

**Untersuchungen zur protektiven Wirkung des
Schilddrüsenhormons (T3) auf die Prozessierung
von APP zu amyloidogenem A β**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Susanne Giersiefer

aus Leverkusen

Düsseldorf, November 2012

aus dem IUF – Leibniz Institut für umweltmedizinische Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Ellen Fritsche
Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung:

Es gibt eine Art, das Leben zu verlängern, die ganz in unserer Macht steht: Früh aufstehen, zweckmäßiger Gebrauch der Zeit, Wählung der besten Mittel zum Endzweck und, wenn sie gewählt sind, muntere Ausführung.

(Georg Christoph Lichtenberg)

I. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Ellen Fritsche für die Überlassung dieses interessanten Themas und die gute fachliche Betreuung bedanken, ganz besonders für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die stetige Unterstützung zu jeder Zeit. Vielen Dank für die motivierenden Gespräche, wenn ich das große Ganze des Projekts aus den Augen verloren habe. Es ist wirklich richtig nett bei uns!

Auch möchte ich Herrn Dr. Dieter Willbold für die fakultätsübergreifende Betreuung danken, durch die meine Dissertation erst möglich war.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Sascha Weggen und seiner Mitarbeiterin Dr. Julia Ness für die freundliche Unterstützung bei der Etablierung der viralen Transduktion und des Aß-Nachweises. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Joachim Altschmied für die vielen Hilfestellungen innerhalb der Etablierung der Transduktion bedanken und PD Dr. Susanne Grether-Beck dafür, dass sie uns einen Platz in ihrem Labor zur Verfügung gestellt hat. Bei Prof. Dr. Fritz Boege und seinen Mitarbeitern Dr. Christian Mielke und Dr. Faiza Kalfalah möchte ich mich für die Bereitstellung der Klonierungsvektoren und die wertvollen Tipps zur Klonierung bedanken. Dafür danke ich auch Dr. Thomas Haarmann-Stemmann.

Auch bei den Mädels aus dem GRK1033 möchte ich mich für die schöne Zeit bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe. Ihr habt mich freundlich aufgenommen und mich stets mit Rat und Tat begleitet, wissenschaftlich wie persönlich. Besonders zu nennen sind Janette Schuwald, Dr. Kathrin Gassmann, Ulrike Hübenthal, Dr. Julia Tigges, Jenny Baumann und Dr. Marta Barenys, die mit mir durch die Höhen und Tiefen der Promotion gegangen sind. Auch bei allen anderen Mitarbeitern der Toxikologie möchte ich mich herzlich bedanken. Danke Denise, Martin, Katharina, Birgit, Katrin, Natalie und Ariana. Es ist mir eine Freude mit Euch zusammenzuarbeiten, da macht Arbeit wirklich Spaß! Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken für den Zuspruch und die Aufmunterungen, wenn es mal scheinbar nicht vorwärtsgehen wollte mit der Promotion.

Zuletzt bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre. Besonders ohne meine Mutter und meinen Ehemann wäre ich während des Zusammenschreibens wahrscheinlich verhungert. Meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Mann danke ich für die Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen.

II. INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	9
1.1	Die Alzheimersche Erkrankung.....	9
1.2	Die Schlüsselrolle der APP-Prozessierung in der Alzheimerschen Erkrankung.....	11
1.2.1	Das Amyloid-Vorläufer-Protein.....	11
1.2.2	Die Prozessierung des APP	13
1.2.3	Die lösliche A β (sA β)-Hypothese	16
1.3	Die Ursachen der Alzheimer-Demenz.....	17
1.4	Der Sortilin-related Rezeptor SorLA.....	20
1.5	Die Rolle von SorLA in der Alzheimerschen Erkrankung.....	21
2	Zielsetzung und Fragestellung	23
3	Material	24
3.1	Geräte.....	24
3.2	Verbrauchsmaterialien.....	25
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	26
3.3.1	Verbrauchsmaterialien	26
3.3.2	Lösungen	27
3.3.3	Enzyme.....	27
3.3.4	Kits	27
3.3.5	Oligonukleotide.....	28
3.3.6	DNS-Längenstandards	28
3.4	Mikrobiologische Methoden.....	28
3.4.1	Verbrauchsmittel	28
3.4.2	Bakterienstämme.....	29
3.4.3	Plasmide	29
3.4.4	Medien.....	29
3.5	Zellbiologische Methoden	30
3.5.1	Zellen.....	30
3.5.2	Medien und Medienzusätze.....	30
3.5.3	Präparation von Mausneurosphären	32
3.5.4	Beschichtung	33
3.5.5	Transfektion	34
3.5.6	Virale Transduktion.....	34
3.5.7	Chemikalien für zelluläre Belastungen	35

3.6	Proteinanalytik.....	35
3.6.1	Verbrauchsmaterialien	35
3.6.2	Lösungen	37
3.6.3	SDS-Page	38
3.6.4	Antikörper für Western Blot Analysen	39
3.6.5	Kits	39
3.7	Software.....	39
4	Methoden	40
4.1	Molekularbiologische Methoden.....	40
4.1.1	RNS-Isolierung aus eukaryotischen Zellen.....	40
4.1.2	Reverse Transkription	40
4.1.3	Isolierung genomischer DNS aus eukaryotischen Zellen.....	41
4.1.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	42
4.1.5	Gelelektrophorese von DNS.....	45
4.1.6	Extraktion der DNS aus präparativen Agarosegelen.....	46
4.1.7	Phenol-Chloroform-Extraktion	47
4.1.8	Alkoholpräzipitation.....	47
4.1.9	Restriktion von DNS	48
4.1.10	Dephosphorylierung von DNS-Enden	50
4.1.11	Glättung und Phosphorylierung von DNS-Enden	50
4.1.12	Ligation	51
4.1.13	Extraktion von Plasmid-DNS aus Bakterien	51
4.1.14	RNS-/DNS-Konzentrationsbestimmung	52
4.2	Mikrobiologische Methoden.....	52
4.2.1	Hitzetransformation von Bakterien	52
4.2.2	Anzucht und Lagerung von Bakterien	53
4.3	Zellbiologische Methoden	54
4.3.1	Kultur von neuronalen Progenitorzellen (NPC).....	55
4.3.2	Kultur von Tumorzelllinien.....	56
4.3.3	Gentechnische Manipulation eukaryotischer Zellen	57
4.4	Proteinanalytik.....	63
4.4.1	SDS-Page und Western Blot Analyse	63
4.4.2	Amyloid- β ELISA	66
4.4.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	67

5	Ergebnisse	68
5.1	Die Charakterisierung der Modellsysteme	68
5.2	Untersuchung des protektiven Effekts von T3 auf die APP-Prozessierung	73
5.2.1	T3 reduziert die Bildung des für die AD pathognomonischen Aß.....	73
5.2.2	Der protektive Effekt von T3 auf die APP-Prozessierung ist abhängig von SorLA	77
5.3	Untersuchung des Mechanismus der T3-abhängigen Aufregulation von SorLA.....	82
5.3.1	Die SorLA-Induktion ist abhängig von Translationsprozessen	82
5.3.2	Analyse des SorLA-Promoters.....	84
6	Diskussion.....	90
6.1	Die Charakterisierung der <i>in vitro</i> Modellsysteme.....	90
6.2	Schilddrüsenhormon und die Alzheimersche Erkrankung	95
6.3	Der molekulare Mechanismus der T3-abhängigen SorLA-Induktion.....	97
6.4	Ausblick.....	101
7	Zusammenfassung.....	102
8	Abstract.....	103
9	Literaturverzeichnis	104
10	Abkürzungsverzeichnis	123
11	Anhang	127
12	Eidesstattliche Erklärung.....	128

III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1 Der Krankheitsverlauf der AD auf klinischer und neuropathologischer Ebene.....	10
Abb. 1.2 Der strukturelle Aufbau des Typ I Membranproteins APP	12
Abb. 1.3 Die Prozessierung und Kompartimentalisierung des APP	14
Abb. 1.2 Übersicht der häufigsten Mutationen in der EOAD	18
Abb. 1.5 Der strukturelle Aufbau von SorLA	20
Abb. 1.6 Modell zur Rolle von SorLA in der APP-Prozessierung	21
Abb. 4.1 Übersicht der verwendeten Zellmodelle.....	54
Abb. 5.1 Die Expression der für die AD kritischen Gene.....	69
Abb. 5.2 Die Expression der Schilddrüsenhormonrezeptoren	70
Abb. 5.3 Die T3-abhängige Regulation von SorLA.....	71
Abb. 5.4 Die adenovirale Überexpression von APP in proliferierenden und differenzierenden hNPC	73
Abb. 5.5 Der Nachweis des für die AD pathognomonischen A β	74
Abb. 5.6 T3 reduziert die Bildung des für die AD pathognomonischen A β	75
Abb. 5.7 Der protektive Effekt des T3 auf die APP-Prozessierung ist unabhängig von der APP-Expression	76
Abb. 5.8 Die Etablierung der lentiviralen Transduktion.....	77
Abb. 5.9 Die Etablierung des lentiviralen SorLA- <i>Knockdown</i>	79
Abb. 5.10 Der protektive Effekt von T3 auf die APP-Prozessierung ist abhängig von SorLA...	80
Abb. 5.11 Die SorLA-Induktion ist abhängig von Translationsprozessen	82
Abb. 5.12 Die Induktion von SorLA ist unabhängig von BDNF.....	83
Abb. 5.13 Das Klonierungsschema der SorLA-Promoter-Konstrukte.....	85
Abb. 5.14 Die Transfektion der SorLA-Promoter-Konstrukte in CaCo2 und HepG2 Zellen .	87
Abb. 5.15 Die Etablierung des 4D-Nucleofector™ Systems	88
Abb. 6.1 Die molekularen Mechanismen des T3-Signaling	99

IV. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 3.1 Die verwendeten Belastungslösungen	35
Tab. 4.1 Die SorLA-Promoter Klonierungsprimer	43
Tab. 4.2 Die Primer zur quantitativen RT-PCR Analyse	45
Tab. 4.3 Die verwendeten Restriktionsenzyme und ihre Funktion	49
Tab. 4.4 Die verwendeten humanen neuralen Progenitorzellen und der Zeitpunkt der Präparation	56
Tab. 4.5 Die SorLA-spezifische shRNS.....	60
Tab. 4.6 Die Bedingungen für die Elektrophorese der zu untersuchenden Proteine.....	64
Tab. 4.7 Die Bedingungen für die Analyse der zu untersuchenden Proteine.....	65

1 EINLEITUNG

1.1 DIE ALZHEIMERSCHE ERKRANKUNG

Altersbedingte Demenzerkrankungen stellen eines der gravierendsten Gesundheitsprobleme der industriellen Gesellschaft dar, da sie zum Einen über Jahre hin sehr belastend für die beteiligten Familien und zum Anderen durch den chronisch progressiven Verlauf auch sozioökonomisch problematisch sind. Demenzerkrankungen betreffen vor allem ältere Menschen, sie sind jedoch keine normalen, sondern pathologische Alterungsprozesse. Entsprechend verschiedener Schätzungen beginnen zwischen 2 und 10 Prozent aller Fälle der Demenz vor dem Alter von 65 Jahren. Die Prävalenz verdoppelt sich alle fünf Jahre ab einem Alter von 65. Die Zahl der Menschen mit Demenz aus dem Jahr 2011 beträgt schätzungsweise 35,6 Millionen weltweit und epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass diese Zahl mit einer alarmierenden Geschwindigkeit weiter wachsen wird. Es wird geschätzt, dass sich die Zahl alle 20 Jahre auf 65,7 Millionen im Jahr 2030 und 115,4 Millionen im Jahr 2050 nahezu verdoppelt (Abb. 1.1 A; Alzheimer's Disease International, 2009). Laut einer Studie über die relative Häufigkeit von Demenz-Subtypen beträgt dabei der Anteil an Alzheimer-Erkrankten 41 Prozent (Stevens *et al.*, 2002) und ihre mediane Überlebenszeit wird auf 7,1 Jahre geschätzt (Fitzpatrick *et al.*, 2005). Eine Heilung ist nach dem aktuellen Stand der Forschung nicht möglich, lediglich eine palliativ-medizinische Behandlung.

Die Alzheimersche Erkrankung (AD), entdeckt 1907 durch Alois Alzheimer, ist eine schleichend fortschreitende neurodegenerative Erkrankung. Neuropathologisch ist die AD durch die extrazellulär gelegenen Plaques, bestehend aus Amyloid β (A β ; Glenner und Wong, 1984), einem Spaltprodukt des Amyloid Vorläuferproteins (*amyloid precursor protein*, APP), und die intraneuronalen neurofibrillären Tangles (NFTs), bestehend aus hyperphosphoryliertem Tau (Abb. 1.1 C; Mirra *et al.*, 1991), charakterisiert. Neueren Forschungsergebnissen zufolge werden die der AD zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen jedoch 10 bis 20 Jahre vor den ersten Symptomen aktiviert (Holtzman *et al.*, 2011). Die Entwicklung neuer Methoden zur Früherkennung der für die AD typischen Amyloidpathologie sowie die präventiver Therapien ist demnach unerlässlich.

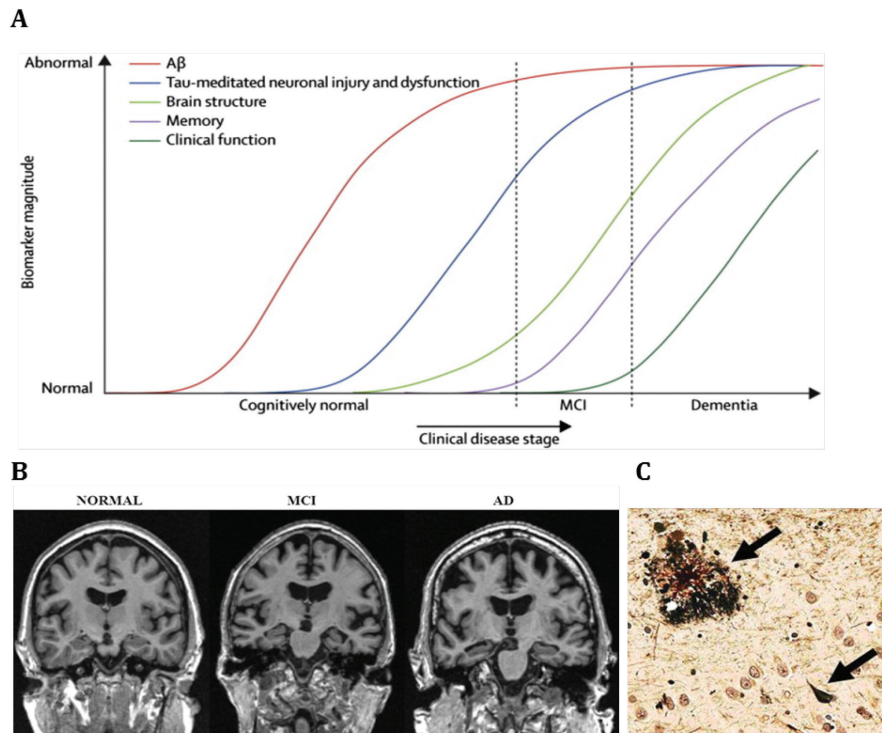


Abb. 1.1 Der Krankheitsverlauf der AD auf klinischer und neuropathologischer Ebene. (A) Hypothetisches Modell der sich verändernden Biomarker im Krankheitsverlauf der AD. Horizontal ist die Progression der AD dargestellt: keine kognitive Beeinträchtigung (*cognitively normal*), mildes kognitives Defizit (MCI), und Demenz (*dementia*). Vertikal ist die Änderung der Biomarker dargestellt - von maximal normal bis maximal abnormal. (B) Magnetresonanztomographie des Hirns eines Gesunden, eines Individuums mit MCI und eines AD Patienten des gleichen Alters. Der Grad der Atrophie ist im AD-Patienten deutlich erhöht. (C) Foto eines senilen Plaques (oben) und neurofibrillären Tangles (unten) eines 85-jährigen mit verifizierter AD (Jack, Jr. *et al.*, 2010; Jack, Jr., 2012).

Nach dem heutigen Stand der Forschung löst die Akkumulation von Aβ eine Kaskade von pathologischen Ereignissen aus, die unter anderem zur extensiven, intrazellulären Ablagerung von NFTs, zur Aktivierung neuroinflammatorischer Mechanismen, zur Erhöhung des oxidativen Stresses, zu Exzitotoxizität, zum Verlust synaptischer Verknüpfungen und schließlich zum Zelltod führen, was sich letztlich in einem Verlust der Hirnmasse manifestiert (zusammengefasst in Hardy und Allsop, 1991; Hardy und Selkoe, 2002 und Vlassenko *et al.*, 2012). Dieser Massenverlust wird durch die Gewichtsbestimmung von AD Gehirnen deutlich. Während die durchschnittliche Hirnmasse des Gesunden 1250 bis 1440 Gramm beträgt, wiegen AD Gehirne nur in etwa 1000 Gramm. Die Atrophie ist dabei symmetrisch und im Frontal-, Temporal-, und Parietallappen besonders stark ausgeprägt. Die lateralen Ventrikel sind vergrößert, Gyri und Hippocampus bilden sich zurück und die lateralen Fissuren sind erweitert (zusammengefasst in Cairns, 2009).

Auf klinischer Ebene beginnt der Krankheitsverlauf mit milden kognitiven Defiziten. Die persönlichen Fähigkeiten der Planung und Organisation verringern sich (Abb. 1.1, violette Linie). Darauf folgt ein Stadium, in dem die Erkrankten mit den Aufgaben des täglichen

Lebens überfordert sind. Während dieser Phase treten Gedächtnisdefizite hinsichtlich alltäglicher Details wie Telefonnummern oder Adressen auf. Sie benötigen Hilfe mit täglichen Aufgaben wie der Auswahl geeigneter Kleidung und bei Routine-Aktivitäten wie dem Baden. Die Patienten leiden außerdem häufig an einer Dysregulation der Schlaf-Wach-Zyklen. Das Bewusstsein für die Umgebung nimmt ebenfalls ab und ist von dem Verlust der Fähigkeit sich an jüngste Ereignisse und Aktivitäten zu erinnern begleitet. Im letzten Stadium sind die Patienten in der Regel pflegebedürftig und nehmen ihre Umgebung überhaupt nicht mehr wahr. Ihre Kommunikation beschränkt sich auf kurze Sätze oder einzelne Wörter. Auch die Reflexe funktionieren nicht mehr normal. Sie verlieren die Fähigkeit sich aufzusetzen, zu lächeln und zu schlucken (zusammengefasst in Lupien *et al.*, 2009). Todesursachen der an AD Erkrankten sind häufig allgemeine Entkräftung, Unterernährung, und/oder Lungenentzündung (zusammengefasst in Bird, 2008).

Es existieren mehrere Subtypen der AD, die sporadische sowie die familiäre Form. Diese basieren alle auf der pathophysiologischen Prozessierung des APP und sind neuropathologisch nicht voneinander zu unterscheiden.

1.2 DIE SCHLÜSSELROLLE DER APP-PROZESSIERUNG IN DER ALZHEIMERSCHEN ERKRANKUNG

1.2.1 DAS AMYLOID-VORLÄUFER-PROTEIN

Wie in Abb. 1.1 A zu sehen, ist das A β -Peptid für die Entstehung der AD von primärer Bedeutung (zusammengefasst in Vlassenko *et al.*, 2012). Dieses für die AD pathognomonische A β ist ein Prozessierungsprodukt des APP. Das APP-kodierende Gen ist auf dem Chromosom 21 lokalisiert (Kang *et al.*, 1987; Tanzi *et al.*, 1987) und besteht aus 18 alternativ gespliceten Exons (Yoshikai *et al.*, 1990). Die häufigsten durch alternatives *Splicing* entstehenden Isoformen sind das APP₆₉₅, das APP₇₅₁ mit einer Kunitz Typ II Protease Inhibitor Domäne und das APP₇₇₀, welches die Kunitz und eine Ox2-ähnliche Domäne enthält (Abb. 1.2; Kang *et al.*, 1987; Kitaguchi *et al.*, 1988; Tanzi *et al.*, 1988; Ponte *et al.*, 1988).

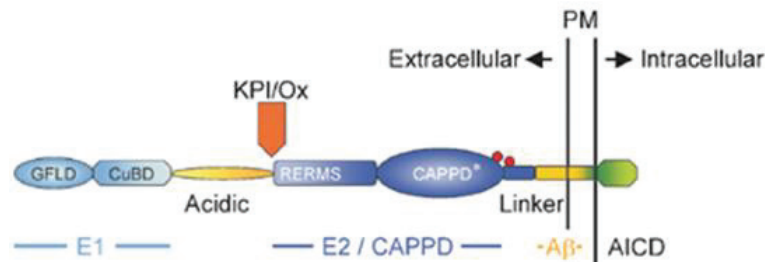


Abb. 1.2 Der strukturelle Aufbau des Typ I Membranproteins APP. Die N-Terminal liegende E1-Domäne besteht aus der einem Wachstumsfaktor ähnlichen Domäne GFLD und der Kupfer bindenden Domäne CuBD. Sie ist über die azide Domäne mit der E2-Domäne verbunden, die aus der zentralen APP-Domäne (CAPPD) und einem Linker besteht. Innerhalb dieses Bereichs liegen zwei Glykosylierungsstellen. Daraufhin schließt sich die Transmembrandomäne an, gefolgt vom intrazellulären Teil des APP (AICD). Aβ markiert den Bereich der Amyloid-Peptidsequenz. Die Kunitz Typ II Protease Inhibitor Domäne des APP_{751/770} und die Ox2-Sequenz des APP₇₇₀ liegen zwischen der aziden und der E2-Domäne (zusammengefasst in Reinhard *et al.*, 2005) .

Evolutionär ist das APP stark konserviert mit nahezu vollständiger Homologie zu den Aminosäuresequenzen von Maus und Ratte (Yamada *et al.*, 1987; Shivers *et al.*, 1988). Auch in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* wurden homologe Proteine beschrieben (Rosen *et al.*, 1989; Daigle und Li, 1993). In Säugetieren gibt es zudem zwei weitere dem APP ähnliche Proteine (APP-like protein 1/2 - APLP1/2; Wasco *et al.*, 1992; Wasco *et al.*, 1993; Coulson *et al.*, 2000).

Mittels Northern Blot Analysen wurde die APP-mRNS in nahezu allen Geweben von 20 bis 22 Wochen alten humanen Föten nachgewiesen. Am stärksten ist das APP im Hirn, im Herz, in der Milz, der Niere, der Bauchspeicheldrüse und dem Muskel exprimiert (Tanzi *et al.*, 1987). Dabei nimmt die Isoform APP₆₉₅ den größten Teil des im Gehirn des Menschen und der Ratte gebildeten APP ein, während die längeren Splicevarianten eher in peripheren Geweben vorkommen (Mita *et al.*, 1989; Tanaka *et al.*, 1989). Im Gehirn der Ratte wird APP hauptsächlich in Neuronen und nicht in Gliazellen exprimiert (Mita *et al.*, 1989).

Aufgrund seiner sequenzspezifischen Eigenschaften, die charakteristisch für glykosylierte Membranrezeptoren sind, wurde schon früh vermutet, dass auch APP als Transmembranrezeptor fungiert (Kang *et al.*, 1987). Durch seine hohe Expression im Gehirn wurde seine Funktion in neuronalen Zellen besonders eingehend studiert. So wurde APP in neuronalen Endigungen sowie der extrazellulären Matrix gefunden, was Funktionen im Zell-Zell-Kontakt sowie beim Neuritenwachstum suggerierte (Whitson *et al.*, 1989; Klier *et al.*, 1990; Whitson *et al.*, 1990). Später wurde beispielsweise bestätigt, dass APP an der Progenitorzellmigration im sich entwickelnden Gehirn beteiligt ist (Young-Pearse *et al.*, 2007). Zudem zeigen gen-manipulierte, APP-defiziente Mäuse, dass APP wesentlich zur Synapsenbildung beiträgt: APP-Verlust führt zu Veränderungen in der Dendritenlänge und ihrer Komplexität. Dies geht mit einem Funktionsverlust in der synaptischen Übertragung

einher, was letztlich zu einer Störung der Langzeitpotenzierung (LTP), einem Maß für Lernen und Gedächtnis, führt (Tyan *et al.*, 2012). Außerdem kolokalisiert APP mit NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) -Rezeptoren in der postsynaptischen Membran und steigert so die NMDA-Rezeptor abhängige Reizweiterleitung an exzitatorischen Synapsen (Hoe *et al.*, 2009).

Multiple Funktionen des APP wurden bis heute gefunden. Neben den oben erwähnten als Oberflächen-Rezeptor, Adhäsionsmolekül und Regulator neuronaler Prozesse fungiert APP außerdem als Signalmolekül, Regulator der Kalzium- und Metall-Homöostase sowie als neurotrophischer bzw. apoptotischer Faktor (zusammengefasst in Reinhard *et al.*, 2005). Viele von diesen Funktionen werden allerdings nicht durch das APP selbst ausgelöst, sondern durch die Spaltprodukte, die aus der proteolytischen Prozessierung des Proteins resultieren. Dabei wirken sich nicht alle APP-Prozessierungsprodukte positiv auf die Homöostase der Zellen aus.

1.2.2 DIE PROZESSIERUNG DES APP

Für die Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung ist die Prozessierung des APP zu spezifischen, pathognomonischen Spaltprodukten Voraussetzung. An der Spaltung des APP sind drei Sekretasen beteiligt: α -Sekretase (ADAM; *a disintegrin and metalloprotease*), β -Sekretase (BACE; *β -site APP cleaving enzyme*) und γ -Sekretase. Außerdem spielt die Kompartimentalisierung des APP eine wichtige Rolle, da z.B. die γ -Sekretase APP nicht an der Zelloberfläche spalten kann, jedoch in den späten endosomalen Kompartimenten des Intrazellularraums. Es bestehen zwei Wege der APP-Prozessierung, ein sogenannter amyloidogener, pathophysiologischer (A β durch β - und γ -Sekretase; Abb. 1.3 A) und ein nicht-amyloidogener, physiologischer (α - und γ -Sekretase; Abb. 1.3 A). Die Spaltung des C-Terminus durch Caspasen ist dabei Bestandteil beider Wege. Die Caspase schneidet innerhalb der zytoplasmatischen Domäne zwischen γ -Sekretase-Schnittstelle und C-Terminus. Generiert werden die Fragmente Jcasp und C31 (Abb. 1.3 A; Lu *et al.*, 2000), denen beiden eine zytotoxische Wirkung nachgewiesen wurde (Lu *et al.*, 2003). Auch die Prozessierung durch die γ -Sekretase ist Bestandteil beider Wege. Sie besteht aus einem in der Zellmembran liegenden Multiproteinkomplex mit den vier Untereinheiten Präsenelin 1 oder 2 (PSEN 1/2), Präsenelin Enhancer 2 (PEN-2), Anterior-Pharynx-Defective (APH-1) und Nicastrin und alle vier sind essentiell für die proteolytische Aktivität der katalytischen Untereinheit PSEN

(zusammengefasst in De Strooper B., 2003). Die γ -Sekretase-Schnittstellen liegen innerhalb der Transmembrandomäne des APP. Durch multiple Schnittstellen an den Aminosäuren 40, 42, 46 und 49 des A β -Peptids generiert sie die C-terminalen Fragmente (AICD - APP intracellular domain, siehe Abb. 1.3 A) und die löslichen Fragmente unterschiedlicher Länge, welche aus der α - bzw. β -Sekretase vermittelten Spaltung hervorgegangen sind (Weidemann *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005). Die γ -Sekretase-Prozessierung erfolgt in den späten endosomalen und sekretorischen Kompartimenten (Abb. 1.3 B ③; zusammengefasst in De Strooper B. und Annaert, 2010). Die AICD im nicht geschnittenen APP ist über die YENPTY-Aminosäuresequenz essentiell für die Internalisierung (Perez *et al.*, 1999). Außerdem sind die löslichen AICD in die Transkriptionsregulation involviert (Kimberly *et al.*, 2001; Cao und Sudhof, 2004; Chang *et al.*, 2006).

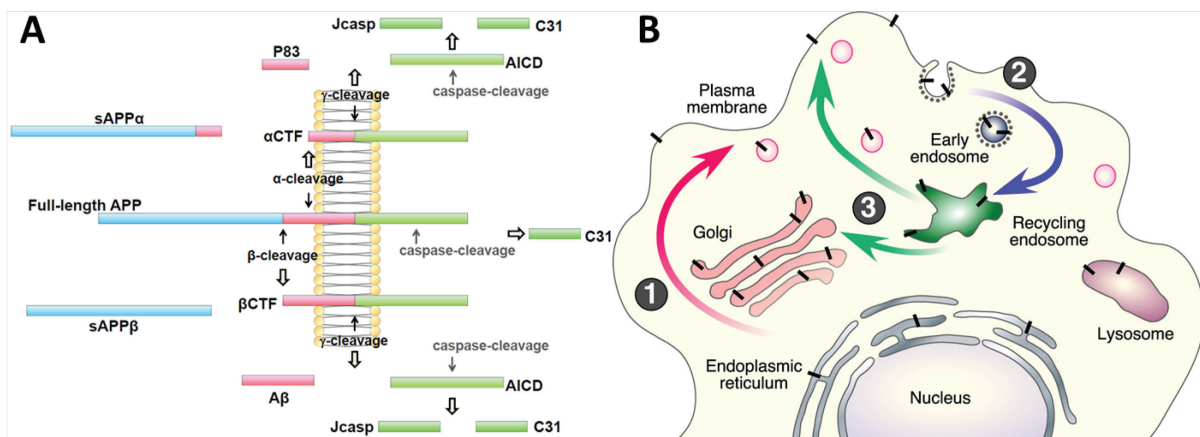


Abb. 1.3 Die Prozessierung und Kompartimentalisierung des APP. (A) Schematische Darstellung der APP-Prozessierung (aus Zhang *et al.*, 2011). (B) Intrazelluläre Verteilung von APP. Synthetisierte APP Moleküle (schwarze Balken) reifen innerhalb des konstitutiven sekretorischen Weges ①. Erreicht APP die Zelloberfläche, wird es schnell internalisiert ② und anschließend mittels der endosomalen Kompartimente zurück an die Zellmembran gebracht ③ oder lysosomal degradiert. Die nicht-amyloidogene Prozessierung findet größtenteils an der Zellmembran statt, während die amyloidogene in den endozytotischen Organellen stattfindet (aus Thinakaran und Koo, 2008).

Als potentielle Enzyme mit α -Sekretase-Aktivität wurden die Mitglieder der Disintegrin- und Metalloprotease Familie ADAM9, 10 und 17 identifiziert (Buxbaum *et al.*, 1998; Koike *et al.*, 1999; Lammich *et al.*, 1999). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion sowie der proteolytischen Spaltung von Zelloberflächenrezeptoren und Signalmolekülen (zusammengefasst in Edwards *et al.*, 2008). Dabei ist ADAM 10 die im Hirn am stärksten exprimierte (Chantry und Glynn, 1990; Howard *et al.*, 1996) und in Neuronen die physiologisch relevante Isoform zur konstitutiven Spaltung des APP (Kuhn *et al.*, 2010). Die

Spaltung durch die α -Sekretase führt durch die Spaltung des für die AD pathognomonischen A β zur Freisetzung des löslichen APP α (sAPP α) und zu einem in der Membran verbleibenden C-terminalen Fragment (Esch *et al.*, 1990), das durch die γ -Sekretase zu p83 und der AICD weiter prozessiert wird (Abb. 1.3 A, zusammengefasst in Zhang *et al.*, 2011). Die Prozessierung des APP durch die α -Sekretase findet mehrheitlich in den Kompartimenten des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) und an der Plasmamembran statt (Abb. 1.3 B ❶; Esch *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1991). Dieser Weg der Prozessierung wurde wegen der positiven Effekte des sAPP α als physiologisch bezeichnet. sAPP α wirkt proliferativ, neurotrophisch und neuroprotektiv (Mattson *et al.*, 1993; Mucke *et al.*, 1996).

Die β -Sekretasen gehören zu den Aspartyl-Proteasen, sind ebenfalls membranständig und auch hier sind mehrere homologe Proteine (BACE1/2) identifiziert worden (Yan *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Farzan *et al.*, 2000). Beide Enzyme werden in neuronalen Geweben exprimiert, BACE2 allerdings zu einem geringeren Teil und vorwiegend in Gliazellen (Bennett *et al.*, 2000; Laird *et al.*, 2005). Zudem weist die Prozessierung des APP durch BACE2 Ähnlichkeiten zur Proteolyse durch die α -Sekretase auf, da sie effizient innerhalb der A β -Sequenz schneidet (Farzan *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2001b). Beide Enzyme sind in den post-Golgi Membranen lokalisiert (Abb. 1.3 ❷; Yan *et al.*, 2001a; Ehehalt *et al.*, 2002). BACE1 prozessiert APP an den Aminosäuren 1 und 11 innerhalb der A β -Sequenz. So entstehen das lösliche sAPP β und die CTF β (C-Terminale Fragmente). Die weitere Spaltung durch die γ -Sekretase führt zu dem für die AD pathognomonischen A β und zur Freisetzung der AICD. Aus γ -Sekretase-Spaltung können vier unterschiedliche Peptide der Längen 40, 42, 46 und 49 hervorgehen (Abb. 1.3 A; zusammengefasst in Zhang *et al.*, 2011). Die Sezernierung dieser in etwa 4 kDa großen Peptide wurde in humaner Zerebrospinalflüssigkeit, Plasma und Zellkulturüberständen nachgewiesen (Haass *et al.*, 1992; Seubert *et al.*, 1992). Dabei nimmt A β_{40} etwa 90 Prozent und A β_{42} 5 bis 10 Prozent der A β -Last ein (Dovey *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1994). Weiterhin wurden jedoch auch Spaltprodukte anderer Längen gefunden (Vigo-Pelfrey *et al.*, 1993). Von all den Spaltprodukten weist das hydrophobe A β_{42} allerdings das stärkste Aggregationspotential auf und hat in Zellkultursystemen die größte Toxizität (Jarrett *et al.*, 1993; El-Agnaf *et al.*, 2000).

1.2.3 DIE LÖSLICHE A β (sA β)-HYPOTHESE

Lange Zeit wurden die senilen Plaques als Auslöser der progressiven Neurodegeneration in der Alzheimerschen Erkrankung angesehen (zusammengefasst in Hardy und Allsop, 1991). Bald stellte sich jedoch heraus, dass die Anzahl der senilen Plaques nicht mit den Symptomen der Demenz korrelierten (Braak und Braak, 1991). 1998 konnte dann gezeigt werden, dass nicht-fibrilläre A β -Derivate, sogenannte ADDL (*A β derived diffusible ligands* oder lösliche A β -Derivate (sA β)) potente Neurotoxine sind, die sich auf die LTP auswirken. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass die zuerst gestörte synaptische Plastizität durch Interaktion dieser sA β -Derivate mit neuronalen Signalwegen zur Abnahme der Gedächtnisleistung innerhalb der frühen Stadien des Krankheitsverlaufs führt, sich dann in der schweren, zellulären Degeneration und der Demenz manifestiert (Lambert *et al.*, 1998). Bestätigt werden konnte dies in APP-überexprimierenden Mausmodellen. Der Nachweis von löslichen A β -Spezies stimmte mit dem Verlust von Synapsen überein (Mucke *et al.*, 2000). Auch in humanen AD-Hirnextrakten korrelierte die Konzentration von löslichem A β mit dem Verlust von Synapsen (Lue *et al.*, 1999). Die direkte Verbindung zwischen den ADDL und Synapsen wurde durch den Nachweis der Kolokalisation der ADDL mit dem postsynaptischen Marker PSD-95 (*postsynaptic density protein 95*) geschaffen (Lacor *et al.*, 2004).

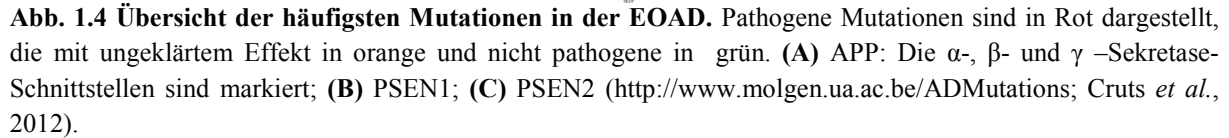
Wie genau der Mechanismus, der durch die ADDL ausgelösten Synaptotoxizität funktioniert, ist bis heute nicht geklärt. Snyder *et al.* (2005) postulierten, dass die Interaktion von A β_{42} mit dem $\alpha 7$ -nikotinergen Rezeptor zu einer reduzierten NMDA-Rezeptordichte an den Synapsen führt. Dies wiederum stört die glutaminerge Transmission und in Folge die synaptische Plastizität. Des Weiteren könnte die direkte Bindung des A β an NMDA-Rezeptoren exzitotoxisch wirken. Dies induziert den Verlust von Dendriten und führt zu synaptischer Depression (Kamenetz *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2010). Außerdem soll A β die Anhäufung und Aktivierung von muskarinergen Glutamat-Rezeptoren auslösen, was zu einer Erhöhung des postsynaptischen, intrazellulären Kalziums und synaptischen Defekten führt (Renner *et al.*, 2010). Als weitere Möglichkeit könnte A β die Glutamat-Wiederaufnahme inhibieren und indirekt die nicht-physiologische Überaktivierung von NMDA-Rezeptoren hervorrufen (Li *et al.*, 2009).

