

**Vergleichende Analyse der APP-Prozessierung zwischen
wildtyp und familiärer schwedischer Alzheimer Mutation**

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur
Sebastian Jäger
geboren am 07.03.1976 in Berlin

von der Fakultät III (Prozesswissenschaften) der
Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften (Dr. Ing.)

genehmigte Dissertation

Berlin, 2009

D83

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Roland Lauster

1. Gutachter: Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl

2. Gutachter: Prof. Dr. Claus U. Pietrzik

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 5. Juni 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Alzheimer Krankheit	1
1.2	Das histopathologische Krankheitsbild	2
1.3	Die Amyloid- (oder A β -) Kaskaden-Hypothese	4
1.4	Die Toxikologie des A β -Peptids	7
1.5	Die Struktur des Amyloid-Precursor-Proteins (APP)	9
1.6	Die APP-Prozessierung	10
1.7	Familäre Alzheimer Mutationen	12
1.8	Funktion des Amyloid-Precursor-Proteins (APP)	14
1.9	Enzyme der APP-Prozessierung	16
1.9.1	Die α -Sekretase	16
1.9.2	Die β -Sekretase	18
1.9.3	Die γ -Sekretase	21
1.10	Unterschiedliche Lokalisierung der amyloidogenen Prozessierung von wildtyp und schwedischem APP	24
1.11	LRP1-abhängige Prozessierung von wildtyp APP	25
1.12	Zielsetzung	27
2	Material und Methoden	28
2.1	Material	28
2.1.1	Chemikalien	28
2.1.2	Antibiotika	30
2.1.3	Enzyme	30
2.1.4	Größenmarker	30
2.1.5	Kits	31
2.1.6	Hardware	31
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	32
2.1.8	Software	33
2.1.9	Zelllinien	34
2.1.10	Bakterienstämme	34
2.1.11	Primer	35
2.1.12	Vektoren	36
2.1.13	Stabile Zelllinien	37
2.1.14	Antikörper	39
2.2	Methoden	40
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	40
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
2.2.1.2	Mutagenese	41
2.2.1.2.1	QuickChange [®] site-directed mutagenesis	41
2.2.1.2.2	Two-Step PCR Mutagenesis	42
2.2.1.3	Kolonie-PCR	42
2.2.1.4	Agarose-Gelelektrophorese	43
2.2.1.5	Elution von DNA aus präparativen Agarosegelen	44
2.2.1.6	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	44
2.2.1.7	Dephosphorylierung von DNA	45
2.2.1.8	Ligation	46

2.2.2	Mikrobiologische Methoden	46
2.2.2.1	Bakterienanzucht	46
2.2.2.2	Herstellung chemisch-kompetenter E. coli Bakterien.....	47
2.2.2.3	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	48
2.2.2.4	Kryokonservierung von Bakterien.....	48
2.2.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	48
2.2.2.6	DNA-Sequenzanalyse.....	49
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	49
2.2.3.1	Kultivierung von Zelllinien	49
2.2.3.2	Zellzählung	50
2.2.3.3	Kryokonservierung von Zellen	50
2.2.3.4	Transiente Transfektionen	51
2.2.3.4.1	Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation	51
2.2.3.4.2	Lipidbasierte transiente Transfektion.....	52
2.2.3.5	Herstellung stabiler Zelllinien	52
2.2.3.5.1	Killing curves.....	52
2.2.3.6	Herstellung von retroviralen Partikeln.....	53
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	54
2.2.4.1	Herstellung von konditioniertem Medium.....	54
2.2.4.2	Proteinextraktion	54
2.2.4.3	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	55
2.2.4.4	Immunopräzipitation.....	56
2.2.4.5	Tris/Tris-Glycin SDS-PAGE.....	57
2.2.4.6	Bis-Tris / Mes-Tris - SDS-PAGE	59
2.2.4.7	Western-Blot-Analyse	61
2.2.4.7.1	Elektroblotting	62
2.2.4.7.2	Immundetektion	63
2.2.4.8	Herstellung HRP-gekoppelter Antikörper	63
2.2.4.9	Sandwich-ELISA.....	64
2.2.4.10	Zelloberflächenbiotinylierung	66
2.2.4.11	AICD in vitro Assay	67
2.2.4.12	Gal4-Assay	68
2.2.4.12.1	Luciferase Assay	69
2.2.4.12.2	β -Galactosidase Assay.....	69
2.2.4.13	Seap Assay.....	70
3	Ergebnisse.....	71
3.1	Antikörper zum Nachweis der APP-Prozessierungsfragmente.....	72
3.2	Unterschiedliche Mechanismen reduzieren die Aβ-Sekretion der internalisierungsdefizienten NPXY-Deletionsmutanten von wildtyp APP und schwedischem APP	74
3.3	Verminderte C99-Fragmente und Aβ-Sekretion der NPTY-Deletionsmutanten von APP770swe.....	76
3.4	Die Deletion der NPTY-Domäne verursacht eine Akkumulation von APPswe an der Zelloberfläche	78
3.5	Punktmutationen der Internalisierungsdomäne YENPTY verursachen bei gleichbleibender APPsβ_{swe}-Sekretion eine starke Reduktion der C99- und Aβ-Mengen.....	79
3.6	Die C-terminale Verkürzung von APPswe erniedrigt die Aβ-Produktion bei unveränderter APPsβ_{swe}-Sekretion.....	82
3.7	Inhibition der lysosomalen Aktivität verursacht einen starken Anstieg der C83-Menge, aber keine Stabilisierung der C99-Fragmente	84
3.8	Inhibition der γ-Sekretase stabilisiert C99- und C83.....	87
3.9	α-Sekretase-Prozessierung von C99 vermindert Aβ-Sekretion	88

3.10	Erhöhte Oberflächenmenge von APP und CTFs durch die Deletion des Internalisierungssignals NPTY	91
3.11	Reduzierte A β -Sekretion internalisierungsdefizienter C99- Fragmente	93
3.12	Mutationen der YENPTY-Domäne von APPswe haben keinen Einfluss auf die in vitro Generation der intrazellulären Domäne von APP (AICD)	95
3.13	α -Sekretase-Prozessierung von APP initiiert die AICD-vermittelte nukleäre Signalübertragung.....	97
3.14	LRP1-abhängige Modulation des APP-Transports beeinflusst die APPswe-Prozessierung.....	101
3.15	Kompetitive Inhibition der γ -Sekretase-Prozessierung von C99 zu A β durch LRP1.....	103
4	<i>Diskussion</i>	105
4.1	Eigenschaften der schwedischen Mutation und ihre Bedeutung in der Erforschung der Alzheimer Krankheit	105
4.2	Die Prozessierung von wildtyp APP	107
4.3	Die Prozessierung von schwedischem APP.....	108
4.4	Die Internalisierungsdomäne YENPTY von APP.....	111
4.5	Die α -Sekretase-Prozessierung des C99-Fragmentes.....	112
4.6	α -Sekretase-Prozessierung von APP initiiert die Transaktivierung der Gentranskription	116
4.7	LRP1-abhängige APP-Prozessierung.....	118
4.8	Ausblick	121
5	<i>Zusammenfassung</i>	123
6	<i>Summary</i>	124
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	125
8	<i>Anhang</i>	146
8.1	Abkürzungsverzeichnis	146
8.2	Publikationen des Autors	149
8.3	Lebenslauf.....	151
8.4	Eidesstattliche Erklärung.....	152
8.5	Danksagungen	153

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer Krankheit

Der Begriff „Demenz“ bezeichnet chronische und fortschreitende Krankheiten des Gehirns, die durch einen Verlust von intellektuellen Leistungen geprägt sind. Das Hauptmerkmal ist dabei die Störung höherer kortikaler Funktionen wie Gedächtnis, Denken, Orientierung, Rechnen, Sprache und Urteilsvermögen. Während die kognitiven Beeinträchtigungen von Veränderungen des sozialen und emotionalen Verhaltens begleitet werden, ist das Bewusstsein nicht beeinträchtigt. Die Schädigung des Gehirns tritt im Frühstadium der Erkrankung durch die Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses, Konzentrationsschwierigkeiten und verminderter Aufmerksamkeit hervor. Da sich die Patienten ihrer Situation bewusst sind, reagieren sie häufig mit Beschämung, Angst und Niedergeschlagenheit, aber auch mit Wut und Aggression. Die verstärkte Ausprägung der Symptome verursacht im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit erhebliche Einschränkungen des täglichen Lebens. Die zunehmende Schädigung des Gehirns beeinträchtigt die örtliche und zeitliche Orientierung, es kommt zu Halluzinationen, Berührungsempfindlichkeiten und abnehmendem Geschmackssinn. Im Spätstadium sind die Erkrankten bei allen Verrichtungen des täglichen Lebens auf fremde Hilfe angewiesen. Zu den kognitiven Symptomen kommen nun auch Ausfälle der Körperkontrolle. Im Endstadium führt der körperliche Verfall zu Bettlägerigkeit und hoher Anfälligkeit für Infektionen, die zum Tod führen können.

Die Alzheimer Krankheit (Morbus Alzheimer, *Alzheimer disease*, AK) ist mit einem Anteil von 50-60 % die häufigste Form der Demenzerkrankung. Die durch Gefäßveränderungen (Arteriosklerose) hervorgerufenen Mini-Infarkte sind Ursache für die mit ca. 15 % zweithäufigste Form der Demenzerkrankung, der vaskulären Demenz (subkortikale arteriosklerotische Enzephalopathie (SAE), Morbus Binswanger oder auch Multi-Infarkt-Demenz genannt). Es wird angenommen das Mischformen der Alzheimer Erkrankung und der vaskulären Demenz für weitere 15 % der Erkrankungen verantwortlich sind. In Folge von weiteren im Alter auftretenden Gehirnerkrankungen kann es zu so genannten sekundären Demenzen kommen. Zu diesen werden zum Beispiel die Lewy-Körperchen-Erkrankung (Lewy-Körperchen-Demenz), die frontotemporale Demenz und das Parkinson Syndrom gezählt.

Die Wahrscheinlichkeit an Alzheimer zu erkranken steigt mit erhöhter Langlebigkeit, wobei sich der Anteil der Kranken an der Bevölkerung (Prävalenzrate) ab dem 65. Lebensjahr alle

fünf Jahre verdoppelt. Während in der Altersgruppe der 65-69jährigen nur ca. 1 % erkrankt ist, steigt der Anteil unter den 75-79jährigen auf 6 % und bei über 90jährigen auf ca. 1/3.

Aktuell leiden bereits mehr als eine Million Deutsche unter einer Demenzerkrankung und die Zahl der Betroffenen wird bis zum Jahre 2050 auf 2,3 Millionen ansteigen. Die Altersdemenz stellt somit nicht nur ein persönliches Schicksal dar, sondern wird zukünftig zu einer gesellschaftlichen und wirtschaftlichen Herausforderung (Quelle: Nach (1), sowie Informationen der Deutschen Alzheimer Gesellschaft, August 2002 und des Statistischen Bundesamts, Sept. 2005).

1.2 Das histopathologische Krankheitsbild

Vor über hundert Jahren wurde die Krankheit durch Alois Alzheimer erstmals bei seiner Patientin Auguste Deter beschrieben, welche die für die Alzheimer Krankheit typischen klinischen Symptome in ihren späten 40ern entwickelte (2-4). Durch Untersuchungen ihres Gehirns etablierte er neben der Abnahme des Hirnvolumens, welches durch das Absterben von Neuronen verursacht wird, mit den intraneuronalen neurofibrillären Bündeln und den extrazellulären Amyloid-Ablagerungen die charakteristischen histologischen Veränderungen der Alzheimer Krankheit.

Die Verdachtsdiagnose Alzheimer kann auch heute nur durch post-mortem Untersuchungen des Gehirns an Hand der charakteristischen Merkmale definitiv bestätigt werden (5, 6). Dabei

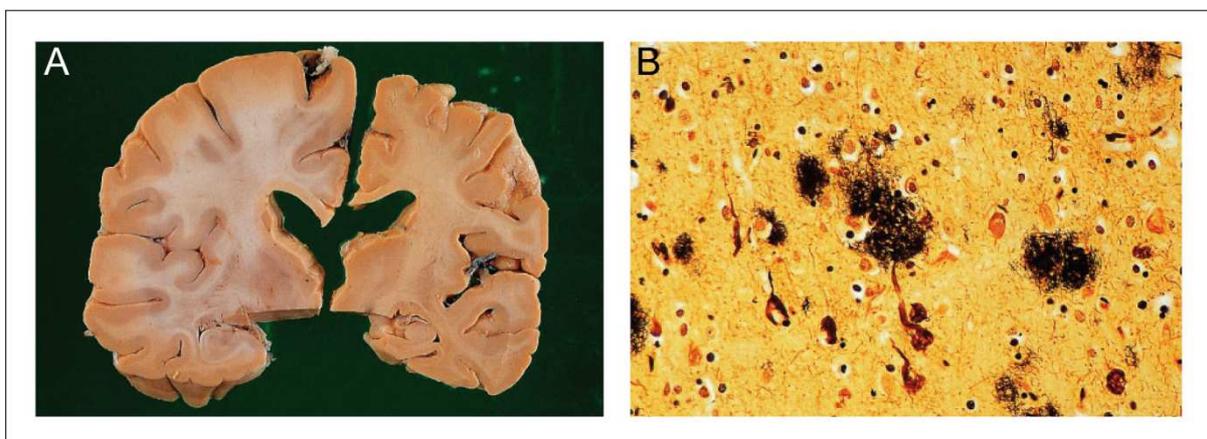


Abb. 1: Pathologie der Alzheimer Krankheit

A Vergleich eines Hirnschnittes eines gesunden 70jährigen (links) und einem Gehirn eines Alzheimer Patienten (rechts). Auffällig ist die Volumenabnahme der weißen Substanz und die kortikale Atrophie.

B Mikroskopische Aufnahme einer mit Methylamine angefärbten Großhirnrinde. Zu erkennen sind die charakteristischen Merkmale der Alzheimer Krankheit, die Amyloiden Plaques und neurofibrillären Bündel.

werden in den Hirnregionen wie dem entorhinalen Cortex, dem Limbischen System und dem Isocortex, welche typischerweise betroffen sind (7), viele Neurone mit intrazellulären, nicht membrangebundenen Bündeln aus nicht-physiologischen Fasern gefunden. Diese neurofibrillären Bündel (*neurofibrillar tangles*, NFT) entwickeln sich im Soma der Nervenzellen. Während sie sich von dort in die Dendriten erstrecken können, ist das proximale Axon nicht betroffen (7). Die einzelnen Fasern bestehen aus 10 µm dicken Filamenten des hyperphosphorylierten Tau-Proteins, die paarweise helikal umeinander gewunden sind (*Paired Helical Filaments*, PHF) (8-10). Tau ist ein lösliches, zytoplasmatisches Protein, welches unter physiologischen Bedingungen bei der Polymerisation der Mikrotubuli an Tubulin bindet und so diese wichtigen Bestandteile des Zytoskeletts stabilisiert (11). Die nicht physiologische Hyperphosphorylierung von Tau, die ein pathologisches Merkmal der AK darstellt, verringert die Bindung von Tau an die Mikrotubuli und führt so zu deren Destabilisierung. Die erhöhte Konzentration an freiem Tau und eine wahrscheinliche Fehlfaltung des Proteins führen zur Aggregation, wodurch die gepaarten helikalen Filamente entstehen (12, 13). Es wird angenommen, dass die Störung des Gleichgewichtes bestimmter Kinasen und Phosphatasen ursächlich für die Hyperphosphorylierung von Tau ist (13-15). Durch die Degeneration eines Neurons werden aus den zuvor intrazellulären NFTs extraneuronale Strukturen, die man als *Ghost Tangles* bezeichnet (7). Tau-Aggregate werden interessanterweise auch bei einigen seltenen neurodegenerativen Krankheiten gefunden. Diese Tau-Aggregate ähneln oder sind identisch mit denen, die in Gehirnen von Alzheimer Patienten gefunden werden. Zu diesen gehören mit der Pick Krankheit (Morbus Pick) und dem Parkinsonismus des Chromosom 17 (Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to Chromosome 17, FTDP-17) einige Formen der Frontotemporalen Demenz (Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD)). Die Erkenntnis, dass Mutationen im Tau-Gen FTLD-17 verursachen, deutet darauf hin, dass Tau eine Schlüsselrolle bei der Entstehung neurodegenerativer Krankheiten spielt (11, 12).

Neben den neurofibrillären Bündeln ist die Alzheimer Krankheit durch Amyloid-Ablagerungen charakterisiert, die hauptsächlich in der Großhirnrinde, insbesondere im Isocortex, lokalisiert sind (7). Diese ausschließlich im extrazellulären Raum zu findenden Plaques werden in zwei Gruppen eingeteilt, die diffusen und die senilen (neuritischen) Plaques (16). Die senilen Plaques haben einen dichten Kern (*Amyloid Core*), der von amorphen, diffusen A β -Ablagerungen umgeben ist. Häufig werden pathologische Veränderungen der Nervenzellfortsätze (dystrophe Neuriten), Verformungen des Neuropils und Ansammlungen von aktivierten Mikroglia und Astrozyten in unmittelbarer Nähe der

senilen Plaques beobachtet (7, 16). Die weit größere Anzahl diffuser Plaques besteht dagegen aus geringen, amorphen A β -Ablagerungen. Diese haben ein körniges Erscheinungsbild und keinen fibrillären, kompakten Kern (16). Neben diesen parenchymalen Plaques findet man auch häufig fibrilläre Amyloid-Ablagerungen in den Basalmembranen von Arteriolen, Kapillaren und Venolen des Cortex cerebri.

Die Hauptkomponente der Amyloid-Plaques, das kurze, amphipatische A β -Peptid, wurde zunächst durch Untersuchungen der Amyloid-Ablagerungen in zerebralen Blutgefäßen (17) und kurz darauf durch die Isolierung aus parenchymalen Plaques identifiziert (18). Die Plaques bestehen hauptsächlich aus zwei A β -Spezies, A β 40 und A β 42. Obwohl menschliche Zellen überwiegend das aus 40 Aminosäuren bestehende A β 40 sezernieren, wird die A β -Aggregation und die Plaque-Bildung vermutlich durch A β 42 initiiert. Das C-terminal um zwei Aminosäuren längere A β 42 neigt durch die erhöhte Hydrophobizität zu verstärkter Aggregation (19-21). Die diffusen Plaques bestehen hauptsächlich aus A β 42 und enthalten nur wenig oder kein A β 40, während die senilen Plaques gemischte Ablagerungen aus A β 40 und A β 42 sind. Dabei besteht der fibrilläre Kern der neuritischen Plaques aus A β 42 und die amorphen Anlagerungen aus A β 40 und A β 42 (22-25). Bei den diffusen, A β 42-reichen Plaques, welche die frühesten A β -Ablagerungen im Gehirn sind, handelt es sich daher wahrscheinlich um Vorläufer der senilen Plaques. Während der Reifung der diffusen Plaques zu senilen Plaques werden die anfänglichen A β 42-Ablagerungen in A β -Fibrillen umgewandelt. Durch weitere Anlagerung von A β 40 und A β 42 kommt es zum Wachstum der amyloiden Plaques (26).

