

# Die Funktion des Flotillin-2-Proteins bei der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Karwey-Schittek, Sina, geb. Karwey  
aus Ostercappeln

Gießen 2018

Aus dem Biochemischen Institut,  
unter der Leitung von Prof. Dr. Lienhard Schmitz,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen  
2. Gutachter: PD Dr. Barbara Ahlemeyer

Tag der Disputation: 04.04.2019

## **Inhaltsverzeichnis**

1.	Einleitung .....	1
1.1	Die Alzheimer-Erkrankung und APP.....	1
1.2	$\beta$ -Sekretase/BACE 1 .....	7
1.3	Flotilline .....	9
1.4	Flotillin und neurodegenerative Erkrankungen.....	13
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit .....	16
2.	Material .....	17
2.1	Materialien und Geräte .....	17
2.2	Chemikalien und Puffer .....	19
2.3	Antikörper .....	21
2.4	Primer .....	21
3.	Methoden.....	22
3.1	Studiendesign .....	22
3.2	Kollektiv.....	22
3.3	Präparation der Objekte.....	23
3.4	Bearbeitung der Hirnpräparate .....	24
3.4.1	Paraffineinbettung .....	24
3.4.2	Schneiden der Gewebe .....	24
3.4.3	Kongorot-Färbung nach Bannhold.....	25
3.4.4	Aufnahmetechniken .....	25
3.4.5	Auszählung der Schnitte.....	26
3.5	Genotypisierung der Mäuse .....	27
3.5.1	PCR – Polymerase-Kettenreaktion.....	27
3.5.2	Western Blot.....	28
3.6	Statistik.....	33

4.	Ergebnisse.....	34
4.1	Plaque-Bildung in Abhängigkeit von Flotillin-Expression.....	34
4.1.1	Analyse der $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen.....	35
4.1.2	Auswertung der untersuchten Gruppen.....	39
4.1.3	Altersabhängigkeit der $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen.....	42
4.2	Abhängigkeit von APP und Flotillin-2-Deletion.....	45
4.3	Wechselwirkung der Flotilline bei Knockout von Flotillin-2.....	46
4.4	Einfluss der Flotillin-2-Deletion auf die Mortalität.....	47
5.	Diskussion.....	49
5.1	Verteilung und Lokalisation der $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen.....	53
5.2	Zusammenhang zwischen Flotillin-2, APP und $\beta$ -Sekretase.....	54
5.3	Abhängigkeit von Flotillin-2-Deletion und $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen.....	56
5.4	Abhängigkeit von Flotillin-1 bei einer Flotillin-2-Deletion.....	58
5.5	Überlebenswahrscheinlichkeit und Ausbildung eines Phänotyps.....	60
5.6	Ausblick.....	63
6.	Zusammenfassung.....	65
7.	Summary.....	67
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	69
9.	Abbildungsverzeichnis.....	71
10.	Tabellenverzeichnis.....	72
11.	Literaturverzeichnis.....	74
12.	Ehrenwörtliche Erklärung.....	82
13.	Danksagung.....	83

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Alzheimer-Erkrankung und APP

Vor über hundert Jahren untersuchte Alois Alzheimer das Verhalten von Auguste D., einer geistig erkrankten Frau, die bereits im Alter von 40 Jahren kognitive Defizite entwickelte. Post mortem konnte er an seiner Patientin unter Verwendung der Silbermethode nach Bielschowsky nachweisen, dass neurofibrilläre Tangles und amyloide Plaques mit Demenz assoziiert werden können (Alzheimer *et al.* 1995). Die Alzheimer-Erkrankung ist heute eine der bekanntesten neurodegenerativen Erkrankungen weltweit. Die Inzidenzrate der neuen Fälle, die sich bei betroffenen Personen über einen bestimmten Zeitraum entwickeln, steigt von etwa 1 % jährlich bei Personen im Alter von 65 bis 70 Jahren auf etwa 6 % bis 8 % für Personen über 85 Jahre an (Chandra *et al.* 2001). Es konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in Raten oder Risikofaktoren der Alzheimer-Erkrankung festgestellt werden. Das kumulative Risiko für 65-jährige Frauen, eine Alzheimer-Erkrankung im Alter von 95 Jahren zu entwickeln, betrug 0,22 im Vergleich zu 0,09 für Männer. Das kumulative Risiko für die Entwicklung im Alter von 95 Jahren war bei Männern und Frauen ähnlich (Andersen *et al.* 1999). Die Erkrankungsdauer kann stark variieren und zwei bis 20 Jahre betragen. Zwei Populations-Studien zeigten, dass die mediane Überlebenszeit für Patienten bei drei bis vier Jahren liegt (Helmer 2001). Diese Zahlen unterstreichen, wie bedeutsam eine vertiefende Erforschung dieser neurodegenerativen Erkrankung ist.

Man unterscheidet eine früh und eine spät auftretende Form der Erkrankung, die sich epidemiologisch und ätiologisch unterscheiden. Die frühe Form ist seltener und häufig autosomal-dominant vererbt (Mayeux 2003). Es wurden Gendefekte und genetische Risikovarianten in verschiedenen Genen, unter anderem dem Amyloidvorläuferprotein (APP) auf Chromosom 21, dem Presenilin 1 (PS1) auf Chromosom 14 und dem Presenilin 2 (PS2) auf Chromosom 1, gefunden. Eine dominante Form der Alzheimer-Erkrankung beginnt hier schon in der dritten Lebensdekade. Häufigste Ursache sind die PS1-Mutationen (Rogaeva *et al.* 2001). Im Gegensatz dazu steht die altersbedingte Alzheimer-Erkrankung, die sich typischerweise erst nach dem sechsten Lebensjahrzehnt manifestiert. Sie macht über 95 % aller Fälle aus und hat eine komplexe Ätiologie (Mayeux 2003), die im folgenden Abschnitt erläutert werden soll.

Die klassische Triade der Alzheimerpathologie besteht aus Amyloid-Plaques, die aus  $\beta$ -Amyloid-Peptiden bestehen, neurofibrillären Tangles (NFTs) mit hyperphosphoryliertem Tau und weitverbreitetem neuronalen Verlust im Kortex und im Hippocampus (Golde 2003).

Im 20. Jahrhundert wurde die neurodegenerative Erkrankung intensiv erforscht. Zu den ersten und wichtigsten Entdeckungen gehörte 1984 das  $\beta$ -Amyloid-Peptid, das als das Kernpeptid von Amyloid-Plaques erkannt wurde (Glenner und Wong 1984).  $\beta$ -Amyloid ist ein physiologisch normales Produkt, das nicht nur im Gehirn von Alzheimer Patienten entsteht (Haass 2004). Im normalen Stoffwechsel werden diese Peptide kontinuierlich erzeugt, es kommt hier aber nicht zu einer Plaque-Bildung (Masters *et al.* 1985). *In vitro* ist  $\beta$ -Amyloid bei höheren Konzentrationen äußerst unlöslich und neigt zur Aggregatbildung (Lomakin *et al.* 1995). Es bilden sich die sogenannten senilen Plaques. Ihr Entstehungsprozess ist irreversibel und aus untersuchten Gewebeproben erkrankter Patienten geht deutlich hervor, dass eine Vielzahl der senilen Plaques in ihren Gehirnen vorhanden ist (Gordon 1981).

Das  $\beta$ -Amyloid-Peptid entsteht durch die enzymatische Spaltung von APP durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase. Die so entstandenen Bruchstücke sind die Hauptbestandteile der Plaque-Ablagerungen in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten (Matsui *et al.* 2007). APP wurde drei Jahre später als das  $\beta$ -Amyloid-Peptid von Goldgaber *et al.* beschrieben (Goldgaber *et al.* 1987). Er konnte dieses Protein nachweisen und zeigen, dass es mit 695 Aminosäuren codiert ist und seine Lokalisation auf dem Chromosom 21 hat. APP ist ein integrales Typ-I-Membranprotein mit einer extrazellulären N-terminalen Ektodomäne, einer Transmembranregion und einer kurzen C-terminalen zytosolischen Domäne (AICD: APP-intrazelluläre Domäne). APP ist Mitglied einer Proteinfamilie, die auch einige APP-ähnliche Proteine umfasst. Hierzu zählen APLP1 und APLP2, die eine hohe Sequenzähnlichkeit mit APP aufweisen (Eggert *et al.* 2004). APLP2 und APP zeigen weitgehend überlappende Expressionsmuster und werden ubiquitär, aber vermehrt im Gehirn exprimiert (Lorent *et al.* 1995). Nach seiner Synthese im ER wird APP über den sekretorischen Weg durch den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert.

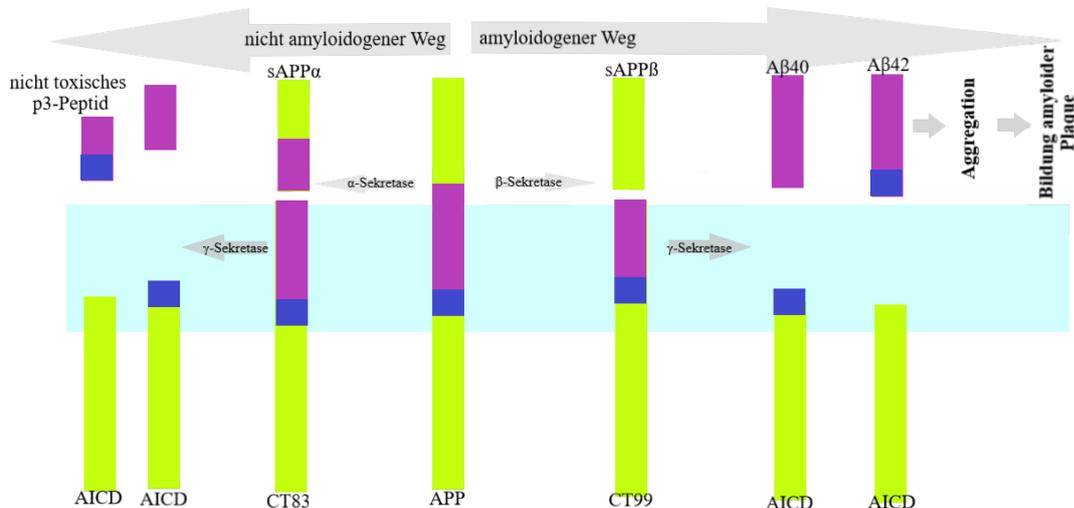
Während seines Durchgangs durch diese Kompartimente unterliegt APP mehreren posttranslationalen Modifikationen, wie N- und O-Glykosylierung, Phosphorylierung und Tyrosinsulfatierung. In weniger als 10 % der Zelltypen wird APP an der Zelloberfläche im stationären Zustand detektiert. Der Hauptpool von APP befindet sich in den Golgi-Regionen. In neuronalen Zellen konnte APP zusätzlich in Axonen und Synapsen nachgewiesen werden. Die zelluläre Lokalisierung von APP ist ein wichtiger Faktor für die Zugänglichkeit von APP als Substrat für die Sekretasen (Icking *et al.* 2007) (Zheng *et al.* 1998).

Die physiologische Funktion von APP rückte in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung, und es gibt einige Vorschläge, welche Funktionen APP, zusätzlich zu der Entstehung des  $\beta$ -Amyloid-Peptids, noch haben könnte. Dazu zählt die Theorie, dass APP und sein Produkt sAPP $\alpha$  in Zusammenhang mit dem Überleben von neuronalen Strukturen stehen (Mattson *et al.* 1993). Zudem wurde vorgeschlagen, dass APP als Zelladhäsionsmolekül und/oder Substratadhäsionsmolekül wirkt, da es an extrazelluläre Matrixkomponenten wie Heparin und Kollagen Typ I bindet (Multhaup 1994). Auch die Fähigkeit von APP, die Transkriptionsaktivierung zu fördern, könnte einen Hinweis darauf geben, dass es einen regulierenden Einfluss auf die Genexpression nehmen kann (Müller *et al.* 2008).

Der Zusammenhang zwischen der Alzheimer-Erkrankung und APP bzw. dem  $\beta$ -Amyloid-Peptid wurde schon in den Anfängen der Alzheimer-Forschung festgestellt. Die proteolytische Prozessierung erfolgt durch zwei alternative Wege: den amyloidogenen und den nicht-amyloidogenen Weg, die in verschiedenen subzellulären Kompartimenten lokalisiert sind und unterschiedliche biologische Effekte vermitteln. Bei dem amyloidogenen Weg wird APP durch die  $\beta$ -Sekretase, auch BACE-1 ( $\beta$ -site of APP cleaving enzyme) genannt, gespalten. Dies geschieht in seiner extrazellulären Domäne, wodurch zwei Fragmente entstehen: das sAPP $\beta$  (ein N-terminales Fragment) und CT99 oder CT89 (Chang und Suh 2010). Das CT99-Fragment wird anschließend in der Membran weiter aufgespalten. Eine weitere Verarbeitung des resultierenden carboxyterminalen Fragments durch die  $\gamma$ -Sekretase führt zur Freisetzung des  $\beta$ -Amyloid-Peptids und AICDs (Kimberly *et al.* 2001).

Da die  $\gamma$ -Sekretase-Spaltstelle leicht variieren kann, entstehen zwei unterschiedlich lange Produkte mit unterschiedlichen Eigenschaften, die als  $A\beta_{40}$  und  $A\beta_{42}$  bezeichnet werden (Haass *et al.* 1992). Ca. 90 % des erzeugten Peptids haben die  $A\beta_{40}$ -Form, während bei familiärer Alzheimer-Erkrankung vermehrt  $A\beta_{42}$  entsteht. Dies ist insofern ein Problem, als  $A\beta_{42}$  verstärkt aggregiert und somit krankheitsrelevanter ist (Borchelt *et al.* 1996).

Im Falle des nicht-amyloidogenen Weges wird die Spaltung des APPs durch die  $\alpha$ -Sekretase durchgeführt (Seals und Courtneidge 2003). Da diese innerhalb der  $A\beta$ -Domäne auftritt, schließt sie die Bildung von toxischen  $\beta$ -Amyloid-Peptiden aus. Stattdessen erzeugt es ein lösliches extrazelluläres Fragment, das als  $sAPP\alpha$  benannt wird, und das CT83 (ein C-terminales Fragment von APP). Das CT83 legt seinen Weg durch die Zelle zurück. Von der Plasmamembran bis hin zum endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Komplex. Das CT83-Fragment wird durch die  $\gamma$ -Sekretase in das nicht toxische  $p3$ -Fragment und die kurze C-terminale zytosolische Domäne gespalten (Suh und Checler 2002).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung Amyloid-Precursor-Protein (APP)-Prozessierung**

In der Abbildung sind die zwei alternativen Spaltungswege von APP im Zytoplasma und im Extrazellulärraum zu sehen. Dargestellt ist die Bildung von toxischen  $A\beta_{42}$ -Fragmenten (rechts) mit Angriffspunkten für die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase sowie die Bildung des löslichen extrazellulären Fragment  $sAPP\alpha$ , das durch die  $\alpha$ -Sekretase erzeugt wird (links). Gleichzeitig sind die Nebenprodukte wie  $sAPP\beta$  oder auch AICD in ihrem Entstehungsprozess dargestellt.

Die Vorgänge der amyloidogenen proteolytischen Prozessierung lassen vermuten, dass die Plaque-Größe konstant wächst, was aber durch experimentelle Daten widerlegt werden konnte. Stattdessen scheinen Größe und relative  $\beta$ -Amyloid-Belastung (Gesamtprozentatz) über einen längeren Zeitraum der Krankheit konstant zu bleiben (Arriagada *et al.* 1992).

Die vermehrte Bildung von A $\beta$ 42 bei erkrankten Patienten und dessen Eigenschaft der Aggregation führen letztendlich zur Plaque-Bildung. Diese amyloidogenen Peptide können entzündliche und neurotoxische Reaktionen im Gehirn hervorrufen, von denen angenommen wird, dass sie auch zu den klinischen Manifestationen von Alzheimer führen (Kao *et al.* 2004). Der Aufbau eines Plaques ist recht komplex. Senile Plaques bestehen aus einem porösen Kern mit Poren, einer charakteristischen Größe und einem diffusen Ring, dessen Dichte langsam vom Schwerpunkt des senilen Plaques abfällt. Cruz *et al.* schlugen daraufhin ein Modell vor, in dem die Bildung dieser porösen Objekte, deren Größenverteilung, Anzahl und  $\beta$ -Amyloid-Belastung relativ konstant bleiben. Seiner Theorie nach ist dies durch ein dynamisches Gleichgewicht in der Aggregation und der Disaggregation möglich (Cruz *et al.* 1997).

Zu den extrazellulären Veränderungen bei der Erkrankung treten auch intrazelluläre pathogene Veränderungen auf. Diese umfassen Ablagerungen von hyperphosphoryliertem  $\tau$ -Protein, einem Mikrotubuli-Protein, in Form von neurofibrillären Tangles. Über ihre sich wiederholenden Abschnitte werden  $\tau$ -Proteine in filamentären Strukturen miteinander verknüpft. Eine abnorme Hyperphosphorylierung der gepaarten helikalen Tau-Filamente (PHF) führt zu einem nicht mehr funktionellen Protein. Auch der Verlust von Neuronen und Synapsen konnte nachgewiesen werden (Dickson 2001). Wie die  $\beta$ -Amyloid-Belastung die Neurodegeneration induziert, ist unklar. In Studien mit kultivierten Zellen konnten Calciumhomöostase und oxidative Schädigungen gezeigt werden, die letztendlich zu Defekten in der Zellmembran führen. Ob  $\beta$ -Amyloid-induzierte Verletzungen in der Zellmembran mit der nachfolgenden Akkumulation von phosphoryliertem  $\tau$ -Protein zusammenhängen, konnte bis jetzt nicht geklärt werden. Es gibt jedoch zusätzliche Beweise, dass die Ansammlung von  $\tau$ -Ablagerungen in Neuronen selbst neurotoxisch ist (Sisodia und St George-Hyslop 2002).

Klinisch konnten weitere Studien zeigen, dass Beeinträchtigungen in zwei kognitiven Domänen die kognitiven Anomalien charakterisieren, die im frühen Stadium der Alzheimer-Erkrankung beschreibend sind. Diese kognitiven Domänen beziehen sich auf Gedächtnis- und Führungskompetenzfähigkeit. Dies zeigt sich insbesondere bei Speicher-Test-Ergebnissen, die den Unterschied zwischen dem sofortigen und dem verzögerten Abruf und den Aufgaben widerspiegeln und folglich eine Beurteilung der kognitiven Flexibilität ermöglichen. Die Untersuchungen der Hippocampusbildung des parahippocampalen Gyrus, des amygdalo-hippocampalen Komplexes und des temporalen Horns der lateralen Ventrikel zeigen signifikante Unterschiede zwischen schwach beeinträchtigten Alzheimer-Patienten und einer Kontrollgruppe über ein breites Spektrum von Studien mit einer Vielzahl von Techniken (Albert 1996).

## 1.2 $\beta$ -Sekretase/BACE 1

Zur Jahrtausendwende veröffentlichten verschiedene Forschungsgruppen Ergebnisse über die molekulare Klonierung von  $\beta$ -Sekretase und benannten sie als BACE1 (Vassar 1999),  $\beta$ -Sekretase (Sinha *et al.* 1999), Asp2 (Verpoorten *et al.* 2006) oder Memapsin 2 (Lin *et al.* 2000). BACE1 wird in allen Geweben exprimiert mit dem höchsten Expressionsniveau im Gehirn. Es zählt zu den intrazellulären Typ-I-Transmembran-Proteinen (Fukumoto 2002). Es kann von frühen Endosomen oder auch von Recycling-Endosomen aufgenommen und modifiziert werden (Vassar 1999). Da BACE1 das erste katalytisch aktive Enzym der  $\beta$ -Amyloid-erzeugenden Kaskade darstellt, kann diese Verarbeitung von APP als der Geschwindigkeitsbegrenzungsschritt betrachtet werden (Hardy und Higgins 1992). Seine Reifung erhöht die katalytische Aktivität des Enzyms um mindestens das Zweifache über die des unreifen BACE1. Darüber hinaus erhöht ein niedriger pH-Wert die Aktivität (Vassar *et al.* 2009). Die Reifung von BACE1 beginnt innerhalb des Lumens des ER, wo eine Glykosylierung an vier Asn-Resten stattfindet (Haniu *et al.* 2000). Anschließend wird es einer transienten Acetylierung an sieben Arg-Resten unterzogen (Costantini *et al.* 2007). Eine weitere Zugabe von komplexen Kohlenhydraten und die Entfernung der BACE1-Prodomäne durch Furin-Konvertasen erfolgen im Golgi-Kompartiment (Bennett *et al.* 2000). Die Wichtigkeit von BACE1 bei der Erzeugung von  $\beta$ -Amyloid wurde durch den Versuch an homozygot deletierten BACE1-Mäusen gezeigt. An ihnen konnte keine  $\beta$ -Amyloid-Bildung nachgewiesen werden (Roberds 2001).

Mäuse, denen BACE1 fehlt, sind gesund, fruchtbar und erscheinen in der makroskopischen Anatomie, Gewebehistologie, Hämatologie und klinischen Chemie normal. Diese Ergebnisse liefern eine Validierung von BACE1 als hauptsächlicher  $\beta$ -Sekretase *in vivo* und legen nahe, dass die therapeutische Hemmung von BACE1 für die Behandlung der Alzheimer-Erkrankung einen durchaus wichtigen Ansatz liefern könnte (Luo *et al.* 2001). Neuere Studien konnten ebenso aufzeigen, dass das Niveau von BACE1-Protein und seine Aktivität im Alzheimer-Hirn etwa zweifach erhöht sind (Fukumoto 2002) im Vergleich zu nicht erkrankten Probanden. Dies deutet auf die Möglichkeit hin, dass die BACE1-Expression entweder zunimmt oder gar die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung initiieren oder beschleunigen kann (Vassar *et al.* 2009). Nach der Entdeckung von BACE1 wurde kurze Zeit später ein Homolog identifiziert und BACE2 genannt. BACE1 und BACE2 ähneln sich in 64 % ihrer Aminosäuresequenz. BACE2 wird jedoch in einem niedrigeren Niveau in Neuronen exprimiert und auch die Spaltungsaktivität von APP ist geringer (Vassar *et al.* 2009).

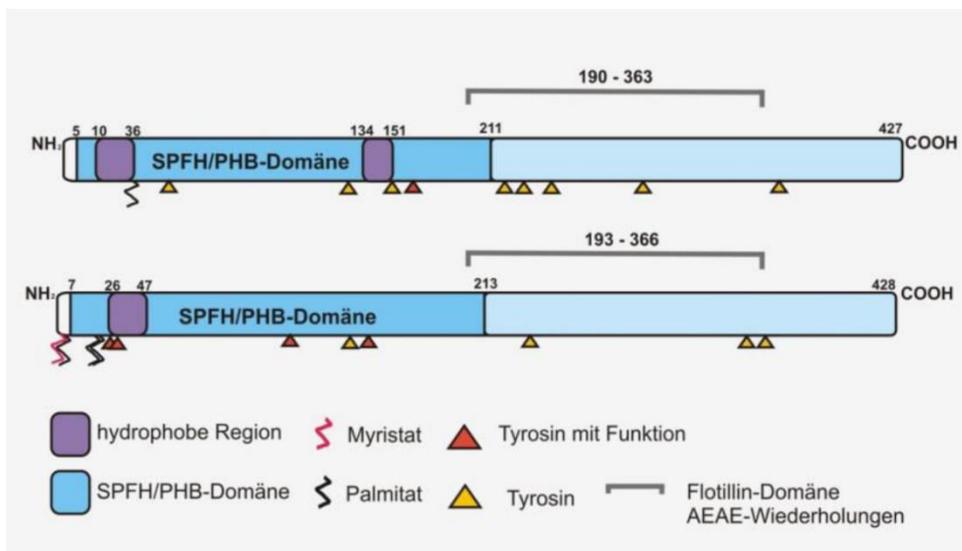
### 1.3 Flotilline

Im Gegensatz zu Säugetieren regenerieren sich die Nervengang-Axone von Fischen, wenn der Sehnerv durchtrennt wird. Hier konnten die Proteine Reggie-1 und Reggie-2 identifiziert werden, die in den retinalen Ganglienzellen und Netzhautaxonen dieser sich regenerierenden Neuronen hochreguliert wurden. Der Name Reggie leitete sich von dem Wort Regeneration ab (Schulte *et al.* 1997). Bickel *et al.* entdeckten dieses Phänomen zeitgleich und veröffentlichten es 1997. Um zu betonen, dass diese Proteine eine neu erkannte Genfamilie darstellten, schlugen sie vor, Reggie künftig in Flotillin umzubenennen (Bickel *et al.* 1997). Für Reggie-2 wurde später der heute offizielle Name Flotillin-1 festgelegt und Reggie-1 in Flotillin-2 umbenannt. Die neue Namensgebung soll auf die Fähigkeit der Proteine hinweisen, in bestimmten Dichtegradienten zu schwimmen (Bickel *et al.* 1997).

Die evolutionäre Bedeutung zeigt sich bei den Flotillinen in der guten Konservierung. Zusätzlich ist eine hohe Similarität zwischen einigen Spezies nachgewiesen worden. Flotilline enthalten am N-Terminus eine weitgehend uncharakterisierte Domäne, die als Prohibitin-Homologie(PHB)-Domäne oder SPFH-Domäne (Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HfIK/C-Domäne) bezeichnet wird. Diese Domäne ist evolutionär konserviert und wird von mehreren eukaryotischen und prokaryotischen Membranproteinen wie Stomatin, Podocin und Prohibitin geteilt. Sie haben vielfältige Funktionen (Morrow *et al.* 2002), die bis heute noch nicht vollständig bekannt sind (Neumann-Giesen *et al.* 2004).

Beide C- und N-Termini stehen dem Zytosol gegenüber. Die Verankerung in der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran erfolgt durch Acylierung. Flotillin-2 wird an Gly2 myristyliert und hauptsächlich an Cys4 palmityliert und zu einem geringen Grad an Cys19 und Cys20. Flotillin-1 fehlt eine Myristylierungsstelle, es wird aber an Cys34 und auch an Cys5 und Cys17 palmityliert.

Da Flotillin-1 unter bestimmten Umständen in den Kern translozieren kann, sind Flotillin-Mikrodomänen nicht nur stabile Gerüste, sondern auch dynamische Einheiten mit eigenen regulatorischen Funktionen (Langhorst *et al.* 2005). Solis *et al.* haben 2007 veröffentlicht, dass Tetramere die hauptoligomere Form von Flotillin in N2a-Zellen sind. Die endgültige Größe der Flotillin-Strukturen bleibt unklar, obwohl aus den immunelektronischen Daten von Solis *et al.* hervorgeht, dass die Flotillin-Mikrodomänen etwa 0,05 bis 0,1  $\mu\text{m}$  groß sein sollen. Sie vermuten, dass mehrere hundert Flotillin-Proteine dazu beitragen, multimere Cluster zu bilden (Solis *et al.* 2007).



**Abbildung 2: Domänenstruktur von Flotillinen, modifiziert nach Kühne *et al.* 2015**

In der Abbildung ist eine schematische Darstellung der Flotilline gezeigt, in der die posttranslationalen Lipidmodifikationen zu sehen sind. Diese Modifikation ist eine wichtige Voraussetzung für die Membranlokalisation. Flotilline gehören zu der SPFH-Protein-Superfamilie. Sie enthalten eine C-Terminal lokalisierte Flotillin-Domäne, die aus kurzen Alanin (A)- und Glutamat (E)-Sequenzmotiven besteht. Es sind Unterschiede zwischen den Flotillinen zu erkennen. Flotillin-1 ist palmitoyliert an der Aminosäure Cystein 34, wohingegen Flotillin-2 an Glycin 2 myristyliert und an Cystein 4, 19 und 20 palmitoyliert ist.

Flotilline scheinen voneinander abhängig zu sein (Amaddii *et al.* 2012). Beweise für die Wechselwirkung zwischen Flotillin-1 und Flotillin-2 wurden durch Solis *et al.* 2007 in siRNA-Studien erbracht: Die Deletion von Flotillin-2 führt zu einem gleichzeitigen Verlust von Flotillin-1-Proteinen. Umgekehrt tritt dieses Phänomen nicht so stark auf, ist aber auch vorhanden (Solis *et al.* 2007).

Flotillin-1 und Flotillin-2 weisen eine ubiquitäre Gewebsverteilung auf (Volonte *et al.* 1999). Ihre Expression ist besonders hoch in Zellen, denen Caveolin fehlt, z. B. Neuronen (Lang *et al.* 1998). Die Endozytose von Flotillin-2 verläuft unabhängig von Clathrin und benötigt kein Caveolin oder Dynamin-2 (Neumann-Giesen *et al.* 2007). Zusätzlich zu ihrer bevorzugten Lokalisierung an der Plasmamembran konnten Flotilline an verschiedenen vesikulären Oberflächen innerhalb der Zelle nachgewiesen werden (Langhorst *et al.* 2005). Flotillin-1 und Flotillin-2 sind beide konstitutiv mit Sphingolipid- und Cholesterol-angereicherten Membran-Mikrodomänen assoziiert, die als Membrane Rafts bekannt sind (Bickel *et al.* 1997). Gerade Flotillin-1 wird oft als ein Markerprotein für Membrane Rafts verwendet (Kurrle *et al.* 2012). Man nimmt an, dass Flotilline in einer Reihe von zellulären Kontexten funktionieren, einschließlich Signalgebung, Endozytose und Wechselwirkungen mit dem Zytoskelett. Es konnte gezeigt werden, dass Flotillin-1 für die axonale Regeneration von retinalen Ganglienzellen notwendig ist (Munderloh *et al.* 2009) und für die Differenzierung und das Wachsen von Hippocampusneuronen, während es zusätzlich die Bildung von glutamatergen Synapsen im Hippocampus fördert (Swanwick *et al.* 2010). Hier sollte aber von einer Verallgemeinerung der Erkenntnisse abgesehen werden, da die Regenerationsfähigkeit des Sehnervs bei Menschen nicht gegeben ist.

Flotillin-1 wurde zudem als evolutionär konserviertes, Gedächtnis-assoziiertes Protein identifiziert, das an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt ist (Monje *et al.* 2013). Früh wurde über die funktionelle Beteiligung von Flotillin an der Zelladhäsion diskutiert (Schulte *et al.* 1997). Eine tatsächliche Beteiligung von Flotillinen bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsstrukturen konnte in einigen Studien aufgezeigt werden. Einblicke in eine funktionelle Assoziation von Flotillinen mit Adhärenz-Verbindungen (Zell-Zell-Kontakttyp) wurden in einer Studie von Bodrikov *et al.* 2011 gezeigt.

Hier ließ sich erkennen, dass ein vorübergehender Knockdown von Flotillin-2 in primären hippocampalen Neuronen das Wachstum und die Differenzierung von Axonen stört (Bodrikov *et al.* 2011). Die Vermutung, dass Flotilline für die endosomale Sortierung und das Recycling von spezifischen Frachtmolekülen wichtig sind, zeigte sich im Laufe der Flotillin-Forschung auf. Auch eine Rolle bei der Endozytose von APP konnte in diesem Zusammenhang dargestellt werden, deren amyloidogene Verarbeitung die Endozytose erfordert (Schneider *et al.* 2008). Flotilline sind wichtig für die endosomale Sortierung und das Recycling von spezifischen Frachtmolekülen. Somit ist der Endozytoseweg von den Flotillinen abhängig, aber eine direkte Beteiligung konnte nicht nachgewiesen werden (Meister und Tikkanen 2014).

Eine weitere Funktion der Flotilline ist die Beteiligung an der EGFR/MAP-Kinase-Signalgebung. Hier kann der Knockdown von Flotillin-1 zur Beeinträchtigung der EGFR-Phosphorylierung sowie der MAPK-Signalgebung führen (Amaddii *et al.* 2012). Funktionelle Rollen von Flotillin-Proteinen in den Insulin- und NGF-Signalkaskaden wurden seit Anfang 2000 diskutiert. Wesentliche metabolische Prozesse wie Glukose- und Lipidumsatz werden durch Insulin kontrolliert. Die Insulinbindung an die extrazellulären Untereinheiten der Insulinrezeptor-Tyrosinkinase induziert eine Konformationsänderung und führt zur Autophosphorylierung mehrerer Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil des Insulinrezeptors. Es konnte gezeigt werden, dass Flotillin-1 bei der Insulin-Stimulation einen ternären Komplex mit c-Cbl-assoziiertem Protein (CAP) und der E3-Ubiquitin-Protein-Ligase Cbl bildet. Dies erwies sich als wichtig für die Assoziation von Membran Rafts, die Signalweiterleitung des CAP-Cbl-Komplexes und die eigentliche Glukoseaufnahme (Baumann *et al.* 2000).

Obwohl sie im gesamten evolutionären Spektrum nahezu ubiquitär vorkommen und anscheinend in allen Säugetiergeweben exprimiert werden, sind die verschiedenen Untersuchungen noch nicht vollständig erschöpft und es gibt noch einige molekulare Details, die erforscht werden müssen, um die verschiedenen Rollen der Flotilline zu verstehen.

## 1.4 Flotillin und neurodegenerative Erkrankungen

Die Auswirkungen von Flotillin auf neurodegenerative Erkrankungen wurden im Zusammenhang mit einer der bekanntesten Erkrankungen in diesem Bereich untersucht: der Alzheimer-Erkrankung. Es zeigten sich aber auch in an anderen Erkrankungen Überschneidungen, die im folgenden Abschnitt erläutert werden sollen.

2003 konnte gezeigt werden, dass Flotillin-1 sich in Zellkörpern von Neuronen ansammelt. Dieses geschieht vor allem in denen, die neurofibrilläre Tangles enthalten (Girardot *et al.* 2003). Durch ihre erhöhte Expression im neuronalen Gewebe gelten Flotilline hier als klassische Membran-Raft-Marker, typischerweise in Pyramidenneuronen und Astrozyten (Kurrle *et al.* 2012). Eine besonders hohe Flotillin-1-Expression zeigt sich bei weiter fortschreitender Alzheimer-Erkrankung. Dies fanden Kokubo *et al.* in parallel laufenden Studien mit Alzheimer-Patienten, Patienten mit Down-Syndrom und nichtdementen Probanden heraus. Diese Erkenntnis unterstützt die Theorie, dass zwischen der Alzheimer-Erkrankung und Flotillin ein Zusammenhang besteht. 2008 wurde durch Zellkulturversuche von Schneider *et al.* gezeigt, dass Flotilline bei der Endozytose von APP eine wichtige Rolle einnehmen (Schneider *et al.* 2008). Erste Beobachtungen, die Flotilline mit APP verknüpften, umfassen die Flotillin-1-Färbung von  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen in Gehirnschnitten von Patienten mit der Alzheimer-Krankheit. Es wurde festgestellt, dass eine Überproduktion des  $\beta$ -Amyloid-Peptids zur Akkumulation in Flotillin-1-positiven Endosomen führte (Rajendran *et al.* 2007). In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Domäne von APP mit Flotillin-1 wechselwirkt (Chen *et al.* 2006). Schneider *et al.* konnten auf diese Erkenntnisse aufbauen und veröffentlichen, dass ein Knockdown von Flotillin-2 die Endozytose von APP sowohl in Neuroblastomzellen als auch in Primärkulturen von Hippocampusneuronen beeinträchtigt und auch die Produktion des  $\beta$ -Amyloid-Peptids beeinflusst (Schneider *et al.* 2008). Die genaue funktionelle Bedeutung des Zusammenspiels von APP und Flotillin ist bis heute nicht vollständig geklärt. Eine Theorie könnte sein, dass Flotilline als Gerüstproteine fungieren, um eine Plattform für das Clustering von APP und die daraus resultierende Endozytose zu bilden (Schneider *et al.* 2008). Nachgewiesen ist, dass Flotillin-1 direkt an das Dileucin-Motiv im zytoplasmatischen Schwanz von BACE1 bindet, während die Flotillin-2-Bindung hauptsächlich durch eine Wechselwirkung mit Flotillin-1 vermittelt wird.

Ein Knockdown der Flotilline führt zu einer veränderten subzellulären Lokalisierung von BACE1 in Endosomen und zur Stabilisierung des BACE1-Proteins. Auch die amyloidogene Verarbeitung des Alzheimer-Amyloid-Vorläuferproteins ist erhöht. Somit zeigt die Studie von John *et al.* zum ersten Mal, dass Flotilline an der endosomalen Sortierung von BACE1 beteiligt sind. Da die endosomale Lokalisation von BACE1 seine Funktion als  $\beta$ -Sekretase beeinflusst, indem es die amyloidogene Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins erhöht, könnten Flotilline eine neue Rolle bei der Alzheimer-Krankheit spielen (John *et al.* 2014).

Weitere untersuchte Erkrankungen sind zum einen die Encephalomyelitis und die multiple Sklerose. Die experimentelle autoimmune Encephalomyelitis ist das künstlich erzeugte Modell einer Autoimmunkrankheit. Hier kommt es zur Entzündung und manchmal auch Demyelinisierung des zentralen Nervensystems, wie es zum Beispiel bei der multiplen Sklerose der Fall ist. Es findet hauptsächlich bei Nagetieren Anwendung. Es konnte eine erhöhte Konzentration der Membran-Raft-assoziierten Proteine wie Caveolin im Rückenmark während des frühen Stadiums der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis nachgewiesen werden (Shin *et al.* 2005). Flotillin-1 zeigte während des Spitzenstadiums der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis ähnliche Werte wie Caveolin. Die immunhistochemische Analyse zeigte eine verstärkte Expression von Flotillin-1 in der dorsalen Hornschicht und in einigen Flotillin-1-positiven Makrophagen und Astrozyten. Diese Ergebnisse können auf eine wichtige Funktion der Flotilline in Immun- und Nervenzellen im zentralen Nervensystem hinweisen (Kim *et al.* 2006).

Flotillin-1-Färbung in Rattenhirnschnitten zeigte eine deutliche Markierung im Zytoplasma von Katecholamin-freisetzenden Zellen und eine hochregulierte Genexpression von Flotillin-1 in der Substantia nigra des Parkinson-Gehirns (Jacobowitz und Kallarakal 2004). Das Parkinson-Syndrom ist eine chronische neurologische Erkrankung, die durch degenerative Veränderungen im extrapyramidal-motorischen System ausgelöst wird. Hier sind besonders die Basalganglien betroffen. Hier kommt es zu einem progredienten Untergang von melanhaltigen Neuronen in der Substantia nigra, die den Neurotransmitter Dopamin synthetisieren und auf die cholinergen Neurone des Striatums hemmend einwirken.

Die Folge ist vor allem eine Störung in der Motorik des Patienten, daneben können aber auch psychische, sensorische und vegetative Funktionen betroffen sein.

## 1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Flotilline wurden in verschiedenen Studien mit Proteinaggregat-induzierten neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer, in Verbindung gebracht. Die genauen Zusammenhänge sind bis heute nicht geklärt.

Der Hauptteil dieser Arbeit soll zeigen, ob es in  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen klar erkennbare Unterschiede zwischen Flotillin-2-deletierten und Wildtyp- bzw. heterozygoten Mäusen gibt. Hierfür wurde ein Mausmodell mit APP-transgenen Tieren verwendet. Mit Hilfe der Ergebnisse sollen mögliche Wechselwirkungen von Flotillin-2 auf die Alzheimer-Erkrankung dargestellt werden.

Weiterhin soll die Wechselwirkung von fehlendem Flotillin-2 zu Flotillin-1 im Gehirn dargestellt werden. Es soll die Frage beantwortet werden, welchen Einfluss die Deletion von Flotillin-2 auf die Expression von Flotillin-1 hat.

Da die proteolytische Verarbeitung von APP nach Stand der heutigen Untersuchungen als ein wichtiger Grund für die Alzheimer-Erkrankung gesehen wird, soll in dieser Arbeit zusätzlich der Zusammenhang zwischen APP und Flotillin-2 genauer betrachtet werden. Es wird die Mortalität der untersuchten Mäuse analysiert und ausgewertet.

## 2. Material

### 2.1 Materialien und Geräte

In dieser Arbeit verwendete Materialien und Geräte mit dazugehörigen Herstellern sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte mit dem jeweiligen Hersteller und dessen Niederlassung.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Neolab, Heidelberg (DE)
CryoPure Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Durchlichtmikroskop	Carl Zeiss, Göttingen (DE)
Entwickler Maschine (Curix 60)	AGFA, Düsseldorf (DE)
Photo Entwickler	Calbe-Chemie, Stadtfeld (DE)
Filter-Papier	Whatman, Dassel (DE)
Fließpapier	
Fluoreszenz-Mikroskop- LSM T-PMT 710	Carl Zeiss, Göttingen (DE)
Frischhaltefolie	Papstar, Kall (DE)
Feinhaar Pinsel	Faber Castel, Stein (DE)
Photo Fixierer	Calbe-Chemie Unimatic-F
Glas-Pasteurpipetten (230 mm)	VWR International, Darmstadt (DE)
Glaskolben	Schott, Mainz (DE)
Gießförmchen aus Metall für Paraffinblöcke	Leica Bio Systems (DE)
Heizblock	Laborgeräte München, München (DE)
Kugelmühle MM200	Retsch (DE)
Mikrotiterplatte (96 Well)	Greiner Bio-One (DE)
Neutralharz	Sigma-Aldrich (DE)
Nitrocellulose- Membran	Whatman, Dassel (DE)
Objektträger	Roth, Karlsruhe (DE)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Brampton (Kanada)
Parafin Gießstation	
Pipettierhilfe accu jet®	Brand, Wertheim (DE)
Pipetten (2, 5, 10, 20, 100, 200, 1000 µl, 5, 10 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (DE)
Polystyrolküvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Röntgenfilm	FUJIFILM, Düsseldorf (DE)
Röntgenkassette	Amersham Biosciences (UK)
Schlittenmikrotom	
Schüttler (KS-15)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (DE)
SDS-PAGE Kammer	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
SDS-Gel-Gießkammer	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Spannungsquelle (Elektrophoresis power supply, EPS 301)	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)

Spektralphotometer (BioPhotometer plus)	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf (DE)
Sterilbank (Herasafe KS)	Thermo Scientific, St.Leon-Rot (DE)
Tecan infinite M 200	Tecan, Crailsheim (DE)
Thermocycler (T-Personal Combi)	Biometra (DE)
Vortex Bio Vortex V1	PEQLAB, Erlangen (DE)
Waage Toledo PB602- S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen (DE)
Wärmeplatte	
Wärmeschrank	Hereus (DE)
Western- Blotsystem Criterion Blotter	Bio Lab Laboratories GmbH, München (DE)
Zentrifuge, Heraeus Biofuge pico	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (DE)
Zentrifuge, Micro 22 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Zentrifuge, Universal 32 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)

## 2.2 Chemikalien und Puffer

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien, Puffer und Lösungen sind mit deren Herstellern und den dazugehörigen Niederlassungen bzw. deren Zusammensetzung in den Tabellen 2 und 3 aufgelistet.

**Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungen mit dem jeweiligen Hersteller und dessen Niederlassung**

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid	Roth, Karlsruhe (DE)
Agarosegel 1,5%ig	Roth, Karlsruhe (DE)
Ammoniumpersulfat (APS)	Appllichem, Darmstadt (DE)
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe (DE)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Bradford Reagenz	BioRad, München (DE)
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe (DE)
BSA (Bovine Serum Albumine)	PAA, Cölbe (DE)
Cumarsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
ECL-Lösung	eigene Herstellung
Essigsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt (DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
DNA-Größenmarker	eigene Herstellung
DNA-Ladepuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt (DE)
flüssigem Stickstoff	LindeAG, Pullach (DE)
Glycin	AppliChem, Darmstadt (DE)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 10%	AppliChem, Darmstadt (DE)
Isofluran	Baxter (DE)
Isopropanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Kongorot	Roth, Karlsruhe (DE)
Lithiumcarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Luminol	AppliChem, Darmstadt (DE)
Magnesiumchlorid	AppliChem, Darmstadt (DE)
Methanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumlaurylsulfat	Roth, Karlsruhe (DE)
NP-40	Fluka Analytics, München (DE)
Paraffin	Roth, Karlsruhe (DE)
PFA-PBS	Roth, Karlsruhe (DE)
Ponceau S	Roth, Karlsruhe (DE)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Proteinase K	Roth, Karlsruhe (DE)
Proteinmarker	BioRad, München (DE)

Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe (DE)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe (DE)
Triton X-100	PharmaciaBiotech (DE)
Tween	Roth, Karlsruhe (DE)
Xylol	Roth, Karlsruhe (DE)

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung

Blockierungspuffer	TBST (Tris buffered saline & Tween 20) 5 % Milchpulver
Blottingpuffer (1 x)	192 mM Glycin 25 mM Tris-Basis 10 % Methanol
ECL-Lösung	1M Tris-HCL 250 mM Luminol in DMSO 90 mM Cumarsäure
Lämmli-Gelelektrophorese-Laufpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-Basis 0,1 % Natriumlaurylsulfat (SDS)
Lysepuffer Schwanzbiopsie	Schwanz-Verdau (10 x) Puffer Proteinase K (Stammlösung 20 mg/ml) β-Mercaptoethanol
SDS Polyacrylamidgel	3 M Tris pH 8,8 3 M Tris pH 6,8 20 % Natriumlaurylsulfat (SDS) Acrylamid Tetramethylethylendiamin (TEMED) Ammoniumpersulfat
Ponceau-Färbelösung	1 % Ponceau S 5 % Essigsäure
Stürmer-Lysat-Puffer	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40
Schwanz-Verdau (10 x) Puffer	670 mM Tris, pH 8,8 166 mM Ammoniumsulfat 65 mM Magnesiumchlorid 0,5 Triton X-100
TBST (Tris buffered saline + Tween 20)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM Natriumchlorid 0,05 % Tween

## 2.3 Antikörper

In den Tabellen 4 und 5 sind die in der Arbeit für den Western Blot eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper aufgeführt.

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primärantikörper, der jeweiligen Verdünnungen und eingesetzten Volumina sowie deren Hersteller**

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung *WB	Hersteller
APP	Kaninchen	1:1000	eigene Herstellung
BACE-1	Maus	1:5000	Geschenk von Bart De Strooper
GAPDH	Maus	1:10000	Abcam, Tel Aviv (ISR)
FLOT 1	Kaninchen	1:1000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
FLOT 2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Cambridge (UK)

\*WB=Western Blot

**Tabelle 5: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Sekundärantikörper, der jeweiligen Verdünnungen und der Hersteller**

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung *WB	Hersteller
Anti-Maus HRP	Ziege	1:5000	Dako Denmark A/S, Glostrup (DNK)
Anti-Kaninchen HRP	Ziege	1:5000	Dako Denmark A/S, Glostrup (DNK)

\*WB=Western Blot

## 2.4 Primer

Die eingesetzten Primer und ihre Sequenzen sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 6: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Primer und ihrer Sequenzen**

Primer	Sequenz	
Bct fwd und rev	Bct-fwd: 5'-ttcagatttctgagcccttcctgagtag-3' Bct-rev: 5'agctataaggcttctacgctaccgtcc-3'	FLOT 2
Flp fwd und rev	Flp-fwd: 5'-tgcggcctctacagttgggtaacc-3' Flp-rev: 5'-catgcaacagggtccttgggtgc-3'	WT
APP fwd und rev	APP-fwd: 5'-ggtgagtttgaagtgatgcc-3' APP-rev: 5'-tcttcttccacctcagc-3'	APP

### 3. Methoden

#### 3.1 Studiendesign

Es handelt sich in dieser Arbeit um eine verblindete Studie. Während der Auswertung waren Geschlecht, Alter und Genotyp der Mäuse nicht bekannt, sodass eine Beeinflussung der auswertenden Person verhindert wurde. Es wurde eine Parallelisierung durchgeführt, um die Repräsentativität und Vergleichbarkeit zu erhöhen.

#### 3.2 Kollektiv

Der Tierversuch lief unter dem Aktenzeichen V54-19c 20/15(1) GI 20/2 Nr. 100/2011 des Regierungspräsidiums Gießen. Die zur Züchtung verwendete Flotillin-2-Knockout-Mauslinie (B6;129-Flot2<sup>tm</sup>) wurde mit einer kommerziell erhältlichen APP-überexprimierenden Mauslinie, die ab einem Alter von acht bis zehn Monaten typische Symptome der Alzheimer-Erkrankung aufweist, verpaart, um eine neue transgene Flotillin-2-Mauslinie zu erhalten, die APP überexprimiert. Es wurde die Mauslinie B6.Cg-Tg(PDGFB-APPSwInd)20Lms/2J (kurz: J20) verwendet. Die Mäuse produzieren eine größere Menge des humanen APP, das in drei Aminosäuren eine Mutation (K670N, M671L, V717F) aufweist. Diese sogenannten ‚schwedischen‘ und ‚Indiana‘-Mutationen treten häufig bei Patienten mit familiärer Alzheimer-Erkrankung auf und begünstigen die Entstehung des  $\beta$ -Amyloid-Peptids aus APP. Die Mauslinie J20 wurde im Jahr 2000 von L. Mucke generiert (Mucke *et al.* 2000). J20-Mäuse sind fertil und eignen sich zur Verpaarung mit anderen Mauslinien. Die gezüchtete Linie, die in dieser Arbeit verwendet wurde, wird als B6;129-Tg(PDGFB-APPSwInd) Flot2<sup>tm</sup> bezeichnet. Die gezüchteten Tiere zeigten keinen auffälligen Phänotyp.

Das zu untersuchende Kollektiv bestand aus 52 Mäusen, wovon zwei Mäuse aufgrund eines unbestimmten Genotyps aus der Studie genommen werden mussten. Zehn Tiere wurden als Kontrollgruppe ohne APP verwendet, um die APP-Expression der anderen Exemplare nachweisen zu können. Hierbei handelte es sich zu 50 % um weibliche und zu 50 % um männliche Tiere. Die endgültig auszuwertende Gruppe bestand aus zwölf männlichen und zehn weiblichen Wildtyp- bzw. heterozygoten Mäusen sowie zehn männlichen und acht weiblichen Flotillin-2-Knockout-Mäusen. Ihr Durchschnittsalter lag bei 53,8 Wochen.

### **3.3 Präparation der Objekte**

Für die Präparation der Großhirnhälften der Mäuse wurden sie einer Tötung durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose unterzogen. Die Tötung der Tiere wurde gemäß dem Tierschutzgesetz von einer Person mit entsprechender aktueller Sachkunde durchgeführt. Nach der Tötung konnte der Kopf abgetrennt werden. Zur besseren Fixation des Schädels wurde eine Pinzette in die Augenhöhlen eingeführt, anschließend konnten die Ohren abgetrennt und die äußere Haut mit dem Skalpell von der Subkutis abgelöst werden. Um die Schädeldecke entfernen zu können, wurde ein waagerechter Schnitt vom occipitalen Schädelanteil bis hin zum Kiefergelenk gesetzt und die Schädeldecke nach anterior abgeklappt. Klein- und Großhirn wurden zwischen Pons und Medulla oblongata vom Hirnstamm getrennt sowie der Nervus opticus gelöst. Anschließend wurde das Hirn aus dem Schädel entnommen. Präzise Schnitte zwischen Groß- und Kleinhirn trennten diese voneinander. Eine Großhirnhälfte wurde durch Schockgefrierung mittels flüssigen Stickstoffs konserviert und die zweite in Formalin fixiert.

## **3.4 Bearbeitung der Hirnpräparate**

### **3.4.1 Paraffineinbettung**

Um die Großhirne zu fixieren und somit die Lebensvorgänge von Zellen und Geweben durch Denaturierung der Proteine zu stoppen, wurden sie über Nacht in PFA-PBS eingelegt. Durch dieses Eiweißfällungsmittel werden postmortale Strukturveränderungen verhindert. Zur weiteren Bearbeitung der Gewebe wurden sie am nächsten Tag gewässert, um das Paraformaldehyd herauszuwaschen. Anschließend wurden die Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, die mit 100%igem Alkohol endete, in dem die Präparate über Nacht verblieben. Dieses Verfahren ist notwendig, da Paraffin nicht wasserlöslich ist. Am dritten Tag der Bearbeitung wurde der Alkohol durch Xylol, das als Intermedium dient, verdrängt, indem die Gehirne jeweils zweimal für eine Stunde eingelegt wurden. Anschließend wurde das Xylol durch 60 °C warmes Paraffin ersetzt und über Nacht bei 60° im Brutschrank gelagert. Danach wurde an einer Paraffin-Gießstation das Gewebe in Metallförmchen in Paraffinblöcke gegossen. Zum Erstarren wurden die Blöcke auf einer Kühlplatte gelagert und nach vollständiger Aushärtung aus den entsprechenden Formen gelöst.

### **3.4.2 Schneiden der Gewebe**

Zum Schneiden der Blöcke wurde in der vorliegenden Arbeit ein Schlittenmikrotom verwendet. Das Messer wurde beidseitig im Mikrotom befestigt und senkrecht zur Schnittrichtung ausgerichtet. Anschließend wurde der Paraffinblock in das Mikrotom eingebracht und zur Schnittebene des Messers ausgerichtet. Um die Schnittstärke zu bestimmen und den Winkel richtig einzustellen, wurden entsprechende Justierhilfen an der Apparatur verwendet. Der optimale Winkel musste jeweils empirisch ermittelt werden. Die Schnittdicke der Präparate beträgt 10 µm, wobei jeder dritte Schnitt auf einen Objektträger aufgetragen wurde. Drei Schnitte wurden jeweils auf einen der Objektträger gesetzt. Mithilfe eines feinhaarigen Pinsels wurden die Schnitte auf die Objektträger aufgezogen und entfalteteten sich im Anschluss auf der Wärmeplatte. Überschüssiges Wasser wurde mit Hilfe eines Fließpapiers abgesaugt. Zur endgültigen Trocknung wurden die Objektträger über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37 °C gelagert.

### 3.4.3 Kongorot-Färbung nach Bennhold

In der Pathologie wird Kongorot verwendet, um  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen darzustellen. Vor der Färbung mussten die Schnitte entparaffiniert und rehydriert werden. Anschließend wurden die Präparate für 30 Minuten in die filtrierte 1%ige Kongorotlösung und danach für 15 Sekunden in Lithiumcarbonatlösung eingetaucht. Zur schnellen Differenzierung wurde 80%iges Ethanol verwendet, bis sich die Kongorotlösung in Schlieren vom Objektträger löste. Dieser Vorgang dauert nur einige Sekunden und kann durch Abspülen mit Leitungswasser unterbrochen werden. Zeigte sich das gewünschte Farbergebnis, konnte mit einer 15-minütigen Spülung in Leitungswasser fortgefahren werden. Andernfalls mussten die vorherigen Verarbeitungsschritte wiederholt werden. Um eine Gegenfärbung der Zellkerne durchzuführen, wurden die Objektträger für drei Minuten in eine Hämalaunlösung nach Mayer gegeben und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Zum Bläuen wurde Leitungswasser verwendet. Anschließend wurden die Präparate wieder entwässert. Vor dem Einschluss wurde Xylol als Zwischenmedium verwendet und die Präparate wurden mit Hilfe von Neutralharz und eines Deckglases konserviert.

### 3.4.4 Aufnahmetechniken

Zur kontrollierbaren und nachvollziehbaren Bearbeitung der Präparate wurden Aufnahmen der Gewebe erstellt. Da eine zusammenhängende Aufnahme eines gesamten Präparates technisch nicht möglich war, wurden Einzelaufnahmen angefertigt, die anschließend mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop zusammengefügt wurden.

Für die Aufnahmen wurde ein für die Durchlichtmikroskopie zugelassenes Zeiss-Mikroskop verwendet. Die Aufnahmen wurden mit der Software AxioVision durchgeführt. Um ausreichende Sicht zu erhalten, musste vor Beginn der Aufnahmen das Mikroskop geköhlet werden, sodass ein Ausgleich des individuellen Augenfehlers erreicht werden konnte. Anschließend wurde der Kondensor justiert und das entsprechende Objektiv ausgewählt. In der vorliegenden Arbeit wurde die fünffache Vergrößerung zur Erstellung der auszuwertenden Schnitte gewählt. Um optimale Aufnahmen zu erzielen, wurde die maximale Helligkeit von 3200 K gewählt. Eine Auswahl zwischen unterschiedlichen Filtern ermöglichte die Anpassung der Helligkeit an die jeweilige Intensität der Färbung. Um die Aufnahmen zu optimieren, musste unter Berücksichtigung der Lichtstärke die Belichtungszeit angepasst und ein Weißabgleich durchgeführt werden. Nach erfolgter Aufnahme wurden sie in entsprechenden Ordnern als Tagged Image File Format (TIFF-Datei) hinterlegt und im Anschluss ausgewertet.

### **3.4.5 Auszählung der Schnitte**

Zur Auswertung wurden entsprechende Schnitte der aufgetragenen Präparate ausgewählt. Um eine Mehrfachauswertung der amyloiden Plaque-Ablagerungen zu vermeiden, wurde jeweils der erste Schnitt auf einem Objektträger gewählt. Konnte dieser nicht ordnungsgemäß gewertet werden, wurde auf einen anderen Schnitt ausgewichen. Es wurde entsprechend darauf geachtet, dass die Auswahl der Schnitte gleichmäßig erfolgte, um eine Ergebnisverfälschung zu vermeiden. Es entstanden pro Schnittpräparat ca. 35–45 Aufnahmen, die mit Hilfe von Adobe Photoshop per Hand zusammengefügt wurden. Die Auswertung wurde mit dem Programm AxioVision und einem digitalen Messwerkzeug durchgeführt. Dies ermöglichte es, die Umrisse eines  $\beta$ -Amyloid-Plaques zu umfahren und gleichzeitig die Fläche der einzelnen Messwerte zu errechnen. Die so erhaltenen Werte konnten in einer Exceltabelle für die jeweils ausgewertete Maus festgehalten werden.

## **3.5 Genotypisierung der Mäuse**

### **3.5.1 PCR – Polymerase-Kettenreaktion**

Die PCR wurde zur Genotypisierung der Mäuse durchgeführt. Hierfür wurde das One-Taq-DNA-Polymerase-System (NEB) nach dem Protokoll des Herstellers unter Verwendung der in Tabelle 6 aufgeführten Primer verwendet.

#### **3.5.1.1 Lyse der Schwanzbiopsien**

Zur Lyse der Schwanzbiopsien wurde ein Proteinase-K-haltiger Lysepuffer jeweils frisch angesetzt und zu jeder Probe 250 µl hinzugegeben. Siehe hierzu Tabelle 3. Die Biopsien wurden in einem Heizblock drei Stunden lang bei einer Temperatur von 50 °C kontinuierlich bewegt, um einen Verdau der Schwanzspitzen zu erreichen. Anschließend wurde die Proteinase K durch Hitze inaktiviert. Die Lysate wurden hierfür bei 95 °C zehn Minuten lang erhitzt und anschließend wieder kurz abzentrifugiert.

#### **3.5.1.2 Standard-PCR mit Taq-Polymerase**

Mit dem hergestellten Lysat konnte anschließend der Ansatz für die PCR hergestellt werden, wie in Tabelle 7 angegeben. Mit dem fertigen Ansatz wurde im Thermocycler weiter verfahren. Um eine Denaturierung der DNA-Stränge zu erreichen, wurde sie auf 94 °C erhitzt. Nachdem die DNA in Einzelsträngen vorlag, konnte die Primerhybridisierung bei 60 °C stattfinden. Während der Elongation synthetisiert die DNA-Polymerase vom Primer aus in 5'-3'-Richtung den komplementären Strang. Dieser Zyklus wurde 40 Mal wiederholt. Genaue Zeit- und Temperaturangaben sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 7: One-Taq-Polymerase (NEB)

Lysat	2 $\mu$ l
dNTP 200 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l
Primer forward 25 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l
Primer reverse 25 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l
5X One Taq Standard Reaction buffer	5 $\mu$ l
One Taq DNA-Polymerase	0,125 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	16,375 $\mu$ l

Tabelle 8: Zeit- und Temperaturangabe für die Standard-PCR mit Taq-Polymerase

Zeit	Temperatur	40 Zyklen
4 min	94 °C	
40 sec	94 °C	
30 sec	60 °C	
1 min	72 °C	
10 min	72 °C	
	4 °C	

### 3.5.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde in einem 1,5%igen Agarosegel durchgeführt. Nach Zugabe von 4  $\mu$ l DNA-Ladepuffer (6 x) zur PCR-Probe konnte die Auftrennung bei 120 Volt durch Elektrophorese erfolgen. Ethidiumbromid wurde hier zur Visualisierung verwendet. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle lagern sich zwischen die Basen der DNA. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht kommt es zu einer Fluoreszenzreaktion des Ethidiumbromids, wodurch die Stellen im Agarosegel, an denen sich Nukleinsäuren befinden, hell aufleuchten. Durch einen Größenmarker konnten die Größen der Banden bestimmt werden.

### 3.5.2 Western Blot

Mittels Western Blot wurde ein spezifischer Proteinnachweis mit Hilfe von Antikörpern durchgeführt. Diese Methodik wurde zum einen verwendet, um die Mäuse nochmals zu genotypisieren, zum anderen, um eine semiquantitative Analyse von APP und Flotillin-1 zwischen Wildtyp- bzw. heterozygoten Mäusen und Knockout-Mäusen durchzuführen.

### 3.5.2.1 Zellaufschluss

Die für den Western Blot benötigten Proben wurden aus den in 3.4 genannten Maushirnhälften gewonnen, die nach der Präparation in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurden und zur Langzeitaufbewahrung bei -80 °C gelagert wurden. Um das Gewebe zu homogenisieren, wurde es zunächst unter ständiger Stickstoffkühlung gemörsert und anschließend 20 mg in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 250 µl Stürmer-Lyse-Puffer und 2,5 µl Protease-Inhibitor eingewogen. Anschließend wurde in einem mechanischen Verfahren der Zellaufschluss mit einer Kugelmühle der Firma Retsch durchgeführt. Hierfür wurden die Proben für zwei Minuten bei 25 Schlägen pro Sekunde bearbeitet. Anschließend wurden die Kugeln mit Hilfe eines Magneten entfernt und die Proben 15 Minuten bei 4 °C in einer Zentrifuge der Firma Hettich bei 18000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das klare Zelllysate wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

### 3.5.2.2 Bradford-Test

Um Proteinmengen in den Lysaten zu bestimmen, wurde der Bradford-Test angewendet. Hierbei handelt es sich um eine photometrische Methode, bei der der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 zu den Lysaten gegeben wird und sich eine saure Lösung bildet. Der Farbstoff wird in seiner unprotonierten, anionischen Form stabilisiert und erscheint blau. Das freie Farbreagenz kann photometrisch gemessen werden und ist durch die unterschiedlichen Absorptionseigenschaften ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Es wurde eine Eichkurve mit BSA als Standard erstellt. Die Lysate wurden in diesem Fall 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt. Gemessen wurden Triplikate. Es wurden jeweils 10 µl verdünntes Lysat sowie 200 µl Bradfordreagenz in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert und über das Tecan-Plattenphotometer ausgewertet. Mit den erhaltenen Werten konnte ein Pipettierschema errechnet werden, das die Proben in ihrer Proteinkonzentration angleicht. Hierfür wurden die Proben mit der entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O verdünnt, anschließend wurden 4 x Ladepuffer und DTT hinzugefügt und die Proben bei 95 °C für fünf Minuten gekocht. Hierdurch wurde erreicht, dass die Proteine denaturiert vorlagen und gleichmäßig negativ geladen waren.

### 3.5.2.3 SDS PAGE

Das Proteingemisch musste vor dem eigentlichen Western Blot mittels einer Gelelektrophorese-Technik in einer Trägermatrix entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierzu wurde ein Polyacrylamid-Gel angefertigt, das aus einem Sammelgel und einem Trenngel bestand. Die genauen Zusammensetzungen sind den Tabellen 9 und 10 zu entnehmen. Nach dem Mischen des Trenngels und der Zugabe von APS sowie der Beimischung von Polymerisierungskatalysator TEMED musste es schnellstmöglich in die vorher bereitgelegte Gießvorrichtung eingebracht werden. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen im Gel bildeten, die Glasplatten fettfrei gereinigt waren und die Platzhalter die einzelnen Glasplatten voneinander trennten.

**Tabelle 9: 10%iges Trenngel zur Gelelektrophorese**

dd-H <sub>2</sub> O	21 ml
3M Tris pH 8,8	5 ml
SDS 20 %	200 µl
AA	13,4 ml
TEMED	64 µl
APS	400 µl

**Tabelle 10: 4%iges Sammelgel zur Gelelektrophorese**

dd-H <sub>2</sub> O	11,7 ml
3M Tris pH 6,8	624 µl
SDS 20 %	75 µl
AA	2,55 ml
TEMED	22,5 µl
APS	75 µl

Um eine störungsfreie Polymerisation des Gels unter Luftabschluss zu erhalten und eine glatte Geloberfläche zu ermöglichen, wurde eine dünne Schicht Isopropanol auf das Trenngel aufgetragen. Nach einer Auspolymerisationszeit von 20 Minuten konnte der Alkohol abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel aufgebracht werden. Der Kamm für die speziellen Einfülltaschen wurde zur Abdichtung in die Vorrichtung eingebracht. Das fertige Polyacrylamidgel wurde zum Auftrennen der Proteine in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Die Apparatur wurde mit Laemmli-Puffer befüllt. Die wie in 3.5.2.2 verarbeiteten Proben wurden aufgetaut und die Geltaschen konnten, je nach Größe, mit 15 µl bei kleinen Taschen und mit 30 µl bei großen Taschen befüllt werden. Zusätzlich zu den Proben wurde 2 µl des Proteinmarkers Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standard auf das Gel geladen, um mit seinen bekannten Markerproteinen die Größe der Proteine der parallel auf dem Gel gelaufenen Proben bestimmen zu können. Die Elektrophorese wurde bei 15 mA pro Gel und 220 V gestartet. Nach Erreichen des Trenngels konnte die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht werden. Die Elektrophorese wurde 1 cm vor Ende des Gels beendet.

### 3.5.2.4 Transfer

Beim Übertragen der Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran, dem eigentlichen Western Blot, wurde ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wodurch die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode wanderten. Das Gel wurde aus der Elektrophorese-Vorrichtung entnommen, die Glasplatten entfernt und das Sammelgel abgetrennt. Es wurde darauf geachtet, keine Risse im Gel zu erzeugen, um einen optimalen Transfer zu ermöglichen. Das Gel wurde von der Trägerplatte gelöst und in Blotsalz gelegt. Hierfür wurde eine ausreichend große Wanne mit Blotsalz gefüllt und die Halterung für den Transfer vorbereitet. Die Halterung wurde mit der schwarzen Seite nach unten in die Wanne gelegt, anschließend wurden ein mit Blotsalz angefeuchteter Schwamm und ein Filterpapier darauf positioniert. Ohne Lufteinschluss wurde das Gel mit der entsprechenden Nitrozellulosemembran aufgelegt und mit einem weiteren Filterpapier und einem Schwamm abgedeckt. Nachdem die Vorrichtung verschlossen war, konnte sie in die Blotkammer eingehängt werden. Diese wurde im Anschluss bis zur Markierung mit Blotsalz aufgefüllt, verschlossen und an den Stromkreis mit 220 V und 400 mA für eine Stunde angeschlossen. Aufgrund ihrer hydrophoben Wechselwirkungen blieben die Proteine an der Membranoberfläche haften und waren nun für weitere Methoden zugänglich. Zur Kontrolle, ob der Transfer auf die Membran gelungen ist, wurden die membrangebundenen Proteine über den Farbstoff Ponceau S detektiert. Der Blot wurde ein bis zwei Minuten bei Raumtemperatur in Ponceaurot inkubiert und anschließend wurde in destilliertem Wasser die überschüssige Farbe entfernt. Auf diese Weise konnten alle Proteine unspezifisch markiert werden. Die Färbung ist reversibel und durch eine einmalige Waschung in 1 x TBST entfernbare.

### 3.5.2.5 Immundetektion

Um eine unerwünschte Anheftung von Antikörpern an der Membran zu verhindern und eine störungsfreie Immundetektion zu ermöglichen, mussten die freien Bindungsstellen der Proteine blockiert werden. In dieser Arbeit wurde hierfür eine 5%ige Lösung von Milchpulver in 1 x TBST für 30 Minuten verwendet. Da unterschiedliche Antikörper für die Immundetektion verwendet werden mussten, wurde die Blotmembran vor weiteren Arbeitsschritten nach Proteingrößen unterteilt und auseinandergeschnitten. So konnte in getrennten Gefäßen mit den einzelnen Membranabschnitten weitergearbeitet werden. Anschließend erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers über Nacht bei 4 °C, um die Bindung an die einzelnen Epitope im gesuchten Protein zu ermöglichen. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrte von je zehn Minuten mit 1 x TBST, um die überschüssigen Antikörper wieder zu entfernen. Um die Detektion durchzuführen, wurde ein Immunkonjugat, bestehend aus sekundärem Antikörper und Meerrettichperoxidase, verwendet, wobei der Sekundärantikörper an die Fc-Region des primären Antikörpers bindet. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schwenktisch. Anschließend wurden die Blots gewaschen und trocken getupft und auf Adhäsionsfolie gelegt. Die Detektion erfolgte mit einem ECL-Substrat. Das Reagenz wurde mit Hilfe einer Pipette aufgetragen und mit der Pipettenspitze gleichmäßig verteilt. Nach einer Einwirkzeit von zwei Minuten wurde die Membran erneut trocken getupft, faltenfrei in die Adhäsionsfolie eingeschlagen und in die Röntgenkassette eingeklebt. In der Dunkelkammer wurde der erste Film für fünf Sekunden aufgelegt und danach in die Entwicklermaschine gegeben. Dieser Vorgang wurde mit steigender Auflagezeit von zehn Sekunden, 30 Sekunden, 180 Sekunden, zehn Minuten und 30 Minuten wiederholt. Die einzelnen Filme wurden beschriftet und ausgewertet.

## 3.6 Statistik

Zur statistischen Datenanalyse wurde die GraphPad Prism Software (Version 5, GraphPad, Software, La Jolla, CA, USA) verwendet. Mittels T-Test (zweiseitig, ungepaart) konnten keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden.

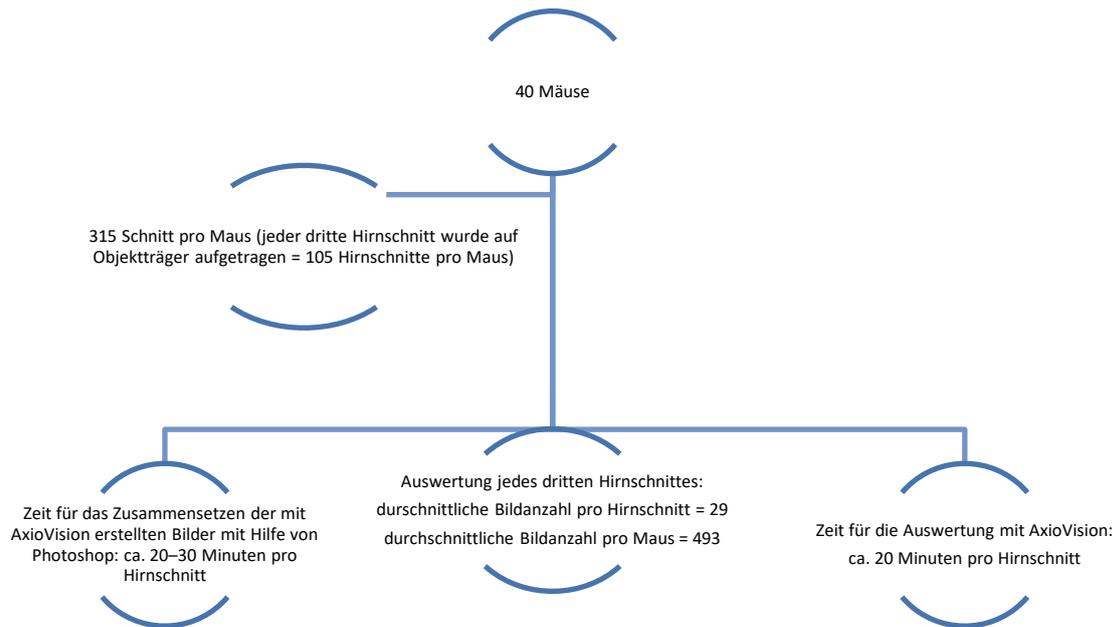
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Plaque-Bildung in Abhängigkeit von Flotillin-Expression

Die Funktionen von Flotillin im menschlichen Organismus nach der Entdeckung Mitte der 90er-Jahre konnten bis heute nicht vollständig geklärt werden. Da Flotilline mit Proteinaggregat-induzierten neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer in anderen Studien in Verbindung gebracht werden konnten, soll die vorliegende Arbeit klären, ob sich durch eine Deletion von Flotillin-2 eine  $\beta$ -Amyloid-Ablagerung im Gehirn von Flotillin-2-Knockout-Mäusen, den so genannten B6;129-Tg(PDGFB-APP<sup>SwInd</sup>)Flot2<sup>tm</sup>, verhindern oder vermindern lässt. Wie in Abschnitt 3.2 bereits erläutert, produzieren die für die Untersuchung verwendeten Mäuse eine größere Menge des humanen APPs. Sie entstanden aus einer speziellen Züchtung der transgene Mauslinie B6.Cg-Tg(PDGFB-APP<sup>SwInd</sup>)20Lms/2J und B6;129-Flot2<sup>tm</sup>. Für die durchgeführten Versuche mussten APP-überexprimierende Tiere verwendet werden, da nur diese die typischen Symptome der Alzheimer-Erkrankung entwickelten. Die Linie B6.Cg-Tg(PDGFB-APP<sup>SwInd</sup>)20Lms/2J wurde gewählt, da es sich um ein weltweit anerkanntes Alzheimer-Tiermodell handelt. Die Funktionen von Flotillinen im lebenden Organismus lassen sich am besten mit Hilfe von Knockout-Mäusen untersuchen. Die Flotillin-2-Knockout-Mäuse exprimieren von Geburt an keinerlei Flotillin-2 und nur kleine Mengen Flotillin-1. So konnten möglichst gute Bedingungen für die gewünschten Untersuchungen erzeugt werden.

#### 4.1.1 Analyse der $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen

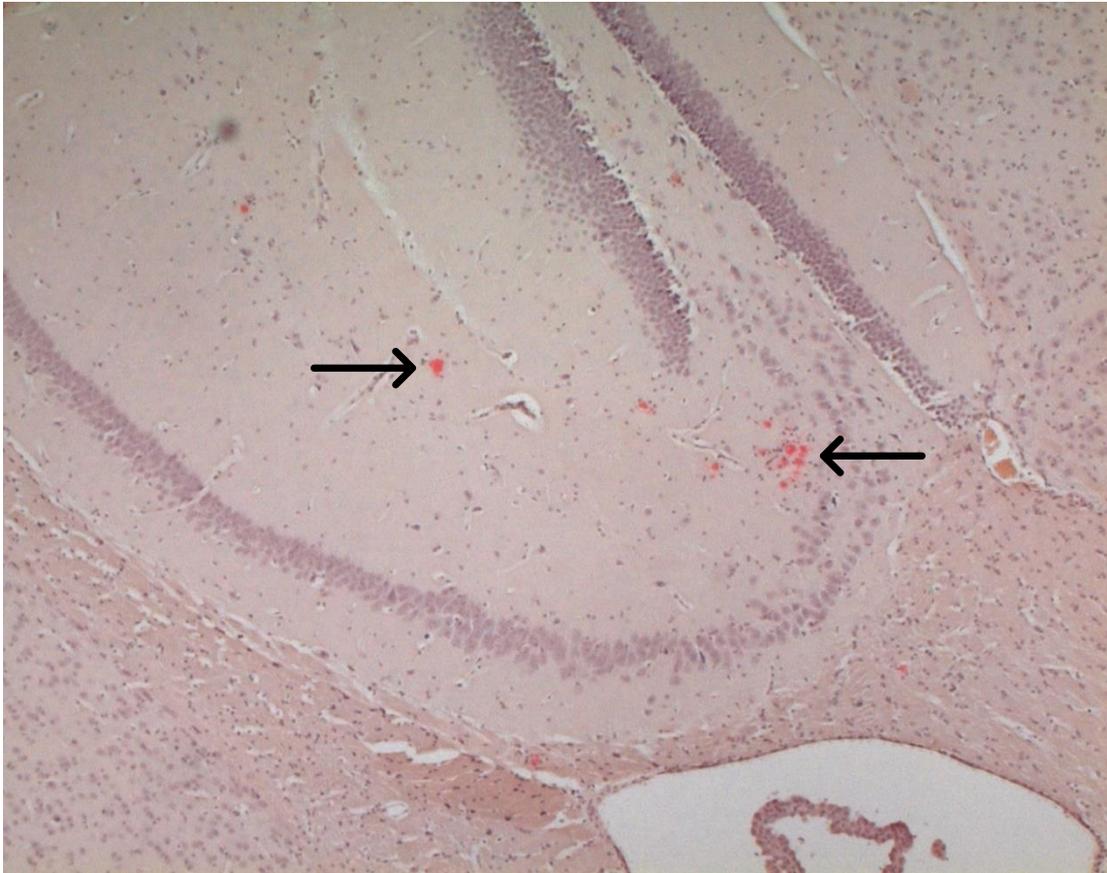
Um eine vergleichbare Auswertung zu erzielen, wurden zwei Mausgruppen als Beobachtungsobjekt herangezogen. Zum einen die B6;129-Tg(PDGFB-APP<sup>SwInd</sup>)Flot2<sup>tm</sup> und als Gegenüberstellung heterozygote Mäuse und Wildtyp-Mäuse. Sie wurden in dieser Studie gleichgesetzt, da diese sich hinsichtlich ihrer Flotillin-2-Expression kaum unterscheiden. Insgesamt wurden 40 Mäuse untersucht, deren Durchschnittsalter bei 53,8 Wochen lag. Als Merkmal wurden die  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen gewählt und quantitativ erhoben. Die Merkmalsausprägung wurde diskret durch eine Auszählung und stetig in Form von einer Messung gewonnen. Somit lassen sich Rückschlüsse über Menge und die betroffene durchschnittliche Plaque-Fläche in den untersuchten Großhirnen ziehen. Auch qualitative Beobachtungen konnten dokumentiert werden. Da die Untersuchungen in der zweidimensionalen Ebene durchgeführt wurden, musste eine Auswahl der erstellten Schnitte getroffen werden. So wurde eine mehrfache Auswertung der einzelnen Plaque-Ablagerungen vermieden. Jeder 18. Schnitt wurde ausgewertet und einzelne Aufnahmen an einem Durchlichtmikroskop aufgenommen. Je nach Größe des vorliegenden Präparats entstanden so ca. 40 Aufnahmen pro Schnitt, die mit Hilfe des Photoshop-Programms manuell zusammengesetzt wurden. Die so rekonstruierten Bilder der einzelnen Schnitte konnten durch das Programm AxioVision LE ausgewertet werden.



**Abbildung 3: Mäuseauswertung – Übersicht**

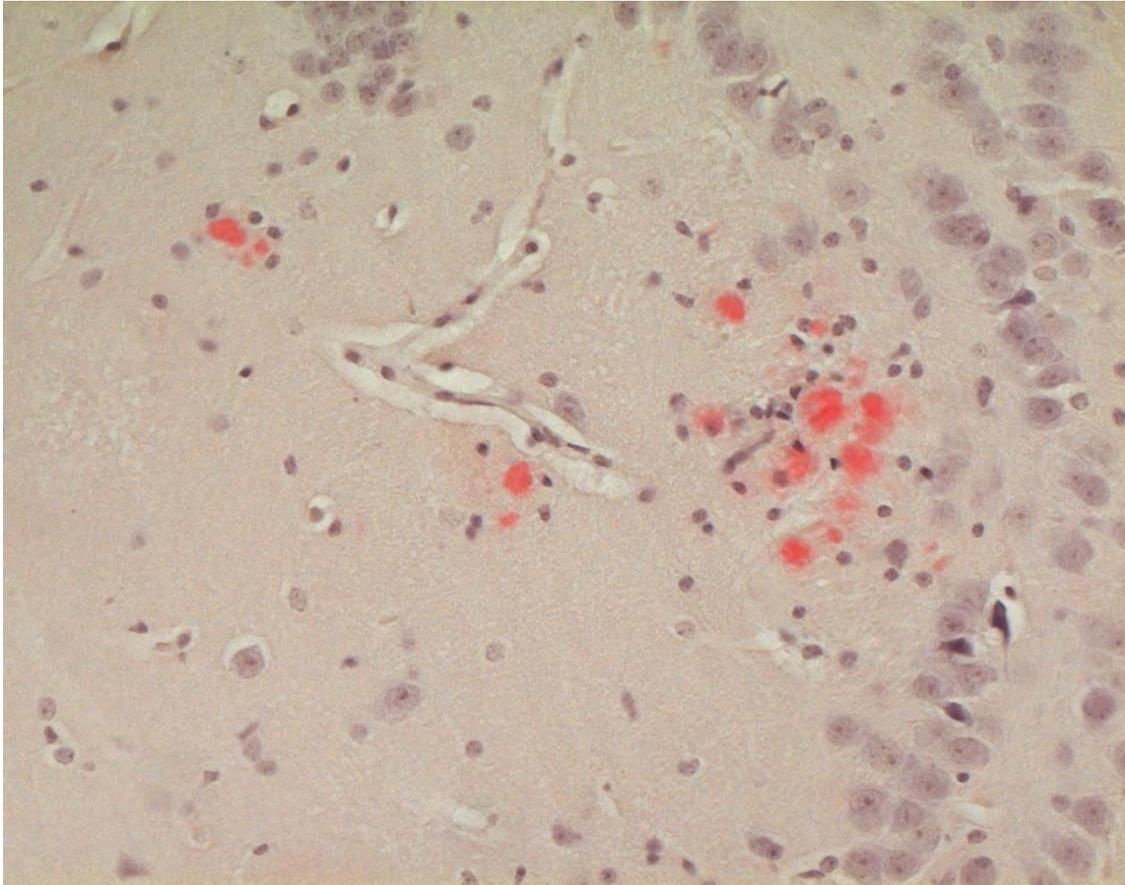
In der Abbildung ist eine Übersicht der Auswertung gegeben. Bedacht wurden hier der zeitliche Aufwand und die Anzahl der gefertigten Präparate.

Durch die Kongorotfärbung hoben sich die vorhandenen Plaques in einer rosafarbenen Umgebung (gesundes Cerebrum) durch einen intensiven Rotton ab, siehe Abbildung 3. Die Begrenzung der Plaques war zumeist scharf, sodass sie mit einem individuellen Messtool des verwendeten Programmes ausgewertet werden konnten.



**Abbildung 4: Ausschnitt Mausgehirn mit Flotillin-2-Deletion**

Ausschnitt eines Paraffinschnittes mit Kongorotfärbung einer männlichen Flotillin-2-Knockout-Maus im Alter von 70 Wochen in fünffacher Vergrößerung. Ein Teil des Hippocampus ist zu sehen, in dem die  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen (rot) deutlich abzugrenzen sind. Einige sind durch Pfeile gekennzeichnet. (Maus Z250, Objektträger Nr. 6)



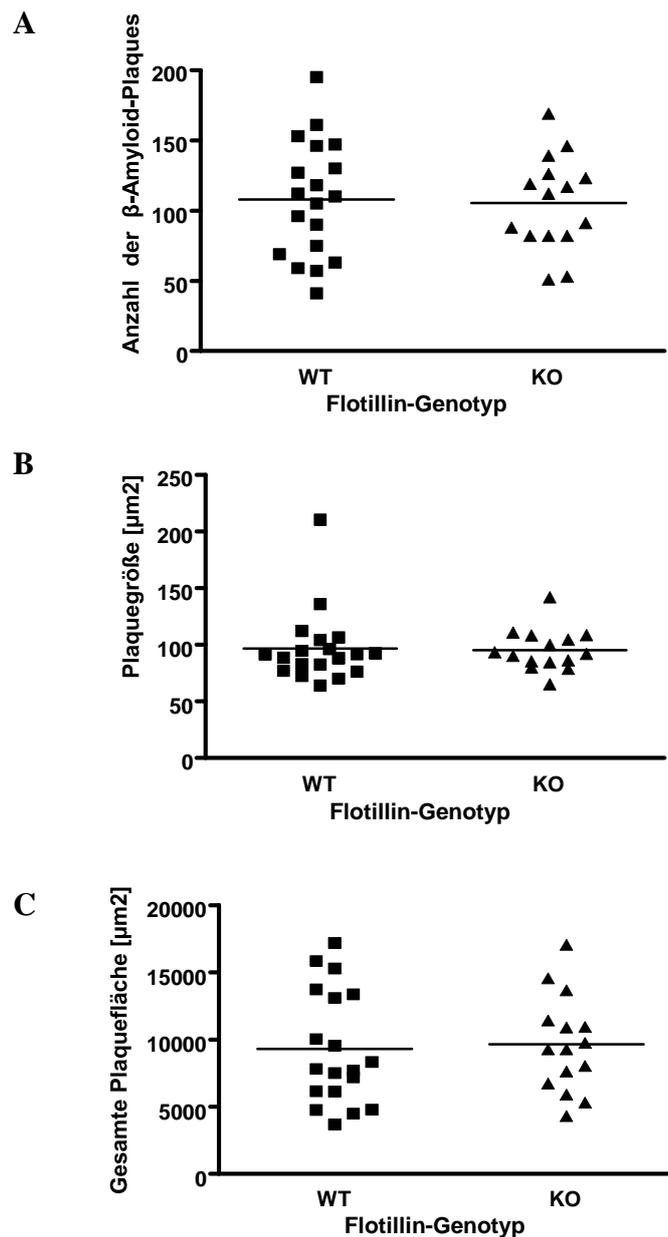
**Abbildung 5: Abbildung 4 in 20facher Vergrößerung**

Ausschnitt einer männliche Maus mit Flotillin-2-Deletion im Alter von 70 Wochen in 20facher Vergrößerung im Hippocampus mit rot hervorstechenden  $\beta$ -Amyloid-Plaques-Ablagerungen durch Kongorotfärbung. (Maus Z250, Objektträger Nr. 6)

#### 4.1.2 Auswertung der untersuchten Gruppen

Nach Auswertung der 40 Mäuse konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Mäusen mit und ohne Flotillin-2-Expression festgestellt werden. Zur Auswertung wurden zusätzlich zu den quantitativ diskreten Merkmalen (Plaqueanzahl) auch die quantitativ stetigen Merkmale (Plaquegröße) betrachtet.

Die Gesamtplaqueanzahl der männlichen und weiblichen Mäuse in Abbildung 5A zeigt keinen Unterschied in der Menge der gezählten Plaques zwischen den Knockout-Tieren und den Wildtyp- bzw. heterozygoten Mäusen. Die durchschnittliche Plaqueanzahl liegt bei ca. 100 Plaques pro Hirnhälfte pro ausgewertetem Tier. Die Abweichung vom Durchschnitt beträgt maximal 50 Plaques, wobei sich kein signifikanter Unterschied in den einzelnen Versuchsgruppen zeigte. In Abbildung 5B ist die Größe der Plaques in  $\mu\text{m}^2$  aller untersuchten Mäuse (männlich und weiblich) dargestellt. Hierfür wurde zur besseren Übersicht der Mittelwert der ermittelten Plaquegröße pro Maus gebildet. Auch hier kann keine Abweichung bestimmt werden. Sie weisen eine durchschnittliche Größe von ca.  $100 \mu\text{m}^2$  auf. Zusammenfassend stellt Abbildung C die Gesamtplaquefläche in  $\mu\text{m}^2$  der männlichen und weiblichen Mäuse dar, die sich auch aus Abbildung A und B ergeben. In der zweidimensionalen Auswertung ergibt dies eine Fläche von  $10000 \mu\text{m}^2$  pro Maus. Auch hier ist die Spannweite groß und liegt bei über  $10000 \mu\text{m}^2$  pro Maus, wobei die Abweichung vom Durchschnitt sich hier von unter  $5000 \mu\text{m}^2$  bis  $17000 \mu\text{m}^2$  bewegt.



**Abbildung 6: Auswertung der männlichen sowie weiblichen Mauspräparate im Alter von 50 Wochen +/- 6 Wochen**

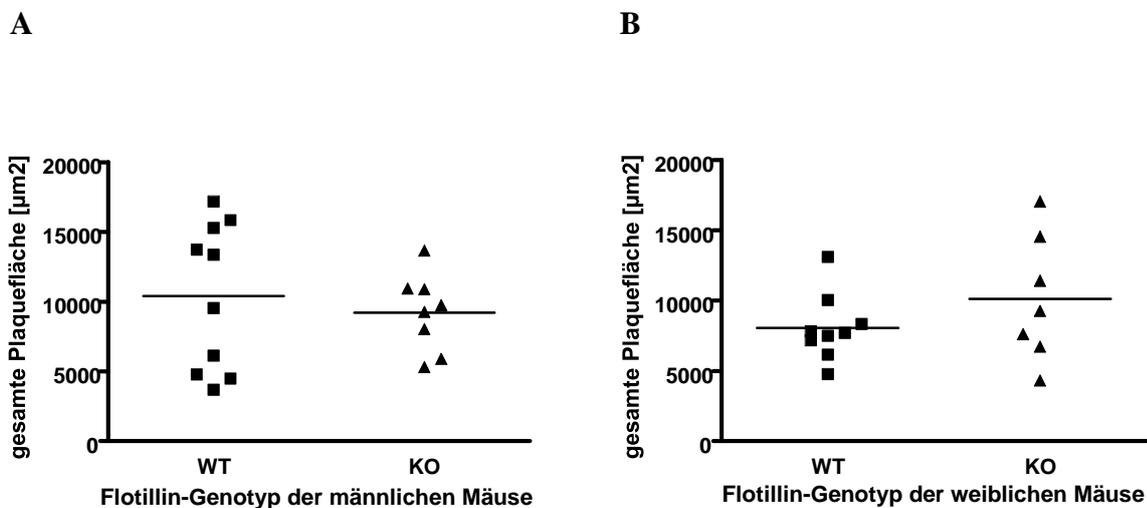
Die Darstellung erfolgte je nach ausgewertetem Parameter individuell sowie die Visualisierung der Mittelwerte durch jeweils horizontale Linien.

A: Die Gesamt-Plaueanzahl der männlichen und weiblichen Mäuse wird in Abbildung A auf der y-Achse aufgeführt. Durch die x-Achse markierte Genotypen können unterschieden werden. Hier sind die untersuchten Gruppen der Knockout(KO)-Tiere oder der Wildtyp- bzw. der heterozygoten Mäuse (WT) abzulesen.

B: Die Größe der Plaues in  $\mu\text{m}^2$  aller untersuchten Mäuse (männlich und weiblich) wird auf der y-Achse dargestellt. Die Genotypen werden durch die x-Achse aufgeteilt.

C: Zusammenfassend stellt Abbildung C die Gesamt-Plaue-Fläche in  $\mu\text{m}^2$  der männlichen und weiblichen Mäuse dar, die sich auch aus Abbildung A und B ergibt.

Da sich im Vergleich der Mausgruppen insgesamt kein Unterschied in der Gesamt-Plaquantzahl ergeben hat, sollten im Folgenden die geschlechterspezifischen Unterschiede genauer untersucht werden. Hier konnte bei Betrachtung der ermittelten Werte ein leichter Unterschied im Altersdurchschnitt sowie eine ungleiche Anzahl der untersuchten Objekte vermerkt werden. Verglichen wurden hier 18 männliche Tiere und 16 weibliche Tiere, aufgeteilt in ihre jeweiligen Genotypen. In der Gegenüberstellung der ermittelten Werte zeigt sich ein leichter Unterschied in der Verteilung der gesamten  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen (in  $\mu\text{m}^2$ ) bei männlichen und weiblichen Tieren, die sich wiederum aus der Multiplikation der Plaquantzahl und der Plaquergröße der jeweiligen Geschlechter ergibt. Abbildung 6 kann entnommen werden, dass die männlichen Flotillin-2-deletierten Mäuse eine geringere Gesamtplaquefläche aufweisen als die Vergleichsgruppe ohne Deletion. Bei den weiblichen Mäusen war die Plaquerfläche in Flotillin-2-Knockout-Mäusen tendenziell erhöht. Dieses Ergebnis war aber nicht signifikant.



**Abbildung 7: Gegenüberstellung der gesamten  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen in  $\mu\text{m}^2$ , geschlechterspezifisch unterteilt**

A: Gezeigt ist die gesamte Fläche der  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen in  $\mu\text{m}^2$  (y-Achse) der 18 männlichen Mäuse, nach Genotypen aufgeteilt (x-Achse).

B: Die gesamte Plaquer-Fläche in  $\mu\text{m}^2$  (y-Achse) der 16 weiblichen Mäuse, die auf der x-Achse in ihre Genotypen unterteilt wurden.

### 4.1.3 Altersabhängigkeit der $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen

Im Vergleich der Altersgruppen konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen und Geschlechtern festgestellt werden. Wie erwartet, steigt die durchschnittliche Plaquegröße mit dem Alter bei allen untersuchten Mäusen kontinuierlich leicht an.

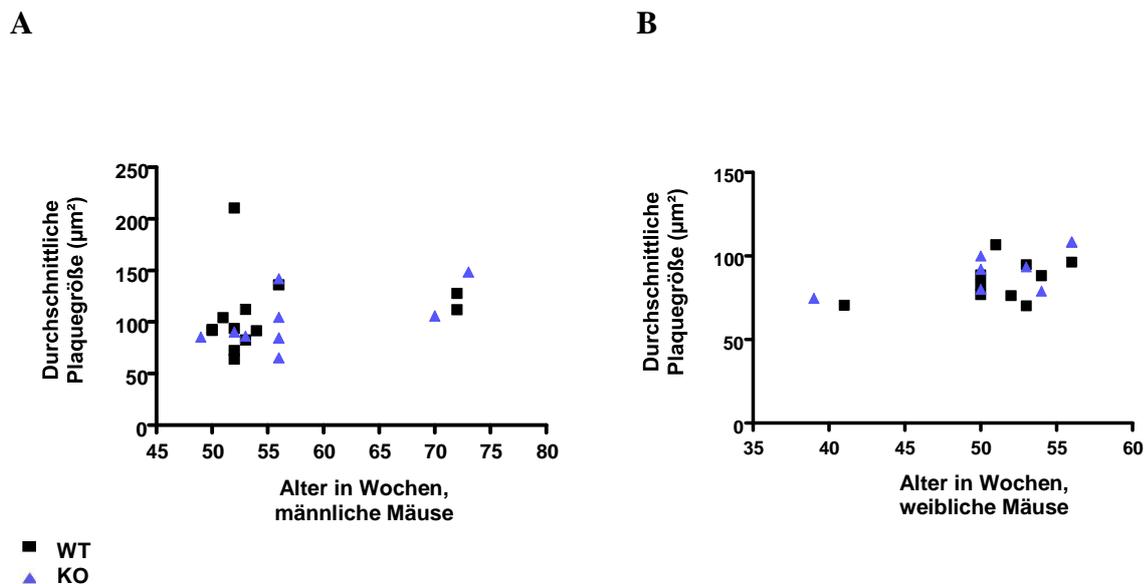


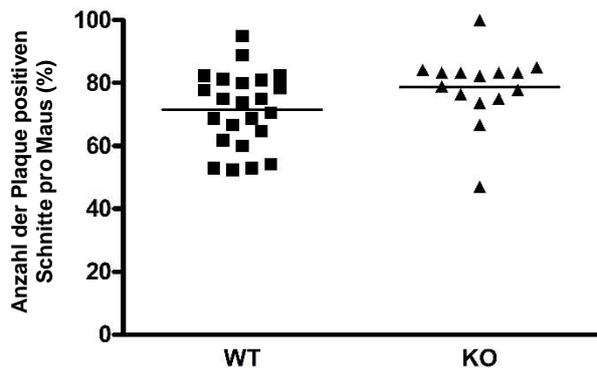
Abbildung 8:  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen in  $\mu\text{m}^2$  in der Altersübersicht, geschlechterspezifisch unterteilt

A: Übersicht der untersuchten männlichen Mäuse im Alter von 47–73 Wochen (x-Achse). Sie zeigt einen parallel verlaufenden Anstieg von Alter und durchschnittlicher Plaquegröße der zu vergleichenden Gruppen.

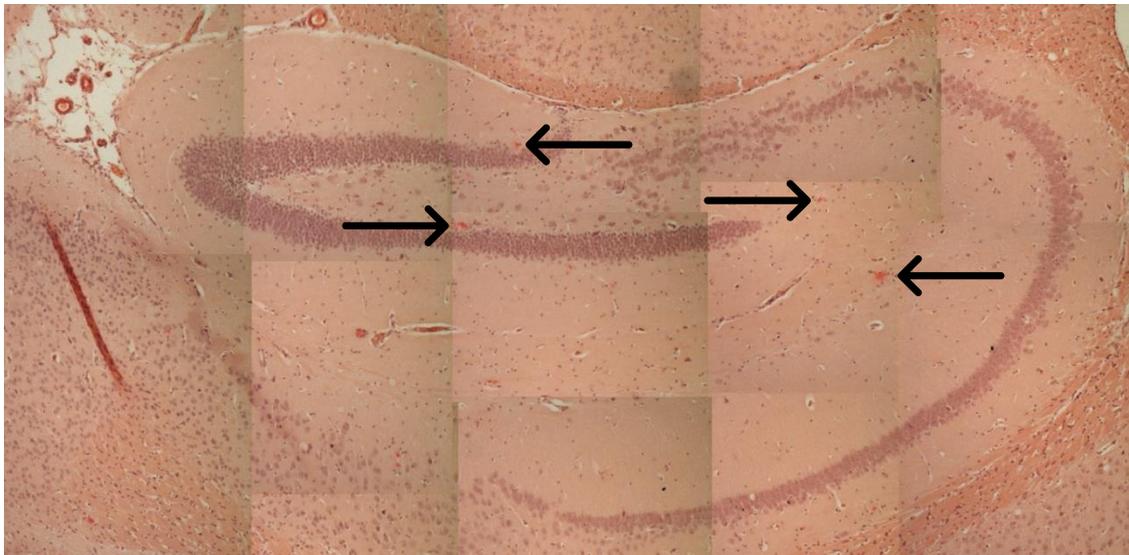
B: Übersicht der untersuchten weiblichen Mäuse im Alter von 38–57 Wochen (x-Achse). Sie zeigt keinen signifikanten Unterschied zu Abbildung A im Hinblick auf Alter und durchschnittliche Plaquegröße.

Die Verteilung der  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen findet nicht im gesamten Gewebe des Großhirns statt, sondern lässt sich auf einen bestimmten Bereich einschränken. Nach Auswertung der Schnitte konnte eine regional kumulierte Plaque-Verteilung festgestellt werden, die eine durchschnittliche Verteilung auf ca. 75 % der Schnitte pro Tier aufwies. Die Abweichung vom Durchschnitt ist bei einigen Tieren erheblich. Die qualitative Auswertung des Merkmals der einzelnen Präparate konnte zusätzlich zeigen, dass diese Verteilung sich auf die hippocampale Region des Cerebrums konzentriert. Werden diese Ergebnisse in eine dreidimensionale Betrachtung des Gewebes mit einbezogen, bildeten sich Plaque-Ablagerungen in den vorliegenden untersuchten Hirnhälften hauptsächlich zentral der untersuchten Gewebe.

A



B

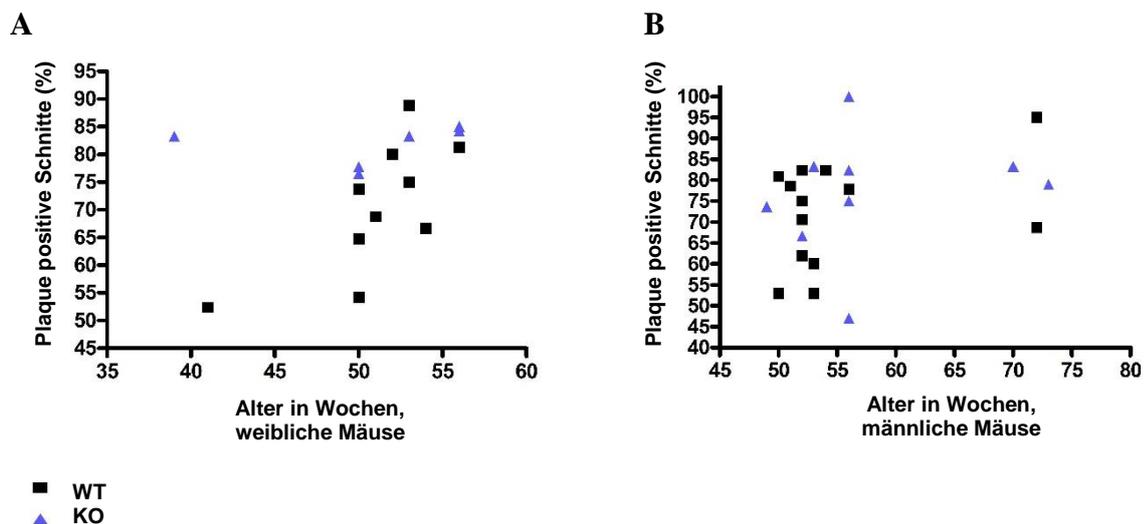


**Abbildung 9: Verteilung der  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen im Cerebrum**

A:  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen verteilen sich nicht im gesamten Cerebrum, sondern akkumulieren regional. Untersuchte Tiere wurden in Wildtyp(WT)- und Knockout(KO)-Tiere unterteilt. Da eine zweidimensionale Auswertung stattgefunden hat, liegt dieser Mittelwert bei 75 % der erhobenen Schnitte pro Tier. Der Mittelwert ist durch eine horizontale Linie in der Grafik markiert.

B: Histologischer Schnitt des Hippocampus mit Kongorotfärbung. Zentral sind  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen aus einer 56 Wochen alten, weiblichen KO-Maus.  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die kumulierten  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen zeigten sich auch deutlich mit Anstieg des Alters der Mäuse unabhängig von Geschlecht und Genotyp (siehe Abbildung 10 A und B). Dieses Ergebnis lässt in Kombination mit der in dieser Arbeit gezeigten zunehmenden Plaquesgröße (Abbildung 6 C) auf eine Ausbreitung der  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen im Cerebrum schließen. Die Deletion des untersuchten Proteins Flotillin-2 scheint hier keinen hemmenden oder stimulierenden Einfluss zu nehmen. Dieses Ergebnis ist alters- und geschlechtsunabhängig und zeigte sich ohne große Abweichungen in der gesamten Untersuchung dieser Arbeit. Es konnte auch nicht gezeigt werden, dass Flotillin-2-Knockout-Mäuse schon im früheren Stadium der Alzheimer-Erkrankung vermehrt  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen entwickeln.



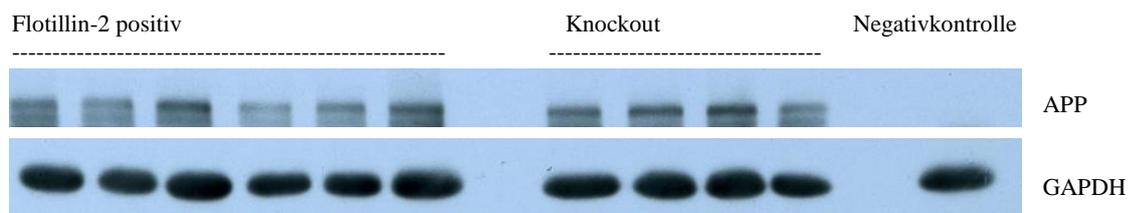
**Abbildung 10: Betroffene Hirnschnitte mit  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen im Verhältnis zum Alter der Mäuse, geschlechterspezifisch unterteilt**

A: Die Verteilung der  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen der weiblichen Mäuse im Alter von 38–57 Wochen zeigt eine Potenzierung der betroffenen Hirnareale mit ansteigendem Alter.

B: Männliche Tiere im Alter von 47–73 Wochen zeigen mit ansteigendem Alter ebenso wie ihre weiblichen Artgenossen einen Anstieg unabhängig der Flotillin-2-Deletion. Die  $\beta$ -Amyloid-positiven Schnitte wurden in beiden Grafiken als Prozentangaben aufgeführt.

## 4.2 Abhängigkeit von APP und Flotillin-2-Deletion

Die Erkenntnisse aus 4.1 zeigten wenig bis keinen Zusammenhang zwischen einer Flotillin-2-Deletion und den neurodegenerativen  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen. Im Folgenden soll geklärt werden, ob das Fehlen von Flotillin-2 einen Einfluss auf die Menge des nachweisbaren APPs hat. Hierfür wurden Lysate aus der anderen Hirnhälfte der schon untersuchten Tiere verwendet. Um eine qualitative Aussage treffen zu können, wurden im Western Blot zusätzlich Mäuse mit Flotillin-2-Expression untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der folgenden Untersuchung, wie Abbildung 11 zu entnehmen ist.



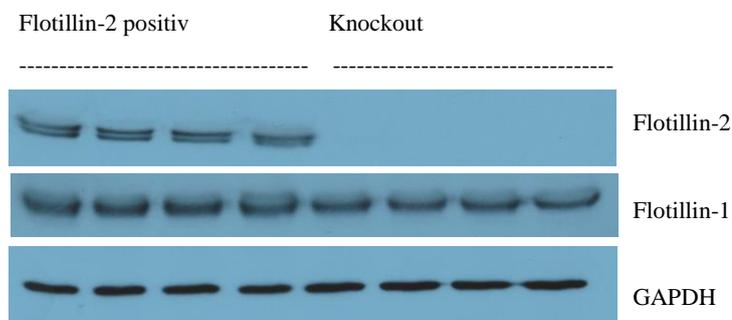
**Abbildung 11: Abhängigkeit der APP-Menge von Flotillin-2-Deletion**

Im Western Blot sind regelmäßige Banden des transgenen APPs zu erkennen mit einer leichten Bandenbildung unterhalb der klaren Linie. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

### 4.3 Wechselwirkung der Flotilline bei Knockout von Flotillin-2

Flotilline sind voneinander abhängig und so zeigt sich nach einer Deletion von Flotillin-2 eine gleichzeitige Verminderung von Flotillin-1. Folgende Versuchsreihe sollte auf diesen Erkenntnissen aufbauen und die eventuelle Dependenz einer Flotillin-2-Deletion und Flotillin-1 im Großhirngewebe von Mäusen nachweisen.

Die Abhängigkeit wurde in dieser Dissertation durch einen Western Blot mit ausgewählten Mäusen untersucht. Im direkten Vergleich wurden Mäuse mit und ohne Flotillin-2-Knockout für diese Untersuchung ausgewählt. Mittels Immunodetektion konnte das Vorkommen von Flotillin-1 nachgewiesen und der Genotyp der untersuchten Objekte kontrolliert werden. Es konnte keine Abhängigkeit zwischen Flotillin-1 und Flotillin-2 bei den jeweils untersuchten Genotypen festgestellt werden. Die vorliegenden Ergebnisse in Abbildung 11 zeigen eine Unabhängigkeit oder sogar eine Kompensation von Flotillin-1 bei Deletion von Flotillin-2 im Großhirngewebe der Mäuse. So verhält sich hier die Dependenz der Flotilline zueinander anders als in untersuchten Geweben anderer Studien.



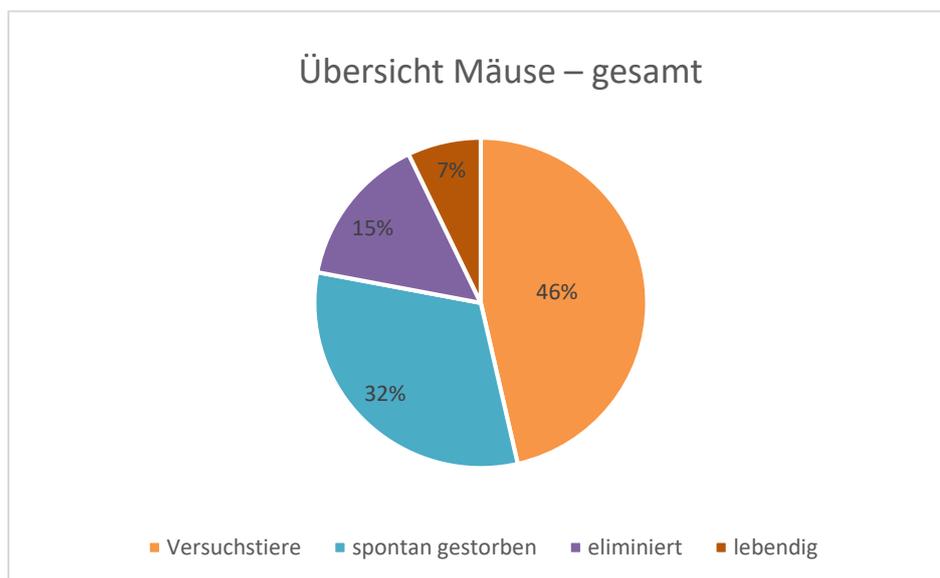
**Abbildung 12 Abhängigkeit der Flotillin-1-Expression bei Flotillin-2-Deletion**

Es sind durchgängige Banden von Flotillin-1 bei Mäusen mit Flotillin-2-Deletion und ohne Deletion von Flotillin-2 zu erkennen. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

#### 4.4 Einfluss der Flotillin-2-Deletion auf die Mortalität

Es wurde von Wang *et al.* 2007 eine erhöhte spontane Mortalität von bis zu 20 % für die in dieser Dissertation verwendete Mauslinie B6.Cg-Tg(PDGFB-APPSwInd)20Lms/2J beschrieben (Wang *et al.* 2007).

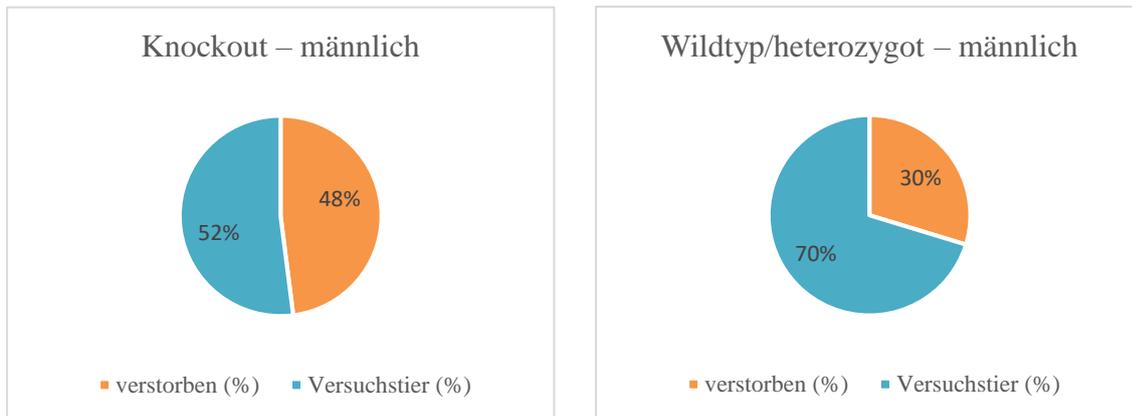
Die vorliegenden Ergebnisse sollen einen Überblick darüber verschaffen, ob die Deletion von Flotillin-2 einen Einfluss auf das erhöhte Mortalitätsrisiko der APP-transgenen Mäuse hat. Hierfür wurde eine Auswertung der APP-positiven Tiere seit dem 30.05.2011 vorgenommen. Diese Gruppe beinhaltete bis zum Zeitpunkt der Untersuchung 168 Tiere. Bis zur Auszählung wurden 25 Tiere eliminiert und zwölf waren zum Untersuchungszeitpunkt aus verschiedenen Gründen weder präpariert noch verstorben. Die für die Erhebung bereitgestellte Gruppe bestand aus 131 Tieren, wobei es sich um 62 männliche und 69 weibliche Tiere handelte. Es konnten 78 Mäuse mit einem Durchschnittsalter von zwölf Monaten erfolgreich für Tierversuche verwendet werden, wohingegen 53 vorzeitig spontan verstarben.



**Abbildung 13: Übersicht über verstorbene und für den Tierversuch verwendete Mäuse**

Gezeigt ist die Gesamtanzahl der erhobenen Werte in Prozentangaben.

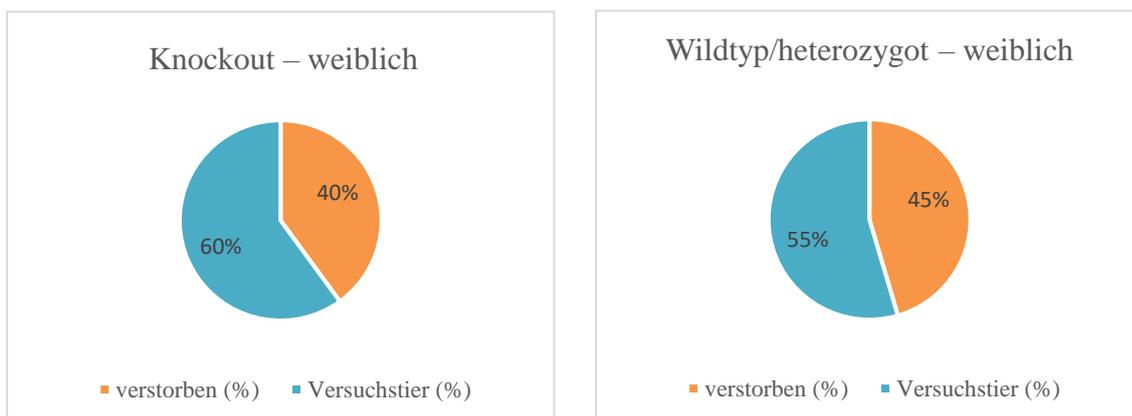
Zur Veranschaulichung, ob eine Flotillin-2-Deletion Einfluss auf die Mortalität der untersuchten Mäuse hatte, sind die Abbildungen 14 und 15 gezeigt. Hier ist die genaue Auswertung im Verhältnis zur Gesamtanzahl der Mäuse dargestellt. Unterteilt wurde in Geschlecht und Genotyp. Es zeigt sich bei den männlichen Knockout-Mäusen eine höhere Sterberate als bei Tieren mit Flotillin-2-Expression.



**Abbildung 14: Prozentuales Verhältnis der männlichen verstorbenen Mäuse und Versuchstiere**

Es ist eine Gegenüberstellung der männlichen Mäuse mit und ohne Flotillin-2-Deletion gezeigt. Es wurde prozentual in verstorben und Versuchstiere zur erhobenen Gesamtmenge unterschieden.

Bei den weiblichen Tieren im Verhältnis zum gesamten Kollektiv kann ein gegenteiliger Effekt zu den männlichen Mäusen festgestellt werden. Hier kam es zu einer leicht erhöhten Sterberate der Mäuse mit Flotillin-2-Expression.



**Abbildung 15: Prozentuales Verhältnis der weiblichen verstorbenen Mäuse und Versuchstiere**

Es ist eine Gegenüberstellung der weiblichen Mäuse mit und ohne Flotillin-2-Deletion gezeigt. Es wurde prozentual in verstorben und Versuchstiere zur erhobenen Gesamtmenge unterschieden.

## 5. Diskussion

Seit vielen Jahrzehnten wird an der neurodegenerativen Alzheimer-Erkrankung geforscht, ohne dass der Krankheitsverlauf, die einzelnen pathogenen Erscheinungen, Sekretasen oder auch das APP in ihrer Funktion im Detail beschrieben werden konnten. Ein erhöhtes Verständnis der Pathogenese und der beteiligten Faktoren, z. B. der Interaktionspartner des APP, könnte die verschiedenen Therapieansätze stark verbessern und sie in der Summe effektiver machen.

Die gegenwärtig verfügbaren und die in Entwicklung befindlichen medikamentösen Therapieverfahren setzen an unterschiedlichen Stellen des Krankheitsgeschehens an und verfolgen verschiedene Ziele. In der Entwicklungspalette zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung gab es im Jahr 2017 105 Wirkstoffe. 70 % der Medikamente gehören zu den krankheitsmodifizierenden Therapien. 14 % sind symptomatisch kognitive Verstärker und 13 % sind symptomatische Mittel, die neuropsychiatrische und Verhaltensänderungen betreffen (Cummings *et al.* 2017).

Antidementiva gehören zu der Gruppe der symptomatisch behandelnden Medikamente. Sie sollen die Überträgerstoffe ergänzen, die infolge des Nervenzelluntergangs vermindert produziert werden. Der Ansatz liegt also in der Behandlung der schon auftretenden Symptome. Eine solche Therapie kann den Fortschritt der Erkrankung eindämmen, wird aber den Krankheitsverlauf kaum nennenswert verändern (Golde 2003). Seit mehreren Jahren werden neue Behandlungsansätze erprobt. Ihr Ziel ist es, die Vorgänge zu beeinflussen, die zum Untergang von Nervenzellen und Nervenzellkontakten beitragen, um auf diese Weise den Krankheitsprozess selbst zu verlangsamen. Einige Beispiele sind hier die Sekretase-Inhibitoren,  $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren und  $\alpha$ -Sekretase-Verstärker (Kumar *et al.* 2018).

Einige  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren wie LY-450139, GSI-953, BMS-708163, PF-3084014, MK-0752 und E2012 befinden sich in klinischen Versuchen. Es wurden bisher aber nur die klinischen Daten für eine Verbindung veröffentlicht (Kumar *et al.* 2018). Das Haupthindernis bei der Entwicklung von robusteren  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren ist ihre Unfähigkeit, zwischen APP und anderen Signaltransduktionswegen, wie zum Beispiel dem Notch-Signalweg, zu unterscheiden, was zu klinischen Problemen führt (Todd *et al.* 2010). Der Notch-Signalweg ist ein weit verbreiteter und stark konservierter Signaltransduktionsweg, durch den Zellen auf äußere Signale reagieren können. Die  $\gamma$ -Sekretase prozessiert auch das Notch-Protein. Eine vielversprechende Alternative stellen die  $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren dar. Sie entwickelten sich mit der Zeit als ein besserer und sicherer Ansatz für die Medikamentenentwicklung gegen die Alzheimer-Erkrankung. Sie reduzieren die Ablagerung von Amyloid, indem sie das Verhältnis von A $\beta$ 42 und A $\beta$ 40 zugunsten von A $\beta$ 40 verschieben (Bursavich *et al.* 2016). Hier kommt es durch die Modulatoren zu einem vermehrten Schnitt der A $\beta$ 40 durch die  $\gamma$ -Sekretase, sodass das aggregationsfreudigere A $\beta$ 42 vermindert gebildet wird.

Die Verringerung von  $\beta$ -Amyloid durch Hemmung seiner Produktion mit einem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor stellt einen weiteren neuen Mechanismus zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung dar. Die Ergebnisse aus klinischen Studien mit mehreren  $\beta$ -Amyloid-zielgerichteten Verbindungen haben jedoch die Existenz einer direkten Verbindung zwischen der Reduktion von  $\beta$ -Amyloid und der Verbesserung der Hirnfunktion in Frage gestellt, insbesondere in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (Doody *et al.* 2014).

Eine andere Möglichkeit der Behandlung mit Anti- $\beta$ -Antikörpern zeigte in einer kürzlich durchgeführten Mausstudie an J-20-Mäusen ein erhöhtes Risiko für eine spontane Mortalität nach Behandlung mit den entsprechenden Antikörpern. Aufgrund einer erhöhten exzitatorischen neuronalen Aktivität kam es zu tödlichen Anfällen der behandelten Mäuse (Mably *et al.* 2015). Keskin *et al.* konnten im Gegensatz zu Doody *et al.* an einem weiteren Alzheimer-Mausmodell zeigen, dass die  $\beta$ -Sekretase-Hemmung für alle Ebenen der Beeinträchtigung von Vorteil ist. Sie konnten positive Effekte sowohl auf der zellulären Ebene als auch hinsichtlich der kognitiven Fähigkeiten vermerken (Keskin *et al.* 2017).

Ein anderer Ansatz der medikamentösen Behandlung von Alzheimer ist nicht die Einschränkung der Sekretasen, sondern das Fördern des nicht-amyloiden Spaltungswegs. Die  $\alpha$ -Sekretase-Aktivierung tritt als ein eindeutiger und möglicher therapeutischer Ansatz auf, um die  $\beta$ -Amyloid-Erzeugung zu verringern. Es erleichtert die Proteolyse von APP im nicht-amyloiden Stoffwechselweg und verhindert die Plaque-Bildung (Kumar *et al.* 2018).

Verschiedene Gruppen haben vorgeschlagen, dass die Aggregation von  $\beta$ -Amyloid-Peptiden durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gestoppt werden könnte, die gegen die verschiedenen Isoformen der  $\beta$ -Amyloid-Peptide erzeugt wurden. In einem solchen Ansatz der Immuntherapie mit  $\beta$ -Amyloid-Antikörpern waren die Antikörper in der Lage, in das ZNS einzudringen, wo sie entweder die Entfernung vorhandener Plaques induzierten oder die Bildung neuer Plaques unterdrückten. Obwohl die Daten aus einer Reihe von Studien ermutigend sind, laufen derzeit weitere Versuche, um die Sicherheit des Ansatzes vollständig zu bewerten (Todd *et al.* 2010). In einer Studie zu Solanezumab, einem monoklonalen Antikörper, konnte nach zahlreichen Misserfolgen in diesem Therapiebereich eine Untergruppe von Patienten mit leichter Demenz nach 18 Monaten eine gewisse Verbesserung der kognitiven und funktionellen Parameter aufweisen. Sie zeigten im Vergleich zu Patienten, die mit Placebo behandelt wurden, auch nach zwei Jahren aufbauender Untersuchungen die Differenz zu den mit Placebo behandelten Patienten (Liu-Seifert *et al.* 2015).

Auch nichtmedikamentöse Ansätze werden angewendet, um den Krankheitsverlauf zu entschleunigen. Hierzu zählt beispielsweise die Musiktherapie. Sie kann in allen Krankheitsstadien eine förderliche Wirkung haben (Bruscia 2012). Auch die kognitive Verhaltenstherapie findet erfolgreich Anwendung. Hier gibt es umfassende psychotherapeutische Behandlungsprogramme für Personen mit beginnender Alzheimer-Erkrankung und ihre Angehörigen (Forstmeier und Roth 2018).

Studien der vergangenen Zeit haben immer wieder Zusammenhänge zwischen Flotillin und Alzheimer festgestellt (Girardot *et al.* 2003, Kokubo *et al.* 2000, Chen *et al.* 2006, John *et al.* 2014). Ein wichtiger Faktor bei der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung sind das Vorläuferprotein APP und die daraus entstehenden  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen. Da die  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen heute als ein wichtiger Faktor der Erkrankung angesehen werden, wie in der Einleitung genauer erläutert, versuchen wir in der vorliegenden Arbeit, den Zusammenhang zwischen APP und Flotillin-2 darzustellen und die Effekte einer Deletion von Flotillin-2 auf APP sowie auf die Ablagerungen des  $\beta$ -Amyloid-Peptids zu verdeutlichen.

## 5.1 Verteilung und Lokalisation der $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen im Großhirngewebe

Typische Plaques bestehen aus einem porösen Kern mit Poren einer charakteristischen Größe und einem diffusen Ring, dessen Dichte langsam vom Schwerpunkt des senilen Plaques abfällt (Cruz *et al.* 1997). Ihr irreversibler Entstehungsprozess führt zu einer unlöslichen  $\beta$ -Amyloid-Ablagerung. Eine Vielzahl von senilen Plaques wurde in Gehirnen von an Alzheimer erkrankten Patienten nachgewiesen (Gordon 1981). Gerade im Cortex cerebri, auch Großhirnrinde genannt, konnten sie vermehrt gezeigt werden (Kokubo *et al.* 2000).

Der Cortex cerebri ist die am weitesten entwickelte Hirnregion und dient zum Beispiel der Verarbeitung von Sinneswahrnehmungen, wie Sehen, Lesen, Hören, Sprechen, Planung und Ausführung von Willkürbewegungen. Auch das Bewusstsein, komplexes Denken und die Persönlichkeitsentwicklung sind durch ihn möglich. Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass gerade zentral im Hippocampus, der ein Teil des limbischen Systems ist und somit zum Cortex cerebri gehört, sich verstärkt  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen befinden. Da gerade dieser Teil des Großhirns für die Gedächtnisbildung verantwortlich ist, können diese Erkenntnisse in einen engen Zusammenhang zum klinischen Erscheinungsbild der Alzheimer-Erkrankung gesetzt werden. Besonders in den frühen Phasen der Erkrankung sind Gedächtnis- und Führungskompetenzfähigkeit eingeschränkt, was sich besonders in Aufgaben widerspiegelt, welche die kognitive Flexibilität beurteilen (Albert 1996).

Die Lokalisation der Plaques selber kann helfen, besonders die Verhaltenstherapien und die spezielle kognitive Förderung von Patienten zu optimieren. Möglicherweise können gezielt gesetzte Reize einen weiteren Ausbau und weitere Vertiefungen der nicht medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten bieten.

## 5.2 Zusammenhang zwischen Flotillin-2, APP und $\beta$ -Sekretase

Untersuchungen, die Flotilline mit APP und  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen verknüpften, umfassen die Flotillin-1-Färbung von  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen in Gehirnschnitten von Patienten mit einer Alzheimer-Erkrankung. Es konnte festgestellt werden, dass eine  $\beta$ -Amyloid-Überproduktion zur Akkumulation dieser Fragmente in Flotillin-1-positiven Endosomen führte (Rajendran *et al.* 2007). Ergebnisse von John *et al.* aus dem Jahr 2014 zeigen zudem, dass ein Flotillin-Knockdown zu einem Anstieg der  $\beta$ -Sekretase-Färbung und zur Akkumulation von  $\beta$ -Sekretase in intrazellulären Strukturen führte. Gleichzeitig konnte auch ein Anstieg des CT-99-Fragments nachgewiesen werden (John *et al.* 2014). Die Verarbeitung von APP mit der  $\beta$ -Sekretase wird als Geschwindigkeitsbegrenzungsschritt in der  $\beta$ -Amyloid erzeugenden Kaskade betrachtet (Hardy und Higgins 1992). Das Ergebnis von John *et al.* lässt vermuten, dass in diesem Zusammenhang auch ein erhöhtes Vorkommen an APP möglich ist und somit vermehrt  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen entstehen. Flotillin-1 bindet direkt an das Dileucin-Motiv im zytoplasmatischen Schwanz der  $\beta$ -Sekretase, während die Flotillin-2-Bindung hauptsächlich durch eine Wechselwirkung mit Flotillin-1 vermittelt wird. Knockdown der Flotilline führt zu einer veränderten subzellulären Lokalisierung der  $\beta$ -Sekretase in Endosomen und zur Stabilisierung des  $\beta$ -Sekretase-Proteins. Die Studie von John *et al.* zeigt zum ersten Mal, dass Flotilline an der endosomalen Sortierung der  $\beta$ -Sekretase beteiligt sind. Da die endosomale Lokalisation von BACE1 seine Funktion als  $\beta$ -Sekretase beeinflusst, indem es die amyloidogene Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins erhöht, könnten Flotilline eine neue Rolle bei der Alzheimer-Krankheit spielen (John *et al.* 2014).

Es konnte nachgewiesen werden, dass das APP direkt mit Flotillin-1 in Wechselwirkung tritt (Chen *et al.* 2006). Ein Zusammenhang von Flotillin und der Verbindung zum Transport und der Verarbeitung von APP wurde 2008 aufgestellt. So konnte von Schneider *et al.* gezeigt werden, dass durch einen siRNA-vermittelten Knockout von Flotillin-2 die Endozytose von APP beeinträchtigt wird und die nanometergroße Ansammlung von APP in der Plasmamembran sich verändert (Schneider *et al.* 2008).

Bitsikas *et al.* konnten mit einem APP/PS1-Knockout-Mausmodell auf diesen Erkenntnissen aufbauen und untersuchten ihr Mausmodell auf  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen. Sie fanden heraus, dass bei einem Flotillin-1- und Flotillin-2-Knockout jeweils eine Verringerung des  $\beta$ -Amyloid-Niveaus und der Häufigkeit von Kongorot-gefärbten Plaques vorlag. Dieses Ergebnis deutet auf eine essentielle Rolle der Flotilline bei dem Transport und der Prozessierung von APP hin. Die Größenordnung der Reduktion war jedoch relativ gering. Daher sollte die Möglichkeit in Erwägung gezogen werden, dass Flotilline nicht direkt in das APP-Trafficking per se involviert sind, sondern eher eine homöostatische Rolle in einem separaten zellulären Prozess spielen, der sich indirekt auf die  $\beta$ -Amyloid-Produktion auswirkt (Bitsikas *et al.* 2014).

Unsere Untersuchungen konnten keinen Einfluss einer Flotillin-2-Deletion auf das nachweisbare APP zeigen. Hier konnte durch den Western Blot eine rein qualitative Aussage getroffen werden. Im direkten Vergleich der untersuchten Mäuse mit und ohne Deletion zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Ob der Knockout noch weitere Einflüsse auf APP und weitere Verarbeitungsschritte hat, konnte durch unseren Versuch nicht aufgezeigt werden. Da es sich bei unserer Auswertung durch den Western Blot um eine qualitative Aussage handelt, wäre hier eine quantitative Messung mit anderen Verfahren nötig, um ein genaueres Ergebnis zu erzielen. Auch konnte nicht gezeigt werden, ob ein Einfluss durch die Überproduktion des transgenen APPs auf die Untersuchungsergebnisse besteht. Um einen vertiefenderen Vergleich treffen zu können, welchen Einfluss eine Deletion von Flotillin-2 auf das APP-Vorkommen oder die weiteren Verarbeitungsschritte hat, wäre auch ein biochemischer Nachweis mittels Western Blot oder ELISA des CT-99-Fragments möglich gewesen. Hier wäre ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen von John *et al.* möglich, die auf einen Anstieg dieses Fragments hinweisen. Da dieses die Vorstufe für das schädliche A $\beta$ 42-Fragment ist, hätten sich diese Erkenntnisse auch in Zusammenhang mit den Ergebnissen der Menge an  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen diskutieren lassen (siehe Abschnitt 5.2).

### 5.3 Abhängigkeit von Flotillin-2-Deletion und $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Abhängigkeit von Flotillin-2 und  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen aufzuzeigen.

Schneider *et al.* fanden Belege dafür, dass die Flotillin-2-Deletion aufgrund der Plasmamembranretention und der ineffizienten Endozytose von APP zu einer verminderten  $\beta$ -Amyloid-Bildung führt (Schneider *et al.* 2008). Sie verwendeten für ihre Erhebungen eine Maus-Neuroblastom-N2a-Zelllinie, die möglicherweise keine geeignete Information bezüglich des Verarbeitungsmechanismus *in vivo* bereitstellt. Da sich die Lokalisierungsmuster von Flotillin-1 und -2 in vielen Zelltypen zwar weitgehend überlappen, trotzdem aber spezifische Unterschiede in den Zelltypen und an Organellen beobachtet werden konnten (Liu *et al.* 2005), können die Ergebnisse von Schneider *et al.* nicht direkt mit unseren Ergebnissen in Verbindung gebracht werden. Dieser Faktor sollte immer mit in die Betrachtung einbezogen werden, da *In-vitro*- und *In-vivo*-Experimente zum Teil widersprüchliche Ergebnisse zeigen können.

In den Gehirnen von zwölf Wochen alten Mäusen, denen Flotillin-1 fehlte, konnten Bitsikas *et al.* auch eine kleine, aber signifikante Reduktion des  $\beta$ -Amyloid-Spiegels und der Häufigkeit von Kongorot-gefärbten Plaques aufzeigen. Hier wurde die Plaque-Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche der Kryoschnitte betrachtet. Eine ähnliche Verringerung wurde bei Flotillin-2- und Doppelknockout-Mäusen beobachtet (Bitsikas *et al.* 2014). Zur Erhebung der Daten wurde ein APP/PS1-Modell verwendet. APP/PS1-Mäuse sind ein Modell der zerebralen Amyloidose und nicht direkt der Alzheimer-Erkrankung, da die Mäuse nicht die Tau-Pathologie und Neurodegeneration modellieren, die bei der Alzheimer-Erkrankung zu sehen ist. Das Einsetzen der Amyloid-Ablagerung in APP/PS1-Mäusen tritt früher auf als bei anderen transgenen Modellen (Radde *et al.* 2006). Die gezüchtete Linie, die in dieser Arbeit verwendet wurde, zeigt hingegen eine Überexpression des humanen APPs, welches in drei Aminosäuren eine Mutation aufweist. Diese Mutationen treten häufig bei Patienten mit familiärer Alzheimer-Erkrankung auf und begünstigen die Entstehung des  $\beta$ -Amyloid-Peptids aus APP.

Die Ergebnisse der Studie von Bitsikas *et al.* stimmen nicht mit unseren Erhebungen überein. Wir konnten zeigen, dass sich kein Unterschied in der Menge der  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen bei Flotillin-2-Deletion im Vergleich zur normalen Expression finden lässt. Die Abweichungen der Ergebnisse können sich aus dem unterschiedlichen Alter oder der Anzahl der untersuchten Objekte ergeben. Genauso sind bei den unterschiedlichen verwendeten Modellen auch unterschiedliche Untersuchungsvoraussetzungen gegeben, die sich in den Ergebnissen widerspiegeln können. Bitsikas *et al.* hatten für ihre Erhebung weniger Mäuse zur Verfügung, zusätzlich waren die untersuchten Mäuse um einige Wochen jünger als in der vorliegenden Arbeit. Es ist möglich, dass sich die Plaque-Bildung mit zunehmendem Alter in den verschiedenen Mausgruppen regulierte und angeglichen hat und somit mit unseren Ergebnissen nicht vergleichbar ist. Dieser Ansatz würde sich mit den Untersuchungsergebnissen von Arriagada *et al.* decken, die nachweisen konnten, dass die Plaque-Größe und die relative  $\beta$ -Amyloid-Belastung (Gesamtprozentsatz) über einen breiten Zeitraum der Krankheit konstant bleiben (Arriagada *et al.* 1992). Da in dieser Auswertung die erhobenen Werte nicht ins Verhältnis zur Gesamtfläche gesetzt wurden, wie bei Bitsikas *et al.*, können auch diese Zahlen nicht in direkte Gegenüberstellung gebracht werden.

Die  $\beta$ -Amyloid-Produktion wird bei exogener Expression von APP oder PS1 beschleunigt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass eine erzwungene Expression von beiden Proteinen signifikante Änderungen des  $\beta$ -Amyloid-Niveaus mit sich bringt. Diese Niveauänderung könnte bei einer Deletion der Flotilline maskierend wirken (John 2014). Die übermäßige Expression von APP kann somit auch die Ergebnisse verfälschen. Da in beiden untersuchten Mausgruppen eine kontinuierliche Überexpression vorlag, kann dieser Faktor höchstwahrscheinlich vernachlässigt werden.

Bei der Erhebung der Ergebnisse hätte es zu einer detaillierteren Auswertung kommen können, wäre das Anfangsgewicht der Gewebe dokumentiert worden. Somit hätte der Plaque-Befall in ein Verhältnis zur Gesamtgröße gesetzt werden und die erhobenen Resultate noch differenzierter betrachtet werden können. Auch eine 3D-Rekonstruktion hätte eine Möglichkeit einer detaillierteren Darstellung der Plaque-Ablagerungen sein können.

#### 5.4 Abhängigkeit von Flotillin-1 bei einer Flotillin-2-Deletion

Bitsikas *et al.* stellten die Theorie auf, dass Flotilline wahrscheinlich eine Verbindung zum Transport oder der Verarbeitung von APP haben und die Abwesenheit von einem Flotillin wahrscheinlich nicht durch die Anwesenheit des anderen Flotillin-Proteins kompensierbar ist, was darauf hindeutet, dass Flotilline einen funktionellen Komplex bilden (Bitsikas *et al.* 2014). Diese Theorie konnte durch Banning *et al.* 2014 nochmals bestätigt werden. Hier führte ein Flotillin-2-Knockout gleichzeitig zu einer stark verminderten Expression des Flotillin-1-Proteins (Banning *et al.* 2014). Die untersuchten Gewebe der Maus waren hier Leber, Lunge, Niere und Kolon. Diese Wechselwirkung ist im Fall von Flotillin-1 stärker, da der Flotillin-1-Knockout typischerweise nur eine mäßige oder sogar keine Depletion von Flotillin-2 zur Folge hat, was darauf hindeutet, dass Flotillin-1 stärker von Flotillin-2 abhängig ist als umgekehrt (Banning *et al.* 2014a).

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit im Großhirngewebe nicht bestätigt werden. Dass Flotilline ubiquitär exprimiert werden und ihre Expression im Hirngewebe besonders hoch ist, konnte schon in den Anfängen der Flotillin-Forschung gezeigt werden (Edgar und Polak 2001). In unseren Untersuchungen konnte die Depletion von Flotillin-2 keinen gleichzeitigen Einfluss auf Flotillin-1 nehmen. Wie im Western Blot gezeigt, findet sich bei Knockout-Mäusen und Tieren mit Flotillin-2-Expression kein Unterschied in der Bandenausprägung von Flotillin-1. Es lässt sich sogar eine erhöhte Expression von Flotillin-1 bei Flotillin-2-Knockout vermuten.

Wie wichtig Flotillin-1 im neuronalen Gewebe ist, konnte 2009 belegt werden. Es wurde gezeigt, dass Flotillin-1 für die axonale Regeneration, Differenzierung und Auswachsen von Hippocampusneuronen (Munderloh *et al.* 2009) sowie für die Bildung von glutamergen Synapsen im Hippocampus (Swanwick *et al.* 2010) und die Internalisierung von Neurotransmittertransportern (Cremona *et al.* 2011) verantwortlich ist. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass im Hippocampusgewebe von Mäusen ein erhöhter Spiegel von Flotillin-1 vorhanden ist und es eine große Bedeutung für die gedächtnisbezogenen Prozesse in Säugetiersystemen hat. Ob die Hochregulierung von Flotillin-1 Ursache oder Folge von hippocampusabhängigem Lernen im intakten Tier ist, ist nicht klar (Monje *et al.* 2013).

Diese Ergebnisse lassen Raum für Spekulation, dass die Funktion der Flotilline in Neuronen durchaus umfassender sein könnte als in anderen Organen von Säugetieren. Durch die Unabhängigkeit oder die sogar mögliche Kompensation von Flotillin-1 bei einem Knockout von Flotillin-2 könnte die Ausbildung eines möglichen Phänotyps oder Ähnliches im Hirngewebe vermieden werden. Um diese Theorie zu bestätigen, müssten jedoch vertiefende Untersuchungen durchgeführt werden.

## 5.5 Flotillin-2-Deletion und die Auswirkungen auf die Überlebenswahrscheinlichkeit und Ausbildung eines Phänotyps

Amaddii *et al.* machten 2012 darauf aufmerksam, dass es bei der Manipulation von Flotillin auch zu unerwarteten Wirkungen kommen kann, wie zum Beispiel einer möglichen Herunterregulierung von mit Wachstum assoziierten Genen (Amaddii *et al.* 2012). Um eine mögliche Auswirkung auf den gesamten Organismus der Mäuse mit Flotillin-2-Knockout darzustellen, wurde in dieser Arbeit eine Aufstellung zu der Überlebensrate der Mäuse mit und ohne Deletion durchgeführt. Die hierfür verwendete APP-transgene Mauslinie B6.Cg-Tg(PDGFB-APP<sup>SwInd</sup>)20Lms/2J weist eine spontane Mortalität auf. Dieser Faktor sollte in die Auswertung mit einbezogen werden.

Andere Forschungsgruppen haben versucht, die Wirkungen eines Flotillin-Knockouts genauer zu definieren. Bodrikov *et al.* waren in der Lage, *in vitro* Anomalien zu identifizieren, die sich aus Flotillin-2-Knockout und der Herunterregulierung in kultivierten Neuronen nachweisen lassen: Die Neuritenextension und das PSD-95-Trafficking waren in jungen Knockout-Neuronen stark beeinträchtigt. Die Abwesenheit von Flotillin-2 führte zu einer verringerten Anzahl von Synapsen und einer reduzierten dendritischen und spinalen Lokalisation von GluN1 und GluA1. Diese Erkenntnisse konnten aber nur in Neuronen *in vitro*, aber nicht *in vivo* beobachtet werden, da möglicherweise kompensatorische Faktoren die neuronale Entwicklung im Gehirn unterstützen, die *in vitro* nicht vorhanden sind (Bodrikov *et al.* 2017). Auch andere Forschungsgruppen stimmten mit dem Ergebnis überein, dass es bei einem Flotillin-2-Knockout scheinbar zur Regulation von Genen und Proteinmodifikation sowie zu Veränderungen in der Aktivierung von Signalmolekülen kommen kann. Ihre Untersuchungen zeigten, dass der Knockout von spezifischen Genen durch Kompensation von expressions- und aktivitätsregulierenden Faktoren zu scheinbar normalen Mäusen führt (Banning *et al.* 2014, Rossi *et al.* 2015).

Wie unsere Untersuchungen ergaben, zeigte sich zwischen Mäusen mit und ohne Knockout von Flotillin-2 kein Unterschied in der Überlebensrate. Alle transgenen Mäuse weisen, wie erwartet, eine erhöhte Mortalität auf, die über den bereits veröffentlichten Werten liegt. Je nach Geschlecht zeigt sich sogar eine tendenziell höhere Mortalität. Um diese Ergebnisse zu festigen, müssten diese mit einer größeren Mauskoorte und verschiedenen unabhängigen Standorten überprüft werden.

Eine Besonderheit im äußeren Erscheinungsbild konnte nicht festgestellt werden, was augenscheinlich zu einem fehlenden Phänotyp führt. Doch selbst wenn man davon ausgeht, dass der Knockout durch eine eventuelle Kompensation beeinflusst wird, sollte beachtet werden, dass eine Maus, die eine funktionelle Kopie eines Gens fehlt, das von einem zweiten Gen unterstützt wird, immer noch einen Phänotyp hat, der aus dem Fehlen des ersten Gens resultiert. Es kann sein, dass es auf der Ebene des gesamten Organismus jedoch nicht sichtbar ist (Barbaric *et al.* 2007). Das Fehlen solcher eindeutigen Phänotypen für Flotilline könnte, ähnlich wie bei der Caveolin-1-Knockout-Maus, die nur sehr milde Defekte aufwies, möglicherweise auch durch die kompensatorische Hochregulation anderer Gerüstproteine maskiert worden sein (Razani *et al.* 2001). Auch Hoehne *et al.* setzten sich mit der Frage des fehlenden Phänotyps bei Flotillin-2-Knockout auseinander und erklärten, dass es möglich sei, dass die kompensatorische Hochregulation anderer Proteine mit überlappender oder redundanter Funktion, wie zum Beispiel Stomatine, hierfür verantwortlich sein könnte. Sie merkten an, dass es vorstellbar sei, dass die alleinige Anwesenheit des Flotillin-1-Proteins ausreicht, um einen scheinbar mutierten Phänotyp zu unterdrücken (Hoehne *et al.* 2005).

Es stellt sich die Frage, ob die Flotillin-Proteine wirklich so abhängig voneinander sind, wie es andere Studien zeigten, oder ob sie sich abhängig vom untersuchten Gewebe unabhängig voneinander betrachten lassen. Möglich ist auch eine weniger wichtige Rolle der Flotilline im Organismus, als der jetzige Stand der Forschung vermuten lässt. Trotz der ubiquitären Verteilung und der evolutionären guten Konservierung der Flotilline konnte ein Doppelknockout der Flotilline in der *Drosophila melanogaster* keinen offensichtlichen und nachweisbaren externen oder internen Mutanten-Phänotyp oder einen phänotypischen Defekt zeigen (Hoehne *et al.* 2005). Dieses Phänomen zeigt sich auch in einer unserer neuesten Mauszüchtungen mit einem Doppelknockout. Auch diese Mäuse weisen keinen offensichtlichen Phänotyp auf. Diese Ergebnisse könnten die oben aufgeführte Vermutung unterstützen, obwohl auch hier eine Kompensation oder eine Unterdrückung des Phänotyps durch andere noch unbekannte Mechanismen möglich ist.

## 5.6 Ausblick

Die Alzheimer-Erkrankung ist eine der bekanntesten neurodegenerativen Erkrankungen weltweit. Klinisch ist sie durch eine zunehmende Demenz gekennzeichnet, die mit Gedächtnis- und Orientierungsstörungen, Sprachstörungen, Störungen des Denk- und Urteilsvermögens sowie Veränderungen der Persönlichkeit einhergeht. Neben dem voranschreitenden Untergang von Nervenzellen und Zellkontakten sind im Gehirn von Alzheimer-Patienten typische Ablagerungen, die sogenannten  $\beta$ -Amyloid-Plaques, festzustellen.

In der vorliegenden Arbeit konnten Forschungsergebnisse präsentiert werden, die unter Verwendung des Flotillin-2-deletierten Mausmodells B6;129-Tg(PDGFB-APP<sup>SwInd</sup>) Flot2<sup>tm</sup> Zusammenhänge zwischen  $\beta$ -Amyloid-Ablagerung und dem ubiquitär exprimierten Flotillin aufzeigen. Es konnte kein Einfluss auf das vorhandene APP-Vorkommen sowie die Ausbildung von  $\beta$ -Amyloid-Plaques in den untersuchten Mauskohorten nachgewiesen werden. Um diese Ergebnisse zu unterstützen und einen Zusammenhang ausschließen zu können, sind weitere unabhängige Untersuchungen unter gleichen Bedingungen mit größeren Kollektiven notwendig. Eine noch genauere Auswertung ist durch die Einbeziehung der Gesamtfläche des zu untersuchenden Mausgehirns zu  $\beta$ -Amyloid-Plaques möglich. Zudem wäre eine genauere Analyse des prozessierten APPs interessant. In den vorliegenden Western Blots konnte das unprozessierte APP gezeigt werden. Durch eine Optimierung der Probenvorbereitung wäre ein Nachweis der einzelnen Spaltprodukte und so eine differenzierte Aussage über die Wirkung der Flotillin-2-Deletion auf APP möglich.

Interessant sind unsere vorliegenden Ergebnisse in Bezug auf die Abhängigkeit der Flotilline untereinander. Im Gegensatz zu anderen untersuchten Geweben wie Leber, Lunge, Niere und Kolon konnten wir im Großhirn keine stark verminderte Expression des Flotillin-1-Proteins bei gleichzeitigem Flotillin-2-Knockout nachweisen. Das würde der Theorie eines funktionellen Komplexes der Flotilline widersprechen und ihnen eine wichtige funktionelle Rolle im neuronalen Gewebe zusprechen. Auf diesem Ergebnis aufbauende Untersuchungen könnten diese Abhängigkeit genauer erläutern. Hierbei sollten auch gedächtnisbezogene Auffälligkeiten sowie die Ausbildung eines Phänotyps mit einbezogen werden.

Ob und welche Maßnahmen zur Kompensation eines Flotillin-2-Knockouts führen, sollte zusätzlich analysiert werden. Untersuchungen an Flotillin-Doppelknockout-Mäusen könnten den Einfluss von Flotillinen im neuronalen Gewebe vertiefen und die Kompensation bestätigen oder widerlegen. Eine Kombination mit verhaltensbiologischen Experimenten könnte die Wirkung eines Knockouts nochmals in Relation mit anderen Aspekten ermöglichen. Der Effekt des einfachen oder Doppelknockouts der Flotilline auf das Verhalten der Mäuse könnte mit Hilfe des Morris-Wasserlabyrinths gezeigt werden. Hierfür wäre die Einbeziehung weiterer Gedächtnis- oder Lerntests möglich. Sie sollten nach genauer Festlegung der zu bearbeitenden Fragestellung ausgewählt werden.

## 6. Zusammenfassung

Die Alzheimer-Erkrankung ist heute eine der bekanntesten neurodegenerativen Erkrankungen weltweit. Ihre klassische Triade der Pathologie besteht aus Amyloid-Plaques, die aus  $\beta$ -Amyloid-Peptiden bestehen, neurofibrillären Tangles mit hyperphosphoryliertem Tau und einem weitverbreiteten neuronalen Verlust im Kortex und im Hippocampus.  $\beta$ -Amyloid-Peptide entstehen durch die enzymatische Spaltung von APP durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase. Diese proteolytische Prozessierung wird als amyloider Weg bezeichnet. Er hat die Entstehung des Bruchstückes A $\beta$ 42 zur Folge, welches der Hauptbestandteil der  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen ist. Im neuronalen Gewebe besteht eine hohe Flotillin-Expression. Besonders hoch ist sie bei weit fortgeschrittener Alzheimer-Erkrankung. Unter Flotillinen werden zwei evolutionär hochkonservierte periphere Membranproteine zusammengefasst, die in verschiedenen Organismen ubiquitär exprimiert werden. Sie sind mit Membranmikrodomänen mittels Lipidmodifikationen und Oligomerisierung assoziiert. Flotilline enthalten am N-Terminus eine weitgehend uncharakterisierte SPFH-Domäne und gehören zusammen mit Stomatin und Prohibitin zur SPFH-Familie. Am C-Terminus der Flotilline befinden sich mehrere Glutamat- und Alanin-Wiederholungen.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die Ausprägung der  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen im Großhirngewebe von APP-überexprimierenden (B6;129-Tg(PDGFB-APP<sup>SwInd</sup>)) Mäusen in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht zu untersuchen und diese mit einem Flotillin-2-deletierten Mausmodell B6;129-Tg(PDGFB-APP<sup>SwInd</sup>)Flot2<sup>tm</sup> zu vergleichen. Mit Hilfe von Kongorotlösung wurden die  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen dargestellt und mikroskopisch ausgewertet. Im Alter von ca. zwölf Monaten zeigten sich bei allen untersuchten Tieren mit APP-Überexpression deutliche Ablagerungen. Unter Berücksichtigung der Parameter-Anzahl und Größe der Ablagerungen, des Alters sowie Genotyps und Geschlechts der Mäuse konnte jedoch kein Einfluss von Flotillin-2 festgestellt werden. Dies könnte durch eine Kompensation des fehlenden Flotillin-2 durch andere Proteine, wie zum Beispiel Flotillin-1, bedingt sein. Flotillin-1 und -2 treten miteinander in Wechselwirkung und stabilisieren sich in vielen Zell- und Gewebetypen gegenseitig.

Die Flotillinexpression wurde mittels Western Blot in Gehirnlisaten der Versuchstiere untersucht. Es zeigte sich eine hohe Expression von Flotillin-1 bei gleichzeitiger Flotillin-2-Deletion. So verhält sich hier die Dependenz der Flotilline zueinander anders als in anderen untersuchten Geweben vorheriger Studien. Die Unabhängigkeit der beiden Flotilline im neuronalen Gewebe lässt die Funktion der Flotilline in Neuronen durchaus umfassender erscheinen als in anderen Organen. Des Weiteren wurde die Menge an endogenem APP im Gehirn von Mäusen mit und ohne Flotillin-2-Deletion verglichen. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied in der Menge des unprozessierten APPs gezeigt werden. Eine Überexpression von APP steigert das Mortalitätsrisiko von Mäusen. Die zusätzliche Deletion von Flotillin-2 scheint jedoch keinen zusätzlichen Einfluss auf das Mortalitätsrisiko der APP-transgenen Mäuse zu haben.

Zusammenfassend zeigt sich durch das Fehlen von Flotillin-2 allein, in dem hier untersuchten Mausmodell, keine Veränderung. Es scheint keinen Einfluss auf die Entstehung und den Schweregrad der Alzheimer-Erkrankung zu haben.

## 7. Summary

Alzheimer's disease is one of the best known neurodegenerative diseases worldwide. Its pathologic triad consists of amyloid plaques made up of  $\beta$ -amyloid peptides, neurofibrillary tangles with hyperphosphorylated tau proteins and widespread neuronal loss in the cortex and hippocampus.  $\beta$ -amyloid peptides evolve through enzymatic cleavage of APP by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases. This proteolytic processing is called the amyloid pathway. It implicates the formation of the fragment A $\beta$ 42, which is the main component of  $\beta$ -amyloid deposits. There is high flotillin expression in neuronal tissue, and it is particularly high in patients with advanced Alzheimer's disease. The term Flotillins comprises two evolutionarily highly conserved peripheral membrane proteins that are ubiquitously expressed in different organisms. They are associated with membrane microdomains via lipid modifications and oligomerization. The N-terminal part of Flotillins contains the poorly characterized SPFH domain also found in proteins like Stomatin and Prohibitin. At their C-terminus, Flotillins contain several glutamate and alanine repeats.

The aim of this study was to investigate the expression of  $\beta$ -amyloid depositions in the cerebral tissue of APP overexpressing (B6; 129-Tg (PDGFB-APP<sup>SwInd</sup>)) mice, depending on their age and gender and to compare these with a Flotillin-2 deleted mouse model (B6;129-Tg(PDGFB-APP<sup>SwInd</sup>))Flot2<sup>tm</sup>. With Congo red solution, the  $\beta$ -amyloid depositions were displayed and evaluated microscopically. At the age of about twelve months, deposits were found in all examined animals with APP overexpression. However, considering the number of parameters and size of depositions, age, genotype and sex of the mice, no influence of Flotillin-2 could be detected. This could be due to a compensation of the missing Flotillin-2 by other proteins, such as Flotillin-1, since Flotillin-1 and -2 interact and stabilize each other in many cell and tissue types.

The expression of Flotillin was examined by Western Blot in cerebral lysates of the laboratory animals. A high expression of Flotillin-1 with simultaneous Flotillin-2 deletion could be found. Thus, the dependency of Flotillins to one another in this case differs from the tissues examined in previous studies. The independence of Flotillins in neuronal tissue function appears more extensive in neurons than in other organs. Furthermore, the amount of endogenous APP in the cerebrum of mice with and without Flotillin-2 deletion was compared. Again, no significant difference in the amount of unprocessed APP could be shown. Overexpression of APP increases the mortality risk of the mice. However, the additional deletion of Flotillin-2 does not appear to have an additional impact on the mortality risk of the APP transgenic mice.

In summary, the absence of Flotillin-2 in this mouse model, shows no difference compared to mice without Flotillin-2 deletion. It seems to have no influence on the development and severity of Alzheimer's disease in the mouse model used in our study.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure
A $\beta$ 40	Amyloid $\beta$ 40
A $\beta$ 42	Amyloid $\beta$ 42
APLP1	<i>engl. Amyloid-like protein 1</i>
APLP2	<i>engl. Amyloid-like protein 2</i>
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
AICD	APP intrazellulären Domäne
BACE1	Beta-secretase 1
BACE2	Beta-secretase 2
BSA	Bovines Serumalbumin
CAP	Cbl-associated Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>engl. enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Reticulum
Flot1	Flotillin-1
Flot2	Flotillin-2
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
KD	<i>engl. Knockdown</i>
KO	<i>engl. Knockout</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MeOH	Methanol
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge

NFT	Neurofibrilläre Tangles
NGF	Nervenwachstumsfaktor
PBH	Prohibitin-Homologie
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyde
PHF	Hyperphosphorylierte helikale Tau-Filamente
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
sAPP $\alpha$	sekretiertes Amyloid-Vorläuferprotein- $\alpha$
sAPP $\beta$	sekretiertes Amyloid-Vorläuferprotein- $\beta$
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>engl. small interfering RNA</i>
SPFH	Stomatin, Prohibitin, Flotillin und HflK/C
TBS-T	<i>engl. Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TIFF	<i>engl. Tagged Image File Format</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
WB	<i>engl. Western Blot</i>
WT	<i>engl. Wildtype</i>

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung Amyloid-Precursor-Protein Prozessierung.....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Flotillinen .....	10
Abbildung 3: Mäuseauswertung – Übersicht .....	36
Abbildung 4: Ausschnitt Mausgehirn mit Flotillin-2-Deletion.....	37
Abbildung 5: Abbildung 4 in 20facher Vergrößerung .....	38
Abbildung 6: Auswertung der männlichen, sowie weiblichen Mauspräparate.....	40
Abbildung 7: Gegenüberstellung der gesamten $\beta$ -Amyloiden-Ablagerungen in $\mu\text{m}^2$ ....	41
Abbildung 8: $\beta$ -Amyloide-Ablagerungen in $\mu\text{m}^2$ in der Altersübersicht .....	42
Abbildung 9: Die Verteilung der $\beta$ -Amyloiden-Ablagerungen im Cerebrum .....	43
Abbildung 10: Betroffene Hirnabschnitte im Verhältnis zum Alter der Mäuse .....	44
Abbildung 11: APP Abhängigkeit bei Flotillin-2-Deletion .....	45
Abbildung 12: Die Abhängigkeit der Flotillin-1-Expression bei Flotillin-2-Deletion ...	46
Abbildung 13: Übersicht über verstorbene + für den Tierversuch verwendete Mäuse ..	47
Abbildung 14: Verhältnis der männlichen verstorbenen Mäuse und Versuchstiere .....	48
Abbildung 15: Verhältnis der weiblichen verstorbenen Mäuse und Versuchstiere .....	48

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte .....	17
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungen .....	19
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Puffer .....	20
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primärantikörper .....	21
Tabelle 5: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Sekundärantikörper .....	21
Tabelle 6: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Primer und ihrer Sequenzen .....	21
Tabelle 7: One Taq Polymerase .....	28
Tabelle 8: Zeit und Temperaturangabe für die Standard-PCR .....	28
Tabelle 9: 10%iges Trenngel zur Gelelektrophorese .....	30
Tabelle 10: 4%iges Sammelgel zur Gelelektrophorese .....	30

## 11. Literaturverzeichnis

- Albert, M. S. (1996): Cognitive and neurobiologic markers of early Alzheimer disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93** (24), S. 13547–13551
- Alzheimer, A.; Stelzmann, R. A.; Schnitzlein, H. N.; Murtagh, F. R. (1995): An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". In: *Clinical anatomy (New York, N.Y.)* **8** (6), S. 429–431
- Amaddii, Monia; Meister, Melanie; Banning, Antje; Tomasovic, Ana; Mooz, Juliane; Rajalingam, Krishnaraj; Tikkanen, Ritva (2012): Flotillin-1/reggie-2 protein plays dual role in activation of receptor-tyrosine kinase/mitogen-activated protein kinase signaling. In: *The Journal of biological chemistry* **287** (10), S. 7265–7278
- Andersen, K.; Launer, L. J.; Dewey, M. E.; Letenneur, L.; Ott, A.; Copeland, J. R. M. et al. (1999): Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia. The Eurodem Studies. In: *Neurology* **53** (9), S. 1992
- Arriagada, P. V.; Growdon, J. H.; Hedley-Whyte, E. T.; Hyman, B. T. (1992): Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. In: *Neurology* **42** (3), S. 631
- Banning, Antje; Kurrle, Nina; Meister, Melanie; Tikkanen, Ritva (2014): Flotillin in receptor tyrosine kinase signaling and cancer. In: *Cells* **3** (1), S. 129–149
- Banning, Antje; Regenbrecht, Christian R. A.; Tikkanen, Ritva (2014b): Increased activity of mitogen activated protein kinase pathway in flotillin-2 knockout mouse model. In: *Cellular signalling* **26** (2), S. 198–207
- Barbaric, Ivana; Miller, Gaynor; Dear, T. Neil (2007): Appearances can be deceiving. Phenotypes of knockout mice. In: *Briefings in functional genomics & proteomics* **6** (2), S. 91–103
- Baumann, Christian A.; Ribon, Vered; Kanzaki, Makoto; Thurmond, Debbie C.; Mora, Silvia; Shigematsu, Satoshi et al. (2000): CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. In: *Nature* **407**, S. 202–207
- Bennett, B. D.; Denis, P.; Haniu, M.; Teplow, D. B.; Kahn, S.; Louis, J. C. et al. (2000): A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta-secretase. In: *Journal of Biological Chemistry* **275** (48), S. 37712–37717
- Bickel, Perry E.; Scherer, Philipp E.; Schnitzer, Jan E.; Oh, Phil; Lisanti, Michael P.; Lodish, Harvey F. (1997): Flotillin and Epidermal Surface Antigen Define a New Family of Caveolae-associated Integral Membrane Proteins. In: *Journal of Biological Chemistry* **272** (21), S. 13793–13802
- Bitsikas, Vassilis; Riento, Kirsi; Howe, Jonathan D.; Barry, Nicholas P.; Nichols, Benjamin J. (2014): The role of flotillins in regulating abeta production, investigated using flotillin 1<sup>-/-</sup>, flotillin 2<sup>-/-</sup> double knockout mice. In: *PloS one* **9** (1)
- Bodrikov, Vsevolod; Pauschert, Aline; Kochlamazashvili, Gaga; Stuermer, Claudia A. O. (2017): Reggie-1 and reggie-2 (flotillins) participate in Rab11a-dependent cargo trafficking, spine synapse formation and LTP-related AMPA receptor (GluA1) surface exposure in mouse hippocampal neurons. In: *Experimental neurology* **289**, S. 31–45

- Bodrikov, Vsevolod; Solis, Gonzalo P.; Stuermer, Claudia A. O. (2011): Prion protein promotes growth cone development through reggie/flotillin-dependent N-cadherin trafficking. In: *The Journal of neuroscience* **31** (49), S. 18013–18025
- Borchelt, David R.; Thinakaran, Gopal; Eckman, Christopher B.; Lee, Michael K.; Davenport, Frances; Ratovitsky, Tamara et al. (1996): Familial Alzheimer's Disease–Linked Presenilin 1 Variants Elevate A $\beta$ 1–42/1–40 Ratio In Vitro and In Vivo. In: *Neuron* **17** (5), S. 1005–1013
- Bruscia, Kenneth E. (2012): Case examples of music therapy for Alzheimer disease. Gilsum, NH: Barcelona Pub.
- Bursavich, Matthew G.; Harrison, Bryce A.; Blain, Jean-François (2016): Gamma Secretase Modulators. New Alzheimer's Drugs on the Horizon? In: *Journal of medicinal chemistry* **59** (16), S. 7389–7409
- Chandra, V.; Pandav, R.; Dodge, H. H.; Johnston, J. M.; Belle, S. H.; DeKosky, S. T.; Ganguli, M. (2001): Incidence of Alzheimer's disease in a rural community in India. The Indo-US Study. In: *Neurology* **57** (6), S. 985–989
- Chang, Keun-A; Suh, Yoo-Hun (2010): Possible roles of amyloid intracellular domain of amyloid precursor protein. In: *BMB reports* **43** (10), S. 656–663
- Chen, Ting-Yu; Liu, Pei-Hsueh; Ruan, Chi-Tun; Chiu, Ling; Kung, Fan-Lu (2006): The intracellular domain of amyloid precursor protein interacts with flotillin-1, a lipid raft protein. In: *Biochemical and biophysical research communications* **342** (1), S. 266–272
- Costantini, Claudio; Ko, Mi Hee; Jonas, Mary Cabell; Puglielli, Luigi (2007): A reversible form of lysine acetylation in the ER and Golgi lumen controls the molecular stabilization of BACE1. In: *The Biochemical journal* **407** (3), S. 383–395
- Cremona, M. Laura; Matthies, Heinrich J. G.; Pau, Kelvin; Bowton, Erica; Speed, Nicole; Lute, Brandon J. et al. (2011): Flotillin-1 is essential for PKC-triggered endocytosis and membrane microdomain localization of DAT. In: *Nature neuroscience* **14** (4), S. 469–477
- Cruz, L.; Urbanc, B.; Buldyrev, S. V.; Christie, R.; Gomez-Isla, T.; Havlin, S. et al. (1997): Aggregation and disaggregation of senile plaques in Alzheimer disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94** (14), S. 7612–7616
- Cummings, Jeffrey; Lee, Garam; Mortsdorf, Travis; Ritter, Aaron; Zhong, Kate (2017): Alzheimer's disease drug development pipeline. 2017. In: *Alzheimer's & dementia* **3** (3), S. 367–384
- Dickson, Dennis W. (2001): Neuropathology of Alzheimer's disease and other dementias. In: *Clinics in Geriatric Medicine* **17** (2), S. 209–228
- Doody, Rachelle S.; Thomas, Ronald G.; Farlow, Martin; Iwatsubo, Takeshi; Vellas, Bruno; Joffe, Steven et al. (2014): Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. In: *The New England journal of medicine* **370** (4), S. 311–321
- Edgar, Alasdair J.; Polak, Julia M. (2001): Flotillin-1: gene structure: cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biologie* (33), S. 53–64

- Eggert, Simone; Paliga, Krzysztof; Soba, Peter; Evin, Genevieve; Masters, Colin L.; Weidemann, Andreas; Beyreuther, Konrad (2004): The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages. Modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. In: *The Journal of biological chemistry* **279** (18), S. 18146–18156
- Forstmeier, Simon; Roth, Tanja (2018): Kognitive Verhaltenstherapie für Patienten mit leichter Alzheimer-Demenz und ihre Angehörige. 1. Aufl. 2018. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Fukumoto, Hiroaki (2002):  $\beta$ -Secretase Protein and Activity Are Increased in the Neocortex in Alzheimer Disease. In: *Arch Neurol* **59** (9), S. 1381
- Girardot, N.; Allinquant, B.; Langui, D.; Laquerriere, A.; Dubois, B.; Hauw, J.-J.; Duyckaerts, C. (2003): Accumulation of flotillin-1 in tangle-bearing neurones of Alzheimer's disease. In: *Neuropathol Appl Neurobiol* **29** (5), S. 451–461
- Glennner, George G.; Wong, Caine W. (1984): Alzheimer's disease: Initial report on the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. In: *Biochemical and biophysical research communications* (3), S. 885–890
- Golde, Todd E. (2003): Alzheimer disease therapy. Can the amyloid cascade be halted? In: *J. Clin. Invest.* **111** (1), S. 11–18
- Goldgaber, D.; Lerman, M.; McBride, O.; Saffiotti, U.; Gajdusek, D. (1987): Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. In: *Science* **235** (4791), S. 877–880
- Gordon, M. (1981): Scaling concepts in polymer physics. In: *Polymer* **22** (4), S. 565
- Haass, C.; Schlossmacher, M. G.; Hung, A. Y.; Vigo-Pelfrey, C.; Mellon, A.; Ostaszewski, B. L. et al. (1992): Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. In: *Nature* **359** (6393), S. 322–325
- Haass, Christian (2004): Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. In: *The EMBO journal* **23** (3), S. 483–488
- Haniu, M.; Denis, P.; Young, Y.; Mendiaz, E. A.; Fuller, J.; Hui, J. O. et al. (2000): Characterization of Alzheimer's beta-secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. In: *Journal of Biological Chemistry* **275** (28), S. 21099–21106
- Hardy, J.; Higgins, G. (1992): Alzheimer's disease. The amyloid cascade hypothesis. In: *Science* **256** (5054), S. 184–185
- Helmer, C. (2001): Mortality with Dementia. Results from a French Prospective Community-based Cohort. In: *American Journal of Epidemiology* **154** (7), S. 642–648
- Hoehne, Martin; Couet, H. Gert de; Stuermer, Claudia A. O.; Fischbach, Karl-Friedrich (2005): Loss- and gain-of-function analysis of the lipid raft proteins Reggie/Flotillin in Drosophila. They are posttranslationally regulated, and misexpression interferes with wing and eye development. In: *Molecular and cellular neurosciences* **30** (3), S. 326–338
- Icking, Ann; Amaddei, Monia; Ruonala, Mika; Höning, Stefan; Tikkanen, Ritva (2007): Polarized transport of Alzheimer amyloid precursor protein is mediated by adaptor protein complex AP1-1B. In: *Traffic* **8** (3), S. 285–296

- Jacobowitz, D. M.; Kallarakal, A. T. (2004): Flotillin-1 in the substantia Nigra of the Parkinson brain and a predominant localization in catecholaminergic nerves in the rat brain. In: *neurotox res* **6** (4), S. 245–257
- John, Bincy A.; Meister, Melanie; Banning, Antje; Tikkanen, Ritva (2014): Flotillins bind to the dileucine sorting motif of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and influence its endosomal sorting. In: *The FEBS journal* **281** (8), S. 2074–2087
- John, Bincy Anu (2014): Function of flotillins in Alzheimer disease and apoptosis. Online verfügbar unter <http://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/frontdoor/index/index/docId/34102> (abgerufen am 13.11.2016)
- Kao, Shih-Chu; Krichevsky, Anna M.; Kosik, Kenneth S.; Tsai, Li-Huei (2004): BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons. In: *The Journal of biological chemistry* **279** (3), S. 1942–1949
- Keskin, Aylın D.; Kekuš, Maja; Adelsberger, Helmuth; Neumann, Ulf; Shimshek, Derya R.; Song, Beomjong et al. (2017): BACE inhibition-dependent repair of Alzheimer's pathophysiology. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114** (32), S. 8631–8636
- Kim, Heechul; Ahn, Meejung; Moon, Changjong; Matsumoto, Yoh; Sung Koh, Chang; Shin, Taekyun (2006): Immunohistochemical study of flotillin-1 in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Brain research* **1114** (1), S. 204–211
- Kimberly, W. T.; Zheng, J. B.; Guenette, S. Y.; Selkoe, D. J. (2001): The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. In: *The Journal of biological chemistry* **276** (43), S. 40288–40292
- Kokubo, Hideko; Lemere, Cynthia A.; Yamaguchi, Haruyasu (2000): Localization of flotillins in human brain and their accumulation with the progression of Alzheimer's disease pathology. In: *Neuroscience Letters* **290** (2), S. 93–96
- Kumar, Devendra; Ganeshpurkar, Ankit; Kumar, Dileep; Modi, Gyan; Gupta, Sanjeev Kumar; Singh, Sushil Kumar (2018): Secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. Long road ahead. In: *European journal of medicinal chemistry* **148**, S. 436–452
- Kurrle, Nina; John, Bincy; Meister, Melanie; Tikkanen, Ritva (2012): Function of Flotillins in Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Endocytosis. Role of Tyrosine Phosphorylation and Oligomerization. In: *Protein Phosphorylation in Human Health: InTech*.
- Lang, Dirk M.; Lommel, Silvia; Jung, Marion; Ankerhold, Richard; Petrusch, Barbara; Laessing, Ute et al. (1998): Identification of Reggie-1 and Reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. In: *J. Neurobiol.* **37** (4), S. 502–523
- Langhorst, M. F.; Reuter, A.; Stuermer, C. A. O. (2005): Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. In: *Cellular and molecular life sciences* **62** (19-20), S. 2228–2240

- Lin, X.; Koelsch, G.; Wu, S.; Downs, D.; Dashti, A.; Tang, J. (2000): Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta -secretase site of beta -amyloid precursor protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97** (4), S. 1456–1460
- Liu, Jun; Deyoung, Stephanie M.; Zhang, Mei; Dold, Lisa H.; Saltiel, Alan R. (2005): The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. In: *The Journal of biological chemistry* **280** (16), S. 16125–16134
- Liu-Seifert, Hong; Siemers, Eric; Holdridge, Karen C.; Andersen, Scott W.; Lipkovich, Ilya; Carlson, Christopher et al. (2015): Delayed-start analysis. Mild Alzheimer's disease patients in solanezumab trials, 3.5 years. In: *Alzheimer's & dementia* **1** (2), S. 111–121
- Lomakin, Aleskey; Chung, Doo Soo; Benedek, Georg B.; Kirschner, Daniel A.; Teplow, David B. (1995): On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.uni-giessen.de/pmc/articles/PMC40042/#?>, (abgerufen am 09.06.2017)
- Lorent, K.; Overbergh, L.; Moechars, D.; De Strooper, B.; Van Leuven, F.; van de Berghe, H. (1995): Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein familiy, of the alpha-2 macroglobulin receptor. low density Lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein e, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40000 molecular weight receptor-associated protein. In: *Neuroscience* **65**(4), S. 1009–1026
- Luo, Y.; Bolon, B.; Kahn, S.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Denis, P. et al. (2001): Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. In: *Nature neuroscience* **4** (3), S. 231–232
- Mably, Alexandra J.; Liu, Wen; Mc Donald, Jessica M.; Dodart, Jean-Cosme; Bard, Frédérique; Lemere, Cynthia A. et al. (2015): Anti-A $\beta$  antibodies incapable of reducing cerebral A $\beta$  oligomers fail to attenuate spatial reference memory deficits in J20 mice. In: *Neurobiology of disease* **82**, S. 372–384
- Masters, C. L.; Simms, G.; Weinman, N. A.; Multhaup, G.; McDonald, B. L.; Beyreuther, K. (1985): Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82** (12), S. 4245–4249
- Matsui, Toshifumi; Ingelsson, Martin; Fukumoto, Hiroaki; Ramasamy, Karunya; Kowa, Hisatomo; Frosch, Matthew P. et al. (2007): Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. In: *Brain research* **1161**, S. 116–123
- Mattson, Mark P.; Cheng, Bin; Culwell, Alan R.; Esch, Fred S.; Lieberburg, Ivan; Rydel, Russell E. (1993): Evidence for Excitoprotective and Intraneuronal Calcium-Regulating Role for Sevreted Forms of the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein. In: *Neuron* **10**(2), S. 243–254
- Mayeux, Richard (2003): Epidemiology of neurodegeneration. In: *Annual review of neuroscience* **26**, S. 81–104
- Meister, Melanie; Tikkanen, Ritva (2014): Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: a flotillin point of view. In: *Membranes* **4** (3), S. 356–371

- Monje, Francisco J.; Divisch, Isabella; Demit, Marvie; Lubec, Gert; Pollak, Daniela D. (2013): Flotillin-1 is an evolutionary-conserved memory-related protein up-regulated in implicit and explicit learning paradigms. In: *Annals of medicine* **45** (4), S. 301–307
- Morrow, Isabel C.; Rea, Shane; Martin, Sally; Prior, Ian A.; Prohaska, Rainer; Hancock, John F. et al. (2002): Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. In: *The Journal of biological chemistry* **277** (50), S. 48834–48841
- Mucke, Lennart; Masliah, Eliezer; Yu, Gui-Qiu; Mallory, Magaret; Rockenstein, Edward M.; Tatsuno, Gwen et al. (2000): High-Level Neuronal Expression of A $\beta$  42 in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice: Synaptotoxicity without Plaques Formation. In: *Neuroscience* **20** (11), S. 4050–4058
- Müller, Thorsten; Meyer, Helmut E.; Egensperger, Rupert; Marcus, Katrin (2008): The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. In: *Progress in neurobiology* **85** (4), S. 393–406
- Multhaup, G. (1994): Identification and regulation of the high affinity binding site of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor (APP) to glycosaminoglycans. In: *Biochimie* **76** (3-4), S. 304–311
- Munderloh, Christina; Solis, Gonzalo P.; Bodrikov, Vsevolod; Jaeger, Friederike A.; Wiechers, Marianne; Málaga-Trillo, Edward; Stuermer, Claudia A. O. (2009): Reggies/flotillins regulate retinal axon regeneration in the zebrafish optic nerve and differentiation of hippocampal and N2a neurons. In: *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **29** (20), S. 6607–6615
- Neumann-Giesen, Carolin; Falkenbach, Bianca; Beicht, Peter; Claasen, Stephanie; Luers, Georg; Stuermer, Claudia A. O. et al. (2004): Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. In: *The Biochemical journal* **378** (2), S. 509–518
- Neumann-Giesen, Carolin; Fernow, Inga; Amaddii, Monia; Tikkanen, Ritva (2007): Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. In: *Journal of cell science* **120** (3), S. 395–406
- Radde, Rebecca; Bolmont, Tristan; Kaeser, Stephan A.; Coomaraswamy, Janaky; Lindau, Dennis; Stoltze, Lars et al. (2006): A $\beta$ 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. In: *EMBO reports* **7** (9), S. 940–946
- Rajendran, Lawrence; Knobloch, Marlen; Geiger, Kathrin D.; Dienel, Stephanie; Nitsch, Roger; Simons, Kai; Konietzko, Uwe (2007): Increased A $\beta$  production leads to intracellular accumulation of A $\beta$  in flotillin-1-positive endosomes. In: *Neurodegenerative diseases* **4** (2-3), S. 164–170
- Razani, B.; Engelman, J. A.; Wang, X. B.; Schubert, W.; Zhang, X. L.; Marks, C. B. et al. (2001): Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. In: *The Journal of biological chemistry* **276** (41), S. 38121–38138

- Roberds, S. L. (2001): BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain. Implications for Alzheimer's disease therapeutics. In: *Human Molecular Genetics* **10** (12), S. 1317–1324
- Rogaeva, E. A.; Fafel, K. C.; Song, Y. Q.; Medeiros, H.; Sato, C.; Liang, Y. et al. (2001): Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases. 21 Novel mutations. In: *Neurology* **57** (4), S. 621–625
- Rossi, Andrea; Kontarakis, Zacharias; Gerri, Claudia; Nolte, Hendrik; Hölper, Soraya; Krüger, Marcus; Stainier, Didier Y. R. (2015): Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. In: *Nature* **524** (7564), S. 230–233
- Schneider, Anja; Rajendran, Lawrence; Honsho, Masanori; Gralle, Matthias; Donnert, Gerald; Wouters, Fred et al. (2008): Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. In: *The Journal of neuroscience* **28** (11), S. 2874–2882
- Schulte, Thomas; Paschke, Katja A.; Laessing, Ute; Lottspeich, Freidrich; Stuermer, Claudia A.O. (1997): Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. In: *The Company of Biologists Limited* 1997, S. 577–587.
- Seals, Darren F.; Courtneidge, Sara A. (2003): The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. In: *Genes & development* **17** (1), S. 7–30
- Shin, Taekyun; Kim, Heechul; Jin, Jae-Kwang; Moon, Changjong; Ahn, Meejung; Tanuma, Naoyuki; Matsumoto, Yoh (2005): Expression of caveolin-1, -2, and -3 in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Journal of neuroimmunology* **165** (1-2), S. 11–20
- Sinha, S.; Anderson, J. P.; Barbour, R.; Basi, G. S.; Caccavello, R.; Davis, D. et al. (1999): Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. In: *Nature* **402** (6761), S. 537–540
- Sisodia, Sangram S.; St George-Hyslop, Peter H. (2002): gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? In: *Nature reviews Neuroscience* **3** (4), S. 281–290
- Solis, Gonzalo P.; Hoegg, Maja; Munderloh, Christina; Schrock, Yvonne; Malaga-Trillo, Edward; Rivera-Milla, Eric; Stuermer, Claudia A. O. (2007): Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. In: *The Biochemical journal* **403** (2), S. 313–322
- Suh, Yoo-Hun; Checler, Frederic (2002): Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease. In: *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* **54**, S. 469–525
- Swanwick, Catherine Croft; Shapiro, Marietta E.; Vicini, Stefano; Wenthold, Robert J. (2010): Flotillin-1 promotes formation of glutamatergic synapses in hippocampal neurons. In: *Developmental neurobiology* **70** (13), S. 875–883
- Todd, Adam; Moore, Adrian; Ashton, Mark; Van, Son (2010): Current research and development of treatments for Alzheimer's disease. In: *the pharmaceutical journal* **284**, S. 429
- Vassar, R. (1999): Beta-Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. In: *Science* **286** (5440), S. 735–741

- Vassar, Robert; Kovacs, Dora M.; Yan, Riqiang; Wong, Philip C. (2009): The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. In: *The Journal of neuroscience* **29** (41), S. 12787–12794
- Verpoorten, Nathalie; Verhoeven, Kristien; Weckx, Stefan; Jacobs, An; Serneels, Sally; Del Favero, Jurgen et al. (2006): Corrigendum to “Synaptopodin and 4 novel genes identified in primary sensory neurons”. In: *Molecular and Cellular Neuroscience* **32** (1-2), S. 216
- Volonte, D.; Galbiati, F.; Li, S.; Nishiyama, K.; Okamoto, T.; Lisanti, M. P. (1999): Flotillins/Cavatellins Are Differentially Expressed in Cells and Tissues and Form a Hetero-oligomeric Complex with Caveolins in Vivo. In: *Journal of Biological Chemistry* **274** (18), S. 12702–12709
- Wang, Haiyu; Lin, Su; Allen, James P.; Williams, Joann C.; Blankert, Sean; Laser, Christa; Woodbury, Neal W. (2007): Protein dynamics control the kinetics of initial electron transfer in photosynthesis. In: *Science (New York, N.Y.)* **316** (5825), S. 747–750
- Zheng, P.; Eastman, J.; Vande Pol, S.; Pimplikar, S. W. (1998): PAT1, a microtubule-interacting protein, recognizes the basolateral sorting signal of amyloid precursor protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95** (25), S. 14745–14750

## 12. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf welches direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### 13. Danksagung

Ich möchte mich auf diesem Wege bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen und mich unterstützt haben.

Dieser Dank gilt besonders meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen, nicht nur für die Möglichkeit die Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu können, sondern auch für die engagierte Betreuung und positive Unterstützung.

Ein ganz herzlicher Dank geht auch an Dr. Antje Banning für die wundervolle Betreuung. Hier blieb keine Frage unbeantwortet und es war für sie selbstverständlich, mich in allen Bereichen der Arbeit mit ihrem Wissen zu unterstützen. Ich bedanke mich auch für die immer wieder motivierenden Worte, die Korrektur der Arbeit und die eine oder andere konstruktive Kaffeepause.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die Möglichkeit das Zeiss Konfokale Mikroskop seiner Abteilung nutzen zu können.

Besonders freue ich mich über die nette Zusammenarbeit mit allen Kollegen der Arbeitsgruppe. Es war für mich durch die tolle Arbeitsatmosphäre und gute Stimmung immer schön im Labor zu arbeiten. An dieser Stelle möchte ich auch besonders Petra Janson danken. Durch ihre unerschöpfliche Hilfsbereitschaft und ihre geduldige Art hat sie sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Die gemeinsame Zusammenarbeit hat mir immer viel Freude bereitet. Auch Ralf Füllkrug möchte ich für die hilfreichen Denkanstöße und musikalische „Untermalung“ der Versuche danken.

Danken möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich während des Studiums und der Doktorarbeit immer unterstützt haben. Ganz besonders danke ich meinen Eltern Silke und Steffen und meiner Schwester Sarah. Doch ohne meinen Mann John wäre diese Arbeit nicht fertig geworden. Er wurde nie müde mich zu ermutigen und zu motivieren, auch wenn es mal schwierig wurde. Für diesen Zuspruch und seine Hilfe bin ich ihm sehr dankbar.