Da die verschiedenen A β -Spezies physiologisch in geringen Konzentrationen während des ganzen Lebens im Gehirn vorkommen, ist es derzeit nicht bekannt, durch welche Mechanismen die pathologische Überproduktion einzelner A β -Formen im Gehirn hervorgerufen werden.

1.3 DIE URSACHEN DER ALZHEIMER-DEMENTZ

Obwohl die pathophysiologische Endstrecke der AD durch einen gemeinsamen Mechanismus, nämlich die Generierung von A β , geprägt ist, gibt es verschiedene Ursachen der AD. So sind seltene, familiäre, früh einsetzende (*early-onset Alzheimer's Disease*, EOAD) und häufige, nicht-familiäre, spät einsetzende (*late-onset Alzheimer's Disease*, LOAD) Formen gut dokumentiert. Die Letzteren werden häufig auch als „sporadische“ Formen der AD beschrieben. Es gibt jedoch eine wachsende Zahl von Anzeichen dafür, dass ein großer Teil dieser Fälle wesentlich durch genetische Faktoren beeinflusst ist (zusammengefasst in Bertram und Tanzi, 2008). Tatsächlich liegt in über 25 Prozent aller AD-Erkrankungen eine familiäre Prädisposition vor, d. h. zwei oder mehr Personen in einer Familie sind betroffen. Von diesen leiden etwa 95 Prozent an der spät beginnenden und 5 Prozent an der früh beginnenden AD (vor dem Alter von 65 Jahren). In den verbleibenden Fällen unbekannter Ursache werden Kombinationen aus Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition diskutiert (zusammengefasst in Bird, 2008). Diese oben genannten Beobachtungen, dass der Einfluss der genetischen Faktoren in der AD hoch ist und dass nicht-genetische Risikofaktoren einen ebenso großen Stellenwert einnehmen, wurde in der größten bisher durchgeführten Zwillingsstudie bestätigt. Diese Studie zeigte zudem, dass Umweltfaktoren, wie z.B. der Lebensstil, sowohl das Risiko an AD zu erkranken als auch den Zeitpunkt des Ausbruchs der AD mitbestimmen (Gatz *et al.*, 2006). Weitere epidemiologische Befunde deuten darauf hin, dass ein niedriger Bildungsstand, ein Schädeltrauma, hochkalorische, fettreiche Ernährung und Bewegungsmangel das Risiko an AD zu erkranken erhöhen (zusammengefasst in Mattson, 2004). Auch Schwermetalle und Pestizide sowie elektromagnetische Felder stehen im Verdacht kausal an der AD beteiligt zu sein (zusammengefasst in Brown *et al.*, 2005).

Die EOAD nimmt den geringsten Teil der diagnostizierten Alzheimer Dementzen ein. In ungefähr 1 bis 6 Prozent aller AD-Fälle manifestiert sich die Krankheit vor dem 60. Lebensjahr (zusammengefasst in Bird, 2008). Ursache der sehr seltenen EOAD ist die autosomal dominante Vererbung einzelner Mutationen in einem von drei Genloci (APP, PSEN1 und PSEN2). Alle Mutationen in den genannten Genen führen eine Änderung der APP-Prozessierung herbei und wirken somit auf die Generierung des für die AD pathognomonischen A β (zusammengefasst in Bertram und Tanzi, 2008). Mutationen innerhalb des APP-Gens sind verantwortlich für etwa 10 bis 15 Prozent der EOAD-Erkrankungen. Die Mehrzahl dieser Mutationen, die primär nahe der Sekretase-Schnittstellen liegen, ist innerhalb oder benachbart zu der A β -Sequenz lokalisiert (Abb. 1.4 B). Das



und 2 konserviert sind. (zusammengefasst in Rubinsztein, 2001). Mutationen im PSEN1-Gen lösen eine früh einsetzende und im Alter des Ausbruchs konsistente AD aus, während PSEN2-Defekte durch ein späteres und variableres Einsetzen der Symptomatik charakterisiert sind (zusammengefasst in Hardy und Hutton, 1995).

Im Gegensatz zu der EOAD weist die LOAD oder „sporadische“ Form der AD kein autosomal dominantes Vererbungsmuster auf und es ist oft keine offensichtliche familiäre Häufung erkennbar. Sie wird wahrscheinlich durch eine Reihe gemeinsamer Risiko-Allele in einer Reihe von verschiedenen Genen ausgelöst. Diese Gene betreffen verschiedene Stoffwechselwege, von denen einige am A β -Metabolismus beteiligt sind (zusammengefasst in Bertram und Tanzi, 2008).

Nach dem aktuellen Stand der Forschung konnte einzig für das ϵ 4-Allel des Apolipoproteins E (APOE) ein konsistenter Zusammenhang zur AD nachgewiesen werden (Abb. 1.3; zusammengefasst in Bertram und Tanzi, 2008). In AD-Hirnen kolokalisieren ApoE und A β innerhalb der senilen Plaques (Strittmatter *et al.*, 1993) und auch die Menge der senilen Plaques ist in Trägern des ϵ 4-Allels erhöht (Schmechel *et al.*, 1993; Rebeck *et al.*, 1993). Ein identisches Bild ergab auch die Expression humaner ApoE-Isoformen in AD-Mausmodellen (Holtzman *et al.*, 1999; Fagan *et al.*, 2002; DeMattos, 2004). Die Expression des ϵ 4-Allels führt zum Einen zu einer verstärkten Aggregation der toxischen A β -Peptide (Wisniewski *et al.*, 1994; Castano *et al.*, 1995), und zum Anderen verlangsamt es die Elimination durch die direkte Degradation von A β unter Beteiligung von Mikroglia (Jiang *et al.*, 2008) sowie den Abtransport über die Blut-Hirn-Schranke durch Familienmitglieder der LDL (*low density lipoprotein*)-Rezeptorfamilie (Deane *et al.*, 2008).

Mittlerweile wurden in genomweiten Assoziationsstudien weitere LOAD-Risikogene entdeckt, die wie ApoE am A β -Metabolismus beteiligt sind. Eines dieser mit der AD assoziierten Gene ist der *Sortilin-related receptor with A-type repeats* (SorLA oder LR11, Rogaeva *et al.*, 2007).

1.4 DER SORTILIN-RELATED REZEPTOR SORLA

Das SORL1-Gen, welches für SorLA, ein 250 kDa großes Membranprotein, kodiert, ist auf dem Chromosom 11 lokalisiert (Jacobsen *et al.*, 1996). SorLA wird ubiquitär exprimiert, zeigt jedoch die höchste Expression in neuronalen Geweben wie dem Hippokampus und dem zerebralen Cortex (Hermans-Borgmeyer *et al.*, 1998; Kanaki *et al.*, 1998).

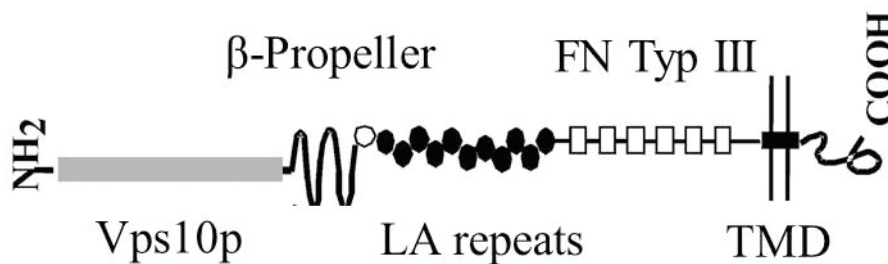


Abb. 1.5 Der strukturelle Aufbau von SorLA. SorLA besteht aus einer *vacuolar protein sorting 10 protein*-Domäne (Vps10p) gefolgt von fünf (F/Y)WTD/β-Propeller-Domänen, 11 *LDL-receptor class A (LA) repeats* (LA repeats), sechs Fibronektin Typ III repeats (FN Typ III), einer Transmembrandomäne (TMD) und einem zytoplasmatischen C-Terminus (Jacobsen *et al.*, 2001).

SorLA bildet ein Bindeglied zwischen der Vps10p (*vacuolar protein sorting 10 protein*)-Domänen- und der LDL-Rezeptorfamilie. Für die erste Familie ist die luminaire Vps10p-Domäne charakteristisch (Jacobsen *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 1997). Diese trägt ein Propeptid, das in den späten Kompartimenten des TGN abgespalten wird (Jacobsen *et al.*, 2001). Die zweite zeichnet sich durch die innerhalb der LDL-Rezeptoren charakteristischen *LDL-receptor class A (LA) repeats* und die folgende β-Propeller-Domäne aus (Abb. 1.5; Jacobsen *et al.*, 1996). SorLA ist deshalb auch als *Low Density Lipoprotein-Rezeptor* (LR11) bekannt (Yamazaki *et al.*, 1997). Die zuvor erwähnten LA repeats interagieren beispielsweise mit Komponenten des Plasminogen-aktivierenden Systems, PDGF (*platelet-derived growth factor*), RAP (*receptor-associated protein*), ApoE und Apolipoprotein AV (Jacobsen *et al.*, 1996; Gliemann *et al.*, 2004; Nilsson *et al.*, 2007; Nilsson *et al.*, 2008). Zudem bewegt sich SorLA zwischen dem TGN und den späten Endosomen (Jacobsen *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2007). Über die zytoplasmatische Domäne interagiert SorLA mit verschiedenen zellulären Adaptern wie AP-1 (*adaptor-protein-1*), GGA (*Golgi-localized, γ-ear-containing, ARF-binding proteins*) und dem Retromerkomplex (Jacobsen *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2007). Subzellulär liegt SorLA zu etwa 10 Prozent an der Zellmembran und zu 90 Prozent in den Kompartimenten des Golgi-Apparats vor (Jacobsen *et al.*, 2001).

SorLA wurde erstmals 2004 mit der AD in Verbindung gebracht, da immortalisierte Lymphoblasten von Alzheimer-Patienten eine wesentlich niedrigere SorLA-Expression als

gesunde Kontrollen aufwiesen (Scherzer *et al.*, 2004). Zudem fand sich eine verminderte SorLA Expression in postmortalen Hirnen von Patienten mit *mild cognitive impairment* oder der sporadischen AD (Dodson *et al.*, 2006; Sager *et al.*, 2007), sowie in der Zerebrospinalflüssigkeit von durch Autopsie-verifizierten AD-Fällen (Ma *et al.*, 2009). Außerdem fehlt selektiv in den von der AD am stärksten betroffenen Hirnregionen die Expression von SorLA (Offe *et al.*, 2006). Molekularepidemiologische Studien fanden zudem polymorphe Genvarianten von SorLA, die zur verminderten SorLA Transkription sowie Translation führen und mit der sporadischen AD assoziiert sind (Rogaeva *et al.*, 2007; Caglayan *et al.*, 2012).

1.5 DIE ROLLE VON SORLA IN DER ALZHEIMERSCHEN ERKRANKUNG

Aufgrund der oben beschriebenen (Kap.1.4) molekularen und molekularepidemiologischen Daten beim Menschen gab es Hinweise, dass SorLA möglicherweise protektiv für die AD sein könnte. Die molekularen Mechanismen, die diese Annahme unterstützen, wurden in den letzten Jahren aufgeklärt, sodass es mittlerweile durch Zell-, und Tierstudien unbenommen ist, dass SorLA einen für die AD protektiven Faktor darstellt.

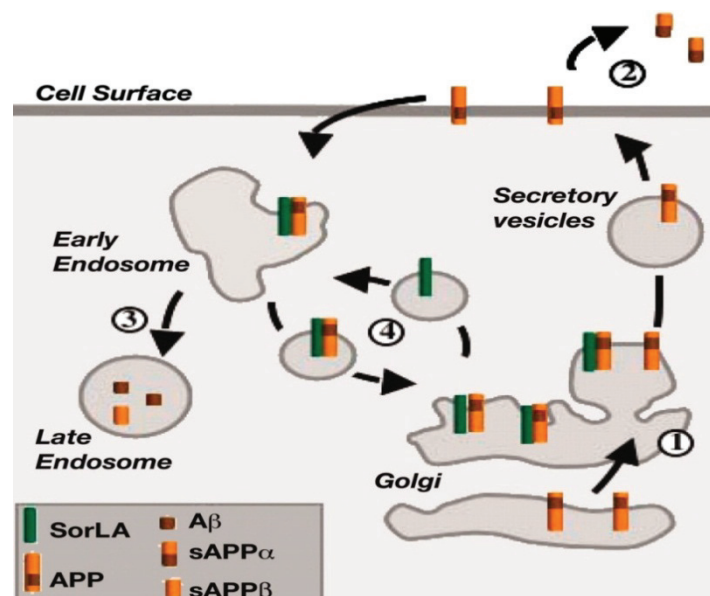


Abb. 1.6 Modell zur Rolle von SorLA in der APP-Prozessierung. Neu synthetisiertes APP wird aus den Golgi-Kompartimenten zur Plasmamembran transportiert ①, wo die Spaltung zu sAPPα erfolgen kann ②. Nicht-prozessiertes APP wird von der Plasmamembran in die späten endosomalen Kompartimente endozytiert und kann dort zu sAPPβ und Aβ prozessiert werden ③. SorLA fungiert als ein Sortierrezeptor, der APP in den Golgi-Kompartimenten festhält und so den Transport zur Zellmembran zur weiteren Prozessierung verhindert.

Des Weiteren transportiert SorLA APP möglicherweise aus den frühen Endosomen zurück zum Golgi-Apparat und reduziert so zusätzlich die A β -Produktion in den späten Endosomen ④ (Andersen *et al.*, 2005).

Die Studien von Anderson *et al.* (2005) waren dabei maßgeblich und werden im Folgenden beschrieben. In Zellkulturexperimenten zeigten sie, dass SorLA die APP-Prozessierung reguliert. Dabei interagiert SorLA mit APP in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 über die *LA repeats* von SorLA und die CAPPD des APP (Abb. 1.2 & 1.5; Andersen *et al.*, 2006). Die Analyse der subzellulären Lokalisation beider Proteine ergab, dass APP alleine hauptsächlich im endoplasmatischen Reticulum (ER) und an der Plasmamembran vorliegt (Abb. 1.6 ②), während sich die subzelluläre Verteilung durch die Expression/Interaktion von/mit SorLA in Richtung der frühen Endosomen und der Kompartimente des Golgi-Apparates verschiebt (Abb. 1.6 ①). Diese Änderung des Aufenthaltsorts ging außerdem mit einer deutlichen Reduktion der APP-Prozessierungsprodukte einher. Dass die subzelluläre Lokalisation und die Funktionalität von SorLA von seiner zytoplasmatischen Domäne abhängig sind, zeigten entsprechende Deletionsversuche. Das Fehlen funktioneller Bindestellen für GGA-1, PACS-1 (*Phosphofurin acidic cluster sorting protein-1*), RAP und ROCK2 (*Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2*) innerhalb von SorLA kann zu einer erhöhten amyloidogenen Prozessierung führen (Schmidt *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008; Herskowitz *et al.*, 2011; Herskowitz *et al.*, 2012). Zusätzlich reduziert SorLA durch direkte Interaktion mit der Sekretase BACE die Bildung des APP-BACE-Komplexes (Spoelgen *et al.*, 2006), was ebenfalls die Prozessierung zum amyloidogenen A β konterkariert.

Diese *in vitro* Ergebnisse wurden außerdem *in vivo* bestätigt. Wildtyp-Mäuse zeigten gemäß der protektiven SorLA-Hypothese eine erheblich geringere A β -Last als SorLA-*Knockout* Tiere. Aus diesen Befunden wurde das in Abb. 1.6 dargestellte Modell zur Rolle von SorLA in der APP-Prozessierung generiert und es entstand das Arbeitsmodell, dass in der umgekehrten Situation, wie sie innerhalb der AD vorliegt, ein Verlust von SorLA zur erhöhten Produktion des A β führt. So zeigt beispielsweise eine SorLA-Defizienz im AD-Mausmodell eine frühe Gendosis-abhängige Entwicklung der AD-Pathologie (Dodson *et al.*, 2008).

2 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG

Eine endogene Substanz, die schon lange in Verbindung mit Demenzerkrankungen gebracht wurde, ist das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin (T3). So kann Hypothyreoidismus die Symptome einer Demenz verursachen (zusammengefasst in Dugbartey, 1998). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ist im Rahmen von Microarrayuntersuchungen T3 als positiver Modulator von SorLA in humanen neuronalen Progenitorzellen identifiziert worden (Moors & Fritsche, unpublizierte Beobachtung). Da sowohl der Wirkmechanismus von SorLA bekannt ist als auch seine Assoziation mit der AD wiederholt von verschiedenen Gruppen bestätigt wurde, wird SorLA als präventivmedizinische Zielstruktur diskutiert, deren Modulation die Entstehung oder Progression der sporadischen AD reduzieren könnte (Scherzer *et al.*, 2004; Offe *et al.*, 2006; Rogaeva *et al.*, 2007).

Innerhalb dieser Arbeit sollten deshalb den Fragen nachgegangen werden, ob und wie das Schilddrüsenhormon T3 präventiv auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins zum amyloidogenen A β wirkt.

Dazu wurden die folgenden Ziele verfolgt:

- i. Charakterisierung verschiedener *in vitro* Modellsysteme: Untersuchungen der Expression hinsichtlich der in der AD pathologischen Faktoren APP, α -, β - und γ -Sekretase sowie die der Schilddrüsenhormonrezeptoren und der T3-abhängigen SorLA-Expression.
- ii. Identifizierung des Mechanismus, welcher zur Aufregulation von SorLA durch T3 führt.
- iii. Verifizierung des SorLA-abhängigen, protektiven Effekts von T3 auf die APP-Prozessierung zum A β .

3 MATERIAL

3.1 GERÄTE

8-Kanalpipette; 10-100 µL	Eppendorf
Arrayscan	Thermo Scientific
Autoklav	KSG GmbH, Bioklav
Binokular	Olympus
Eismaschine	Scotsman
Entwicklermaschine	Protec
Feinwaage	Satorius, A200S
Flachbettapparatur	Easy Cast Elektrophoresis System
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss
Geldokumentation	Intas
Gewebezerkleinerer	McIllwain Tissue Chopper, Vibratome
Heizblock	Mixing Block MB-102, Bioer
Inkubationsschüttler	Infors AG
Inkubator	HeraCell 240, Heraeus
Kamera	VisitronSystems
Lichtmikroskop	CKX41, Olympus
Magnetrührer	Monotherm
Multimode Reader	Tecan
Netzgeräte	Pharmacia Biotech
pH-Meter	WTW, pH537
Pipetten 0,5-10; 10-100; 100-1000 µl	Eppendorf
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Robocycler	Stratagene
Rotor-Gene Q	Qiagen
RT-Block	Biometra
SDS-PAGE/Wet Blotting Kammer	BioRad
Sterilbank	HeraGuard, Heraeus
	MSC Advantage, Thermo Scientific

Waage	Satorius, 1204MP
Wärmeschrank	Memmert
Wasserbad	Lauda
Wasser-Deionisierer	Milli-Q, Millipore
Zählkammer (Neubauer/Nageotte)	Marienfeld
Zentrifugen	Mikro 22R, Hettich Zentrifugen Sorvall Evolution RC Rotina 420R, Hettich Heraeus Fresco 17, Thermo Scientific

3.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

100 x 20 mm Petrischalen	BD Falcon
3 kDa Cut-off Säulen	Millipore
60 x 15 mm Petrischalen	Greiner
8-Kammerobjektträger	BD-Falcon
Bottle Top Filter	Sarstedt
Centricon®Plus-70 Centrifugal Filter Devices	Millipore
Deckgläschen	Menzel Gläser
Durapore™ 0.45 µm Stericup	Millipore
Einwegpasteurpipetten	Roth
Einwegpipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One/Sarstedt
Kryoröhrchen	Greiner
Multiwellplatten	Greiner
Parafilm	Pechinery
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl, mit/ohne Filter)	Biozym
Rasierklingen	Wilkinson
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf

Sterilfilter	Pall
Striptubes	LTF-Labortechnik
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellschaber	Costar

3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.3.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN

10x TAE	Life Technologies
6x Probenpuffer	Fermentas
Agarose	Biozym
ATP	Sigma Aldrich
Chloroform-Isoamylalkohol	Roth
DEPC-Wasser	Roth
dNTP	peqGold dNTP-Mix
EDTA	Sigma Aldrich
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Isopropanol	Roth
Natriumacetat	Merck
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Roth
Poly dt Primer	Roche
Tris-HCl	Roth

3.3.2 LÖSUNGEN

0,25 % lineares Polyacrylamid

- 5 % Acrylamid in 40 mM Tris-HCl, 20 mM Natriumacetat und 1 mM EDTA
- Mit 1/100 des Volumens einer 10 % APS-Lösung und einem 1/1000 TEMED versetzen
- Ca. 30 min polymerisieren, bis die Lösung viskos ist
- 2,5x Volumen an Ethanol hinzufügen und durch Zentrifugation pelletieren
- Pellet in 20x Volumen an dH₂O durch Schütteln über Nacht lösen

3.3.3 ENZYME

Alkalische Phosphatase (TSAP)	Promega
Polynukleotid-Kinase	Fermentas
Restriktionsenzyme	NEB
Reverse Transkriptase	Promega
T4 DNS-Ligase	Fermentas

Bei allen Enzymreaktionen wurde der mitgelieferte Puffer in einfacher Endkonzentration verwendet.

3.3.4 KITS

Blood Extraction Kit	Qiagen
Gel Extraction Kit	Qiagen
PCR Purification Kit	Qiagen
PCR-Kit (Taq)	Qiagen
peqGold Total RNA Kit	peqLab
Plasmid High Speed Maxi Kit	Qiagen
Plasmid Mini Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen

3.3.5 OLIGONUKLEOTIDE

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) bezogen (Tab. 4.1; Tab. 4.2)

3.3.6 DNS-LÄNGENSTANDARDS

100 bp Ladder	peqLab
Marker X	Roche
Marker XVI	Roche

3.4 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

3.4.1 VERBRAUCHSMITTEL

Ampicillin	Applichem
Casein	Sigma Aldrich
Glucose	Merck
Hefeextrakt	Roth
KCl	Merck
LB-Agar	Roth
LB-Medium	Roth
MgCl ₂	Sigma Aldrich
MgSO ₄	Sigma Aldrich
NaCl	Roth
Transformations-Kit	Stratagene

3.4.2 BAKTERIENSTÄMME

Es wurde der *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm XL1-Blue (superkompetente Zellen) mit dem Genotyp *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac(F' proAB lacIq Z M15 Tn10[Tetr])* verwendet. Dieser stammte aus dem Transformationskit von Stratagene.

3.4.3 PLASMIDE

PCR-Fragmente wurden in dem prokaryotischen Expressionsvektor pUC18 vermehrt. Das Plasmid ist 2686 bp lang und enthält durch das β -Lactamase-Gen (*Ampr*) eine Ampicillin-Resistenz. Dieser Vektor stammte aus dem Transformationskit von Stratagene.

3.4.4 MEDIEN

LB-Agar	40 g/l LB-Agar 1 mg/l Ampicillin
LB-Medium	25 g/l LB-Medium 1 mg/l Ampicillin
SOB-Mg	20 g/l Casein-Hydrolysat 5 g/l Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl
SOC	10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose in SOB-Mg-Medium

3.5 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.5.1 ZELLEN

A172

Caco2

HEK293FT

PD. Joachim Altschmied (IUF, Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung)

HepG2

hNPC

Lonza

msNPC

Maushirn C57BL/6 Postnataltag 3

SH-SY5Y

Prof. Dr. Sascha Weggen (Institut für Neuropathologie, HHU Düsseldorf)

3.5.2 MEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE

3.5.2.1 Verbrauchsmittel

Antibiotikum/Antimykotikum (100x)

PAA

B27

Life Technologies

DMEM

Life Technologies

DMSO

Roth

Fötales Kälberserum

PAA

Genetecin

Life Technologies

Ham's F12

Life Technologies

hEGF

Life Technologies

hFGF-basic

R & D Systems

Hormonfreies fötales Kälberserum

Biochrom

MEM

PAA

Mix nicht essentieller Aminosäuren

PAA

N2

Life Technologies

PBS

Life Technologies

Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA
RPMI	PAA
Trypsin/EDTA	PAA

3.5.2.2 Zusammensetzung

Caco2-Zellkulturmedium	MEM 20 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Antibiotikum/Antimykotikum
Differenzierungsmedium N2 (NPC)	DMEM-Glutamax/Ham's F12, 3:1 1 % (v/v) N2 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium für Zelllinien	Entsprechendes Kulturmedium 10 % DMSO 10 % FCS
HEK293-FT Zellkulturmedium	DMEM-Glutamax 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Antibiotikum/Antimykotikum 1 % (v/v) Mix nicht essentieller Aminosäuren 0,5 mg/ml Geneticin
HepG2-Zellkulturmedium	RPMI 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Antibiotikum/Antimykotikum
Hormonfreies Medium	DMEM-Glutamax 10 % (v/v) hormonfreies FCS 1 % (v/v) Antibiotikum/Antimykotikum

Medium für die Transduktion der hNPC	DMEM-Glutamax/Ham's F12, 3:1 2 % (v/v) B27 50 ng/ml EGF 20 ng/ml rhFGFb 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
Proliferationsmedium B27 (NPC)	DMEM-Glutamax/Ham's F12, 3:1 2 % (v/v) B27 20 ng/ml EGF 20 ng/ml rhFGFb 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
SH-SY5Y/A172-Zellkulturmedium	DMEM-Glutamax 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Antibiotikum/Antimykotikum

3.5.3 PRÄPARATION VON MAUSNEUROSPHÄREN

3.5.3.1 Verbrauchsmittel

BSA	Serva
DNase I	Worthington
MEM, DMEM, steriles PBS	Life Technologies
Papain	Worthington
Trypsininhibitor	Sigma Aldrich

3.5.3.2 Lösungen

Verdaulösung

- 970 µL MEM
- 20 µL Papain (Endkonzentration: 30 U/ml)
- Inkubation zehn Minuten bei 37 °C
- 10 µL DNase I zusetzen (Endkonzentration: 40 µg/ml)
- durch einen 0,2 µm Spritzenfilter steril filtrieren

Ovomucoid-Lösung

- 975 µL DMEM
- 10 µL DNase I (40 µg/ml)
- 5 µL BSA (10 % in PBS)
- 10 µL Trypsin-Inhibitor (1 µg/ml)
- durch einen 0,2 µm Spritzenfilter steril filtrieren

3.5.4 BESCHICHTUNG

3.5.4.1 Chemikalien

Laminin	Sigma Aldrich
PBS-Ca ²⁺ Mg ²⁺	Life Technologies
Poly-D-Lysin-Hydrobromid	Sigma Aldrich

3.5.4.2 Lösungen

Laminin	1:100 in dH ₂ O
Poly-D-Lysin	0,1 mg/ml in PBS

3.5.5 TRANSFEKTION

3.5.5.1 Kits

AD1 4D-Nucleofector™ Y Kit	Lonza
CaPhos Kit	Sigma Aldrich
Lipofectamine® LTX & Plus Reagent	Life Technologies
P3 Primary Cell 4D-Nucleofector® X Kit	Lonza

3.5.5.2 Expressionsvektoren

pCMVΔR8.91	PD. Joachim Altschmied
pLKO.1-shRNS Kontrollvektor	Open Biosystems
pLKO.1-shRNS shSorLA	Open Biosystems
pMAX-eGFP	Lonza
pMCC-eGFP	Prof. Fritz Boege
pMCC-TagRFP	Prof. Fritz Boege
pMD2.G	PD. Joachim Altschmied

3.5.6 VIRALE TRANSDUKTION

3.5.6.1 Chemikalien

Polybren	Sigma Aldrich
Puromycin	Sigma Aldrich

3.5.6.2 Lösungen

Polybren	1 mg/ml in dH ₂ O
Puromycin	1 mg/ml in dH ₂ O

3.5.7 CHEMIKALIEN FÜR ZELLULÄRE BELASTUNGEN

3.5.7.1 Chemikalien

1 N HCl	Roth
Cycloheximid (CHX)	Sigma Aldrich
DMSO	Roth
Ethanol, unvergällt	Roth
Trijodthyronin (T3)	Sigma Aldrich

3.5.7.2 Lösungen

Tab. 3.1 Die verwendeten Belastungslösungen. Verwendete Chemikalien für die Belastung von eukaryotische Zellen mit entsprechender Stock- und Belastungskonzentration und dem jeweiligen Lösungsmittel.

Stock	Endkonzentration	Lösungsmittel
300 µM T3	0,3 -30 nM	EtOH/HCl (1:2)
25 mM CHX	25 µM	DMSO
100 % EtOH/HCl (1:2)	0,01 % EtOH/HCl (1:2)	
100 % DMSO	0,1 % DMSO	

3.6 PROTEINANALYTIK

3.6.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Ammoniumpersulfat	Serva
Bromphenol Blau	Serva
BSA	Serva
Desoxycholat	Sigma Aldrich
DTT	Life Technologies
ECL Plus Detection System	GE Healthcare
EDTA	Sigma Aldrich
Entwickler-/Fixierlösung	Kodak
Essigsäure	Merck

Glycerol	Serva
Hoechst 33258	Sigma Aldrich
Isopropanol	Roth
Magermilchpulver	Handelsübliches
Methanol	Roth
NaCl	Roth
Natronlauge	Roth
Nonidet 40	ICN-Biomedicals Inc.
NuPAGE® (3-8 %) Tris-Acetate Gel	Life Technologies
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Life Technologies
NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer	Life Technologies
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich
PBS (gebrauchsfertige Mischung)	Biochrom
Ponceau-S Lösung	Sigma Aldrich
Precision Plus Protein Standard Dual Color	BioRad
Protease Inhibitor (PMSF)	Appllichem
Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC III)	Calbiochem
PVDF Transfer Membran	GE Healthcare
Röntgenfilme	Amersham
Salzsäure	Roth
SDS	Serva
TEMED	Sigma Aldrich
Tris	MP Biomedicals Inc
Triton-X 100	Sigma Aldrich
Tween	Sigma Aldrich

3.6.2 LÖSUNGEN

1x Laufpuffer	0,2 M Glycin 20 mM Tris 0,1 % SDS (w/v)
1x Sammelgelpuffer	1 M Tris pH 6,8
1 x Transferpuffer	25 mM Tris 0,2 mM Glycin 20 % Methanol pH 8,5
1x Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8
10x PBS	191 g PBS gebrauchsfertige Mischung ad 2 L dH ₂ O
10x TBS-T	1,5 M NaCl 0,5 M Tris 1 % Tween 20 (v/v)
12 % Paraformaldehyd	12 g PFA 5 Tropfen 1 N NaOH ad 100 ml PBS pH 7,4 mit HCl
2x RIPA	100 mM Tris/HCl pH 7,4 300 mM NaCl 0,2 mM EDTA pH 8 2 % Nonidet P40 2 % Desoxycholat 0,2 % SDS
4x Ladepuffer	500 mM Tris 16 % SDS (w/v) 30 % Glycerin 400 mM DTT 0,04 % Bromphenolblau
Blockierlösung	5 % Magermilchpulver (w/v) in 1 x TBS-T

Hoechst 33258 (0,2 mg/ml Stock)	10 mg/ml Hoechst 33258 Stock in DMSO zu 0,2 mg/ml in dH ₂ O verdünnt
Lysispuffer (1x RIPA)	50 % 2x RIPA 0,5 % PMSF 0,5 % PIC 49 % dH ₂ O
PBS-T	0,1 % Triton X (v/v) in PBS

3.6.3 SDS-PAGE

Sammelgel	72 % dH ₂ O 13 % [40 % Acrylamid (v/v)] 13 % 1,5 M Tris (pH 6,8) 0,5 % [20 % SDS (v/v)] 0,5 % [20 % APS (v/v)] 0,1 % TEMED (v/v)
12 % Trenngel	42 % dH ₂ O 30 % [40 % Acrylamid (v/v)] 26 % 1,5 M Tris (pH 8,8) 0,5 % [20 % SDS (v/v)] 0,5 % [20 % APS (v/v)] 0,06 % TEMED (v/v)

3.6.4 ANTIKÖRPER FÜR WESTERN BLOT ANALYSEN

Anti-Mouse-IgG (2 nd ; HRP-gekoppelt)	GE Healthcare
Anti-Rabbit-IgG (2 nd ; HRP-gekoppelt)	GE Healthcare
CT-15 (1 st)	Prof. Dr. Weggen
GAPDH (1 st)	Abcam
IC-16 (1 st)	Prof. Dr. Weggen
LR11 (1 st)	BD
α Tubulin (1 st)	Sigma Aldrich

3.6.5 KITS

A β -ELISA-Kit (1-42) FL	IBL International
A β -ELISA-Kit (1-x)	IBL International
DC Protein Assay	BioRad
Quick Titer™ Lentivirus Titer Kit	Cell Biolabs Inc.

3.7 SOFTWARE

Axiovision (Carl Zeiss)	Dokumentation der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen
FinchTV (Geospiza)	Programm zum Auslesen der Elektropherogramme aus den Sequenzierungen
ImageJ (National Institutes of Health)	Densitometrie der Western Blots
PickPrimers (NCBI)	Primerdesign
Rotorgene (Qiagen)	Auswertung der quantitativen RT-PCRs
Serial Cloner (Serial Basics)	Erstellung der Vektorkarten/Planung der Klonierung
Adobe Photoshop/Graph Pad Prism	Erstellung der Abbildungen

4 METHODEN

4.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

4.1.1 RNS-ISOLIERUNG AUS EUKARYOTISCHEN ZELLEN

Zur Isolierung von RNS aus den Zelllinien A172 und SH-SY5Y wurden 3×10^6 Zellen pro 6-Well ausplattiert. Die RNS wurde mit dem peqGold Total RNA Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNS wurde in 50 μ l DEPC Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

Die RNS-Isolation der NPC erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben. Je nach Versuchsaufbau wurden 10 bis 20 Neurosphären im 24-Well-Format in 1 ml des entsprechenden Mediums ausplattiert. Für die Isolation der NPC unter proliferierenden Bedingungen wurde das komplette Medium mit Neurosphären abgenommen, bei 4 °C und 7000xg für 5 min pelletiert und anschließend mit Lysispuffer ohne β -Mercaptoethanol versetzt. Lagen differenzierende Bedingungen vor, wurde das Medium vorsichtig abgenommen und der Lysispuffer in die Wells pipettiert. Die RNS wurde in 30 μ l DEPC Wasser isoliert und bei -80 °C gelagert.

4.1.2 REVERSE TRANSKRIPTION

Bei aus Zelllinien gewonnener RNS (siehe Kap. 4.1.1) wurde eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Für die cDNS-Synthese wurde ein definierter RNS-Gehalt (500 ng) eingesetzt. Diese erfolgte nach folgendem Ansatz:

500 ng RNS

1,25 μ l dt (15) Primer (Stockkonzentration 100 μ M)

1 μ l dNTP Mix (Stockkonzentration 10 mM)

➔ 5 min, 65 °C; anschließend 4 °C und nachfolgenden Ansatz hinzufügen

5 µl DEPC-Wasser

4 µl 5x RT-Puffer

1 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl)

➔ 52 min, 37 °C; 15 min, 70 °C; anschließend 4 °C

Für die reverse Transkription der RNS aus Neurosphären wurde das Quantitect Reverse Transcription Kit verwendet. Wegen der geringen Anzahl an eingesetzten Zellen wurde stets das maximale Volumen der eluierten RNS eingesetzt. Eine Normierung erfolgte durch den Abgleich auf konstant exprimierte Haushaltsgene. Dies erfolgte nach folgendem Ansatz:

2 µl 7x gDNS Wipeout Buffer

12 µl RNS

➔ 2 min, 42°C; anschließend auf Eis und nachfolgenden Ansatz hinzufügen

1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase

4 µl 5x Quantiscript RT Buffer

1 µl RT-Primer Mix

➔ 30 min, 42 °C; 3 min, 95 °C; anschließend 4 °C

In beiden Protokollen wurde die cDNS ohne weitere Aufreinigungsschritte jedoch in einer 1:3 Verdünnung in der quantitativen RT-PCR eingesetzt. Die cDNS wurde bei -20 °C gelagert.

4.1.3 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNS AUS EUKARYOTISCHEN ZELLEN

Zur Isolierung genomischer DNS wurden 50 proliferierende Neurosphären verwendet. Diese wurden bei 7000xg und 4 °C für 5 min pelletiert, das Medium entfernt und anschließend nach den Angaben des Hersteller mit dem Blood Extraction Kit aufgereinigt.

4.1.4 POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)

In einer Polymerase-Ketten-Reaktion werden die Eigenschaften von temperaturstabilen DNS-Polymerasen genutzt, um Nukleinsäuren zu amplifizieren. Dazu wird in der ersten Temperaturstufe die doppelsträngige *Template*-DNS getrennt (Denaturierung). Im zweiten Schritt erfolgt die Primer-Bindung (*annealing*). Als Primer bezeichnet man kurze einzelsträngige Oligonukleotide. In jedem PCR-Ansatz befinden sich zwei solcher Oligonukleotide, von denen einer am sense- und einer am antisense-Strang bindet. In der dritten Temperaturstufe wird dann ausgehend vom 3'-OH-Ende dieser Oligonukleotide ein neuer Doppelstrang synthetisiert (Elongation). Danach beginnt der Temperaturzyklus erneut mit der Denaturierung des Doppelstrangs.

Die konventionelle PCR wurde in einem Robocycler durchgeführt und es wurde die Taq-Polymerase mit dem dazu gehörenden Puffer verwendet. Die Auswertung erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese. Dies erfolgte nach folgendem Ansatz:

PCR-Ansatz**SorLA-Promoter-Konstrukte****1309 bp/631 bp**

100 ng gDNS

1x Puffer

1 U Taq-Polymerase

0,2 µM fw-Primer

0,2 µM rv-Primer

0,2 mM dNTP

7,5 % DMSO

ad 20 µl dH₂O**PCR-Ansatz****SorLA-Promoter-Konstrukt****2000 bp**

100 ng gDNS

1x Puffer

1 U Taq-Polymerase

0,2 µM fw-Primer

0,2 µM rv-Primer

0,2 mM dNTP

2,5 mM MgCl₂ad 20 µl dH₂O

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm:

94 °C	4 min	
94 °C	30 sek	40x
Tab. 4.1	30 sek	
72 °C	30 sek	
72 °C	4 min	
4 °C		

Tab. 4.1 Die SorLA-Promoter Klonierungsprimer. Fw bezeichnet den sense-Primer und rv den antisense-Primer. Gezeigt sind die Sequenzen der verwendeten Primer mit der Enzymschnittstelle, welche über die PCR eingefügt wurde (schwarz unterlegt *Clal*; schwarz unterlegt, kursiv *XhoI*). Der jeweils entstehende Überhang ist fett gedruckt und unterstrichen. Außerdem sind die Länge des Amplikons und die in der PCR verwendete Annealing-Temperatur angegeben. Alle Sequenzen sind in 5'-3' Orientierung angegeben.

SorLA-Promoter	Sequenz		Amplikon	Annealing Temperatur
fw 2000 bp	AGA	<u>ATCGAT</u> GGTGTCCATTCCTGGTAAGG	2000	51-53 °C
fw 1309 bp	AGA	<u>ATCGAT</u> GTGGCTTGTCGGAGATGAGG	1309	51-65 °C
fw 631 bp	AGA	<u>ATCGAT</u> TTGTGGTGCCCAAGAGTAGATG	631	51-63 °C
rv	AGA	<u>CTCGAG</u> GTTCGGGCGAACGCTACTGCA		

Zur quantitativen Analyse der mRNS-Expression wurde die Methode der quantitativen RT-PCR angewandt.

Die quantitative RT-PCR wurde mit einem Rotor-Gene Q durchgeführt und das SensiMix SYBR Hi-ROX Kit verwendet. Dies besteht aus einer hitzeaktivierten DNS-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ (Konzentration 6 mM), einer internen Referenz und dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I. Die PCR erfolgte nach folgendem Ansatz:

7,5 µl SensiMix
 1 µl fw-Primer (4 µM)
 1 µl rv-Primer (4 µM)
 2,5 µl DEPC
 3 µl cDNS (1:3 verdünnt)

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm:

95 °C	15 min	
95 °C	20 sec	} 50x
56 °C	20 sec	
72 °C	20 sec	
50 °C	30 sec	
50 °C bis 99 °C	je 5 sec	

Das Prinzip der quantitativen RT-PCR basiert auf der Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green mit doppelsträngiger DNS. Der daraus resultierende Komplex absorbiert blaues Licht und emittiert grünes Licht. Die Zunahme der Ziel-DNS korreliert somit mit der Zunahme an grüner Fluoreszenz. Aufgrund der Verwendung externer Standards, die durch die Aufreinigung der spezifischen, amplifizierten Fragmente gewonnen werden, ist die Berechnung der Genkopienzahlen in den eingesetzten Proben möglich. Die PCR-Proben wurden mit dem PCR Purification Kit aufgereinigt, ihre Konzentration bestimmt und mit folgender Formel die Molekülzahl/µl berechnet:

$$\text{Molekülzahl}/\mu\text{l} = \frac{\text{DNA-Konzentration (g}/\mu\text{l)}}{\text{Produktlänge} \times 660 \text{ g/mol}} \times 6,023 \times 10^{23} \text{ Moleküle}$$

Auf Grundlage der berechneten Moleküle wurde eine Eichreihe mit den Molekülzahlen von $1,5 \times 10^2$ bis $1,5 \times 10^6$ erstellt. Die aus der Standardreihe ermittelten Zykluszahlen gegen den Logarithmus der eingesetzten DNS-Moleküle aufgetragen ergeben eine Gleichung, mit deren Hilfe aus den Zykluszahlen der Proben die Kopienzahl der DNS von Interesse berechnet werden kann. Die Kopienzahlen der Gene von Interesse wurden immer auf das Haushaltsgen β -Aktin abgeglichen.

Tab. 4.2 Die Primer zur quantitativen RT-PCR Analyse. Fw bezeichnet den sense-Primer und rv den antisense-Primer. Weiterhin sind die Produktgröße und die Spezies dargestellt, für die der jeweilige Primer spezifisch ist. Alle Sequenzen sind in 5'-3' Orientierung angegeben.

Gen	Spezies	Sequenz	Länge (bp)
ADAM	human	fw GAAGATGGTGGTGTGCTGAGAG rv GTCTTCATGTGAGACTGCTC	175
APP	human	fw ATCATGGTGTGGTGGAGGTT rv CCGATGGGTAGTGAAGCAAT	179
BACE1	human	fw CCAGTCATCTCACTCTACCT rv GAAGCCCTCCATGATAACAG	183
BACE2	human	fw CCATCAAGTTCTCTGGAGAC rv GGGTATACCAGATGTCTCCT	181
BDNF	human	fw TGCTCCCCAGTGAAGGCCACA rv TGGCAGAGGTGAGGCAGGGAC	78
Hairless	human	fw GCAGCCTATGGTGTGAGCCCG rv CACCATCTGGAGAAAGCGGCGGATG	249
PSEN	human	fw TCAAGTACCTCCCTGAATGG rv CCATATTCACCAACCACACC	183
SorLA	human	fw GGTGAATGGCTATGTGGTGA rv AGTCTGGTTGATGGCTTTGG	247
SorLA	murin	fw CGTGGTGAACCTTTTCTGGT rv AGTCTGATTGATGGCCTTGG	238
THRα	human	fw GCTGCTAATGTCAACAGACCGCT rv CCCCgATCATGCGGAGGTCA	170
THRβ (Silva <i>et al.</i>, 2002)	human	fw AAGTGCCCAGACCTTCCAAA rv AAAGAAACCCTTGCAGCCTTC	150
β-Aktin	human	fw GCACAGAGCCTCGCCTTTGCC rv CATGCCCAACCATCACGCCCTGG	198
β-Aktin	murin	fw CTACAATGAGCTGCGTGTGG rv TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA	450

4.1.5 GELELEKTROPHORESE VON DNS

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNS im elektrischen Feld innerhalb eines festen Trägermaterials. Die Wahl des Trägermaterials für die Elektrophorese ist abhängig von Art und Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren. Während der Dissertationsarbeit wurden Agarosegele zur Kontrolle von Restriktionen und Präparationen von Plasmid-DNS oder zur Isolation von DNS-Fragmenten verwendet. Agarose ist ein Polymer, das sich aus unterschiedlich verknüpften Galaktose-Einheiten zusammensetzt. Die Auftrennung der Nukleinsäuren im elektrischen Feld erfolgt aufgrund der negativen Ladung

des Zucker-Phosphat-Rückgrats, welches in einem pH-Bereich kleiner 7 stabil ist, in Richtung der Anode. Die Wandergeschwindigkeit und damit die effektive Größe der Nukleinsäure im Trägermaterial sind nicht nur abhängig von ihrer absoluten Masse, sondern auch von ihrer Form. Es wird unterschieden zwischen linearer und zirkulärer DNS. Bei linearer DNS ist die Laufstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare, d.h. größere Moleküle werden eher zurückgehalten als kleine. Zirkuläre DNS hat eine längere Laufstrecke, je höher der Grad der Superspiralisierung ist. Nachgewiesen wird die DNS über Ethidiumbromid, welches zwischen den Basen interkaliert. Der Ethidiumbromid-DNS-Komplex emittiert nach Anregung mit UV-Licht Fluoreszenzstrahlung (500-590 nm). Innerhalb der Arbeit wurden Agarosegele der Konzentrationen 1 % (w/v) für Fragmente zwischen 1 und 14 kb und 2 % (w/v) für Fragmente unter 1 kb verwendet. Zur Längenbestimmung der Fragmente wurden zusätzlich DNS-Marker aufgetragen. Zur Elektrophorese wurde die benötigte Menge Agarose mit dem Elektrophoresepuffer 1x TAE (10x TAE 1:10 verdünnt in dH₂O) aufgekocht, nach Abkühlen auf etwa 55 °C mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine mit einem Gelkamm bestückte Gelform gegossen. Nach Erkalten des Gels wurde es in eine Flachbettapparatur überführt und mit dem Elektrophoresepuffer (1x TAE) überschichtet. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Danach wurde über ein Netzgerät eine konstante Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand angelegt. Nach der Auftrennung wurde das Gel durch UV-Licht detektiert.

4.1.6 EXTRAKTION DER DNS AUS PRÄPARATIVEN AGAROSEGELEN

Die benötigten Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNS wurde mit Hilfe des QIAGEN Gel Extraction Kits nach den Anweisungen des Herstellers extrahiert und im Anschluss durch eine Ethanolpräzipitation (Kap. 4.1.8) konzentriert.

4.1.7 PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION

Das hier genannte Verfahren wird verwendet, um in einer wässrigen Lösung enthaltene Proteine und Nukleinsäuren voneinander zu trennen. Zunächst wird die Nukleinsäurelösung mit Phenol-Chloroform, einem organischen Lösungsmittel, versetzt und gemischt. Daraufhin erfolgt eine Phasentrennung. In der oberen, wässrigen Phase sammelt sich die DNS aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen an, während sich in der organischen Phase bzw. in der Grenzschicht zwischen organischer und wässriger Phase die durch das Phenol-Chloroform denaturierten Proteine befinden. Zur Extraktion der DNS wurde die wässrige DNS-Lösung mit dem einfachen Volumen von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und gründlich gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (1 min, 20.000xg). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die untere, organische Phase wurde nun mit dem 0,5-fachen Volumen an dH₂O erneut extrahiert. Die sich bildende, wässrige Phase wurde mit der ursprünglichen vereinigt und mit dem einfachen Volumen von Chloroform-Isoamylalkohol versetzt. Durch eine weitere Zentrifugation (1 min, 20.000xg) wurden nun die verbliebenen Phenolreste entfernt. Der wässrige Überstand wurde wiederum in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. An die Phenol-Chloroform-Extraktion schließt sich zur Konzentrierung der DNS eine Alkoholpräzipitation (Kap. 4.1.8) an.

4.1.8 ALKOHOLPRÄZIPITATION

Dieses Verfahren dient der Konzentrierung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen durch Ethanol oder Isopropanol. Die DNS-Lösungen wurden mit einem 0,1-fachen Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2, dem 2,5-fachen Volumen an 96 % Ethanol und 5 µl linearem Polyacrylamid als Fällhilfe (Gaillard und Strauss, 1990) bzw. mit einem einfachen Volumen an Isopropanol versetzt. In Folge der hohen Salz- und Alkoholkonzentration verliert das Nukleinsäuremolekül die Hydrathülle. Die DNS sammelt sich durch Zentrifugation (10 min, 20.000xg) am Boden des Reaktionsgefäßes. In einem weiteren Zentrifugationsschritt (4 min, 20.000xg) wird das DNS-Pellet mit 150 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Im Anschluss wird die gewonnene DNS bei 60 °C getrocknet und in dH₂O aufgenommen.

4.1.9 RESTRIKTION VON DNS

Die Restriktionsanalyse dient der Charakterisierung, Identifizierung und Isolierung doppelsträngiger DNS. Sie ist essentiell für die Herstellung der zur Klonierung verwendeten DNS-Fragmente sowie zur Identifizierung der entstehenden Klonierungsprodukte. Grundlage für dieses Analyseverfahren ist die Aktivität von Restriktionsenzymen, die an spezifischen Erkennungsstellen die doppelsträngige DNS binden und spalten. Durch die Lage der Spaltstellen entstehen Fragmente mit definierter Länge, d.h. die Kombination jedes DNS-Moleküls mit einem Restriktionsenzym bildet ein spezifisches Bandenmuster. Diese können mittels Gelelektrophorese nach der Größe aufgetrennt und mit Längenstandards verglichen werden. Innerhalb der Arbeit wurden Restriktionsenzyme des Typs II verwendet. Sie gehören zu den Endonukleasen, ihre Erkennungsstelle ist meist 4 bis 8 Basen lang und palindromisch. Diese Enzyme schneiden innerhalb ihrer Erkennungssequenz. Die Spaltung erfolgt durch Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung, wodurch ein 5'-Phosphatende entsteht. Die einzusetzende Enzymmenge richtete sich nach der eingesetzten DNS-Menge, der Anzahl der in der DNS vorkommenden Spaltstellen und der Spaltaktivität des Enzyms. Die Spaltaktivität gibt an, welche DNS-Stoffmenge durch 1 U Enzym pro Stunde gespalten wird. Dabei entspricht 1 U der Enzymmenge, die 1 µg lambda-DNS in einer Stunde unter Standardbedingungen vollständig spaltet. Das Volumen des Ansatzes wurde so gewählt, dass eine Glycerolkonzentration von 5 % nicht überschritten wurde. Der zugehörige Puffer des Enzyms wurde in einfacher Konzentration eingesetzt. Anschließend wurde der Restriktionsansatz mit der für das Enzym optimalen Temperatur mindestens eine Stunde im Wasserbad inkubiert. Sollten für einen Verdau mehrere Enzyme mit unterschiedlichen Puffersystemen benötigt werden, wurden die Reaktionsansätze nach jeder Restriktion durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Kap. 4.1.7) gereinigt und durch eine Alkoholpräzipitation (Kap. 4.1.8) konzentriert.

Tab. 4.3 Die verwendeten Restriktionsenzyme und ihre Funktion. Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme, ihre Funktion und die Größen der Spaltprodukte.

Restriktionsenzyme	Funktion	Spaltprodukte (bp)
<i>ClaI/XhoI</i>	Testverdau SorLA-Promoter/pUC18 und Restriktion der SorLA-Promoter-Konstrukte aus pUC18	2686 2000/1309/631
<i>BamHI/HincII</i>	Testverdau pCMVΔR8.91	6522 2626 1750 1229 23
<i>BamHI/EcoRI</i>	Testverdau pMD2.G	2739 1671 827 556 31
<i>ClaI/XhoI</i>	Restriktion des CMV-Promoters aus pMCC-eGFP	5424 890
<i>ClaI/XhoI</i>	Testverdau SorLA-Promoter/pMCC-eGFP	5424 2000/1309/631
<i>HindIII</i>	Testverdau pCMVΔR8.91	4139 3674 2689 565 627 365
<i>BsrDI</i>	pLKO.1-shRNS (Kontrollvektor/shSorLA)	2910 2451 1542 182
<i>BsaI</i>	pLKO.1-shRNS (Kontrollvektor/shSorLA)	2214 2055 1601 914 301
<i>BpmI</i>	pLKO.1-shRNS (Kontrollvektor/shSorLA)	2341 2100 1373 954 317
<i>Eco53kI</i>	Linearisieren von pUC18	2686

4.1.10 DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNS-ENDEN

DNS-Enden werden dephosphoryliert, um eine Ligation mit sich selbst zu verhindern. Durch die alkalische Phosphatase (*thermosensitive alkaline phosphatase*, TSAP) werden die 5'Phosphatreste an den Enden des linearisierten Vektors eliminiert, so dass dieser kein ringförmiges DNS-Molekül mehr ausbilden kann. Von der alkalischen Phosphatase wurde pro µg DNS eine Unit eingesetzt. Der entsprechende Puffer (Multicore Buffer) lag in einfacher Konzentration vor. Die Inkubation erfolgte 15 Minuten bei 37 °C. Im Anschluss wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Kap. 4.1.7) und eine Alkoholpräzipitation (Kap. 4.1.8) oder eine Gelextraktion (Kap. 4.1.6) durchgeführt.

4.1.11 GLÄTTUNG UND PHOSPHORYLIERUNG VON DNS-ENDEN

Die Glättung von DNS-Enden geschieht durch die T4 DNS-Polymerase. Dieses Enzym weist zwei unterschiedliche Aktivitäten auf. Erstens können DNS-Fragmente, an deren Ende sich Überhänge befinden aufgefüllt werden und zweitens können diese Enden durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase entfernt werden. Im selben Schritt erfolgt die Phosphorylierung der DNS-Fragmente durch die T4 Polynukleotid-Kinase. Dabei wird durch die Kinase der Transfer von einer Phosphatgruppe des ATP auf das 5'-Ende des DNS-Fragments katalysiert. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 25 °C. Im Anschluss wurde die DNS durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Kap. 4.1.7) gereinigt und durch eine Alkoholpräzipitation (Kap. 4.1.8) konzentriert.

Ansatz: 10 - 40 ng DNS-Fragment
 400 µM dNTP-Mix
 25 µM ATP
 1x Puffer der T4 DNS-Polymerase
 2,5 U T4 DNS-Polymerase
 5 U T4 Polynukleotid-Kinase
 dH₂O ad 25 µl

4.1.12 LIGATION

Während einer Ligation werden die Enden eines linearen DNS-Moleküls kovalent verknüpft. In diesem Schritt wird unter ATP-Verbrauch die Verbindung des 5'Phosphatrests mit dem 3'Hydroxylrest durch die T4 DNS-Ligase katalysiert. Die Inkubation erfolgte während der Blunt-End-Ligation bei 25 °C und der Sticky-End-Ligation bei 16 °C über Nacht. Die Plasmidkarten der entstandenen Konstrukte wurden mit dem Programm Serial Cloner erstellt.

Blunt-End-Ligation: 150 fmol DNS-Fragment

50 fmol Vektor (pUC18: linearisiert mit *Eco53kI*, dephosphoryliert mit TSAP)

5 % PEG 4000 Solution

1x Puffer T4 DNS-Ligase

5 U T4 DNS-Ligase

dH₂O ad 20 µl

Sticky-End-Ligation: je 45 fmol DNS-Fragment

15 fmol Vektor (pMCC-eGFP: linearisiert mit *ClaI/XhoI*, dephosphoryliert mit TSAP)

1x Puffer T4 DNS-Ligase

2,5 U T4 DNS-Ligase

dH₂O ad 20 µl

4.1.13 EXTRAKTION VON PLASMID-DNS AUS BAKTERIEN

Um die Plasmid-DNS aus den Bakterien zu isolieren, wurde das Plasmid Mini Kit verwendet. Es basiert auf der Methode der alkalischen Lyse. Dabei wurden zunächst die Flüssigkulturen abzentrifugiert und das entstandene Pellet mit EDTA- und RNase A-haltigem Puffer (P1) resuspendiert. EDTA komplexiert in der Bakterienzellwand enthaltene Kationen und destabilisiert diese. Die vollständige Lyse der Bakteriensuspension erfolgte im Anschluss durch Zugabe eines Puffers (P2), der SDS und NaOH enthält. SDS ist ein Detergenz, das Phospholipide und Proteine der Zellwände löst, während NaOH sowohl Proteine als auch chromosomale und Plasmid-DNS löst. Die Dauer der Inkubation unter alkalischen Bedingungen spielt eine entscheidende Rolle. Eine zu lange Inkubationszeit führt zum

Beispiel zu irreversiblen Schäden an der Plasmid-DNS. Das Lysat wurde dann mit saurem Kaliumacetatpuffer (P3) neutralisiert. Das entstehende Kaliumdodecylsulfat bildet mit Proteinen, RNS, chromosomaler DNS und der bakteriellen Zelldebris unlösliche Komplexe und wird mit dem Salz präzipitiert. Die kleinen Plasmidmoleküle verbleiben in der Lösung und können durch die Neutralisation renaturieren. Im Anschluss erfolgte eine Fällung der DNS mit Isopropanol zur Konzentrierung (Kap. 4.1.8). Zum Schnelltest wurden Bakterien in 2 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 200 Umdrehungen pro Minute kultiviert. Um größere Mengen DNS zu erhalten, wurden 200 ml Kulturen gewählt. Die DNS wurde in diesem Fall über das QIAGEN HighSpeed Plasmid Maxi Kit nach den Anweisungen des Herstellers gereinigt.

4.1.14 RNS-/DNS-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNS bzw. DNS-Proben erfolgte über die Nano Quant Platte am Multimode Reader. Das Verhältnis der Wellenlängen 260/280 sollte bei einer reinen Probe für DNS etwa 1,8 und für RNS 2,0 betragen.

4.2 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

Alle Arbeiten mit *E. coli* erfolgten unter einer Reinraumwerkbank. Alle Nährmedien (LB, LB-Agar, SOB) wurden autoklaviert und alle anderen Substanzen (Glucose, MgCl₂, MgSO₄, Ampicillin) sterilfiltriert.

4.2.1 HITZETRANSFORMATION VON BAKTERIEN

Die Hitzetransformation der Bakterien wurde nach dem Stratagene Agilent Protokoll durchgeführt.

4.2.2 ANZUCHT UND LAGERUNG VON BAKTERIEN

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte entweder in Flüssigkulturen mit LB-Medium oder auf Agarplatten. In beiden Fällen wurde das Antibiotikum Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Flüssigkulturen wurden angeimpft, indem ein einzelner Klon mit einer ausgeglühten Platinöse von der Agarplatte in die Flüssigkultur überführt wurde. Diese Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 200 Umdrehungen pro Minute in einem Inkubationsschüttler gelagert. Zur Kultivierung von Bakterien auf Agarplatten wurden 100 µl einer Flüssigkultur mit einem ausgeglühten Drigalskyspatel ausgestrichen. Auch diese Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese Platten wurden dann mit Parafilm verschlossen und konnten so mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden. Für eine Langzeitlagerung wurde jedoch eine Flüssigkultur mit einem Volumen von 1 ml angeimpft und 4 bis 5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Diese wurde 1:2 mit 10 % (v/v) Glycerol-LB-Medium versetzt. Ein 1 ml Aliquot der Bakteriensuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C eingelagert.

4.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank. Alle in der Zellkultur benötigten Lösungen und Puffer wurden entweder autoklaviert oder sterilfiltriert. Alle Gegenstände, die unter der Sicherheitswerkbank benötigt wurden, sind vor Gebrauch mit Terralin desinfiziert worden. Innerhalb dieser Arbeit wurden primäre, neurale Progenitorzellen und die immortalisierten Zelllinien SH-SY5Y (Neuroblastom), A172 (Glioblastom), HEK293 (embryonale Nierenzellen), Caco2 (Kolonkarzinom) und HepG2 (Leberkarzinom) verwendet (Abb. 4.1).

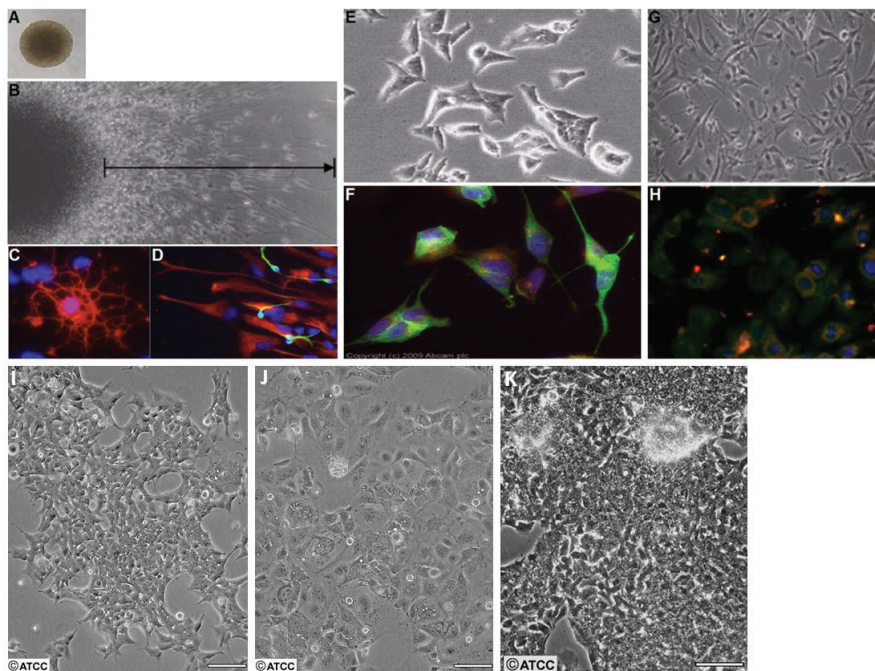


Abb. 4.1 Übersicht der verwendeten Zellmodelle. Phasenkontrastaufnahme proliferierender (A) und differenzierender (B) hNPC (40x Vergrößerung). (C) Immunzytochemischer Nachweis des Oligodendrozytenmarkers O4 in 7 Tage differenzierten hNPC (200x Vergrößerung). (D) Immunzytochemischer Nachweis des Neuronenmarkers β III-Tubulin (grün) und des Astrozytenmarkers GFAP (rot) in 7 Tage differenzierten hNPC (200x Vergrößerung). (E) Phasenkontrastaufnahme der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y. (F) Immunzytochemischer Nachweis des Neuronenmarkers Doublecortin (grün). (G) Phasenkontrastaufnahme der Glioblastomzelllinie A172 (100x Vergrößerung). (H) Immunzytochemischer Nachweis des Progenitorzellmarkers Nestin (grün) und des Astrozytenmarkers GFAP (rot) in A172 Zellen (200x Vergrößerung). Phasenkontrastaufnahme (Größenstandard 100 μ m) von (I) humanen, embryonalen Nierenzellen (HEK293), (J) Colonkarzinomzellen (Caco2), (K) Leberkarzinomzellen (HepG2); (A-D; Breier *et al.*, 2010; E; Lopes *et al.*, 2010; F; Abcam, 2009; G-H; Gil und Kang, 2008; J-K; ATCC, 2012)

4.3.1 KULTUR VON NEURALEN PROGENITORZELLEN (NPC)

4.3.1.1 Präparation von murinen neuralen Progenitorzellen (msNPC)

Mäuse des Stamms C57BL/6 wurden am Postnataltag 3 mit einer Schere dekapitiert und die Köpfe nacheinander in eine mit auf 37 °C äquilibriertem sterilen PBS gefüllte, 100 x 20 mm Petrischale überführt. Nach Freilegen des Gehirns wurde es in eine mit auf 37 °C äquilibriertem MEM gefüllte 100 x 20 mm Petrischale überführt. Unter dem Binokular wurden die Meningen und Blutgefäße entfernt, um bei der späteren Kultivierung der neuralen Zellen ein Wachstum von Fibroblasten zu verhindern. Nach der Freipräparation wurde je ein Gehirn in ein mit 1 ml MEM gefülltes Reaktionsgefäß überführt und mit der Schere grob zerkleinert. Dieser Ansatz wurde mit je 1 ml einer Verdauungslösung versetzt.

Der Gewebeverdaу wurde etwa 30 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Nach dem Gewebeverdaу wurde das Gewebe mit einer 1 ml Pipettenspitze tituiert, bis eine Einzelzellsuspension entstanden ist. Zum Stoppen des Gewebeverdaуs wurde je Gehirn 1 ml Ovomucoid-Lösung hinzugefügt.

Die Einzelzellsuspension wurde in ein mit 9 ml DMEM gefülltes Falcon-Röhrchen überführt und fünf Minuten bei 300xg zentrifugiert. Anschließend wurde das überstehende Medium vorsichtig abgegossen und das Zellpellet in 1 ml B27 Medium vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspensionen aller präparierten Gehirne wurden vereint, um spätere interindividuelle Unterschiede zu minimieren. Je präpariertes Gehirn wurde eine mit 20 ml B27 Medium gefüllte 100 x 20 mm Petrischalen verwendet.

4.3.1.2 Proliferationskultur und Passage von Neurosphären

Humane neurale Progenitorzellen (hNPC) wurden als Einzelzellsuspension aus Vollhirnhomogenat von der Firma Lonza erworben. Die NPC wurden in einem Volumen von 20 ml B27-Medium pro Petrischale (100 x 20 mm) bei 37 °C und 7,5 % CO₂ kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde die Hälfte des Mediums ersetzt. Da NPC als dreidimensionale Zellaggregate (Neurosphären) kultiviert werden, führt die Proliferation der Zellen zu einer Vergrößerung des Durchmessers. Als Proliferationsmedium (B27) der NPC wurden Dulbecco's Modified Eagle Medium und F12 im Verhältnis 3:1 verwendet. Dem wurde außerdem 2 % (v/v) B27, die Wachstumsfaktoren EGF und FGF in einer Endkonzentration von 20 ng/ml sowie 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt.

Zur Passagierung wurden die Neurosphären mit einem McIlwain Tissue Chopper zerteilt.

Tab. 4.4 Die verwendeten humanen neuralen Progenitorzellen und der Zeitpunkt der Präparation.

Lotnummer	Präparation (Gestationswoche)
503	16. Woche
095	19. Woche
942	18. Woche

4.3.1.3 Kultivierung von Neurosphären unter differenzierenden Bedingungen

Die Differenzierungsinitiation von NPC erfolgte durch den Entzug der Wachstumsfaktoren auf mit einer Proteinmatrix beschichteten Oberflächen. Die Oberflächen wurden zunächst mit einer 100 µg/ml Poly-D-Lysin-Hydrobromid Lösung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit sterilem dH₂O gewaschen und eine weitere Stunde mit 10 µg/ml Laminin bei 37 °C inkubiert. Dann wurde nochmals mit sterilem dH₂O gewaschen. Zur Lagerung wurden die Oberflächen mit Calcium- & Magnesium-haltigen PBS überschichtet und bis zu sieben Tage mit Parafilm versiegelt bei 4 °C gelagert. Als Differenzierungsmedium (N2) der NPC wurden Dulbecco's Modified Eagle Medium und Ham's F12 im Verhältnis 3:1 verwendet. Dem wurde außerdem 1 % (v/v) N2 sowie 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Die Differenzierung der Neurosphären erfolgte bei 37°C und 7,5% CO₂ über einen dem Versuchsdesign entsprechenden Zeitraum. Auch die Anzahl und die Größe ausplattierter Neurosphären wurden in Abhängigkeit des Versuchsdesigns gewählt.

4.3.2 KULTUR VON TUMORZELLINIEN

4.3.2.1 Revitalisierung kryokonservierter Zelllinien

Das Aliquot der konservierten Zelllinie wurde aus dem Stickstofftank entnommen und bei 37 °C schnell aufgetaut. Es wurde unverzüglich in eine vorbereitete Zellkulturflasche mit dem entsprechenden Kulturmedium überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

4.3.2.2 Kultur und Passage

Die Kultur der Zellen erfolgte in 175 cm²-Plastikkulturflaschen. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium ausgetauscht. Die Kultur wurde bei einer nahezu vollständigen Konfluenz passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in Trypsin/EDTA abgelöst, anschließend in frischem Wachstumsmedium resuspendiert und die gewünschte Zellzahl in eine neue Flasche überführt.

Für Experimente wurden die abgelösten Zellen in Medium aufgenommen, das mit 10 % hormonfreiem FCS versetzt war. Die Belastung erfolgte ebenfalls in diesem Medium.

4.3.2.3 Kryokonservierung von Zelllinien

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen einer konfluenten Kulturflasche (175 cm²), wie in Abschnitt 4.3.2.2 beschrieben, vom Flaschenboden abgelöst und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Dieses wurde mit dem entsprechenden Medium zur Verdünnung des Trypsins auf 50 ml aufgefüllt. Daraufhin erfolgte bei 300xg das Abzentrifugieren der Zellen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 6 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in 1,8 ml Portionen in Einfrier Röhrchen aliquotiert. Um die Zellen langsam einzufrieren, wurden die Röhrchen in einem Einfriergefäß, welches mit Isopropanol gefüllt war und dadurch kontrolliert 1 °C pro Minute herunterkühlt, 24 Stunden bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

4.3.3 GENTECHNISCHE MANIPULATION EUKARYOTISCHER ZELLEN

4.3.3.1 4D-Nucleofector™ Technologie

Die Nukleofektion ist eine Technologie, die auf der Formation von kleinen Poren in der Zellmembran beruht. Diese entstehen durch das Anlegen eines kurzen, elektrischen Impulses. Dies in Kombination mit zelltyp-spezifischen Transfektionsreagenzien führt zu einer hohen Transfektionseffizienz unabhängig von der proliferativen Kapazität.

Zur Etablierung dieser Technologie unter proliferierenden Bedingungen wurden 400 proliferierende Neurosphären mit 20 µl Transfektionsmastermix (P3-Lösung + Supplement 1 [4,5:1] + 0,4 µg pMax-GFP; P3 Primary Cell 4D-Nucleofector® X Kit) versetzt, in ein 16-well Nucleocuvette® Strip überführt und mit der X-Unit des 4D-Nucleofector™ Systems

(Programm DC-104) elektroporiert. 24 Stunden nach Transfektion wurde das GFP-Signal des Kontrollplasmids fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Unter differenzierenden Bedingungen wurden die Neurosphären in ein 24-Well ausplattiert und 72 Stunden differenziert. Im Anschluss wurden sie mit 350 µl Transfektionsmastermix (AD1-Lösung + Supplement 1 [4,5:1] + 17,5 µg pMax-GFP; AD1 4D-Nucleofector™ Y Kit) versetzt und mit der Y-Unit des Nucleofector Systems (Programm ER-137) elektroporiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, eine Zellkernfärbung durchgeführt (HOECHST, blau) und das GFP- bzw. HOECHST-Signal fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Zur Durchführung des Reporterassays in humanen, neuronalen Progenitorzellen wurden diese nach den zuvor beschriebenen Protokollen mit dem Originalvektor pMCC-eGFP bzw. pMCC-eGFP/SorLA-Promoter (1309 bp/ 631 bp) in Kombination mit pMCC-TagRFP in einem Verhältnis von 5:1 transfiziert. Dazu wurden unter proliferierenden Bedingungen DNS-Mengen von 0,1 µg für die Konstrukte mit pMCC-eGFP-Rückgrat und 0,4 µg für den Kontrollvektor pMCC-TagRFP eingesetzt. Unter differenzierenden Bedingungen wurden 3 µg DNS für die eGFP-Konstrukte und 12 µg für die Transfektionskontrolle pMCC-TagRFP verwendet. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 3 nM T3 und dem entsprechenden Lösemittel behandelt. Die GFP- und RFP-Fluoreszenz wurde 48 Stunden nach der Belastung am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

4.3.3.2 Lipofectamine

Diese Methode beruht auf der Formation von Liposomen aus im Transfektionsreagenz enthaltenen Lipid-Untereinheiten im wässrigen Milieu, die das zu transfizierende Material einschließen. Diese Liposomen fusionieren mit der Zellmembran und die darin eingeschlossene DNS wird ins Zytoplasma entlassen. Sie wurde zur Kontrolle der *Knockdown*-Effizienz der shRNS-Plasmide (pLKO.1-shSorLA) in HEK293-FT Zellen und zur Durchführung des Reporterassays in Caco2 bzw. HepG2 Zellen angewendet.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen im 6-Well-Format ausplattiert. Die gewählte Zellzahl war abhängig von der verwendeten Zelllinie. Pro µg DNS wurden 5 µl Plus-Reagenz und 7,5 µl Lipofectamine eingesetzt. Die DNS wurde zunächst in 100 µl serumfreiem Medium aufgenommen und die entsprechende Menge an Plus-Reagenz hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde gut gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Innerhalb dieses Zeitraums wurde der Lipofectamine Ansatz vorbereitet (100 µl serumfreies

Medium + entsprechende Menge Lipofectamine). Dieser wurde durch Vortexen mit dem oberen Ansatz gemischt und ebenfalls 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und es wurde 800 µl serumfreies Medium hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Transfektionsansatzes. Dieser verblieb drei Stunden auf den Zellen und wurde dann mit 1,5 ml des entsprechenden Kulturmediums verdünnt. Am nächsten Tag wurde das Medium vollständig durch reguläres Medium ersetzt.

Zur Kontrolle der *Knockdown*-Effizienz der SorLA-shRNS wurden 3×10^5 Zellen HEK293-FT Zellen mit 0,8 µg pLKO.1-shSorLA bzw. Kontrollvektor transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die RNS der HEK293-FT Zellen nach Protokoll geerntet und mittels quantitativer RT-PCR hinsichtlich der SorLA-Expression untersucht.

Zur Durchführung des Reporterassays wurden 4×10^5 Caco2 bzw. 2×10^5 HepG2 Zellen mit dem Originalvektor pMCC-eGFP bzw. pMCC-eGFP/SorLA-Promoter in Kombination mit pMCC-TagRFP in einem Verhältnis von 5:1 transfiziert. Dazu wurden DNS-Mengen von 0,4 µg für die Konstrukte mit pMCC-eGFP-Rückgrat und 1,6 µg für den Kontrollvektor pMCC-TagRFP eingesetzt. Die Konstrukte pMCC-eGFP/Original, pMCC-eGFP/SorLA-Promoter (1309 bp) sowie pMCC-eGFP/SorLA-Promoter (631 bp) wurden jeweils mit dem Vektor pMCC-TagRFP kombiniert. Vor und nach der Transfektion wurde ausschließlich das hormonfreie Medium verwendet. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 30 nM T3 und dem entsprechenden Lösemittel behandelt. Die GFP und RFP-Fluoreszenz wurde 48 Stunden nach der Belastung mit Hilfe des Array Scan dokumentiert.

4.3.3.3 Calcium-Phosphat-Transfektion/Virusproduktion

Die Calcium-Phosphat-Transfektion basiert auf dem Prinzip, dass DNS an präzipitiertes Calciumphosphat bindet. DNS wird in isotonischer Kochsalzlösung mit einer niedrigen Phosphat-Konzentration verdünnt und Calciumchlorid wird zugegeben, was zur Bildung eines Calciumphosphat-Präzipitats führt. Die DNS kopräzipitiert mit dem Calciumphosphat und wenn die resultierende Suspension zu einer Monozellschicht hinzugefügt wird, adsorbiert die DNS an die Zellen und wird aufgenommen (Graham und Van der Eb, 1973). Hier wird sie eingesetzt um lentivirale Partikel zu erzeugen, die für kleine interferierende RNS (*small hairpin* RNS; shRNS) kodieren, die zur Stilllegung eines spezifischen Gens eingesetzt werden. Die shRNS Konstrukte bilden eine Haarnadelstruktur, die aus einem 21 Basenpaar

langen Rückgrat und einer 6 Basenpaar langen Schleife besteht. Diese Sequenz ist in den lentiviralen Vektor pLKO.1 kloniert. pLKO.1 ist ein HIV basierter lentiviraler Vektor, der zur transienten und stabilen Transfektion sowie zur Produktion viraler Partikel in lentiviralen Verpackungszelllinien geeignet ist, zudem enthält er eine Puromycin-Resistenz.

Tab. 4.5 Die SorLA-spezifische shRNS. Dargestellt sind die Klon-ID aus der TRC-Datenbank (Open Biosystems; <http://www.thermoscientificbio.com/EktronTemplates/ProductLayout.aspx?id=17179927389&term=SORL1&productId=1961A1D5-D4C1-4A23-A7D0-81D8B30525CB&sourceId=ING:arm>) und die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung.

Klon-ID	Bezeichnung
TRCN0000062948	48
TRCN0000062949	49
TRCN0000062950	50
TRCN0000062951	51
TRCN0000062952	52

Außerdem wurde noch ein für GFP kodierender Lentivirus produziert um die Transduktion von hNPC zu etablieren. Zur Virusproduktion wurde die Verpackungszelllinie HEK293FT verwendet. Sie ist ein schnellwachsender Klon der parenteralen humanen, embryonalen Nierenkarzinomzellen (HEK293), die mit einer Adenovirus Typ-5-DNS immortalisiert wurden (Graham *et al.*, 1977). Der Lentivirus wird durch die Kotransfektion des Transfervektors und der Verpackungsplasmide pCMV- Δ R8.91 (gag-pol Expressionsvektor) pMD2.G (VSV-G Expressionsvektor) generiert.

Zur Transfektion der HEK293FT-Zellen wurden an Tag 1 zunächst 10 cm Petrischalen für 20 min mit Polyornithin beschichtet. Im Anschluss wurden sie einmal mit PBS gewaschen und 5×10^6 HEK293FT-Zellen pro Kulturschale in 7 ml Medium ausplattiert. An Tag 2 erfolgte die Transfektion. Zunächst wurde ein Mediumwechsel (10 ml) durchgeführt.

Dann wurde nach dem Protokoll des Calcium-Phosphate-Transfection Kit folgender Ansatz pro 10 cm Schale vorbereitet.

- 10 µg Transfervektor
 - 3,5 µg pMD2.G
 - 6,5 µg pCMVΔR8.91
 - 50 µl 2,5 M CaCl₂
 - ad 500 µl mit H₂O, mischen
-
- 500 µl 2x HeBS unter Vortexen tropfenweise zugeben
 - weitere 5 sek Vortexen

Dieser Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tröpfchenweise und gleichmäßig über die Schale verteilt. Daraufhin wurde noch durch mehrfache nach vorne und hinten bzw. links und rechts Bewegung gemischt. 4 bis 6 Stunden später wurde das Medium durch weitere 10 ml ergänzt. Am nächsten Tag (3) wurde das HEK293FT-Medium gegen 15 ml des Medium zur Virusernte ausgetauscht. An Tag 4, 5 und 8 wurde der Virusüberstand abgenommen und konnte 1 bis 2 Tage bei 4 °C gelagert werden.

Im weiteren Verlauf wurde der Virusüberstand für 20 min bei 4750xg und 4 °C zentrifugiert, um restliche Zellen und Zelltrümmer zu entfernen, durch einen 0,45 µm Steril Filter filtriert und durch Ultrafiltration mit Centricon Plus-70 Säulen nach Herstelleranweisung konzentriert. Bei 7 Ansätzen zur Virusproduktion wurde auf 2 bis 3 ml Endvolumen konzentriert, mit dem Medium für die Virusernte auf 10 ml aufgefüllt, in 500 µl Aliquots abgefüllt und bei -80 °C gelagert.

Die Virustiter wurden mit einem das virale Hüllprotein p24 messenden ELISA nach Herstellerangaben bestimmt. Dies geschah mit einmal bei -80 °C eingefrorenen Aliquots, da diese direkt mit den weiteren gelagerten Aliquots vergleichbar waren.

4.3.3.4 Lentivirale Transduktion

Für die lentivirale Transduktion von Neurosphären wurden diese 2 bis 4 Tage vorher gechoppt, um eine homogenere Größenverteilung innerhalb der Proliferationskultur zu erhalten. Am Tag der Transduktion (Tag 1) wurden die Neurosphären erneut gechoppt. Diese wurden dann in B27 resuspendiert und die Partikelzahl mit der Zählkammer Nageotte bestimmt. Zur Berechnung der Partikel pro μl wurde folgende Formel verwendet.

$$\text{Partikel}/(\mu\text{l}) = (\text{gezählte Partikel}) / (\text{Fläche} * \text{Tiefe} * \text{Verdünnung})$$

Als nächstes wurde nun der Virus vorbereitet. Es wurden 10.000 lentivirale Partikel pro Zelle eingesetzt. Das benötigte Virusvolumen wurde mit einer einfachen Konzentration an B27, EGF (50 ng/ml Endkonzentration) sowie FGF (20 ng/ml Endkonzentration) versetzt und zusätzlich wurde jedem Ansatz 1 μl Polybren hinzugefügt, um die Effizienz der Infektion zu erhöhen. Dies wurde nun zu der gewünschten Anzahl an Neurosphären in einem 6-Well hinzugegeben und mit dem Transduktionsmedium auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt. Nach 4 Stunden erfolgte die Zugabe von weiteren 4 ml Transduktionsmedium. Am nächsten Tag (Tag 2) wurden die Zellen abzentrifugiert und mit Standard-Proliferationsmedium in eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Zur Selektion der nicht transduzierten Zellen wurde dem Standardproliferationsmedium an Tag 3 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin zugesetzt. Im Falle der lentiviralen Transduktion mit shRNS wurde hier die *Knockdown*-Effizienz überprüft. Nach 4 Tagen ist die Selektion abgeschlossen. Die transduzierten Neurosphären werden jedoch weiterhin in Selektionsmedium kultiviert.

4.3.3.5 Adenovirale Transduktion

Die Infektion mit einem Adenovirus kann sowohl in proliferierenden als auch in differenzierenden Neurosphären durchgeführt werden. Die verwendeten Viren kodierten für humanes APP und dieses sollte in den humanen NPC überexprimiert werden. Der gesamte Versuch wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Sascha Weggen (Institut für Neuropathologie, HHU Düsseldorf) mit Unterstützung von Dr. Julia Ness durchgeführt.

Um unter proliferierenden Bedingungen zu transduzieren wurden 200 Neurosphären gechoppt und direkt mit unterschiedlichen Konzentrationen von Adenoviren behandelt. Um den Versuch unter differenzierenden Bedingungen durchzuführen wurden die Neurosphären einen

Tag vor der Transduktion gechopt und in einer PDL/Laminin beschichteten 6-Well ausplattiert. 4 Stunden nach der Belastung mit den Viren wurde das Medium gewechselt und 48 Stunden später konnte die Überexpression überprüft werden.

Für die Untersuchungen des A β wurden die Zellen über den gesamten Versuchszeitraum in mit 3 nM T3 bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel versetztem Medium gehalten.

4.4 PROTEINANALYTIK

4.4.1 SDS-PAGE UND WESTERN BLOT ANALYSE

Das Western-Blotting beschreibt eine Methode, mit Hilfe derer Proteine immunologisch nachgewiesen werden. Dafür werden die Proteine zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Membran mit hoher Proteinbindekapazität transferiert und immobilisiert. Im Anschluss können die Proteine durch spezifische Erstantikörper nachgewiesen werden.

Für die Analyse der Proteine mittels Western Blot wurden zwei unterschiedliche Protokolle angewendet.

Bei der Vorgehensweise ohne Proteinbestimmung wurden je nach Versuchsaufbau 10 bis 20 Neurosphären ausplattiert. Unter differenzierenden Bedingungen wurde das Medium vorsichtig abgenommen und der Lysispuffer in die Wells pipettiert. Das Protein wurde in 25 μ l aufgenommen. Vor dem Beladen des SDS-Gels wurden die Proben bei 4 °C und 20.000xg für 10 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der komplette Ansatz wurde mit 4x Ladepuffer versetzt.

Nach dem Protokoll mit Proteinbestimmung wurden 1000 Neurosphären unmittelbar nach dem Passagieren in einer PDL/Laminin beschichteten 6-Well ausplattiert. Nach dem entsprechenden Experiment wurde das Medium vorsichtig abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und 150 μ l Lysispuffer hinzugefügt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und das Zelllysats in ein Reaktionsgefäß überführt. Vor der Proteinbestimmung wurden die Proben bei 4 °C und 20.000xg für 10 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinbestimmung wurde mit dem DC Protein Assay von Biorad nach dem Protokoll des Microplate Assays durchgeführt. Bei jeder Messung wurde eine BSA-Eichreihe mit den Konzentrationen 1,5; 1,2; 0,9; 0,75; 0,6; 0,3; 0,2 und 0 mg/ml BSA mitgeführt. Es wurden mindestens 2 Verdünnungen in Doppelbestimmung

gemessen. Eichreihe sowie Verdünnungen wurden mit dem Lysispuffer hergestellt. Für die Analyse wurde folgender Ansatz verwendet.

20 µg Protein
 5 µl 4 x Puffer
 Ad 20 µl dH₂O

Vor Beladen des Gels wurden die Proben denaturiert. Die Bedingungen der Gelelektrophorese wurden in Abhängigkeit zu untersuchenden Proteinen gewählt (Tab. 4.6)

Tab. 4.6 Die Bedingungen für die Elektrophorese der zu untersuchenden Proteine. Dargestellt sind die verwendeten Gele, die Bedingungen für die Denaturierung sowie die Parameter für die Elektrophorese.

Protein	Denaturierung	Verwendetes Gel	Elektrophorese
SorLA	10 min, 70 °C; NuPAGE® LDS Sample Buffer	NuPAGE® (3-8%) Tris-Acetate Gel	150 V, 60 min mit NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer
Aβ	Dr. Julia Ness (AG Weggen)		
APP	5 min, 90 °C; 4x Ladepuffer	14 % SDS-Page	90 V, 20 min; 130 V 180 min mit 1x Laufpuffer

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels Wet-Blotting auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese wurde zunächst in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer eingelegt. Auch die benötigten Fiber Pads, Filterpapiere und das Gel wurden vor Transferbeginn in Transferpuffer inkubiert. Für den Transfer wurden ein *Fiber Pad*, gefolgt von einem Filterpapier, dem Gel, der PVDF-Membran, einem weiteren Filterpapier und *Fiber Pad* in einer Gel-Halte-Kassette geschichtet und in die Blotting-Kammer überführt. Der Transfer erfolgte für 60 min mit 100 V. Danach wurde die PVDF-Membran mit Ponceau S angefärbt, um den Transfer zu überprüfen. Im Falle eines positiven Ergebnisses wurde die Membran für 1 Stunde in 5 % Magermilchpulver in TBS-T blockiert. Danach wurde mit der Antikörperfärbung begonnen. Die Bedingungen der Erstantikörperfärbung richteten sich nach dem nachzuweisenden Protein (Tab. 4.7). Die Zweitantikörperfärbung erfolgte für 1 Stunde (Tab. 4.7). Nach jeder Antikörperinkubation wurde die Membran 3 x 10 Minuten in TBS-T gewaschen.

Tab. 4.7 Die Bedingungen für die Analyse der zu untersuchenden Proteine. Dargestellt sind die verwendeten Antikörper sowie die eingesetzte Verdünnung und der Wirt der im Western Blot verwendeten Erst- und Zweitantikörper.

Protein	Antikörper	Verdünnung	Wirt
SorLA	LR11 (1 st)	1:1000 in Blockierlösung	Maus
Aβ	IC-16 (1 st)	Dr. Julia Ness (AG Weggen)	
APP	CT-15 (1 st)	1:1000 in Blockierlösung	Kaninchen
αTubulin	α Tubulin (1 st)	1:50.000 in Blockierlösung	Maus
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	GAPDH (1 st)	1:100.000 in Blockierlösung	Maus
	Anti-Rabbit-IgG (2 nd ; HRP-gekoppelt)	1:5000 in Blockierlösung	Esel
	Anti-Mouse-IgG (2 nd ; HRP-gekoppelt)	1:5000 in Blockierlösung	Schaf

Nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran 5 min mit dem ECL Plus Reagenz inkubiert. Die Detektion der spezifischen Banden beruht auf der an die Zweitantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase, welche die Oxidation des im Detektionsreagenz enthaltenen Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid in alkalischem Milieu katalysiert. Luminol geht so in einem angeregten Zustand über und fällt unter Abgabe von Licht in den Ausgangszustand zurück. Die Abgabe des Lichts wird auf einem Röntgenfilm detektiert. Die Zeitspanne, für die der Röntgenfilm exponiert wird, kann stark variieren und richtet sich nach der Bandenintensität.

Zur Quantifizierung der Banden wurden die exponierten Röntgenfilme eingescannt, die Farbe in Graustufen umgewandelt und mit dem Programm ImageJ densitometrisch ausgewertet, wobei für die Quantifizierung ein Abgleich gegen eine Ladekontrolle (Tab. 4.7) durchgeführt wurde.

4.4.2 AMYLOID- β ELISA

Der ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ist ein Antikörper basiertes Nachweisverfahren. Das nachzuweisende Antigen wird über einen spezifischen Erstantikörper an eine Mikrotiterplatte gebunden. Durch die Zugabe eines enzymgekoppelten Zweitantikörpers und eines Substrats für dieses, kommt es zu einer enzymatischen Farbreaktion, deren Absorption gemessen wird.

Zum Nachweis von A β in Zellkulturüberständen wurden 1000 Neurosphären ausplattiert und für 12 bzw. 24 Stunden unter der Behandlung T3 und der entsprechenden Kontrolle in 1 ml N2-Medium differenziert. Bei der Ernte der Proben für den A β -Nachweis wurden unterschiedliche Versuchsdesigns verwendet, die im Folgenden aufgelistet sind:

- Ernte des Überstands und des Proteins nach 12 Stunden
- Ernte des Überstands und des Proteins nach 24 Stunden
- Ernte des Überstands nach 12 Stunden, erneute Belastung, Ernte des Überstands nach weiteren 12 Stunden und Ernte des Proteins

Das Zelllysate und die Zellkulturüberstände wurden für 10 min bei 4 °C mit 20.000xg abzentrifugiert, um feste Bestandteile zu pelletieren, und in neue Reaktionsgefäße überführt. Mit den Zelllysaten wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt, um später den A β -Gehalt pro mg Protein bestimmen zu können. Die Überstände wurden im Falle des A β_{42} -Nachweises mittels der 3 kDa Cut-off Säulen nach dem Protokoll des Herstellers auf 100 μ l konzentriert und das vollständige Volumen im ELISA (1-42) FL verwendet. Für den ELISA (1-x) wurden 100 μ l des Überstandes eingesetzt. Bis zur Verwendung wurden die Zelllysate bei -20 °C gelagert und die Überstände bei -80 °C.

Der ELISA (1-x) bzw. (1-42) FL wurde exakt nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.4.3 FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie basiert auf der Filterung sehr hellen Lichts, so dass nur die Anregungswellenlänge eines bestimmten Fluorophors den Filter durchtritt und so das Präparat anregt. Das im Präparat enthaltene Fluorophor absorbiert das Licht einer bestimmten Wellenlänge und geht in einen angeregten Zustand über. Anschließend wird die Anregungsenergie wieder abgegeben und das Fluorophor fällt in seinen Grundzustand zurück. Die dabei abgegebene Strahlung durchtritt erneut einen Filter, den Emissionsfilter. So wird nur das emittierte Licht zum Auge bzw. zur Kamera geleitet. Durch das Einsetzen unterschiedlicher Filter ist es möglich, mehrere unterschiedliche Fluorophore in einem Präparat zu detektieren.

Um die Fluoreszenz innerhalb des Reportergenassays zu detektieren, wurden die transfizierten Zellen mit den Wellenlängen 488 nm für grüne Fluoreszenz, 546 nm für rote Fluoreszenz und 358 nm für blaue Fluoreszenz, falls eine Nuklei-Färbung mit HOECHST durchgeführt wurde, angeregt. Wichtig hierbei war, dass in den unterschiedlichen Belastungen innerhalb eines Versuchs immer mit der gleichen Belichtungszeit gemessen wurde. Dies galt sowohl für die Bilddokumentation am Fluoreszenzmikroskop wie auch am Arrayscan.

5 ERGEBNISSE

5.1 DIE CHARAKTERISIERUNG DER MODELLSYSTEME

Innerhalb dieser Arbeit wird der Frage nachgegangen, ob und wie das Schilddrüsenhormon T3 SorLA reguliert und somit präventiv auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins zum amyloidogenen A β wirkt. Die Voraussetzungen für diese *in vitro* Untersuchungen sind, dass (i) in den genutzten Zellkulturen die Genprodukte der APP-Prozessierung vorhanden sind sowie die APP-Prozessierung funktionell ist und (ii) die Zellen in der Lage sind auf T3 zu reagieren. Dies wurde in drei verschiedenen Zellmodellen untersucht. Zum einen in humanen, neuralen Progenitorzellen (hNPC), welche in 3D Kulturen wachsen und die humane Neurogenese *in vitro* abbilden, da sie als neurale Progenitorzellen proliferieren und nach Wachstumsfaktorentzug zu Neuronen und zu Gliazellen (Astrozyten/Oligodendrozyten) differenzieren (Abb. 4.1 A-D). Diese Kulturen repräsentieren somit als organotypische Kulturen einen Teil der normalen Physiologie des Gehirns (Moors *et al.*, 2009). Solche Zellmodelle haben jedoch die Nachteile, dass sie sehr teuer, aufwendig in der Kultur und limitiert an zur Verfügung stehendem Material sind. Daher wurden in dieser Arbeit zusätzlich zwei Tumorzelllinien mit in die Untersuchungen einbezogen, die preislich wesentlich günstiger und zudem unlimitiert in der Menge des Materials sind. Daher wurden die Neuroblastom Tumorzelllinie SH-SY5Y, die neuronalen Ursprungs ist (Abb. 4.1 E & F) sowie die Glioblastomzelllinie A172 (Abb. 4.1 G & H) auf oben genannte Eigenschaften hin untersucht.

Für die Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung ist die Prozessierung des APP Voraussetzung. An der Spaltung des APP sind die drei Enzyme α -, β - und γ -Sekretase beteiligt. Daher ist es zur Bearbeitung der Fragestellung essentiell, dass das für die AD kritische Protein APP und die an seiner Prozessierung beteiligten Enzyme in den Zellmodellen vorhanden sind. Um dies zu untersuchen wurde die mRNS-Expression der Gene von Interesse durch quantitative RT-PCR untersucht. Die Expression der α - Sekretase wurde über die im Hirn am stärksten exprimierte Isoform ADAM10 bestimmt. Außerdem wurden die Transkripte der zwei homologen β -Sekretasen BACE1/2 sowie die der katalytischen Untereinheit PSEN der aus einem Multiproteinkomplex bestehenden γ -Sekretase quantifiziert (Abb. 5.1).

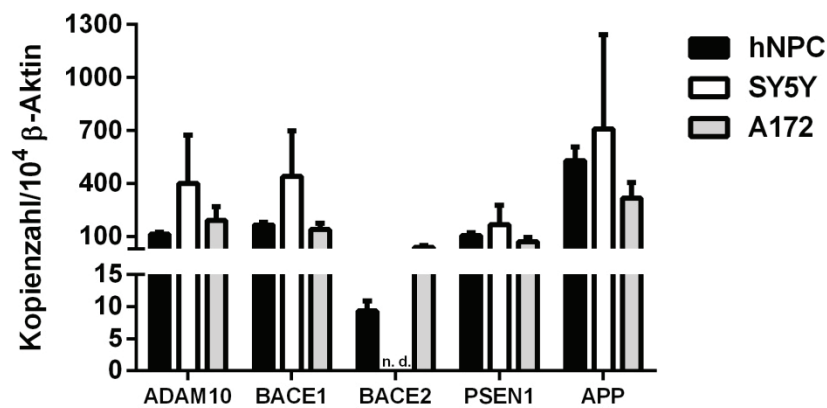


Abb. 5.1 Die Expression der für die AD kritischen Gene. Die Expression der Gene wurde in den Kontrollen aus Abb. 5.3 (hNPC, SH-SY5Y, A172) analysiert. Die Genkopienzahlen wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und auf β -Aktin abgeglichen. Alle Daten sind aufgetragen als Mittelwert $\pm$ SEM von 3 unabhängigen Experimenten. n. d.: nicht detektierbar.

Alle Zellmodelle weisen in etwa den gleichen APP-Gehalt auf, der sich im Mittel zwischen 318 Kopien pro 10.000 β -Aktin-Transkripten in der Tumorzelllinie A172 und 710 Kopien pro 10.000 β -Aktin in den SH-SY5Y bewegt. ADAM 10, BACE1 und die katalytische Untereinheit der γ -Sekretase sind in den A172 und den hNPC in etwa gleich verteilt. Der mRNS-Gehalt beträgt ca. 100 Kopien abgeglichen auf das Haushaltsgen β -Aktin. Im Vergleich dazu ist die Expression von ADAM 10 in den SH-SY5Y 2,1- bis 3,6-fach und von BACE1 2,7 bis 3,2-fach erhöht. BACE2 erreicht in den A172 das gleiche Expressionsniveau wie die anderen Sekretasen, ist jedoch in den SH-SY5Y gar nicht und in den Primärzellen ungefähr zehnfach niedriger exprimiert. Bis hierhin zeigt dies, dass alle Zellmodelle die für die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins zum amyloidogenen A β notwendige Enzymausstattung enthalten.

Ebenso wesentlich für die Untersuchung der Fragestellung, ob das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin präventiv auf die Bildung des pathognomonischen A β wirken kann, ist eine funktionelle THR-Maschinerie der Zellmodelle. Deshalb wurde die Expression der Schilddrüsenhormonrezeptoren ebenfalls quantifiziert (Abb. 5.2).

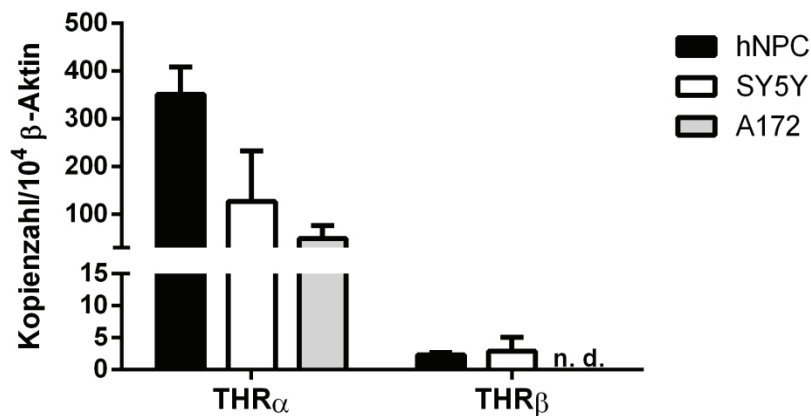


Abb. 5.2 Die Expression der Schilddrüsenhormonrezeptoren. Die Expression der Rezeptoren wurde in den Kontrollen der Abb. 5.3 (hNPC, SH-SY5Y, A172) analysiert. Die Genkopienzahlen wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und auf β -Aktin abgeglichen. Alle Daten sind aufgetragen als Mittelwert $\pm$ SEM von 3 unabhängigen Experimenten. n. d.: nicht detektierbar.

Die humanen neuralen Progenitorzellen weisen mit 350 Kopien pro 10.000 β -Aktin den höchsten THR α -Gehalt auf. Die SH-SY5Y exprimieren in etwa die Hälfte und die A172 ein Siebtel davon. Die THR β -Expression beträgt dagegen lediglich 3 Kopien pro 10.000 β -Aktin in den Primärzellen und den SH-SY5Y, in der Glioblastomzelllinie ist dieser Rezeptor mittels quantitativer RT-PCR nicht nachweisbar (Abb. 5.2).

Da T3 schon in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe im Rahmen von Microarrayuntersuchungen als positiver Modulator von SorLA in neuralen Progenitorzellen des Menschen identifiziert worden ist, besteht durch die Analyse der Thyroidhormonrezeptoren die Möglichkeit, dass es sich um einen THR-abhängigen Prozess handelt. Ob das Expressionsmuster der Thyroidhormonrezeptoren Rückschlüsse auf die T3-abhängige Induktion von SorLA liefert, wurde durch weitere quantitative RT-PCRs analysiert (Abb. 5.3 A).

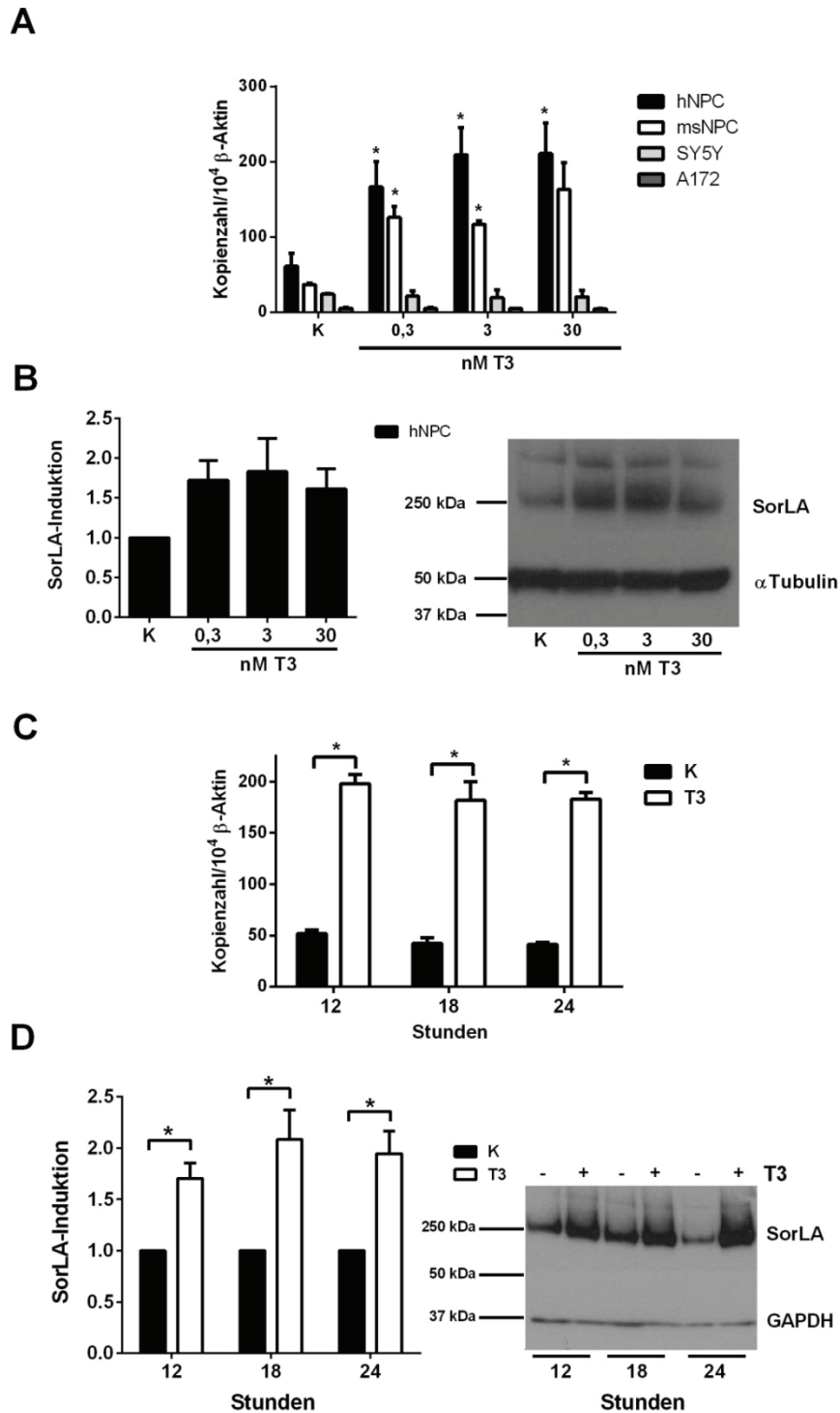


Abb. 5.3 Die T3-abhängige Regulation von SorLA. (A) Differenzierende humane und murine NPC sowie SH-SY5Y und A172 wurden für 24 Std. mit 0,3, 3 und 30 nM T3 sowie dem Lösemittel 0,01% EtOH/HCl behandelt. Die Genkopienzahlen wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und auf β -Aktin abgeglichen. Alle Daten sind aufgetragen als Mittelwert $\pm$ SEM von 3-12 unabhängigen Experimenten. Innerhalb der Experimente mit den hNPC wurden 3 verschiedene Individuen getestet (Tab. 4.4). (B) Behandlung wie unter (A) beschrieben. Die Zelllysate wurden mittels Western Blot Analyse hinsichtlich der SorLA-Expression untersucht. Zur Quantifizierung wurde eine densitometrische Analyse der SorLA-Signale durchgeführt und diese auf α -Tubulin abgeglichen. Alle Daten sind aufgetragen als Vielfaches der EtOH/HCl-Kontrolle. (C) Differenzierende hNPC wurden für 12, 18 und 24 Std. mit 3 nM T3 sowie dem Lösemittel 0,01% EtOH/HCl behandelt. Die Genkopienzahlen wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und auf β -Aktin abgeglichen. Alle Daten sind aufgetragen als Mittelwert $\pm$ SEM von 3 unabhängigen Experimenten. (D) Behandlung wie unter (C)

beschrieben. Auswertung wie unter (B) beschrieben, jedoch wurde zum Proteinabgleich GAPDH verwendet. * p-Wert $\leq 0,05$, signifikant gegenüber der Kontrolle.

Im Gegensatz zu neuronalen Primärzellen der Maus und des Menschen ist SorLA in den Tumorzelllinien SH-SY5Y und A172 bei T3-Konzentrationen von 0,3 bis 30 nM und einer Belastungszeit von 24 Stunden auf mRNA-Ebene nicht induzierbar. Dabei ist in Progenitorzellen der Maus SorLA signifikant um das 3,5-fache induziert (0,3 und 3 nM T3; Abb. 5.3 A), in hNPC steigern die Konzentrationen 0,3, 3 und 30 nM T3 die SorLA-Expression signifikant um das 2,7- bis 4-fache (Abb. 5.3 A, C). Diese Induktion ist außerdem unabhängig vom verwendeten Individuum und wurde auf Proteinebene bestätigt. Die densitometrische Auswertung ergab eine 1,5- bis 2-fache Steigerung der SorLA-Proteinexpression bei verschiedenen T3-Konzentrationen über 24 Stunden (Abb. 5.3 B). Die Evaluierung des zeitlichen Verlaufs der SorLA-Expression von 12 bis 24 Stunden bei einer Belastung mit 3 nM T3 erbrachte eine stabile Induktion von SorLA auf mRNA und Proteinebene. Die SorLA mRNA-Expression ist vierfach und der Protein-Gehalt bis zu zweifach gegenüber der Kontrolle erhöht (Abb. 5.3 C, D).

Ob Thyroidhormonrezeptoren an der SorLA-Induktion durch T3 beteiligt sind, konnte durch diese Versuche nicht geklärt werden. Da jedoch keine der beiden Tumorzelllinien in der Lage ist, SorLA durch T3 aufzuregulieren, habe ich die folgenden Untersuchungen zum protektiven Effekt des T3 auf die APP-Prozessierung und zur Identifizierung des Mechanismus der T3-abhängigen Aufregulation von SorLA ausschließlich in den humanen neuronalen Progenitorzellen durchgeführt.

5.2 UNTERSUCHUNG DES PROTEKTIVEN EFFEKTS VON T3 AUF DIE APP-PROZESSIERUNG

5.2.1 T3 REDUZIERT DIE BILDUNG DES FÜR DIE AD PATHOGNOMONISCHEN A β

Für den Beweis, dass T3 einen protektiven Effekt auf die APP-Prozessierung hat, musste zunächst eine Nachweismethode für das in der AD pathognomonische A β gefunden werden. Um den Nachweis des A β zu etablieren, wurden hNPC zur Überexpression von APP adenoviral transduziert (Abb. 5.4). Diese Versuche wurden in Kooperation mit Prof. Sascha Weggen (Institut für Neuropathologie, HHU Düsseldorf) durchgeführt.

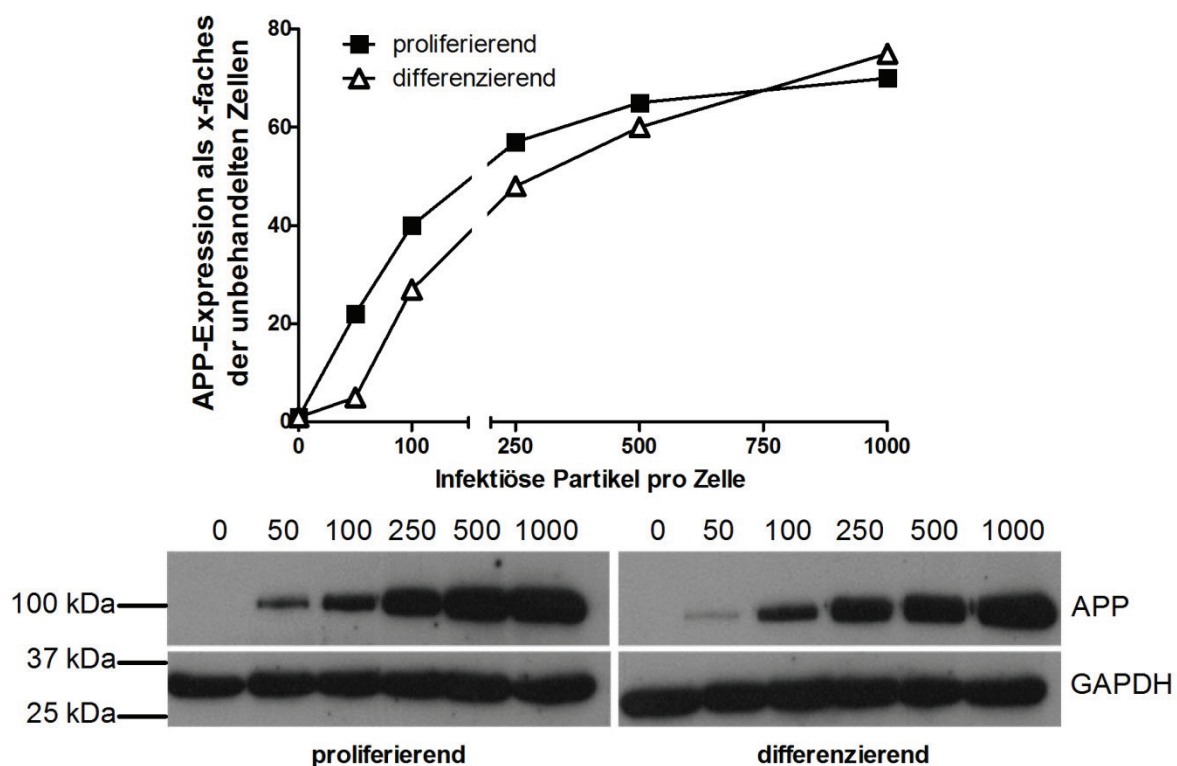


Abb. 5.4 Die adenvirale Überexpression von APP in proliferierenden und differenzierenden hNPC. 48 Stunden nach Transduktion wurden die hNPC Lysate (20 µg Protein/Spur) mittels Western Blot Analyse hinsichtlich der APP-Expression unter Verwendung eines APP-spezifische Antikörpers untersucht. Ein GAPDH-spezifischer Antikörper wurde als Ladekontrolle verwendet. Zur Quantifizierung wurde eine densitometrische Analyse der APP-Signale durchgeführt und diese auf GAPDH abgeglichen. Alle Daten sind aufgetragen als Vielfaches der nicht transduzierten hNPC.

In proliferierenden Neurosphären steigern schon 50 infektiöse Partikel die APP-Expression um das 20-fache. Es folgt ein nahezu linearer Anstieg bis zu 250 infektiösen Partikeln mit einer Steigerung der Expression um das 57-fache. Darauf folgt eine Sättigung mit einem nur noch leichten Anstieg auf das 65-fache bei einer Behandlung mit 500 und das 70-fache bei 1000 infektiösen Partikeln. In differenzierenden hNPC ist erst bei 100 infektiösen Partikeln

pro Zelle eine relevante Steigerung der APP-Expression (27-fach) zu verzeichnen. Der Einsatz von 250 infektiösen Partikeln führt zu einem Anstieg auf das 48-fache. Danach flacht auch hier die Kurve ab. Die APP-Expression erhöht sich insgesamt auf das 75-fache.

Die adenovirale Transduktion hat sich als effiziente Methode zur Überexpression von Proteinen in proliferierenden und differenzierenden hNPC erwiesen (Abb. 5.4). Jedoch liegt die übertragende DNS episomal vor und wird nicht in das Wirtsgenom integriert (Harui *et al.*, 1999). Es ist also lediglich eine transiente Infektion der Wirtszelle möglich. Zudem bleibt eine basale Replikation des Virus-Rückgrats bestehen, was zytotoxisch auf die Wirtszelle wirkt (Shenk, 1996). Daher eignet sich die adenovirale Transduktion lediglich für Kurzversuche, jedoch mit einer sehr effizienten Expression des Transgens.

Für die weiteren Versuche zur Detektion des A β und zur Analyse des protektiven Effekts von T3 wurden 250 infektiöse Partikel pro Zelle eingesetzt. Das A β sollte in den Zellkulturüberständen nachgewiesen werden. Dazu diente zum einen die Methode des Western Blots und zum anderen ein ELISA zum Nachweis von Gesamt A β .

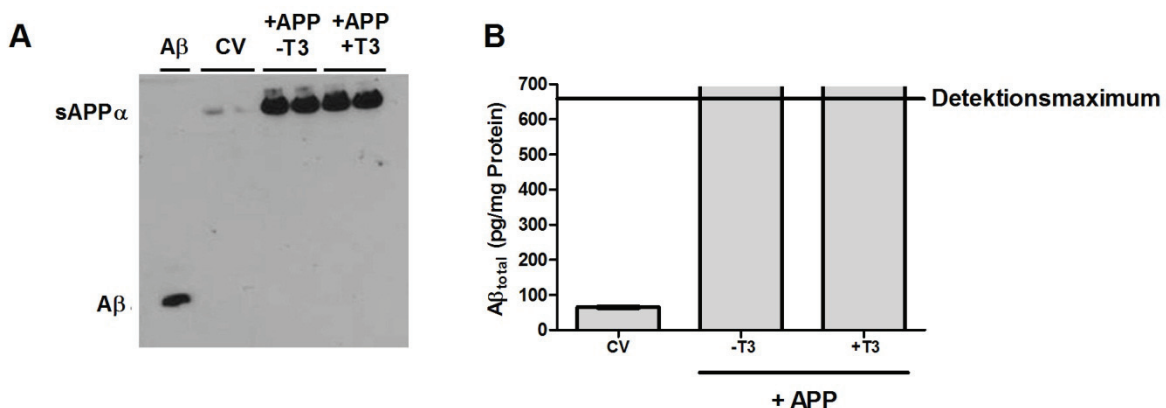


Abb. 5.5 Der Nachweis des für die AD pathognomonischen A β . (A) 24 Stunden differenzierende hNPC wurden adenoviral mit APP bzw. einem Kontrollvektor (CV) transduziert (250 infektiöse Partikel). Im Anschluss wurden sie für 48 Std. mit 3 nM T3 sowie dem Lösemittel 0,01% EtOH/HCl behandelt. Die Zellkulturüberstände wurden mittels Western Blot Analyse (Dr. Julia Ness, AG Weggen, HHU Düsseldorf) hinsichtlich des Gesamt-A β unter Verwendung eines A β -spezifischen Antikörpers untersucht. (B) Behandlung wie unter (A). Die Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA hinsichtlich des Gesamt-A β (1-x) untersucht. Der A β -Gehalt wurde auf die Proteinkonzentration im Zelllysat der entsprechenden Proben normalisiert.

Zunächst habe ich Western Blot Analysen zum Nachweis des A β durchgeführt. Der Antikörper detektiert jedoch nicht nur das A β -Fragment, sondern auch das durch die Prozessierung entstehende sAPP α als interne Kontrolle. Trotz der starken APP Überexpression, die durch die Erhöhung des sAPP α -Gehalts im Vergleich zum Kontrollvektor deutlich wird, detektierte der Antikörper kein A β in den Überständen der

hNPC. Die Positivkontrolle, die aus aufgereinigtem A β (500 pg) besteht, erbrachte jedoch ein Signal (Abb. 5.5 A). Um die A β Menge in diesen Überständen zu quantifizieren, habe ich die gleichen Proben in einem ELISA analysiert. Während die Überstände der mit Kontrollvektor transduzierten Zellen einen A β -Gehalt von 65 pg/mg Protein ergaben, lag der A β -Gehalt der APP-überexprimierenden hNPC Überstände über dem Detektionsmaximum (Abb. 5.5 B). Warum der Western Blot diese Mengen A β nicht detektiert, ist unklar.

Aus diesem Grund wurde als Standardmethode der ELISA in nicht gentechnisch-manipulierten hNPC etabliert und der protektive Effekt von Trijodthyronin auf die Prozessierung des APP zum pathognomonischen A β in Zellkulturüberständen der hNPC untersucht (Abb. 5.6).

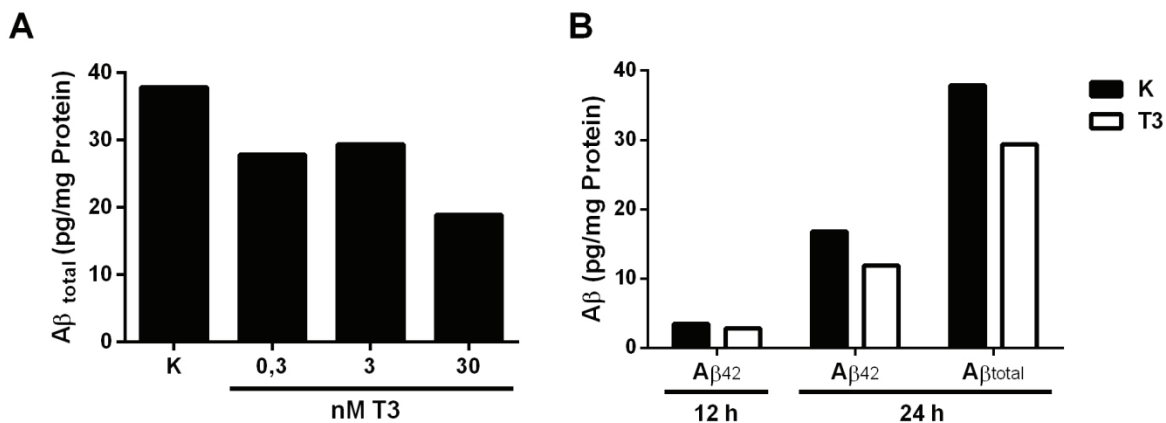


Abb. 5.6 T3 reduziert die Bildung des für die AD pathognomonischen A β . (A) Differenzierende hNPC wurden für 24 Std. mit 0,3, 3 und 30 nM T3 sowie dem Lösemittel 0,01 % EtOH/HCl behandelt. Die Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA hinsichtlich des Gesamt-A β (1-x) untersucht. (B) Differenzierende hNPC wurden für 12 und 24 Std. (h = Std.) mit 3 nM T3 sowie dem Lösemittel 0,01 % EtOH/HCl behandelt. Die Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA hinsichtlich des Gesamt-A β und A β_{42} (1-x, 1-42) untersucht. (A) & (B) Der A β -Gehalt wurde auf die Proteinkonzentration im Zelllysate der entsprechenden Proben normalisiert.

Der ELISA (1-x) zur Quantifizierung aller A β -Spezies (1-42, 1-40, 1-38, 1-28) detektiert bei einer 24-stündigen Behandlung mit 0,3 bzw. 3 nM T3 eine Abnahme des Gesamt-A β um etwa 30 Prozent. Durch einen T3-Stimulus von 30 nM wurde eine Reduktion des Gesamt-A β von 50 Prozent erreicht (Abb. 5.6 A). Da jedoch in der Pathologie der Alzheimerschen Erkrankung vor allem das A β_{42} von Bedeutung ist, wurde außerdem durch einen für A β_{42} -spezifischen ELISA die Wirkung von T3 auf die APP-Prozessierung zum A β_{42} analysiert (Abb. 5.6 B). Dazu wurde eine T3 Konzentration von 3 nM verwendet. Nach 12 Stunden ist der A β -Gehalt durch die T3-Belastung von 3,5 auf 2,8 pg/mg Protein reduziert, was einer Abnahme um 20 Prozent entspricht. Nach 24 Stunden liegt eine Reduktion um 30 Prozent

vor. Hier betrug der A β ₄₂-Gehalt in der Kontrolle 16,8 pg/mg Protein und verringerte sich unter Belastung auf 11,9. Dies entspricht exakt der prozentualen Verringerung des Gesamt-A β nach 24 Stunden in der 3 nM T3-Belastung.

Somit konnte ich zeigen, dass T3 tatsächlich die Prozessierung des APP zum für die AD pathognomonischen A β hemmt und somit möglicherweise protektiv auf die Entstehung oder Progression der AD wirkt. Nun stellte sich die Frage, auf welchem Mechanismus dieser protektive Effekt beruht. So zeigten Studien in der Maus, dass T3 die APP-Expression reduziert (O'Barr *et al.*, 2006). Dies habe ich nun in den hNPC auf transkriptioneller sowie translationaler Ebene überprüft (Abb. 5.6 A, B).

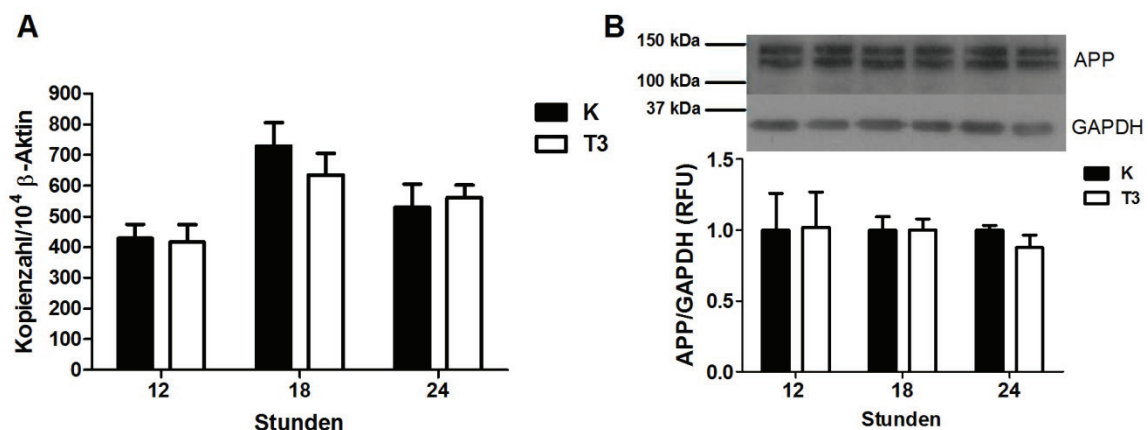


Abb. 5.7 Der protektive Effekt des T3 auf die APP-Prozessierung ist unabhängig von der APP-Expression. (A) Differenzierende hNPC wurden für 12, 18 und 24 Std. mit 3 nM T3 sowie dem Lösemittel 0,01 % EtOH/HCl behandelt. Die Genkopienzahlen von APP wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und auf β -Aktin abgeglichen. Alle Daten sind aufgetragen als Mittelwert $\pm$ SEM von 3-6 unabhängigen Experimenten. (B) Behandlung wie unter (A) beschrieben. Die Zelllysate wurden mittels Western Blot Analyse hinsichtlich der APP-Expression untersucht. Zur Quantifizierung wurde eine densitometrische Analyse der APP-Signale durchgeführt und diese auf GAPDH abgeglichen. Alle Daten sind aufgetragen als Mittelwert $\pm$ SEM von 4 unabhängigen Experimenten.

Die APP-mRNS Expression schwankt über einen Zeitraum von 12 bis 24 Stunden zwischen 429 und 730 Genkopien pro 10.000 β -Aktin. Zu keinem der Zeitpunkte besteht ein Unterschied in der APP-Expression zwischen der Lösemittelkontrolle und der T3-Belastung (Abb. 5.7 A). Dies spiegelt sich auch auf Proteinebene wieder. Hier ist zudem der APP-Gehalt zwischen den verschiedenen Zeitpunkten konstant (Abb. 5.7 B). Somit zeigt sich, dass der protektive Effekt des Schilddrüsenhormons unabhängig von der APP-Expression ist. Als letzten Schritt galt es nun, zu verifizieren, dass der protektive Effekt des Schilddrüsenhormons auf die APP-Prozessierung und die T3-abhängige Induktion von SorLA kausal zusammenhängen.

5.2.2 DER PROTEKTIVE EFFEKT VON T3 AUF DIE APP-PROZESSIERUNG IST ABHÄNGIG VON SORLA

Um die funktionelle Signifikanz der T3-abhängigen SorLA-Induktion innerhalb der APP-Prozessierung zu verifizieren, wurde nun ein lentiviraler *Knockdown* mittels shRNS angestrebt. Dazu musste zunächst die lentivirale Transduktion der hNPC etabliert werden. (Abb. 5.8).

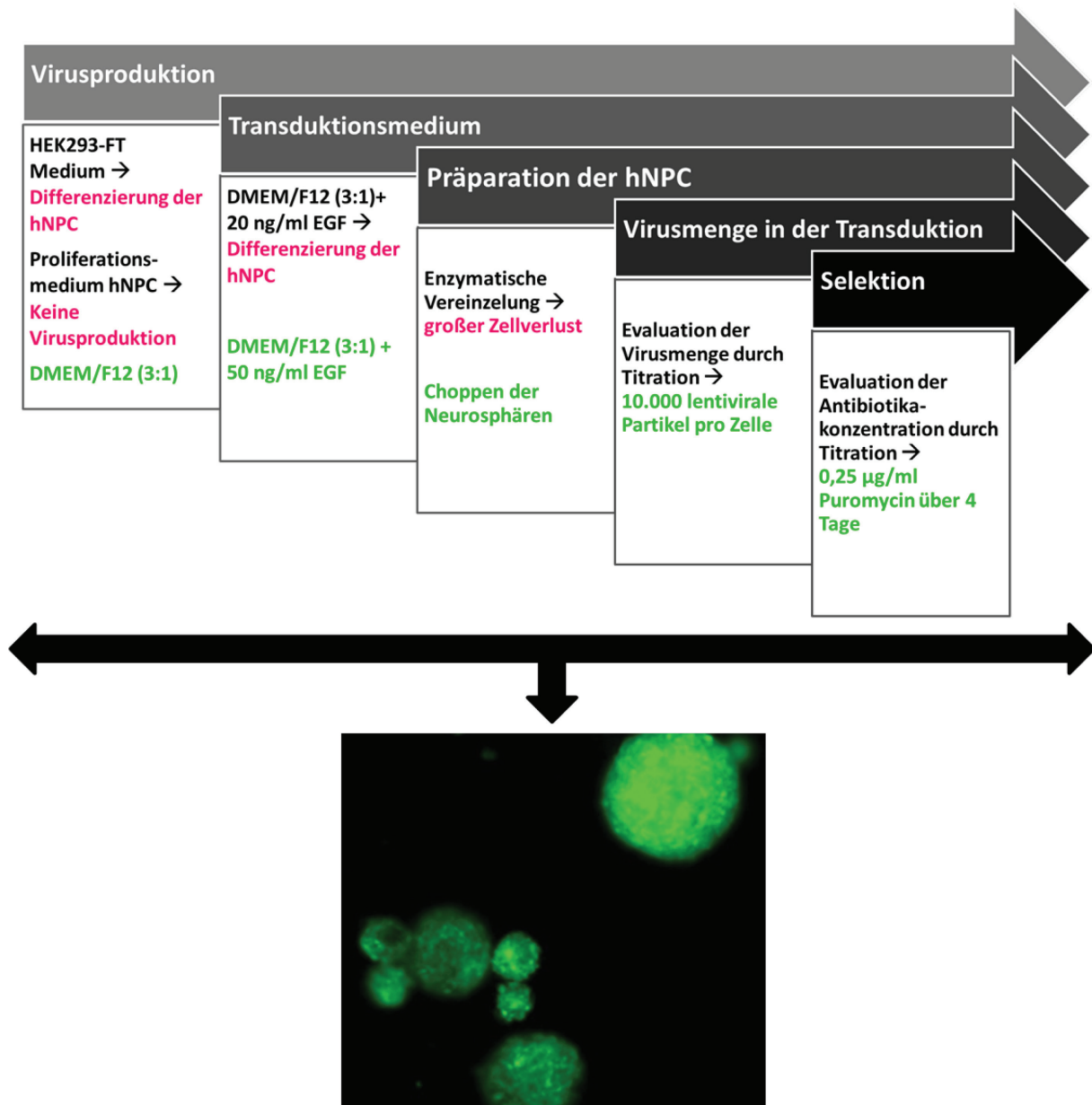


Abb. 5.8 Die Etablierung der lentiviralen Transduktion. Das Flussdiagramm zeigt die kritischen Faktoren innerhalb dieser Methode. Pinkfarben sind die unerwünschten Effekte und Grün der etablierte Faktor innerhalb der Methode. Des Weiteren ist eine lentivirale Transduktion der hNPC mit GFP dargestellt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Expression des GFP 48 Stunden nach Transduktion (200x Vergrößerung, in Zusammenarbeit mit Janette Schuwald).

Da die Expression eines Fluoreszenzmarkers eine einfache und zuverlässige Nachweismethode der Transfektionseffizienz darstellt, wurde mit Hilfe des GFP die lentivirale Transduktion in hNPC etabliert. Dazu musste zunächst die Virusproduktion etabliert werden. Ein kritischer Punkt hierbei war die Wahl des Mediums. Das Standardkulturmedium der Verpackungszelllinie enthält fötales Kälberserum. Wurde der Virus darin produziert, initiierte dies die Differenzierung von nahezu allen in der Transduktion eingesetzten hNPC und eine weitere Kultivierung war nicht möglich. Der Versuch den Virus im Proliferationsmedium der hNPC zu produzieren schlug fehl, es konnten keine ausreichenden Virustiter erreicht werden. Schließlich stellte sich heraus, dass eine effiziente Virusproduktion mit der Grundkomponenten des Proliferationsmediums (DMEM/F12, 3:1) möglich ist. Während der Transduktion der hNPC wurden diesem dann die anderen Komponenten des hNPC-Proliferationsmediums zugesetzt, doch auch dies führte zur Differenzierung von etwa 50 Prozent der eingesetzten hNPC. Die Gründe dafür sind unbekannt. Da jedoch die Proliferation der hNPC dosisabhängig dem Wachstumsfaktor EGF unterworfen ist (Moors *et al.*, 2009), verhindert der kurzzeitige Einsatz von mehr EGF die Differenzierung der hNPC nahezu vollständig.

Neben der Transduktionseffizienz ist jedoch die *Knockdown*-Effizienz essentiell. Diese hängt zum einen von den infektiösen, viralen Partikeln (*Transforming Units*, TU) und zum anderen vom Verhältnis der viralen Partikel zur eingesetzten Zellzahl ab. Zellzahl und eingesetzte Menge infektiöser Partikel sollten deshalb konstant sein.

Durch einen ELISA zur Quantifizierung des Virushüllproteins p24 wird der Gesamt-Virusgehalt, der sich aus infektiösen, nicht-infektiösen und zerfallenden Viruspartikeln zusammensetzt, bestimmt (Marozsan *et al.*, 2004). 1 TU entspricht demnach 100 bis 1000 viralen Partikeln und die Bestimmung des funktionellen Titers kann nur über eine Titration erfolgen. Diese ergab, dass im Falle der hNPC 10.000 virale Partikel pro Zelle einzusetzen sind.

Zu Beginn der Etablierung wurden die Neurosphären per Hand sortiert. Hier stellte sich jedoch heraus, dass bei großen Ansätzen von ca. 3000 Neurosphären die Abweichungen in der Transduktionseffizienz, verursacht durch eine schwankende Zellzahl, und damit der Verlust an hNPC während der Selektion, sehr hoch waren. Optimiert wurde dies durch die Etablierung einer Zählkammer (Nageotte). Diese weist eine Kammertiefe von 0,5 mm auf und ist deshalb geeignet, um Neurosphären zu zählen. Der Verlust an Neurosphären während der Selektion ist dadurch erheblich verbessert worden. Ein optimales Ergebnis könnte jedoch durch einen automatisierten Sortiervorgang mittels einem speziell auf große Partikel

ausgerichtetem Durchflusszytometer (*complex object parametric analyzer and sorter*, COPAS Plus, Union Biometrica Inc.) erreicht werden (Gassmann *et al.*, 2012).

Kritische Punkte innerhalb dieser Methode waren also das Medium, in dem der Virus produziert wurde, die einzusetzende Virusmenge im Verhältnis zur einzusetzenden Zellzahl der hNPC, die Größe der eingesetzten hNPC, das Medium während der Transduktion und den 24 Stunden danach, sowie die Selektion. Nach Etablierung all dieser Faktoren erbrachte die Transduktion mit dem GFP eine sehr hohe Transduktionseffizienz (Abb. 5.8) und es konnte mit der Testung der SorLA-shRNS auf ihre *Knockdown*-Effizienz begonnen werden (Abb. 5.9).

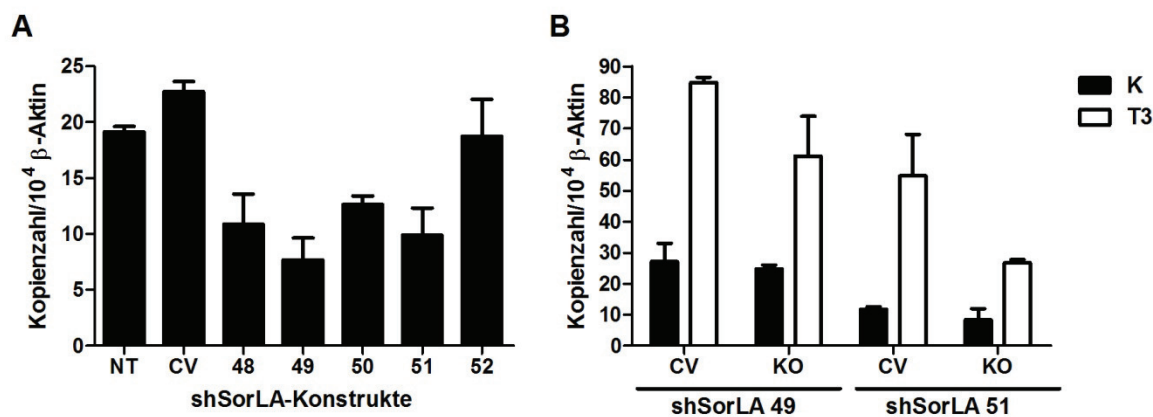


Abb. 5.9 Die Etablierung des lentiviralen SorLA-Knockdown. (A) HEK293-FT Zellen wurden eingesät und 24 Stunden später mittels Lipofectamine mit den SorLA-shRNS (48 bis 52) und dem entsprechenden Kontrollvektor (CV) transfiziert. Weitere 24 Stunden später wurde *Knockdown* der einzelnen shRNS-Plasmide überprüft. Die Genkopienzahlen von SorLA wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und auf β -Aktin abgeglichen. Alle Daten sind aufgetragen als Mittelwert $\pm$ min/max einer Doppelbestimmung. (B) hNPC wurden mit den SorLA-shRNS 49 und 51 transduziert. Nach Abschluss der Selektion wurden differenzierende hNPC für 18 Std. mit 3 nM T3 sowie dem Lösemittel 0,01 % EtOH/HCl behandelt. Die Genkopienzahlen von SorLA wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und auf β -Aktin abgeglichen. Alle Daten sind aufgetragen als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung eines Triplikats.

Die verwendeten shRNS stammten aus der TRC-Bibliothek (The RNAi Consortium, Open Biosystems), einer gemeinsamen Forschungsanstrengung universitärer Institute und internationaler Organisationen. Das Ziel der TRC ist es lentivirale shRNA Bibliotheken mit mehreren Konstrukten pro Gen zu erstellen, die 15.000 Zielgene des Menschen und der Maus erfassen. Die TRC prognostiziert, dass 1 oder 2 aus den 4 bis 5 Konstrukten pro Gen voraussichtlich mindestens 70 Prozent *Knockdown*-Effizienz zeigen (Thermo Fisher Scientific Inc, 2009). Für die SorLA shRNS-Konstrukte konnte ich dies bestätigen (Abb. 5.9). HEK293-FT Zellen wurden transient mit fünf verschiedenen SorLA-shRNS und dem Kontrollplasmid CV-shRNS transfiziert. Außerdem wurden nicht transfizierte Zellen als zusätzliche Kontrolle

mitgeführt. Die CV-shRNS Zellen unterschieden sich in ihrer SorLA Expression nicht wesentlich von den nicht transfizierten Zellen. Im Gegensatz dazu hemmten die fünf SorLA-shRNS die SorLA Expression unterschiedlich stark. Die shRNS 49 und 51 wiesen dabei die größte *Knockdown*-Effizienz auf. Im Vergleich zum Kontrollplasmid reduzierten sie die SorLA-Expression von 23 Genkopien pro 10.000 β -Aktin auf 8 (shRNS 49) und 10 (shRNS 51). Dies entspricht einem *Knockdown* von 65 bzw. 57 Prozent (Abb. 5.9 A). Diese shRNS wurden nun hinsichtlich ihrer Hemmung der T3-abhängigen Induktion von SorLA in hNPC getestet. Hier zeigte sich, dass, obwohl die shRNS 49 die größte *Knockdown*-Effizienz in den HEK293-FT Zellen hatte, ihr inhibitorischer Effekt auf die T3-induzierte Aufregulation von SorLA lediglich 30 Prozent betrug, wohingegen die shRNS 51 diese um 50 Prozent hemmte (Abb. 5.9 B). Zur Untersuchung, ob der protektive Effekt des T3 direkt mit der Aufregulation von SorLA verknüpft ist, wurde daher die shRNS 51 verwendet (Abb. 5.10).

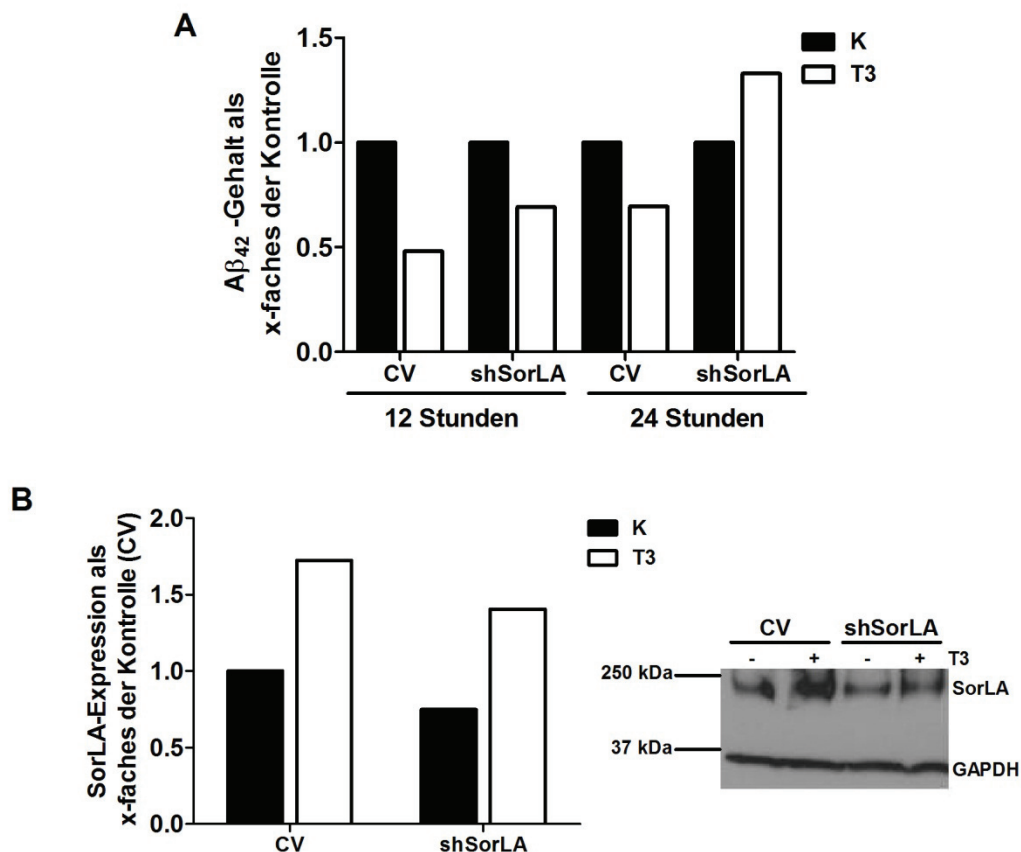


Abb. 5.10 Der protektive Effekt von T3 auf die APP-Prozessierung ist abhängig von SorLA (A) Mit Kontroll- bzw. SorLA-shRNS transduzierte hNPCs wurden für 24 Std. differenziert und über diesen Zeitraum mit 3 nM T3 sowie dem Lösemittel 0,01 % EtOH/HCl behandelt. Die Zellkulturüberstände wurden alle 12 Stunden abgenommen und durch neues Belastungsmedium ersetzt. Anschließend wurden sie mittels ELISA hinsichtlich des A β ₄₂-Gehalts untersucht. Der A β -Gehalt wurde auf die Proteinkonzentration im Zelllysat der entsprechenden Proben normalisiert. **(B)** Behandlung wie unter (A). Die Zelllysate wurden mittels Western Blot Analyse hinsichtlich der SorLA-Expression untersucht. Zur Quantifizierung wurde eine densitometrische Analyse der SorLA-Signale durchgeführt und diese auf GAPDH abgeglichen (n = 1)

Die Überstände der SorLA-shRNS sowie CV-shRNS transduzierten hNPC wurden zum A β -Nachweis in den A β ELISA eingesetzt. Die Abnahme des A β_{42} beträgt nach 12 Stunden T3-Behandlung in den mit der CV-shRNS transduzierten Neurosphären 50 Prozent, in den mit der SorLA-shRNS sind es lediglich 30 Prozent verglichen mit der Lösemittelkontrolle. Nach 24 Stunden ergab die Analyse der Zellkulturüberstände eine Verminderung des A β_{42} -Gehalts von 30 Prozent in den mit der CV-shRNS transduzierten hNPC und eine Steigerung (1,3-fach) des A β_{42} in den Neurosphären mit einer verminderten SorLA-Expression (Abb. 5.10 A). Die Western Blot Analyse des entsprechenden Zelllysats zeigt, dass die Transduktion der shRNS die Expression des SorLA-Proteins reduziert. Sowohl die basale Expression von SorLA als auch die durch T3-induzierte sind im Vergleich zu der jeweiligen Behandlung der Kontroll-hNPC um 20 Prozent vermindert (Abb. 5.10 B).

Da die durch T3-induzierte Abnahme des A β_{42} in den mit SorLA-shRNS transduzierten Zellen nach 12 Stunden vermindert und nach 24 Stunden nicht vorhanden ist, deuten diese präliminären Daten darauf hin, dass der protektive Effekt des Schilddrüsenhormons auf die APP-Prozessierung und die T3-abhängige Induktion von SorLA tatsächlich kausal zusammenhängen.

5.3 UNTERSUCHUNG DES MECHANISMUS DER T3-ABHÄNGIGEN AUFREGULATION VON SORLA

5.3.1 DIE SORLA-INDUKTION IST ABHÄNGIG VON TRANSLATIONSPROZESSEN

Um mehr über den molekularen Mechanismus der T3-abhängigen SorLA-Induktion herauszufinden, habe ich zunächst untersucht, ob es sich um einen direkten oder indirekten Signalweg handelt. Dazu wurde der Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) verwendet (Abb. 5.11). Sollte der Translationsinhibitor die T3-abhängige SorLA-Induktion hemmen, liegt eine indirekte Regulation vor. Wesentlich für diese Experimente war die Etablierung einer Positivkontrolle, die die Wirkung des T3-Stimulus verifiziert. In diesem Fall habe ich das T3-regulierte Gen *Hairless* gewählt (Thompson, 1996). Wie in der Literatur bereits beschrieben, wird *Hairless* im Gehirn durch T3 direkt über den THR α reguliert (Ramos und Weiss, 2006).

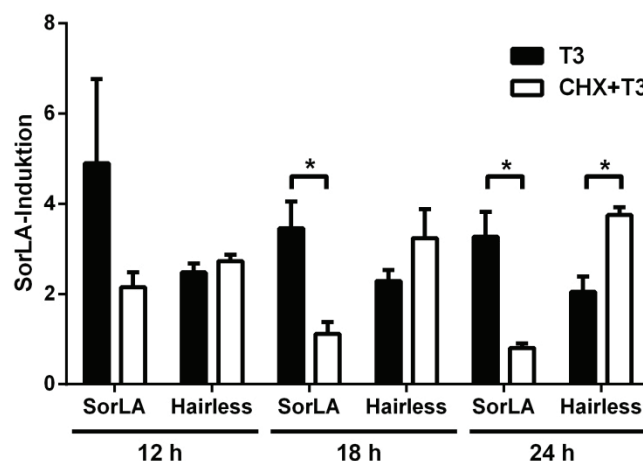


Abb. 5.11 Die SorLA-Induktion ist abhängig von Translationsprozessen. Differenzierte hNPC wurden für 12, 18 und 24 Std. mit 3 nM T3 und 25 μ M CHX sowie dem entsprechenden Lösemittel (0,01 % EtOH/HCl + 0,1 % DMSO) behandelt. Die Genkopienzahlen von SorLA und Hairless wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und auf β -Aktin abgeglichen. Gezeigt sind die Daten der T3- sowie der Ko-Behandlung mit T3 und CHX als Mittelwert $\pm$ SEM des Vielfachen der Kontrolle dreier unabhängiger Experimente. * p-Wert $\leq$ 0,05, signifikante Hemmung gegenüber der T3-Behandlung.

Die Exposition der NPC gegenüber 3 nM T3 führte zu einer 4,9-fachen, 3,5-fachen und 3,3-fachen Induktion von SorLA nach 12, 18 und 24 Stunden. Diese wird durch die Ko-Belastung von T3 mit CHX nach 12 Stunden auf 50 Prozent und nach 18 und 24 Stunden auf Kontrollniveau und 80 Prozent des Kontrollniveaus reduziert. Die T3-abhängige Regulation des Kontrollgens *Hairless* ist dagegen nach 12 und 18 Stunden nicht beeinflusst. Nach 24 Stunden führt die Ko-Behandlung zu einer 3,8-fachen Steigerung der Induktion, was auf eine

Superinduktion hindeutet. Dieses Phänomen kann - beispielsweise wegen veränderter Translation von Repressormolekülen - durch eine verlängerte und stabilisierte Expression der schnell-regulierten Gene ausgelöst werden (Lau und Nathans, 1987; Haarmann-Stemmann *et al.*, 2007). Da die Induktion von Hairless im Gegensatz zu der von SorLA nicht gehemmt, sondern sogar gesteigert ist, ist es naheliegend, dass diese beiden T3-abhängigen Gene durch unterschiedliche molekulare Mechanismen reguliert werden.

Für die Induktion von SorLA wird im Gegensatz zu Hairless Proteinbiosynthese benötigt. Da BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) kürzlich als Induktor von SorLA in der Maus *in vivo* und *in vitro* beschrieben wurde (Rohe *et al.*, 2009), stellt dieser neurotrophe Faktor einen möglichen Kandidaten innerhalb der Signalkaskade dar, der zur T3-induzierten Genexpression von humanem SorLA führen könnte. T3 induziert SorLA nach 12 Stunden vierfach (Abb. 5.3 C), daher wäre mit einer T3-abhängigen BDNF-Induktion vor dem Zeitpunkt von 4 Stunden zu rechnen. Aus diesem Grund wurde die BDNF-mRNS nach 2, 4, 6 und 8 Stunden quantifiziert (Abb. 5.12 A).

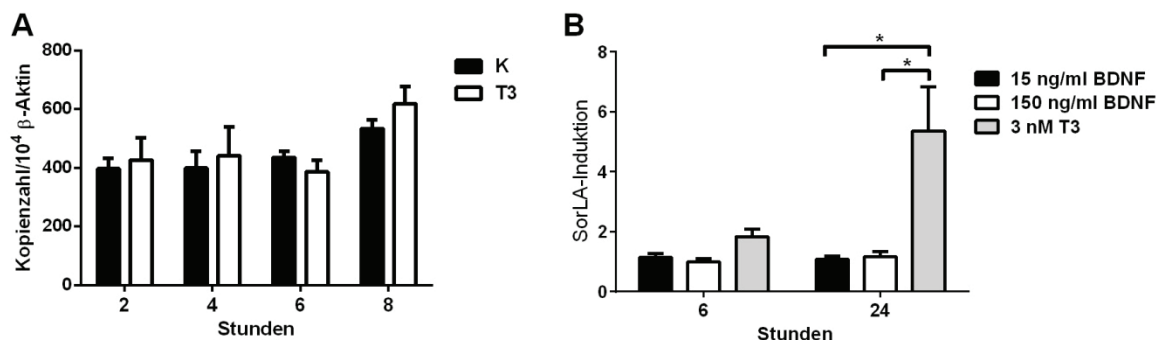


Abb. 5.12 Die Induktion von SorLA ist unabhängig von BDNF. (A) Differenzierte hNPCs wurden für 2, 4, 6 und 8 Std. mit 3 nM T3 sowie dem Lösemittel 0,01 % EtOH/HCl behandelt. Die Genkopienzahlen wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und auf β -Aktin abgeglichen. Alle Daten sind aufgetragen als Mittelwert $\pm$ SEM dreier unabhängiger Experimente. (B) Differenzierte hNPC wurden für 6 und 24 Std. mit 15 und 150 ng/ml BDNF sowie 3 nM T3 und der entsprechenden Lösemittelkontrolle (0,1 % BSA in dH₂O bzw. 0,01 % EtOH/HCl) behandelt. Die Genkopienzahlen wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und auf β -Aktin abgeglichen. Alle Daten sind aufgetragen als Mittelwert $\pm$ SEM (Vielfaches der Kontrolle) von 3 unabhängigen Experimenten. * p-Wert $\leq$ 0,05.

Eine Exposition der NPC mit 3 nM T3 beeinflusste die BDNF mRNS-Expression von 2 bis 8 Stunden jedoch nicht. (Abb. 5.12 A). Dies deutet daraufhin, dass auch die T3-abhängige Induktion von SorLA unabhängig von BDNF verläuft. Um jedoch vollständig auszuschließen, dass BDNF an der Induktion von SorLA beteiligt ist, wurden die hNPC außerdem mit 15 und 150 ng/ml BDNF belastet. Die physiologische Konzentration im Serum von Primaten beträgt etwa $18 \pm 7,9$ ng/ml (Mori *et al.*, 2003). BDNF beeinflusste die SorLA-Induktion nicht. Im

Gegensatz dazu induziert T3, welches als Kontrolle mitgeführt wurde, nach 6 Stunden die SorLA mRNA zweifach und nach 24 Stunden fünffach (Abb. 5.12 B). Die Möglichkeit, dass BDNF an der Aufregulation von SorLA beteiligt ist, ist somit ausgeschlossen, da T3 weder BDNF induziert (Abb. 5.12 A) noch die Belastung mit BDNF eine Induktion von SorLA hervorruft (Abb. 5.12 B).

5.3.2 ANALYSE DES *SORLA*-PROMOTERS

Um den molekularen Mechanismus der T3-abhängigen SorLA-Induktion weiter zu untersuchen, habe ich mich als Nächstes mit dem SorLA-Promoter beschäftigt. Zunächst wurde dieser hinsichtlich putativer Thyroidhormon responsiver Elemente (TRE) mit der Software TFBind analysiert. Innerhalb der ersten 2000 bp wurden 10 putative TRE ermittelt (Kap. 11, SorLA-Promoter Sequenz). Im Falle einer genomischen Regulation interagiert T3 mit dem Thyroidhormonrezeptor, welcher an TRE im SorLA-Promotor bindet, oder schon gebunden ist, und die Transkription moduliert. Deshalb sollten die ersten 2000 bp des SorLA-Promoters in einen Reportergenvektor (pMCC-eGFP, Kooperation mit Prof. Fritz Boege, Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, HHU Düsseldorf) kloniert werden (Abb. 5.13), um damit den Mechanismus der T3-abhängigen Regulation von SorLA aufzuklären.

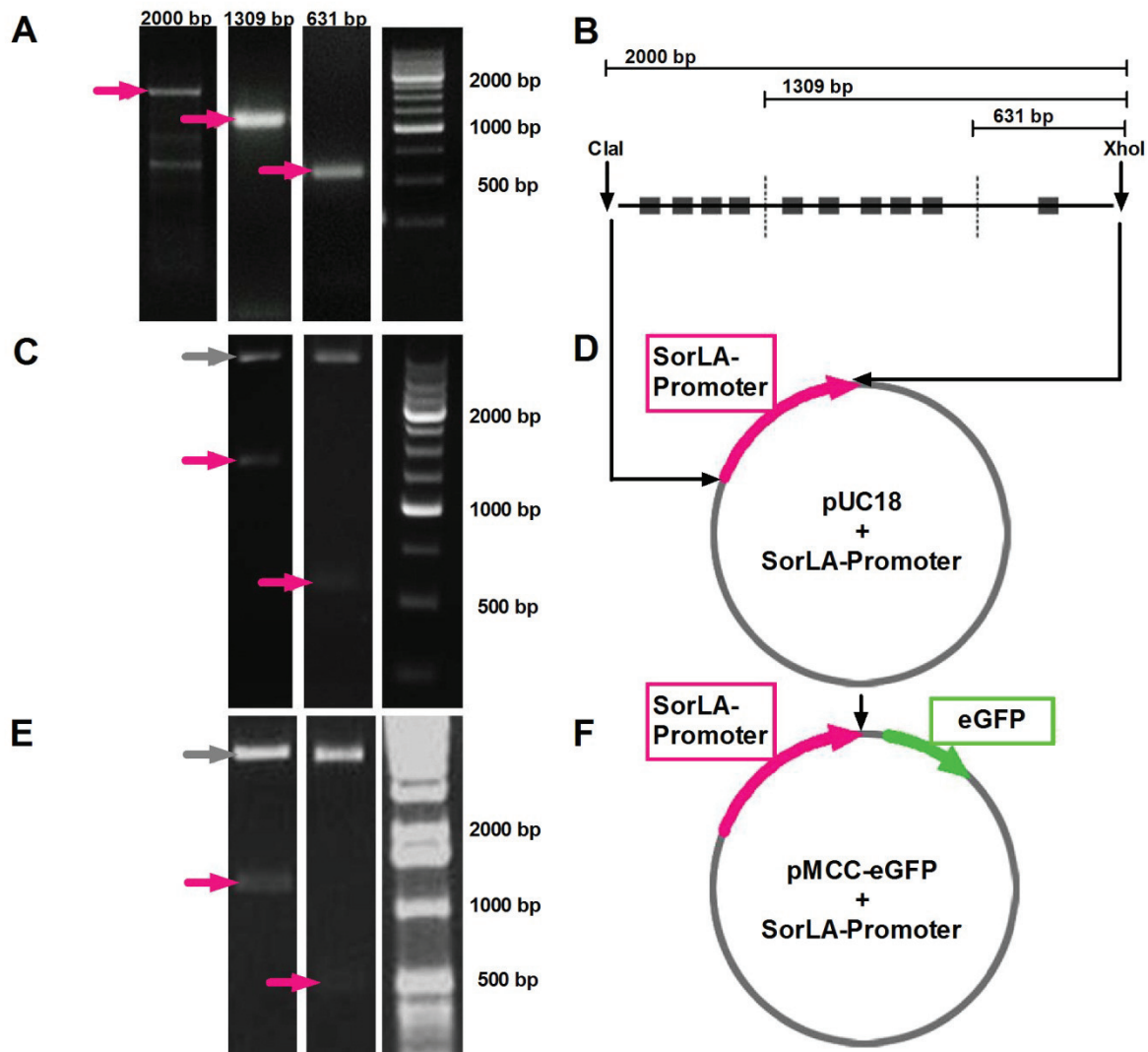


Abb. 5.13 Das Klonierungsschema der SorLA-Promoter-Konstrukte. (A) Mit Ethidiumbromid versetzte, 1 %-ige Agarosegele der amplifizierten SorLA-Promoter-Fragmente (2000, 1309 und 631 bp) und des Längenstandards (Marker XVI, Roche). Die aus dem Gel eluierten Amplikons sind mit pinkfarbenen Pfeilen markiert. Diese wurden in den pUC18-Vektor kloniert. (B) Gezeigt sind die ausgewählten Bereiche des humanen SorLA-Promotors mit jeweiliger Basenpaar-Länge. Die Kästen stellen schematisch die putativen TRE-Sequenzen dar, welche mit TFBind ermittelt wurden. Die Restriktionsenzyme *ClaI* und *XhoI* markieren die über PCR eingefügten Schnittstellen. (C) Mit Ethidiumbromid versetzte, 1 %-ige Agarosegele der mittels *ClaI* und *XhoI* aus pUC18 geschnittenen SorLA-Promoter-Fragmente (1309 und 631 bp) und des Längenstandards (Marker XVI, Roche). Der linearisierte pUC18-Vektor ist mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet. Die aus dem Gel eluierten Fragmente sind mit pinkfarbenen Pfeilen markiert. Diese wurden über die Schnittstellen *ClaI* und *XhoI* in den Vektor pMCC-eGFP kloniert. (D) Schematische Darstellung der in pUC18 klonierten SorLA-Promoter-Konstrukte. (E) Testverdau der pMCC-eGFP/SorLA-Promoter-Konstrukte. Mit Ethidiumbromid versetzte, 1 %-ige Agarosegele der mittels *ClaI* und *XhoI* aus pMCC-eGFP geschnittenen SorLA-Promoter-Fragmente (1309 und 631 bp) und des Längenstandards (Marker X, Roche). Die SorLA-Promoter-Fragmente sind mit pinkfarbenen Pfeilen markiert. Der linearisierte pMCC-eGFP ist mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet. (F) Schematische Darstellung der in pMCC-eGFP klonierten SorLA-Promoter-Konstrukte.

Um schon früh eingrenzen zu können, welche der TRE funktional sind, wurden die ersten 2000 bp noch zweimal unterteilt, woraus die Konstruktängen von 2000, 1309 und 631 bp resultieren. Diese wurden mittels konventioneller PCR amplifiziert (Abb. 5.13 A). Außerdem

wurden durch die PCR je eine *Clal*-Schnittstelle am 3'-Ende und je eine *XhoI*-Schnittstelle am 5'-Ende eingefügt (Abb. 5.13 B). Die PCR-Fragmente wurden anschließend über eine *Eco53kI*-Schnittstelle (*blunt-end*) in den pUC18-Vektor ligiert (Abb. 5.13 D). Dies gelang jedoch nur mit den Konstrukten der Längen 1309 und 631 bp (Abb. 5.13 C).

Vor der Verwendung für weitere Klonierungsschritte wurden diese zunächst mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Die fehlerfreien Konstrukte wurden in den Expressionsvektor pMCC-eGFP kloniert (Abb. 5.13 E, F). Dazu wurde aus dem Originalvektor der CMV-Promoter mittels eines Restriktionsverdaus mit den Enzymen *Clal* und *XhoI* entfernt und durch den SorLA-Promoter ersetzt. Die Promoter-Fragmente wurden ebenfalls mit den Enzymen *Clal* und *XhoI* aus pUC18 ausgeschnitten (Abb. 5.13 C) und im Folgenden in den pMCC-eGFP Vektor umklontiert (Abb. 5.13 F). Dieser Schritt wurde nochmals durch eine Restriktion des Promoters aus dem pMCC-Rückgrat überprüft (Abb. 5.13 E).

Nach Abschluss der Klonierung konnten die Konstrukte für das Reporteragen-Assay verwendet werden. Dazu wurden die Zelllinien Caco2 und HepG2 gewählt, da diese eine funktionelle T3-Signaltransduktion besitzen (Theriault *et al.*, 1992; Matosin-Matekalo *et al.*, 1998). Zusätzlich wurde ein zweiter Fluoreszenz-Vektor (pMCC-TagRFP, Kooperation mit Prof. Fritz Boege) als Transfektionskontrolle in den Versuch integriert. Um die Funktionalität der Ko-Transfektion zu überprüfen und als Maß für die Intensität der grünen Fluoreszenz, wurde neben den Promoter-Konstrukten außerdem der Original-eGFP-Vektor in Kombination mit pMCC-RFP in einem Verhältnis von 1:5 transfiziert. In den Kontrollvektoren pMCC-eGFP bzw. -RFP wird die Expression der Reportergene über einen CMV-Promoter reguliert.

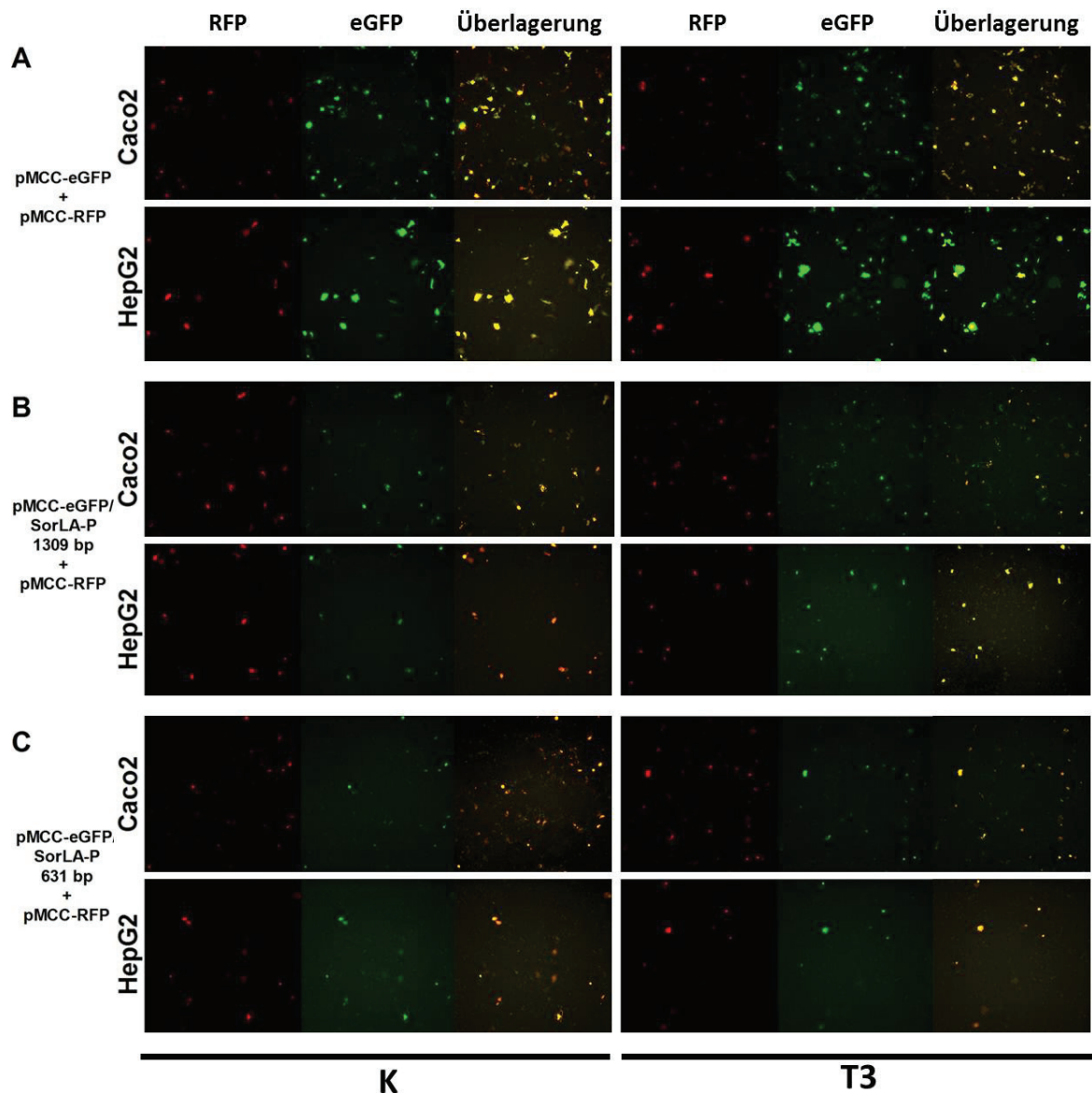


Abb. 5.14 Die Transfektion der SorLA-Promoter-Konstrukte in CaCo2 und HepG2 Zellen. 4×10^3 CaCo2 und 2×10^5 HepG2 Zellen wurden in Medium mit hormonfreiem FCS eingesät und 24 Stunden später mittels Lipofectamine transfiziert. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen mit 30 nM T3 (T3) und der entsprechenden Lösemittelkontrolle 0,01 % EtOH/HCl (K) belastet. Die GFP und RFP-Fluoreszenz wurde 48 Stunden nach der Belastung mit Hilfe des Array Scan dokumentiert. Das erste Bild zeigt die RFP-Fluoreszenz (rot), das zweite die GFP-Fluoreszenz (grün) und das dritte Bild zeigt eine mit Adobe Photoshop generierte Überlagerung der Farbenen (gelb). Dargestellt sind exemplarische Bilder der jeweiligen Belastungen. **(A)** Transfektion der Kontrollvektoren pMCC-eGFP und -RFP. Die Expression der Fluoreszenzproteine wird durch einen CMV-Promoter reguliert. **(B)** Transfektion des pMCC-eGFP/SorLA-Promoter-Konstrukts (1309 bp) und des Kontrollvektors pMCC-TagRFP. **(C)** Transfektion des pMCC-eGFP/SorLA-Promoter-Konstrukts (631 bp) und des Kontrollvektors pMCC-TagRFP.

Durch die transiente Transfektion der Kontrollvektoren pMCC-eGFP und -RFP in die Zelllinien HepG2 und CaCo2 konnte ich zunächst zeigen, dass die Ko-Transfektion methodisch funktioniert. 72 Stunden nach der Transfektion war eine deutliche eGFP- bzw. RFP-Fluoreszenz sichtbar (Abb. 5.14 A). Auch die Ko-Transfektion des pMCC-RFP und der SorLA-Promoter-Konstrukte verlief positiv, da basale Reporterexpression präsent war (Abb.

5.14 B [K], C [K]). Allerdings war weder in dem 1309 bp langen Promoter-Konstrukt (Abb. 5.14 B) noch in dem der Länge 631 bp (Abb. 5.14 C) ein Unterschied in der eGFP-Expression zwischen der Lösemittelkontrolle und der T3-Belastung detektierbar. Dies zeigt somit, dass die klonierten Konstrukte funktionell sind, aber keine der beiden Zelllinien mit einer Erhöhung der Reporter-Expression auf den T3-Stimulus reagiert.

Parallel zu diesen Experimenten wurde die Transfektion der hNPC durch das 4D-Nucleofector™ System etabliert. Durch Elektroporation wird hier Fremd-DNS in eukaryotische Zellen eingebracht. Das System ist sowohl für proliferierende als auch für differenzierende NPC geeignet. Zur Etablierung wurde der von Lonza zur Verfügung gestellte Vektor pMAX-GFP verwendet (Abb. 5.15 A, B).

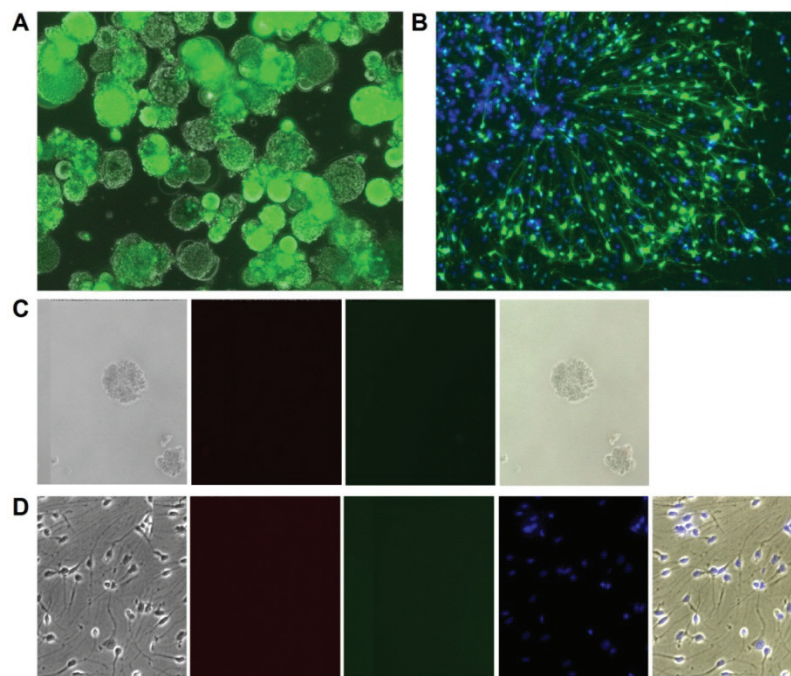


Abb. 5.15 Die Etablierung des 4D-Nucleofector™ Systems. (A) 400 proliferierende Neurosphären wurden mit Transfektionsmastermix (P3-Lösung + Supplement 1 [4,5:1] + 0,4 µg pMax-GFP; P3 Primary Cell 4D-Nucleofector® X Kit) versetzt, in ein 16-well Nucleocuvette® Strip überführt und mit der X-Unit des Nucleofector Systems (Programm DC-104) elektroporiert. 24 Stunden nach Transfektion wurde das GFP-Signal fluorezenzmikroskopisch überprüft (200x Vergrößerung). (B) 150 Neurosphären wurden in ein 24-Well ausplattiert und 72 Stunden differenziert. Im Anschluss wurden sie mit 350 µl Transfektionsmastermix (AD1-Lösung + Supplement 1 [4,5:1] + 17,5 µg pMax-GFP; AD1 4D-Nucleofector™ Y Kit) versetzt und mit der Y-Unit des Nucleofector Systems (Programm ER-137) elektroporiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, eine Zellkernfärbung durchgeführt (HOECHST, blau) und das GFP- bzw. HOECHST-Signal fluorezenzmikroskopisch überprüft (200x Vergrößerung). (C) 400 proliferierende Neurosphären wurden mit 20 µl Transfektionsmastermix (P3-Lösung + Supplement 1 [4,5:1] 0,1 µg pMCC-GFP + 0,4 µg pMCC-TagRFP) versetzt, in ein 16-well Nucleocuvette® Strip überführt und mit der Y-Unit des Nucleofector Systems (Programm DC-104) elektroporiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden das GFP- und RFP-Signal fluorezenzmikroskopisch überprüft. Gezeigt sind außerdem eine Durchlichtaufnahme sowie die Überlagerung (200x Vergrößerung). (D) 150 Neurosphären wurden in ein 24-Well ausplattiert und 72 Stunden differenziert. Im Anschluss wurden sie mit 350 µl Transfektionsmastermix (AD1-Lösung + Supplement 1 [4,5:1] + 3 µg pMCC-

GFP + 12 µg pMCC-TagRFP; AD1 4D-Nucleofector™ Y Kit) versetzt und mit der Y-Unit des Nucleofector Systems (Programm ER-137) elektroporiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, eine Zellkernfärbung durchgeführt (HOECHST, blau) und das GFP-, RFP- bzw. HOECHST-Signal fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Gezeigt sind außerdem eine Durchlichtaufnahme sowie die Überlagerung (400x Vergrößerung).

Obwohl mit dem pMax-GFP (Kontrollvektor der Firma Lonza) eine sehr gute Transfektionseffizienz erreicht wurde (Abb. 5.15 A, B), war es nicht möglich, dies mit den pMCC-Vektoren zu reproduzieren. Exemplarisch ist hier die Transfektion der Vektoren mit den CMV-regulierten Fluoreszenzproteinen gezeigt. Diese erbrachte weder unter proliferativen noch unter differenzierenden Bedingungen ein Fluoreszenz-Signal (Abb. 5.15 C, D). Eine Untersuchung der T3-abhängigen Aktivierung der Transkription durch den SorLA-Promoter in hNPC konnte somit nicht durchgeführt werden.

Zusammenfassend konnte ich also nachweisen, dass die Aufregulation von SorLA durch einen translationsabhängigen Prozess gesteuert wird, die präzisen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bleiben Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

6 DISKUSSION

6.1 DIE CHARAKTERISIERUNG DER *IN VITRO* MODELLSYSTEME

Innerhalb dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Aufregulierung des Sortilinrezeptors SorLA durch das Schilddrüsenhormon T3 zu einer Verminderung der Prozessierung von APP zum pathogenen A β führt. Für diese Untersuchungen war es essentiell, ein *in vitro* System zu verwenden, welches profizient in der APP Prozessierung sowie im T3 Signalweg ist. Primärzellen des Menschen werden heutzutage generell als die bevorzugteren Zellsysteme angesehen, da sie humane Signalwege besser konservieren als Zellen des Nagers, welche eben Nager Signalwege *in vitro* abbilden (Abbott *et al.*, 1999; Gassmann *et al.*, 2010). Diese Aussage ist jedoch nicht allgemeingültig, sondern sicherlich stark vom untersuchten Signalweg abhängig. Wesentliche Limitierungen der Nutzung humaner Primärzellen sind zudem Kosten und Menge des vorhandenen Materials. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Tumorzelllinien in die Untersuchungen mit einbezogen, da solche wesentlich günstiger sind und Zellmaterial in großen Mengen zu generieren ist. Aus diesem Grund wurden hNPC, SH-SY5Y und A172 Zellen auf ihre Eignung zur Beantwortung der oben genannten Fragestellung untersucht. Humane NPC wachsen als 3D Kulturen in Neurosphären, bilden die humane Neurogenese (Progenitorzellproliferation, -migration und -differenzierung; Abb. 4.1 A-D) *in vitro* ab und repräsentieren somit als organotypische Kulturen einen Teil der Physiologie des Gehirns (Fritsche *et al.*, 2005; Moors *et al.*, 2007; Moors *et al.*, 2009; Moors *et al.*, 2010; Tegenge *et al.*, 2011; Fritsche *et al.*, 2011). Unter Wachstumsfaktorentzug differenzieren sie zu Neuronen und zu Gliazellen (Astrozyten/Oligodendrozyten) und bilden die phänotypischen Marker dieser Zelltypen aus (Abb. 4.1 C & D; Breier *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu dieser organotypischen Mischkultur der verschiedenen Hirnzelltypen exprimieren die Tumorzelllinien neuronalen (SH-SY5Y, Abb. 4.1 F) und glialen Ursprungs (A172, Abb. 4.1 H) ähnlich der NPC die für die jeweiligen Ursprungsgewebe phänotypischen Marker DCX und GFAP (Gil und Kang, 2008; Abcam, 2009). Um mit Hilfe dieser Modellsysteme die Frage zu beantworten, ob das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin präventiv auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins zum amyloidogenen A β und somit auf die Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung wirkt, musste zunächst sichergestellt werden, dass die obengenannten Modellsysteme alle für diese Fragestellung notwendigen Gene exprimieren. Dazu gehören das Amyloid-Vorläuferprotein, die α -Sekretase ADAM10, die β -Sekretasen BACE1/2 und die katalytische Untereinheit der γ -Sekretase PSEN sowie die

Schilddrüsenhormonrezeptoren α bzw. β . Des Weiteren war die T3-abhängige Induktion von SorLA essentiell zur Beantwortung der Frage.

Northern Blot Analysen der APP-mRNS zeigten, dass APP in nahezu allen Geweben vorhanden ist. Dabei ist die Expression im Gehirn im Vergleich zu anderen Organen besonders hoch (Tanzi *et al.*, 1987). Physiologisch nimmt die Isoform APP₆₉₅ den größten Teil des im Hirn gebildeten APP ein, während die längeren Splice-Varianten eher in anderen peripheren Geweben vorkommen (Mita *et al.*, 1989; Tanaka *et al.*, 1989). In den im Rahmen dieser Arbeit gewählten Zellmodellen, den hNPC, SH-SY5Y sowie A172 Zellen, war das APP exprimiert (Abb. 5.1). Zur quantitativen RT-PCR Analyse wurde ein Primerpaar verwendet, das alle Splice-Varianten des APP detektiert. Eine Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Splice-Varianten konnte mit diesem Primer demnach nicht durchgeführt werden. In Gehirnen der Ratte wurden Neuronen im Gegensatz zu Gliazellen als Hauptort der APP-Synthese identifiziert (Mita *et al.*, 1989). Dies ließ sich in meinen Analysen mit den verwendeten Modellen nicht bestätigen. Die hNPC als organotypische Mischkultur, welche nach Differenzierung aus ca. 10 Prozent neuronalen Zellen bestehen, die SH-SY5Y neuronalen Ursprungs wie auch die A172 glialen Ursprungs wiesen sehr ähnliche APP-Gehalte auf. Wesentliche Unterschiede zwischen den Arbeiten in den Gehirnen der Ratte (Mita *et al.*, 1989) und diesen Untersuchungen bestehen darin, dass diese hier verwendeten Modelle (i) *in vitro* Arbeiten sind, (ii) aus einer unterschiedlichen Spezies, nämlich dem Menschen, stammen, (iii) im Falle der hNPC es fetale und keine adulten Zellen sind und (iv) die Zelllinien betreffend es Tumorzellen sind, die nur eingeschränkt die Physiologie des Ursprungsgewebes repräsentieren. Daher ist der Vergleich mit den Ergebnissen von Mita *et al.* (1989) nur eingeschränkt möglich.

Neben dem APP exprimierten alle drei Zellmodelle die drei für die APP-Prozessierung notwendigen Sekretasen. Als potentielle Enzyme mit α -Sekretase Aktivität wurden die Mitglieder der Disintegrin- und Metalloprotease Familie ADAM9, 10 und 17 identifiziert (Buxbaum *et al.*, 1998; Koike *et al.*, 1999; Lammich *et al.*, 1999). Da ADAM10 die im Hirn am stärksten exprimierte und die in Neuronen physiologisch relevante Isoform zur konstitutiven Spaltung des APP zu sAPP α ist (Chantry und Glynn, 1990; Esch *et al.*, 1990; Howard *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 2010), wurde die Expression dieser Isoform in allen drei Zellmodellen, hNPC, A172 und SH-SY5Y, nachgewiesen (Abb. 5.1). Frühere Arbeiten fanden ebenfalls ADAM10-mRNS, α -Sekretase-Aktivität sowie das aus der α -Sekretase-vermittelten Spaltung des APP resultierende sAPP α in A172-Zellen (Tanabe *et al.*, 2007). Das ADAM10-Protein wurde ebenfalls in SH-SY5Y detektiert (Hogl *et al.*, 2011; Colombo *et al.*,

2012). Das Vorhandensein von ADAM10 in hNPC war zu erwarten, da ADAM10 essentiell für die Entwicklung des murinen Gehirns ist (Jorissen *et al.*, 2010). Dessen Expression in A172 und SH-SY5Y spiegelt ebenfalls die Literatur wider.

Auch für die β -Sekretase sind mehrere homologe Proteine (BACE1/2) identifiziert worden (Yan *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Farzan *et al.*, 2000). Beide Enzyme werden in neuronalen Geweben exprimiert, BACE2 allerdings auf einem niedrigeren Niveau als BACE1 und vorwiegend in Gliazellen (Bennett *et al.*, 2000; Laird *et al.*, 2005). Auch in den in dieser Arbeit untersuchten Zellmodellen fand sich eine zehnfach höhere BACE2-mRNS-Expression in Glioblastom-Zellen verglichen mit hNPC und SH-SY5Y Zellen. Im Gegensatz dazu liegen die BACE1-Kopienzahlen in allen untersuchten Zellmodellen in einem ähnlichen Bereich (Abb. 5.1). In aus embryonalen Stammzellen differenzierten hNPC sowie SH-SY5Y konnte das BACE1-Protein durch Western Blot Analysen detektiert werden (Porayette *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011), *in situ* Hybridisierungen zeigten eine Ko-Expression von BACE1 und APP ausschließlich in kortikalen Neuronen des Menschen sowie der Maus (Marcinkiewicz und Seidah, 2000). Um in den Ko-Kulturen der NPC die exakte Zelltyp-spezifische Expression zu erfassen, müssten immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt werden, die allerdings über den Inhalt dieser Arbeit hinausgehen.

Expressionsstudien zur quantitativen Erfassung von APP, ADAM10 und BACE1 mRNS im menschlichen Kortex demonstrierten, dass im direkten Vergleich die Expression von APP am höchsten ist, gefolgt von BACE1 und ADAM10 (Marcinkiewicz und Seidah, 2000). In den in dieser Arbeit untersuchten Zellmodellen wird das APP ebenfalls am stärksten exprimiert, BACE1 und ADAM10 unterscheiden sich jedoch nicht in der Höhe ihrer Expression (Abb. 5.1). Das mag entweder daran liegen, dass es sich bei den untersuchten Zellmodellen ausschließlich um *in vitro* Modelle handelt, oder an der Tatsache, dass die untersuchten Zellen kein normales adultes Gewebe repräsentieren.

Auch die katalytische Untereinheit der γ -Sekretase wies in allen drei Zellmodellen eine ähnliche hohe Expression auf (Abb. 5.1). Schon in einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde PSEN in SH-SY5Y Zellen auf Proteinebene nachgewiesen (Xiong *et al.*, 2011), während dazu keine Untersuchungen in den A172-Zellen beschrieben sind. Für die hNPC war eine substantielle γ -Sekretase Expression zu erwarten, da auch *in vivo* PSEN eine wichtige Rolle in der neuronalen Entwicklung und der adulten Neurogenese spielt (Yang *et al.*, 2000; Wen *et al.*, 2002; Gadadhar *et al.*, 2011) und es scheint, als ob NPC die *in vivo* exprimierten Signalwege auch *in vitro* konservieren könnten (Moors *et al.*, 2007; Moors *et al.*, 2010; Gassmann *et al.*, 2010). Dies bestätigen die Beobachtungen zur physiologischen Funktion von

APP in der frühen Embryogenese in humanen embryonalen Stammzellen sowie neuronalen Progenitorzellen, in welchen die Sekretasen exprimiert und deren Funktionalität durch den Nachweis von A β bestätigt wurden (Porayette *et al.*, 2009).

Zusammenfassend entspricht also die Expression des APP sowie die Expression der Sekretasen in den hNPC weitestgehend der *in vivo* Situation im Gehirn. Abweichend ist lediglich, dass ADAM10 und BACE1 das gleiche Expressionslevel aufweisen. Die SH-SY5Y scheinen ebenfalls mit der *in vivo* Situation vergleichbar zu sein. Dagegen entspricht die APP-Expression in den A172 möglicherweise nicht dem physiologischen Bild, da diese trotz glialen Ursprungs einen mit den SH-SY5Y und hNPC vergleichbaren Gehalt an APP aufweisen, der Hauptort der APP-Synthese jedoch in Zellen neuronalen Ursprungs liegt.

Ebenso wesentlich für die Untersuchung der Fragestellung dieser Arbeit ist eine funktionelle THR-Maschinerie der Zellmodelle. Eine Voraussetzung dafür ist die Expression dieser Rezeptoren. Quantitative RT-PCR Analysen ergaben, dass hNPC und SH-SY5Y Zellen beide THR-Isotypen, nämlich THR α und THR β , exprimieren. Die Expression des THR α ist jedoch in den hNPC hundertfach und in den SH-SY5Y zehnfach höher verglichen mit der Expression der β -Isoform. In der Glioblastom-Zelllinie A172 ist lediglich die mRNS der α -Variante exprimiert (Abb. 5.2). Wegen eines Mangels an funktionierenden Antikörpern konnte dies im Rahmen dieser Arbeit auf Proteinebene nicht bestätigt werden. *In vivo* werden beide, THR α und β , im Gehirn exprimiert. Im Nager ist der THR α während der fötalen Hirnentwicklung die prädominante Isoform (Bradley *et al.*, 1992). Auch im humanen Gehirn ist der THR α während des Fötalstadiums signifikant höher als der THR β exprimiert, dessen Expression im adulten Gehirn jedoch stark zunimmt. (Chan *et al.*, 2002). Die Rolle des THR α in der frühen neuronalen Differenzierung wurde zudem in embryonalen Stammzellkulturen mechanistisch aufgeklärt (Liu *et al.*, 2002). Auch zwischen den verschiedenen Hirnzelltypen unterscheiden sich die THR-Isoformexpressionen. Primäre astrogliale Zellen der Ratte besitzen keine THR β -mRNS (Leonard *et al.*, 1994). Auch diese Zelltyp-Spezifität ließ sich im Rahmen dieser Arbeit wegen des bereits oben erwähnten Mangels an funktionierenden humanen THR Antikörpern nicht untersuchen. Somit entsprechen die THR Expressionen der untersuchten *in vitro* Systeme denen des sich entwickelnden Gehirns. Ob auch adulte NPC des Menschen, die sich im Hippokampus befinden und für die regenerative Kapazität des adulten Gehirns verantwortlich sind (Eriksson *et al.*, 1998), THR-Isoformen in diesem THR α / β Verhältnis exprimieren ist derzeit nicht bekannt, in adulten NPC der Ratte, ist jedoch die THR β -Isoform prädominant (Desouza *et al.*, 2005).

Da zumindest der THR α in allen untersuchten *in vitro* Systemen detektiert wurde, war eine Induktion von SorLA durch T3 in diesen Systemen zunächst zu erwarten. Die quantitative Bestimmung der T3-abhängigen SorLA mRNA zeigte jedoch, dass SorLA nur in neuronalen Primärzellen des Menschen und der Maus durch T3 induzierbar ist (Abb. 5.3), nicht aber in immortalisierten neuronalen Tumorzelllinien (Abb. 5.3 A). Die Expressionsmuster der THR lassen somit keinen Rückschluss auf die Induktion von SorLA durch T3 zu. Dies war der erste Hinweis, dass SorLA durch T3 nicht über den ‚klassischen‘, THR-abhängigen Weg (zusammengefasst in Horn und Heuer, 2010) reguliert wird. Diese Annahme wird von Rezeptorbindungsstudien in SH-SY5Y Zellen unterstützt: die identifizierten 4500-4800 Rezeptormoleküle pro Zelle interagieren mit T3, wobei die spezifische THR Isoform in dieser Studie nicht untersucht wurde (Goya und Timiras, 1991).

Ob die Glioblastomzellen eine funktionelle THR-Maschinerie ausbilden ist bisher noch nicht beschrieben. Dass die Differenzierung von NPC durch T3 moduliert wird, wurde in unserer Arbeitsgruppe untersucht. *In vitro* beeinflusst T3 die Migration und die Differenzierung humaner neuronaler Progenitorzellen: unter T3-Behandlung nimmt zum Einen der Progenitorzellmarker Nestin ab und zum Anderen wird die Differenzierung zu Oligodendrozyten induziert (Fritsche *et al.*, 2005; Schreiber *et al.*, 2010). Unter T3-Mangel *in vivo* kommt es so während der Hirnentwicklung zu massiven Störungen der Neurogenese und der Differenzierung im zerebralen Kortex (zusammengefasst in Koibuchi und Chin, 2000), aber auch die adulte Neurogenese ist vom Thyroidhormon abhängig. In hypothyroiden Mäusen ist die Migration von Zellen entlang des RMS (*rostral migratory stream*) inhibiert und die Anzahl von Zellen mit proliferativer Kapazität in der subventrikulären Zone reduziert (Lemkine *et al.*, 2005). Auch für das durch T3 regulierte SorLA ist eine Beteiligung an Entwicklungsprozessen von NPC möglich, da es sowohl im differenzierenden Nervensystem als auch in Hirnarealen des adulten Nervensystems, in denen Zellen aus der proliferativen Zone migrieren, hoch exprimiert ist. Auch in Subpopulationen unreifer Neurone findet sich verstärkte SorLA-Expression, was diese Annahme unterstützt (Hermans-Borgmeyer *et al.*, 1998).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass nur die humanen NPC, nicht aber die Tumorzelllinien geeignet sind, die T3-abhängige SorLA-Induktion und die möglicherweise daraus resultierende veränderte Prozessierung des APP zum amyloidogenen A β zu untersuchen.

6.2 SCHILDDRÜSENHORMON UND DIE ALZHEIMERSCHE ERKRANKUNG

Seit langem ist bekannt, dass Hypothyreoidismus die Symptome einer Demenz verursachen kann (zusammengefasst in Dugbartey, 1998). Kürzlich fand zudem eine epidemiologische Studie, dass in der Zerebrospinalflüssigkeit von euthyreoten Patienten mit AD die Konzentration von Gesamt-T3 erniedrigt und die des inhibitorischen rT3 erhöht war (Sampaolo *et al.*, 2005). Außerdem zeigten *post-mortem* Untersuchungen des präfrontalen Kortex, dass in Hirnen von Patienten mit AD gegenüber denen ohne AD ein signifikant niedrigerer T3-Gehalt vorliegt (Davis *et al.*, 2008). Dies weist darauf hin, dass trotz euthyreoten Blutwerten ein T3-Mangel im *Liquor cerebrospinalis* möglicherweise kausal an der Entstehung der AD beteiligt sein könnte. Die molekularen Mechanismen, die hinter der protektiven Wirkung von T3 auf die AD stehen, sind weitestgehend unbekannt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vitro* Modell etabliert, welches die Möglichkeit bietet, die Effekte sowie die zu Grunde liegenden Mechanismen von T3 auf die APP Prozessierung zu untersuchen.

Zur Erfassung der funktionellen Bedeutung von T3 auf die APP-Prozessierung wurden die aus der enzymatischen Proteolyse hervorgehenden Spaltprodukte (Gesamt-A β /A β ₄₂) mittels ELISA bestimmt. Abb. 5.6 verdeutlicht, dass T3 zu einer Abnahme aller APP-Prozessierungsprodukte führt. Schon früher wurden Effekte von T3, allerdings auf die Expression von APP in der Maus und in der Ratte *in vitro* und *in vivo* sowie in humanen Tumorzelllinien beschrieben. Laut ihnen reprimiert der T3/Rezeptor-Komplex die APP-Promoter-Aktivität durch die Bindung an spezifische DNS-Sequenzen im ersten Exon des APP-Gens. Die Interaktion des unligierten Rezeptors erhöht die transkriptionelle Aktivität des Promoters, während T3 den Effekt umkehrt. Dieser Effekt ist unabhängig von der THR-Isoform (Belandia *et al.*, 1998). Zudem reduziert T3 die Expression des APP in Neuroblastomzellen und in Kulturen primärer Rattenneuronen (Latasa *et al.*, 1998; O'Barr *et al.*, 2006; Belakavadi *et al.*, 2011; Contreras-Jurado und Pascual, 2012). Auch *in vivo* erhöht ein hypothyroider Status die Expression der APP-mRNS und des APP-Proteins im Gehirn (O'Barr *et al.*, 2006), so wie ein hyperthyroider Status die APP-mRNS reduziert (Belakavadi *et al.*, 2011). Ein simultaner *Knockout* der THR α und β in Mäusen bestätigte diese Studien (Contreras-Jurado und Pascual, 2012). In all diesen Arbeiten wurde die Konsequenz der APP Regulierung auf die Spaltung zum pathognomonischen A β nicht untersucht. Ob die T3-abhängige Abnahme der APP-Prozessierungsprodukte in den hier untersuchten hNPC an solch einer Reduktion der APP-Produktion an sich oder an einer veränderten Prozessierung des APPs liegt, war Gegenstand der weiteren Arbeiten. Dazu wurden die APP mRNS- und

Proteinexpressionen nach Behandlung von hNPC mit T3 analysiert. T3 führte in hNPC weder zu einer Abnahme der APP-mRNS noch des Proteins (Abb. 5.7). Da alle bisherigen Untersuchungen zu diesem Thema am Nager durchgeführt wurden und bisher beim Menschen noch nicht untersucht sind, könnte es sich hier um einen Speziesunterschied in der Regulation der APP-Expression handeln. Dass es weitreichende molekulare Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies gibt, ist mittlerweile unbenommen (zusammengefasst in Hartung, 2008). So hat beispielsweise eine Proteomanalyse postsynaptischer Dichten von Maus und Mensch signifikante Unterschiede in der Expression von Proteinen gezeigt, die innerhalb der postsynaptischen Dichte von zentraler Bedeutung sind (Bayes *et al.*, 2012). Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine Transkriptomanalyse humaner und muriner Strukturen der Niere. Besonders in Strukturen mit den gleichen funktionellen Eigenschaften waren die größten Expressionsunterschiede zwischen den Spezies vorhanden (Cheval *et al.*, 2012). Solche Abweichungen im Transkriptom bzw. Proteom entstehen durch Interspezies-Unterschiede in der Genregulation. Ein Beispiel dafür ist die Spezies-spezifische Lipopolysaccharid/TLR-4 (*toll-like receptor-4*) -abhängige Genexpression, einem zentralen Prozess in der Immunabwehr des Organismus. Gene, die zwischen Maus und Mensch divergent reguliert sind, weisen vor allem eine hohe Streuung innerhalb der Genexpression und in Sequenz-spezifischen Merkmalen des Promoters, wie einer Anreicherung mit TATA-Box Motiven und das Fehlen von CpG-Bereichen, auf. Diese regulatorische Divergenz steht stets in Verbindung mit stark konservierten Promotersequenzen zwischen den Spezies (Schroder *et al.*, 2012). Neben den Speziesunterschieden könnte auch die Art der Zellen, bzw. deren Entwicklungsstadium für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein. Während die Studien am Nager Neuronenkulturen oder ganze Hirne verwendeten, handelt es sich in dieser Arbeit um neurale Vorläuferzellen und/oder differenzierte neurale Zellen in einem frühen Entwicklungsstadium.

Da diese Ergebnisse also ausschlossen, dass die T3-abhängige Reduktion der A β -Spezies in hNPC auf einer Reduktion der APP-Expression beruht, lag ein weiterer möglicher Mechanismus in der Regulation der APP-Prozessierung durch das mit der AD-assoziierte Gen SorLA. SorLA kompartimentalisiert das Amyloid Precursor Protein (APP) in späte Endosomen, was die an der Membran stattfindende Prozessierung von APP zum amyloidogenen sA β verhindert (Andersen *et al.*, 2005). Dieser protektive Effekt von SorLA auf die AD wird bei Patienten deutlich, die polymorphe Varianten dieses Gens exprimieren. Die gefundenen Genvarianten führen zur verminderten SorLA Transkription sowie Translation und in einer molekularepidemiologischen Studie waren sie mit der AD assoziiert

(Rogaeva *et al.*, 2007; Caglayan *et al.*, 2012). Zudem fand sich eine verminderte SorLA Expression in postmortalen Hirnen von Patienten mit *mild cognitive impairment* oder der sporadischen AD (Dodson *et al.*, 2006; Sager *et al.*, 2007). Da sowohl der Wirkmechanismus von SorLA bekannt ist, als auch seine Assoziation mit der AD wiederholt von verschiedenen Gruppen bestätigt wurde, wird SorLA als präventivmedizinische Zielstruktur diskutiert, deren Modulation die Entstehung oder Progression der sporadischen AD reduzieren könnte (Andersen *et al.*, 2005; Offe *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2007). Um die funktionelle Signifikanz der T3-abhängigen SorLA-Induktion innerhalb der APP-Prozessierung zu verifizieren, wurde ein lentiviraler *Knockdown* mittels SorLA shRNS durchgeführt. Da in einem präliminären Versuch die durch T3 induzierte Abnahme des A β ₄₂ in den mit SorLA-shRNS transduzierten Zellen vermindert bzw. nicht vorhanden ist, ist möglicherweise der protektive Effekt des Schilddrüsenhormons auf die APP-Prozessierung tatsächlich durch eine Induktion von SorLA vermittelt (Abb. 5.10).

6.3 DER MOLEKULARE MECHANISMUS DER T3-ABHÄNGIGEN SORLA-INDUKTION

Da es scheint, dass die T3-abhängige SorLA-Induktion möglicherweise als präventivmedizinischer Mechanismus genutzt werden könnte, ist es von grundlegender Bedeutung, die molekularen Mechanismen zu verstehen, die zu einer protektiven SorLA Genregulation führen. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob SorLA durch T3 direkt reguliert wird, oder ob die Zelle für die SorLA Induktion die Produktion eines neuen Proteins benötigt. Eine Ko-Behandlung der hNPC mit Cycloheximid, einem Translationsinhibitor, und T3 zeigte, dass die T3-abhängige Geninduktion Proteinneusynthese benötigt (Abb. 5.11). Als Kontrolle für die ‚klassische‘ THR-Signaltransduktion fungierte hierbei das Gen Hairless, welches bekannterweise im Gehirn dem klassischen, genomischen Regulationsmechanismus durch T3 (Abb. 6.1 A; Thompson, 1996) und dem THR α (Ramos und Weiss, 2006) unterliegt. Da die T3-Induktion von Hairless durch CHX - im Gegensatz zu SorLA - nicht gehemmt sondern sogar superinduziert wird (Thompson, 1996), ist ein unterschiedlicher Mechanismus der Regulation dieser zwei T3-abhängigen Gene anzunehmen. Wie bereits erwähnt wurde BDNF kürzlich als Induktor von SorLA identifiziert (Rohe *et al.*, 2009). Da die Regulation von BDNF im Nagerhirn einem T3-abhängigen Mechanismus unterliegt (Koibuchi *et al.*, 1999; Koibuchi *et al.*, 2001), war BDNF ein

möglicher Kandidat, der die T3-abhängige SorLA-Induktion mediiieren könnte. Dieser Mechanismus wurde jedoch für hNPC ausgeschlossen, da weder T3 BDNF (Abb. 5.12 A) noch BDNF SorLA in den Progenitorzellen des Menschen induziert (Abb. 5.12 B).

Neben einem unbekannten Protein, das in die translationsabhängige Regulation von SorLA involviert sein könnte, ist außerdem der THR β selbst ein Kandidat, da T3 die eigene Rezeptorexpression *in vivo* positiv reguliert und dieser Prozess durch Cycloheximid im euthyreoten Rattenhirn unterbunden wird (Lemarchand-Beraud *et al.*, 1987). Spätere *in vitro* Versuche ergaben außerdem, dass dieser Mechanismus THR β -Isoform-spezifisch ist und sowohl die mRNS- als auch die Proteinexpression beeinflusst (Kanamori und Brown, 1992; Maruvada *et al.*, 2004). Zudem löst die Hormonbindung auch die Degradation seines Rezeptors durch das Proteasom aus (Dace *et al.*, 2000). Da unter Ko-Behandlung mit CHX die Synthese von neuem Protein inhibiert wird, erfolgt so keine Neusynthese des Rezeptors und keine Transkription von THR β -abhängigen Genen. Dies zusammen mit der Tatsache, dass Hairless THR α -abhängig reguliert ist, macht eine direkte Beteiligung des THR β an der Induktion von SorLA möglich.

Zudem wurden verschiedene Subpopulationen des THR β innerhalb der Zelle gefunden, die unterschiedlich resistent gegen die Degradation durch das Proteasom sind. Unter Ko-Belastung von T3 und CHX erfolgte eine kontinuierliche Degradation des Proteins in der zytosolischen und solublen, nukleären Fraktion, während in der insolublen, nukleären Fraktion neben einem kurzen Anstieg durch Translokation des Rezeptors in den Nukleus das basale Level bestehen bleibt (Brunelle *et al.*, 2011). Die in den löslichen Fraktionen vorliegenden Rezeptoren sind damit sensitiver gegenüber einer Translationsinhibierung und interessanterweise spielen diese eine wichtige Rolle innerhalb des nicht-genomischen T3-Signalwegs (Abb. 6.1). Dies könnte möglicherweise bedeuten, dass die SorLA-Induktion über das nicht-genomische, THR β -abhängige T3-Signaling reguliert wird.

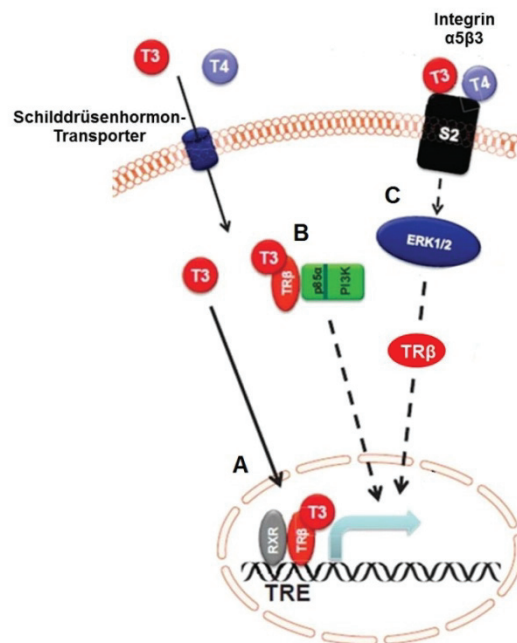


Abb. 6.1 Die molekularen Mechanismen des T3-Signaling. (A) Klassisches TR/TRE-vermittelte Geninduktion; (B) Aktivierung der PI3K-Signalkaskade durch T3/TRβ; (C) Translokation des TRβ in den Nukleus durch die T3-vermittelte Aktivierung der ERK-Kaskade (modifiziert nach Moeller und Broecker-Preuss, 2011).

Zur Regulation von SorLA können also mehrere Mechanismen in Betracht gezogen werden: (i) die Expression eines unbekannten Proteins über einen unbekannten Mechanismus führt zur Induktion von SorLA oder (ii) es handelt sich um einen direkten, THRβ-abhängigen Mechanismus, der den nicht-genomischen Signalwegen der T3-abhängigen Genregulation angehört. Einer dieser vielversprechenden Mechanismen beinhaltet die Interaktion von T3 und THRβ im Zytosol, die dann einen Komplex mit der regulatorischen Untereinheit der IP3K bilden und so eine Kinase-Kaskade auslösen, die letztendlich zur Genexpression führt. Dieser Mechanismus wurde für die Regulation von ZAKI4, einem Calcineurin-Inhibitor, identifiziert (Abb. 6.1 B; Cao *et al.*, 2005). Es wurde jedoch auch ein weiterer, zunächst Rezeptor-unabhängiger T3-Signalweg beschrieben, welcher Integrine beteiligt. Durch die Bindung des T3 an die S2-Domäne des Integrin α5β3 werden die Kinasen ERK1/2 aktiviert (Lin 2009), die daraufhin den THRβ phosphorylieren, dieser in den Zellkern transloziert und dort die Transkription aktiviert (Abb. 6.1 C; Cao *et al.*, 2009). Ob diese Wege, oder ein weiteres, bisher unbekanntes Protein an der Aufregulierung von SorLA durch T3 beteiligt sind, ging über das Volumen dieser Arbeit hinaus und wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Ein Werkzeug zur Klärung des Mechanismus der T3-abhängigen SorLA Induktion, das im Rahmen dieser Studien etabliert wurde, ist die Klonierung des SorLA-Promoters in einen

Reportergenvektor. Die transiente Transfektion dieses Vektors in Caco2, HepG2 und hNPC sollte Aufschluss über die T3-abhängige Aktivierung der Transkription durch den SorLA-Promoter geben. Die Versuche in den Tumorzelllinien Caco2 und HepG2 zeigten, dass die Konstrukte funktionell sind, jedoch die eGFP-Expression durch T3 nicht induziert wurde (Abb. 5.14). Zudem konnte auch die endogene SorLA Expression in HepG2 Zellen durch T3 nicht induziert werden (unpublizierte Ergebnisse, Björn Oswald). Dass diese Zellen eine funktionelle ‚klassische‘ T3 Signaltransduktionsmaschinerie besitzen, wurde durch Reportergenassays mit funktionellen TREs (You *et al.*, 2006) in diesen Zellen bestätigt (unpublizierte Ergebnisse, Katharina Dach, IUF). Dies wird von den Beobachtungen unterstützt, dass unter T3-Belastung die Genexpression der SGLT und Na⁺-K⁺-ATPase in Caco2 sowie der HTGL und des ApoB in HepG2 Zellen aktiviert wird (Theriault *et al.*, 1992; Giannella *et al.*, 1993; Kihara *et al.*, 1993; Matosin-Matekalo *et al.*, 1998). Diese Tumorzelllinien scheinen also mindestens eine funktionelle THR-Isoform zu exprimieren, die den ‚klassischen‘ Rezeptorsignalweg bedient. Ob es sich dabei um THR α oder THR β handelt ist nicht bekannt. Dass T3 die SorLA-Promoter Reportergenexpression in diesen Zelllinien nicht beeinflusste, könnte somit bedeuten, dass (i) diese Zelllinien nur eine Rezeptor-Isoform exprimieren und die SorLA-Regulation von der fehlenden anderen abhängig ist oder (ii) die Mechanismen der SorLA-Regulation nicht-genomisches TH-Signaling involvieren, welches in diesen Zelllinien möglicherweise nicht funktionell ist. Diese Reportergenuntersuchungen müssen in hNPC wiederholt werden, da diese die endogenen Signalwege exprimieren, die zur Aufregulierung von SorLA durch T3 notwendig sind. Es bleibt also zu diesem Zeitpunkt ungeklärt, ob die Regulation von SorLA durch T3 ein THR-abhängiger Mechanismus ist und möglicherweise TREs involviert.

6.4 AUSBLICK

Um die Arbeiten für die Publikation der Daten abzuschließen, muss zunächst die Kausalität zwischen dem protektiven Effekt des Schilddrüsenhormons auf die APP-Prozessierung und der T3-abhängigen Induktion von SorLA in hNPC verifiziert werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht möglich. Des Weiteren wird der protektive Effekt der SorLA Induktion durch T3 *in vivo* untersucht. Dazu eignet sich der Vergleich zwischen einem transgenen Mausmodell mit SorLA-*Knockout* und den entsprechenden Wildtyp-Mäusen. Nach Behandlung dieser Tiere mit T3 ist eine SorLA-Induktion und konsequenterweise eine Reduktion der murinen APP-Prozessierungsprodukte in den Gehirnen von Wildtyp-Mäusen zu erwarten, während dieser Effekt in den SorLA-defizienten Tieren fehlen würde.

Darüber hinaus werden in weiteren Arbeiten die molekularen Mechanismen identifiziert, die der T3-abhängigen SorLA-Induktion zu Grunde liegen. Da ich während meiner Dissertation ausschließen konnte, dass der ‚klassische‘ THR Signalweg die SorLA Induktion mediert, werden T3-abhängige, nicht-genomische Signalwege, die THR-abhängig oder auch – unabhängig sein können, in die zukünftigen Untersuchungen mit einbezogen.

Zusammenfassend werden diese geplanten Arbeiten zur Klärung der molekularen Mechanismen beitragen, über die SorLA durch T3 in NPC reguliert wird. Die *in vivo* Versuche werden der Bestätigung der hier erhobenen *in vitro* Befunde dienen und somit letztendlich dazu beitragen, möglicherweise ein neues Zielmolekül zur Prävention/Behandlung der AD zu identifizieren.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Demenzerkrankungen wie die Alzheimersche Erkrankung (AD) stellen eines der gravierendsten Gesundheitsprobleme der heutigen Gesellschaft dar. Die AD gehört zu den langsam fortschreitenden neurodegenerativen Erkrankungen, die mit einem zunehmenden Verlust der kognitiven Leistung einhergeht. Dabei ist die amyloidogene Prozessierung des APP zu A β pathognomonisch für die Erkrankung. Nach heutigem Wissensstand spielen neben Umwelteinflüssen auch genetische Faktoren eine bedeutende Rolle für den Verlauf der AD. Eines dieser mit der AD assoziierten Gene ist der Sortilinrezeptor SorLA. Dieser kompartimentalisiert APP in späte Endosomen, was die an der Membran stattfindende Prozessierung von APP zum amyloidogenen A β verhindert. Dieser protektive Effekt von SorLA auf die AD wird bei Patienten deutlich, die polymorphe Varianten dieses Gens exprimieren. Die gefundenen Genvarianten führen zur verminderten SorLA Transkription sowie Translation und waren in einer molekularepidemiologischen Studie mit der AD assoziiert. Zudem fand sich eine verminderte SorLA Expression in postmortalen Hirnen von Patienten mit ‚*mild cognitive impairment*‘ oder der sporadischen AD. Da der Wirkmechanismus von SorLA bekannt ist, und seine Assoziation mit der AD wiederholt bestätigt wurde, wird SorLA als präventivmedizinische Zielstruktur diskutiert, deren Modulation möglicherweise die Entstehung und/oder Progression der sporadischen AD reduzieren könnte.

In meiner Arbeit habe ich nun in einem humanen neuronalen Primärzellmodell (humane neurale Progenitorzellen, hNPC) gezeigt, dass das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin (T3) die Expression von SorLA auf mRNA- und Proteinebene induziert. Diese T3-abhängige SorLA-Induktion ist Zelltyp-, aber nicht Spezies-spezifisch, da SorLA auch in NPC der Maus durch T3 induziert wurde. Im Gegensatz dazu ließ sich die Expression von SorLA in den Tumorzelllinien SH-SY5Y (Neuroblastom) und A172 (Glioblastom) nicht heraufregulieren. Für die T3-abhängige SorLA-Induktion in hNPC ist Proteinneusynthese notwendig, da eine Ko-Behandlung der Zellen mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) und T3 die T3-Induktion verhinderte. Da die Induktion von Hairless, einem über den ‚klassischen‘ THR-Signalweg regulierten Gen, im Gegensatz zu SorLA durch CHX nicht inhibiert wurde, deutet dies auf unterschiedliche Regulationsmechanismen dieser zwei T3-abhängigen Gene hin. Auch mit dem in einen GFP-Reportergenvektor klonierten SorLA Promoter bestätigte sich die Hypothese der SorLA Expressionsregulation über einen nicht-klassischen Schilddrüsenhormon-Signalweg. Bisherige Arbeiten von anderen zur Induktion von SorLA identifizierten BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) als Induktor in der Maus *in vitro* und *in vivo*. Dass BDNF der Mediator der T3-abhängigen SorLA Induktion in hNPC ist, wurde jedoch ausgeschlossen, da (i) T3 die BDNF-Genexpression nicht induziert und (ii) BDNF die SorLA-Expression nicht stimuliert. Die präzise Identifizierung der molekularen Mechanismen der SorLA-Induktion durch T3 in hNPC bleibt zu erschließen. Die zweite Frage meiner Arbeit beschäftigte sich mit der funktionellen Relevanz der SorLA-Aufregulierung durch T3. SorLA verhindert eine exzessive A β -Produktion von Zellen über eine Kompartimentalisierung des APP. Daher war zu erwarten, dass T3 die A β -Produktion der NPC herabsetzt. ELISA Untersuchungen bestätigten diese Hypothese: alle A β -Spezies, inklusive dem für die AD pathognomonischen A β_{42} waren in Zellkulturüberständen der NPC nach Exposition gegenüber T3 vermindert. Diese Reduktion von A β durch T3 wurde nicht durch eine verminderte APP-Expression ausgelöst, da sich sowohl mRNA- als auch Protein-Expressionen von APP durch T3 nicht veränderten. Um den funktionellen Zusammenhang zwischen der T3-abhängigen SorLA-Induktion und der Reduktion der APP-Prozessierungsprodukte aufzuklären, wurde die SorLA-Expression durch lentiviralen Gen-Knockdown mittels shRNA reduziert. Erste Daten weisen darauf hin, dass die Reduktion von A β_{42} nach T3-Behandlung in SorLA-defizienten hNPC vermindert ist. Zusammenfassend habe ich durch meine Arbeiten mit primären humanen Zellen einen vollständig neuen Mechanismus der SorLA-Induktion identifiziert, der möglicherweise als neues Ziel für molekulare Strategien zur Behandlung/Prävention der AD dienen könnte.

8 ABSTRACT

Dementious diseases like the Alzheimer's disease (AD) represent one of the most serious health problems in industrialized societies. AD belongs to the slowly progressing neurodegenerative diseases and is accompanied by an increasing loss of cognitive functions, whereupon the amyloidogenic processing of the APP to A β is pathognomonic for the disease. Based on current knowledge besides environmental factors, genetic factors play a major role for the progression of AD. The sortilin-receptor SorLA is one of these AD-related genes. It compartmentalizes APP into late endosomes and thereby prohibits the membrane-located processing of APP to amyloidogenic A β . This protective effect of SorLA for AD becomes obvious in AD patients, which express polymorphic variants of this gene. The identified gene variants lead to reduced SorLA transcription and translation and were associated to AD in a molecular epidemiological study. In addition, there was reduced expression of SorLA in *post mortem* brains of patients with mild cognitive impairment or sporadic AD. As the mode of action of SorLA is very well known and its association with AD was repeatedly confirmed, SorLA is discussed as a target for prevention or therapy which modulation could possibly reduce the onset and/or progression of sporadic AD.

In this thesis I demonstrated in a primary human neural cell model (human neural progenitor cells, hNPC), that the thyroid hormone Triiodothyronine (T3) induces the expression of SorLA on mRNA and protein level. This T3-dependent induction of SorLA is cell-type, but not species-specific, as in mouse NPC SorLA was also inducible by T3. In contrast to this SorLA could not be up-regulated in the tumour cell lines SH-SY5Y (neuroblastome) and A172 (glioblastome). For the T3-dependent induction of SorLA *de novo* protein synthesis is necessary as a co-treatment of the cells with the translational inhibitor cycloheximide (CHX) and T3 prohibited the T3-induction. As the induction of Hairless, a gene regulated via the 'classical' THR pathway, unlike SorLA was not inhibited by CHX, this suggests different regulatory mechanisms of these two T3-dependent genes. Analysis of the SorLA promoter cloned into a GFP-reportergene vector also confirmed the hypothesis that the SorLA expression is regulated via the non-classical thyroid hormone signaling pathway. Current data of others identified BDNF (brain derived neurotrophic factor) as an inductor of SorLA in mouse *in vitro* and *in vivo*. In hNPC BDNF was excluded to be the mediator of the T3-dependent induction of SorLA as (i) T3 did not induce BDNF gene expression and (ii) BDNF protein did not stimulate the SorLA expression. However the precise identification of the molecular mechanisms of SorLA-induction by T3 remains elusive and needs to be further investigated. The second question of my thesis dealt with the functional relevance of SorLA-upregulation by T3. SorLA prevents an excessive A β -production by compartmentalization of APP. Therefore it was expected that T3 reduces the A β -production of NPC. ELISA studies confirmed this hypothesis: all A β -species, including the A β_{42} (pathognomonic for the AD), were reduced in cell culture supernatants of NPC after exposure to T3. This reduction of A β by T3 was not due to decreased APP-expression, as both mRNA and protein level was not altered by T3. To elucidate the functional relationship between the T3-dependent induction of SorLA and the reduction of APP-processing products, the SorLA expression was reduced by lentiviral gene knockdown using shRNA. Initial data indicates that the reduction of A β_{42} by T3 treatment in SorLA-deficient hNPC is diminished. In summary, through my work with primary human cells I was able to identify a completely new mechanism of SorLA induction, which could potentially serve as a new target for molecular strategies for the treatment/prevention of AD.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Abbott BD, Held GA, Wood CR, Buckalew AR, Brown JG, Schmid J: AhR, ARNT, and CYP1A1 mRNA quantitation in cultured human embryonic palates exposed to TCDD and comparison with mouse palate in vivo and in culture. *Toxicol Sci* 47:62-75 (1999).
- 2 Abcam: (http://www.abcam.com/Doublecortin-antibody-Neuronal-Marker-ab77450.html#2008-10-07_000ashsp-AP512368%20ab18723%20%2877450%29%20edited.jpeg.jpg, 2009).
- 3 Alzheimer's Disease International: World Alzheimer's Report 2009, Prince Martin, Jackson Jim (eds) (Alzheimer's Disease International, <http://www.alz.co.uk/research/files/WorldAlzheimerReport.pdf>, London 2009).
- 4 Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, von Arnim CA, Breiderhoff T, Jansen P, Wu X, Bales KR, Cappai R, Masters CL, Gliemann J, Mufson EJ, Hyman BT, Paul SM, Nykjaer A, Willnow TE: Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* %20;102:13461-13466 (2005).
- 5 Andersen OM, Schmidt V, Spoelgen R, Gliemann J, Behlke J, Galatis D, McKinstry WJ, Parker MW, Masters CL, Hyman BT, Cappai R, Willnow TE: Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor SorLA/LR11. *Biochemistry* 45:2618-2628 (2006).
- 6 ATCC: (HEK293: <http://www.lgcstandards-atcc.org/attachments/1820.jpg>; Caco2: <http://www.lgcstandards-atcc.org/attachments/1985.jpg>; HepG2: <http://www.lgcstandards-atcc.org/attachments/1967.jpg>, 2012).
- 7 Bayes A, Collins MO, Croning MD, van de Lagemaat LN, Choudhary JS, Grant SG: Comparative study of human and mouse postsynaptic proteomes finds high compositional conservation and abundance differences for key synaptic proteins. *PLoS One* 7:e46683 (2012).
- 8 Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW: Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23:213-227 (2010).
- 9 Belakavadi M, Dell J, Grover GJ, Fondell JD: Thyroid hormone suppression of beta-amyloid precursor protein gene expression in the brain involves multiple epigenetic regulatory events. *Mol Cell Endocrinol* 339:72-80 (2011).
- 10 Belandia B, Latasa MJ, Villa A, Pascual A: Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the beta-amyloid precursor protein gene. *J Biol Chem* 273:30366-30371 (1998).

- 11 Bennett BD, Babu-Khan S, Loeloff R, Louis JC, Curran E, Citron M, Vassar R: Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem* 275:20647-20651 (2000).
- 12 Bertram L, Tanzi RE: Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci* 9:768-778 (2008).
- 13 Bird TD: Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med* 10:231-239 (2008).
- 14 Braak H, Braak E: Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259 (1991).
- 15 Bradley DJ, Towle HC, Young WS, III: Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 12:2288-2302 (1992).
- 16 Breier JM, Gassmann K, Kayser R, Stegeman H, De GD, Fritsche E, Shafer TJ: Neural progenitor cells as models for high-throughput screens of developmental neurotoxicity: state of the science. *Neurotoxicol Teratol* 32:4-15 (2010).
- 17 Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR: Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect* 113:1250-1256 (2005).
- 18 Brunelle M, Fayad T, Langlois MF: Degradation of thyroid hormone receptor beta 1: existence of stable and unstable forms. *Thyroid* 21:311-318 (2011).
- 19 Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA: Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273:27765-27767 (1998).
- 20 Caglayan S, Bauerfeind A, Schmidt V, Carlo AS, Prabakaran T, Hubner N, Willnow TE: Identification of Alzheimer disease risk genotype that predicts efficiency of SORL1 expression in the brain. *Arch Neurol* 69:373-379 (2012).
- 21 Cai XD, Golde TE, Younkin SG: Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259:514-516 (1993).
- 22 Cairns NJ: Alzheimer's Disease: Neurodegeneration, Squire LR (ed): *Encyclopedia of Neuroscience*, pp 275-281 (Academic Press, Oxford 2009).
- 23 Cao HJ, Lin HY, Luidens MK, Davis FB, Davis PJ: Cytoplasm-to-nucleus shuttling of thyroid hormone receptor-beta1 (Trbeta1) is directed from a plasma membrane integrin receptor by thyroid hormone. *Endocr Res* 34:31-42 (2009).

- 24 Cao X, Kambe F, Moeller LC, Refetoff S, Seo H: Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol* 19:102-112 (2005).
- 25 Cao X, Sudhof TC: Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem* 279:24601-24611 (2004).
- 26 Castano EM, Prelli F, Wisniewski T, Golabek A, Kumar RA, Soto C, Frangione B: Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid beta peptides and apolipoprotein E. *Biochem J* 306 (Pt 2):599-604 (1995).
- 27 Chan S, Kachilele S, McCabe CJ, Tannahill LA, Boelaert K, Gittoes NJ, Visser TJ, Franklyn JA, Kilby MD: Early expression of thyroid hormone deiodinases and receptors in human fetal cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 138:109-116 (2002).
- 28 Chang KA, Kim HS, Ha TY, Ha JW, Shin KY, Jeong YH, Lee JP, Park CH, Kim S, Baik TK, Suh YH: Phosphorylation of amyloid precursor protein (APP) at Thr668 regulates the nuclear translocation of the APP intracellular domain and induces neurodegeneration. *Mol Cell Biol* 26:4327-4338 (2006).
- 29 Chantry A, Glynn P: A novel metalloproteinase originally isolated from brain myelin membranes is present in many tissues. *Biochem J* 268:245-248 (1990).
- 30 Cheval L, Pierrat F, Rajerison R, Piquemal D, Doucet A: Of mice and men: divergence of gene expression patterns in kidney. *PLoS One* 7:e46876 (2012).
- 31 Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ: Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672-674 (1992).
- 32 Colombo A, Wang H, Kuhn PH, Page R, Kremmer E, Dempsey PJ, Crawford HC, Lichtenthaler SF: Constitutive alpha- and beta-secretase cleavages of the amyloid precursor protein are partially coupled in neurons, but not in frequently used cell lines. *Neurobiol Dis* 49C:137-147 (2012).
- 33 Contreras-Jurado C, Pascual A: Thyroid hormone regulation of APP (beta-amyloid precursor protein) gene expression in brain and brain cultured cells. *Neurochem Int* 60:484-487 (2012).
- 34 Coulson EJ, Paliga K, Beyreuther K, Masters CL: What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int* 36:175-184 (2000).
- 35 Cruts M, Theuns J, Van BC: Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum Mutat* 33:1340-1344 (2012).

- 36 Dace A, Zhao L, Park KS, Furuno T, Takamura N, Nakanishi M, West BL, Hanover JA, Cheng S: Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8985-8990 (2000).
- 37 Daigle I, Li C: *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:12045-12049 (1993).
- 38 Davis JD, Podolanczuk A, Donahue JE, Stopa E, Hennessey JV, Luo LG, Lim YP, Stern RA: Thyroid hormone levels in the prefrontal cortex of post-mortem brains of Alzheimer's disease patients. *Curr Aging Sci* 1:175-181 (2008).
- 39 De Strooper B.: Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38:9-12 (2003).
- 40 De Strooper B., Annaert W: Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:235-260 (2010).
- 41 Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, Holtzman DM, Zlokovic BV: apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest* 118:4002-4013 (2008).
- 42 DeMattos RB: Apolipoprotein E dose-dependent modulation of beta-amyloid deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 23:255-262 (2004).
- 43 Desouza LA, Ladiwala U, Daniel SM, Agashe S, Vaidya RA, Vaidya VA: Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain. *Mol Cell Neurosci* 29:414-426 (2005).
- 44 Dodson SE, Andersen OM, Karmali V, Fritz JJ, Cheng D, Peng J, Levey AI, Willnow TE, Lah JJ: Loss of LR11/SORLA enhances early pathology in a mouse model of amyloidosis: evidence for a proximal role in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 28:12877-12886 (2008).
- 45 Dodson SE, Gearing M, Lippa CF, Montine TJ, Levey AI, Lah JJ: LR11/SorLA expression is reduced in sporadic Alzheimer disease but not in familial Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:866-872 (2006).
- 46 Dovey HF, Suomensaaari-Chrysler S, Lieberburg I, Sinha S, Keim PS: Cells with a familial Alzheimer's disease mutation produce authentic beta-peptide. *Neuroreport* 4:1039-1042 (1993).
- 47 Dugbartey AT: Neurocognitive aspects of hypothyroidism. *Arch Intern Med* 158:1413-1418 (1998).
- 48 Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ: The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29:258-289 (2008).

- 49 Eehalt R, Michel B, De Pietri TD, Zacchetti D, Simons K, Keller P: Splice variants of the beta-site APP-cleaving enzyme BACE1 in human brain and pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 293:30-37 (2002).
- 50 El-Agnaf OM, Mahil DS, Patel BP, Austen BM: Oligomerization and toxicity of beta-amyloid-42 implicated in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 273:1003-1007 (2000).
- 51 Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317 (1998).
- 52 Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ: Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248:1122-1124 (1990).
- 53 Fagan AM, Watson M, Parsadanian M, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM: Human and murine ApoE markedly alters A beta metabolism before and after plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 9:305-318 (2002).
- 54 Farzan M, Schnitzler CE, Vasilieva N, Leung D, Choe H: BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9712-9717 (2000).
- 55 Fitzpatrick AL, Kuller LH, Lopez OL, Kawas CH, Jagust W: Survival following dementia onset: Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neurol Sci* 229-230:43-49 (2005).
- 56 Fritsche E, Cline JE, Nguyen NH, Scanlan TS, Abel J: Polychlorinated biphenyls disturb differentiation of normal human neural progenitor cells: clue for involvement of thyroid hormone receptors. *Environ Health Perspect* 113:871-876 (2005).
- 57 Fritsche E, Gassmann K, Schreiber T: Neurospheres as a model for developmental neurotoxicity testing. *Methods Mol Biol* 758:99-114 (2011).
- 58 Gadadhar A, Marr R, Lazarov O: Presenilin-1 regulates neural progenitor cell differentiation in the adult brain. *J Neurosci* 31:2615-2623 (2011).
- 59 Gaillard C, Strauss F: Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res* 18:378 (1990).
- 60 Gassmann K, Abel J, Bothe H, Haarmann-Stemmann T, Merk HF, Quasthoff KN, Rockel TD, Schreiber T, Fritsche E: Species-specific differential AhR expression protects human neural progenitor cells against developmental neurotoxicity of PAHs. *Environ Health Perspect* 118:1571-1577 (2010).

- 61 Gassmann K, Baumann J, Giersiefer S, Schuwald J, Schreiber T, Merk HF, Fritsche E: Automated neurosphere sorting and plating by the COPAS large particle sorter is a suitable method for high-throughput 3D in vitro applications. *Toxicol In Vitro* 26:993-1000 (2012).
- 62 Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL: Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 63:168-174 (2006).
- 63 Giannella RA, Orlowski J, Jump ML, Lingrel JB: Na(+)-K(+)-ATPase gene expression in rat intestine and Caco-2 cells: response to thyroid hormone. *Am J Physiol* 265:G775-G782 (1993).
- 64 Gil YG, Kang MK: Capsaicin induces apoptosis and terminal differentiation in human glioma A172 cells. *Life Sci* 82:997-1003 (2008).
- 65 Glenner GG, Wong CW: Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890 (1984).
- 66 Gliemann J, Hermey G, Nykjaer A, Petersen CM, Jacobsen C, Andreasen PA: The mosaic receptor sorLA/LR11 binds components of the plasminogen-activating system and platelet-derived growth factor-BB similarly to LRP1 (low-density lipoprotein receptor-related protein), but mediates slow internalization of bound ligand. *Biochem J* 381:203-212 (2004).
- 67 Goya L, Timiras PS: Characterization of nuclear T3 receptors in human neuroblastoma cells SH-SY5Y: effect of differentiation with sodium butyrate and nerve growth factor. *Neurochem Res* 16:113-116 (1991).
- 68 Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74 (1977).
- 69 Graham FL, Van der Eb AJ: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-467 (1973).
- 70 Haarmann-Stemmann T, Bothe H, Kohli A, Sydlik U, Abel J, Fritsche E: Analysis of the transcriptional regulation and molecular function of the aryl hydrocarbon receptor repressor in human cell lines. *Drug Metab Dispos* 35:2262-2269 (2007).
- 71 Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplow DB: Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem* 269:17741-17748 (1994).
- 72 Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, .: Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359:322-325 (1992).

- 73 Hardy J, Allsop D: Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383-388 (1991).
- 74 Hardy J, Hutton M: Two new genes for Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 18:436 (1995).
- 75 Hardy J, Selkoe DJ: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356 (2002).
- 76 Hartung T: Food for thought... on animal tests. *ALTEX* 25:3-16 (2008).
- 77 Harui A, Suzuki S, Kochanek S, Mitani K: Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. *J Virol* 73:6141-6146 (1999).
- 78 Hermans-Borgmeyer I, Hampe W, Schinke B, Methner A, Nykjaer A, Susens U, Fenger U, Herbarth B, Schaller HC: Unique expression pattern of a novel mosaic receptor in the developing cerebral cortex. *Mech Dev* 70:65-76 (1998).
- 79 Herskowitz JH, Offe K, Deshpande A, Kahn RA, Levey AI, Lah JJ: GGA1-mediated endocytic traffic of LR11/SorLA alters APP intracellular distribution and amyloid-beta production. *Mol Biol Cell* 23:2645-2657 (2012).
- 80 Herskowitz JH, Seyfried NT, Gearing M, Kahn RA, Peng J, Levey AI, Lah JJ: Rho kinase II phosphorylation of the lipoprotein receptor LR11/SORLA alters amyloid-beta production. *J Biol Chem* 286:6117-6127 (2011).
- 81 Hoe HS, Fu Z, Makarova A, Lee JY, Lu C, Feng L, Pajoohesh-Ganji A, Matsuoka Y, Hyman BT, Ehlers MD, Vicini S, Pak DT, Rebeck GW: The effects of amyloid precursor protein on postsynaptic composition and activity. *J Biol Chem* 284:8495-8506 (2009).
- 82 Hogg S, Kuhn PH, Colombo A, Lichtenthaler SF: Determination of the proteolytic cleavage sites of the amyloid precursor-like protein 2 by the proteases ADAM10, BACE1 and gamma-secretase. *PLoS One* 6:e21337 (2011).
- 83 Holtzman DM, Bales KR, Wu S, Bhat P, Parsadanian M, Fagan AM, Chang LK, Sun Y, Paul SM: Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 103:R15-R21 (1999).
- 84 Holtzman DM, Morris JC, Goate AM: Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* 3:77sr1 (2011).
- 85 Horn S, Heuer H: Thyroid hormone action during brain development: more questions than answers. *Mol Cell Endocrinol* 315:19-26 (2010).

- 86 Howard L, Lu X, Mitchell S, Griffiths S, Glynn P: Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J* 317 (Pt 1):45-50 (1996).
- 87 Jack CR, Jr.: Alzheimer disease: new concepts on its neurobiology and the clinical role imaging will play. *Radiology* 263:344-361 (2012).
- 88 Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ: Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 9:119-128 (2010).
- 89 Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, Nielsen MS, Gliemann J, Petersen CM: Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J Biol Chem* 276:22788-22796 (2001).
- 90 Jacobsen L, Madsen P, Moestrup SK, Lund AH, Tommerup N, Nykjaer A, Sottrup-Jensen L, Gliemann J, Petersen CM: Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the alpha2-macroglobulin receptor-associated protein. *J Biol Chem* 271:31379-31383 (1996).
- 91 Jacobsen L, Madsen P, Nielsen MS, Geraerts WP, Gliemann J, Smit AB, Petersen CM: The sorLA cytoplasmic domain interacts with GGA1 and -2 and defines minimum requirements for GGA binding. *FEBS Lett* 511:155-158 (2002).
- 92 Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr.: The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 695:144-148 (1993).
- 93 Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, Mann K, Lamb B, Willson TM, Collins JL, Richardson JC, Smith JD, Comery TA, Riddell D, Holtzman DM, Tontonoz P, Landreth GE: ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron* 58:681-693 (2008).
- 94 Jorissen E, Prox J, Bernreuther C, Weber S, Schwanbeck R, Serneels L, Snellinx A, Craessaerts K, Thathiah A, Teseur I, Bartsch U, Weskamp G, Blobel CP, Glatzel M, De SB, Saftig P: The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci* 30:4833-4844 (2010).
- 95 Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R: APP processing and synaptic function. *Neuron* 37:925-937 (2003).
- 96 Kanaki T, Bujo H, Hirayama S, Tanaka K, Yamazaki H, Seimiya K, Morisaki N, Schneider WJ, Saito Y: Developmental regulation of LR11 expression in murine brain. *DNA Cell Biol* 17:647-657 (1998).
- 97 Kanamori A, Brown DD: The regulation of thyroid hormone receptor beta genes by thyroid hormone in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 267:739-745 (1992).

- 98 Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B: The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736 (1987).
- 99 Kihara S, Wolle J, Ehnholm C, Chan L, Oka K: Regulation of hepatic triglyceride lipase by thyroid hormone in HepG2 cells. *J Lipid Res* 34:961-970 (1993).
- 100 Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ: The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 276:40288-40292 (2001).
- 101 Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shiojiri S, Ito H: Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331:530-532 (1988).
- 102 Klier FG, Cole G, Stallcup W, Schubert D: Amyloid beta-protein precursor is associated with extracellular matrix. *Brain Res* 515:336-342 (1990).
- 103 Koibuchi N, Chin WW: Thyroid hormone action and brain development. *Trends Endocrinol Metab* 11:123-128 (2000).
- 104 Koibuchi N, Fukuda H, Chin WW: Promoter-specific regulation of the brain-derived neurotropic factor gene by thyroid hormone in the developing rat cerebellum. *Endocrinology* 140:3955-3961 (1999).
- 105 Koibuchi N, Yamaoka S, Chin WW: Effect of altered thyroid status on neurotrophin gene expression during postnatal development of the mouse cerebellum. *Thyroid* 11:205-210 (2001).
- 106 Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, Okuyama A, Fujisawa-Sehara A, Ohno S, Suzuki K, Ishiura S: Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* 343 Pt 2:371-375 (1999).
- 107 Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF: ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29:3020-3032 (2010).
- 108 Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL: Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 24:10191-10200 (2004).
- 109 Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, Wen H, Chiang HC, Xu G, Koliatsos VE, Borchelt DR, Price DL, Lee HK, Wong PC: BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* 25:11693-11709 (2005).

- 110 Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL: Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448-6453 (1998).
- 111 Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F: Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3922-3927 (1999).
- 112 Latasa MJ, Belandia B, Pascual A: Thyroid hormones regulate beta-amyloid gene splicing and protein secretion in neuroblastoma cells. *Endocrinology* 139:2692-2698 (1998).
- 113 Lau LF, Nathans D: Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1182-1186 (1987).
- 114 Lemarchand-Beraud T, Von OK, Rognoni JB: The modulation by 3,5,3'-triiodothyronine (T3) of pituitary T3 nuclear receptors in hypothyroid rats is inhibited by cycloheximide. *Endocrinology* 121:677-683 (1987).
- 115 Lemkine GF, Raj A, Alfama G, Turque N, Hassani Z, Alegria-Prevot O, Samarut J, Levi G, Demeneix BA: Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *FASEB J* 19:863-865 (2005).
- 116 Leonard JL, Farwell AP, Yen PM, Chin WW, Stula M: Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms in neurons and astroglial cells. *Endocrinology* 135:548-555 (1994).
- 117 Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D: Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 62:788-801 (2009).
- 118 Li YC, Chen Q, Wan XZ, Yang XL, Liu X, Zhong L: Effects of conjugated linoleic acid on cleavage of amyloid precursor protein via PPARgamma. *Neurol Sci* 32:1095-1101 (2011).
- 119 Liu YY, Tachiki KH, Brent GA: A targeted thyroid hormone receptor alpha gene dominant-negative mutation (P398H) selectively impairs gene expression in differentiated embryonic stem cells. *Endocrinology* 143:2664-2672 (2002).
- 120 Lopes FM, Schroder R, da Frota MLJ, Zanutto-Filho A, Muller CB, Pires AS, Meurer RT, Colpo GD, Gelain DP, Kapczinski F, Moreira JC, Fernandes MC, Klamt F: Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res* 1337:85-94 (2010).

- 121 Lu DC, Rabizadeh S, Chandra S, Shayya RF, Ellerby LM, Ye X, Salvesen GS, Koo EH, Bredesen DE: A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nat Med* 6:397-404 (2000).
- 122 Lu DC, Soriano S, Bredesen DE, Koo EH: Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid beta-protein toxicity. *J Neurochem* 87:733-741 (2003).
- 123 Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J: Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155:853-862 (1999).
- 124 Lupien SJ, Lord C, Sindi S, Wilkinson CW, Fiocco AJ: Aging and Alzheimer's Disease, Pfaff DW, Arnold AP, Fahrbach SE, Etgen AM, Rubin RT (eds): *Hormones, Brain and Behavior* (Second Edition), pp 3049-3083 (Academic Press, San Diego 2009).
- 125 Ma QL, Galasko DR, Ringman JM, Vinters HV, Edland SD, Pomakian J, Ubeda OJ, Rosario ER, Teter B, Frautschy SA, Cole GM: Reduction of SorLA/LR11, a sorting protein limiting beta-amyloid production, in Alzheimer disease cerebrospinal fluid. *Arch Neurol* 66:448-457 (2009).
- 126 Ma QL, Teter B, Ubeda OJ, Morihara T, Dhoot D, Nyby MD, Tuck ML, Frautschy SA, Cole GM: Omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid increases SorLA/LR11, a sorting protein with reduced expression in sporadic Alzheimer's disease (AD): relevance to AD prevention. *J Neurosci* 27:14299-14307 (2007).
- 127 Mann DM, Jones D, Prinja D, Purkiss MS: The prevalence of amyloid (A4) protein deposits within the cerebral and cerebellar cortex in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 80:318-327 (1990).
- 128 Marcinkiewicz M, Seidah NG: Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem* 75:2133-2143 (2000).
- 129 Marozsan AJ, Fraundorf E, Abraha A, Baird H, Moore D, Troyer R, Nankja I, Arts EJ: Relationships between infectious titer, capsid protein levels, and reverse transcriptase activities of diverse human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* 78:11130-11141 (2004).
- 130 Maruvada P, Dmitrieva NI, East-Palmer J, Yen PM: Cell cycle-dependent expression of thyroid hormone receptor-beta is a mechanism for variable hormone sensitivity. *Mol Biol Cell* 15:1895-1903 (2004).
- 131 Matosin-Matekalo M, Mesonero JE, Delezay O, Poiree JC, Ilundain AA, Brot-Laroche E: Thyroid hormone regulation of the Na⁺/glucose cotransporter SGLT1 in Caco-2 cells. *Biochem J* 334 (Pt 3):633-640 (1998).

- 132 Mattson MP: Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430:631-639 (2004).
- 133 Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE: Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10:243-254 (1993).
- 134 Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van BG, Berg L: The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41:479-486 (1991).
- 135 Mita S, Schon EA, Herbert J: Widespread expression of amyloid beta-protein precursor gene in rat brain. *Am J Pathol* 134:1253-1261 (1989).
- 136 Moeller LC, Broecker-Preuss M: Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res* 4 Suppl 1:S6 (2011).
- 137 Moors M, Cline JE, Abel J, Fritsche E: ERK-dependent and -independent pathways trigger human neural progenitor cell migration. *Toxicol Appl Pharmacol* 221:57-67 (2007).
- 138 Moors M, Rockel TD, Abel J, Cline JE, Gassmann K, Schreiber T, Schuwald J, Weinmann N, Fritsche E: Human neurospheres as three-dimensional cellular systems for developmental neurotoxicity testing. *Environ Health Perspect* 117:1131-1138 (2009).
- 139 Moors M, Vudattu NK, Abel J, Kramer U, Rane L, Ulfig N, Ceccatelli S, Seyfert-Margolies V, Fritsche E, Maeurer MJ: Interleukin-7 (IL-7) and IL-7 splice variants affect differentiation of human neural progenitor cells. *Genes Immun* 11:11-20 (2010).
- 140 Mori T, Shimizu K, Hayashi M: Levels of serum brain-derived neurotrophic factor in primates. *Primates* 44:167-169 (2003).
- 141 Mucke L, Abraham CR, Masliah E: Neurotrophic and neuroprotective effects of hAPP in transgenic mice. *Ann N Y Acad Sci* 777:82-88 (1996).
- 142 Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L: High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050-4058 (2000).
- 143 Neve RL, Finch EA, Dawes LR: Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron* 1:669-677 (1988).

- 144 Nielsen MS, Gustafsen C, Madsen P, Nyengaard JR, Hermey G, Bakke O, Mari M, Schu P, Pohlmann R, Dennes A, Petersen CM: Sorting by the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein binding receptor SorLA. *Mol Cell Biol* 27:6842-6851 (2007).
- 145 Nilsson SK, Christensen S, Raarup MK, Ryan RO, Nielsen MS, Olivecrona G: Endocytosis of apolipoprotein A-V by members of the low density lipoprotein receptor and the VPS10p domain receptor families. *J Biol Chem* 283:25920-25927 (2008).
- 146 Nilsson SK, Lookene A, Beckstead JA, Gliemann J, Ryan RO, Olivecrona G: Apolipoprotein A-V interaction with members of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochemistry* 46:3896-3904 (2007).
- 147 O'Barr SA, Oh JS, Ma C, Brent GA, Schultz JJ: Thyroid hormone regulates endogenous amyloid-beta precursor protein gene expression and processing in both in vitro and in vivo models. *Thyroid* 16:1207-1213 (2006).
- 148 Offe K, Dodson SE, Shoemaker JT, Fritz JJ, Gearing M, Levey AI, Lah JJ: The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *J Neurosci* 26:1596-1603 (2006).
- 149 Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, Chen X, Stokin GB, Koo EH: Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J Biol Chem* 274:18851-18856 (1999).
- 150 Ponte P, Gonzalez-DeWhitt P, Schilling J, Miller J, Hsu D, Greenberg B, Davis K, Wallace W, Lieberburg I, Fuller F: A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 331:525-527 (1988).
- 151 Porayette P, Gallego MJ, Kaltcheva MM, Bowen RL, Vadakkadath MS, Atwood CS: Differential processing of amyloid-beta precursor protein directs human embryonic stem cell proliferation and differentiation into neuronal precursor cells. *J Biol Chem* 284:23806-23817 (2009).
- 152 Ramos HE, Weiss RE: Regulation of nuclear coactivator and corepressor expression in mouse cerebellum by thyroid hormone. *Thyroid* 16:211-216 (2006).
- 153 Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT: Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11:575-580 (1993).
- 154 Reinhard C, Hebert SS, De SB: The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J* 24:3996-4006 (2005).

- 155 Renner M, Lacor PN, Velasco PT, Xu J, Contractor A, Klein WL, Triller A: Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 66:739-754 (2010).
- 156 Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, Chen F, Shibata N, Lunetta KL, Pardossi-Piquard R, Bohm C, Wakutani Y, Cupples LA, Cuenco KT, Green RC, Pinessi L, Rainero I, Sorbi S, Bruni A, Duara R, Friedland RP, Inzelberg R, Hampe W, Bujo H, Song YQ, Andersen OM, Willnow TE, Graff-Radford N, Petersen RC, Dickson D, Der SD, Fraser PE, Schmitt-Ulms G, Younkin S, Mayeux R, Farrer LA, St George-Hyslop P: The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 39:168-177 (2007).
- 157 Rohe M, Synowitz M, Glass R, Paul SM, Nykjaer A, Willnow TE: Brain-derived neurotrophic factor reduces amyloidogenic processing through control of SORLA gene expression. *J Neurosci* 29:15472-15478 (2009).
- 158 Rosen DR, Martin-Morris L, Luo LQ, White K: A Drosophila gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2478-2482 (1989).
- 159 Rubinsztein DC: Alzheimer's Disease, Brenner S, Miller HJ (eds): *Encyclopedia of Genetics*, pp 48-49 (Academic Press, New York 2001).
- 160 Sager KL, Wu J, Leurgans SE, Rees HD, Gearing M, Mufson EJ, Levey AI, Lah JJ: Neuronal LR11/sorLA expression is reduced in mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 62:640-647 (2007).
- 161 Sampaolo S, Campos-Barros A, Mazziotti G, Carlomagno S, Sannino V, Amato G, Carella C, Di IG: Increased cerebrospinal fluid levels of 3,3',5'-triiodothyronine in patients with Alzheimer's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 90:198-202 (2005).
- 162 Sato T, Tanimura Y, Hirotani N, Saido TC, Morishima-Kawashima M, Ihara Y: Blocking the cleavage at midportion between gamma- and epsilon-sites remarkably suppresses the generation of amyloid beta-protein. *FEBS Lett* 579:2907-2912 (2005).
- 163 Scherzer CR, Offe K, Gearing M, Rees HD, Fang G, Heilman CJ, Schaller C, Bujo H, Levey AI, Lah JJ: Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 61:1200-1205 (2004).
- 164 Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD: Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9649-9653 (1993).
- 165 Schmidt V, Sporbert A, Rohe M, Reimer T, Rehm A, Andersen OM, Willnow TE: SorLA/LR11 regulates processing of amyloid precursor protein via interaction with adaptors GGA and PACS-1. *J Biol Chem* 282:32956-32964 (2007).

- 166 Schreiber T, Gassmann K, Gotz C, Hubenthal U, Moors M, Krause G, Merk HF, Nguyen NH, Scanlan TS, Abel J, Rose CR, Fritsche E: Polybrominated diphenyl ethers induce developmental neurotoxicity in a human in vitro model: evidence for endocrine disruption. *Environ Health Perspect* 118:572-578 (2010).
- 167 Schroder K, Irvine KM, Taylor MS, Bokil NJ, Le Cao KA, Masterman KA, Labzin LI, Semple CA, Kapetanovic R, Fairbairn L, Akalin A, Faulkner GJ, Baillie JK, Gongora M, Daub CO, Kawaji H, McLachlan GJ, Goldman N, Grimmond SM, Carninci P, Suzuki H, Hayashizaki Y, Lenhard B, Hume DA, Sweet MJ: Conservation and divergence in Toll-like receptor 4-regulated gene expression in primary human versus mouse macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E944-E953 (2012).
- 168 Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, .: Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359:325-327 (1992).
- 169 Shenk TE: Adenoviridae: The Viruses and Their Replication, P.M.Howley, D.M.Snipe, B.N.in Fields (eds), pp 2111-2148 (Fields Virology. Lippincott-Raven, Philadelphia 1996).
- 170 Shivers BD, Hilbich C, Multhaup G, Salbaum M, Beyreuther K, Seeburg PH: Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact. *EMBO J* 7:1365-1370 (1988).
- 171 Silva JM, Dominguez G, Gonzalez-Sancho JM, Garcia JM, Silva J, Garcia-Andrade C, Navarro A, Munoz A, Bonilla F: Expression of thyroid hormone receptor/erbA genes is altered in human breast cancer. *Oncogene* 21:4307-4316 (2002).
- 172 Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P: Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8:1051-1058 (2005).
- 173 Spoelgen R, von Arnim CA, Thomas AV, Peltan ID, Koker M, Deng A, Irizarry MC, Andersen OM, Willnow TE, Hyman BT: Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme. *J Neurosci* 26:418-428 (2006).
- 174 Stevens T, Livingston G, Kitchen G, Manela M, Walker Z, Katona C: Islington study of dementia subtypes in the community. *Br J Psychiatry* 180:270-276 (2002).
- 175 Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD: 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 (1993).

- 176 Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, Golde TE, Younkin SG: An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264:1336-1340 (1994).
- 177 Tanabe C, Hotoda N, Sasagawa N, Sehara-Fujisawa A, Maruyama K, Ishiura S: ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP alpha-secretase in A172 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 352:111-117 (2007).
- 178 Tanaka S, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Ito H, Kameyama M, Kimura J, Nakamura S, Ueda K: Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun* 165:1406-1414 (1989).
- 179 Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL: Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235:880-884 (1987).
- 180 Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, Villa-Komaroff L, Gusella JF, Neve RL: Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331:528-530 (1988).
- 181 Tegenge MA, Rockel TD, Fritsche E, Bicker G: Nitric oxide stimulates human neural progenitor cell migration via cGMP-mediated signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 68:2089-2099 (2011).
- 182 Theriault A, Ogbonna G, Adeli K: Thyroid hormone modulates apolipoprotein B gene expression in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 186:617-623 (1992).
- 183 Thermo Fisher Scientific Inc: Thermo Scientific Open Biosystems Expression Arrest - The RNAi Consortium (TRC) Lentiviral shRNA (Technical Manual) (<http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/The%20RNAi%20Consortium%20%28TRC%29%20Lentiviral%20shRNA%20Technical%20Manual.pdf>, 2009).
- 184 Thinakaran G, Koo EH: Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283:29615-29619 (2008).
- 185 Thompson CC: Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and a hairless homolog. *J Neurosci* 16:7832-7840 (1996).
- 186 Tyan SH, Shih AY, Walsh JJ, Maruyama H, Sarsoza F, Ku L, Eggert S, Hof PR, Koo EH, Dickstein DL: Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Mol Cell Neurosci* 51:43-52 (2012).

- 187 Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M: Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741 (1999).
- 188 Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I, Schenk DB: Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 61:1965-1968 (1993).
- 189 Vlassenko AG, Benzinger TL, Morris JC: PET amyloid-beta imaging in preclinical Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1822:370-379 (2012).
- 190 Wang R, Meschia JF, Cotter RJ, Sisodia SS: Secretion of the beta/A4 amyloid precursor protein. Identification of a cleavage site in cultured mammalian cells. *J Biol Chem* 266:16960-16964 (1991).
- 191 Wasco W, Bupp K, Magendantz M, Gusella JF, Tanzi RE, Solomon F: Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10758-10762 (1992).
- 192 Wasco W, Gurubhagavatula S, Paradis MD, Romano DM, Sisodia SS, Hyman BT, Neve RL, Tanzi RE: Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* 5:95-100 (1993).
- 193 Wei W, Nguyen LN, Kessels HW, Hagiwara H, Sisodia S, Malinow R: Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat Neurosci* 13:190-196 (2010).
- 194 Weidemann A, Eggert S, Reinhard FB, Vogel M, Paliga K, Baier G, Masters CL, Beyreuther K, Evin G: A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* 41:2825-2835 (2002).
- 195 Wen PH, Friedrich VL, Jr., Shioi J, Robakis NK, Elder GA: Presenilin-1 is expressed in neural progenitor cells in the hippocampus of adult mice. *Neurosci Lett* 318:53-56 (2002).
- 196 Whitson JS, Glabe CG, Shintani E, Abcar A, Cotman CW: Beta-amyloid protein promotes neuritic branching in hippocampal cultures. *Neurosci Lett* 110:319-324 (1990).
- 197 Whitson JS, Selkoe DJ, Cotman CW: Amyloid beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science* 243:1488-1490 (1989).

- 198 Wisniewski T, Castano EM, Golabek A, Vogel T, Frangione B: Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol* 145:1030-1035 (1994).
- 199 Xiong Z, Hongmei Z, Lu S, Yu L: Curcumin mediates presenilin-1 activity to reduce beta-amyloid production in a model of Alzheimer's Disease. *Pharmacol Rep* 63:1101-1108 (2011).
- 200 Xu G, Karch C, Li N, Lin N, Fromholt D, Gonzales V, Borchelt DR: Receptor-associated protein (RAP) plays a central role in modulating Abeta deposition in APP/PS1 transgenic mice. *PLoS One* 3:e3159 (2008).
- 201 Yamada T, Sasaki H, Furuya H, Miyata T, Goto I, Sakaki Y: Complementary DNA for the mouse homolog of the human amyloid beta protein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 149:665-671 (1987).
- 202 Yamazaki H, Bujo H, Saito Y: A novel member of the LDL receptor gene family with eleven binding repeats is structurally related to neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor. *J Atheroscler Thromb* 4:20-26 (1997).
- 203 Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrikson RL, Gurney ME: Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402:533-537 (1999).
- 204 Yan R, Han P, Miao H, Greengard P, Xu H: The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta -amyloid precursor protein (APP) substrate. *J Biol Chem* 276:36788-36796 (2001a).
- 205 Yan R, Munzner JB, Shuck ME, Bienkowski MJ: BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells. *J Biol Chem* 276:34019-34027 (2001b).
- 206 Yang X, Handler M, Shen J: Role of presenilin-1 in murine neural development. *Ann N Y Acad Sci* 920:165-170 (2000).
- 207 Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y: Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87:257-263 (1990).
- 208 You SH, Gauger KJ, Bansal R, Zoeller RT: 4-Hydroxy-PCB106 acts as a direct thyroid hormone receptor agonist in rat GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 257-258:26-34 (2006).
- 209 Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, LoTurco JJ, Selkoe DJ: A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci* 27:14459-14469 (2007).

- 210 Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H: APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 4:3 (2011).
- 211 Zhao G, Cui MZ, Mao G, Dong Y, Tan J, Sun L, Xu X: gamma-Cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain. *J Biol Chem* 280:37689-37697 (2005).
- 212 Zhao G, Mao G, Tan J, Dong Y, Cui MZ, Kim SH, Xu X: Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 279:50647-50650 (2004).

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	Mikro
1 st	Erstantikörper
2 nd	Zweitantikörper
3D	Dreidimensional
AD	Alzheimersche Erkrankung
ADAM	A disintegrin and metalloprotease
ADDL	Aβ derived diffusible ligands
AICD	APP intracellular domain
AP	Adaptor-Protein
APH	Anterior-Pharynx-Defective
APLP	APP-like protein
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid precursor /Amyloid Vorläuferprotein
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintripohosphat
Aβ	Amyloid β
BACE	β-site APP cleaving enzyme
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CAPPD	Zentrale APP-Domäne
cDNS	Komplementäre DNS
CHX	Cycloheximid
Cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalie-Virus
COPAS	Complex Object Parametric Analyzer and Sorter
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CTF	C-Terminales Fragment
CuBD	Kupfer-bindende Domäne
CV	Kontrollvektor
D	Destilliert
DCX	Neuronal migration protein doublecortin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	DesoxyNucleotidTriPhosphat

E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
eGFP	Enhanced GFP
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EOAD	Early-onset Alzheimer's Disease
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
EtOH	Ethanol
f	Femto
FGF	Fibroblast growth factor
FN TypIII	Fibronectin Typ III repeats
fw	Forward
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNS	Genomische DNS
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFLD	Wachstumsfaktor ähnliche Domäne
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GGA	Golgi-localized, γ -ear-containing, ARF-binding proteins
h	Human
HGLT	Hepatische Triglyceridlipase
HIV	Human immunodeficiency virus
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IP3K	Inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LA	LDL-receptor class A
LDL	Low density lipoprotein
LOAD	Late-onset Alzheimer's Disease
LR11	Low Density Lipoprotein-Rezeptor
LTP	Langzeitpotenzierung
m	Milli
M	Molar
min	Minute
Mm	Millimeter

mRNS	Messenger RNS
Ms	Maus
N	Nano
NFT	Neurofibrilläre Tangles
Nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-aspartate
NPC	Neurale Prognitorzellen
P	Pico
p24	Virales Hüllprotein
PACS	Phosphofurin acidic cluster sorting protein
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDL	Poly-D-Lysin
PEN	Präsenelin Enhancer
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD	Postsynaptic density protein
PSEN	Präsenelin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAP	Receptor-associated protein
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RMS	Rostral migratory stream
RNS	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2
RT	Reverse Transkription
Rv	Reverse
sAPP	lösliche APP-Derivate
sA β	lösliche A β -Derivate
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
SGLT	Na ⁺ /Glucose Ko-Transporter
Sh	small hairpin
SorLA	Sortilin-related receptor with A-type repeats
Std	Stunde
T	Tween 20
T3	Trijodthyronin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

TATA	Thymin-Adenin-Thymin-Adenin
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerkes
TH	Thyroidhormon
THR/TR	Thyroidhormonrezeptor
TLR	Toll-like receptor
TMD	Transmembrandomäne
TRE	Thyroidhormon responsives Element
TSAP	Thermosensitive alkalische Phosphatase
TU	Transforming Units
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
Vps10p	Vacuolar protein sorting 10 protein
VSV-G	Vesicular Stomatitis Virus Glykoprotein G
w/v	Gewichtsprozent
ZAKI4	Calcipressin-2, Regulator of calcineurin 2 (RCAN2)

11 ANHANG

Sequenz der ersten 2000 Basenpaare des SorLA-Promoters:

Das 1309 bp lange Promoter-Fragment ist unterstrichen und das 637 bp lange grau unterlegt.

Die putativen TREs sind fett und kursiv dargestellt bzw. schwarz unterlegt bei Überlagerungen.

GACCATGGGGTTGTCCATTCC**TGGTAAGGTGATGCTG**ACCAGACAGAGCTGATCTAGATGAG
GG**GTGGGAGGTGACAGT**GGTTTCAGTGGCTTTCTTGGAGGATGCATGATTGTTTGAATTATTA
TTTTTAATTGACATATATAAGTATATAATAAATATATATGTTATATATATGAGTTAGAGCTG
AATTGCACAATATGAGCAAGGCGTTCCCTCTCAGCTTCAAACCAGCTCTGGGTTGTAAACAA
GCTACCACTTCCCTCAATCCCTCTGAAATAACATCAAAGTTGGGGTGCA**GGATGAAGGCACCC**
CAATAATACCACACTGGGGAAAGTGTGGTATTTTGATACCTGTATACAATGTATAATGAACA
AAGCAGGGTGGTTAACATAGAGAATGCATGATTTGCTTGGTGGGAGAACTGGATGGTTCTG
TAATTATGTTGAGATGGACAGAAAGACATCATCTGACTTGGGGAGAAAATCGGGTGTGGGAG
GAGGTGGGAGAGTGCAGAACCTGA**GGCAGAGGTCCCCAGCA**AGTCTGGCATGGGGTAGGGTA
GGGTGGTTGAATACTGGCTTCAGGGAGATGAGGCAAGCTGGCCTGACTCTGGCAGGTTGTCA
GTGGTAGTCCTAGGTAGAGGAGGGGGCTTTGCTAAGCTACCTGAAAAGTACTAGAGTGGGCC
GGGGTAGGAATCGGGCTACCGTGGCTTGTTCGAGATGAGGAATGTTTTTAGAAAATTGAACT
GACCATCCCTTCCCTTCCCCTGAACAGCAGCTTGTATGCAACTATAAAGGTAGTCTCCCTTTC
AGCCCTGCT**TGCTGTGTCTTTATTCT**TATCAAAAACCAGG**ATCTGAGTTTCAGAGGGC**AGTGA
AACATAAAATGAAATAGGAAAGGTTGCAGTAGTACATAGACTTTGGCTGCTCCCACTAACCT
GCAAAAAAATATTTTCCCTTGGGCGTACCTTAGCAGTTCATGGCAGAAGTTTTATCTCCTG
TGGTTCAGAGAGTTTGGCTCGTCAAGCTGA**ATGTAGGGTTAAAGTCTGTCCCTCCCTCCTCTG**
TGGGTGTTTGCTAGCTCCTGGCTGTGGGTTGAAGGGACTGGTAAATATGTCTATTTTACTG
CTGAGGCAGGGTGGCTCAGTG**CTTGGTACCTTGGAGGG**GATCATAAGCAAGCCGCCGCTGGG
GCCCTGTGCCACGCACAGGTATTCATGCGTGCCTGCAAGCACACCCTGTATAGCTGTGTAAT
AATTGTCCAGGTGTGGTGCATTCTTTGTTCAGATGTACCCTTGTTTTTACTGCCTCTGTGCAG
GATGTTTATTTGCTGTGCTTCAGGCTGGGGCACGTAGCTTGATCAAGGGTAGTTTTTGTCTGT
GGCCCCTGCAAATACGTTGTGGTGCCAGAGTAGATGAAAACTGTGAGTTTCCCAATAGAG
CGGGTTCATCTGGACTCTTGTTGGTTGCGTTCTAGGAGCTAATTCTGTGGCTCTGGACTCTT
CCCTGGAGGTGGGGATGAGGCCGGGGCCGGGGGGAGGTGGTCTTGTGGCGCTACTGCGGGCT
GTGCACTCAGGAAAGTGGCCACGGTTTAGGACGACCTCGACACGACCCTGTATAGGACGCAA
CTAACTCCAGAGAAAACGAGCGAGCCCCATGCAACTCTTCATTCCTGCAGGGAGAACAAGGA
GGTGTGCCCCGCCAGGGAAGGGACGCACCCCCACCGGCGCTCGCTGCCTTAACTTCCCCATCC
CCGCGCCAGGGAGGGGCCGGAGTCGCCGCCGAGGCCGCCGAGCGCAGAAAGTGCAGCGAAAGG
GACGCGCTGCGAGCCTCACACGTGACGGCGCCGCGCCGAACC**GAGCGGGACCTGGCGGC**AGC
GGCGGCGGGCGCAGCGGGGCGGCCCGGAGCGGCGCGGGCGGCCTGGAGCCCCGGGAGCGGCG
CGCGCGGTCCCGGCCAGCGGCTCTCCTGGCCTCGCGCTGCACATTCTCTCCTGGCGGCGGC
GCCACCTGCAGTAGCGTTCGCCCCGAAC

12 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 08.11.2012

Susanne Giersiefer