1.3 Die Amyloid- (oder A β -) Kaskaden-Hypothese

Die Ursache für den umfassenden Verlust von Neuronen bei Alzheimer Patienten ist nicht vollständig geklärt. Viele Anhaltspunkte weisen aber darauf hin, dass die entartete Produktion des A β -Peptids eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit spielt. Die in der Amyloid-Hypothese zusammengefasste Theorie (27-29) besagt, dass eine geringe Erhöhung des A β 42/A β 40-Verhältnisses, eine Erhöhung der totalen A β -Produktion, reduzierter Abbau oder Veränderungen der Aggregationseigenschaften des A β -Peptids die Amyloid-Kaskade auslöst. In den meisten Fällen kommt es durch eine erhöhte A β 42-Menge zu einer verstärkten Entstehung von Oligomeren. Diese verursachen erst leichte und dann zunehmend stärkere Veränderungen der Synapsenfunktion. Parallel bilden sich mikroskopisch

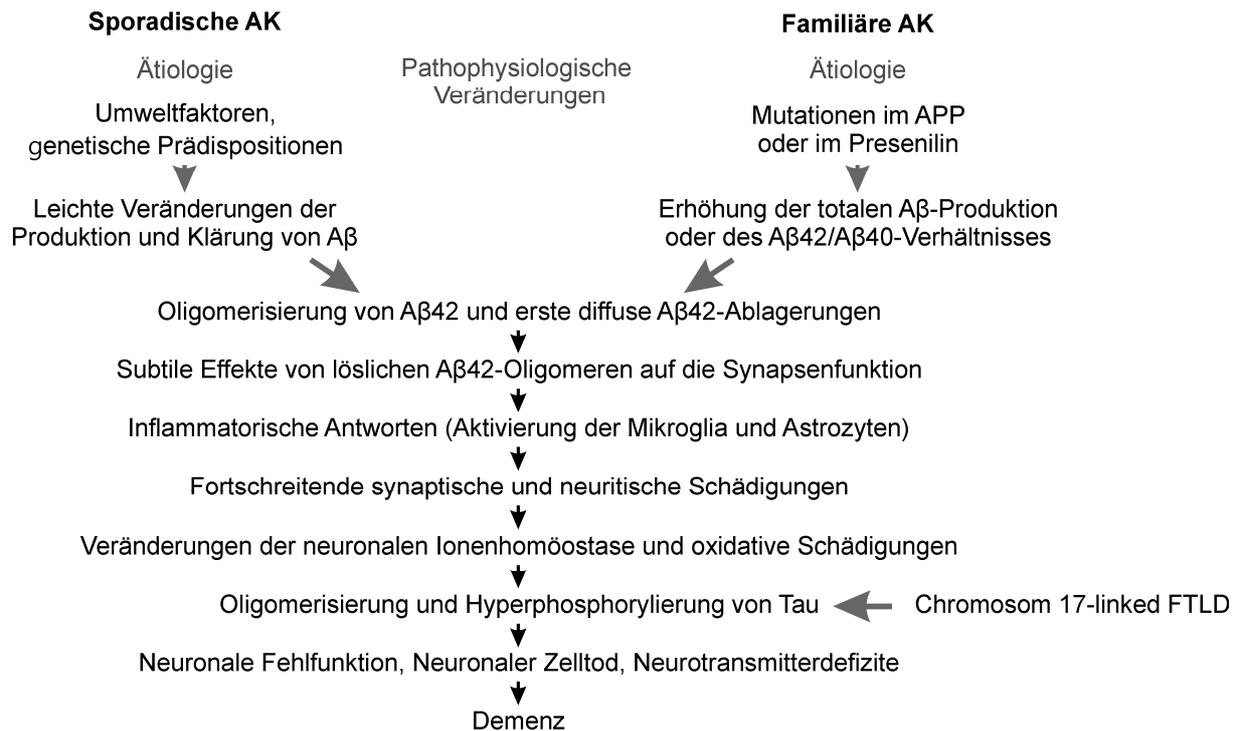


Abb. 2: Die Amyloid- oder A β -Kaskaden-Hypothese

Umweltfaktoren, genetische Prädispositionen oder Mutationen im APP- oder Presenilin-Gen können den Metabolismus von A β beeinflussen. Zunächst bilden sich kleine, lösliche A β 42-Oligomere, welche synaptische Fehlfunktionen verursachen und die Amyloid-Kaskade einleiten. Es kommt zu mikroskopisch sichtbaren diffusen Ablagerungen. Nach der Entstehung fibrillärer Strukturen in den diffusen Plaques werden inflammatorische Antworten wie Mikrogliose und Astroglie, Verlust von Dornfortsätzen und die Entstehung von dystrophen Neuriten beobachtet. Im weiteren Verlauf kommt es zu oxidativem Stress, veränderter ionischer Homöostase und weiteren biochemischen Veränderungen. Durch die Störung des Gleichgewichtes von Kinasen- und Phosphatasenaktivitäten entstehen neurofibrilläre Bündel, die weitere Defekte wie z.B. des axonalen Transports verursachen. Die Kaskade mündet in weitverbreiteten synaptischen und neuronalen Fehlfunktionen, Zelltod und letztendlich in Demenz des Alzheimer Typs mit den charakteristischen Merkmalen A β -Plaques und neurofibrillären Bündeln. Tau-Pathologien können auch direkt durch Mutationen im Tau-Gen entstehen (verändert nach (30)).

sichtbare, diffuse A β 42-Ablagerungen. Mit der Entstehung von A β -Fibrillen in den diffusen Plaques kommt es zu lokalen Inflammationsreaktionen wie Mikrogliose und Astroglie, Verlust von Dornfortsätzen und der Entstehung von dystrophen Neuriten. Mit der Zeit resultieren diese Ereignisse in oxidativem Stress, veränderter ionischer Homeostase (z.B. von Calcium-Ionen) und es kommt zu weiteren biochemischen Veränderungen. Störungen des Gleichgewichtes von Kinasen und Phosphatasen induzieren die Bildung der neurofibrillären Bündel. Die NFTs wiederum verursachen weitere physiologische Störungen, z.B. im axonalen Transport. Diese pathologische Kaskade führt zu synaptischen bzw. neuronalen Fehlfunktionen, zum neuronalen Zelltod und verursacht letztendlich Demenz (14, 30)(Abb. 2).

Obwohl bis heute weder die Verbindung zwischen der A β -Akkumulation und den NFTs noch der Zusammenhang dieser histopathologischen Kennzeichen mit dem beträchtlichen

Neuronenverlust eindeutig geklärt ist, deuten mehrere Beobachtungen darauf hin, dass die verstärkte Sekretion von A β die Alzheimer Krankheit auslöst. Wenige Jahre nach der Identifizierung des A β -Peptids als Hauptkomponente der Plaques wurde das Vorläuferprotein *Amyloid Precursor Protein* (APP), aus dem das A β -Peptid als proteolytisches Spaltprodukt hervorgeht (siehe APP-Prozessierung (1.6)), identifiziert und kloniert (31-34). Beim Menschen liegt das Gen für APP auf dem Chromosom 21 (34). Dies ist der Grund dafür, dass Menschen mit Trisomie 21 (Down-Syndrom) im mittleren Alter ausnahmslos an Morbus Alzheimer erkranken (35, 36). Die Verknüpfung der höheren APP-Gen dosis bei Trisomie 21 mit der Entwicklung von A β -Ablagerungen deutet darauf hin, dass die A β -Überproduktion ursächlich für die AK sein könnte. Zudem wird die A β -Kaskaden-Hypothese durch die seltenen Fälle von autosomal-dominant vererbten Formen der Alzheimer Krankheit unterstützt. Bei der familiären Alzheimer Krankheit (FAK) treten die Symptome definitionsgemäß vor dem 65. Lebensjahr auf (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme der Weltgesundheitsorganisation (WHO), engl.: *International Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD)*, www.dimdi.de). Dabei unterscheidet sie sich histopathologisch nicht von den sporadischen Formen, die definitionsgemäß nach dem 65. Lebensjahr auftreten. Bei den familiären Formen verursachen Mutationen im APP-Gen entweder eine Erhöhung der A β -Produktion, eine Erhöhung des A β ₄₂/A β ₄₀-Verhältnisses oder eine Veränderung der Aggregationseigenschaften von A β (37-39). Neben den Mutationen im APP-Gen werden die familiären „presenilen“ Formen der Alzheimer Krankheit durch Mutationen in zwei weiteren Genen, Presenilin 1 (PS1) auf Chromosom 14 und Presenilin 2 (PS2) auf Chromosom 1, verursacht. Mutationen in PS 1 und PS 2 führen durch eine Veränderung der APP-Prozessierung zu einer Erhöhung des A β ₄₂/40-Verhältnisses (40-43). Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass die Verdopplung des Genlocus von APP (44) oder auch Mutationen im APP-Promotor die Alzheimer Krankheit verursachen können (45).

Mutationen im Tau-Gen führen zur Frontotemporalen Demenz und Parkinsonismus des Chromosom 17 (FTDP-17) (46-48). Diese neurodegenerative Erkrankung ist durch starke Atrophie der Stirn- und Schläfenlappen gekennzeichnet. Dabei werden Ablagerungen von Tau in neurofibrillären Bündeln, aber keine A β -Ablagerungen gefunden (29). Dagegen zeigten Mäuse, die sowohl humanes APP als auch humanes Tau überexprimierten, eine verstärkte Formation von Tau-positiven Bündeln, obwohl die Menge und Struktur der A β -Plaques unverändert blieb (49). Dies deutet darauf hin, dass Veränderungen des Tau-Proteins die Entstehung von neurofibrillären Bündeln verursachen und zu Neurodegeneration führen

können. Gleichzeitig sind diese aber nicht ausreichend, um die für die Alzheimer Krankheit charakteristischen A β -Plaques zu erzeugen. Andererseits kann A β Tauopathien verstärken. Anomales Tau-Protein kann somit einen Seiteneinstieg in die Amyloid-Kaskade darstellen, der zu einer seltenen neurodegenerativen Krankheit führt (30).

Während FAK autosomal dominant vererbt wird, wurden für die sporadische Alzheimer Erkrankung einige Risikofaktoren beschrieben (Aktuelle Auflistung der in genetischen Assoziationsstudien gefundenen Kandidatengene: <http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene/default.asp>). Der am besten untersuchte genetische Risikofaktor ist das in den Lipidstoffwechsel involvierte Apolipoprotein E (ApoE). Von den drei existierenden Allelen ApoE2, ApoE3 und ApoE4, ist ApoE3 das in der Gesamtpopulation am häufigsten vorkommende. Genetische Assoziationsstudien haben gezeigt, dass das ApoE4-Allel in sporadischen Alzheimer Patienten überrepräsentiert ist. Träger des ApoE4-Gens haben somit eine höhere Wahrscheinlichkeit an AK zu erkranken, wobei das Risiko wiederum mit der Gendosis steigt (50-52). Untersuchungen von Autopsie-Proben zeigten bei ApoE4-Patienten mehr senile Plaques und vaskuläre A β -Ablagerungen als bei ApoE3-Patienten (53, 54). Die Kreuzung von APP-transgenen mit ApoE-defizienten Mäusen führte dagegen zu stark reduzierter A β -Ablagerung in den ApoE-defizienten Nachkommen (55). Im Vergleich zu ApoE3-Tieren verursachte die Expression von humanem ApoE4 in ApoE-defizienten Mäusen eine Vervielfachung der fibrillären A β -Plaques (>10) (56). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass auch die genetische Variabilität des ApoE-Locus durch Einflussnahme auf den A β -Metabolismus an der Krankheitsentstehung beteiligt ist.

Eine aus unterschiedlichen Gründen veränderte A β -Produktion ist also ausreichend für die Initiierung des Krankheitsverlaufs und führt zu der Annahme, dass die Reduzierung der A β -Sekretion ein Mittel zur Behandlung der AK sein kann.

1.4 Die Toxikologie des A β -Peptids

Die Hypothese, dass APP und A β eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Krankheit spielen, führte bereits kurz nach der Entdeckung von A β als Bestandteil der amyloiden Plaques zu Untersuchungen, ob und in welcher Form A β die Beeinträchtigung der hippocampalen Funktionen und damit des episodischen Gedächtnisses hervorrufen kann. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Neurotoxizität von A β in der Zellkultur (57-60) abhängig vom Aggregationszustand ist (61-64). Die A β -Toxizität setzte dabei die

Aggregation von A β zu fibrillären Strukturen voraus (65-68). Zudem verursachten fibrilläre Amyloid-Ablagerungen in transgenen Mäusen lokale synaptische Abnormalitäten und Brüche von Neuriten (69). Diese Beobachtungen stimmten mit pathologischen Untersuchungen von Alzheimer Gehirnen überein, bei denen Plaques aus fibrillärem A β normalerweise von dystrophen Neuriten umgeben sind. Dies deutet darauf hin, dass fibrilläre A β -Ablagerungen zu den neuronalen Schäden der Alzheimer Krankheit beitragen.

Auf der anderen Seite wird angenommen, dass die anfängliche Verschlechterung der Gedächtnisleistung durch Veränderungen der Synapsenfunktion hervorgerufen wird. So wurden Expressionsveränderungen von synaptischen Proteinen und eine Abnahme der Synapsenendköpfchen schon in frühen Stadien der Alzheimer Krankheit beobachtet (70-72). Die synaptischen Veränderungen korrelierten dabei mit der A β - und nicht mit der Plaque Menge in den Gehirnen (71). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Beeinträchtigungen der Gedächtnisleistungen mit der Gesamtmenge an löslichem A β und nicht mit der Plaques-Menge in Gehirnen von Alzheimer Patienten korreliert (73-76). Untersuchungen deuten darauf hin, dass nicht die fibrillären Strukturen sondern diffusionsfähige A β -Oligomere zytotoxisch auf Neuronenkulturen wirken (77, 78). Neuronale Funktionsstörungen wie die Inhibition der Langzeit-Potenzierung (LTP), einem elektrophysiologisches Korrelat für Lernen und Gedächtnis, können dabei lange vor der Degeneration von Zellen gemessen werden (78). Diese Inhibition der LTP durch Oligomere, die aus wenigen A β -Peptiden bestehen, konnte anschließend auch *in vivo* bestätigt werden (79-81). Die Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung wird dabei möglicherweise durch die extrazelluläre Akkumulation eines 56kDa großen Oligomers, wahrscheinlich ein A β -Dodecamer, verursacht (82). Darüber hinaus wurde eine Beteiligung von A β an einer negativen Rückkopplung der synaptischen Aktivität postuliert, da eine aktivitätsabhängige Regulierung der A β -Produktion und Sekretion beobachtet wurde (80). Diese Resultate deuten darauf hin, dass die frühe, präklinische Entwicklung der Alzheimer Krankheit durch die Akkumulation von spezifischen A β -Oligomeren, vermutlich Dimeren bis Dodecameren, verursacht werden könnte.

1.5 Die Struktur des Amyloid-Precursor-Proteins (APP)

Das *Amyloid-Precursor-Protein* (APP) ist ein 110-135 kDa großes Typ-I-Transmembranprotein mit einer großen N-terminalen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einem kurzen C-terminalen, zytoplasmatischen Schwanz (83). Für die Translation ins Endoplasmatische Retikulum (ER) befindet sich am N-Terminus ein 17 Aminosäure (AS) langes Signalpeptid (SP) (32, 34). Es existieren wenigstens acht verschiedene Splicevarianten von APP, von denen hauptsächlich die drei Isoformen mit 695, 751 und 770 Aminosäuren exprimiert werden. Im Unterschied zu APP695 enthalten APP751 und APP770 ein Kunitz-Protease-Inhibitor Motiv (KPI-Motiv, Exon 7) und APP770 zusätzlich noch ein OX-2 Domäne (Exon 8) (84-87). Die 751 und 770 Aminosäuren langen Spliceformen werden hauptsächlich in nicht neuronalen Zellen exprimiert, kommen aber auch in Neuronen vor. Dagegen exprimieren Neuronen sehr viel höhere Mengen APP695, welches nur in geringen Mengen in nicht neuronalen Zellen vorkommt (88, 89).

Im zytosolischen Teil enthält APP ein Asparagin-Prolin-X-Tyrosin (NPxY) Motiv. Dieses evolutionär konservierte Sortierungssignal von Typ-I-Transmembranproteinen kontrolliert den Transport der Proteine von der Zelloberfläche in die Endosomen durch Clathrin umhüllte Vesikel (*Clathrin-coated Vesicles*) (90).

Zusätzlich enthalten alle APP-Isoformen Bindungsstellen für Heparin (91), Zink (Zn) (92, 93) und Kupfer (Cu) (94).

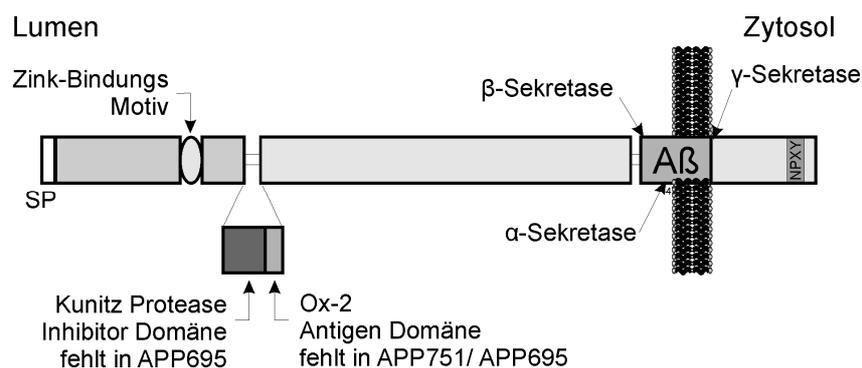


Abb. 3: Schematische Darstellung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP).

Dargestellt ist die hauptsächlich in neuronalem Gewebe gefundene Spliceform APP695. Am N-Terminus aller APP-Isoformen befindet sich ein 17 AS langes Signalpeptid (SP). Durch alternatives Spleißen werden beim APP 751 ein 56 AS langes Exon, welches für die Kunitz-Protease-Inhibitor Domäne kodiert, und beim APP770 zusätzlich ein 19 AS langes Exon, welches für die Ox-2-Antigen Domäne kodiert, bei AS 289 in das APP eingebaut. Das Amyloid-β (Aβ) Fragment besteht aus 28 AS unmittelbar vor der Zellmembran und aus 12-14 AS der Transmembrandomäne. Die Positionen des α-, β- und γ-Sekretase Schnittes relativ zum Aβ-Peptid sind gekennzeichnet.

Nach der co-translationalen Translokation in das endoplasmatische Retikulum wird das APP zunächst im ER N-glykosyliert und anschließend durch den sekretorischen Transportweg zur Plasmamembran transportiert. Dabei wird es im Golgi-Apparat O-glykosyliert, sulfatiert und phosphoryliert (87, 95-97). Von der Zelloberfläche kann APP durch Clathrin-umhüllte Vesikel endozytiert (98-100) und über den endosomalen-lysosomalen Weg dem Abbau zugeführt werden (101, 102). Nach der Endozytose kann APP aber auch durch Rezeptor-Recycling aus den Endosomen zurück zur Plasmamembran transportiert werden (103, 104). Die Halbwertszeit des APP ist dabei mit 45-60 Min. relativ kurz (87).

APP gehört mit den zwei homologen Proteinen APLP1 und APLP2 zu der Familie der APP ähnlichen Proteine (*Amyloid Precursor-like Proteins*, APLP) (105-107). APLP1 und APLP2 haben in der Ektodomäne und besonders im zytoplasmatischen Schwanz große Homologien zum APP. Auf Grund der Unterschiede in der A β -Region wird durch die Prozessierung von APLP1 und APLP2 aber kein A β -ähnliches amyloidogenes Peptid gebildet.

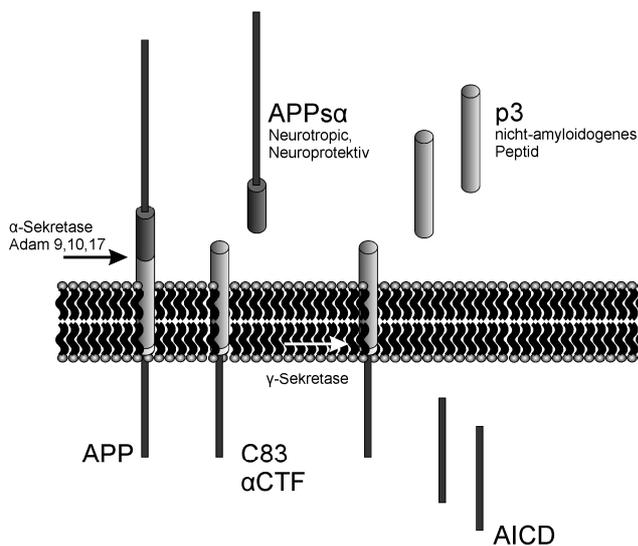
1.6 Die APP-Prozessierung

Die am meisten untersuchte und am besten verstandene posttranslationale Modifikation von APP ist die proteolytische Prozessierung, welche zu der Entstehung des A β -Peptids führen kann. Die APP-Prozessierung kann sowohl auf dem amyloidogenen, bei dem das A β -Peptid entsteht, als auch auf dem nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg, bei dem kein A β entsteht, erfolgen. Während der überwiegende Teil von APP durch den nicht-amyloidogenen Weg prozessiert wird, wird ein kleiner Prozentsatz durch den amyloidogenen Weg gespalten.

Die Freisetzung des A β -Peptids aus APP ist ein komplizierter Prozess, bei dem zwei sequentielle Schnitte durch zwei unterschiedliche Proteasen erfolgen. Die amyloidogene Prozessierung wird durch den β -Sekretase-Schnitt im luminalen Teil von APP initiiert. BACE1 (*β -site APP cleaving Enzyme*) setzt dabei die N-terminale lösliche Domäne von APP (APPs β) frei und es entsteht ein 99 Aminosäuren langes C-terminales Fragment (CTF), das mit der ersten Aminosäure der A β -Region beginnt (β CTF oder C99) (108-110). Während A β aus dem membrangebundenen C99-Fragment durch die γ -Sekretase ins Lumen abgegeben wird (111), wird die intrazelluläre Domäne von APP (*APP intracellular domain*, AICD) gleichzeitig ins Zytosol freigesetzt (87, 112, 113). Die γ -Sekretase-Prozessierung erfolgt dabei innerhalb der Transmembrandomäne. Bei der γ -Sekretase handelt es sich um einen Proteinkomplex, der mindestens aus den vier Proteinen Presenilin 1 (PS1) bzw. Presenilin 2 (PS2), Nicastrin, *Anterior Pharynx Defective 1* (APH1) und *Presenilin Enhancer Protein 2*

(PEN2) besteht (114). Diese γ -Sekretase-vermittelte Prozessierung erfolgt dabei nicht durch einen einzelnen Schnitt, sondern durch mehrere Schnitte an verschiedenen Stellen von C99. Zunächst wird durch die Spaltung zwischen Leucin und Valin an Position 49 und 50 (ϵ -Schnittstelle) das AICD freigesetzt (112, 113, 115). Anschließend durchläuft das zurückbleibende, membranverankerte A β 49 einen weiteren Schnitt, der 3 Aminosäuren N-terminal zur ϵ -Schnittstelle erfolgt (ζ -Schnittstelle) (116, 117). A β wird durch den finalen Schnitt an der γ -Schnittstelle freigesetzt. Auch dieser γ -Sekretase-Schnitt ist variabel und erfolgt nach den A β Aminosäuren 38, 40 und 42.

Nicht-amyloidogener Prozessierungsweg



Amyloidogener Prozessierungsweg

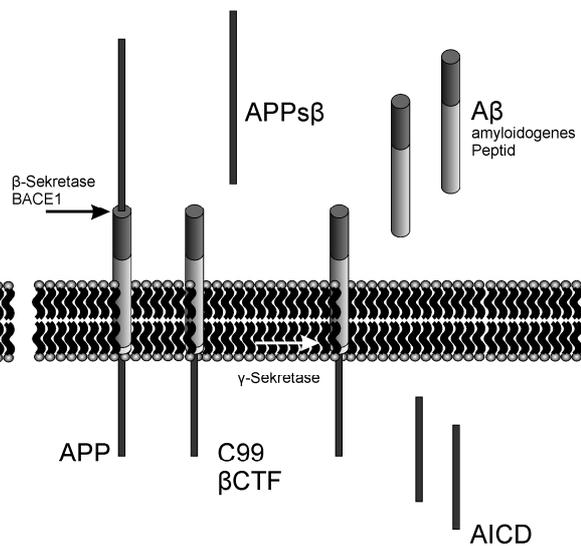


Abb. 4: Schematische Darstellung der APP-Prozessierung

APP kann entweder über nicht-amyloidogenen (links) oder den amyloidogenen Weg (rechts) prozessiert werden. Im nicht-amyloidogenen Weg wird APP zuerst durch die α -Sekretase in der A β -Domäne geschnitten, wodurch der größte Teil der extrazellulären Domäne als APPs α sezerniert wird und ein 83 AS langes Fragment (α CTF, C83) in der Membran zurückbleibt. Anschließend wird das C83 durch die γ -Sekretase in der Transmembrandomäne geschnitten. Hierbei wird die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) ins Zytosol freigegeben, während das nicht-amyloidogene p3 ins Lumen sezerniert wird. Auf dem amyloidogenen Weg wird APP nacheinander durch die β -Sekretase und die γ -Sekretase geschnitten. Die β -Sekretase legt den N-Terminus des A β -Peptids durch die Sekretion des etwas kürzeren APPs β frei. Das dabei in der Membran zurückbleibende 99 AS lange C-terminale Fragment (C99, β CTF) wird anschließend durch die γ -Sekretase prozessiert, wodurch der C-Terminus des A β -Peptids gebildet wird. Dabei wird neben der Freisetzung des AICD ins Zytosol das A β -Peptid ins Lumen freigegeben.

Im nicht-amyloidogenen Weg wird APP zunächst durch eine α -Sekretase zwischen Lysin und Leucin an den Positionen 16 und 17 der A β -Domäne geschnitten (118, 119). Durch diesen α -Sekretase-Schnitt wird die Ektodomäne von APP als lösliches Protein sezerniert (APPs α), welches den N-terminalen Teil der A β -Peptidsequenz enthält. Daneben entsteht ein membranständiges CTF mit einer Länge von 83 AS (α CTF oder C83). Der α -Sekretase-Schnitt wird durch die Mitglieder der ADAM (*A Disintegrin and Metallo-Proteinase*) Familie

9, 10 und 17 durchgeführt (120-122). Ähnlich zum C99 wird das C83 durch die γ -Sekretase in ein ins Zytosol freigesetzte AICD (112) und ein ins Lumen abgegebene 3 kDa Fragment, p3 (123), geschnitten. Der α -Sekretase-Schnitt von APP innerhalb der A β -Region verhindert somit die Entstehung des amyloidogenen A β -Peptids.

1.7 Familäre Alzheimer Mutationen

Es wurden verschiedene Mutationen im APP beschrieben, die alle in der Nähe der α -, β - und γ -Sekretase-Schnittstelle liegen. Die in der Nähe der β - und γ -Sekretase-Schnittstelle liegenden Mutationen verursachen die familiäre Alzheimer Krankheit. Dagegen führen die in der Nähe der α -Sekretase liegenden Mutationen zusätzlich zu cerebraler Amyloid-Angiopathie (cerebroarterielle Amyloidose, *cerebral amyloid angiopathy*, CAA), einer ebenfalls autosomal-dominant erblichen Erkrankung mit präferenzialer A β -Ablagerung in den Hirngefäßen, die zu hämorrhagischen Schlaganfällen und Demenz führen können. Die verschiedenen Mutationen verursachen dabei unterschiedliche Ausprägungen an hämorrhagischen Schlaganfällen und parenchymalen A β -Ablagerungen. Die Entwicklung der Demenz vom Alzheimer-Typ variiert dabei je nach Grad der charakteristischen histopathologischen Veränderungen der AK. Die holländische („dutch“) Mutation, E693Q (APP770 Nummerierung), sechs Aminosäuren C-terminal der α -Sekretase-Schnittstelle, verursacht „*hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of the dutch type (HCHWA-dutch)*“. HCHWA-dutch ist durch CAA, wiederholte hämorrhagische Schlaganfälle und Demenz gekennzeichnet. Im Gegensatz zur Alzheimer Krankheit entwickeln sich nur wenige senile Plaques (39, 124-126). Die flämische Mutation A692G führt dagegen sowohl zu schwerwiegender CAA mit gelegentlichen cerebralen Blutungen als auch zu Alzheimer typischen Plaques und neurofibrillären Bündeln (127, 128). Ein ähnliches neuropathologisches Bild wurde bei der Iowa-Mutation D694N gefunden (129). Im Gegensatz zur familiären Alzheimer Erkrankung mit überwiegender A β 42-Ablagerung werden sowohl bei der flämischen als auch bei der Iowa-Mutation überwiegend A β 40-Depots gefunden (129, 130). Trotz der Substitution der gleichen Aminosäure wie bei der holländischen Mutation, führt die arktische Mutation E693G zu klinischen Symptomen der familiären Alzheimererkrankung. Dabei werden keine Anzeichen von Schlaganfällen oder vaskulären Läsionen gefunden (131-133).

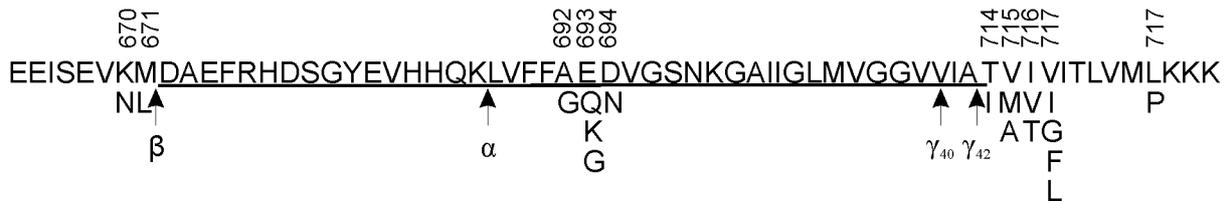


Abb. 5: APP Mutationen, die genetisch mit der familiären Alzheimer Krankheit oder ähnlichen Erkrankungen gekoppelt sind.

Die Sequenzregion von *wildtyp* APP, inklusive Aβ-Peptid, ist im Einbuchstaben-Aminosäurecode wiedergegeben. Die unterstrichene Sequenz entspricht dem Aβ42-Peptid. Die Nummern beziehen sich auf die Aminosäureposition in der APP770-Isoform. Die Buchstaben unterhalb der Sequenz geben die bekannten Substitutionsmutationen an, die bei bestimmten Patienten der familiären Alzheimer Krankheit und/oder Familien des *hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis* gefunden wurden. Bei der schwedischen Mutation unmittelbar vor der β-Sekretase-Schnittstelle handelt es sich um eine Doppelmutation (K670N/M671L).

Wie die holländische, arktische und Iowa Substitution veränderte auch die italienische Mutation E693K (134) das *in vitro* Aggregationsverhalten der Aβ-Peptide (135).

Im Gegensatz zu diesen im Aβ-Motiv gelegenen Mutationen führt die unmittelbar N-terminal vor der β-Sekretase-Schnittstelle gelegene schwedische Doppelmutation K670N/M671L zu einer Erhöhung aller Aβ-Peptide. Die schwedische Mutation verursacht dabei durch eine verstärkte Affinität zur β-Sekretase eine Steigerung der Aβ-Produktion um das 6-8fache (37, 136). Bei Trägern der schwedischen Mutation kann die Alzheimer Krankheit ab Mitte 40 bis Mitte 50 ausbrechen.

Die zwölf unterschiedlichen Punktmutationen der Aminosäuren T714, V715, I716, V717, L723 und K724 c-terminal von der Aβ42 γ-Sekretase-Schnittstelle verursachen alle die familiäre Form der Alzheimer Krankheit (österreichische Mutation T714I: (137); iranische Mutation T714A: (138); französische Mutation V715M: (139); deutsche Mutation V715A: (140, 141); Florida Mutation I716V: (142); I716T: (143); Indiana Mutation V717F: (144), V717G: (145); London Mutation V717I: (146); V717L: (147); australische Mutation L723P: (148); belgische Mutation L724N: (149)). Bei Trägern dieser Mutationen wird der Ausbruch der Krankheit von Ende 30 bis Anfang 60 beobachtet. Sie wird wahrscheinlich durch die verstärkte Aβ42-Produktion bei gleichzeitig verminderter Aβ40-Sekretion, d.h. durch eine Erhöhung des Aβ42/Aβ40-Verhältnisses, verursacht (38, 140, 148-150).

Das APP-Gen umfasst 18 Exons, wobei die Aminosäuren für das Aβ von den Exons 16 und 17 kodiert werden. Während sich die schwedische Mutation auf Exon 16 befindet, sind alle anderen hier erwähnten Aminosäuresubstitutionen auf Exon 17 lokalisiert. Im Gegensatz zu den meisten Mutationen, die nur in einer oder wenigen Familien gefunden wurden, ist die Londoner Mutation V717I bei über 20 unterschiedlichen Familien identifiziert worden.

1.8 Funktion des Amyloid-Precursor-Proteins (APP)

Die Prozessierung von APP spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Krankheit. Im Gegensatz zum fortgeschrittenen Verständnis der APP-Prozessierung ist die physiologische Funktion des Proteins weitgehend unbekannt. Untersuchungen deuten auf eine Funktion von APP in der Zell-Zell-Interaktion, als Adhäsionsmolekül, Zelloberflächenrezeptor oder als Transkriptionsregulator hin. Zusätzlich weisen Beobachtungen auf eine Rolle von APPs α als Wachstumsfaktor hin.

Überraschenderweise zeigten APP-defiziente Mäuse keinen ausgeprägten Phänotyp. Die Mäuse waren lebensfähig und fruchtbar. Sie hatten ein etwas geringeres Gewicht, verminderte Bewegungs- und Erkundungsaktivität, reduzierte Greifkraft und eine Verschlechterung des räumlichen Lernens und der Langzeit-Potenzierung (LTP) (151-154). Dagegen starben sowohl APP/APLP2 und APLP1/APLP2 doppel-*knockout* Mäuse als auch APP/APLP1/APLP2 *triple-knockout* Mäuse wenige Wochen nach der Geburt (155-157). Die APP/APLP2 doppel-*knockout* Mäuse zeigten Veränderungen der motorischen Endplatte (158), während die *triple-knockout* Mäuse eine neuronale Ektopie aufwiesen, die der humanen Typ-II-Lissenzephalie ähnelte (157). Diese Ergebnisse demonstrieren die Bedeutung der APP-Familie in der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung und weisen darüber hinaus auf eine wichtige Funktion im Erwachsenenalter hin. Zusätzlich deuten sie auf eine in Teilen funktionelle Redundanz zwischen APP und seinen Homologen APLP1 und APLP2 hin.

Während die *in vivo* Arbeiten nur wenig Aufschluss über die Funktion der APP-Familie gaben, wurden zahlreiche Funktionen von APP durch *in vitro* Untersuchungen postuliert.

Das sezernierte APPs dient möglicherweise als Signalmolekül. Es konnte gezeigt werden, dass die freigesetzte Ektodomäne das Wachstum von Fibroblasten in Kultur beeinflusst (159). Zusätzlich zeigte es eine neuroprotektive Wirkung. Die Behandlung von primären Neuronen mit APPs verhinderte den durch Glukose-Entzug erzeugten Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Ionen-Konzentration und erhöhte den exzitotoxischen Grenzwert des Glutamats (160). Des Weiteren hat APPs einen Einfluss auf das axonale und dendritische Wachstum (161). Interessanterweise konnten die Anomalien der APP-defizienten Mäuse, wie die Defizite beim LTP, durch die transgene Expression von APPs behoben werden (162). Dieses deutet darauf hin, dass APPs als autokriner oder parakriner Faktor fungieren kann und die Ektodomäne wahrscheinlich den wichtigsten funktionellen Teil von APP im ausgewachsenen Gehirn darstellt.

Die beiden längeren APP-Isoformen APP751 und APP770 enthalten ein 56 Aminosäuren langes Insert für ein Kunitz-Protease-Inhibitor-Motiv. *In-vitro*-Studien haben bestätigt, dass beide Isoformen Serin-Proteasen wie Trypsin und Chymotrypsin inhibieren können (163) und sie als Inhibitoren des Faktor XIa, einer Serin-Protease, auch eine Rolle in der Gerinnungskaskade spielen (164).

Mehrere Indizien deuten auch auf eine Funktion von APP als Adhäsionsmolekül hin. So konnte gezeigt werden, dass APP sowohl an extrazelluläre Matrix-Proteine wie Heparin und Kollagen bindet (165, 166) als auch die interzelluläre Adhäsion durch Homo- bzw. Heterodimerisierung unterstützt (167).

Wie bereits erwähnt, setzt die γ -Sekretase-Prozessierung von APP auch die intrazelluläre Domäne, AICD, frei. Neben APP wurde dieser Prozessierungsschritt auch bei vielen anderen Transmembranproteinen gefunden. Dadurch werden in der Membran verankerte Proteine gespalten, entweder um zytosolische Fragmente freizusetzen, die an der Zellkommunikation beteiligt sind, wie z.B. beim Notch-Rezeptor, oder um durch den Abbau dieser Proteine die physiologische Funktion abzuschalten ("Proteosom der Membran", (168)). Nach Ligandenbindung wird der Notch-Rezeptor durch α - und γ -Sekretase gespalten, wodurch die intrazelluläre Domäne von Notch (NICD, *Notch intracellular domain*) ins Zytosol freigesetzt wird. Wie der Notch-Rezeptor wird APP durch die α -Sekretase und anschließend durch die γ -Sekretase prozessiert (168). Daher wurde in Analogie zur Signalübertragung des Notch-Rezeptors eine transkriptionsaktivierende Funktion von AICD postuliert. Durch die Verwendung eines artifiziellen Reportersystems konnte gezeigt werden, dass AICD mit zwei weiteren Molekülen, Fe65 und der Histon Acetyltransferase Tip60, einen transkriptionsaktivierenden Komplex bilden kann (169). Fe65 nimmt in der Zelle durch eine intramolekulare Interaktion eine geschlossene Konformation ein. Durch die Bindung des Fe65 an den zytoplasmatischen Schwanz von APP wird diese intramolekulare Interaktion aufgehoben und Fe65 aktiviert. Das AICD wird zusammen mit dem aktivierten Fe65 durch α -Sekretase-*Shedding* und anschließender γ -Sekretase-Prozessierung ins Zytosol freigesetzt. Nach der Translokation in den Kern interagiert Fe65 mit Tip60 und weiteren noch unbekanntem Transkriptionsfaktoren. Durch die Bindung an Promotorregionen reguliert dieser Komplex die Transkription von Zielgenen (170). Obwohl die von der γ -Sekretase-vermittelte Prozessierung von APP für die Translokation von Fe65 in den Kern notwendig zu sein scheint, ist die gleichzeitige Translokation von AICD in den Kern wahrscheinlich nicht erforderlich (170).

Die endogenen Zielgene der APP-Signalübertragung werden gegenwärtig kontrovers diskutiert. So wurde die AICD-abhängige Expressionsregulation für mehrere potentielle Gene wie Neprilysin, Glykogen-Synthase-Kinase 3- β (GSK3- β), LRP1 und dem EGF-Rezeptor beschrieben (171-174). Einige dieser Zielgene stehen in enger Verbindung mit der AK. Dazu zählen insbesondere das Neprilysin, eine Endopeptidase mit A β -degradierender Aktivität, und LRP1, einem in den ApoE-Metabolismus involvierten Rezeptor. Dennoch sind weitere Untersuchungen der Funktion von AICD als Transkriptionsaktivator oder Coaktivator nötig, da einige Zielgene in einer weiteren Studie nicht bestätigt werden konnten. Zudem zeigte diese Untersuchung, dass Fe65 unterschiedliche Promotoren unabhängig von der AICD Co-Expression transaktivieren kann (175).

Obwohl APP einem Zelloberflächenrezeptor ähnelt, sind bisher nur wenige Liganden postuliert worden. Zu den bisher identifizierten Liganden gehören F-Spondin und TAG1. F-Spondin ist ein sezerniertes neuronales Protein, das an Zell-Zell Interaktionen beteiligt ist. Co-Expression von F-Spondin verhinderte die β -Sekretase-Spaltung von APP und reduzierte so die A β -Sekretion (176). Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass TAG1, ein *Glycophosphatidylinositol (GPI)-linked Recognition Molecule* der äußeren Plasmamembran, ein funktioneller Ligand von APP ist (177). Durch die Interaktion von TAG1 mit APP wird AICD in einem γ -Sekretase-abhängigen Prozess freigesetzt. Es wurde postuliert, dass die erhöhte Freisetzung von AICD eine verminderte Neurogenese verursacht. So wurden sowohl im Gehirn von APP- als auch von TAG1-defizienten Mäusen mehr neuronale Vorläuferzellen gefunden. Sollte diese Beobachtung bestätigt werden, wäre TAG1 der erste funktionelle Ligand von APP, der einen intrazellulären Signalweg beeinflusst.

1.9 Enzyme der APP-Prozessierung

1.9.1 Die α -Sekretase

Die α -Sekretase schneidet APP zwischen AS 16 und 17 der A β -Domäne. Dieser Schnitt führt zur Sekretion des größten Teils der extrazellulären Domäne als APPs α und verhindert die Entstehung des A β -Peptids durch die Spaltung von APP innerhalb des A β -Motivs (118, 119). Es konnte gezeigt werden, dass dieser proteolytische Schnitt durch eine α -helikale Konformation im Bereich der Spaltstelle sowie durch einen 12-13 AS großen Abstand der Schnittstelle von der Membran bestimmt wird. Dabei ist der Schnitt weitgehend unabhängig von der primären Aminosäuresequenz (119). Die α -Sekretase abhängige Prozessierung von

APP findet in den späten Kompartimenten des sekretorischen Transportweges oder an der Zelloberfläche statt (102, 119, 178). Während APP α von fast allen kultivierten Zellen konstitutiv ins Medium sezerniert wird, kann die Sekretion durch die Aktivierung von sekundären Botenstoffen erhöht werden. So führt die Signalübertragung der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren oder der *Epidermal-Growth-Factor* (EGF)-Rezeptoren über sekundäre Botenstoffe zu einer Aktivierung von Proteinkinase C (PKC), Tyrosinkinase (MAPK) oder *Extracellular-signal regulated* Kinasen (ERK). Diese wiederum steuern die α -Sekretase-Aktivität und führen infolgedessen zu einer verstärkten APP α -Sekretion (179-182). Die α -Sekretase-Aktivität kann aber auch direkt über die Aktivierung der PKC durch Phorbolester stark erhöht werden (183, 184).

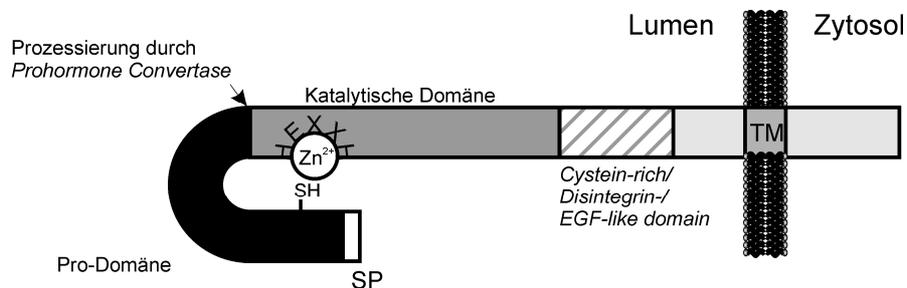


Abb. 6: Domänenstruktur eines typischen Mitglieds der ADAM-Familie.

ADAMs sind Typ-I-Transmembranproteine mit einer Multi-Domänen-Struktur bestehend aus (1) einem N-terminalen Signalpeptid, (2) einer Prodomäne, welche den Cystein-Switch enthält, (3) einer Schnittstelle für die Serin-Protease Furin, (4) einer katalytischen Domäne mit einem HEXXH Zink-Bindemotiv, (5) einer *Cystein-rich/Disintegrin-/EGF-like Domain*, (6) einer hydrophoben Transmembrandomäne und (7) einem zytosolischen Schwanz (verändert nach (185)).

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass mehrere Mitglieder der ADAM (*A Disintegrin and Metallo-Proteinase*)-Familie die charakteristischen Eigenschaften der α -Sekretase haben. Neben dem *Tumor-Necrosis-Factor- α converting* Enzym (TACE, ADAM17) wurde α -Sekretase Aktivität auch für die Familienmitglieder ADAM10 und ADAM9 nachgewiesen. ADAMs sind Typ-I-Transmembranproteine mit einer Multi-Domänen-Struktur. Typischerweise bestehen sie aus einem N-terminalen Signalpeptid, einer den „*Cystein-Switch*“ enthaltende Prodomäne, einer katalytischen Domäne mit einem Zink-Bindemotiv, einem Cystein-reichen/Disintegrin-/EGF-ähnlichen Bereich, der Transmembrandomäne und einem kurzen zytosolischen Bereich (Abb. 6).

TACE wurde ursprünglich als Proteinase identifiziert, die das inflammatorische Zytokin TNF α von dem membrangebundenem Vorläuferprotein freisetzt (186, 187). Die perinatale Sterblichkeit von TACE-*knockout* Mäusen ist vermutlich auf die stark erniedrigte TNF- und Notch-Prozessierung zurückzuführen (188, 189)

Dagegen wurde ADAM10 als *Myelin-Basic-Protein* degradierendes Enzym aus Myelin-Membranpräparationen des Gehirns isoliert (190). Auf Grund von vielfältigen Fehlentwicklungen des zentralen Nervensystem, der Somiten und des kardiovaskulären Systems sterben ADAM10-*knockout* Mäuse früh in der embryonalen Entwicklung. Dabei spielt die Prozessierung des Notch-Rezeptors, welcher in eine Reihe von Signalübertragungen involviert ist, als wichtigstes physiologisches Substrat von ADMA10 eine entscheidende Rolle (191).

ADAM9 schneidet nicht die Lys16-Leu17 Peptidbindung, sondern die His14-Gln15 Bindung innerhalb der A β -Domäne von APP (192). Ein mit dieser Spaltung übereinstimmendes APP α wurde im Sekret von primären hippocampalen Neuronen gefunden (193).

APP α wird jedoch sowohl von TACE und ADAM10-*knockout* Fibroblasten (120, 191) als auch primäre Neuronen aus ADAM9-*knockout* Mäusen sekretiert (194). Dies deutet darauf hin, dass ein „Team“ an Proteasen mit α -Sekretase-Aktivität existiert. Auf Grund funktioneller Überlappung oder Redundanz kann somit der Ausfall eines Mitgliedes kompensiert werden.

1.9.2 Die β -Sekretase

Die amyloidogene Prozessierung von APP wird durch die β -Sekretase BACE1 (*β -site APP Cleaving Enzyme 1*) eingeleitet. BACE1, auch als Memapsin 2 oder Asp2 bezeichnet, ist eine 501 Aminosäuren lange Typ-I-Transmembranprotease mit einer großen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen C-terminalen Schwanz. Am N-Terminus befindet sich ein kurzes Signalpeptid (AS 1-21), gefolgt von einem Propeptid (AS 22-45) ((109, 110, 195-197), Abb. 7). Nach der posttranslationalen Entfernung des Propeptids beginnt das reife Enzym bei AS 46 (198). Das in der luminalen Domäne gelegene katalytische Zentrum enthält zwei für Aspartylproteasen der Pepsin-Familie charakteristische Motive (DTGS (AS 93-96) und DSGT (AS 289-292)). Die Mutation eines der beiden Asparaginsäuren inaktiviert das Enzym (195). Wie andere Aspartylproteasen hat BACE1 sechs luminale Cysteinreste, die drei intramolekulare Disulfidbrücken bilden, sowie mehrere N-Glykosylierungsstellen (199). Zusätzlich sind bei BACE1 die Transmembrandomäne und der zytoplasmatische Schwanz an drei Cysteinen palmitoyliert (200).

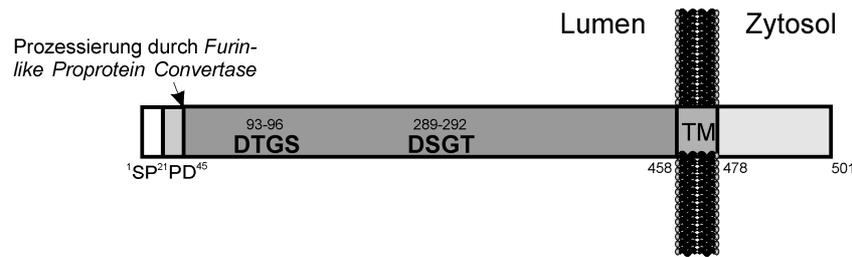


Abb. 7: Schematische Darstellung der β -Sekretase BACE1.

BACE1 ist eine Typ-I-Transmembranprotease mit einem großen luminalen Teil, einer Transmembrandomäne (TM) und einem kurzen zytosolischen Schwanz. Dem N-terminalen Signal-Peptid (SP) folgt ein Propeptid (PD), welches posttranslational durch eine *Furin-like Proprotein Convertase* entfernt wird. Das luminal katalytische Zentrum der Aspartylprotease ist durch die beiden charakteristischen Motive DTGS und DSGT gekennzeichnet.

BACE1 weist die charakteristischen Merkmale der β -Sekretase auf. β -Sekretase-Aktivität wurde in den meisten Zell- und Gewebetypen nachgewiesen (111), wobei die höchste Aktivität in neuronalem Gewebe und neuronalen Zelllinien beobachtet wurde (201). Die β -Sekretase-Aktivität überwog dabei in Neuronen, während nur geringe Mengen in ruhenden Gliazellen gefunden wurden (202). Die β -Sekretase kann nur membrangebundenes Substrat effizient spalten (108). Zudem wurde die höchste β -Sekretase Aktivität in sauren subzellulären Kompartimenten, wie dem Trans-Golgi-Netzwerk und Endosomen, detektiert (123, 203, 204). Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen wurde BACE1 in diesen Kompartimenten lokalisiert (110, 195, 205) und ein pH-Optimum von pH 4,5 nachgewiesen (195). Während die α -Sekretase APP in einem festen Abstand zur Membran spaltet, schneidet die β -Sekretase sequenzspezifisch (108). So führt die Substitution des Methionins unmittelbar vor der β -Sekretase-Schnittstelle (M596) durch eine große hydrophobe Aminosäure, wie man es bei der schwedischen Mutation durch eine Leucin Substitution (M596L) findet, zu einer Erhöhung der Affinität der β -Sekretase. Dagegen hemmt die Substitution des Methionins durch eine kleine, hydrophobe Aminosäure, z.B. Valin, die β -Sekretase-Prozessierung von APP (108). Die Überexpression von BACE1 induziert einen starken Anstieg der β -Sekretase-Aktivität. Diese verursacht sowohl eine verstärkte Bildung der unmittelbar durch den β -Sekretase-Schnitt erzeugten Produkte APPs β und C99, als auch eine Erhöhung der A β -Sekretion.

Der zweifelsfreie Nachweis, dass es sich bei BACE1 um die β -Sekretase handelt, wurde durch die Generierung von BACE1-*knockout* Mäusen erbracht. Untersuchungen der BACE1-defizienten Mäuse zeigten weder in postnatalen noch in adulten Mäusen einen offensichtlichen Phänotyp (206, 207). In BACE-defizienten, aber APP_{sw} überexprimierenden Mäusen, wurden weder A β -Peptide noch die direkten Produkte des β -Sekretase-Schnittes, C99 und APPs β , gefunden (206, 208). Zusammen mit *in vitro* Untersuchungen von primären Neuronen aus BACE1-*knockout* Mäusen, die kein A β

herstellten (207, 209), deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass BACE1 die bedeutendste, wenn nicht die einzige β -Sekretase im Gehirn ist. Eine Erhöhung der BACE1-Expression könnte somit einen großen Einfluss auf die Entstehung der Alzheimer Krankheit haben. In der Tat wurde beobachtet, dass die β -Sekretase-Aktivität mit dem Alter ansteigt (210). Zudem wurden erhöhte BACE1-Mengen und Aktivitäten in Alzheimer-Gehirnen gefunden (211-213). Da Alterung der größte Risikofaktor der sporadischen Alzheimer Krankheit ist, könnte ein überproportionaler Anstieg der β -Sekretase-Aktivität die Entstehung der AK auslösen.

Da nur ein kleiner Anteil der APP-Moleküle durch die β -Sekretase geschnitten wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass noch andere BACE1-Substrate existieren. Bisher wurden neben APP auch die APP Homologen APLP1 und APLP2 (214, 215) sowie die β -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals (*Voltage-gated Sodium Channel*, VGSC, (216, 217)), das *Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein* (LRP1, (218)), der *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1* (PSGL-1, (219)), die β -Galaktosid α -2,6-Sialyltransferase (ST6Gal1, (220, 221)) und der Interleukin-1-Rezeptor Typ-II (IL-1R2, (222)) als BACE1-Substrate identifiziert.

Zudem wurde eine Funktion von BACE1 in der axonalen Myelinierung beschrieben. Durch die genauere Untersuchung der BACE1-*knockout* Mäuse wurde eine Hypomyelinierung der Axone im zentralen und peripheren Nervensystem gefunden (223, 224). Neuregulin-1 (NRG1) ist ein bekannter Initiator der Myelinierung im peripheren Nervensystem und ein Modulator der Myelinscheidendicke. Der Vergleich von *wildtyp* Mäusen mit BACE1-*knockout* Mäusen zeigte, dass in BACE1-defizienten Mäusen ungeschnittenes NRG1 akkumulierte und gleichzeitig weniger Spaltprodukte von NRG1 detektiert wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BACE1 in die Proteolyse von NRG1 involviert ist (223, 224).

BACE2 ist ein Homolog von BACE1, welches in der kritischen Region des Down Syndroms auf Chromosom 21 liegt (225). Die Aminosäuresequenz von BACE1 und BACE2 ist zu 45% gleich und zu 75 % homolog (226, 227). Aber im Gegensatz zu BACE1, welches in neuronalem Gewebe verstärkt exprimiert ist, wurde BACE2 im adulten und im fetalen Gehirn nur in sehr niedrigen Mengen gefunden (227, 228). *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass APP von BACE2 sowohl an der β -Sekretase-Schnittstelle als auch innerhalb der $A\beta$ -Domäne geschnitten wird. Die Prozessierung innerhalb der $A\beta$ -Domäne kann dabei zwischen Glu-11 und Val-12 als auch C-terminal von der α -Sekretase-Schnittstelle zwischen Phe-19 und Phe-20 bzw. Phe-20 und Ala-21 erfolgen. Zudem wurde die $A\beta$ -Sekretion durch die

BACE2-Überexpression erniedrigt. Dies deutet darauf hin, dass BACE2 als alternative α -Sekretase fungieren kann (195, 229-231).

1.9.3 Die γ -Sekretase

Die γ -Sekretase schneidet die durch α - bzw. β -Sekretase-Spaltung von APP entstandenen CTFs. Neben der Sekretion von A β bzw. p3 führt der γ -Sekretase-Schnitt zur Freisetzung des intrazellulären Fragmentes AICD. Die γ -Sekretase ist eine Aspartylprotease (232), die Typ-1-Transmembranproteine nach der Entfernung des größten Teils der Ektodomäne in ihrer Transmembrandomäne schneidet. Diesen Vorgang nennt man regulierte intramembranöse Proteolyse (RIP, (233)). Die γ -Sekretase ist ein Multiproteinkomplex, der mindestens aus den vier verschiedenen Proteinen Nicastrin (234), *Anterior Pharynx Defective-1* (APH-1, (235)), *Presenilin Enhancer Protein-2* (PEN2) und Presenilin (PS1 bzw. PS2) besteht. Diese vier Proteine sind notwendig und ausreichend, um einen aktiven γ -Sekretase-Komplex zu bilden (114, 236). Zwei weitere Proteine, CD147 und TMP21, wurden als Modulatoren der γ -Sekretase-Aktivität und als Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes vorgeschlagen. Da beide Proteine nicht für die γ -Sekretase-Funktion notwendig sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob sie tatsächlich integrale Bestandteile des γ -Sekretase-Komplexes sind (237, 238).

PS1 und PS2 sind homologe, polytope Transmembranproteine mit neun Transmembrandomänen (TMD, (239-241)), die das katalytische Zentrum des Komplexes bilden. Die PS-Proteine enthalten zwei katalytisch aktive Aspartat-Reste in den TMD 6 und 7. Die Substitution eines der Aspartate durch eine andere Aminosäure inaktiviert die γ -Sekretase (232, 242). Zwischen Transmembrandomäne 6 und 7 befindet sich ein großer, zytoplasmatischer Loop. Innerhalb dieser Schleife wird das PS-Protein in ein Amino-terminales (NTF) und ein Carboxy-terminales-Fragment (CTF) endoproteolytisch gespalten ((243), Abb. 8). Obwohl Presenilin in der Zelle nur als stabiles NTF/CTF-Heterodimer vorliegt, ist die proteolytische Prozessierung keine Voraussetzung für die Bildung eines aktiven γ -Sekretase-Komplexes. So konnte gezeigt werden, dass die mit der familiären Alzheimer Krankheit assoziierte PS1- Δ Exon9 Mutation, der die endoproteolytische Schnittstelle fehlt, proteolytisch aktiv ist (244).

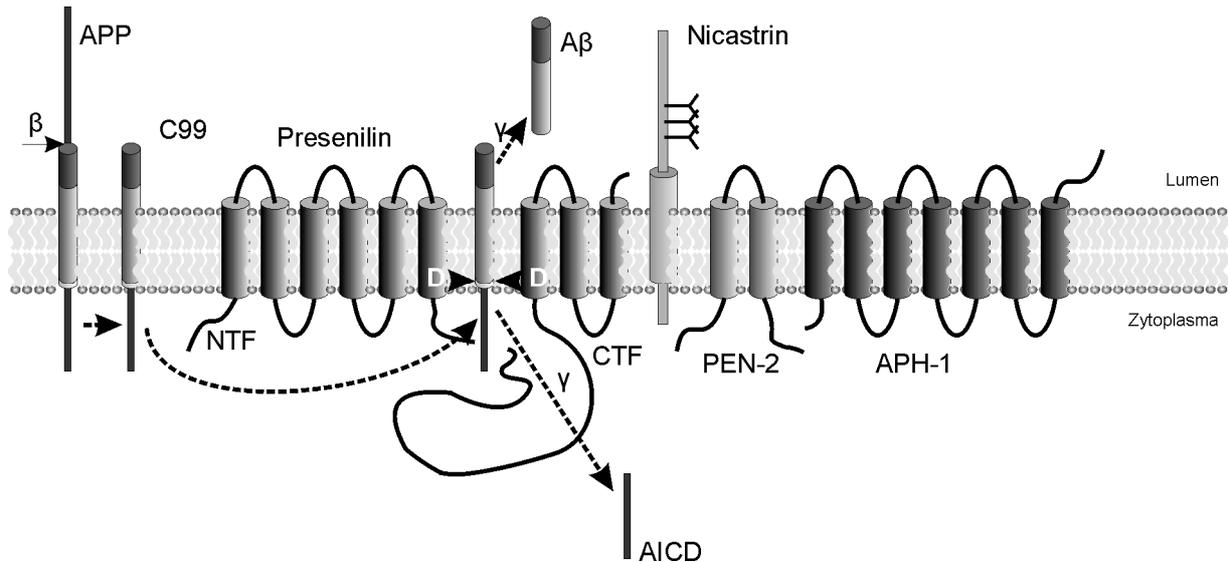


Abb. 8: Der γ -Sekretase-Komplex

Die amyloidogene Prozessierung von APP wird durch die β -Sekretase BACE1 eingeleitet. Dadurch wird der größte Teil der Ektodomäne als APPs β sezerniert und es entsteht ein in der Membran zurückbleibendes Fragment, C99. Dieses bindet an die Andockstelle des γ -Sekretase-Komplexes und wird anschließend in das aktive Zentrum überführt, zu dem die Transmembrandomänen 6 und 7 von Presenilin gehören. PS1 bzw. PS2 werden beide autoproteolytisch geschnitten, wodurch ein N-terminales (NTF) und ein C-terminales Fragment (CTF) entstehen. Diese bilden zusammen mit drei weiteren Proteinen, PEN-2, APH-1 und Nicastrin, den essentiellen Kernkomplex der γ -Sekretase. Das in der Membran gelegene katalytische Zentrum ist durch die kritischen Aspartat-Reste (D) gekennzeichnet. Die γ -Sekretase schneidet das C99 in der Transmembrandomäne und führt so zur Freisetzung der intrazellulären Domäne von APP (AICD) ins Zytoplasma und zur gleichzeitigen Sekretion des A β -Peptids (verändert nach (245)).

Nicastrin ist ein hoch glykosyliertes Typ-1-Transmembranprotein (246) und möglicherweise der Substrat-Rezeptor des γ -Sekretase-Komplexes (247). Keine eindeutigen Funktionen wurden bisher den weiteren γ -Sekretase-Komponenten, APH-1 und PEN-2, zugeordnet. PEN-2 hat zwei TMDs und sowohl der N- als auch der C-Terminus befinden sich auf der luminalen Seite der Membran. Dagegen hat APH-1 sieben TMD. Beim Menschen wurden zwei verschiedene APH-1 Gene, APH-1A und APH-1B, und bei Nagern drei Gene identifiziert, die zusätzlich alternativ gesplittet werden können. Da sich APH-1A und APH-1B sowie PS1 und PS2 innerhalb des γ -Sekretase-Komplexes gegenseitig ausschließen, können beim Menschen mindestens vier und bei Nagetieren mindestens sechs verschiedene γ -Sekretase-Komplexe gebildet werden (248, 249). Ob diese verschiedenen Komplexe unterschiedlich exprimiert werden, unterschiedliche Funktionen oder verschiedene Rollen in Entwicklungsprozessen spielen, wird derzeit noch untersucht.

Die einzelnen Proteine innerhalb des γ -Sekretase-Komplexes beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Expression. So wird transfiziertes PS oder PEN2 nicht stabil exprimiert und überexprimiertes Nicastrin nicht maturiert (250). Während die alleinige Überexpression von PS die γ -Sekretase-Aktivität nicht erhöht, führt die gemeinsame Überexpression der essentiellen γ -Sekretase-Komponenten zu einer erhöhten Bildung des γ -Sekretase-Komplexes

(236, 251). Die einzelnen Komponenten der γ -Sekretase ko-lokalisieren im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Zunächst wird ein stabiler Subkomplex aus Nicastrin und APH-1 gebildet (252, 253), zu dem anschließend ungeschnittenes PS hinzugefügt wird. Durch die Assoziation von Pen-2 an diesen trimeren Komplex wird die Endoproteolyse von Presenilin ermöglicht (254). Ob die Endmontage des Komplexes bereits innerhalb des ER oder erst später im Sekretionsweg erfolgt (255) ist nicht vollständig aufgeklärt. Die jüngsten Beobachtungen deuten darauf hin, dass ER-Golgi-Recycling-Mechanismen eine Rolle in dem komplexen Zusammenbau spielen (256, 257).

Bis heute wurden mehr als 20 Substrate der γ -Sekretase identifiziert (siehe Zusammenfassung (258)). Alle identifizierten Proteine sind Typ-I-Transmembranproteine. Die vorherige Entfernung ihrer luminalen Domäne ist die einzige Voraussetzung für die γ -Sekretase abhängige Prozessierung. Die γ -Sekretase-Prozessierung der durch „*Shedding*“ entstandenen kurzen, transmembranösen Fragmente der Proteine führt neben der Freisetzung kleiner hydrophober Peptide in den extrazellulären Raum, wie A β , auch zur Abgabe der intrazellulären Domänen (ICD) in das Zytoplasma. Diese ICD haben möglicherweise spezifische Funktionen wie die Aktivierung nukleärer Signalwege.

Die beiden am besten untersuchten Substrate der γ -Sekretase sind der Notch-Rezeptor und das APP. Der Notch-Signaltransduktionsweg wurde in der Evolution hoch konserviert und spielt in der embryonalen Entwicklung bei der Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle. Der Notch-Rezeptor wird in ähnlicher Weise wie das APP prozessiert. Nach der Entfernung der Ektodomäne durch die α -Sekretase (ADAM10 oder TACE) wird das membrangebundene Fragment durch die γ -Sekretase geschnitten (259, 260). Dabei entsteht ein dem A β analoges N β -Peptid und die intrazelluläre Domäne von Notch (NICD) wird in das Zytoplasma freigesetzt (261). Dieses NICD transloziert in den Zellkern und reguliert die Transkription bestimmter Zielgene (259), wie das Homeobox-Gen Hes-1, welches für einen basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionfaktor kodiert (262, 263). Die Bedeutung der γ -Sekretase in der Notch-Prozessierung wird dadurch bestätigt, dass PS1-*knockout* Mäuse eine phänotypische Kopie der Notch-defizienten Mäuse sind. Diese Mäuse sterben kurz nach der Geburt, haben Fehlbildungen des Achsenskeletts und zeigen eine schwer beeinträchtigte Neurogenese (264-266). Dagegen wurden bei PS2-*knockout* Mäusen nur eine leichte Lungenfibrose und Blutungen im Alter beobachtet (267). Dies deutet darauf hin, dass PS1 den Verlust der PS2-Funktionen kompensieren kann. PS1/PS2 doppel-*knockout* Mäuse zeigen noch schwerwiegendere Beeinträchtigungen als die PS1-*knockout* Mäuse, die vermutlich auf die fehlende Prozessierung weiterer Substrate zurückzuführen sind (267, 268).

Während bei *PS1-knockout* Mäuse eine starke Reduzierung der A β -Sekretion und eine Akkumulation der C-terminalen-Fragmente beobachtet wurde (266, 269), konnte bei PS1- und PS2-defizienten Mäuse keine A β -Produktion nachgewiesen werden (267, 270).

Seit der ersten Beschreibung einer PS1-Mutation im Jahre 1995 (271) sind mehr als 150 weitere Mutationen im PS1 und etwa 10 im PS2 beschrieben worden. Diese führen zu aggressiven Formen der familiären Alzheimer Krankheit, die schon in den Zwanzigern zum Ausbruch kommen können (272). Bei diesen gleichmäßig über das PS1- bzw. PS2-Molekül verteilt gefundenen Mutationen handelt es sich in den meisten Fällen um Punktmutationen und nur in wenigen Ausnahmen um Insertionen oder Deletionen. Das gemeinsame Merkmal dieser FAK assoziierten Mutationen ist die Erhöhung des A β 42 zu A β 40-Verhältnisses (40, 42, 43). Die Verschiebung des A β 42/40-Verhältnisses kann sowohl durch einen Rückgang der A β 40-Produktion als durch eine Erhöhung der A β 42-Menge verursacht werden (273).

1.10 Unterschiedliche Lokalisierung der amyloidogenen Prozessierung von wildtyp und schwedischem APP

Auch nach 15 Jahren intensiver Forschung sind die genaue Lokalisationen der einzelnen Prozessierungsschritte von APP und die zellulären Kompartimente, in denen die A β -Freisetzung erfolgt, nicht eindeutig geklärt. Die konstitutiv aktiven Metalloproteinasen, die als α -Sekretase (120-122) fungieren, schneiden APP an oder in der Nähe der Zelloberfläche (119, 178, 274). Anfängliche Untersuchungen haben die β -Sekretase-Aktivität mit leicht sauren Kompartimenten, wie dem Trans-Golgi-Netzwerk oder den Endosomen, in Verbindung gebracht (99, 102, 123, 275). Nach der Entdeckung von BACE1 konnte die Lokalisation der β -Sekretase in diesen Kompartimenten bestätigt werden (110, 195, 205). Das zweite entscheidende Ereignis der A β - oder p3-Freisetzung ist die Spaltung der CTFs durch den γ -Sekretase-Komplex. Obwohl ein Teil der A β -Produktion den Kompartimenten des sekretorischen Transportweges (ER, TGN) zugeschrieben wurde (276, 277), deuten mehrere Untersuchungen darauf hin, dass die γ -Sekretase-Aktivität an der Plasma-Membran oder in den Endosomen lokalisiert ist (278, 279).

Der Vergleich von *wildtyp* APP mit der schwedischen Mutation zeigte, dass die einzelnen Prozessierungsschritte und die Freisetzung des A β -Peptids in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten erfolgen. Der zytoplasmatische Schwanz von APP enthält u.a. eine NPxY-Konsensussequenz, die für die Clathrin-vermittelte Endozytose von APP zuständig ist. Mutationen der NPTY-Domäne verursachten eine starke Erniedrigung der APP-Internalisierung und eine Akkumulation von APP an der Zelloberfläche (100). Es konnte

gezeigt werden, dass die Inhibition der *wildtyp* APP-Endozytose sowohl durch die Entfernung des zytosolischen Schwanzes, als auch durch Substitutionsmutationen im Internalisierungssignal GYENPTY die A β -Freisetzung verhinderte (99, 123). Darüber hinaus haben radioaktive Zelloberflächenmarkierungen von *wildtyp* APP gezeigt, dass die A β -Produktion die Internalisierung und das Recycling von markiertem *wildtyp* APP erfordert (99). Daraus lässt sich schließen, dass die A β -Freisetzung aus *wildtyp* APP nach der Internalisierung in den endozytischen Kompartimenten erfolgt. Ungeklärt ist bisher, ob das β -Sekretase-*Shedding* und auch die γ -Sekretase-Prozessierung von *wildtyp* APP in den endozytischen Kompartimenten stattfinden.

Dagegen unterscheidet sich die Prozessierung von APP mit der schwedischen Mutation (APP^{swe}) wesentlich von der des *wildtyp* APP. Der β -Sekretase-Schnitt im APP^{swe} erfolgt im späten sekretorischen Transportweg, höchstwahrscheinlich in sekretorischen Vesikeln, die aus dem Golgi hervorgegangen sind (275, 280). Im Gegensatz zum *wildtyp* APP wurde die A β -Sekretion von schwedischem APP durch die Entfernung des zytosolischen Schwanzes nicht beeinträchtigt (37, 108). Diese Untersuchungen zeigten, dass das β -Sekretase-*Shedding* von APP^{swe} im späten sekretorischen Transportweg erfolgt und dass die A β -Sekretion unabhängig von dem Internalisierungsmotiv von APP^{swe} ist. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass sowohl der β -Sekretase-Schnitt als auch die anschließende γ -Sekretase-Prozessierung von APP^{swe} im sekretorischen Transportweg stattfindet.

Abweichend von diesem Modell der schwedischen APP-Prozessierung wurde kürzlich gezeigt, dass die A β -Sekretion in APP^{swe} überexprimierenden Tg2576 Mäusen durch die *in-vivo* Inhibition der Dynamin-vermittelten Endozytose um bis zu 70% reduziert wurde (281, 282). Zudem ergaben Untersuchungen der Prozessierung eines C99-GFP Fusionsproteins, dass die γ -Sekretase C99 nicht im ER, dem TGN oder in den sekretorischen Vesikeln spaltet, sondern dass die AICD-Freisetzung an der Zelloberfläche oder in den frühen Endosomen erfolgt (278).

1.11 LRP1-abhängige Prozessierung von *wildtyp* APP

Die *Low-density Lipoprotein Receptor* (LDLR)-Familie besteht aus strukturell eng verwandten Zelloberflächenproteinen, die eine Vielzahl an unterschiedlichen Funktionen in verschiedenen Organen, Geweben und Zelltypen ausführen. Ursprünglich wurde eine Beteiligung der Familienmitglieder an der Entstehung der Alzheimer Krankheit auf Grund ihrer Schlüsselfunktion im Cholesterin/Apolipoprotein E (ApoE)-Metabolismus untersucht.

Das $\epsilon 4$ -Allel des ApoE ist bis heute der stärkste genetische Risikofaktor der nicht-familiären Alzheimer Erkrankung. Ein charakteristisches Merkmal der LDLR-Familienmitglieder ist die Bindung der ApoE-Lipoprotein-Partikel an die extrazellulären Ligandenbindestellen der Rezeptoren. Die Regulation des Cholesterol/ApoE-Stoffwechsels durch die Familienmitglieder hat direkten Einfluss auf den parenchymalen ApoE-Gehalt, die zelluläre Cholesterolkonzentration und auf die Entfernung des extrazellulären A β -Peptids. Neben der Beteiligung an der Entstehung der Alzheimer Krankheit auf Grund der Schlüsselfunktion im Cholesterol/ApoE-Metabolismus, konnte auch ein direkter Einfluss einiger Familienmitglieder auf die APP-Prozessierung gezeigt werden (siehe Review (283)).

Der Einfluss des *Low-density-Lipoprotein Receptor-related Proteins* (LRP1) auf die *wildtyp* APP-Prozessierung wurde im Detail untersucht (284, 285). LRP1 ist ein 600 kDa großes Typ-I-Transmembranprotein, welches posttranslational durch Furin in zwei Fragmente, die nicht-kovalent miteinander verbunden bleiben, gespalten wird. Die 515 kDa große extrazelluläre α -Chain enthält die 4 Ligandenbindungsstellen, während die 85 kDa große β -Chain aus einem extrazellulären Stück, welches mit der α -Chain verbunden bleibt, der Transmembrandomäne und dem zytoplasmatischen Schwanz, der zwei NPxY-Motive enthält, besteht. Es konnte gezeigt werden, dass APP zusammen mit LRP1 durch den sekretorischen Transportweg an die Zelloberfläche transportiert und anschließend in die endosomalen-lysosomalen Kompartimente internalisiert wird (284, 286). LRP1-defiziente Zellen zeigten eine um 50% reduzierte Internalisierung von *wildtyp* APP. Analog zu den Mutationen der YENPTY-Domäne von APP verursachte die erniedrigte Endozytose einen Anstieg der APPs-Sekretion und gleichzeitig eine starke Reduktion der A β -Sekretion in LRP1-defizienten Zellen (284). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass LRP1 den Transport von APP beeinflusst und die APP-Prozessierung reguliert. Detaillierte Untersuchungen haben gezeigt, dass die Interaktion von LRP1 mit APP durch das Adaptorprotein Fe65 vermittelt wird. Die Zerstörung des trimeren Komplexes resultierte in einer Erhöhung der APPs-Sekretion und in einer Reduzierung der A β -Produktion (285).

1.12 Zielsetzung

1. Auf Grund widersprüchlicher Beschreibungen sollten in dieser Arbeit die Prozessierungswege von *wildtyp* APP und APP mit der schwedischen Mutation (APP^{swe}) verglichen werden. Dazu sollten verschiedene Mutationen in APP^{wt}-, APP^{swe}- und C99-Expressionskonstrukte eingefügt und diese stabil in Zellen exprimiert werden. Durch den direkten Vergleich der APP-Metaboliten sollten die potenziellen zellulären Kompartimente der β -Sekretase- und γ -Sekretase-Prozessierung untersucht und die Unterschiede zwischen *wildtyp* APP und der schwedischen Mutation herausgearbeitet werden.
2. Durch den γ -Sekretase-Schnitt wird neben dem A β -Peptid auch die intrazelluläre Domäne von APP freigesetzt. Es wurde gezeigt, dass AICD zusammen mit dem nukleären Adaptorprotein FE65 und der Histon Acetyltransferase Tip60 die Transkription verschiedener Zielgene aktivieren kann. Die Freisetzung der intrazellulären Domäne von APP durch die γ -Sekretase und die Funktion von AICD in der Regulation der Transkription anderer Gene ähneln stark der Prozessierung und Signalübertragung des Notch-Rezeptors. In Analogie zur Notch-Prozessierung könnte ein extrazellulärer oder intrazellulärer Stimulus mit dem Ziel einer Transkriptionsregulierung die amyloidogene oder die nicht-amyloidogene Prozessierung einleiten. Eine verstärkte amyloidogene Prozessierung würde durch die erhöhte A β -Sekretion zur Entwicklung der Alzheimer Krankheit beitragen. In dieser Arbeit sollte durch die Verwendung eines heterologen Transkriptionsassays der Anteil des nicht-amyloidogenen bzw. des amyloidogenen Prozessierungsweges von APP an der Transkriptionsstimulation bestimmen werden.
3. Verschiedene Rezeptoren der Low-density-Lipoprotein Familie greifen durch die Beeinflussung des APP-Transportes in den APP-Metabolismus ein. *Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 1* (LRP1)-defiziente Zellen haben eine erniedrigte APP-Endozytose, die eine stark verminderte A β -Sekretion verursacht. Aufbauend auf den Untersuchungsergebnissen der unterschiedlichen Prozessierung von *wildtyp* APP und schwedischem APP sollte der Einfluss von LRP1 auf den Metabolismus von APP^{swe} untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

1-Step Ultra TMB ELISA Substrat	Pierce, Bonn
30% Acrylamid (37,5:1)	National Diagnostics, USA
40% Acrylamid (29:1)	National Diagnostics, USA
Agarose	Cambrex, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Roth, Karlsruhe
Bicine	Sigma, Deisenhofen
Bis-Tris	Calbiochem, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma, Deisenhofen
Desoxynucleotidtriphosphat (dNTP)	NEB, Frankfurt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat, Anhydrat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Lonza, Verviers
ECL Western Blotting Substrate	Pierce, Bonn
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGTA	Sigma, Deisenhofen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (Etbr)	Sigma, Deisenhofen
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin	Pierce, Bonn
Fötale Kälber Serum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen
Fugene TM 6	Roche, Mannheim
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Sigma, Deisenhofen
Hepes	Sigma, Deisenhofen
IGEPAL [®] CA-630 (NP-40)	Sigma, Deisenhofen

2. Material und Methoden

Immobilon Western HRP Substrate	Millipore, Schwalbach
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat (CH ₃ COOK)	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
L-685,458	Bachem AG, Weil am Rhein
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid (MnCl ₂)	Sigma, Deisenhofen
MES	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat Dihydrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat Anhydrat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natrium-Pyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
NeutrAvidin Agarose Beads	Pierce, Bonn
O-nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (OPNG)	Sigma, Deisenhofen
Opti-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
OrangeG	Sigma, Deisenhofen
PBS	Lonza, Verviers
pNPP (p-Nitrophenylphosphat)	Sigma, Deisenhofen
Polybrene	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Protease Inhibitor Cocktail Complete, EDTA-free	Roche, Mannheim
Protein A Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
rProteinG Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma, Deisenhofen
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma, Deisenhofen
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin)	BioRad, Munich
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Invitrogen, Karlsruhe

Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Ultrasol®F	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Yeast Extrakt	Roth, Karlsruhe
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Sigma, Deisenhofen
α-MEM	Lonza, Verviers
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen

2.1.2 Antibiotika

Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Hygromycin	Invitrogen, Karlsruhe
G418	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3 Enzyme

Antarktische Phosphatase	NEB, Frankfurt
Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase	NEB, Frankfurt
Restriktionsenzyme	NEB, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt
Taq Polymerase	NEB, Frankfurt

2.1.4 Größenmarker

peqGOLD Markers IV	PEQLab, Erlangen
1 kb DNA Ladder	NEB, Frankfurt
2-log DNA Ladder	NEB, Frankfurt

2.1.5 Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Bonn
EZ-Link™ Plus Activated Peroxidase Kit	Pierce, Bonn
JETstar Plasmid Purification System	Genomed, Löhne
Luciferase Assay Kit	Promega, Mannheim
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick Gel Extraction Kits	Qiagen, Hilden
QuickChange XL site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA

2.1.6 Hardware

Agarosegeldokumentationseinheit	Intas, Göttingen
Blockthermostat – BT1302	HLC, Bovenden
Elektrophoresekammern	
Mini-Protean 3 electrophoresis cell	BioRAD, Hercules, CA
Novex Midi Gel System	Invitrogen, Karlsruhe
XCell4 <i>SureLock</i> ™ Midi-Cell	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Elektrophoresekammern	
Agagel Mini	Biometra, Göttingen
DNA SubCell	BioRAD, Hercules, CA
Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Japan
Geltrockner - Model 583 Geldryer	BioRAD, Hercules, CA
Gene Ray UV-Photometer	Biometra, Göttingen
Glaswaren	Schott, Mainz
Horizontalschüttler - HT	Infors, Bolmingen, Schweiz
Inkubator (Bakterien)	New Brunswick Sci., Nürtingen
Inkubatoren (Zellkultur)	
Excella Eco-170	New Brunswick Sci., Nürtingen
CO-150	New Brunswick Sci., Nürtingen
Kryo-Einfriercontainer	Nunc, Wiesbaden
Kühlschränke und Gefrierschränke	Thermo Scientific
--80°C	
--20°C	Siemens, München
LAS-3000 Mini Luminescent Image Analyser	Fujifilm, Düsseldorf
Lichtmikroskop	Wilovert, Wetzlar
Luminometer Victor	PerkinElmer, Rodgau - Jügesheim
Magnetrührer	Heidolph, Kehlheim
Mikrowelle	Media Markt

Multiscan RC Thermo	Labsystems, Finnland
PCR-Maschine (Tpersonal)	Biometra, Göttingen
pH-Meter	inoLab, Weinheim
Pipetten 0,2 µl – 1 ml	Gilson, USA
Pipettor AccuJet	VWR, Darmstadt
Schüttler – Rocky 3D	Fröbl, Lindau
Spannungsquelle Power Pac 200	BioRAD, Hercules, CA
Spectrophotometer	Beckmann, Krefeld
Sterilbank	Nunc, Wiesbaden
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Trans-Blot [®] Electrophoretic Transfer Cell	BioRAD, Hercules, CA
Überkopf-Schüttler – Test-Tube-Rotator 34528	Snijders Scientific, Tilburg, NL
Ultraschallstab – UW2070 + Sonoplus	Bandelin electronics, Berlin
Vortex	Scientific Industries, New York
Waagen	Sartorius, Göttingen
Analysewaage - AE 160	Mettler-Toledo, Giessen
Feinwaage - PL 1200	Mettler-Toledo, Giessen
Feinwaage - BL150S	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank – Incucell	MMM, Gräfelfing
Wasseraufbereitungsanlage (Ionenaustauscher, Milli-Q)	Millipore, USA
Wasserbad – Grant	VWR
X-ray film developer	FUJI Photo, Japan
Zentrifugen	
Sorvall RC 5B Plus (Rotor GSA - 8357)	Thermo Scientific
Kühltischzentrifuge	
Mikro200R (Rotor 2424)	Hettich, Tuttlingen
Universal 320R (Rotor 1619)	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge	
Mikro120	Hettich, Tuttlingen

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

0,2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
10 cm Petri-Schaalen (Bakterien)	Sarstedt, Nümbrecht
10 cm Petri-Schaalen (Zellkultur)	Nunc, Wiesbaden
12-well Platten (Zellkultur)	Nunc, Wiesbaden

15 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
50 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
6-well Platten	Nunc, Wiesbaden
Aluminiumfolie	Aro, Metro
Blotting Papier	A. Hartenstein, Würzburg
Einweg-Handschuhe	Semperit, Wien
Einwegküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
High performance chemiluminescence film	Amersham Biosciences, UK
Kryo-Vials	Nunc, Wiesbaden
Parafilm M Laboratory Film	Roth, Karlsruhe
Mikrotiterplatte, 96-well Platte	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatte, high binding, Corning	Sigma, Deisenhofen
Nitrozellulose Membran	Hertenstein, Würzburg
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (1 mm x 12 well)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Midi Gel (1 mm x 20 well)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE MES Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg
Pipetten (5 ml – 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Protran [®] (Nitrozellulose Transfer Membran)	Schleicher & Schuell, Dassel
PVDF Membran (Immobilion P)	Millipore, Schwalbach
Slide-A-Lyzer 10K MWCO Dialysis Kassetten	Pierce, Bonn
Zellkratzer	TPP, Schweiz

2.1.8 Software

Fuji Imaging Software
Microsoft Office 2003
Prism GraphPad 4.0
Clone Manager 7
Adobe Photoshop 7.0
CorelDraw 12
MultiGauge V3.1
FinchTV

2.1.9 Zelllinien

Es wurden zwei immortalisierte Zelllinien, HEK293T und CHO-KI, in dieser Arbeit verwendet. Bei den HEK293 (ATCC: CRL-1573) Zellen handelt es sich um eine ursprünglich von humanen embryonalen Nierenzellen (*Human Embryonic Kidney Cells*) abgeleitete Zelllinie. HEK293T Zellen besitzen durch den Einbau des temperatursensitiven Gens des SV40 T-Antigens eine höhere Transfektionseffizienz als ihre Mutterzelllinie (ATCC: CRL 11268). HEK293T Zellen wurden in dieser Arbeit sowohl für die transiente als auch für die stabile Expression von Proteinen verwendet.

Bei der CHO-KI Zelllinie (ATCC: CCL-61) handelt es sich um einen Subklon der elterlichen CHO Zelllinie. Die CHO Zelllinie (Chinese Hamster Ovary Cells) wurde aus einer Biopsie eines Ovariums (Eierstocks) eines erwachsenen chinesischen Hamsters, *Cricetulus griseus*, gewonnen (287). Die LRP1 defiziente Zelllinie 13-5-1 wurde durch Ethylmethansulfonat-induzierte Mutation der CHO-KI Zellen erzeugt und anschließend durch ihre *Pseudomonas* Exotoxinresistenz selektiert (288). *Pseudomonas* Exotoxin A ist ein Ligand von LRP1 und wird über LRP1 in die Zelle transportiert, wo es seine tödliche Wirkung entfalten kann (289). Die CHO-KI und 13-5-1 Zellen wurden von Dr. S. Leppa zur Verfügung gestellt.

Die aus HEK293 hervorgegangene Verpackungszelllinie GP2-293 (Clontech, France), welche die viralen *gag* und *pol* Gene stabil exprimiert, wurde zur Herstellung von retroviralen Partikeln verwendet.

2.1.10 Bakterienstämme

Für die Transformation von DNA wurden chemokompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien des Stammes DH5 α verwendet.

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5 α	F- Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 end A1 hsdR17</i> (r κ -, m κ +) <i>phoA supE44 thi-1 gyr A96 relA1</i> λ -
<i>E. coli</i> XL10 Gold	TetrD(<i>mcrA</i>)183 D(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacIqZDM15Tn10</i> (Tetr) Amy Camr

2.1.11 Primer

Konstrukt	Oligonukleotide	Einbau in Vektor	Restriktionsenzyme
APP695myc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pcDNA3.1A+mychis	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG TTCTGCATCTGCTCAAAGA ACTT - 3'		
APP695swemyc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pcDNA3.1A+mychis	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG TTCTGCATCTGCTCAAAGA ACTT - 3'		
APP695myc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TATTT ATCGATT CAATGGTGATGGTGATGAT - 3'		
APP695ANPXymyc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX APP695myc	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG TTCTGCATCTGCTCAAAGA ACTT - 3'		
APP695ANPXy-F615Pmyc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX APP695myc	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- CTTCTGCAA ATGGC ACCAATTTT - 3'		
	Fwd: 5'- AAAATTGGTG CCATT TGCAGAAG - 3'		
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG TTCTGCATCTGCTCAAAGA ACTT - 3'		
APP695swemyc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TATTT ATCGATT CAATGGTGATGGTGATGAT - 3'		
APP695sweANPXymyc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX APP695myc	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG TTCTGCATCTGCTCAAAGA ACTT - 3'		
APP695sweANPXy-F615Pmyc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX APP695myc	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- CTTCTGCAA ATGGC ACCAATTTT - 3'		
	Fwd: 5'- AAAATTGGTG CCATT TGCAGAAG - 3'		
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG TTCTGCATCTGCTCAAAGA ACTT - 3'		
APP695swe-G681Amyc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX APP695myc	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG CTAGTTCTGCATCTGCTCAAAGA ACTT - 3'		
APP695swe-Y682Amyc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX APP695myc	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG CTAGTTCTGCATCTGCTCAAAGA ACTT - 3'		
APP695swe-N684Amyc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX APP695myc	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG CTAGTTCTGCATCTGCTCAAAGA ACTT - 3'		
APP695swe-P685Amyc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX APP695myc	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG CTAGTTCTGCATCTGCTCAAAGA ACTT - 3'		
APP695swe-Y687Amyc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX APP695myc	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG CTAGTTCTGCATCTGCTCAAAGA ACTT - 3'		
APP695(-3)	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TATTT ATCGATT TACAAAGGTGATGACGATCACTG - 3'		
APP695 <i>stailless</i>	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX APP695myc	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG CTACAGCATCACC AAAGGTGATGA -3'		
APP695+4	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TATTT ATCGATT ACTGTTTCTTCTCAGCATCA - 3'		
APP695+32	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TATTT ATCGATT TAGTTCTGCTGCATCTGGACA - 3'		
APP695+40	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TATTT ATCGATT ACTGTTTCTTCTCAGCATCA - 3'		
APP695	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TTT ATCGATT TAGTTCTGCTGCATCTGC-3'		
APP695swe(-3)	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TATTT ATCGATT TACAAAGGTGATGACGATCACTG - 3'		
APP695 <i>sweetailless</i>	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX APP695myc	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG CTACAGCATCACC AAAGGTGATGA -3'		
APP695swe+4	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TATTT ATCGATT ACTGTTTCTTCTCAGCATCA - 3'		
APP695swe+32	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TATTT ATCGATT TAGTTCTGCTGCATCTGGACA - 3'		
APP695swe+40	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TATTT ATCGATT ACTGTTTCTTCTCAGCATCA - 3'		
APP695swe	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TTT ATCGATT TAGTTCTGCTGCATCTGC-3'		
C99	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TTT ATCGATT TAGTTCTGCTGCATCTGC-3'		
C99ANPXy	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TTT ATCGATT TAGTTCTGCTGCATCTGC-3'		
C99myc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX APP695myc	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG TTCTGCATCTGCTCAAAGA ACTT - 3'		
C99ANPXymyc	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX APP695myc	HindIII/XbaI
	Rev: 5'- GGGCC CTAGAG TTCTGCATCTGCTCAAAGA ACTT - 3'		
APPGal	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- TTT ATCGATT TAGTTCTGCTGCATCTGC-3'		
APPGal-F615P	Fwd: 5'- AAAC TTAAGCTT ATGCTGCCCGGTTTGGCACT - 3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'- CTTCTGCAA ATGGC ACCAATTTT - 3'		
	Fwd: 5'- AAAATTGGTG CCATT TGCAGAAG - 3'		
	Rev: 5'- TTT ATCGATT TAGTTCTGCTGCATCTGC-3'		

Konstrukt	Oligonukleotide	Einbau in Vektor	Restriktionsenzyme
APPGal-M596V	Fwd: 5'-AAACTT AAGCTT ATGCTGCCCGGTTGGCACT-3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'-ATTCTGCATCA ACC TTCACTTCA-3'		
	Fwd: 5'-TGAAGTGAAG GT TGATGCAGAAT-3'		
	Rev: 5'-TTTT ATCGAT TTAGTTCTGCATCTGC-3'		
SEAP-APP	Fwd: 5'-GGCCCC AAGCTT ATGCCCATGGGGTCTCTGC-3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'-TTTT ATCGAT TTAGTTCTGCATCTGC-3'		
SEAP-APP-F615P	Fwd: 5'-GGCCCC AAGCTT ATGCCCATGGGGTCTCTGC-3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'-CTTCTGCAAAT TGG CACCAATTTT-3'		
	Fwd: 5'-AAAATTGGT GCCA TTTGCAGAAG-3'		
	Rev: 5'-TTTT ATCGAT TTAGTTCTGCATCTGC-3'		
SEAP-APP-M596V	Fwd: 5'-GGCCCC AAGCTT ATGCCCATGGGGTCTCTGC-3'	pLHCX	HindIII/ClaI
	Rev: 5'-ATTCTGCATCA ACC TTCACTTCA-3'		
	Fwd: 5'-TGAAGTGAAG GT TGATGCAGAAT-3'		
	Rev: 5'-TTTT ATCGAT TTAGTTCTGCATCTGC-3'		

2.1.12 Vektoren

Eukaryontische Expressionvektoren	
pcDNA3.1 A+ mychis	Invitrogen (Karlsruhe)
pLHCX	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, France)
pcDNA3.1 A+ mychis APP695myc	
pcDNA3.1 A+ mychis APP695ΔNPXYmyc	
pcDNA3.1 A+ mychis APP695swemyc	
pcDNA3.1 A+ mychis APP695sweΔNPXYmyc	
pLHCX APP695myc	
pLHCX APP695ΔNPXYmyc	
pLHCX APP695ΔNPXY-F615Pmyc	
pLHCX APP695swemyc	
pLHCX APP695sweΔNPXYmyc	
pLHCX APP695sweΔNPXY-F615Pmyc	
pLHCX APP695swe-G681Amyc	
pLHCX APP695swe-Y682Amyc	
pLHCX APP695swe-N684Amyc	
pLHCX APP695swe-P685Amyc	
pLHCX APP695swe-Y687Amyc	
pLHCX APP695-(-3)	
pLHCX APP695tailless	
pLHCX APP695+4	
pLHCX APP695+32	
pLHCX APP695+40	
pLHCX APP695	
pLHCX APP695swe-(-3)	
pLHCX APP695swetailless	
pLHCX APP695swe+4	
pLHCX APP695swe+32	
pLHCX APP695swe+40	
pLHCX APP695swe	
pLHCX C99	
pLHCX C99ΔNPXY	
pLHCX C99myc	

Eukaryontische Expressionvektoren	
pLHCX C99ΔNPXYmyc	
pLHCX APPGal	
pLHCX APPGal-F615P	
pLHCX APPGal-M596V	
pLHCX APPGal-F615P/M596V	
pLHCX APPGalswe	
pLHCX APPGalswe-F615P	
pLHCX SEAP-APP	
pLHCX SEAP-APP-F615P	
pLHCX SEAP-APP-M596V	
pLHCX SEAP-APP-F615P/ M596V	
pLHCX SEAP-APPGalswe	
pLHCX SEAP-APPswe-F615P	
pLHCX LRPCT	
pG5E1B	
pcDNA3.1 mychis LacZ (+)	Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA3	Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA3-Fe65	
pLPCX	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, France)
pLPCX-BACE1	

2.1.13 Stabile Zelllinien

Stabile Zelllinie	Resistenz
CHOKI APP695myc	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695ΔNPXYmyc	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695ΔNPXY-F615Pmyc	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695swemyc	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695sweΔNPXYmyc	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695sweΔNPXY-F615Pmyc	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695swe-G681Amyc	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695swe-Y682Amyc	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695swe-N684Amyc	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695swe-P685Amyc	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695swe-Y687Amyc	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695-(-3)	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695 <i>tailless</i>	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695+4	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695+32	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695+40	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695swe-(-3)	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695swe <i>tailless</i>	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695swe+4	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695swe+32	pLHCX – Hygromycin

Stabile Zelllinie	Resistenz
CHOKI APP695swe+40	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APP695swe	pLHCX – Hygromycin
CHOKI C99	pLHCX – Hygromycin
CHOKI C99 Δ NPXY	pLHCX – Hygromycin
CHOKI C99myc	pLHCX – Hygromycin
CHOKI C99 Δ NPXYmyc	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APPGal	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APPGal-F615P	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APPGal-M596V	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APPGal-F615P/M596V	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APPGalswe	pLHCX – Hygromycin
CHOKI APPGalswe-F615P	pLHCX – Hygromycin
CHOKI SEAP-APP	pLHCX – Hygromycin
CHOKI SEAP-APP-F615P	pLHCX – Hygromycin
CHOKI SEAP-APP-M596V	pLHCX – Hygromycin
CHOKI SEAP-APP-F615P/ M596V	pLHCX – Hygromycin
CHOKI SEAP-APPGalswe	pLHCX – Hygromycin
CHOKI SEAP-APPswe-F615P	pLHCX – Hygromycin
293T APPGal	pLHCX – Hygromycin
293T APPGal-F615P	pLHCX – Hygromycin
293T APPGal-M596V	pLHCX – Hygromycin
293T APPGal-F615P/M596V	pLHCX – Hygromycin
293T APPGalswe	pLHCX – Hygromycin
293T APPGalswe-F615P	pLHCX – Hygromycin
293T SEAP-APP	pLHCX – Hygromycin
293T SEAP-APP-F615P	pLHCX – Hygromycin
293T SEAP-APP-M596V	pLHCX – Hygromycin
293T SEAP-APP-F615P/ M596V	pLHCX – Hygromycin
293T SEAP-APPGalswe	pLHCX – Hygromycin
293T SEAP-APPswe-F615P	pLHCX – Hygromycin

2.1.14 Antikörper

Primäre Antikörper				
Bezeichnung	Antigen	Wirt	WB	Bezugsquelle / Referenz
CT15	APP (AS 681-695)	Kaninchen	1:10000 in 5% Milch/TBST	C.U. Pietrzik, Johannes- Gutenberg Universität Mainz (284)
1G7-5A3	APP (AS 380-665)	Maus	1:3000 in TBST	E.H. Koo, University of California San Diego California (103)
63D	APP	Kaninchen	1:1000 in 5% Milch/ TBST	E.H. Koo, University of California San Diego California (290)
192swe	APPs β_{swe} (AS 591 – 596)	Kaninchen	1:5000 in TBST	D. Schenk, Elan Pharmaceuticals (204)
192wt	APPs β_{wt} (AS 591 – 596)	Kaninchen	1:2500 in 3% BSA/TBST	D. Schenk, Elan Pharmaceuticals (201)
26D6	APP (AS 597-608)	Maus	1:3000 in TBST	E.H. Koo, University of California San Diego California (291)
IC16	APP (AS 597-612)	Maus	1:500 in TBST	
BAP-24	Human A β 40	Mouse	Monoclonal	K.-H. Baumann, Roche, Basel (292)
BAP-15	Human A β 42	Mouse	Monoclonal	K.-H. Baumann, Roche, Basel (292)
9E10	c-myc (AS 410 – 419)	Maus	1:1000 in TBST	ATCC: CRL-1729
1704	LRP1 (AS 4530 – 4544)	Kaninchen	1:10000 in 5% Milch/ TBST	C.U. Pietrzik, Johannes- Gutenberg Universität Mainz (284)

Sekundäre HRP-gekoppelte Antikörper				
Bezeichnung	Antigen	Wirt	WB	Bezugsquelle
Anti- Kaninchen- HRP	Kaninchen IgG	Ziege	1:10000 in 5% Milch/TBST	Jackson Lab, Maine, USA
Anti-Maus- HRP	Maus IgG	Ziege	1:10000 in 5% Milch/TBST	Jackson Lab, Maine, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Standardverfahren zur Amplifizierung von beliebigen Nukleinsäureabschnitten. Eine thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert hierbei einen DNA-Abschnitt, der durch zwei Oligonukleotide, so genannten Primern, genau festgelegt ist. Während der PCR wird die DNA durch thermisches Erhitzen denaturiert und durch anschließendes Abkühlen binden die Primer an jeweils einen Einzelstrang der Nukleinsäure. Der entstehende kurze Abschnitt doppelsträngiger DNA ist sowohl Voraussetzung als auch Startpunkt der Synthese des neuen DNA Stranges. Im Laufe der Verlängerung der Primer (Extension) bei 72°C, dem Aktivitätsoptimum der DNA-Polymerase, werden passende Nukleotide an das freie 3'-OH Ende des Primers angefügt. Durch mehrfache Wiederholung der Denaturierung, Primeranlagerung und Primerextension können genau bestimmte DNA-Abschnitte exponentiell amplifiziert werden.

Zur Klonierung von cDNA Abschnitten wurde die PCR im Rahmen dieser Arbeit zur Amplifikation und Modifikation verwendet. Die PCR Protokolle unterscheiden sich auf Grund des DNA Templates, der Primersequenz, der Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden DNA Fragments. Spezifische Oligonukleotide wurden entworfen und von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Um die Wahrscheinlichkeit eines fehlerhaften Einbaus von Nukleotiden zu reduzieren, wurde die PhusionTM High Fidelity DNA Polymerase der Firma NEB (Frankfurt) verwendet. Neben einer 5'-3'-DNA Polymerase besitzt die Phusion Polymerase auch eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, welche die Proofreading-Funktion übernimmt. Für Test-PCRs und Kolonie-PCRs wurde die Taq Polymerase der Firma NEB (Frankfurt) eingesetzt, die keine Proofreading-Aktivität hat.

Reaktionsansatz: 10 µl 5x Phusion HF Puffer
 100-500 ng cDNA Template
 0,25 µl (500 nM) Primer fwd (Stock: 100 µM)
 0,25 µl (500 nM) Primer rev (Stock: 100 µM)
 1 µl (200 µM) dNTP-Mix (Stock: je 10mM)
 0,5 µl Phusion
 Mit H₂O_{dd} auf 50 µl aufgefüllt.

Die Reaktionsansätze wurden gemischt, dicht verschlossen und die PCR im Thermocycler durchgeführt. Das hier angegebene PCR Programm wurde zur Amplifikation der cDNA von APP verwendet.

PCR Programm:	Denaturierung:	98°C	30 s	} 30 Zyklen
	Denaturierung:	98°C	10 s	
	Annealing:	60°C	30 s	
	Elongation:	72°C	240 s	
	Schlussverlängerung:	72°C	240 s	
	Lagerung:	4°C	∞	

Die PCR wurde anschließend über ein 0,8 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt (2.2.1.4) und das amplifizierte DNA-Fragment mittels Gelextraktion aus dem Gel eluiert (2.2.1.5). Nach anschließendem Restriktionsverdau (2.2.1.6) und erneuter Aufreinigung (2.2.1.5) wurde das DNA-Fragment in einen Expressionsvektor kloniert (2.2.1.8).

2.2.1.2 Mutagenese

Zum Austausch einer oder mehrerer Basen oder für Deletionen eines oder mehrerer Codons innerhalb eines Vektors bzw. cDNA-Abschnittes wurde entweder die *QuickChange® site-directed mutagenesis* oder die *Two-Step PCR Mutagenesis* verwendet.

2.2.1.2.1 QuickChange® site-directed mutagenesis

Das *QuickChange XL site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) wurde zum gezielten Einfügen von Punktmutationen verwendet. Die Methode beruht auf einem doppelsträngigen Vektor, in den die Modifikation eingefügt werden soll, und zwei synthetischen Oligonukleotidprimern. Das Primer-Paar ist komplementär zueinander und enthält in der Mitte die gewünschte Mutation. Die beiden Plasmid-Stränge werden anschließend durch die Nutzung der *PfuTurbo* DNA-Polymerase in der PCR mit höchster Genauigkeit repliziert, so dass durch den Einbau der beiden Primer ein mutiertes Plasmid mit versetzten Bruchstellen in den beiden Einzelsträngen entsteht. Dpn I, eine spezifische Endonuklease für methylierte bzw. hemimethylierte DNA, erkennt und verdaut DNA, die aus fast allen *E. coli* Stämmen isoliert wurde. Durch die anschließende Behandlung des PCR-Ansatzes mit Dpn I wird der parentale, nicht mutierte DNA-Strang abgebaut und der mutierte, neu synthetisierte Strang selektiert. Nach der Transformation in superkompetente *E. coli* XL10-Gold Bakterien wird die doppelsträngige, mit versetzten Bruchstellen versehene Vektor-DNA enzymatisch repariert und die Zellen auf Ampicillin-Platten selektioniert. Die Mutagenese wurde gemäß dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll durchgeführt.

2.2.1.2.2 Two-Step PCR Mutagenesis

Die *Two-Step PCR Mutagenesis* wurde zum Austausch von Basen und zur Deletion von Codons verwendet. Dabei wurde nicht das gesamte Plasmid repliziert, sondern ähnlich einer Standard-PCR ein mutiertes DNA-Fragment generiert, welches an den Enden mit Restriktionschnittstellen versehen wurde. Nach anschließendem Verdau (2.2.1.6) wurde das Insert in einen linearisierten Vektor ligiert (2.2.1.8). Dazu wurden ein innerhalb und ein an den Enden des zu amplifizierenden DNA Stückes bindendes Primerpaar verwendet. Das innere Primerpaar war sowohl komplementär zueinander als auch zu dem jeweils entgegengesetzten Strang des eingesetzten Vektors. Für den Entwurf der beiden inneren Primer war es essentiell, dass sich die einzufügende Mutation in der Mitte des Primers befand und diese von 10-15 zum Matrizenstrang komplementären Nukleotiden flankiert wurde. Durch drei PCR-Reaktionen wurde das mutierte Insert hergestellt. In zwei primären PCR Reaktionen wurden der 5' bzw. der 3' zur Mutation liegende Abschnitt mit jeweils einem der äußeren und einem der inneren Primer amplifiziert, so dass die beiden entstandenen Fragmente auf Grund der inneren Primer einen überlappenden, die Mutation-enthaltenden Sequenzabschnitt besaßen. Diese beiden PCR-Fragmente wurden in einer dritten PCR mit den beiden äußeren Primern eingesetzt. Diese PCR resultierte in dem vollständigen Insert-Fragment inklusive der eingefügten Mutation.

2.2.1.3 Kolonie-PCR

Nach der Ligation der cDNA Fragmente in einen Expressionsvektor und anschließender Transformation des Ligationsgemisches in *E. coli* DH5 α eignet sich die Kolonie-PCR zur schnellen Untersuchung einer großen Anzahl an Bakterien auf den richtigen und vollständigen Einbau des Inserts in den Expressionvektor. Dazu wurde ein PCR-Master-Mix für die Anzahl der zu untersuchenden Kolonien, eine Negativkontrolle (keine Kolonie) und eine Positivkontrolle (das eingesetzte cDNA Plasmid) angesetzt und je 20 μ l des Ansatzes in PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde je eine Kolonie von der Transformationsplatte aufgenommen und durch Eintauchen und kurzes Drehen in den PCR-Mix überführt. Anschließend wurde zur Sicherung der Kolonie die Pipettenspitze auf einer frischen Agaroseplatte mit Selektionsantibiotikum abgestrichen. Zum Nachwachsen der Kolonie wurde die Platte über Nacht in den Bakterieninkubator bei 37°C gestellt. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und die PCR im Thermocycler durchgeführt. Nach Beendigung des Laufes wurde die PCR mittels qualitativer Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.4) auf das entsprechende PCR-Produkt untersucht.

PCR-Master-Mix:

	für eine PCR	für 10 PCR's	Endkonzentration
10x ThermoPol Puffer	2 µl	20 µl	1 x
eine Kolonie als Template			
Primer fwd (Stock: 100 µM)	0,1 µl	1 µl	0,5 µM
Primer rev (Stock: 100 µM)	0,1 µl	1 µl	0,5 µM
dNTP-Mix (Stock: je 10 mM)	0,4 µl	4 µl	200µM
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,04 µl	0,4 µl	
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt auf	20 µl	200 µl	

PCR Programm zur Selektion positiver Kolonien der APP Klonierungen:

Denaturierung:	94°C	3 min	} 30 Zyklen
Denaturierung:	94°C	45 s	
Annealing:	58°C	30 s	
Elongation:	72°C	240 s	
Schlussverlängerung:	72°C	240 s	
Lagerung:	4°C	∞	

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen von Plasmiden oder PCR-Fragmenten wurde die präparative Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen, die Untersuchung der Kolonie-PCR-Ansätze und die qualitative Analyse der Kontrollrestriktionen der Klonierungen wurden mit analytischen Gelen durchgeführt. Bei präparativen Gelen wurden größere Probenvolumina eingesetzt (50 µl) als bei analytischen Gelen (20 µl), so dass sich die beiden Systeme in der Taschengröße der Gele und bei sehr großen Probenvolumina auch in der Geldicke unterschieden. Je nach Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente wurden 0,5% (>4 kDa), 0,8% (0,5 – 4 kDa) und 1,5%ige (<1 kDa) Gelsysteme verwendet.

Unter regelmäßigem Schütteln wurde die abgewogene Agarose durch Erhitzen in der Mikrowelle in 1x TAE gelöst. Anschließend wurde der bis auf 60°C abgekühlten Agarose 1/50000 der Ethidiumbromidstammllösung zugesetzt. Nach kurzem Mischen wurde die flüssige Agarose in den vorbereiteten Gelträger gegossen und der entsprechende Probetaschenkamm eingesetzt. Nach dem Erstarren des Agarosegels wurde der Probenkamm entfernt und das Gel in die mit 1x TAE gefüllte Laufkammer gestellt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 1/10 Probenvolumen OrangeG Ladepuffer versetzt, gemischt und dann vorsichtig in die Probetaschen pipettiert. 0,7 µl des 1 kDa Größenmarkers der Firma NEB (Frankfurt) wurden zusätzlich als DNA-Standard bei Fragmenten mit

einer Länge größer als 1 kDa aufgetragen, während 0,7 µl des 2-log Standards für kleinere Stücke benutzt wurden.

Die DNA-Fragmente wurden anschließend bei 100 V solange aufgetrennt, bis die OrangeG-Lauffront ca. 2/3 des Gels durchwandert hatte. OrangeG läuft bei einer Größe von ungefähr 50 bp und wurde daher als Lauffront bezeichnet. Das im Agarosegel vorhandene Ethidiumbromid interkalierte während des Laufes in die DNA, so dass diese unmittelbar nach dem Lauf sichtbar gemacht werden konnte. Zum Schutze vor Schädigungen der DNA durch UV-Licht wurden präparative Gele mit einer Schwarzlichtlampe untersucht. Qualitative Gele wurden dagegen mittels UV-Licht auf einer Agarosegeldokumentationseinheit dokumentiert.

10x TAE	
0,4 M Tris (M 121,14)	48,46 g/l
0,01 M EDTA*Na ₂ *2H ₂ O (M 372,24)	3,72 g/l
11,4% v/v ~ 0,2 M Eisessig (Acetic Acid)	11,42 ml/l
Zur Herstellung des 1x TAE Laufpuffers wurde die Stammlösung 1:10 mit H ₂ O _{dd} verdünnt.	

Ethidiumbromidstammlösung	
1% w/v Ethidiumbromid (EtBr)	10 mg/ml
In H ₂ O _{dd} gelöst.	

10x OrangeG Stammlösung	
20 % (w/v) Ficoll 400	2 g/10ml
0,25 % OrangeG	0,025 g/10ml
In H ₂ O _{dd} gelöst.	

2.2.1.5 Elution von DNA aus präparativen Agarosegelen

Die DNA-Fragmente des präparativen Gels wurden mit Schwarzlicht sichtbar gemacht und die gewünschte Bande mit einer Rasierklinge herausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) nach den Vorgaben des Herstellers eluiert. Nach dem Schmelzen des Gels in 750 µl Puffer QG bei 50°C wurde die Lösung auf Eis gekühlt, um die Affinität der DNA zur Silica-Membran zu erhöhen. Nach der Zugabe von 250 µl Isopropanol wurde die Lösung über die Säule gegeben. Nach dem Waschen mit 600 µl Puffer PE und anschließender Trocknung wurde die DNA nach 5 min Inkubation mit 32 µl des auf 70°C erhitzten TE Puffers eluiert.

2.2.1.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen zerschneiden DNA an enzymespezifischen, palindromischen Sequenzen, die eine Länge von 4, 6 oder 8 bp haben. Durch diesen Verdau entstehen DNA-Fragmente mit „klebrigen“ („sticky“) bzw. „stumpfen“ („blunt“) Enden. Um ein DNA-Insert gerichtet in einen Zielvektor

einzubauen, wurde sowohl das Insert als auch der Vektor durch zwei unterschiedliche Restriktionsendonukleasen, die beide „klebrige“ Enden erzeugten, verdaut. Die dabei entstehenden überhängenden, einzelsträngigen und komplementären DNA-Enden des Inserts und des Vektors wurden anschließend durch Ligation (2.2.1.8) miteinander verbunden.

Dazu wurden 4 µg Plasmid-DNA bzw. das PCR-Produkt-Geleluat bei optimalen Pufferbedingungen der beiden Enzyme und dem Zusatz einer Proteinphase, BSA, in einem Endvolumen von 50 µl über Nacht bei 37°C vollständig verdaut. Anschließend wurde der Restriktionsansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.4) aufgetrennt und das gesuchte DNA-Fragment aus dem Gel aufgereingt (2.2.1.5).

Zur analytischen Untersuchung wurden entsprechend 1 µg Plasmid-DNA für 2-3 Std. bei 37°C in einem 30 µl Ansatz verdaut (2.2.1.6) und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und dokumentiert (2.2.1.4).

Präparativer Verdau:	DNA	4 µg
	Restriktionsenzym 1	1 µl
	Restriktionsenzym 2	1 µl
	10x Puffer	5 µl
	100x BSA	0,5 µl

Auf 50 µl mit H₂O_{dd} aufgefüllt.

Analytischer Verdau:	DNA	1 µg
	Restriktionsenzym 1	0,25 µl
	Restriktionsenzym 2	0,25 µl
	10x Puffer	3 µl
	100x BSA	0,3 µl

Auf 30 µl mit H₂O_{dd} aufgefüllt.

2.2.1.7 Dephosphorylierung von DNA

Um die intramolekulare Re-Ligation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen durch die antarktische Phosphatase entfernt. Nach dem Verdau konnte die antarktische Phosphatase (NEB, Frankfurt) durch Zusatz von 1/10 Volumen des spezifischen 10x Reaktionspuffers direkt im Restriktionsansatz verwendet werden. Nach der Dephosphorylierung bei 37°C für 1 Std. konnte das Enzym gegebenenfalls bei 65°C für 5 min hitzeinaktiviert werden. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) extrahiert (2.2.1.5).

Zum Beispiel:	Restriktionsansatz	50 µl
	10x Antarktischer Phosphatase Reaktionspuffer	6 µl
	Antarktische Phosphatase	1 µl
	H ₂ O _{dd}	3 µl

2.2.1.8 Ligation

Der Einbau des mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen DNA-Fragmentes in einen zuvor linearisierten und dephosphorylierten Vektor erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Die T4-DNA-Ligase knüpft eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxylende des einen Nukleotides mit dem 5'-Phosphatende des anderen Nukleotides. An Hand eines Agarosegels, auf welchem 2 µl des Vektor- und des Inserteluates analysiert wurden, wurden die einzusetzenden Volumina so bestimmt, dass das eingesetzte molare Verhältnis des Inserts zum Vektor 3:1 betrug. Parallel wurde eine Ligation des Vektors ohne Zusatz des Inserts als Religationskontrolle durchgeführt. Die Ligation wurde in einem 20 µl Ansatz bei RT (~18°C) über Nacht durchgeführt. 10 µl eines jeden Ligationsansatzes wurden zur Transformation von kompetenten *E. coli* DH5a eingesetzt (2.2.2.3).

Ligationsansatz:	10x Ligase-Puffer	2 µl
	Plasmid DNA	x µl
	Insert DNA	x µl
	T4-DNA-Ligase	0,5 µl

Auf 20 µl mit H₂O_{dd} aufgefüllt.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Bakterienanzucht

Einzelkolonien der *E. coli* Bakterien wurden sowohl zur Plasmidpräparation im kleinen Ansatz (Mini-Präp) als auch im großen Ansatz (Maxi-Präp) in LB-Medium inokuliert und bei 37°C und 200 U/min über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert. Als Selektionsantibiotikum wurde bei Bedarf Ampicillin in einer Konzentration von 40 µg/ml zugesetzt.

1000x Ampicillin	
40 mg/ml Ampicillin	400 mg / 10 ml
In H ₂ O _{dd} gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.	

LB Medium	
1% w/v Trypton	10 g/l
0,5% w/v Yeast Extrakt	5 g/l
1% Natriumchlorid (NaCl, M 58,44)	10 g/l
Alle Inhaltsstoffe wurden in Lösung gebracht und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Anschließend wurde das LB-Medium abgefüllt und 20 min bei 121°C autoklaviert.	

LB Agar Platten	
1% w/v Trypton	10 g/l
0,5% w/v Yeast Extrakt	5 g/l
1% Natriumchlorid (NaCl, M 58,44)	10 g/l
1,5% Bacto-Agar	15 g/l
Alle Zutaten wurden gerührt und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Anschließend wurde das LB-Medium abgefüllt und 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf unter 60°C wurde wahlweise Ampicillin 1:1000 hinzugefügt und 15 ml Medium in sterile 10 cm Bakterienschalen gegossen.	

2.2.2.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Bakterien

Chemisch-kompetente Bakterien wurden dem Hanahan-Protokoll folgend hergestellt (293). Dabei wurde eine Einzelkolonie *E.coli* DH5 α über Nacht in 5 ml LB-Medium bei 37°C und 200 U/min kultiviert. Nach dem Umimpfen von einem Milliliter der Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium in einem 1 L Schüttelkolben wurde die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Bakterien wurden daraufhin bei 5000 U/min und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis und wenn möglich im Kühlraum durchgeführt. Der Überstand wurde abgegossen und die restliche Flüssigkeit mit einer Pipette abgesaugt. Das Pellet wurde in 33,2 ml kaltem RF1-Puffer mit einer 10 ml Pipette vorsichtig resuspendiert und für eine Stunde im Eisbad im Kühlraum inkubiert. Das anschließend durch 10minütige Zentrifugation bei 5000 U/min und 4°C erhaltene Pellet wurde in 8 ml kaltem RF2-Puffer vorsichtig resuspendiert und für 15 min im Eisbad im Kühlraum inkubiert. Je 50 μ l der chemisch-kompetenten Bakterien wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen, die bei -80°C vorgekühlt wurden, aliquotiert, umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden 0,1 ng des Vektors pcDNA3.1 A+ in die Bakterien mittels Hitzeschocks transformiert. Die Effizienz wurde in Kolonien pro μ g DNA (colony forming units, cfu) angegeben, wobei 500 Kolonien nach der Transformation von 0,1 ng einer Transformationsrate von 5×10^6 cfu/ μ g entsprechen. Chemisch-kompetente Bakterien, die eine Transformationseffizienz höher als 5×10^6 cfu/ μ g hatten, wurden bei allen weiteren Experimenten benutzt.

RF1	Pro Liter
100 mM Rubidiumchlorid (RbCl, M 120,9)	12,1 g
50 mM Manganchlorid (MnCl ₂ , M 197,9)	9,895 g
30 mM Kaliumacetat (CH ₃ COOK, M 98,14)	2,944 g
10 mM Calciumchlorid (CaCl ₂ , M 147,01)	1,47 g
15% w/v Glycerol	150 g
pH auf 5,8 eingestellt und anschließend sterilfiltriert.	

RF2	Pro 500 ml
10 mM MOPS (M 209,3)	1,05 g
10 mM Rubidiumchlorid (RbCl, M 120,9)	0,6 g
75 mM Calciumchlorid (CaCl ₂ , M 147,01)	5,51 g
15% w/v Glycerol	75g
pH auf 6,8 eingestellt und anschließend sterilfiltriert.	

2.2.2.3 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Zur Transformation von Vektor-DNA wurden 50 µl Aliquots der kompetenten *E. coli* DH5α (2.2.2.2) auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA bzw. 10 µl Ligationsansatz vermischt und für 20 Min. auf Eis inkubiert. Durch einen einminütigen Hitzeschock bei 42°C und anschließender zweiminütiger Inkubation auf Eis wurde die Aufnahme der DNA in die Bakterien ermöglicht. Zur Erholung der Zellen wurde der Transformationsansatz mit 700 µl auf 42°C vorgewärmtem LB-Medium versetzt und für 1 Std. bei 37°C und 200 U/min inkubiert. 100 µl der Plasmid-DNA-Transformation wurden direkt auf Ampicillin enthaltende LB-Agar-Platten ausplattiert. Dagegen wurden die Zellen der Ligationsansatz-Transformation nach kurzer Abzentrifugation bei 10000 U/min in 100 µl LB Medium resuspendiert und anschließend ausgestrichen. Die Platten wurden für 16-24 Std. bei 37°C inkubiert.

2.2.2.4 Kryokonservierung von Bakterien

Zur dauerhaften Lagerung der Bakterienstämme wurden 600 µl einer frisch angezogenen und durchgewachsenen LB-Medium-Kultur mit 400 µl Glycerol in einem Cryogefäß gemischt und anschließend bei -80°C eingefroren und gelagert. Zur erneuten Anzuchtung des Bakterienstammes wurden mit einer sterilen Pipettenspitze einige Zellen von der Oberfläche gekratzt und direkt in Antibiotikum enthaltendes LB-Medium inokuliert.

2.2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

In den meisten kommerziell erhältlichen DNA-Extraktions-Kits wird eine Kombination aus alkalischer Lyse (294) und anschließender Bindung der DNA an eine Silicamembran durchgeführt. Dabei werden nach der alkalischen Lyse Proteine, chromosomale DNA und Zellfragmente durch die Neutralisation des pH-Wertes und die Erhöhung der Salzkonzentration gefällt. Zudem wird die Affinität der DNA zur Silicmembran durch die hohe Salzkonzentration erhöht. Nach der Entfernung der Präzipitate wird die Plasmid-DNA spezifisch an eine Silica-Membran gebunden. Verbleibende Verunreinigungen wie RNA, Proteine und andere Metabolite werden anschließend durch Waschschrte vollständig entfernt. Nach der Elution der Plasmid-DNA bei niedriger Salzkonzentration ist diese direkt für weitere Versuche einsetzbar.

Zur Aufreinigung größerer Mengen an Plasmid-DNA („Maxi-Präp“) wurden 330 ml Bakterienkultur über Nacht gezüchtet. Zur Isolation der Plasmid-DNA wurde das JETstar Plasmid Purification System der Firma Genomed (Löhne) verwendet. Kleinere Mengen Plasmid-DNA („Mini-Präp“) wurden aus 3 ml einer Übernachtskultur mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kits der Firma Macherey-Nagel (Düren) aufgereingt. Beide Kits enthielten alle notwendigen Puffer und Lösungen. Die DNA-Extraktion wurde den Vorgaben des Herstellers entsprechend durchgeführt.

2.2.2.6 DNA-Sequenzanalyse

Zur Verifizierung wurden alle hergestellten DNA-Konstrukte am Institut für Immunologie und Genetik der Universität Kaiserslautern sequenziert. Die Sequenzrohdaten wurden mit dem Programm *FinchTV* (Geospiza, Seattle, WA) editiert und die ermittelte mit der gewünschten Sequenz mit dem Programm *Clone Manager 7* (Sci Ed Software, NC) verglichen.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Routinemäßige Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen in Laboratorien der Sicherheitsstufe 1 und 2 durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden sämtliche Zellkulturwaren separat von Laborwaren aufbewahrt, gewaschen und autoklaviert. Bei den verwendeten Zellkulturschalen und -platten, 1,5 ml, 15 ml und 50 ml Reaktionsgefäßen, Spritzen und Kanülen sowie Sterilfiltern handelte es sich um Einwegplastikwaren für die Zellkultur („*cell culture qualified*“). Soweit nicht anders vom Hersteller empfohlen, wurden alle Lösungen und Medien bei 4°C gelagert.

2.2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Die adhärent wachsenden HEK293T und CHO-KI Zellen wurden routinemäßig in 10 cm Kulturschalen bei 37°C, 5 % CO₂ und Feuchtigkeitsättigung in einem Brutschrank kultiviert. Die zur Teilung der Zellen benötigten Medien, 1x PBS und 1x Trypsin-EDTA wurden vor der Benutzung in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die konfluenten Zellen wurden mit 10 ml 1x PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml 1x Trypsin-EDTA für einige Minuten von der Platte gelöst. Die Zellen wurden in 9 ml Medium aufgenommen, für 4 min bei 1200 U/min pelletiert und anschließend in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Um die Zellen 1:10 zu verdünnen, wurden 7 ml frisches Medium mit einem ml der Einzelzellsuspension vermischt und in eine neue 10 cm Kulturschale gegeben. Wurden die Zellen in größeren oder kleineren Platten kultiviert, wurden die Mengen entsprechend angepasst.

DMEM complete	
DMEM (+ 4.5 g/l Glukose, + L-Glutamin, - Na-Pyruvat)	500 ml
10 % FBS	50 ml
1 % Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin / 10000 µg/ml Streptomycin)	5 ml
1 mM Na-Pyruvat	5 ml

α-MEM complete	
α-MEM	500 ml
10 % FBS	50 ml
1 % Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin/10000 µg/ml Streptomycin)	5 ml
1 mM Na-Pyruvat	5 ml

1x Trypsin-EDTA	
10x Trypsin-EDTA	5 ml
Mit 1x PBS auf 50 ml aufgefüllt.	

10x PBS	
1,4 M Natriumchlorid (NaCl, M 58,44)	81,816 g/l
27 mM Kaliumchlorid (KCl, M 74,55)	2,01 g/l
100 mM Dinatriumhydrogenphosphat, Anhydrat (Na ₂ HPO ₄ , M 141,96)	14,186 g/l
17,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat, (KH ₂ PO ₄ , M 136,1)	2,381 g/l
Der pH wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt und das PBS autoklaviert.	

2.2.3.2 Zellzählung

Zur Aussaat einer gleichmäßigen Zellmenge der verschiedenen stabilen Zelllinien wurde die Zellzahl nach der Resuspendierung in frischem Medium (2.2.3.1) mittels Neubauer Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellmenge anschließend ausgesät.

2.2.3.3 Kryokonservierung von Zellen

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurde das Einfriermedium immer unmittelbar vor der Benutzung frisch angesetzt. Die einzufrierenden Zellen wurden in 10 cm Schalen bis zur Konfluenz gezüchtet und anschließend trypsiniert, in frischem Medium aufgenommen und abzentrifugiert (2.2.3.1). Das Pellet wurde anschließend in 2 ml Einfriermedium resuspendiert und in zwei Kryovials aliquotiert. Die Dauerkulturen wurden unmittelbar bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C schnellstmöglich aufgetaut, in 9 ml warmem Medium aufgenommen und anschließend in einem 15 ml Reaktionsröhrchen für 4 min bei 800 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 8 ml warmem Medium aufgenommen, in eine 10 cm Schale überführt und anschließend in einem Inkubator inkubiert.

Einfriermedium	
90 % (v/v) DMEM complete bzw. α -MEM complete	9 ml
10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 ml

2.2.3.4 *Transiente Transfektionen*

Zur transienten Expression von Proteinen in Zelllinien wurde sowohl die Calciumphosphat-Präzipitation als auch lipidbasierte Transfektionsmethoden verwendet. Das optimale Transfektionsverfahren wurde individuell für jede Zelllinie ermittelt. Während beide Techniken hohe Transfektionsraten bei allen HEK 293T Zelllinien erzielten, konnten CHO-KI Zellen nur mit der Lipid-vermittelten Methode effizient transfiziert werden.

2.2.3.4.1 Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation

Bei der Calciumphosphat-Präzipitation (295) wird DNA mit Calciumchlorid und einem Phosphatpuffer gemischt. Die sich dabei bildenden, feinen DNA-Calciumphosphat-Kristalle setzen sich auf der Zelloberfläche ab und werden anschließend durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Zur Transfektion wurden am Vortag ausgesäten HEK 293T bzw. GP2 293 Zellen mit einer Dichte von 40-50% eingesetzt. Zur Herstellung des Transfektionsansatzes eines 6-wells (einer 10 cm Platte) wurden 2 μ g (15 μ g) DNA in 75 μ l (450 μ l) H_2O_{dd} gelöst und mit 8,3 μ l (50 μ l) einer 2,5 M $CaCl_2$ Lösung versetzt. Anschließend wurden 83 μ l (500 μ l) 2x HEPES-Puffer hinzugegeben, die Lösung kurz gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Eine leichte Trübung bildete sich innerhalb weniger Minuten. Der Transfektionsansatz wurde anschließend vorsichtig im Zellkulturmedium verteilt und die Schale in den Inkubator gestellt. Durch einen Mediumwechsel wurden nach 4-6 stündiger Inkubation die Präzipitate entfernt. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium zur Gewinnung des konditionierten Mediums nochmals gewechselt. Nach weiteren 24 Std. wurde das Medium eingesammelt und die Zellen lysiert (2.2.4.2).

2,5 M Calciumchlorid-Lösung	
2,5 M Calciumchlorid ($CaCl_2$, M 147,02)	3,67 g
Mit H_2O_{dd} auf 10 ml aufgefüllt und sterilfiltriert.	

2x HEPES-Buffer	
50 mM HEPES (M 238,3)	5,96 g
280 mM Natriumchlorid ($NaCl$, M 58,44)	8,18 g
1,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat, Anhydrat (Na_2HPO_4 , M 141,96)	0,106 g
In 450 ml H_2O_{dd} gelöst und den pH auf pH 7,1 eingestellt. Es ist entscheidend, dass der pH im Bereich von 7,1 +/- 0,05 liegt. Anschließend auf 500 ml aufgefüllt. Sterilfiltriert.	

2.2.3.4.2 Lipidbasierte transiente Transfektion

Der Transfer der DNA in die Zelle erfolgt bei der lipidbasierten Transfektionsmethode durch einen Komplex aus DNA und dem Multikomponententransfektionsreagenz FugeneTM6 (Roche, Mannheim). Wie bei der Calciumphosphat-Transfektion wurden 24 Std. vor der Transfektion ausgesäte Zellen mit einer Konfluenz von ca. 30-40 % eingesetzt. Die Transfektion erfolgte gemäß dem vom Hersteller angegebenen Protokoll. Bei allen Transfektionen wurde ein FugeneTM6 zu DNA Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Um einen Kontakt des Transfektionsreagenz mit der Plastikoberfläche des 1,5 ml Reaktionsgefäßes zu verhindern, wurden zur Transfektion von 6-well Platten pro well 100 µl OptiMEM vorgelegt. Direkt in das Medium wurden 6 µl FugeneTM6 pipettiert und durch kurzes Antippen gemischt. Anschließend wurden 2 µg DNA hinzugefügt und wiederum gemischt. Nach einer 20 minütigen Inkubationszeit wurde der DNA-Transfektionsreagenz-Komplex tröpfchenweise und gleichmäßig auf dem Zellkulturmedium verteilt. Zur Herstellung eines 24 Std. Überstandes wurde das Medium am folgenden Tag gewechselt. Nach weiteren 24 Std. wurde das Medium eingesammelt und die Zellen lysiert (2.2.4.2).

2.2.3.5 *Herstellung stabiler Zelllinien*

2.2.3.5.1 Killing curves

Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurde zuerst die zur Selektion benötigte Konzentration des verwendeten Antibiotikums ermittelt. Dazu wurden die zu transfizierenden Zellen 1:10 in 6-wells gesplittet und zur Adhäsion an den Boden für wenige Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antibiotikums behandelt. Zur Bestimmung der Konzentration des Antibiotikums Hygromycin wurden 50 µg/ml bis 400 µg/ml dem Medium zugesetzt. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und frisches Antibiotikum hinzugefügt. Das Absterben der Zellen wurde regelmäßig beobachtet und die Konzentration, bei der alle Zellen abgestorben waren, bestimmt. Sowohl 293T als auch CHOKI Zellen waren bei ungefähr 250 µg/ml Hygromycin vollständig abgestorben. In anfänglichen Experimenten wurden daher 250 µg/ml Hygromycin zur Selektion von stabilen Zellen verwendet. Zum Vergleich verschiedener Mutationen mussten mehrere Zelllinien mit gleicher Expression hergestellt werden. Nach unserer Erfahrung lässt sich eine gleichmäßige und hohe Expression durch die Verwendung einer niedrigeren Konzentration erreichen. Daher wurden die stabilen Zellen durch 50-70 % des ermittelten Wertes, bei Hygromycin 150 µg/ml, selektioniert.

2.2.3.6 Herstellung von retroviralen Partikeln

Alle Arbeiten mit retroviralen Partikeln wurden in Laboratorien der Sicherheitsstufe 2 unter entsprechenden Vorkehrungen durchgeführt. Alle Arbeiten wurden an Sicherheitsstufe 2 geeigneten und mit Biohazard-Warnhinweisen gekennzeichneten Sterilbänken durchgeführt. Dabei wurden Kittel, Gesichtsschutz, Armstulpen und doppelte Handschuhe getragen. Zur Verhinderung von Kontaminationen wurden nur Plastik-Einmalwaren verwendet. Potentiell infektiöser Müll wurde vor der Entsorgung mit Ultrasol®F (Fresenius Kabi, Bad Homburg) desinfiziert. Alle scharfkantigen Materialien wurden mit Vorsicht verwendet und in speziellen Sicherheitscontainern gesammelt. Sowohl der Fest- als auch der Flüssigmüll wurden regelmäßig durch Autoklavieren dekontaminiert.

Für den stabilen und vererbaren Einbau von genetischem Material in das Genom von sich teilenden Zellen wurde retroviraler Gentransfer verwendet (296, 297). Die Technik beruht auf der Verwendung der Verpackungszelllinie GP2-293, welche die viralen *gag* und *pol* Gene stabil exprimiert, dem Vektor pVSV-G, welcher das Virushüllen Glykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) kodiert und dem retroviralen Expressionsvektor pLHCX. *Gag*, *Pol* und *VSV-G* sind für Bildung und die Replikation des Virus nötig. Durch die Transfektion des pVSV-G und des retroviralen Expressionsvektors in die Verpackungszelllinie werden auf Grund der separaten Integration der Gene infektiöse, aber replikationsinkompetente retrovirale Partikel gebildet, wodurch die Sicherheit bei der Verwendung retroviraler Partikel erhöht wird. Da das Hüllenprotein VSV-G den Viruseintritt in die Zellen durch Lipidbindung und Fusion mit der Plasmamembran vermittelt (298), können mit diesen pantropischen retroviralen Partikeln sowohl Säugetier- als auch Nicht-Säugetierzellen infiziert werden. Zur Herstellung der retroviralen Partikel wurden 10 cm Schalen für mindestens eine Stunde mit Poly-L-Lysin (5 µg/ml in sterilem H₂O_{dd}) beschichtet, zweimal mit 5 ml sterilem H₂O_{dd} gewaschen und anschließend getrocknet. Konfluente GP2-293 Zellen wurden 1:5 auf die frisch beschichteten Platten gesplittet, so dass sie am nächsten Tag eine ca. 80%ige Konfluenz erreichten. Die Zellen wurden anschließend mit 10 µg pVSV-G und 10 µg des Expressionsvektors pLHCX mittels Calciumphosphat-Methode (2.2.3.4.1) transfiziert. Das die Präzipitate enthaltende Medium wurde nach 4-6 Std. abgesaugt und durch 8 ml frisches Medium ersetzt. 48 Std. nach der Transfektion wurde das Medium durch 5 ml frisches Medium erneuert und die retroviralen Partikel für weitere 24 Std. in dem Medium gesammelt. Parallel wurden 200000 Zellen der zu transfizierenden CHOKI bzw. 293T Zellen pro 6-well ausgesät und über Nacht inkubiert. Das konditionierte, viruspartikelhaltige Medium wurde eingesammelt und sterilfiltriert. Anschließend wurde 1 ml frisches Medium mit 1 ml sterilfiltriertem, retrovirale Partikel enthaltendem Medium gemischt und 4 µl Polybrene (5 mg/ml in sterilem H₂O_{dd}) hinzugefügt. Polybrene ist ein Polykation, das die Ladungsabstoßung zwischen Virus und Zellmembran reduziert. Das Medium der zu transfizierenden Zellen wurde durch das retrovirale Partikel-Polybrene-Medium ersetzt. Die Zellen wurden für 24 Std. inkubiert und anschließend das

Medium gewechselt. Am folgenden Tag wurden die Zellen 1:40 in 10 cm Schalen gesplittet und in Selektion (150 µg/ml Hygromycin für CHOKI und 293T Zellen) genommen. Das Antibiotika enthaltende Medium wurde anschließend alle zwei Tage erneuert und das Wachstum der Zellen mit einer nicht-transfizierten Kontrollplatte verglichen. Nachdem die Zellen unter Selektion mehrfach gesplittet worden waren, wurden die Zellen auf die Expression des erwünschten Zielproteins untersucht und nach erfolgreichem Nachweis zur Konservierung weggefroren. Alle in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten stabilen Zelllinien wurden ohne Subklonierung als gemischte Kulturen verwendet, um klonale Effekte zu vermeiden.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 *Herstellung von konditioniertem Medium*

Zur Untersuchung sezernierter Proteine wie APPs oder A β wurde konditionierter Zellkulturüberstand eingesammelt. Das Medium wurde 48 Std. nach der Aussaat der Zellen auf 60 mm Zellkulturplatten abgesaugt und durch 4 ml frisches Medium ersetzt. Am nächsten Tag wurden die konfluenten Zellkulturplatten aus dem Inkubator genommen und auf Eis gestellt. Das 24 Std. Medium wurde abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 14000 U/min bei 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 *Proteinextraktion*

Zur Untersuchung intrazellulärer Proteine wurden Zelllysate hergestellt. Dazu wurden konfluente 60 mm Zellkulturplatten aus dem Inkubator genommen und direkt auf Eis gestellt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 4 ml eiskaltem PBS wurde 1,5 ml eiskaltes 1 x PBS auf die Zellen gegeben und die Zellen vollständig mit einem Zellkulturschaber von den Platten gekratzt. Die Zellen wurden resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Abzentrifugation der Zellen für 1 min bei 7000 U/min und 4°C wurde der Überstand verworfen. Durch erneutes Waschen der Zellkulturplatten mit 1,5 ml eiskaltem 1 x PBS wurden die Zellen vollständig eingesammelt und in das gleiche Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 1 min bei 7000 U/min und 4°C wurde der Überstand vorsichtig vollständig abgenommen und das Zellpellet in exakt 150 µl NP40-Lysis-Puffer + 1x Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free (Roche, Mannheim) aufgenommen und auf Eis für 20 min inkubiert. Alle 5 min wurde das Zelllysate durch invertieren gemischt. Die unlöslichen Zellfragmente wurden anschließend für 20 min bei 14000 U/min und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

NP40 Lysis-Puffer	
50 mM Tris (M 238,3)	10 ml 1 M Tris, pH 7,4
150 mM Natriumchlorid (NaCl, M 58,44)	6 ml 5 M NaCl
0,02 % Natriumazid (NaN ₃ , M 65.01)	2 ml 2% NaN ₃
1 % Nonidet™ P40 (NP40, chemisch identisch: IGEPAL® CA-630)	2 ml Nonidet™ P40 (NP40, chemisch identisch: IGEPAL® CA-630)
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt und pH auf 7,4 eingestellt. Bei 4°C lagern.	Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt und pH auf 7,4 eingestellt. Bei 4°C lagern.

1 M Tris, pH 7,4	
1 M Tris base (Tris, M 121,14)	24,23 g / 200 ml
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt, pH mit HCl auf 7,4 eingestellt. Achtung: Tris Puffer sind Temperatur abhängig. Lösung steril autoklaviert.	

5 M NaCl	
5 M NaCl (NaCl, M 58,44)	14,61 g / 50 ml
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt.	

2 % Natriumazid		Giftig !!!
2 % Natriumazid (NaN ₃ , M 65.01)	0,65 g / 50 ml	
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt. Bei 4°C gelagert.		

25 x Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free	
25 x Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free	1 Tablette
In 2 ml H ₂ O _{dd} aufgelöst und bei -20°C gelagert.	

10x PBS	
1,4 M Natriumchlorid (NaCl, M 58,44)	81,816 g/l
27 mM Kaliumchlorid (KCl, M 74,55)	2,01 g/l
100 mM Dinatriumhydrogenphosphat, Anhydrat (Na ₂ HPO ₄ , M 141,96)	14,186 g/l
17,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat, (KH ₂ PO ₄ , M 136,1)	2,381 g/l
Den pH mit HCl auf 7,4 eingestellt und das PBS autoklaviert.	

2.2.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen der