Abteilung für Neurologie
der Universität Ulm
Direktor: Prof. Dr. med A. C. Ludolph

Picalm beeinflusst die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins in zellulären Alzheimer-Modellen

Dissertation zur Erreichung des Doktorgrades der Medizin der medizinischen Fakultät der Universität Ulm

eingereicht von
Lisa Marina Di Giorgio
aus Karlsruhe

2015

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth
Erstgutachter:	Prof. Dr. med. Christine von Arnim
Zweitgutachter:	Prof. Dr. med. Dietmar Thal
Datum:	16.06.2016

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS II

1 EINLEITUNG 1

1.1 Die Alzheimer-Krankheit 1

1.2 Das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) 2

1.3 Die Genetik der Alzheimer-Krankheit 6

1.4 Picalm (= Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein) 7

1.5 Meine Hypothese 11

2 MATERIAL UND METHODEN 12

2.1 Material 12

2.2 Methoden 21

3 ERGEBNISSE 31

3.1 Die endogene Expression und zelluläre Lokalisation von Picalm 31

3.2 Beeinflusst Picalm die APP-Prozessierung? 34

3.3 Gibt es eine direkte Interaktion von Picalm und APP? 40

4 DISKUSSION 42

4.1 Ergebnisse 42

4.2 Schlussfolgerung und Ausblick 50

5 ZUSAMMENFASSUNG 51

6 QUELLENVERZEICHNIS 52

7 ANHANG 61

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A β	Amyloid beta
AD	Alzheimer`s disease (= Alzheimer-Krankheit)
AICD	APP intrazelluläre Domäne
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor (= Vorläufer) Protein
BACE 1	beta-site of APP cleaving-enzyme 1
BCA	Bicinchoninsäure
CALM	clathrin assembly lymphoid myeloid leukaemia protein
CI	Konfidenzintervall
CME	Clathrin-mediated endocytosis (= Clathrin-vermittelte Endozytose)
CTF	C-terminales Fragment
div	days in vitro (= Tage in Zellkultur)
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco`s Phosphate Bufferd Saline without Ca^{2+}/Mg^{2+} Solution
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E18	Entwicklungstag 18 (von Mausembryonen)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	Familiäre Alzheimer Krankheit
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Hek-Zellen	humane embryonale Nieren- (engl. kidney) Zellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseraddish (= Meerrettich)-Peroxidase
LDS	Lithium Dodecyl Sulfat
LOAD	Late onset Alzheimer`s desease
NFT	Neuro-fibrillary tangles (= Neurofibrillen)
OR	Odd`s Ratio
Picalm	phosphatidyl-inositol binding clathrin assembly protein
PLL	poly-L-Lysin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	rounds per minute (= Umdrehungen pro Minute)
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RT	Raumtemperatur
sAPP	soluble (= lösliches) Amyloid Precursor Protein
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SV	synaptischer Vesikel
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
w / o	without (= ohne)

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer-Krankheit

1.1.1 Krankheitsverlauf und Epidemiologie

Die Alzheimer-Krankheit (engl. Alzheimer`s Disease = AD) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die über mehrere Jahre zu einem langsamen, progredienten Verlust der kognitiven Fähigkeiten, zu Verhaltensauffälligkeiten und anderen neuropsychologischen Symptomen führt. Sie ist für 50 bis 60% aller Fälle von Demenz verantwortlich und damit die häufigste Ursache von Demenz (Blennow et al. 2006). Es existiert bis heute keine Therapie, die die Progredienz der dementiellen Entwicklung aufhalten kann.
In Deutschland leben laut Deutscher Alzheimer Gesellschaft etwa 1,5 Millionen Demenzkranke (Stand 2014), so dass man von etwa 750.000 Alzheimer-Patienten in Deutschland ausgehen kann. Da die Prävalenz der Alzheimer-Krankheit stark altersabhängig ist, müssen wir uns, aufgrund der Bevölkerungsentwicklung in den nächsten Jahrzehnten, auf eine starke Zunahme der Anzahl der Alzheimer-Patienten einstellen. Alle Alzheimer-Patienten werden im Laufe ihrer Erkrankung pflegebedürftig, was oft mit einer großen psychischen Belastung für Betroffene und Angehörige, sowie mit einem erheblichen finanziellen Aufwand einhergeht. Der Morbus Alzheimer ist daher eine Krankheit mit einer immensen gesundheitspolitischen Bedeutung, die unser Gesundheits- und Pflegesystem in Zukunft vor eine große Herausforderung stellen wird.

1.1.2 Diagnosestellung

Die Diagnose einer AD erfolgt bis heute klinisch und stützt sich auf den Ausschluss anderer Ursachen für die Demenz, auf das typische Profil der kognitiven Defizite, die Anamnese und unterstützende Befunde wie die Liquordiagnostik (Gehlen und Delank 2010). Wegweisende Liquor-Parameter sind das Amyloid β 42 (Aβ 42), Gesamt-Tau und Phospho-Tau. Bei der Bestimmung aller drei Parameter gelingt eine gute Abgrenzung von Patienten mit Alzheimer-Demenz gegenüber Gesunden (Sensitivität 92%, Spezifität 89%) (Sunderland et al. 2003), die Abgrenzung einer Alzheimer-Demenz von anderen Demenzformen ist durch die Liquordiagnostik jedoch nicht möglich (Frankfort et al. 2008). Die definitive Diagnose eines Morbus Alzheimer kann letztendlich erst post mortem, aufgrund des Vorliegens der typischen neuropathologischen Kennzeichen, gestellt werden.

1.1.3 Die Neuropathologie der Alzheimer-Krankheit

Bereits 1907 beschrieb Alois Alzheimer die typische Neuropathologie der nach ihm benannten Erkrankung (siehe Abbildung 1). Er erkannte im Gehirn der von ihm untersuchten Patientin intrazelluläre Fibrillen, extrazelluläre Ablagerungen und neuronalen Zelltod (Alzheimer et al. 1995). Heute weiß man, dass die intrazellulären Neurofibrillen aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein und die charakteristischen extrazelluläre Plaques vor allem aus Amyloid β 42 bestehen (O`Brian und Wong 2011). Diese senilen Plaques und extrazellulären Neurofibrillen sind das pathologische Erkennungszeichen der AD (Ballard et al. 2011).

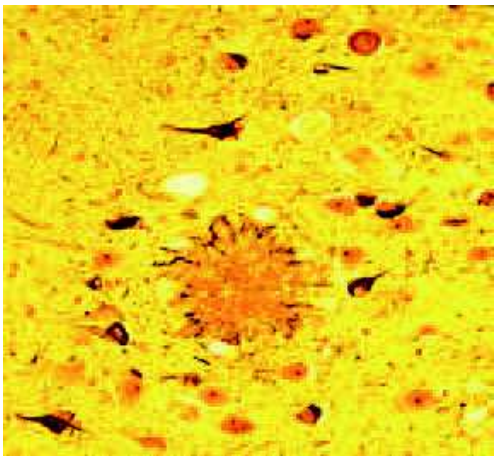

Abbildung 1: Amyloid-Plaque und Neurofibrillen
Dieser Schnitt aus der Amygdala eines Alzheimer-Patienten zeigt die neuropathologischen Kennzeichen der AD: Ein neuritischer Plaque, bestehend aus kompakten Ablagerungen von extrazellulärem Amyloid, umgeben von einem Kranz aus dystrophen Neuriten; sowie pyramidale Neurone mit intrazellulären Neurofibrillen (die dunkle Masse, die einen Großteil des Zytoplasmas ausfüllt). Färbung: modifizierte Bielschowsky-Silber-Färbung. Bild entnommen aus *Selkoe DJ: The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer`s disease, Trends in Cell Biology 8(11): 447-453, 1998.*

1.2 Das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP)

1.2.1 Struktur und Funktion von APP

Das Amyloid β, das zum Großteil die Plaques in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten bildet, entsteht aus dem Amyloid-Vorläufer-Protein (engl.: Amyloid Precurser Protein = APP). *APP* liegt auf Chromosom 21 und kodiert für ein Typ I Transmembran-Protein mit 8 Splice-Isoformen von denen drei (APP770, 751 und 695) mit Abstand die häufigsten sind (O`Brian und Wong 2011). APP770 und APP751 werden im ganzen Körper exprimiert, während APP695 den Großteil des neuronalen APPs ausmacht (Bayer et al. 1999, Zhang et al. 2011).

Die genaue Funktion von APP ist noch nicht bekannt, es gibt aber Hinweise auf eine Beteiligung von *full-length*-APP bei der Zell-Adhäsion, dem Auswachsen von Neuriten, der Synaptogenese, dem Calcium-Stoffwechsel, beim axonalen Proteintransport und der transmembranen Signaltransduktion (Thinakaran und Koo 2008, Zhang et al. 2011).

Da APP durch Proteolyse in mehrere Produkte gespalten wird, die verschiedene und teilweise entgegengesetzte Funktionen ausüben, ist es auch möglich, dass der Einfluss von *full-length*-APP auf die Zelle aus einer Kombination der Effekte seiner Spaltprodukte besteht, je nachdem, welches Produkt in der Zelle gerade überwiegt (Zhang et al 2011).

1.2.2 Die Amyloidhypothese

Wie genau die oben beschriebenen Veränderungen mit der synaptischen Dysfunktion und dem neuronalen Zelltod und damit mit den Symptomen der Alzheimer-Krankheit zusammenhängen, ist noch nicht geklärt und der genaue der AD zugrunde liegende Pathomechanismus ist immer noch unklar.
Die bekannteste Sichtweise, die sogenannte Amyloid-Hypothese, geht davon aus, dass das Amyloid β 42 eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit spielt. J. Hardy und G. Higgins postulierten 1992, dass die Ablagerung von Amyloid β in Form von Plaques der Auslöser der Alzheimer-Krankheit ist. In den folgenden Jahren wurde diese Hypothese immer wieder durch andere Autoren modifiziert, die zum Beispiel das intrazelluläre Amyloid β, Amyloid-Oligomere oder das Verhältnis von Aβ 42 zu Aβ 40 als den entscheidenden Punkt betrachten (Gilbert 2013, Pimplikar 2009).

1.2.3 Die Prozessierung von APP

APP kann prinzipiell auf zwei Wegen prozessiert werden (siehe Abbildung 2). Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung wird APP von der α- und der γ-Sekretase geschnitten, sodass sAPPα (soluble = lösliches APPα), p3 und eine intrazelluläre Domäne von APP (APP intracellular domain = AICD) entstehen. Dagegen wird bei der amyloidogenen Prozessierung APP von der β- und der γ-Sekretase geschnitten, so dass sAPPβ, Amyloid β und die AICD entstehen (O`Brian und Wong 2011). Die Funktion der neuronalen β-Sekretase wird von BACE1 (*beta-site of APP cleaving enzyme 1*) erfüllt (Cai et al. 2001). Dieser Schritt findet vor allem in Endosomen statt (Kinoshita et al. 2003).
Das sAPPα wirkt neuroprotektiv gegen Exitotoxizität und spielt außerdem eine Rolle bei der neuronalen Plastizität, der Stammzellproliferation und der ZNS-Entwicklung (Caille et al. 2004, Furukawa et al. 1996, Ohsawa et al. 1999). Im Gegensatz dazu spielt sAPPβ vermutlich eine Rolle beim neuronalen Zelltod und Untergang von Axonen (Nikolaev et al. 2009, Zhang et al. 2011).

Nach dem Schneiden durch die α- bzw. β-Sekretase entstehen die membranassoziierten C-terminalen Fragmente (CTF) von APP (CTFα bzw. β), die dann durch die γ-Sekretase weiter prozessiert werden (siehe Abbildung 2).

Da es sich bei den CTFs nur um Zwischenprodukte der APP-Prozessierung handelt, ist ihre Funktion bisher nur wenig charakterisiert worden (Zhang et al. 2011).

Die γ-Sekretase teilt die CTFs jeweils in die AICD und ein kleineres, lösliches Fragment, nämlich p3 (aus CTFα) bzw. Aβ (aus CTFβ). Das p3-Fragment wird schnell abgebaut und man geht davon aus, dass es keine weitere Funktion hat (Zhang et al. 2011).

Da die γ-Sekretase über keine Sequenz-Spezifität verfügt und deshalb an mehreren Stellen in der Transmembrandomäne von APP schneiden kann, gibt es Aβ-Peptide mit unterschiedlicher Länge. Das Aβ 40 macht normalerweise circa 90 % des Amyloid β aus und das Aβ 42 weniger als 10 % (Selkoe und Wolfe 2007). Die Bildung von Amyloid-Plaques im Gehirn beginnt mit der Ablagerung von Aβ 42, da es deutlich hydrophober ist als Aβ 40 und daher schneller aggregiert (Selkoe 1998). Die Überproduktion von Aβ ist mit synaptischer Dysfunktion, der Bildung von Neurofibrillen (NFTs) und neuronalem Zelltod assoziiert (Zhang et al. 2011).

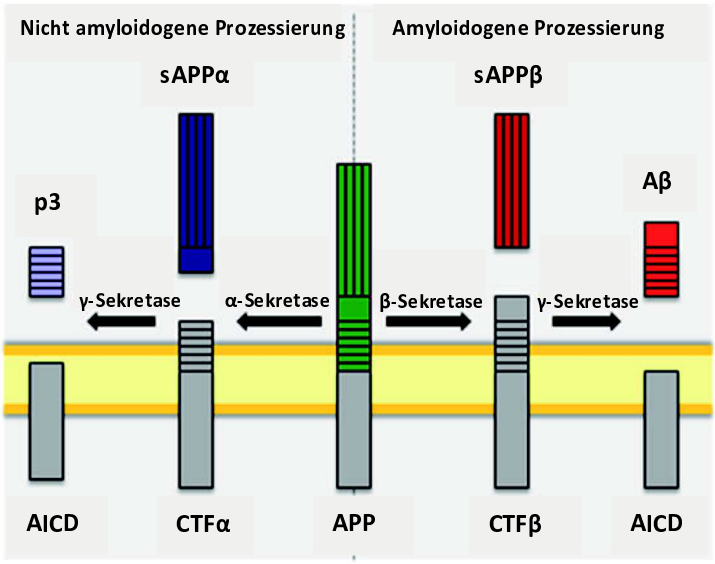

Abbildung 2: Die Prozessierung von APP. APP (grün) kann entweder durch die α- oder die β-Sekretase geschnitten werden, wobei jeweils ein lösliches n-terminales Fragment (sAPPα (dunkelblau) bzw. sAPPβ (dunkelrot)) und ein membranständiges c-terminales Fragment (CTFα bzw. β, beide grau) entsteht. Das CTF wird dann durch die γ-Sekretase geschnitten, wobei jeweils die intrazelluläre Domäne von APP (AICD, ebenfalls grau) übrig bleibt. Außerdem entsteht aus CTFα das p3 Fragment (hellblau) und aus CTFβ entsteht Amyloid β (Aβ) (hellrot). Abbildung erstellt nach *Zhang et al. APP processing in Alzheimer`s disease, Molecular Brain, 4:3 (2011)*.

Die an der APP-Prozessierung beteiligten Enzyme sind in der Zelle unterschiedlich lokalisiert. Daher hängt die Frage, ob APP amyloidogen oder nicht-amyloidogen prozessiert wird, auch von der intrazellulären Lokalisation des APP ab (siehe Abbildung 3). APP gelangt zunächst vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran. Dort wird es entweder von der α-Sekretase und anschließend von der γ-Sekretase prozessiert - ohne dass Amyloid β entsteht - oder es wird durch Endozytose wieder in die Zelle aufgenommen.
Im endosomalen Kompartiment der Zelle kann APP von der neuronalen β-Sekretase BACE1 und dann von der γ-Sekretase geschnitten werden, so dass Aβ entsteht. (O`Brian und Wong 2011). Der Endozytose-Schritt im Transportweg von APP stellt also einen Umschlagpunkt vom nicht-amyloidogenen hin zum amyloidogenen APP-Abbau dar.

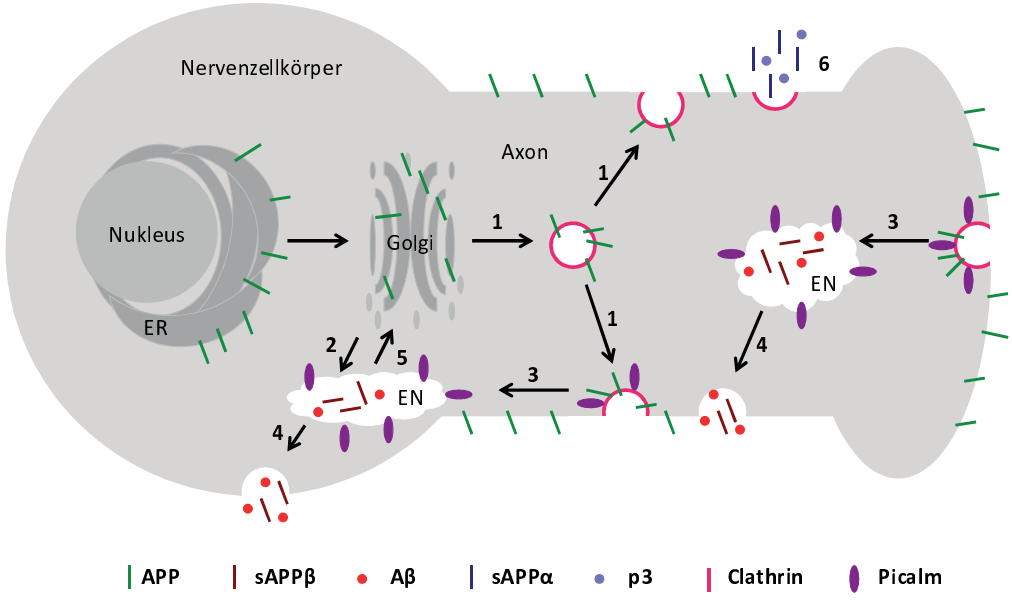

Abbildung 3: APP-Transport in Neuronen. Neu synthetisiertes APP (grün) wird vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Golgi-Apparat entweder entlang des Axons (1) oder ins endosomale Kompartiment (EN = Endosom) des Zellkörpers (2) transportiert. Nach dem Einfügen in die Plasmamembran wird ein Teil des APPs von der α-Sekretase abgebaut (6) wobei sAPPα (dunkelblau) und p3 (hellblau) entstehen und ein Teil wird mittels Clathrin-vermittelter Endozytose (Clathrin = rosa), bei der Picalm (lila) eine Rolle spielt, ins endosomale Kompartiment reinternalisiert (3), wo sAPPβ (dunkelrot) und Aβ (hellrot) entstehen. Auch der Rücktransport von APP aus dem endosomalen Kompartment in den Golgi-Apparat kommt vor (5). Abbildung modifiziert nach: *O`Brian RJ, Wong PC. 2011. Amyloid Precurser Protein processing and Alzheimer`s Disease. Annu. Rev. Neurosci. 34: 185-204*. Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Annual Reviews.

1.3 Die Genetik der Alzheimer-Krankheit

1.3.1 Familiäre und sporadische Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit tritt in den meisten Fällen sporadisch auf, es gibt jedoch auch autosomal-dominant vererbte familiäre Formen. Diese seltenen autosomal-dominanten Formen der Erkrankung beginnen meist vor dem 65. Lebensjahr und können durch Mutationen im APP-, Presenilin1-, oder Presenilin2-Gen ausgelöst werden (Blennow et al. 2006). Insgesamt sind in diesen drei Genen zusammen mindestens 203 Mutationen bekannt, die familiären Alzheimer auslösen können (http://www.molgen.ua.ac.be /ADMutations/, Stand vom 30.03.2015).

Mutationen in diesen drei Genen können zu Veränderungen der Amyloid β Produktion führen (Bagyinszky et al. 2014), sodass der genetische Hintergrund familiärer AD-Fälle ein Argument für die Richtigkeit der Amyloid-Hypothese darstellt (Blennow et al. 2006).

Das APP-Gen ist auf Chromosom 21 lokalisiert und interessanterweise zeigen Menschen mit einer Trisomie 21 (Down-Syndrom) ab einem Alter von 30 bis 40 Jahren in ihren Gehirnen nahezu immer die typische AD-Pathologie (Wisniewski et al. 1985). Im Alter von 60 Jahren haben 50 - 70% dieser Menschen eine Demenz entwickelt (Wilcock und Griffin 2013). Diese Tatsache wird ebenfalls als unterstützend für die Amyloid-Hypothese angesehen (Blennow et al. 2006).

Die sehr viel häufigere sporadische Form der AD ist wohl multifaktoriell bedingt und beginnt meist nach dem 65. Lebensjahr. Nichtgenetische Risikofaktoren sind zum Beispiel das Rauchen (Anstey et al. 2007), Übergewicht, ein erhöhter Cholesterinspiegel und Hypertonie (Kivipelto et al. 2005). Dennoch ist ein großer Teil des Erkrankungsrisikos auf genetische Faktoren zurückzuführen, denn die Heritabilität der sporadischen AD liegt bei ca. 80% (Gatz et al. 2006). Für einen großen Teil dieses genetischen Risikos ist das Apolipoprotein E (APOE) ε4-Allel verantwortlich. Eine Kopie dieses Allels erhöht das Risiko an AD zu erkranken um das zwei- bis vierfache, bei zwei Allelen ist das Risiko sogar 12-fach erhöht (Hollingworth et al. 2011). Insgesamt geht etwa 50 % des genetischen Risikos für sporadische AD auf APOE zurück. Da häufige genetische Varianten mit einem derart großen Effekt wie APOEε4 selten sind, war davon auszugehen, dass noch viele weitere Risikogene existieren, deren Effekt aber, jeweils für sich allein genommen, deutlich unter dem von APOE liegt (van Es & van den Berg 2009). Einige dieser Risikogene (PICALM, CLU, CR1) wurden erstmals 2009 in einer großen genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) von Harold et al. entdeckt.

1.4 Picalm (= Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein)

1.4.1 Picalm und Alzheimer

Die Assoziation von Picalm, einem Clathrin-Adaptor-Protein das eine Schlüsselrolle bei der Clathrin-vermittelten Endozytose spielt (Tebar et al. 1999, Meyerholz et al. 2005), mit dem Auftreten der Alzheimer-Krankheit wurde 2009 durch eine große genomweite Assoziationsstudie (GWAS) von Harold et al. bekannt. Hier konnte gezeigt werden, dass der Picalm-SNP rs3851179 mit dem Risiko an Alzheimer zu erkranken assoziiert ist (OR = 0,85; 95% CI 0,80 - 0,90) (siehe Abbildung 4) (Harold et al. 2009). Diese Assoziation konnte für diesen und andere Picalm-SNPs mittlerweile wiederholt beobachtet werden (Carrasquillo et al. 2010, Corneveaux et al. 2010, Jun et al. 2010, Lee et. al 2011, Naj et al. 2011, Schjeide et al. 2011). Es existieren auch Hinweise darauf, dass Picalm besonders bei Trägern des APOEε4-Allels das AD-Risiko beeinflusst (Morgen et al. 2014, Jun et al. 2010).

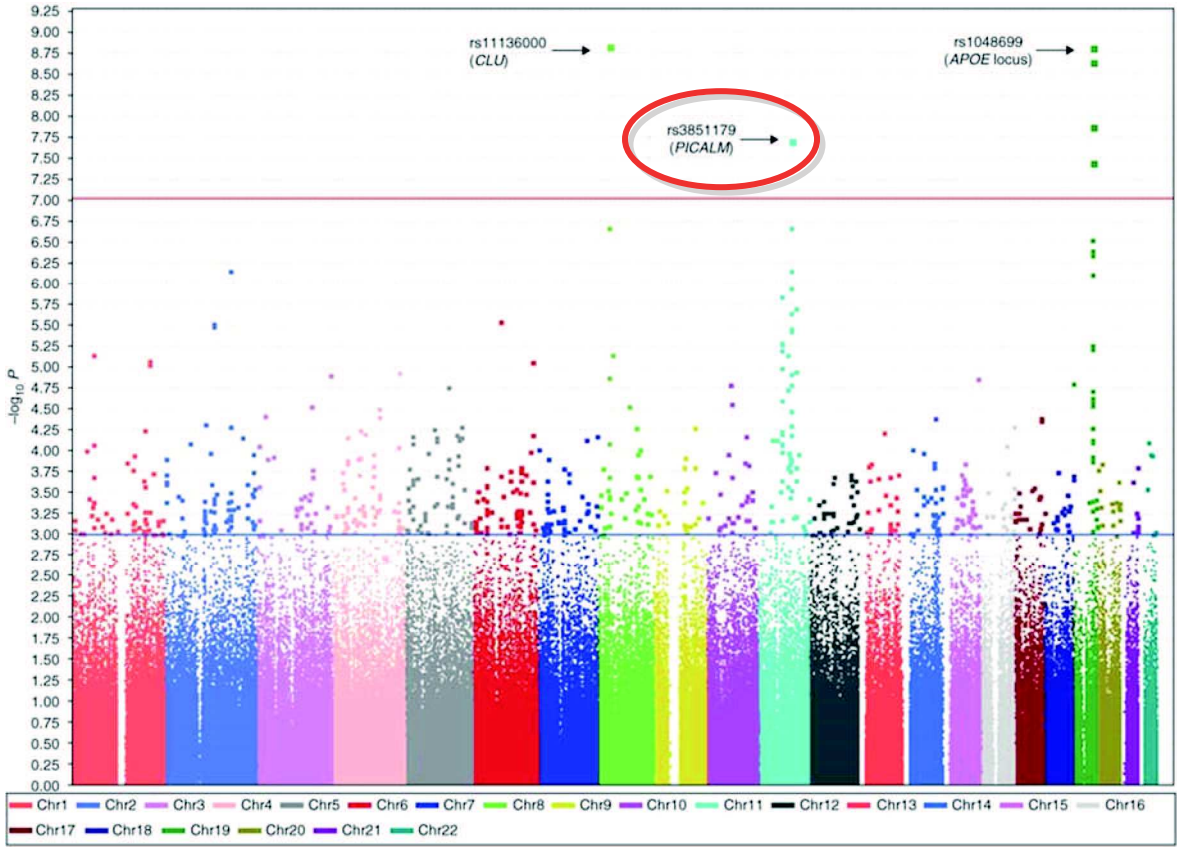

Abbildung 4: Der Picalm-SNP rs3851179 ist signifikant mit dem AD-Risiko assoziiert. Chromosomale Position (x-Achse) gegen den $-\log_{10}$ des GWAS P-Wertes (y-Achse). Die rote Linie zeigt die Grenze für genomweite Signifikanz. Rs3851179 liegt oberhalb dieser Grenze (roter Kreis). Modifiziert nach: *Harold D. et al. 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer`s disease. Nature Genetics 41: 1088 – 1093.* Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Nature Publishing Group.

In ihrer Veröffentlichung 2009 spekulierten Harold et al., dass die Assoziation von Picalm mit der AD durch einen Einfluss des Endozytoseproteins Picalm auf die APP-Endozytose und die Produktion von Aβ zustande kommen könnte. Auch beschrieben Schjeide et al. 2011, dass ein bestimmter Picalm-SNP (rs541458) mit erniedrigten Amyloid β 42 Leveln im Liquor einhergeht, was ein Alzheimer-Biomarker ist.

Xiao et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression von Picalm in Neuro2A-Zellen mit einer vermehrten Internalisation von APP und einer erhöhten Produktion von Aβ assoziiert ist und dass der *Knock-down* von Picalm mit einer verminderten Aufnahme von APP und Aβ assoziiert ist (Xiao et al. 2012). Passend dazu konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass Picalm im Frontalhirn von Alzheimer-Patienten leicht erhöht exprimiert wird (Baig et al. 2010). Auch im Cortex von Tg2576-Mäusen (einem AD-Mausmodell), die APP mit *Swedish*-Mutation exprimieren, liegt Picalm erhöht vor (Thomas et al. 2011).

Dagegen zeigten Ando et al., dass ungespaltenes Picalm (65-75 kDa) in AD-Gehirnen vermindert vorliegt und dass Picalm mit dem hyperphosphorylierten Tau in Neurofibrillen in AD-Gehirnen kolokalisiert (Ando et al. 2013). Moreau et al. brachten Picalm ebenfalls mit Tau in Verbindung. Sie zeigten, dass Picalm die Autophagie durch die Regulation der Endozytose von SNARE-Proteinen wie VAMP2, 3 und 8 beeinflusst und dadurch einen Effekt auf die Tau-Clearance hat (Moreau et al. 2014).

Picalm ist, wie bereits erwähnt, ein Clathrin-Adaptor-Protein. Die n-terminale ANTH-Domäne von Picalm bindet an das Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat in Zellmembranen (Ford et al. 2001), während der C-Terminus von Picalm an die Clathrin-*heavy-chain* bindet (Tebar et al. 1999). Außerdem interagiert Picalm mit AP2, einem Adaptorkomplex, der eine zentrale Rolle bei der *Cargo*-Selektion in der Endozytose spielt (Meyerholz et al. 2005). Daten von Tian et al. deuten darauf hin, dass der AP2/Picalm-Komplex als *Cargo*-Rezeptor für das APP-CTF fungiert und es aus dem Endozytose- in den Autophagie-*Pathway* der Zelle schleust (Tian et al. 2013).

Picalm weist morphologische Ähnlichkeiten mit dem neuronenspezifischen Clathrin-Adaptorprotein AP180 auf, z.B. ist beiden die ANTH-Domäne gemeinsam (Tebar et al. 1999). Picalm wird jedoch - im Gegensatz zu AP180 - in fast jedem Gewebe exprimiert (Dreyling et al. 1996). Im Gehirn lässt sich Picalm in den Blutgefäßen (Baig et al. 2010), Astrozyten und Neuronen - besonders im Bereich der prä- und postsynaptischen Membranen - nachweisen (Yao et al. 2003 und 2005).

Eine wichtige Funktion von Picalm scheint die Regulation der Endozytose der R-SNAREs VAMP2 - das für die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran nötig ist - und seiner nicht-neuronalen Homologe VAMP3 und 8 zu sein (siehe Abbildung 5) (Maritzen et al. 2012, Miller et al. 2011, Harel et al. 2008).

Es gibt also Hinweise auf verschiedene Mechanismen, über die Picalm an der Pathophysiologie der AD beteiligt sein könnte, aber die genaue Rolle von Picalm ist bislang noch unklar.

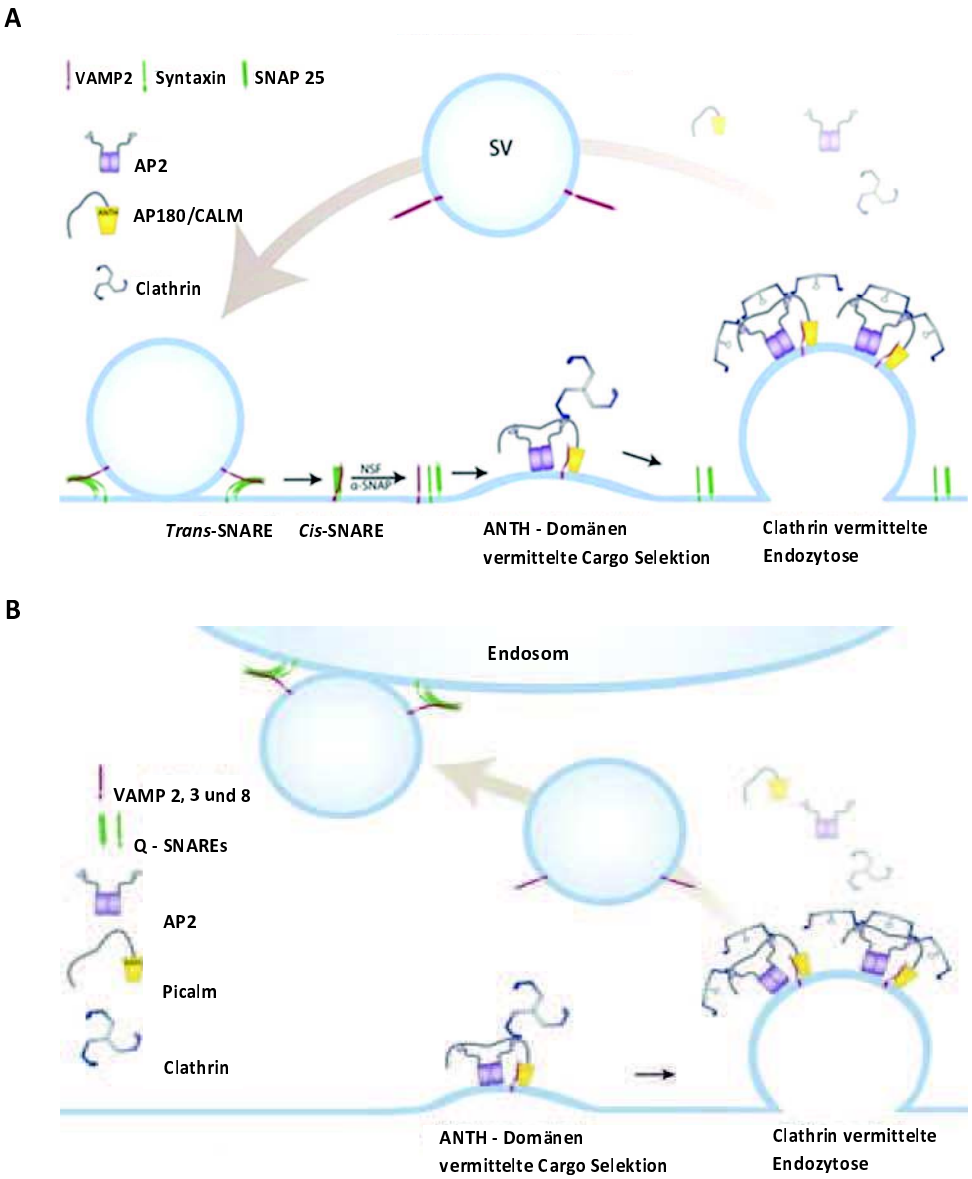

Abbildung 5: VAMP-Transport durch AP180 und Picalm. Die ANTH-Domäne (gelb) von AP180 bzw. Picalm bindet an das SNARE-Motiv von VAMP2, 3 und 8. **A** AP180- und Picalm abhängiger Transport von VAMP2 an der Synapse. SV = synaptischer Vesikel **B** Picalm-abhängiger Transport von VAMP2, 3 und 8. Abbildung entnommen aus *Maritzen T. et al.: Turning CALM into excitement: AP180 and CALM in endocytosis and disease. Biol. Cell (2012) 104, 585 – 602.*

1.4.2 Weitere Erkenntnisse über Picalm

Als Erstes beschrieben wurde Picalm/Calm als Fusionspartner in der t(10;11) (p13;q14) Translokation, die bei akuten Leukämien und malignen Lymphomen beobachtet wird; daher auch die Bezeichnung Calm (= *clathrin-assembly lymphoid myeloid leukaemia protein*) (Dreyling et al. 1996, Dreyling et al. 1998).

Picalm spielt wohl eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung, besonders bei der Ausbildung von Dendriten (Bushlin et al. 2008, Schwartz et al. 2010). Dieser *in vitro* erhobene Befund wurde bisher nicht *in vivo* untermauert, da bei Charakterisierungen von Picalm-defizienten Mäusen, wegen des oben genannten Zusammenhangs mit Leukämien, der Fokus bisher auf der hämatologischen Untersuchung dieser Tiere lag.

Picalm-defiziente Mäuse wurden bereits 1997 beschrieben, wenn auch damals nicht klar war, dass die bei diesen Tieren (sog. fit1-Mäuse) nachgewiesene Mutation eine Nonsense-Punktmutation im Maus-Ortholog von PICALM ist (Klebig et al. 2003, Potter et al. 1997). Fit1-Mäuse fallen durch eine Wachstumsretardierung, eine verkürzte Lebensdauer, Anämien, Störungen in der Hämatopoese und eine Eisentransportstörung auf (Klebig et al. 2003). Dieser Phänotyp konnte von Suzuki et al. bestätigt werden, die eine Picalm-*Knock-out*-Mauslinie generierten (siehe Abbildung 6) (Suzuki et al. 2012). Bei der Untersuchung der Gehirne der *Knock-out*-Mäuse fielen eine Cortex-Atrophie und erweiterte Ventrikel auf, eine genauere Analyse des neurologischen Phänotyps soll noch folgen (Suzuki et al. 2012).

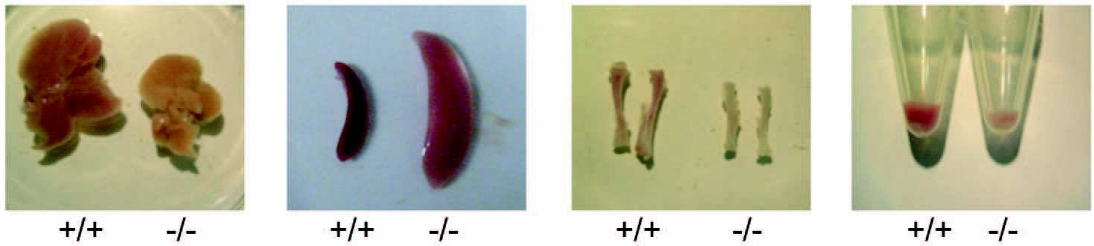



Abbildung 6: Vergleich von Picalm-*Knock-out* (KO) (-/-) und Wildtypmäusen (+/+). Die KO-Mäuse sind insgesamt deutlich kleiner als die WT-Mäuse (Bild links, im Alter von 3 Wochen). Auch Leber (1. Bild der oberen Reihe) und Tibia (3. Bild der oberen Reihe) der KO-Mäuse sind deutlich kleiner. Zudem zeigt sich bei den KO-Tieren eine Splenomegalie (2. Bild der oberen Reihe) und eine Anämie (4. Bild). Abbildung aus *Suzuki M. et al.: The clathrin Assembly Protein PICALM is required for erythroid maturation and transferrin internalization in mice. PLoS ONE, 2012, 7, 2, e31854*

1.5 Meine Hypothese

Da genomweite Assoziationsstudien einen Zusammenhang zwischen Picalm-SNPs und dem AD-Risiko herstellen, kann man vermuten, dass Picalm eine Rolle in der Pathophysiologie der AD spielen könnte. Der genaue Pathomechanismus der AD ist noch unbekannt, man geht aber davon aus, dass das Amyloid β-Peptid und damit auch sein Vorläufer - das APP - dabei eine zentrale Rolle spielen (siehe oben). Faktoren, die den amyloidogenen Abbau von APP fördern, könnten daher auch die Entstehung einer AD fördern. Es wurde gezeigt, dass Picalm-SNPs mit veränderten Amyloid β 42 Leveln im Liquor assoziiert sind. Daher möchte ich den Einfluss von Picalm auf die APP-Prozessierung untersuchen.

Picalm ist ein Clathrin-Adaptorprotein, mit einer Schlüsselrolle bei der Clathrin-vermittelten Endozytose. Beim Abbau von APP ist die Clathrin-vermittelte Endozytose von APP von der Zelloberfläche ein Umschlagpunkt vom nicht-amyloidogenen hin zum amyloidogenen Abbau. Hier könnte Picalm in seiner Funktion als Clathrin-Adaptorprotein beteiligt sein.

Meine Hypothese lautet daher, dass Picalm die Sekretion von Amyloid β und sAPPs begünstigt, indem es die amyloidogene Prozessierung von APP fördert.

Ich werde als Vorversuch zunächst mittels Westernblot und Immunzytochemie überprüfen, welche der mir zur Verfügung stehenden Zelllinien Picalm endogen exprimieren und in welchen Zellkompartimenten es vorliegt.

Dann werde ich die Frage untersuchen, ob Picalm tatsächlich den amyloidogenen APP-Abbau beeinflusst. Dazu werde ich Picalm in Hek293 und Neuro2A überexprimieren bzw. die Expression mittels siRNA herunterregulieren und dann die Menge von sAPPs und Aβ im Mediumüberstand der Zellen mittels Immunoassays messen.

Bei einem Einfluss von Picalm auf die APP-Prozessierung, stellt sich dann die Frage, wie dieser zustande kommen könnte. Ist tatsächlich eine Steigerung der Endozytose von APP ursächlich oder spielen noch andere Faktoren - etwa eine direkte Interaktion von Picalm und APP - eine Rolle? Dies soll mittels Co-Immunopräzipitation untersucht werden.

Insgesamt erhoffe ich mir von dieser Arbeit, einen Hinweis darauf zu bekommen, welche Rolle Picalm im Pathomechanismus der AD spielen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

2.1.1.1 Hek 293

Die Hek293-Zelllinie (DSMZ ACC 305) entstand aus der Transformation von humanen embryonalen Nierenzellen (engl. **H**uman **e**mbryonic **k**idney = Hek) mit dem humanen Adenovirus 5 (Graham et al. 1977). Die Gründe für die Verwendung dieser Zelllinie in meiner Arbeit sind die problemlose Kultur dieser Zellen, ihr relativ schnelles Wachstum, ihre gute Transfizierbarkeit und ihr humaner Ursprung. Außerdem haben Hek293-Zellen eine gewisse Ähnlichkeit mit neuronalen Zellen, da sie Neurofilamente exprimieren, die typisch für Neurone in einem frühen Differenzierungsstadium sind (Shaw et al. 2002).

2.1.1.2 Neuro2A (N2A)

Neuro2A-Zellen (DSMZ ACC 148) sind murine Neuroblastomzellen aus einem Spontantumor einer A Albinomaus (Olmsted et al. 1970). Das heißt, es handelt sich um Zellen neuronalen Ursprungs, die sich aber extrem schnell vermehren und einfach zu kultivieren sind. Daher sind Neuro2A-Zellen ein leicht zu handhabendes Modell für primäre murine Neurone.

2.1.1.3 SH-SY5Y

Die SH-SY5Y-Zelllinie (DSMZ ACC 209) ist eine klonale Sublinie von SK-N-SH, die ihrerseits aus einer Biopsie von Knochenmetastasen eines Neuroblastoms bei einem 4-jährigen Mädchen entstanden ist (Biedler et al. 1973, Ross et al. 1983). SH-SY5Y eignen sich für die Alzheimer-Forschung, da sie humane Zellen neuronalen Ursprungs sind.

2.1.1.4 Primäre murine Zellen

Für die Gewinnung primärer Zellen wurden C57BL/6J-Mausembryonen (Entwicklungstag 18 = E18) verwendet. Die Präparation erfolgte durch Dr. Cathrin Schnack und Anke Wahler und wird in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben.

2.1.2 Bakterienstämme

Tabelle 1

Bezeichnung	Hersteller
Escherichia coli DH5 α ™	Invitrogen, Carlsbad (USA)

2.1.3 Kulturmedien

2.1.3.1 Zellkultur

Tabelle 2

Bezeichnung	Verwendung	Katalognummer	Hersteller
B-27® Serum-free Supplement (50x)	Kultur von primären Neuronen	17504-044	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Kultur von Hek,- N2A- und SY5Y- Zellen	41966-029	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Neurobasal®	Kultur von primären Neuronen	21103-049	Invitrogen, Carlsbad (USA)

2.1.3.2 Bakterienkultur

Tabelle 3

Bezeichnung	Verwendung	Katalognummer	Hersteller
LB-Agar	Ausplatieren von Bakterien	X969.2	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
LB-Medium	Easy-,Mini- und Maxi-Prep	X968.2	
SOC-Medium	Transformation	15544-034	Invitrogen, Carlsbad (USA)

2.1.4 Chemikalien und Laborbedarf

Tabelle 4, weiter auf Seite 14 und 15

Bezeichnung	Verwendung	Katalognummer	Hersteller
Agarose	Gelelektrophorese	A9539-500G	SIGMA-ALDRICH, St. Louis (USA)
Bicin	Transferpuffer	A102,40250	AppliChem GmbH, Darmstadt
Blotting Filter Paper, 2.5mm dick 8.6x13.5 cm	Western-Blot	LC2008	Invitrogen, Carlsbad (USA)
$CaCl_2$	Calcium-Phosphat-Transfektion	449709	SIGMA-ALDRICH, St. Louis (USA)
Cryo Tubes	Glycerolstocks	V7634-500E	SIGMA-ALDRICH, St. Louis (USA)
µ Columns	Säulen für die Co-Immunopräzipitation	130-042-701	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
DABCO	Mowiol (für ICC)	0718	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe

Bezeichnung	Verwendung	Katalognummer	Hersteller
DAPI	Mowiol (für ICC)	A1001,0025	AppliChem GmbH, Darmstadt
Deoxycholate	BEX-Puffer	3484.2	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
DTT für die Molekularbiologie	Westernblot	A2948,0025	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	verschiedene Puffer	8043.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Ethanol	Maxi-Prep	459836	SIGMA-ALDRICH, St. Louis (USA)
Fetal Bovine Serum (= FCS)	Zellmedium	SO115	Biochrom KG, Berlin
Glycerin	Mowiol	7530.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
HBS (HEPES buffered saline)	Calcium-Phosphat-Transfektion	51558	SIGMA-ALDRICH, St. Louis (USA)
Igepal CA-630	Brain Extraction Buffer	I3021	SIGMA-ALDRICH, St. Louis (USA)
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Transfektion von Zellen	11668-019	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Loading Dye Solution (6x)	Gelelektrophorese	R0611	Fermentas GmbH – part of Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth
Luminata™Forte Western HRP Substrate	Proteindetektion nach Western-Blot	WBLUF0500	Millipore Corporation, Billerica (USA)
Lysozym	Easypreplysepuffer	10515.0001	neoLab Migge Laborbedarf - Vertriebs GmbH, Heidelberg
µMACS™ Seperator	Magnet für Co-Immunopräzipitation	130-042-602	Miltenyi Biotek GmbH, Bergisch Gladbach
Methanol	Western-Blot	320390	SIGMA-ALDRICH, St. Louis (USA)
3-Morpholino-propanesulfonic acid (MOPS)	MOPS-Puffer für SDS-PAGE	A1076,1000	AppliChem GmbH, Darmstadt
Mowiol 4-88 Reagent	ICC	475904	Merck Millipore, Darmstadt
NaN_3 (Sodium azide)	ICC	S2002	SIGMA-ALDRICH, St. Louis (USA)
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Midi Gel	Western-Blot	WG1401BOX	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Objektträger SuperFrost®	ICC	1880.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Fixierung bei der ICC	0335.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
PBS Dulbecco	PBST	L 182-50	Biochrom AG, Berlin

Bezeichnung	Verwendung	Katalognummer	Hersteller
Pierce®BCA Protein Assay Reagent A	Protein-konzentrations-bestimmung	23228	Thermo Scientific, Rockfort (USA)
Pierce®BCA Protein Assay Reagent B	Protein-konzentrations-bestimmung	23224	Thermo Scientific, Rockfort (USA)
RNAzol® RT	RNA Isolation	RN 190	Molecular Research Center Inc., Cincinnati (USA)
Roti®block 10x	Blockingpuffer für Western-Blots	A151.2	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Roti®-Immunoblock	ICC	T144.1	Carl Roth GmbcH + Co.KG, Karlsruhe
SatisFection Transfection Reagent	Transfektion von Zellen	204122	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
SDS Pellets	Stripping-Puffer MOPS-Puffer	CN30.3	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Sucrose	Easypräplysepuffer	S0389	SIGMA-ALDRICH, St. Louis (USA)
Triton® x-100	Permeabilisierungs-puffer bei ICC	A1388,1000	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Zellkultur	L11-004	PAA Laboratories GmbH, Pasching (CH),
Tween®20	PBST und Strippingpuffer	A1389,1000	AppliChem GmbH, Darmstadt
Westran™ S	PVFD Blottingmembran	10413096	Whatman GmbH, Dassel

2.1.5 Puffer

Tabelle 5

Bezeichnung	Verwendung	Katalognummer	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Ca^{2+}/Mg^{2+} Solution	Zellkultur ICC	H15-002	PAA Laboratories GmbH, Pasching (CH)
NuPAGE ®LDS Sample Buffer (4x)	SDS-PAGE	NP0007	Invitrogen, Carlsbad (USA)

2.1.6 Selbst angesetzte Lösungen

Tabelle 6

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
Blocking - Puffer	1x Roti®block in H_2O	Western-Blot
Brain Extraction Buffer (BEX)	20 mM NaCl 0,6% Deoxycholate 0,6% Igepal 25 mM Tris pH 8	Lyse von Zellen und Geweben
Fixierungspuffer	4% Paraformaldehyd in 1x PBS	ICC
Immunoblock	1x Roti®-Immunoblock 0,05% NaN_3 in 1x PBS	ICC
MOPS-Puffer	0,5 M 3-Morpholino propanesulfonic acid 0,5 M Tris 10 mM EDTA 1% SDS	SDS-PAGE
Mowiol	6g Glycerin 2,4g Mowiol 4-88 Reagent 12 ml Tris 0,2 M 25 mg/ml DABCO 1µg/ml DAPI	ICC
PBST	1x PBS 0,1 % Tween®20	Western-Blot
Permeabilisierungspuffer	0,01% Triton x-100 in 1x PBS	ICC
Stripping Buffer	500 mM Glycin 1 % SDS 1 % Tween®20 Salzsäure bis pH 3,5	Western-Blot
Transferpuffer	25 mM Bicin 25 mM Tris 10 % Methanol	Western-Blot
Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer	40 mM Tris 20 mM Eisessig 1 mM EDTA pH 8	Gelelektrophorese

2.1.7 Antibiotika

Tabelle 7

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller	Katalognummer
Ampicillin Sodium Salt Biochemica BC	Kultur von Bakterien	AppliChem GmbH, Darmstadt	A0839,0010
Kanamycin Sulphate		Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe	T832.1
G418 – Disulfat Biochemica BC	Kultur stabiler Zelllinien	AppliChem GmbH, Darmstadt	A2167,0001
Penicillin/Streptomycin	Zellkultur	Biochrom AG, Berlin	A 2210

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Primärantikörper

2.1.8.1.1 Westernblot

Tabelle 8

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
anti-APP (6E10)	mouse	1:1200	Covance Inc., Princeton (USA)	SIG-39320
anti-APP c-term	rabbit	1:4000	SIGMA-ALDRICH, St.Louis (USA)	A8717
anti-beta-Aktin	mouse	1:7500		A2228
Anti-BACE1	rabbit	1:1000	Abcam, Cambridge (GB)	ab108394
anti-CALM	goat	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)	Sc-6433
anti-GFP	rabbit	1:2500	SIGMA-ALDRICH, St.Louis (USA)	G1544
anti-HA	rabbit	1:2000		H6908
anti-myc (9E10)	mouse	1:5000		M4439

2.1.8.1.2 Immunzytochemie

Tabelle 9

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
anti-APP (6E10)	mouse	1:500	Covance Inc., Princeton (USA)	SIG-39320
anti-CALM	goat	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)	Sc-6433
anti-EEA1	rabbit	1:100	Cell Signaling, Cambrige (UK)	24119
anti-GM130	mouse	1:500	BD Bioscience, Heidelberg	610822
anti-LAMP1	rat	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)	Sc-19992

2.1.8.2 Sekundärantikörper

2.1.8.2.1 Westernblot

Tabelle 10

Bezeichnung	Konjugat	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
goat anti-mouse IgG	HRP	1:5000	Invitrogen, Carlsbad (USA)	626520
goat anti-rabbit IgG	HRP	1:5000		G21234
rabbit anti-goat IgG	HRP	1:5000		611620

2.1.8.2.2 Immunzytochemie

Tabelle 11

Bezeichnung	Konjugat	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
donkey anti-goat IgG	Alexa 488	1:750	Invitrogen, Carlsbad (USA)	A11055
donkey anti-mouse IgG	Alexa 647	1:750		A31571
goat anti-mouse IgG	Alexa 546	1:750		A11003
goat anti-rabbit IgG	Alexa 546	1:750		A11010
goat anti-rabbit IgG	Alexa 647	1:750		A21244
goat anti-rat IgG	Alexa 546	1:750		A11081

2.1.9 Proteinstandards

Tabelle 12

Bezeichnung	Verwendung	Katalognummer	Hersteller
Bovine Serum Albumin Standard (2mg/ml)	Proteinbestimmung	23210	Thermo Scientific, Rockfart (USA)
MagicMark™ XP Western Protein Standard	SDS-PAGE	LC5602	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Novex Sharp ® PreStained Protein Standard	SDS-PAGE	LC5800	Invitrogen, Carlsbad (USA)

2.1.10 siRNA

Tabelle 13

Bezeichnung	enthaltene siRNAs	Targetsequenz	Katalog - nummer	Hersteller
GeneSolution siRNA (Katalognummer: GS8301)	Hs_Picalm_1	CACGTTGTTTAACTTAAGCAA	SI00094990	QUIAGEN Sciences, Maryland (USA)
	Hs_Picalm_2	TAGGTGGACTTCTCAAACCAA	SI00094997	
	Hs_Picalm_3	AAGAAGGTCTTGACATCTATA	SI00095004	
	Hs_Picalm_5	CAGGCACGTTTGAAAGCTTTA	SI03070207	

2.1.11 Vektoren und Konstrukte

Tabelle 14

Bezeichnung	Vektor	Resistenz	Hersteller
APP695-myc	Säugetier Expressions - vektor	Ampicillin	Bradley T. Hyman, Mass. General Hospital, Boston (USA)
Bace1-HA		Kanamycin	Björn von Einem, Universität Ulm
pEGFP-C1		Kanamycin	Clontec Laboratories Inc., Mountain View (USA), GenBank: U55763
GFP-mRFP		Kanamycin	Bradley T. Hyman, Mass. General Hospital, Boston (USA)
GFP-Picalm		Kanamycin	Björn von Einem und Simom Schwörer , Universität Ulm

2.1.12 Kits

Tabelle 15

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
µMACS GFP Isolation Kit	130-091-125	Milenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MSD® 96-Well MULTI-SPOT® sAPPα/sAPPβ Assay	K15120E-2	Meso Scale Discovery, Gaithersburg (USA)
MSD® 96-Well MULTI-SPOT® Human (6E10) Abeta Triplex Assay	K15148E-1	Meso Scale Discovery, Gaithersburg (USA)
PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit	K2100-07	Invitrogen, Carlsbad (USA)
PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit	K2100-10	Invitrogen, Carlsbad (USA)
QIAquick® Gel Extraction Kit	28706	QUIAGEN Sciences, Maryland (USA)

2.1.13 Geräte

Tabelle 16

Bezeichnung	Verwendung	Produktname	Hersteller
Bench	Zellkultur	HERA Safe	Heraeus instruments, Hanau
CCD Kamera	Westernblot	LAS1000 Intelligent Dark Box	FujiFilm GmbH, Düsseldorf
ELISA Reader	ELISA	Sector Imager 2400	MesoScale Discovery, Rockville (USA)
Fluoreszenzmikroskop	ICC	Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Gelkammern	SDS-PAGE	XCell Surelock™ Midi-Cell	life technologies, Carlsbad (USA)
Platereader	BCA-Assay	EL-800 UV	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Semidry Blotter	Westernblot	Trans Blot SD	Biorad, München
Spektrometer	Bestimmung DNA-Konzentration	Nanodrop 1000 V.3.7.1	Thermoscientific, Rockford (USA)
Thermomixer, klein	Easypräp	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer, groß	Mini- und Maxipräp	Certomat R H	B. Braun Biotech International, Melsungen
Zellkulturschrank	Zellkultur	BBD 6220	Heraeus instruments, Hanau
Zentrifuge, klein	Easypräp, Zelllyse	Minispin plus	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, groß	Mini- und Maxipräp	Labofuge™ 400	Thermo Scientific

2.1.14 Software

Tabelle 17

Verwendung	Bezeichnung
CCD-Kamera	Image Quant LAS 4000 Version 1.2
ELISA Reader	Discovery Workbench 4.0
Fluoreszenz-Mikroskop	Axio Vision 40 (4.8)
Nano-Drop	NanoDrop 8000 V2.0
Proteinbestimmung (BCA-Assay)	KCjuniorWin
Statistik	SigmaStat 3.1

2.2 Methoden

2.2.1 Zellmethoden

2.2.1.1 Zellkultur von Hek293, Neuro2A und SH-SY5Y

Hek293-, Neuro2A- und SH-SY5Y-Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO_2 kultiviert. Für die normale Zellkultur wurde DMEM mit 10% FCS und 1x Penicillin/Streptomycin (P/S) verwendet. Für die Kultur der stabil GFP und GFP-Picalm exprimierenden Hek293-Zelllinien wurde DMEM mit 10% FCS, 1x P/S und 200 µg/ml G418 verwendet. Die Zellen wurden gesplittet, wenn sie den Boden der Zellkulturflasche vollständig bedeckten. Nach Passage 30 wurden die Zellen verworfen.

2.2.1.2 Stabile Hek293-Zelllinien

Um Hek293 Zelllinien zu generieren, die stabil GFP-Picalm bzw. GFPmRFP (Kontrolle) exprimieren, wurden zunächst Hek293 in 6 cm Schalen ausgesät (1 Million Zellen pro Schale) und mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert (zur Transfektion siehe Abschnitt 2.2.1.4.1). Nach 24 h wurde das Medium der Zellen von DMEM mit 10% FCS und 1x P/S auf DMEM mit 10% FCS, 1x P/S und 400 µg/ml G418 umgestellt, sodass jetzt die erfolgreich transfizierten Zellen selektiert wurden, da die beiden transfizierten Konstrukte in eukaryoten Zellen eine Resistenz gegen G418 induzieren. Die Zellen wurden nach einigen Tagen in eine Zellkulturflasche umgesetzt, regelmäßig gesplittet und das Medium erneuert. Nach 3 Wochen wurde die G418-Konzentration auf eine Erhaltungsdosis von 200 µg/ml reduziert.

2.2.1.3 Präparation und Kultur der primären murinen Zellen

Die Präparation der embryonalen Hippocampus-Neurone erfolgte durch Dr. Cathrin Schnack und Anke Wahler, PhD. Hierfür wurden trächtige C57BL/6J Mäuse durch Genickbruch getötet, die E18 Embryonen entnommen und durch Abtrennen des Kopfes getötet. Die ganzen Gehirne wurden aus dem Schädel entnommen, die Hemisphären getrennt, die Meningen entfernt und die Hippocampi freipräpariert (siehe Abbildung 7). Die einzelnen Zellen wurden aus den Hippocampi durch Inkubation mit 2,5% Trypsin und Pipettieren gelöst. Die Kultur der embryonalen Hippocampus-Neurone erfolgte in Neurobasal® Medium mit B-27, bei 37°C mit 5% CO_2.

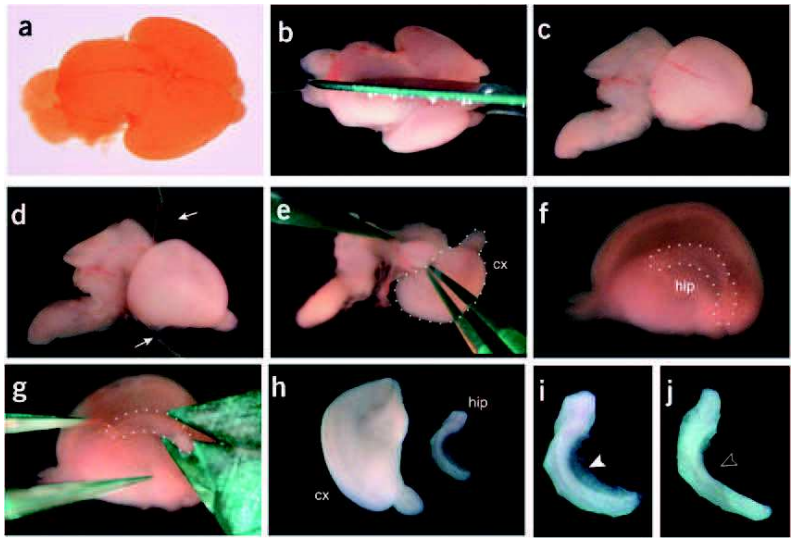

Abbildung 7: Präparation der Hippocampi aus E16.5 Maus-Gehirnen (a). Das Gehirn wird geteilt (b) und mit dem Cortex nach oben plaziert (c). Die Meningen (d) und der Cortex (cx) werden entfernt, sodass der Hippucampus (hip) sichtbar wird (f) und mit einer Schere entfernt werden kann (g). Cortex und Hippocampus werden getrennt (h) und die Fimbrien an der Seite des Hippocampus entfernt (i,j). Abbildung entnommen aus *Fath T et al.: Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons. Nature Protocols 4: 78 – 85 (2009).*

Zur Präparation von Astrozyten wurden die ganzen Gehirne (ohne Meningen) mit 1% Trypsin und 0,05% DNase lysiert, die so erhaltene Zellsuspension abzentrifugiert und in DMEM mit 10% FCS und 1x P/S resuspendiert. Die Zellen wurden in poly-L-Lysin (1 µg/ml) beschichteten 75 cm^2 Flaschen ausgesät. Nach 12 bis 14 Tagen in Kultur wurden die nur wenig adhärente Mikroglia durch Abklopfen entfernt und die adhärenten Zellen mit frischem Medium reinkubiert. Einmal pro Woche wurde danach die nachwachsende Mikroglia entfernt und nach 5 bis 6 Wochen die adhärenten Astrozyten mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und in Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.1.4 Transfektion

2.2.1.4.1 Calcium-Phosphat-Transfektion von Hek293-Zellen

Zur transienten Transfektion von Hek293-Zellen mit DNA wurde die Calcium-Phosphat-Methode verwendet. Dazu wurde HBS, $CaCl_2$ und die gewünschte DNA unter sterilen Bedingungen gemischt, für 20 min bei RT inkubiert und dann auf die Zellen getropft. Die Mengen unterscheiden sich je nach Größe des Zellkulturgefäßes (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18

	HBS	**$CaCl_2$**	**DNA**
24-Well-Platte (pro Well)	18 µl	1,1 µl	1,1 µg
12-Well-Platte (pro Well)	36 µl	2,1 µl	2,1 µg
35 mm-Schale	72 µl	4,3 µl	4,3µg
10 cm Schale	500 µl	30µl	30µg

2.2.1.4.2 Lipofectamine2000-Transfektion von Hek293 (siRNA)

Für den siRNA-vermittelten *Knock-down* von Picalm wurde Lipofectamine2000 verwendet. Dafür wurden die Hek293-Zellen an Tag 1 ausgesät (100.000 Zellen pro Well einer 12-Well-Platte), an Tag 2 transfiziert und 48 h später an Tag 4 lysiert. Für die Transfektion wurde zunächst pro Well (12-Well-Platte) 98 µl DMEM-Medium w/o und 2 µl Lipofectamine2000 in ein Tube gegeben. In ein anderes Tube wurde pro Well 3 µl von jeder der vier 10 µMolaren siRNAs gegeben (d.h. insgesamt 120 pmol pro Well) und mit Medium auf 100 µl aufgefüllt. Beides wurde dann für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde beides gemischt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Medium auf die Zellen getropft und durch Schwenken verteilt.

2.2.1.4.3 Lipofectamine2000-Transfektion von Hek293 für die Co-Immunopräzipitation

Um eine Co-Immunopräzipitation durchzuführen, wurden Hek293 in 10 cm Schalen (4 Millionen Zellen pro Schale) ausgesät und mittels Lipofectamine2000 transfiziert. Dafür wurden pro Schale 700 µl DMEM w/o und 30 µl Lipofectamine2000 gemischt. In ein zweites Tube wurden 35 µg DNA und 700 µl DMEM w/o gegeben und beides 5 min bei RT inkubiert. Dann wurde beides gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Mischung auf die Zellen getropft und durch Schwenken verteilt.

2.2.1.4.4 Transfektion von Neuro2A mittels SatisFection

Für die Transfektion von Neuro2A, wurde pro Well einer 12-Well-Platte 1 µl SatisFection in 50 µl DMEM w/o und 1,5 µg DNA ebenfalls in 50 µl DMEM w/o angesetzt, zusammengegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.
Für die Transfektion von Neuro2A in einer 6 cm Schale wurde entsprechend 9 µl SatisFection in 200 µl DMEM w/o und 6 µg DNA in 200 µl DMEM w/o angesetzt, zusammengegeben und inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf die Zellen getropft und durch Schwenken verteilt.

2.2.1.5 Zelllyse für SDS-PAGE/Westernblot und ELISA

Um mittels Westernblot oder ELISA in Zellen Proteine nachzuweisen, werden die Zellen lysiert. Zur Lyse von Hek293 und Neuro2A-Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Ca^{2+}/Mg^{2+} Solution (DPBS) gewaschen und danach für 2 bis 3 min mit 100 µl (12-Well-Platte) bzw. 250 µl (35 mm-Schälchen) BEX-Puffer inkubiert.
Zur Lyse von SH-SY5Y, die weniger dicht wachsen, wurde nur die Hälfte der oben genannten Mengen an BEX-Puffer verwendet, ansonsten wurde identisch vorgegangen.
Nach der Inkubation mit dem BEX-Puffer lässt sich die Zellmasse mit einem Zell-Scraper von der Platte kratzen und mit Hilfe einer Pipette in einen Tube geben. In dem Tube wurde das Lysat 15 x mit einem Kunststoffstößel zerkleinert. Dann wurden die Tubes 20 min bei 4°C mit 140.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in einen neuen Tube gegeben. Das Lysat (= Überstand) wurde dann verarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

2.2.2 Proteinmethoden

2.2.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA-Assay)

Soll mit Zelllysaten ein Westernblot durchgeführt werden, muss die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden, um identische Mengen Protein auf das SDS-Gel auftragen zu können. Dazu wurde in eine 96-Well-Platte zunächst eine Doppelreihe mit je 20 µl BSA-Proteinstandard mit definierter Proteinkonzentration gegeben (Konzentrationen: 0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 und 2 µg/ml). Auch von den zu untersuchenden Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Dazu wurden Proben von lysierten Zellen 1:5 mit BEX-Puffer verdünnt, sodass das Gesamtvolumen 20 µl betrug. Für die Messung einer 96-Well-Platte wurden dann Pierce®BCA Protein Assay Reagent A und Pierce®BCA Protein Assay Reagent B 50:1 gemischt und davon 200 µl in jedes Well gegeben. Danach wurde die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert.
Grundlage dieser Proteinkonzentrationsbestimmung ist die Tatsache, dass Proteine in einem alkalischen Milieu Cu^{2+} zu Cu^{+}- Ionen reduzieren. Zwei Bicinchoninsäure (BCA)-Moleküle reagieren mit einem solchen einwertigen Kupfer-Ion zu einem violetten Komplex, der sein Absorptionsmaximum bei 562 nm hat. So kann der Protein-Gehalt der Proben photometrisch bestimmt werden. Dazu wurde der EL-800 UV von Bio-Tek Instruments und die Software KCjunior Win verwendet.

2.2.2.2 SDS-PAGE

Die SDS-**P**oly**a**crylamid-**G**elel**e**ktrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Dafür wurde ein NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Midi Gel in eine Gelelektrophoresekammer eingespannt und der Zwischenraum der Gele vollständig, die restliche Kammer etwa zur Hälfte mit MOPS-Puffer gefüllt.
Die Proben wurden 1:4 mit NuPAGE ®LDS Sample Buffer (4x), 1:10 mit 10 x DTT (Dithiothreitol) sowie bei Bedarf mit Wasser zu einem 40 µl-Ansatz vermischt und für 10 min bei 70°C aufgekocht. Danach wurden die aufgekochten Proben mithilfe einer Spritze in die Geltaschen geladen.
Um später die Größe der Proteine zu erkennen, wurde neben den Proben ein Marker aus 6 µl Novex Sharp ® PreStained Protein Standard und 2 µl MagicMark™ XP Western Protein Standard auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte für 90 min bei 150 V.
Das zugefügte LDS verleiht allen Proben eine konstant negative Ladung, sodass die Proteine im Gel nach unten (in Richtung der positiven Elektrode) wandern. Da das Polyacrylamid-Gel als eine Art Sieb wirkt, kommen größere Proteine langsamer voran als kleine, sodass sich die Proteine in dem Gel nach ihrer Größe auftrennen. Das beigefügte DTT löst Disulfidbrücken auf, sodass die Auftrennung tatsächlich nur nach der Länge der Proteine und nicht nach ihrer Form erfolgt.

2.2.2.3 Westernblot

Der Western-Blot dient dazu, die bei der SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran zu übertragen. Dazu wurde die Membran für einige Minuten in Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit zwei Blotting-Filterpapieren in Transferpuffer eingelegt. In den SemiDryBlotter wurde erst ein Filterpapier, dann die Membran, das Gel und dann noch ein Filterpapier geschichtet. Vorhandene Luftblasen wurden mithilfe einer Kunststoffrolle aus dem Stapel gepresst. Der Gellauf erfolgte für 30 min bei 25 Volt.

2.2.2.4 Detektion von Proteinen auf der Blotting-Membran

Nach dem Blotten wurde die Membran in PBST gewaschen, um Reste des Methanols zu entfernen. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt („Blocken“), indem die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockingpuffer inkubiert wurde.

Der Primärantikörper gegen das Protein, das nachgewiesen werden sollte, wurde dann über Nacht bei 4°C auf die Membran gegeben. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min in PBST gewaschen, um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit einem HRP-getaggten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war, inkubiert. Es folgte ein nochmaliger Waschschritt (3 x 10 min in PBST), durch den ungebundener Sekundärantikörper entfernt wurde.
Zum Detektieren des gebundenen Sekundärantikörpers wurde HRP-Substrat (Luminata™Forte Western HRP Substrate) auf die Membran gegeben. Die HRP katalysiert eine Reaktion, die mit dem Aussenden von Licht einhergeht. Dieses Licht kann von der CCD-Kamera (LAS1000 Intelligent Dark Box von FujiFilm) detektiert und so das gesuchte Protein nachgewiesen werden. Um ein zweites Protein detektieren zu können, wurde die Membran 30 min bei 37°C mit Strippingpuffer inkubiert, danach wieder für eine Stunde bei RT geblockt und die folgenden Schritte wie oben beschrieben wiederholt.

2.2.2.5 Immunzytochemie (ICC)

Die Immunzytochemie (ICC) dient dazu, die Lokalisation von Proteinen in Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen. Dafür wurde zunächst je ein Deckgläschen in ein Well einer 24-Well-Platte gegeben und für mindestens 30 min bei 37°C mit 300 µl PLL überschichtet, um den Zellen später besseren Halt zu bieten.
Dann wurde in jedes Well die gewünschte Anzahl Zellen ausgesät (SY5Y: 100.000 Zellen, Hek293-Zellen: 70.000 Zellen, N2A: 40.000 Zellen, primäre Neurone: 40.000 Zellen) und bei Bedarf am nächsten Tag transfiziert. 24 h nach der Transfektion, bzw. 48 h nach dem Aussähen wurde das Medium abgenommen und die Zellen dreimal mit 300 µl DPBS gewaschen und für 90 sec geschwenkt. Nach dem dritten Waschen wurden jedes Well mit 300 µl Fixierungspuffer überschichtet und für 10 min in einem Rotationsschüttler inkubiert. Dieser Schritt fixiert die Zellen auf den Deckgläschen. Danach folgte dreimaliges Waschen wie beschrieben.
Dann wurde jedes Well mit 300 µl Permeabilisierungspuffer überschichtet und für 15 min in einem Rotationsschüttler inkubiert. Dadurch wird die Zellmembran durchlässig für die Antikörper. Dann wurden die Zellen wieder wie oben beschrieben gewaschen.

Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mittels 300 µl Immunoblock pro Well geblockt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde im Rotationsschüttler.
Danach wurde der Immunoblock abgenommen und 200 µl des gewünschten Primärantikörpers auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut gewaschen. Dann wurde der fluoreszierende Sekundärantikörper (200 µl pro Well) auf die Zellen gegeben.
Da die Sekundärantikörper lichtempfindlich sind, muss ab diesem Schritt eine direkte Lichteinstrahlung auf die Zellen immer vermieden werden.
Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1h bei RT. Danach wurden die Zellen wieder gewaschen. Auf ein zuvor mit Ethanol gereinigtes Deckgläschen wurde dann ein Tropfen Mowiol gegeben. Das im Mowiol enthaltene DAPI dient dazu, den Kern anzufärben, während das Mowiol die Deckgläschen auf dem Objektträger zu fixieren. Die Deckgläschen wurden mit einer Pinzette aus den Wells gehoben und mit der Zellseite nach unten auf das Mowiol gegeben. Die Objektträger mussten dann im Dunkeln für 72 h trocknen. Vor dem Mikroskopieren wurde überschüssiges Mowiol mit Ethanol entfernt. Die anschließende Fluoreszenzmikroskopie erfolgte am Axiovert 200-Mikroskop, die Fotos wurden mithilfe der Software Axio Vision 40 (Version 4.8) aufgenommen.

2.2.2.6 Amyloid β - und sAPP - Assays

Um die Menge von Aβ, sAPPα und sAPPβ im Mediumüberstand von Zellen zu bestimmen, wurden Immunoassay-Kits von Meso Scale Discovery verwendet (sAPPα/β-Kit, Kat.nr.: K15120E-2 bzw. Aβ Triplex Assay, Kat.nr.: K15148E-1). Der für die Messung verwendete Mediumüberstand wurde zuvor von den Zellen abgenommen und bei -20 °C eingefroren, während die Zellen lysiert wurden, um im Westernblot die korrekte Expression der transfizierten Konstrukte zu überprüfen. Die Durchführung der Immunoassays ist in den unten stehenden Tabellen beschrieben. Tabelle 19 zeigt die Arbeitsschritte und Tabelle 20 das Ansetzen der Proteinstandards. Zum Ablesen der Platten wurde der Sector Imager 2400 von Meso Scale Discovery, sowie die zugehörige Software Discovery Workbench 4.0 verwendet.

Tabelle 19

sAPPα/β Assay	Aβ Triplex Assay
1. Ansetzen von Puffern und Standard	**1. Ansetzen von Puffern und Standard**
Waschpuffer (den 10-fach Waschpuffer 1:10 verdünnen), Blockingpuffer (20 ml Waschpuffer und 600 mg Blocker A Pulver pro Platte), Standard (siehe Tabelle unten), Antikörperpuffer (2 ml Waschpuffer und 1 ml Blockingpuffer pro Platte), Antikörperlösung (60 µl 50 x SULFO-TAG anti-APP Antikörper und 2,94 ml kalter Antikörperpuffer pro Platte) und Read-Buffer (den 4-fach Read-Buffer 1:4 verdünnen)	Waschpuffer (den 10-fach Waschpuffer 1:10 verdünnen), Blockingpuffer (50 ml Waschpuffer und 500 mg Blocker A Pulver pro Platte), Standard (siehe Tabelle unten), Antikörperlösung (60 µl 50 x SULFO-TAG 6E10 Antikörper, 30 µl 100 x Blocker G und 2,91 ml Blockingpuffer pro Platte) und Read-Buffer (den 4-fach Read-Buffer 1:2 verdünnen)
2. Blocken	**2. Blocken**
150µl Blockingpuffer/Well, für 1h bei RT schüttelnd inkubieren, dann 3 mal waschen mit je 300 µl Waschpuffer/Well	150µl Blockingpuffer/Well, für 1h bei RT schüttelnd inkubieren, dann 4 mal waschen mit je 150 µl Waschpuffer/Well
3. Probe / Standard hinzufügen	**3. Probe / Standard und Antikörper hinzufügen**
Pro Well 25 µl Probe bzw. Standard, für 1 h bei RT schüttelnd inkubieren, dann 3 mal waschen mit je 300 µl Waschpuffer/Well	Pro Well 25 µl Antikörperlösung und 25 µl Probe bzw. Standard, für 2 h bei RT schüttelnd inkubieren, dann 4 mal waschen mit je 150 µl Waschpuffer/Well
4. Schritt: Antikörper hinzufügen	
Pro Well 25 µl Antikörperlösung, für 1 h bei RT schüttelnd inkubieren, dann 3 mal waschen	
5. Schritt: Platte ablesen	**4. Schritt: Platte ablesen**
Pro Well 150 µl Read-Buffer hinzufügen, für 10 min bei RT inkubieren, dann ablesen	Pro Well 150 µl Read-Buffer hinzufügen, dann sofort ablesen

Tabelle 20

sAPPα/β Assay - Standard	Aβ Triplex Assay - Standard
1. Herstellen der höchsten Konzentration des Standards	**1. Vorbereitung und Herstellen der höchsten Konzentration des Standards:**
Je 6 µl der mitgelieferten sAPPα bzw. β - Lösungen (50 µg/ml) mit 288 µl DMSO w/o + HEPES-Puffer (pH 7,3; Konz.: 50 mM) mischen.	20 µl der Aβ 1-38 und Aβ 1-40 Stocks mit 180 µl Blockingpuffer mischen. 22,5 µl vorverdünntem Aβ 1-38 Stock, 50 µl vorverdünntem Aβ 1-40 Stock und 15 µl des mitgelieferten Aβ 1-42 Stock und 212,5 µl Blockingpuffer (pro Platte) mischen.
2. Herstellen der Verdünnungsreihe	**2. Herstellen der Verdünnungsreihe**
100 µl der höchsten Konzentrationsstufe mit 216 µl DMSO + HEPES (s.o.) mischen. Diesen Schritt 9 Mal wiederholen, so dass 11 Verdünnungen entstehen. DMSO w/o + HEPES dient zur Nullkalibrierung, so dass die Verdünnungsreihe insgesamt 12 Stufen aufweist.	100 µl der höchsten Konzentrationsstufe mit 200 µl Blockingpuffer mischen. Diesen Schritt 5 Mal wiederholen, so dass 7 Verdünnungen entstehen. Blockingpuffer dient zur Nullkalibrierung, so dass die Verdünnungsreihe insgesamt 8 Stufen aufweist.

2.2.2.7 Co-Immunopräzipitation

Eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) dient dazu, Bindungen zwischen Proteinen nachzuweisen. Hek293-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.1.4.3 beschrieben mit GFP-Picalm + APP/BACE1 transfiziert und 24h später lysiert. Dazu wurde - wie im Protokoll des µMACS GFP Isolation Kit angegeben - das Medium entfernt, die Zellen auf Eis dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann mit 1 ml gekühltem Lysepuffer (im Kit enthalten) überschichtet. Dann wurden die Zellen mittels eines Zellscrapers abgelöst, mit einer Pipette in ein 1,5 ml Tube transferiert, gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben 10 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert, um Zellüberreste zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein frisches Tube gegeben. Mit einem Teil dieses Rohlysats wurde im Westernblot die korrekte Expression überprüft. Für die eigentliche Co-IP wurde 1 ml des Überstandes mit 50 µl der anti-GFP Microbeads (ebenfalls aus oben genanntem Kit) versetzt und für 1 h auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden die µColumns in den µMACS™ Seperator (einem starken Magneten) plaziert und mit 200 µl Lysepuffer equilibriert. Dann wurde die Lysat/Microbeats-Mischung auf die Säulen gegeben. Dabei wird magnetisch gelabeltes Protein in der Säule zurückgehalten.

Die Säulen werden dann viermal mit je 200 µl Waschpuffer 1 (aus dem Kit) und einmal mit Waschpuffer 2 (ebenfalls aus dem Kit) gewaschen. Die gelabelten Proteine wurden mit 1x LDS/DTT in H_2O eluiert. Dazu wurden 20 µl dieses Puffers auf die Säule gegeben und für 5 min inkubiert, um vorhandene Waschpufferreste zu entfernen. Dann wurde 50 µl des erhitzen Puffers auf die Säule gegeben und in einem frischen Tube aufgefangen. Die so erhaltenen Proben konnten dann im Westernblot analysiert werden.

2.2.3 DNA-Methoden

2.2.3.1 Mini-Präp

Mini-Präps dienen dazu, größere Mengen eines positiven Bakterienklones anzuzüchten und Glycerolstocks anzulegen. Dafür wurden 5 ml LB-Medium mit dem Antibiotikum, gegen das der gewünschte Bakterienklon resistent ist, in einen Kolben gegeben (Kanamycin-Konzentration: 25µg/ml; Ampicillin-Konzentration: 100µg/ml).
Dann wurde mit einem Zahnstocher Bakterienkolonien aufgenommen und hinzugefügt. Die Kolben wurden luftdurchlässig abgedeckt und bei 37°C mit 200 rpm über Nacht inkubiert, um die Bakterien zu vermehren. Zum Anlegen eines Glycerolstocks wurden 0,5 ml der Mini-Präp-Flüssigkeit mit 0,5 ml Glycerol 50 % in ein Cryo-Tube gegeben und bei –80°C gelagert. Zum Aufreinigen der DNA wurde das PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit von Invitrogen verwendet, dabei wurden immer die Angaben des Herstellers befolgt.

2.2.3.2 Maxi-Präp

Maxi-Präps dienen dazu, größere Mengen eines positiven Bakterienklones anzuzüchten, um dann durch Aufreinigung genügend DNA für die Transfektion von Zellen zu gewinnen. Dafür wurden 200 ml LB-Medium mit dem Antibiotikum, gegen das der gewünschte Bakterienklon resistent ist, in einen Kolben gegeben (Kanamycin-Konzentration: 25µg/ml; Ampicillin-Konzentration: 100µg/ml). Dann wurde mit einem Zahnstocher etwas Material aus einem Glycerolstocks aufgenommen und hinzugefügt. Die Kolben wurden luftdurchlässig abgedeckt und bei 37°C mit 200 rpm über Nacht inkubiert, um die Bakterien zu vermehren.
Zum Aufreinigen der DNA wurde das PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit von Invitrogen verwendet, dabei wurden immer die Angaben des Herstellers befolgt.

3 Ergebnisse

3.1 Die endogene Expression und zelluläre Lokalisation von Picalm

3.1.1 Endogenes Picalm liegt in Hek293-, N2A-, SH-SY5Y-Zellen und murinen embryonalen Astrozyten und Neuronen punktförmig im Zytoplasma verteilt vor

Um die Eignung verschiedener Zelltypen für die geplanten Experimente festzustellen und dann die intrazelluläre Lokaliation von Picalm zu untersuchen, wurden zunächst die endogenen Picalm-Expressionslevel in Hek293-, Neuro2A- und SH-SY5Y- Zellen, sowie in murinen embryonalen Neuronen und Astrozyten mittels Westernblot bestimmt. In Abbildung 8 A bis E sind immunzytochemische Färbungen von endogenem Picalm in diesen Zelltypen zu sehen. Als Primärantikörper wurde für diese Färbungen ein goat-anti-CALM Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) verwendet und als Sekundärantikörper ein fluoreszierender donkey-anti goat Alexa 488 Antikörper von Invitrogen. Abbildung 8 F zeigt im Westernblot die endogenen Expressionslevel in Lysaten der oben genannten Zelltypen. Es ist zu erkennen, dass Picalm in allen untersuchten Zelltypen exprimiert wird, besonders gut in Hek293-Zellen, aber auch in murinen embryonalen Neuronen sowie in Neuro2A-Zellen. Die genannten Zelllinien wurden für diese Färbungen aufgrund ihrer einander ergänzenden Charakteristika verwendet: Hek293, Neuro2A und SH-SY5Y stammen von malignen Tumoren ab, so dass sie sich rasch teilen und relativ einfach zu kultivieren sind. Bei Hek293 und SH-SY5Y handelt es sich zudem um humane Zellen. Die embryonalen Neurone bzw. Astrozyten sind als primäre Zellen zwar aufwendiger zu kultivieren und haben keinen humanen Ursprung, jedoch sind sie ein brauchbares Modell für die entsprechenden humanen Zellen, da sie ihren Ursprung in gesundem Gewebe haben. In den immunzytochemischen Färbungen (Abb. 8 A - E) ist zu sehen, dass Picalm in allen Zelltypen punktförmig im Zytoplasma verteilt vorliegt.

3.1.2 Endogenes Picalm ist in Hek293-Zellen im Bereich der *Early Endosomes* lokalisiert

Um zu bestimmen, in welchem Zellkompartiment Picalm lokalisiert ist, habe ich – wegen der in der Literatur beschriebenen Funktion von Picalm in der Clathrin-vermittelten Endozytose (Meyerholz et al. 2005, Tebar et al. 1999) – in Hek293-Zellen sowohl Picalm (Abb. 9 A - C) als auch Early Endosomes (Abb. 9 A), Late Endosomes (Abb. 9 B) und den Golgi-Apparat (Abb. 9 C) angefärbt.

Hek293-Zellen wurden hier verwendet, da es sich um eine sich rasch teilende humane Zelllinie mit einer gewissen Ähnlichkeit zu embryonalen Neuronen handelt (Shaw et al. 2002). In Abbildung 9 A ist zu erkennen, dass Picalm wohl im Bereich der *Early Endosomes* lokalisiert ist, was gut zu der in der Literatur beschriebenen Schlüsselrolle von Picalm bei der Clathrin-vermittelten Endozytose passt.

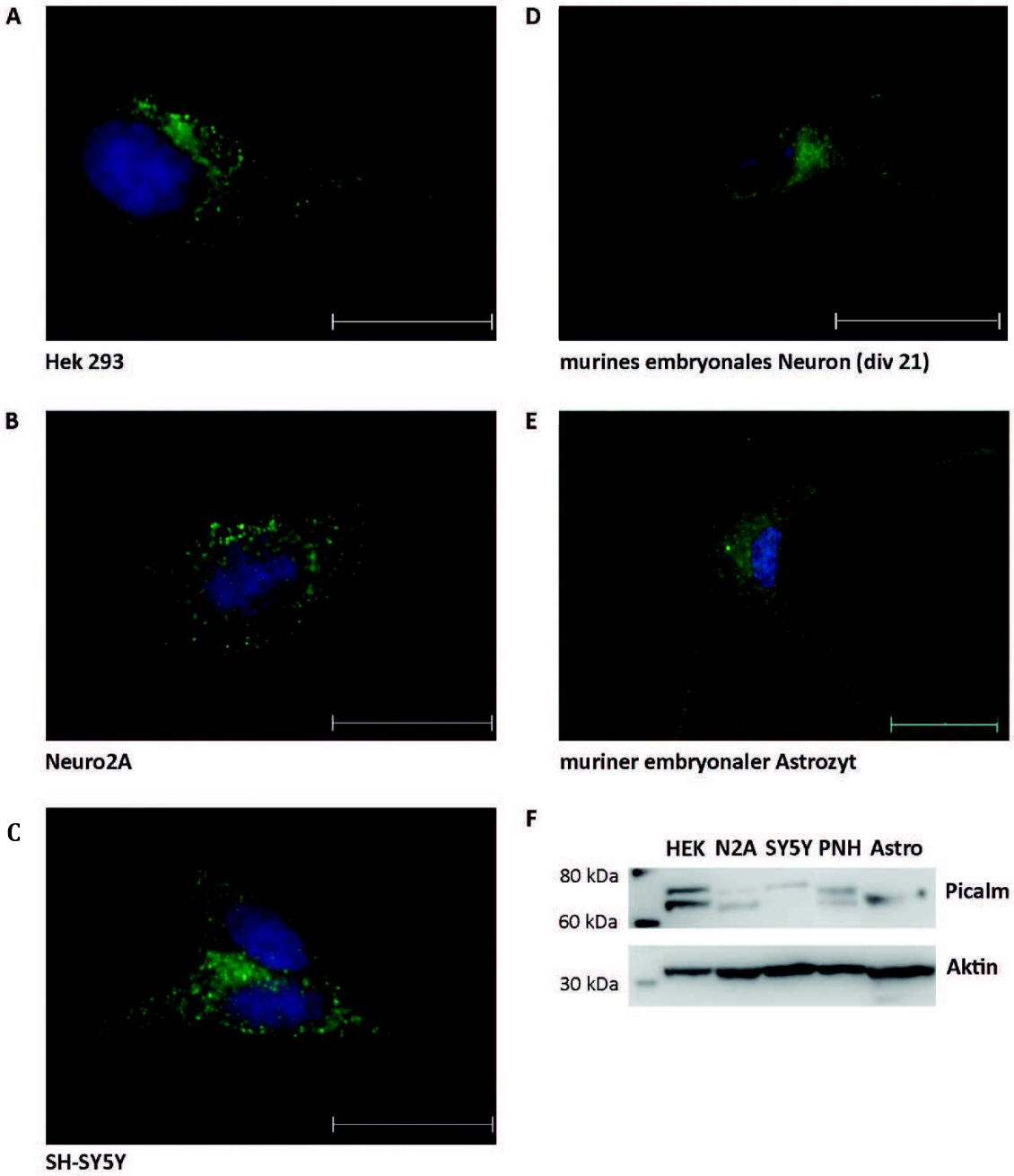

Abbildung 8: Endogenes Picalm liegt punktförmig verteilt im Zytoplasma vor. Grün: endogenes Picalm, Primärantikörper: anti-CALM (Santa Cruz), Sekundärantikörper: donkey anti-goat Alexa 488 (Invitrogen); Blau: DAPI. **A-D** Vergrößerung: 100-fach. **E** Vergrößerung: 63-fach. Die Balken entsprechen 5µm. **F** Westernblot der Zelllysate von Hek293, Neuro2A, SH-SY5Y, primären murinen Hippocampusneuronen (PNH; div 21) und Astrozyten (Astro), Primärantikörper: goat anti-CALM (Santa Cruz), mouse anti-Aktin (Sigma-Aldrich), Sekundärantikörper (Invitrogen): rabbit anti-goat HRP, goat anti-mouse HRP. Mikroskop: AxioVision40 (4.8).

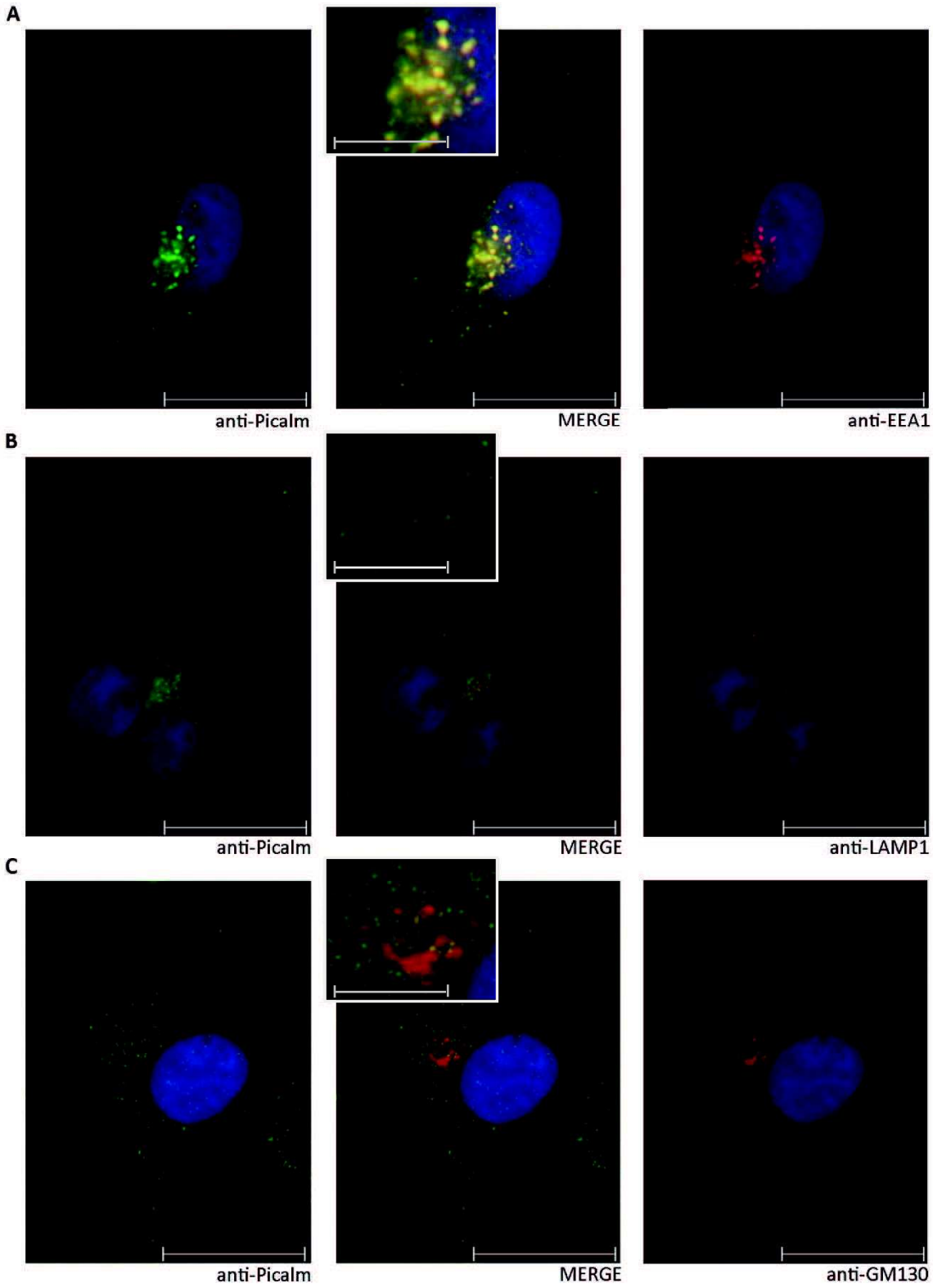

Abbildung 9: Endogenes Picalm ist im Bereich der *Early Endosomes* lokalisiert. Grün: endogenes Picalm (Primärantikörper: goat anti-CALM (Santa Cruz), Sekundärantikörper: donkey anti-goat Alexa 488); Blau: DAPI. Kleinere Vergrößerung: 100-fach (hier entspricht ein Balken 5µm). Größere Vergrößerung: 400-fach (hier entspricht ein Balken 1 µm). **A** Rot: *Early Endosomes* (Primärantikörper: rabbit anti-EEA1 (Cell Signaling), Sekundärantikörper: goat anti-rabbit Alexa 647); Gelb: Kolokalisation. **B** Rot: Lysosomen (Primärantikörper: rat anti-LAMP1 (Santa Cruz), Sekundärantikörper: goat anti-rat Alexa 546) **C** Rot: Golgi-Apparat (Primärantikörper: mouse anti-GM130 (BD Bioscience), Sekundärantikörper: donkey anti-mouse Alexa 647); Alle Sekundärantikörper von Invitrogen. Mikroskop: Axio Vision 40 (4.8).

3.2 Beeinflusst Picalm die APP-Prozessierung?

3.2.1 Die Überexpression von Picalm in Hek293-Zellen ist mit einer erhöhten Sekretion von sAPPα und sAPPβ assoziiert

Picalm ist ein mögliches Alzheimer-Risikogen und SNPs im Picalm-Gen korrelieren mit veränderten Mengen von Aβ im Liquor untersuchter Personen (Hardy et al. 2009, Schjeide et al. 2011). Daher kann spekuliert werden, dass Picalm die physiologischen Prozesse der Prozessierung von APP und damit das Entstehen der APP-Spaltprodukte in der Zelle beeinflusst.

Um den Effekt von Picalm auf die APP-Prozessierung zu untersuchen, habe ich Picalm in Hek293,- bzw. Neuro2A- Zellen überexprimiert. Im Medium der lysierten Zellen habe ich dann die Menge von sAPPs und Amyloid β mittels Immunoassays von MesoScale Discovery gemessen, um zu untersuchen, ob Veränderungen in der Expression von Picalm mit Veränderungen der Menge von APP-Spaltprodukten einhergehen.

Um den Einfluss von erhöhten Picalm-Expression auf die Sekretion von sAPPα und β zu untersuchen, habe ich GFP-Picalm in Hek293-Zellen transient und stabil überexprimiert. Dann wurde der Mediumüberstand der Zellen abgenommen und die Zellen lysiert. Aus den Zelllysaten wurden dann Westernblots angefertigt. In Abbildung 10 C sind diese Expressions-Westernblots gezeigt. Hier ist zu sehen, dass GFP-Picalm sowohl in den transient als auch in den stabil transfizierten Zellen in vergleichbarem Maß exprimiert wird. Als Kontrolle dient bei den transient transfizierten Zellen ein GFP-Leervektor und bei den stabil transfizierten Zellen GFP-mRFP, wobei der GFP-Leervektor hier die stärkere Expression aufweist.

Aus dem Mediumüberstand der Zellen wurde dann mittels eines Immunoassays von Meso Scale Discovery die Menge von sAPPα und sAPPβ gemessen. In Abbildung 10 A ist zu sehen, dass es im Medium der Picalm-überexprimierenden Zellen, im Vergleich zu den Kontrollen, zu einer deutlichen Steigerung der Menge von sAPPα kommt. Der gleiche Trend kann in Abbildung 10 B in Bezug auf sAPPβ beobachtet werden, auch hier ist die Überexpression von Picalm mit einer erhöhten Menge von sAPPβ im Mediumüberstand assoziiert.

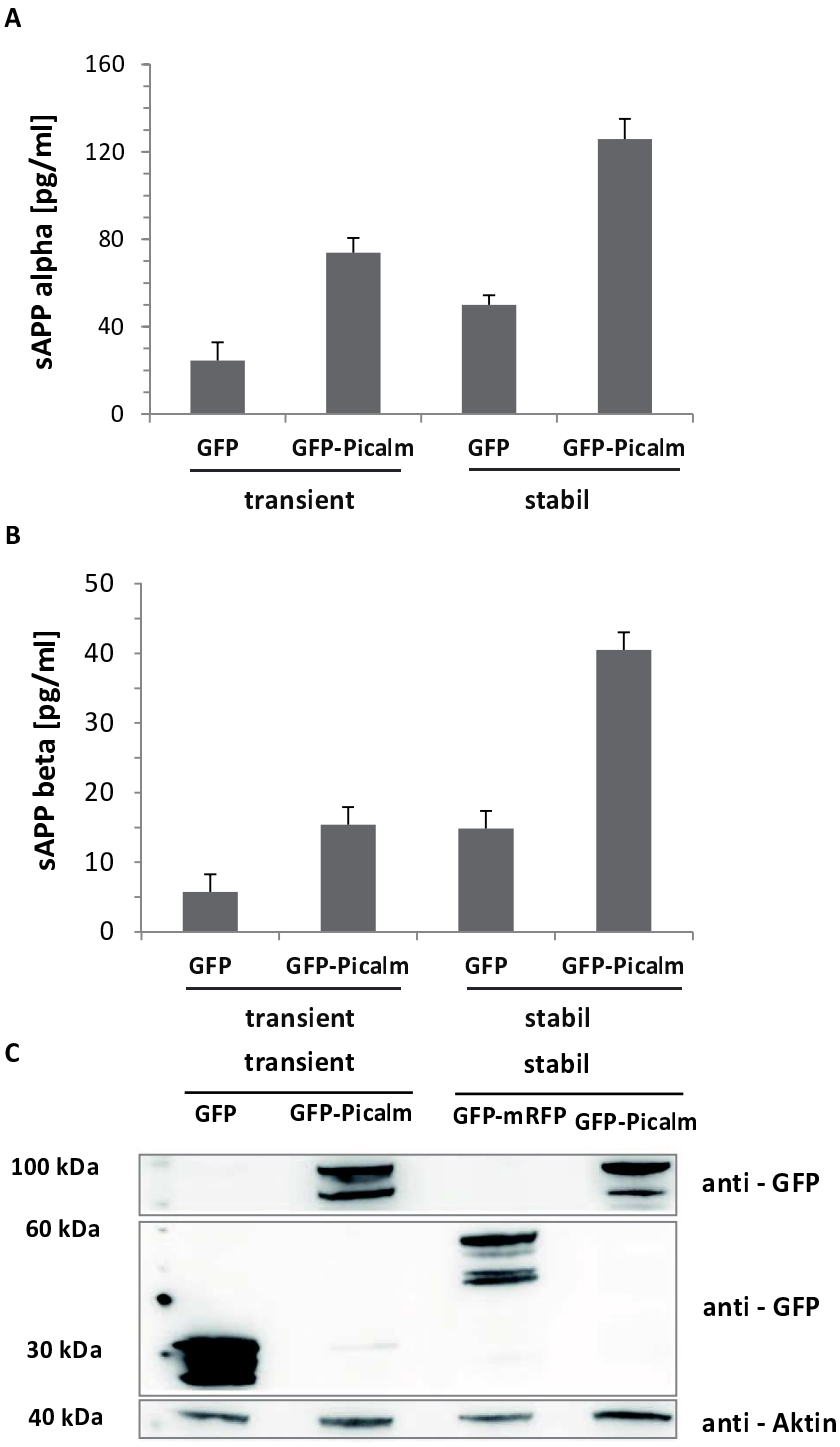

Abbildung 10: **Die Überexpression von Picalm ist mit erhöhten Leveln von sAPPα und sAPPβ im Mediumüberstand von Hek293-Zellen assoziiert**. Von Hek293-Zellen, die mit GFP-Picalm bzw. GFP-Leervektor transfiziert wurden, wurde nach 24h das Medium abgenommen und die Zellen lysiert. Die Menge an sAPPs im Medium wurde mittels eines Immunoassays (MesoScale Discovery) bestimmt.
A Level von sAPPα im Medium von Hek293-Zellen mit GFP-Picalm bzw. Kontrolle (GFP). **B** Level von sAPPβ im Medium von Hek293-Zellen mit GFP-Picalm bzw. Kontrolle (GFP). **C** Westernblot der Zelllysate. Primärantikörper (beide Sigma-Aldrich): rabbit anti-GFP und mouse anti-Aktin. Sekundärantikörper (beide Invitrogen): goat anti-mouse IgG HRP und goat anti-rabbit IgG HRP. Die Fehlerbalken zeigen die Standartabweichung an. Der Assay wurde zweimal durchgeführt mit je 4 Ansätzen pro Bedingung. Jede Probe wurde doppelt bestimmt.

3.2.2 Die Herunterregulation der Expression von Picalm in Hek293-Zellen ist mit einer verminderten Sekretion von sAPPβ assoziiert

Wie oben beschrieben, ist die Überexpression von GFP-Picalm in Hek293-Zellen mit einer vermehrten Sekretion von sAPPα und sAPPβ assoziiert. Um den Einfluss von Picalm auf die APP-Prozessierung genauer zu verstehen, habe ich im nächsten Schritt untersucht, ob im Gegensatz zur Überexpression der *Knock-down* von Picalm auch mit einer verminderten Sekretion der sAPPs assoziiert ist.

Um die Expression von endogenem Picalm in Hek-Zellen herunter regulieren zu können, habe ich zunächst die Funktion der Picalm-siRNA (Quiagen) überprüft (siehe Abb. 11).

In Abbildung 11 A ist eine exemplarische Färbung von endogenem Picalm in einer Hek293-Zelle zu sehen. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 11 B eine exemplarische Picalm-Färbung in einer Hek293-Zelle nach der Behandlung mit Picalm-siRNA zu sehen. Es ist zu erkennen, dass die siRNA zu einer Abnahme der Intensität der Picalm-Färbung führt, was darauf schließen lässt, dass in der behandelten Zelle, wie zu erwarten, weniger Picalm exprimiert wird.

Um diese Abnahme der Picalmexpression semiquantitativ zu erfassen, ist in Abbildung 11 C ein Westernblot aus lysierten Hek293-Zellen gezeigt, die mit zunehmenden Konzentrationen von Picalm-siRNA behandelt wurden. Die optische Dichte der Westernblot-Banden ist in dem Balken-Diagramm in Abbildung 11 D zu sehen, wobei eine deutliche Abnahme der Intensität der Banden zu erkennen ist. Mithilfe der verwendeten siRNA kann also eine gute Herunterregulation der Picalm-Expression in Hek293-Zellen erreicht werden.

Um den Einfluss der verminderten Picalm-Expression auf die sAPP-Sekretion zu untersuchen, habe ich die Menge der sAPPs im Medium von mit Picalm-siRNA behandelten Hek293-Zellen mittels eines Immunoassays von Mesoscale Discovery gemessen (Expressionswesternblot siehe Abb. 12 C). In Abbildung 12 A ist zu sehen, dass die verminderte Picalm-Expression zu keiner Änderung der Menge von sAPPα im Medium der Zellen führt. In Abbildung 12 B ist zu sehen, dass die verminderte Picalm-Expression zumindest im Trend zu einer Reduktion der Menge von sekretiertem sAPPβ führt, auch wenn hier, da der Assay nur einmal durchgeführt werden konnte, nicht von einer Signifikanz zu sprechen ist.

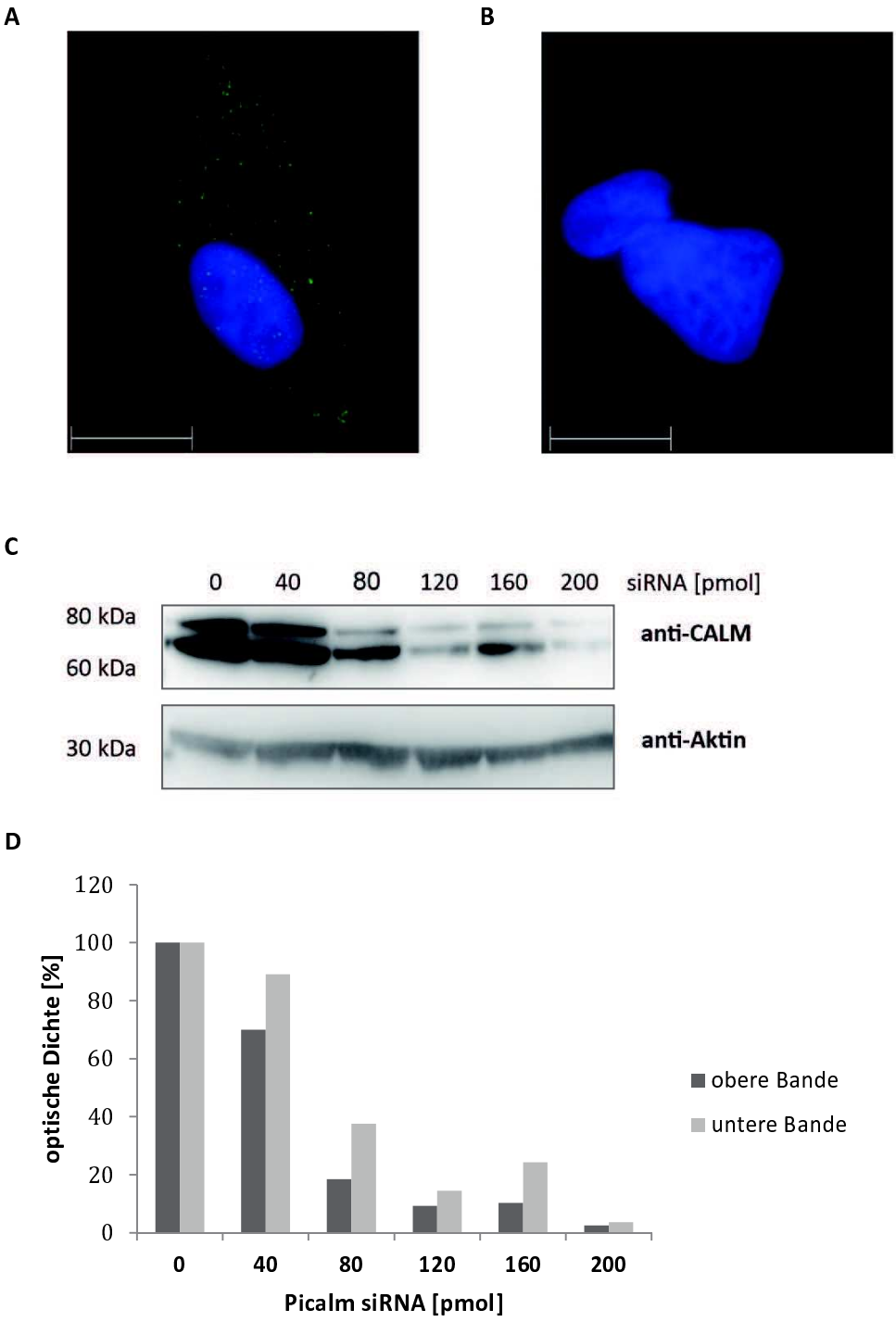

Abbildung 11: ***Knock-down*** **von Picalm mittels siRNA** Immunozytochemie in Hek293-Zellen, 100-fache Vergrößerung; Der weiße Strich entspricht 5µm. Grün: endogenes Picalm, Primärantikörper: goat anti-CALM (Santa Cruz), Sekundärantikörper: donkey anti-goat Alexa 488 (Invitrogen), 1sec belichtet; Blau: DAPI, 10 msec belichtet. **A** Färbung von endogenem Picalm in Hek293-Zellen. **B** Färbung von endogenem Picalm 48h nach der Transfektion mit 100 pmol siRNA. **C** Westernblot aus Hek293-Lysaten nach Transfektion mit aufsteigenden Mengen siRNA. Primärantikörper: goat anti-CALM (Santa Cruz), Sekundärantikörper: rabbit anti-goat IgG HRP (Invitrogen). **D** Optische Dichte der Picalm-Banden aus dem Westernblot in C (gemessen mit Photoshop). Ab 80 pmol siRNA ist ein deutlicher Picalm-*Knock-down* zu detektieren.

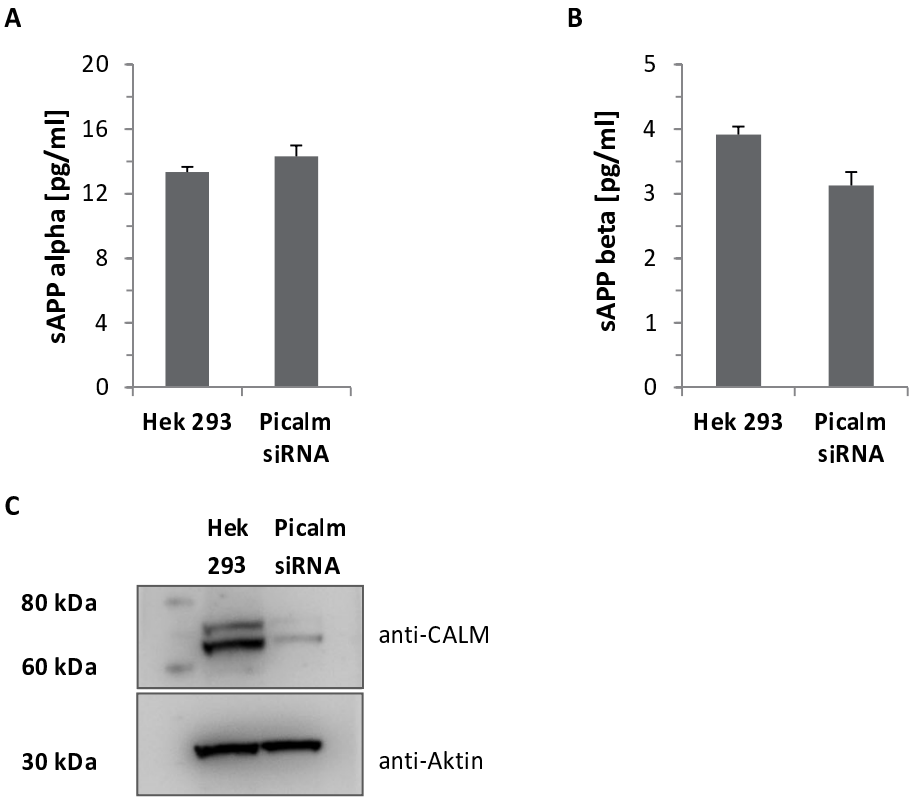

Abbildung 12: Eine verminderte Expression von Picalm ist mit tendenziell geringeren Leveln von sAPPβ im Mediumüberstand von Hek293-Zellen assoziiert. Hek293-Zellen wurden mit Picalm siRNA (Quiagen) transfiziert. Nach 48h wurde das Medium abgenommen und die Menge von sAPPα/β im Medium mittels eines Immunoassays (Mesoscale Discovery) bestimmt. **A** Die Level von sAPPα im Mediumüberstand von Hek293-Zellen mit und ohne Picalm siRNA. Es ist kein Unterschied erkennbar. **B** Die Level von sAPPβ im Mediumüberstand von Hek293-Zellen mit und ohne Picalm siRNA. Die Level von sAPPβ sind in den Zellen mit siRNA tendenziell reduziert. **C** Westernblot der Zelllysate. Primärantikörper: goat anti-CALM (Santa Cruz) und mouse anti-Aktin (Sigma-Aldrich). Sekundärantikörper: rabbit anti-goat IgG HRP und goat anti-mouse IgG HRP (beides Invitrogen). Die Fehlerbalken zeigen die Standartabweichung an. Der ELISA wurde einmal durchgeführt mit je 3 Ansätzen pro Bedingung. Jede Probe wurde doppelt bestimmt.

3.2.3 Die Überexpression von Picalm in Neuro2A-Zellen ist mit einer erhöhten Sekretion von Amyloid β assoziiert

Als nächstes habe ich den Einfluss von Picalm auf die Aβ - Sekretion untersucht. In den zuvor verwendeten Hek293-Zellen liegt die Menge des endogenen Aβ unterhalb des Detektionslimits des ELISAs. In diesen Versuch habe ich daher murine Neuro2A-Zellen verwendet. Da mit den ELISAs nur humanes Aβ gemessen wird, interferieren die endogenen APP-Level der Zelle nicht mit den Messungen. In den Neuro2A-Zellen wurde dann humanes APP695 und dann BACE1 überexprimiert. Als Picalm-Konstrukt wurde wieder GFP-Picalm verwendet. In Abbildung 13 A, B und C ist zu sehen, dass es im Medium der Picalm-überexprimierenden Zellen, im Vergleich zu den Kontrollen, zu einer signifikanten Steigerung der Menge von Amyloid β 42, 40 und 38 kommt.

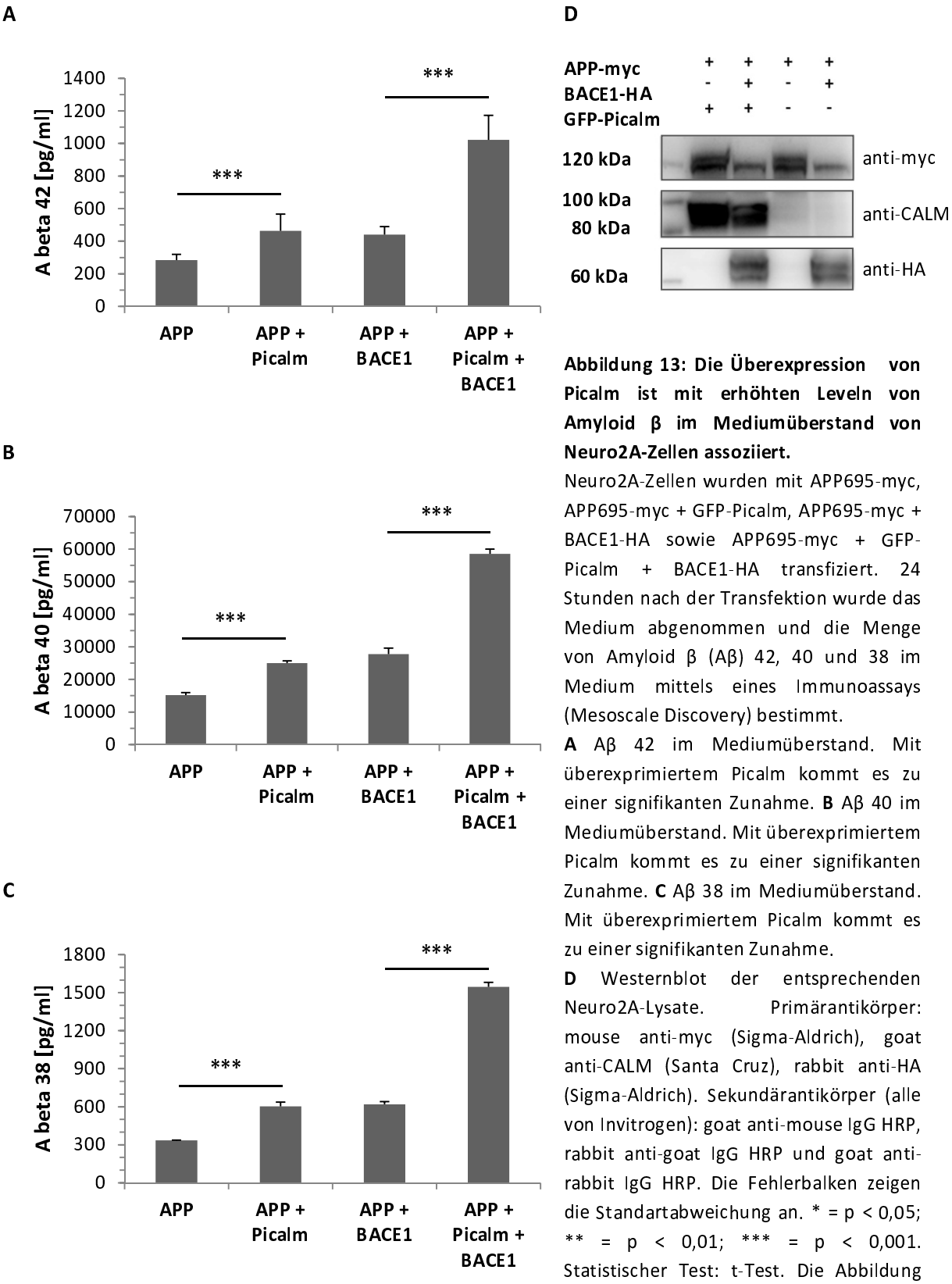

Abbildung 13: Die Überexpression von Picalm ist mit erhöhten Leveln von Amyloid β im Mediumüberstand von Neuro2A-Zellen assoziiert.

Neuro2A-Zellen wurden mit APP695-myc, APP695-myc + GFP-Picalm, APP695-myc + BACE1-HA sowie APP695-myc + GFP-Picalm + BACE1-HA transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen und die Menge von Amyloid β (Aβ) 42, 40 und 38 im Medium mittels eines Immunoassays (Mesoscale Discovery) bestimmt.

A Aβ 42 im Mediumüberstand. Mit überexprimiertem Picalm kommt es zu einer signifikanten Zunahme. **B** Aβ 40 im Mediumüberstand. Mit überexprimiertem Picalm kommt es zu einer signifikanten Zunahme. **C** Aβ 38 im Mediumüberstand. Mit überexprimiertem Picalm kommt es zu einer signifikanten Zunahme.

D Westernblot der entsprechenden Neuro2A-Lysate. Primärantikörper: mouse anti-myc (Sigma-Aldrich), goat anti-CALM (Santa Cruz), rabbit anti-HA (Sigma-Aldrich). Sekundärantikörper (alle von Invitrogen): goat anti-mouse IgG HRP, rabbit anti-goat IgG HRP und goat anti-rabbit IgG HRP. Die Fehlerbalken zeigen die Standartabweichung an. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Statistischer Test: t-Test. Die Abbildung zeigt exemplarisch einen von drei durchgeführten Assays. Pro Bedingung 4 Ansätze. Jede Probe wurde doppelt bestimmt.

3.3 Gibt es eine direkte Interaktion von Picalm und APP?

3.3.1 Picalm und APP lokalisieren im perinukleären Bereich

Um zu klären, ob der beobachtete Effekt von Picalm auf die Sekretion von Amyloid und sAPPs nicht auch durch eine direkte Interaktion von Picalm mit APP zustande kommen könnte, habe ich zunächst untersucht, ob Picalm grundsätzlich ein direkter Interaktionspartner von APP sein könnte. Dazu habe ich mittels ICC untersucht, ob Picalm und APP in Hek293-Zellen im gleichen zellulären Kompartiment vorkommen.
In Abbildung 14 B ist zu sehen, dass sich die Signale von APP und Picalm überlagern, d.h. beide Proteine könnten gemeinsam in den zu erkennenden Vesikeln vorkommen. Allerdings bedeutet eine Überlagerung der Signale im Fluoreszenzmikroskop noch nicht, dass beide Proteine auch tatsächlich miteinander interagieren.

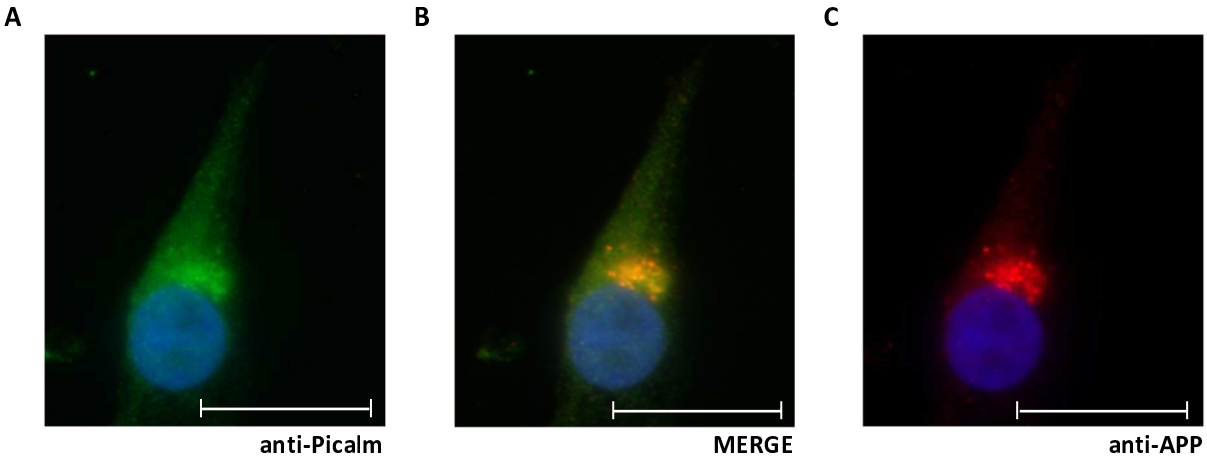

Abbildung 14: Die intrazelluläre Lokalisation von endogenem Picalm und APP in Hek293 - Zellen
Picalm und APP wurden mittels ICC angefärbt. Grün: endogenes Picalm (Primärantikörper: anti-CALM von Santa Cruz, Sekundärantikörper: donkey anti-goat IgG Alexa 488 von Invitrogen); Rot: endogenes APP (Primärantikörper: anti-APP(6E10) von Sigma-Aldrich, Sekundärantikörper: donkey anti-mouse IgG Alexa 647 von Invitrogen); Blau: DAPI. Vergrößerung: 100-fach. Die Balken entsprechen 5 µm. **A** Grün angefärbt ist endogenes Picalm zu sehen. **C** Rot angefärbt ist endogenes APP zu sehen. **B** Die Überlagerung des grünen und roten Signals und damit der Ort einer möglichen Kolokalisation zeigt sich gelb.

3.3.2 Die Co-Immunopräzipitation zeigt keine direkte Interaktion von Picalm und APP

Um zu testen, ob Picalm und APP direkt miteinander interagieren, habe ich eine Co-Immunopräzipitation aus Hek293-Zelllysaten durchgeführt.

In den Hek293-Zellen wurde einmal nur GFP-Picalm, dann GFP-Picalm und APP-myc sowie GFP-Picalm und BACE1-HA exprimiert. Die korrekte Expression wurde im Westernblot überprüft (siehe Abb. 15 A). Dann wurden die Lysate mit magnetischen Beads, die mit anti-GFP-Antikörper bedeckt waren (Milenyi Biotec), zusammengebracht und inkubiert. Mithilfe eines Magneten konnte dann das GFP-Picalm sowie seine potentiellen Bindungspartner aus den Rohlysaten extrahiert werden. In Abbildung 15 B ist zu sehen, dass die Extraktion von GFP-Picalm aus den Lysaten gut funktioniert hat, dass jedoch weder APP noch BACE1 in den Eluaten detektiert werden können und diese Proteine somit vermutlich nicht direkt an Picalm binden.

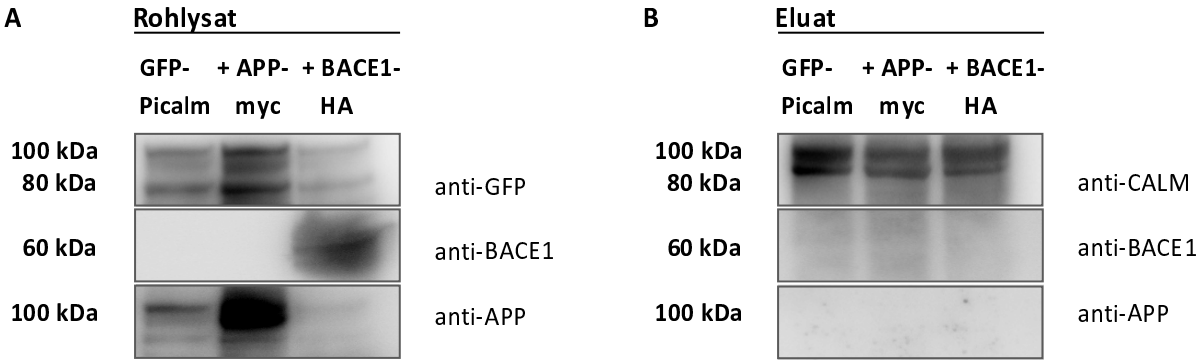

Abbildung 15: Es lässt sich keine direkte Interaktion von Picalm und APP nachweisen. Hek293-Zellen wurden mit GFP-Picalm, GFP-Picalm und APP-myc und mit GFP-Picalm und BACE1-HA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die korrekte Expression im Rohlysat mittels Westernblot überprüft (**A**). Danach wurde mit Beads, die mit anti-GFP-Antikörpern beschichtet waren, eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Die Eluate wurden auf einen Westernblot aufgetragen (**B**). Verwendete Primärantikörper: rabbit anti-GFP (Sigma-Aldrich), goat anti-CALM (Santa Cruz), rabbit anti-BACE1 (Abcam) und rabbit anti-APP c-term (Sigma-Aldrich). Sekundärantikörper (alle Invitrogen): goat anti-rabbit IgG HRP, rabbit anti-goat IgG HRP. Es ist zu sehen, dass wie erwartet GFP-Picalm im Eluat vorhanden ist, jedoch weder BACE1 noch APP.

4 Diskussion

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Picalm liegt punktförmig im Zytoplasma im Bereich der *Early Endosomes* vor

Wie in dieser Arbeit bereits geschildert, ist Picalm ein Alzheimer-Risikogen und Picalm-SNPs gehen mit veränderten Mengen von Aβ im Liquor einher (Hardy et al. 2009, Schjeide et al. 2011), weshalb spekuliert werden kann, dass Picalm das Alzheimer-Risiko durch einen Einfluss auf die Prozessierung von APP beeinflusst.

Um die Eignung verschiedener Zelltypen für die geplanten Experimente festzustellen und um dann die intrazelluläre Lokaliation von Picalm zu untersuchen, wurde zunächst die endogene Picalm-Expression in Hek293-, Neuro2A- und SH-SY5Y- Zellen, sowie in murinen embryonalen Neuronen und Astrozyten mittels Westernblot und ICC bestimmt. Picalm wird in allen untersuchten Zelltypen exprimiert (siehe Abbildung 8) und liegt, wie die ICCs zeigen, hauptsächlich punktförmig im Zytoplasma verteilt im Bereich der *Early Endosomes* vor (siehe Abbildung 9). Diese Ergebnisse decken sich mit den Angaben aus der Literatur und passen gut zu der beschriebenen Schlüsselrolle von Picalm bei der Clathrin-vermittelten Endozytose (Meyerholz et al. 2005, Tebar et al. 1999).

Der verwendete Picalm-Antikörper (goat anti-CALM von Santa Cruz, sc-6433) wird von vielen Arbeitsgruppen verwendet (etwa Baig et al. 2010, Bushlin et al. 2008, Schwartz et al. 2010), daher halte ich ihn für diese Arbeit für geeignet.

Im Westernblot ist zu sehen, dass dieser Antikörper zwei Banden detektiert, auf Höhe von etwa 65 und 72 kDa. Vermutlich handelt es sich bei diesen Banden um verschiedene Isoformen von Picalm. Es sind vier humane und sechs murine Isoformen von Picalm beschrieben (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8301, www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/233489, Stand vom 14.03.2015). Über diese Isoformen ist bisher nur wenig bekannt und inwieweit sie sich eventuell funktionell unterscheiden ist noch völlig unklar.

In dieser Arbeit wurden Hek293-, Neuro2A-, und SH-SY5Y-Zellen sowie murine embryonale Neurone und Astrozyten verwendet. Ein Vorteil von Hek293-, Neuro2A- und SH-SY5Y-Zellen ist, dass sie sich als Zelllinien, die von malignen Tumoren abstammen, durch ein schnelles Wachstum und langes Überleben auszeichnen. Zudem sind sie gut transfizierbar und kultivierbar, was die Arbeit mit ihnen vereinfacht. Hek293- und SH-SY5Y-Zellen haben außerdem den Vorteil, humanen Ursprungs zu sein.

Neuro2A-Zellen (eine murine Glioblastomzelllinie) und SH-SY5Y (enstanden aus Biopsien von ossären Metastasen eines Neuroblastoms) haben den Vorteil, neuronalen Ursprungs zu sein. Hek293-Zellen exprimieren zudem Neurofilamente, die denen von Neuronen eines frühen Differenzierungsstadiums entsprechen (Shaw et al. 2002).
Die murinen embryonalen Neurone bzw. Astrozyten sind als primäre Zellen zwar aufwendiger zu kultivieren und haben keinen humanen Ursprung, jedoch haben sie den Vorteil ihren Ursprung in gesundem und nicht in entartetem Tumorgewebe zu haben.
Selbstverständlich können alle Zelllinien nur ein Modell für die tatsächlichen Vorgänge in primären humanen Neuronen sein. Aber selbst diese wären nur eine Annäherung an die komplexen Vorgänge in einem lebendigen Gehirn. Wenn man sich dieser Einschränkungen bewusst bleibt, bieten sich aber alle verwendeten Zelllinien als praktikable und etablierte Zellmodelle für die Alzheimer-Forschung an.

4.1.2 Der Einfluss von Picalm auf die Sekretion von sAPPs und Amyloid β

Um den Einfluss von Picalm auf die Prozessierung von APP zu untersuchen, habe ich zunächst GFP-Picalm in Hek293-Zellen transient und stabil überexprimiert und die sAPP-Level im Mediumüberstand mittels eines Immunoassays gemessen.
Durch die Transfektion mit Plasmid-DNA produziert eine Zelle ein Protein, dass sie normalerweise gar nicht, oder nur in wesentlich geringeren Mengen produzieren würde. Alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte tragen einen Tag wie GFP oder HA, der sich im Westernblot mittels eines Antikörpers und (im Falle von GFP) in der Fluoreszensmikroskopie durch sein Leuchten detektieren lässt. Die massive Expression des transfizierten Konstrukts könnte den Stoffwechsel der Zelle verändern, weshalb als Kontrollen immer mit dem Tag-Protein transfizierte Zellen verwendet wurden.
Für die Transfektion von Hek293 wurde meist die Calcium-Phosphat-Methode verwendet, ein etabliertes, günstiges und effizientes Verfahren. Lediglich für die Transfektion mit siRNA und für die Transfektion großer Zellzahlen (10 cm Schalen) musste aus technischen Gründen eine Transfektion mittels Lipofectamine2000 erfolgen. Für die Transfektion von Neuro2A wurde die Transfektion mittels Satisfection verwendet, da sie sich als besonders effizient erwiesen hat.
Um die Menge von Aβ, sAPPα und sAPPβ im Mediumüberstand von Zellen zu bestimmen, wurden Immunoassays von Mesoscale Discovery verwendet (sAPPalpha/beta-Kit, bzw. A beta Triplex Assay).

Beide Kits finden in der Alzheimer-Forschung breite Anwendung (etwa bei Burgert et al. 2013, Maia et al. 2013, Schipke et al. 2011), daher halte ich sie für diese Arbeit für gut geeignet. Der für die Messung verwendete Mediumüberstand wurde zuvor von den Zellen abgenommen und eingefroren, während die Zellen lysiert wurden, um im Westernblot die korrekte Expression der transfizierten Konstrukte zu überprüfen.

Für die sAPP-Assays wurden humane Hek293-Zellen verwendet. Als Kontrolle für die transient bzw. stabil mit GFP-Picalm transfizierten Hek293-Zellen, dienten transient mit GFP-Leervektor transfizierte Zellen und stabil GFP-mRFP exprimierende Zellen. Hier hätte besser eine Hek293-Zelllinie verwendet werden sollen, die stabil ebenfalls den GFP-Leervektor exprimiert. Außerdem wäre es sinnvoll gewesen, bei den Westernblots, die vor den sAPP-Assays durchgeführt wurden, auch APP-Blots anzufertigen, um sicher zu stellen, dass keine Unterschiede in der endogenen APP-Expression vorliegen, die das Messergebnis beeinflussen würden. Insgesamt wäre es wünschenswert gewesen, die Versuche öfter durchzuführen, um die Daten noch besser zu validieren.

Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben, kann bei einer vermehrten Expression von Picalm ein vermehrtes Vorhandensein von sAPPs im Mediumüberstand der Zellen beobachtet werden (Abbildung 10). Dabei sind die insgesamt erhöhten Mengen von sAPPs bei der stabilen Überexpression im Vergleich zur transienten Überexpression dadurch zu erklären, dass die Zellen nach der transienten Transfektion erst nach einigen Stunden mit der Expression von GFP-Picalm beginnen, während die stabilen Zellen das Konstrukt bereits vom Beginn des Experiments an exprimieren. Zudem stehen die stabilen Zellen unter Selektionsdruck, was dazu führt, dass tatsächlich jede einzelne Zelle das Konstrukt exprimiert. Dadurch tritt der Effekt von Picalm stärker zu Tage, als bei den transient transfizierten Zellen, bei denen eine Transfektionseffizienz von hundert Prozent nicht zu erreichen ist.

Da die erhöhte Expression von Picalm in Hek293-Zellen, wie oben beschrieben, mit einer vermehrten Sekretion von sAPPs in den Mediumüberstand der Zellen einhergeht, habe ich im nächsten Schritt untersucht, wie sich die verminderte Expression (*Knock-down*) von Picalm auf die Menge der sAPPs auswirkt.

Die Expression von Picalm wurde mittels siRNA (Quiagen) herunterreguliert. Bei der siRNA (small interfering RNA) handelt es sich um kurze RNA-Moleküle, die in Zellen unter Anderem eine Rolle bei der RNA-Interferenz spielen.

Diese verhindert die Translation von mRNA und schützt die Zelle so etwa vor Viren (Hamilton et al. 1999). Dieser Mechanismus kann genutzt werden um die Expression eines bestimmten Proteins - in dieser Arbeit Picalm - drastisch zu reduzieren und so Erkenntnisse über die Funktion dieses Proteins zu gewinnen (Elbashir et al. 2001). Dabei wird die Zelle mit siRNA transfiziert, die komplementär zur mRNA des Zielproteins ist. Die komplementären RNA-Moleküle verbinden sich und werden abgebaut, so dass es nicht zur Translation der mRNA kommt.

Die verwendete Kombination von Picalm-siRNAs hat eine vom Hersteller (Qiagen) garantierte *Knock-down*-Effizienz von 70 %, was sich in meinen Experimenten so bestätigt hat. Daher halte ich die verwendete siRNA für ein gutes Instrument, um die Rolle von Picalm bei der APP-Prozessierung genauer zu untersuchen.

Im Mediumüberstand der Zellen mit herunterregulierter Picalm-Expression wurde dann ebenfalls mittels eines Immunoassays von Mesoscale Discovery die Menge an sAPPs gemessen. Für die Menge von sAPPα konnte hier kein Unterschied festgestellt werden. Die Menge von sAPPβ war jedoch im Mediumüberstand der mit siRNA behandelten Zellen tendenziell reduziert (Abbildung 12).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass eine Überexpression von Picalm in Hek293-Zellen mit einem vermehrten Vorhandensein von sAPPs im Mediumüberstand einhergeht und dass bei einer verminderten Expression von Picalm tendenziell eine Reduktion von sAPPβ im Mediumüberstand zu beobachten ist.

Für die Aβ-Assays wurden Neuro2A-Zellen verwendet, da dieser Assay nur humanes Aβ detektiert und so das endogene murine APP der Neuro2A-Zellen nicht mit in die Messungen einfließt. Dies trägt zu einer größeren Exaktheit der Aβ-Messungen bei. Es wurde jeweils APP695-myc + GFP-Picalm bzw. APP695-myc + GFP-Picalm + BACE1-HA exprimiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die nur mit APP695-myc bzw. APP695-myc + BACE1-HA transfiziert wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass bei einer Picalm-Überexpression in Neuro2A-Zellen vermehrt Amyloid β 42, 40 und 38 im Mediumüberstand der Zellen nachweisbar ist (siehe Abbildung 13). Die zusätzliche Überexpression von BACE1-HA führt dazu, dass der Effekt von Picalm deutlicher hervortritt, da BACE1 als Schlüsselenzym an der Prozessierung von APP beteiligt ist.

Passend zu meinen Beobachtungen, konnten Xiao et al. 2012 feststellen, dass die Überexpression von Picalm in Mäusen mit dem vermehrten Vorhandensein von Aβ und Amyloid-Plaques im Gehirn der Tiere einhergeht.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der *Knock-down* von Picalm in Mäusen zur verminderten Entstehung von Aβ und Amyloid-Plaques führt.

In vitro konnten Xiao et al. zeigen, dass der *Knock-down* von Picalm in stabil Wildtyp-APP695 exprimierenden Neuro2A-Zellen mit einer verminderten Internalisation von APP und einer verminderten Produktion von Amyloid β einhergeht. Diese Beobachtungen passen zu meinen Ergebnissen.

Im Gegensatz zu meinen Beobachtungen kamen Wu et al. 2009 zu dem Ergebnis, dass zwar der *Knock-down* von AP180 (dem neuronenspezifischen Homolog von Picalm) die Bildung von Aβ 40 und 42 reduziert, jedoch nicht der *Knock-down* von Picalm. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte die von Wu et al. verwendete Zelllinie darstellen, eine SH-SY5Y-Linie, die stabil APP695 mit einer sogenannten *Swedish*-Mutation exprimiert. Diese Mutation ist für einen Teil der seltenen monogenetisch vererbten Fälle von FAD verantwortlich. Jedoch zeigten Haass et al. 1995, dass die erhöhte Produktion von Aβ bei Trägern der *Swedish*-Mutation durch einen zellulären Mechanismus zustande kommt, der sich grundlegend von der Aβ Produktion aus Wild-Typ-APP unterscheidet. Im Falle des Wild-Typ-APPs ist für die Amyloid-Bildung eine Reinternalisation des APPs von der Zelloberfläche mittels Endozytose notwendig.

Die Beteiligung von Picalm an dieser Clathrin-vermittelten Endozytose ist meiner Hypothese nach die Erklärung für den Effekt von Picalm auf die amyloidogene APP-Prozessierung. Bei Vorliegen der *Swedish*-Mutation findet die Aβ-Produktion jedoch bereits in sekretorischen Vesikeln aus dem Golgi-Apparat statt, eine Endozytose ist hier also nicht notwendig (Haass et al. 1995). Daher erscheint es mir gut erklärbar, dass Wu et al. mit einem auf APP mit *Swedish*-Mutation basierenden Zellmodell keinen Effekt von Picalm auf die Produktion von Amyloid β feststellen konnten.

In meinen Versuchen habe ich Picalm in Hek293- und Neuro2A-Zellen überexprimiert, bzw. herunterreguliert. Zu der Frage inwieweit die Expression von Picalm in Gehirnen von AD-Patienten verändert ist, existieren allerdings widersprüchliche Daten: Laut Ando et al. (2013) gibt es eine Verminderung von *full-lenght* Picalm in den Gehirnen von AD-Patienten durch Proteolyse. Dagegen beschreiben Baig et al. (2010) eine Erhöhung der Picalm-Expression im frontalen Kortex von AD-Patienten. Parikh et al. (2014) beschreiben eine leichte Erhöhung der Picalm-Expression, die mit dem protektiven rs3851179A SNP einhergeht. Auch hier sind also weitere Untersuchungen nötig, um eindeutige Daten zu gewinnen.

4.1.3 Es lässt sich keine direkte Interaktion zwischen Picalm und APP nachweisen

Um die Hypothese zu bekräftigen, dass der beobachtete Effekt von Picalm auf die Prozessierung von APP durch den Einfluss von Picalm auf die Clathrin-vermittelte Endozytose zustande kommt, sollte eine direkte Interaktion von Picalm mit APP ausgeschlossen werden. Um zu klären, ob Picalm grundsätzlich ein direkter Interaktionspartner von APP sein könnte, habe ich mittels ICC untersucht, ob Picalm und APP in Hek293-Zellen im gleichen zellulären Kompartiment vorkommen. Dabei zeigte sich, dass sich in der Fluoreszenzmikroskopie die Signale von APP und Picalm überlagern (siehe Abbildung 14). Allerdings bedeutet die Überlagerung der Fluoreszenzsignale hier nicht notwendigerweise eine Kolokalisation der Proteine. Es wäre daher sinnvoll gewesen, hier eine konfokale Lasermikroskopie durchzuführen, bei der immer nur eine Ebene eines Präparates gezeigt wird. Anders als bei der verwendeten konventionellen Fluoreszenzmikroskopie überlagern sich so räumlich übereinander liegende Signale nicht.

Um zu klären, ob Picalm und APP direkt miteinander interagieren, habe ich eine Co-Immunopräzipitation aus Hek293-Zelllysaten durchgeführt, eine Methode mit der sich Protein-Protein-Interaktionen nachweisen lassen. Die Überlagerung der Fluoreszenssignale in den ICC-Färbungen bedeutet wie oben geschildert, nicht unbedingt eine Kolokalisation der Proteine sondern kann auch eine räumliche Überlagerung der Proteine anzeigen.

So zeigte auch die Co-Immunopräzipitation keinen Hinweis auf eine direkte Interaktion zwischen Picalm und APP (siehe Abbildung 15).

Dieses Ergebnis war so zu erwarten, da die Schlüsselrolle von Picalm bei der Clathrin-vermittelten Endozytose (CME) einen Einfluss auf die APP-Prozessierung über diesen Mechanismus wahrscheinliche macht, da APP für die amyloidogene Prozessierung von der Zelloberfläche mittels CME reinternalisiert werden muss (Nordstedt et al. 1993, Koo EH et al. 1994, Cirrito JR et al. 2008). Zudem gibt es auch in der Literatur keinen Hinweis auf eine direkte Interaktion von Picalm und APP.

4.1.4 Welche Rolle könnte Picalm beim Entstehen der Alzheimer-Krankheit spielen?

Es gibt verschiedene Hypothesen dazu, wie Picalm an der Entstehung der Alzheimer-Pathologie beteiligt sein könnte. Xu et al. fassen in ihrem Review „*The role of Picalm in Alzheimer`s Disease*“ (2014) diese Möglichkeiten zusammen. Dabei werden Amyloid-abhängige von Amyloid-unabhängigen *Pathways* unterschieden. Zu den Amyloid-abhängigen *Pathways* zählen ein Einfluss auf die Amyloidogenese, zum Einen über die APP-Internalisation und zum Anderen über die Modulation der γ-Sekretase-Aktivität; ein Einfluss auf die Aβ-Clearance, entweder über die Blut-Hirn-Schranke oder durch Autophagie; sowie ein Einfluss auf die Aβ-Toxizität. Zu den Amyloid-unabhängigen *Pathways* zählen ein Einfluss von Picalm auf die Tauopathie und die synaptische Funktion.

In der oben beschriebenen Arbeit schlussfolgern Xiao et al. (2012), dass Picalm die APP-Internalisation und anschließende Aβ-Produktion reguliert und so zur Entstehung von Amyloid-Plaques im Gehirn beiträgt, was sich mit meiner Hypothese deckt. Passend dazu fanden Kok et al. 2011 in einer Alters- und APOE4-Status kontrollierten Untersuchung von 603 Gehirnen, bei Trägern des T-Allels im Picalm-SNP rs3851179 eine geringere Menge an Amyloidplaques. Chibnik et al. konnten 2011 jedoch keinen Zusammenhang zwischen Picalm und der Menge von Amyloidplaques nachweisen, allerdings untersuchten sie den SNP rs7110631 und nicht rs3851179, was diesen Unterschied erklären könnte.

Als weitere Möglichkeit, wie Picalm an der Amyloidogenese beteiligt sein könnte, kommt die Modulation der γ-Sekretase-Aktivität in Betracht: Picalm scheint über die Clathrin-vermittelte Endozytose die intrazellulär vorhandene Menge an γ-Sekretase und damit die Aβ42-Produktion zu regulieren (Kanatsu et al. 2014).

Neben einem Einfluss auf die Amyloidogenese ist eine Beteiligung von Picalm an der Aβ - Clearance aus dem zentralen Nervensystem denkbar. Diese erfolgt über die Blut-Hirn-Schranke, wo Picalm in den Gefäßwänden exprimiert wird (Parikh et al. 2014, Baig et al. 2010). Passend dazu beschrieben Schjeide et al. 2011 in einer Gruppe aus 425 deutschen Probenden (214 Fälle und 211 Kontrollen) einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des AD-Risiko-Allels im Picalm-SNP rs541458 und erniedrigten Liquorleveln von Amyloid β. Allerdings konnten Kauwe et al. 2011 in einer Gruppe von 664 US-amerikanischen Probanden (256 Fälle und 408 Kontrollen) für keinen Picalm-SNP einen Zusammenhang mit den Liquorleveln von Amyloid β oder Phospho-Tau nachweisen.

Hier werden noch weitere Untersuchungen, eventuell in größeren Kohorten, nötig sein, um abschließend zu klären, inwieweit die Alzheimer-Biomarker im Liquor von Picalm-SNPs beeinflusst werden.

Als einen weiteren Weg der Aβ-Clearance beschrieben Tian et al. (2013) die Autophagie. Der Komplex aus AP2 und Picalm könnte als Rezeptor für das Erkennen und den Transport des APP-CTF aus dem Endozytose- hin zum Autophagie-*Pathway* führen und so die Produktion von Amyloid verhindert (Tian et al. 2013).

Außerdem erscheint eine Rolle von Picalm als Modulator der Aβ-Toxizität möglich, wobei unterschiedliche Ansichten darüber existieren, ob Picalm die Toxizität von Aβ in einem Hefezellmodell vermindert (Treusch et al. 2011) oder erhöht (D`Angelo et al. 2013). Auch hier könnten weitere Untersuchungen Klarheit schaffen.

Einen Zusammenhang von Picalm mit der Alzheimer-typischen Tauopathie zeigten Ando et al. (2013). Sie beschrieben, dass Picalm in Gehirnen von Alzheimer-Patienten (13 Kontrollen, 10 LOAD-Fälle, 3 FAD-Fälle) vermehrt proteolysiert vorliegt und dass die proteolysierten Fragmente von Picalm sich in intrazellulären NFTs (Neurofibrillen) nachweisen lassen. Dies könnte ein Hinweis auf einen Zusammenhang von Picalm und der Tauopathie bei Alzheimer-Patienten sein. Ebenfalls diskutiert wird ein Einfluss von Picalm auf die Tau-Clearance, da Tau ein bekanntes Autophagie-Substrat ist und Picalm durch die Regulation von SNAREs wie VAMP2 den Autophagie-Pathway zu beeinflussen scheint (Moreau et al. 2014).

Ein möglicher Einfluss auf die synaptische Dysfunktion wird diskutiert, weil Picalm in Neuronen besonders an den Synapsen exprimiert wird und hier, wie bereits erwähnt, eine Rolle bei der Reinternalisierung von VAMP2 zu spielen scheint (Maritzen et al. 2012, Koo et al. 2011, Harel et al. 2008). Eine Fehlverteilung von VAMP2 könnte zu der Alzheimer-typischen synaptischen Dysfunktion beitragen (Koo et al. 2011).

Es gibt also verschiedene Forschungsansätze zur Rolle von Picalm bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit und weitere Untersuchungen werden hier in Zukunft sicher vielversprechende Ergebnisse liefern.

4.2 Schlussfolgerung und Ausblick

4.2.1 Schlussfolgerung

Die Hypothese dieser Arbeit lautet, dass Picalm den amyloidogenen APP-Abbau fördert, und damit die Sekretion von Amyloid β und sAPPs begünstigt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Picalm tatsächlich die APP-Prozessierung beeinflusst, und zwar in der Form, dass eine Überexpression von Picalm mit einem vermehrten Vorhandensein von sAPPs und Amyloid β 38, 40 und 42 im Mediumüberstand der transfizierten Zellen assoziiert ist. Eine Herunterregulation der Picalm-Expression ist tendenziell mit einem verminderten Vorhandensein von sAPPβ im Mediumüberstand assoziiert. Diese Resultate passen zu meiner eingangs genannten Hypothese.
Auch sind diese Ergebnisse weitgehend konsistent mit der Literatur zu diesem Thema, die vorhandenen Diskrepanzen lassen sich meines Erachtens gut erklären. Um die Hypothese dieser Arbeit weiter zu bestätigen, sind in Zukunft noch zusätzliche Untersuchungen notwendig.

4.2.2 Ausblick

Es müssen noch Experimente durchgeführt werden, um zu bestätigen, dass die beobachteten Veränderungen tatsächlich wie vermutet durch die veränderte Endozytose von APP zustande kommen. Dazu bietet sich die Durchführung von Endozytoseassays an, die auch in unserer Arbeitsgruppe bereits geplant sind. Um einen Einfluss von endogenen APP-Leveln auf die Ergebnisse auszuschließen, sollen zudem APP- bzw. Picalm-q-PCRs aus Picalm- bzw. APP-überexprimierenden Zellen durchgeführt werden. Zudem ist eine Wiederholung der Experimente mit höherer n-Zahl geplant. Ein weiterer zukünftiger Schritt wäre die Wiederholung der Experimente in primären Neuronen. Die hierfür notwendigen Klonierungen zum Herstellen eines geeigneten viralen Vektors wurden bereits begonnen.

5 Zusammenfassung

Die Alzheimer-Krankheit (AD) ist die häufigste Ursache von Demenz und ihr Pathomechanismus ist bis heute nicht vollständig geklärt. Eine Hypothese zu ihrem Ursprung ist die Amyloidhypothese. Sie besagt, dass zerebrale Amyloid-Plaques, bestehend aus Amyloid β (Aβ), ursächlich für die Entstehung der AD sind. Aβ entsteht aus dem APP (Amyloid-Precursor-Protein). Wird dieses amyloidogen prozessiert, entsteht sAPPβ und Aβ. Die Reinternalisierung von der Zelloberfläche mittels Clathrin-vermittelter Endozytose (CME) ist der Umschlagpunkt von der nicht-amyloidogenen hin zur amyloidogenen APP-Prozessierung. Genomweite Assoziationsstudien identifizierten Picalm als neues AD-Risikogen. Picalm spielt eine Schlüsselrolle bei der CME und ist mit veränderten Aβ-Liquorleveln assoziiert. Meine Hypothese lautet daher, dass Picalm die amyloidogene APP-Prozessierung und damit die Sekretion von sAPPβ und Amyloid β fördert. Ein möglicher Mechanismus hierfür könnte ein Einfluss des Clathrinadaptors Picalm auf die Endozytose von APP sein.

Picalm wird in allen untersuchten Zelltypen (Hek293, Neuro2A, SH-SY5Y, murine embryonale Neurone und Astrozyten) exprimiert und liegt punktförmig im Zytoplasma in *Early Endosomes* vor. Um zu untersuchen, ob Picalm die amyloidogene APP-Prozessierung beeinflusst, wurde Picalm in Hek293 und Neuro2A-Zellen überexprimiert bzw. die Expression mittels siRNA herunterreguliert und die sAPPs und Aβ im Mediumüberstand mittels Immunoasays gemessen. Es zeigte sich, dass eine Überexpression von Picalm in Hek293-Zellen mit einem vermehrten Vorhandensein von sAPPs im Mediumüberstand einhergeht und dass bei einer verminderten Expression von Picalm eine tendenzielle Reduktion von sAPPβ im Mediumüberstand zu beobachten ist. Bei Picalm-Überexpression in Neuro2A ist vermehrt Aβ im Mediumüberstand der Zellen nachweisbar. Wie erwartet, wurde mittels Co-Immunopräzipitation keine direkte Interaktion von Picalm mit APP nachgewiesen.

Die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbungen decken sich mit der Literatur und passen zu der Schlüsselrolle von Picalm bei der CME. Die Ergebnisse der Immunoassays sind weitgehend konsistent mit der Literatur, die vorhandenen Diskrepanzen lassen sich meines Erachtens durch methodische Unterschiede erklären. In dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass Picalm tatsächlich die APP-Prozessierung beeinflusst. Um die Hypothese dieser Arbeit weiter zu bestätigen, sind noch zusätzliche Untersuchungen, wie z.B. Endozytoseassays notwendig, die in unserer Arbeitsgruppe bereits geplant sind.

6 Quellenverzeichnis

1. Alzheimer A, Stelzmann R A, Schnitzlein H N, Murtagh F R: An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". Clinical Anatomy, 8: 429-431 (1995)

2. Ando K, Brion J P, Stygelbout V, Suain V, Authelet M, Dedecker R, Chanut A, Lacor P, Lavaur J, Sazdovitch V, Rogaeva E, Potier M C, Duyckaerts C: Clathrin adaptor CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's brains. Acta Neuropathologica, 125: 861-878 (2013)

3. Anstey K J, von Sanden C, Salim A, O'Kearney R: Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. American Journal of Epidemiology, 166: 367-378 (2007)

4. Bagyinszky E, Youn Y C, An S S A, Kim S Y: The genetics of Alzheimer`s Disease. Clinical Interventions in Aging, 535-551 (2014)

5. Baig S, Joseph S A, Tayler H, Abraham R, Owen M J, Williams J, Kehoe P G, Love S: Distribution and expression of picalm in Alzheimer disease. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 69: 1071-1077 (2010)

6. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E: Alzheimer's disease. Lancet, 377: 1019-1031 (2011)

7. Bayer T A, Cappai R, Masters C L, Beyreuther K, Multhaup G: It all sticks together--the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. Molecular Psychiatry, 4: 524-528 (1999)

8. Biedler J L, Helson L, Spengler B A: Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. Cancer Research, 33: 2643-2652 (1973)

9. Blennow K, de Leon M J, Zetterberg H: Alzheimer's disease. Lancet, 368: 387-403 (2006)

10. Burgert T, Schmidt V, Caglayan S, Lin F, Fuchtbauer A, Fuchtbauer E M, Nykjaer A, Carlo A S, Willnow T E: SORLA-dependent and -independent functions for PACS1 in control of amyloidogenic processes. Molecular & Cellular Biology, 33: 4308-4320 (2013)

11. Bushlin I, Petralia R S, Wu F, Harel A, Mughal M R, Mattson M P, Yao P J: Clathrin assembly protein AP180 and CALM differentially control axogenesis and dendrite outgrowth in embryonic hippocampal neurons. Journal of Neuroscience, 28: 10257-10271 (2008)

12. Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt D R, Price D L, Wong P C: BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. Nature Neuroscience, 4: 233-234 (2001)

13. Caille I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Muller U, Prochiantz A: Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. Development, 131: 2173-2181 (2004)

14. Carrasquillo M M, Belbin O, Hunter T A, Ma L, Bisceglio G D, Zou F, Crook J E, Pankratz V S, Dickson D W, Graff-Radford N R, Petersen R C, Morgan K, Younkin S G: Replication of CLU, CR1, and PICALM associations with alzheimer disease. Archives of Neurology, 67: 961-964 (2010)

15. Chibnik L B, Shulman J M, Leurgans S E, Schneider J A, Wilson R S, Tran D, Aubin C, Buchman A S, Heward C B, Myers A J, Hardy J A, Huentelman M J, Corneveaux J J, Reiman E M, Evans D A, Bennett D A, De Jager P L: CR1 is associated with amyloid plaque burden and age-related cognitive decline. Annals of Neurology, 69: 560-569 (2011)

16. Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S, Holtzman DM: Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. Neuron, 58: 42-51 (2008)

17. Corneveaux J J, Myers A J, Allen A N, Pruzin J J, Ramirez M, Engel A, Nalls M A, Chen K, Lee W, Chewning K, Villa S E, Meechoovet H B, Gerber J D, Frost D, Benson H L, O'Reilly S, Chibnik L B, Shulman J M, Singleton A B, Craig D W, Van Keuren-Jensen K R, Dunckley T, Bennett D A, De Jager P L, Heward C, Hardy J, Reiman E M, Huentelman M J: Association of CR1, CLU and PICALM with Alzheimer's disease in a cohort of clinically characterized and neuropathologically verified individuals. Human Molecular Genetics, 19: 3295-3301 (2010)

18. D'Angelo F, Vignaud H, Di Martino J, Salin B, Devin A, Cullin C, Marchal C: A yeast model for amyloid-beta aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PICALM in cytotoxicity. Disease Models & Mechanisms, 6: 206-216 (2013)

19. Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN), Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) (Hrsg) Diagnose- und Behandlungsleitlinie Demenz. Interdisziplinäre S3 Praxisleitlinien. 1, Springer-Verlag, Berlin, (2010)

20. Dreyling M H, Martinez-Climent J A, Zheng M, Mao J, Rowley J D, Bohlander S K: The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family. Proceedings of the National Acadamy of Science U.S.A., 93: 4804-4809 (1996)

21. Dreyling M H, Schrader K, Fonatsch C, Schlegelberger B, Haase D, Schoch C, Ludwig W, Loffler H, Buchner T, Wormann B, Hiddemann W, Bohlander S K: MLL and CALM are fused to AF10 in morphologically distinct subsets of acute leukemia with translocation t(10;11): both rearrangements are associated with a poor prognosis. Blood, 91: 4662-4667 (1998)

22. Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature, 411: 494-498 (2001)

23. Fath T, Ke Y D, Gunning P, Gotz J, Ittner L M: Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons. Nature Protocols, 4: 78-85 (2009)

24. Ford M G, Pearse B M, Higgins M K, Vallis Y, Owen D J, Gibson A, Hopkins C R, Evans P R, McMahon H T: Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. Science, 291: 1051-1055 (2001)

25. Frankfort S V, Tulner L R, van Campen J P, Verbeek M M, Jansen R W, Beijnen J H: Amyloid beta protein and tau in cerebrospinal fluid and plasma as biomarkers for dementia: a review of recent literature. Current Clinical Pharmacology, 3: 123-131 (2008)

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

27. Gatz M, Reynolds C A, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer J A, Berg S, Fiske A, Pedersen N L: Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. Archives of General Psychiatry, 63: 168-174 (2006)

28. Gehlen W D H: Neurologie. 12, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (2010)

29. Gilbert B J: The role of amyloid beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Journal of Clinical Pathology, 66: 362-366 (2013)

30. Graham F L, Smiley J, Russell W C, Nairn R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. Journal of General Virology, 36: 59-74 (1977)

31. Haass C, Lemere C A, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe D J: The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. Nature Medicine, 1: 1291-1296 (1995)

32. Hamilton A J, Baulcombe D C: A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science, 286: 950-952 (1999)

33. Hardy J A, Higgins G A: Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science, 256: 184-185 (1992)

34. Harel A, Wu F, Mattson M P, Morris C M, Yao P J: Evidence for CALM in directing VAMP2 trafficking. Traffic, 9: 417-429 (2008)

35. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere M L, Pahwa J S, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan A R, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton M K, Brayne C, Rubinsztein D C, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown K S, Passmore P A, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith A D, Love S, Kehoe P G, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schurmann B, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frolich L, Hampel H, Hull M, Rujescu D, Goate A M, Kauwe J S, Cruchaga C, Nowotny P, Morris J C, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn P P, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass N J, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw C E, Tsolaki M, Singleton A B, Guerreiro R, Muhleisen T W, Nothen M M, Moebus S, Jockel K H, Klopp N, Wichmann H E, Carrasquillo M M, Pankratz V S, Younkin S G, Holmans P A, O'Donovan M, Owen M J, Williams J: Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. Nature Genetics, 41: 1088-1093 (2009)

36. Hollingworth P, Harold D, Jones L, Owen M J, Williams J: Alzheimer's disease genetics: current knowledge and future challenges. International Journal of Geriatric Psychiatry, 26: 793-802 (2011)

37. Jun G, Naj A C, Beecham G W, Wang L S, Buros J, Gallins P J, Buxbaum J D, Ertekin-Taner N, Fallin M D, Friedland R, Inzelberg R, Kramer P, Rogaeva E, St George-Hyslop P, Alzheimer's Disease Genetics C, Cantwell L B, Dombroski B A, Saykin A J, Reiman E M, Bennett D A, Morris J C, Lunetta K L, Martin E R, Montine T J, Goate A M, Blacker D, Tsuang D W, Beekly D, Cupples L A, Hakonarson H, Kukull W, Foroud T M, Haines J, Mayeux R, Farrer L A, Pericak-Vance M A, Schellenberg G D: Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. Archives of Neurology, 67: 1473-1484 (2010)

38. Kanatsu K, Morohashi Y, Suzuki M, Kuroda H, Watanabe T, Tomita T, Iwatsubo T: Decreased CALM expression reduces A beta 42 to total A beta ratio through clathrin-mediated endocytosis of y-sekretase. Nature Communications, (2014)

39. Kauwe J S, Cruchaga C, Karch C M, Sadler B, Lee M, Mayo K, Latu W, Su'a M, Fagan A M, Holtzman D M, Morris J C, Alzheimer's Disease Neuroimaging I, Goate A M: Fine mapping of genetic variants in BIN1, CLU, CR1 and PICALM for association with

cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease. PLoS ONE [Electronic Resource], 6: e15918 (2011)

40. Kinoshita A, Fukumoto H, Shah T, Whelan C M, Irizarry M C, Hyman B T: Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. Journal of Cell Science, 116: 3339-3346 (2003)

41. Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, Kareholt I, Winblad B, Helkala E L, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A: Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. Archives of Neurology, 62: 1556-1560 (2005)

42. Klebig M L, Wall M D, Potter M D, Rowe E L, Carpenter D A, Rinchik E M: Mutations in the clathrin-assembly gene Picalm are responsible for the hematopoietic and iron metabolism abnormalities in fit1 mice. Proceedings of the National Academy of Science U.S.A., 100: 8360-8365 (2003)

43. Kok E H, Luoto T, Haikonen S, Goebeler S, Haapasalo H, Karhunen P: CLU, CR1 and PICALM genes associate with Alzheimer`s-related senile plaques. Alzheimer`s Research & Therapy, 3: (2011)

44. Koo EH, Squazzo SL: Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. Journal of Biological Chemistry, 269: 17386-17389 (1994)

45. Koo S J, Markovic S, Puchkov D, Mahrenholz C C, Beceren-Braun F, Maritzen T, Dernedde J, Volkmer R, Oschkinat H, Haucke V: SNARE motif-mediated sorting of synaptobrevin by the endocytic adaptors clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) and AP180 at synapses. Proceedings of the National Academy of Science U.S.A., 108: 13540-13545 (2011)

46. Lee J H, Cheng R, Barral S, Reitz C, Medrano M, Lantigua R, Jimenez-Velazquez I Z, Rogaeva E, St George-Hyslop P H, Mayeux R: Identification of novel loci for Alzheimer disease and replication of CLU, PICALM, and BIN1 in Caribbean Hispanic individuals. Archives of Neurology, 68: 320-328 (2011)

47. Maia L F, Kaeser S A, Reichwald J, Hruscha M, Martus P, Staufenbiel M, Jucker M: Changes in amyloid-beta and Tau in the cerebrospinal fluid of transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein. Science Translational Medicine, 5: 194re2 (2013)

48. Maritzen T, Koo S J, Haucke V: Turning CALM into excitement: AP180 and CALM in endocytosis and disease. Biology of the Cell, 104: 588-602 (2012)

49. Meyerholz A, Hinrichsen L, Groos S, Esk P C, Brandes G, Ungewickell E J: Effect of clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein depletion on clathrin coat formation. Traffic, 6: 1225-1234 (2005)

50. Miller S E, Sahlender D A, Graham S C, Honing S, Robinson M S, Peden A A, Owen D J: The molecular basis for the endocytosis of small R-SNAREs by the clathrin adaptor CALM. Cell, 147: 1118-1131 (2011)

51. Moreau K, Fleming A, Imarisio S, Lopez Ramirez A, Mercer J, Jimenez-Sanchez M, Bento C, Puri C, Zavodszky E, Siddiqi F, Lavau C, Betton M, O`Kane C, Wechsler D, Rubinsztein D: PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. Nature Communications, 5:4998: (2014)

52. Morgen K, Ramirez A, Frölich L, Tost H, Plichta M, Kölsch H, Rakebrandt F, Rienhoff O, Jessen F, Peters O, Jahn H, Luckhaus C, Hüll M, Gertz H, Schröder J, Hampel H, Teipel S, Pantel J, Heuser I, Wiltfang J, Rüther E, Kornhuber J, Maier W, Meyer-Lindenberg A: Genetic interaction of PICALM and APOE is associated with brain atrophy and cognitive impairment in Alzheimer`s disease. Alzheimer's & Dementia, 10: 269-276 (2014)

53. Naj A C, Jun G, Beecham G W, Wang L S, Vardarajan B N, Buros J, Gallins P J, Buxbaum J D, Jarvik G P, Crane P K, Larson E B, Bird T D, Boeve B F, Graff-Radford N R, De Jager P L, Evans D, Schneider J A, Carrasquillo M M, Ertekin-Taner N, Younkin S G, Cruchaga C, Kauwe J S, Nowotny P, Kramer P, Hardy J, Huentelman M J, Myers A J, Barmada M M, Demirci F Y, Baldwin C T, Green R C, Rogaeva E, St George-Hyslop P, Arnold S E, Barber R, Beach T, Bigio E H, Bowen J D, Boxer A, Burke J R, Cairns N J, Carlson C S, Carney R M, Carroll S L, Chui H C, Clark D G, Corneveaux J, Cotman C W, Cummings J L, DeCarli C, DeKosky S T, Diaz-Arrastia R, Dick M, Dickson D W, Ellis W G, Faber K M, Fallon K B, Farlow M R, Ferris S, Frosch M P, Galasko D R, Ganguli M, Gearing M, Geschwind D H, Ghetti B, Gilbert J R, Gilman S, Giordani B, Glass J D, Growdon J H, Hamilton R L, Harrell L E, Head E, Honig L S, Hulette C M, Hyman B T, Jicha G A, Jin L W, Johnson N, Karlawish J, Karydas A, Kaye J A, Kim R, Koo E H, Kowall N W, Lah J J, Levey A I, Lieberman A P, Lopez O L, Mack W J, Marson D C, Martiniuk F, Mash D C, Masliah E, McCormick W C, McCurry S M, McDavid A N, McKee A C, Mesulam M, Miller B L, Miller C A, Miller J W, Parisi J E, Perl D P, Peskind E, Petersen R C, Poon W W, Quinn J F, Rajbhandary R A, Raskind M, Reisberg B, Ringman J M, Roberson E D, Rosenberg R N, Sano M, Schneider L S, Seeley W, Shelanski M L, Slifer M A, Smith C D, Sonnen J A, Spina S, Stern R A, Tanzi R E, Trojanowski J Q, Troncoso J C, Van Deerlin V M, Vinters H V, Vonsattel J P, Weintraub S, Welsh-Bohmer K A, Williamson J, Woltjer R L, Cantwell L B, Dombroski B A, Beekly D, Lunetta K L, Martin E R, Kamboh M I, Saykin A J, Reiman E M, Bennett D A, Morris J C, Montine T J, Goate A M, Blacker D, Tsuang D W, Hakonarson H, Kukull W A, Foroud T M, Haines J L, Mayeux R, Pericak-Vance M A, Farrer L A, Schellenberg G D: Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. Nature Genetics, 43: 436-441 (2011)

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

55. Nordstedt C, Caporaso GL, Thyberg J, Gandy SE, Greengard P: Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. Journal of Biological Chemistry, 268: 608-612 (1993)

56. O'Brien R J, Wong P C: Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. Annual Review of Neuroscience, 34: 185-204 (2011)

57. Ohsawa I, Takamura C, Morimoto T, Ishiguro M, Kohsaka S: Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. European Journal of Neuroscience, 11: 1907-1913 (1999)

58. Olmsted J B, Carlson K, Klebe R, Ruddle F, Rosenbaum J: Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. Proceedings of the National Academy of Science U.S.A., 65: 129-136 (1970)

59. Parikh I, Fardo D W, Estus S: Genetics of PICALM Expression and Alzheimer`s Disease. PLoS ONE [Electronic Resource], Volume 9, Issue 3, e91242: (2014)

60. Pimplikar S W: Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 41: 1261-1268 (2009)

61. Potter M D, Shinpock S G, Popp R A, Godfrey V, Carpenter D A, Bernstein A, Johnson D K, Rinchik E M: Mutations in the murine fitness 1 gene result in defective hematopoiesis. Blood, 90: 1850-1857 (1997)

62. Ross R A, Spengler B A, Biedler J L: Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. Journal of the National Cancer Institute, 71: 741-747 (1983)

63. Schipke C G, Jessen F, Teipel S, Luckhaus C, Wiltfang J, Esselmann H, Frolich L, Maier W, Ruther E, Heppner F L, Prokop S, Heuser I, Peters O: Long-term stability of Alzheimer's disease biomarker proteins in cerebrospinal fluid. Journal of Alzheimer's Disease, 26: 255-262 (2011)

64. Schjeide B M, Schnack C, Lambert J C, Lill C M, Kirchheiner J, Tumani H, Otto M, Tanzi R E, Lehrach H, Amouyel P, von Arnim C A, Bertram L: The role of clusterin, complement receptor 1, and phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein in Alzheimer disease risk and cerebrospinal fluid biomarker levels. Archives of General Psychiatry, 68: 207-213 (2011)

65. Schwartz C M, Cheng A, Mughal M R, Mattson M P, Yao P J: Clathrin assembly proteins AP180 and CALM in the embryonic rat brain. Journal of Comparative Neurology, 518: 3803-3818 (2010)

66. Selkoe D J: The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. Trends in Cell Biology, 8: 447-453 (1998)

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

68. Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham F L: Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. FASEB Journal, 16: 869-871 (2002)

69. Sunderland T, Linker G, Mirza N, Putnam K T, Friedman D L, Kimmel L H, Bergeson J, Manetti G J, Zimmermann M, Tang B, Bartko J J, Cohen R M: Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. Journal of the American Medical Association, 289: 2094-2103 (2003)

70. Suzuki M, Tanaka H, Tanimura A, Tanabe K, Oe N, Rai S, Kon S, Fukumoto M, Takei K, Abe T, Matsumura I, Kanakura Y, Watanabe T: The clathrin assembly protein PICALM is required for erythroid maturation and transferrin internalization in mice. PLoS ONE [Electronic Resource], 7: e31854 (2012)

71. Tebar F, Bohlander S K, Sorkin A: Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. Molecular Biology of the Cell, 10: 2687-2702 (1999)

72. Thinakaran G, Koo E H: Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. Journal of Biological Chemistry, 283: 29615-29619 (2008)

73. Tian Y, Bustos V, Flajolet M, Greengard P: A small-molecule enhancer of autophagy decreases levels of Abeta and APP-CTF via Atg5-dependent autophagy pathway. FASEB Journal, 25: 1934-1942 (2011)

74. Tian Y, Chang J C, Fan E Y, Flajolet M, Greengard P: Adaptor complex AP2/PICALM, through interaction with LC3, targets Alzheimer's APP-CTF for terminal degradation via autophagy. Proceedings of the National Academy of Science U.S.A., 110: 17071-17076 (2013)

75. Treusch S, Hamamichi S, Goodman J L, Matlack K E, Chung C Y, Baru V, Shulman J M, Parrado A, Bevis B J, Valastyan J S, Han H, Lindhagen-Persson M, Reiman E M, Evans D A, Bennett D A, Olofsson A, DeJager P L, Tanzi R E, Caldwell K A, Caldwell G A, Lindquist

S: Functional links between Abeta toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. Science, 334: 1241-1245 (2011)

76. van Es M A, van den Berg L H: Alzheimer's disease beyond APOE. Nature Genetics, 41: 1047-1048 (2009)

77. Wilcock D M, Griffin W S: Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis. Journal of Neuroinflammation, 10: 84 (2013)

78. Wisniewski K E, Wisniewski H M, Wen G Y: Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. Annals of Neurology, 17: 278-282 (1985)

79. Wu F, Matsuoka Y, Mattson M P, Yao P J: The clathrin assembly protein AP180 regulates the generation of amyloid-beta peptide. Biochemical & Biophysical Research Communications, 385: 247-250 (2009)

80. Xiao Q, Gil S C, Yan P, Wang Y, Han S, Gonzales E, Perez R, Cirrito J R, Lee J M: Role of phosphatidylinositol clathrin assembly lymphoid-myeloid leukemia (PICALM) in intracellular amyloid precursor protein (APP) processing and amyloid plaque pathogenesis. Journal of Biological Chemistry, 287: 21279-21289 (2012)

81. Xu W, Tan L, Yu J T: The Role of Picalm in Alzheimer`s Disease. Molecular Neurobiology, (2014)

82. Yao P J, Petralia R S, Bushlin I, Wang Y, Furukawa K: Synaptic distribution of the endocytic accessory proteins AP180 and CALM. Journal of Comparative Neurology, 481: 58-69 (2005)

83. Yao P J, Zhu M, Pyun E I, Brooks A I, Therianos S, Meyers V E, Coleman P D: Defects in expression of genes related to synaptic vesicle trafficking in frontal cortex of Alzheimer's disease. Neurobiology of Diseases, 12: 97-109 (2003)

84. Zhang Y W, Thompson R, Zhang H, Xu H: APP processing in Alzheimer's disease. Molecular Brain, 4: 3 (2011)

7 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (Seite 2): Amyloid-Plaques und Neurofibrillen, Quelle: Selkoe DJ, The cell biology of beta- amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer`s disease, Trends in Cell Biology 8(11): 447-453, 1998.

Abbildung 2 (Seite 4): Die Prozessierung von APP, Quelle: Abbildung erstellt nach Zhang et al., Processing of APP in Alzheimer`s Disease, Molecular Brain, 4:3, 2011.

Abbildung 3 (Seite 5): APP-Transport in Neuronen, Quelle: Modifiziert nach O`Brian RJ, Wong PC. 2011. APP processing and Alzheimer`s Disease. Annu. Rev. Neurosci. 34: 185-204.

Abbildung 4 (Seite 7): Der Picalm-SNP rs3851179 ist signifikant mit dem Alzheimer-Risiko assoziiert, Quelle: Modifiziert nach Harold D. et al. 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer`s disease. Nature Genetics 41: 1088 – 1093.

Abbildung 5 (Seite 9): VAMP-Transport durch AP180 und Picalm, Quelle: Abbildung entnommen aus Maritzen T. et al., Turning CALM into excitement: AP180 and CALM in endocytosis and disease. Biol. Cell (2012) 104, 585 – 602.

Abbildung 6 (Seite 10): Vergleich von Picalm-*Knock-out* (KO) (-/-) und Wildtyp-Mäusen (+/+), Quelle: Suzuki M. et al., The clathrin Assembly Protein PICALM is required for erythroid maturation and transferrin internalization in mice. PLoS ONE, 2012, 7, 2, e31854.

Abbildung 7 (Seite 22): Präparation der Hippocampi aus E16,5 Mausgehirnen, Quelle: Fath T et al.: Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons. Nature Protocols 4: 78 – 85 (2008).

Abbildung 8 (Seite 32): Endogenes Picalm liegt punktförmig verteilt im Zytoplasma vor, Quelle: eigene Ergebnisse.

Abbildung 9 (Seite 33): Endogenes Picalm kolokalisiert mit *Early Endosomes*, Quelle: eigene Ergebnisse.

Abbildung 10 (Seite 35): Die Überexpression von Picalm ist mit erhöhten Leveln von sAPPα und sAPPβ im Mediumüberstand von Hek293-Zellen assoziiert, Quelle: eigene Ergebnisse

Abbildung 11 (Seite 37): *Knock-down* von Picalm mittels siRNA, Quelle: eigene Ergebnisse.

Abbildung 12 (Seite 38): Eine verminderte Expression von Picalm ist mit tendeziell geringeren Leveln von sAPPβ im Mediumüberstand von Hek293-Zellen assoziiert, Quelle: eigene Ergebnisse.

Abbildung 13 (Seite 39): Die Überexpression von Picalm ist mit erhöhten Leveln von Amyloidβ im Mediumüberstand von Neuro2A-Zellen assoziiert, Quelle: eigene Ergebnisse

Abbildung 14 (Seite 40): Die intrazelluläre Lokalisation von endogenem Picalm und APP in Hek293- Zellen, Quelle: eigene Ergebnisse.

Abbildung 15 (Seite 41): Es lässt sich keine direkte Interaktion von Picalm und APP nachweisen, Quelle: eigene Ergebnisse.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bakterienstämme ..... Seite 13

Tabelle 2: Materialien für die Zellkultur ..... Seite 13

Tabelle 3: Materialien für die Bakterienkultur ..... Seite 13

Tabelle 4: Chemikalien und Laborbedarf ..... Seite 13

Tabelle 5: Puffer ..... Seite 15

Tabelle 6: Selbst angesetzte Lösungen ..... Seite 16

Tabelle 7: Antibiotika ..... Seite 16

Tabelle 8: Primärantikörper Westernblot ..... Seite 17

Tabelle 9: Primärantikörper Immuncytochemie ..... Seite 17

Tabelle 10: Sekundärantikörper Westernblot ..... Seite 17

Tabelle 11: Sekundärantikörper Immuncytochemie ..... Seite 18

Tabelle 12: DNA- und Proteinstandards ..... Seite 18

Tabelle 13: siRNA ..... Seite 18

Tabelle 14: Vektoren und DNA - Konstrukte ..... Seite 18

Tabelle 15: Kits ..... Seite 19

Tabelle 16: Geräte ..... Seite 19

Tabelle 17: Software ..... Seite 20

Tabelle 18: Calcium-Phosphat-Transfektion von Hek293-Zellen ..... Seite 22

Tabelle 19: sAPPα / β - Assay und Aβ Triplex - Assay ..... Seite 28

Tabelle 20: Ansetzen der ELISA-Standards ..... Seite 28

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. med. Christine von Arnim für das Ermöglichen dieser Arbeit und für ihre Anregungen, sowie bei der gesamten AG Arnim für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken.
Besonders möchte ich Frau Dr. Cathrin Schnack für die Betreuung während meiner Zeit im Labor und für das Korrekturlesen danken.
Außerdem bedanke ich mich bei Anke Wahler für zahlreiche Hilfestellung bei Laborarbeiten, sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit und bei Dr. Björn von Einem für seine Hilfe bei Laborarbeiten.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie für ihre aufmunternden Worte bedanken.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name:	Lisa Marina Di Giorgio
Geburtsdatum:	25.05.1989
Geburtsort:	Karlsruhe

Schulische Ausbildung

07/2008	Abitur (Note: 1,8) am Thomas-Mann-Gymnasium in Stutensee

Studium

10/2008 - 05/2015	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm

Staatsexamina

09/2010	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,5)
04/2014	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)
05/2015	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)

Famulaturen

03/2011	Urologie am Universitätsklinikum Ulm
09/2011	Neurologie am Universitätsklinikum Ulm
09/2012	Frauenheilkunde und Geburtshilfe an der Filderklinik Bonlanden
03/2013	Kinder - und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Ulm
09/2013	Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Gandaki Western Regional Hospital in Pokhara (Nepal)

Praktisches Jahr

05/2014 - 04/2015	Universitätsklinikum Ulm Wahlfach: Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Promotion

10/2011 - 07/2012	Stipendium des Promotionsprogramms Experimentelle Medizin der Universität Ulm
09/2012	Posterpräsentation auf dem 85. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie: „Überexpression des Alzheimer-Risikogens Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein beeinflusst die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins“ (L. Di Giorgio, C. Schnack, B. von Einem, A.Wahler, C.A.F. von Arnim)

Beruflicher Werdegang

seit 01/2016	Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des Krankenhauses Böblingen

Stuttgart, den 18.06.2016 _____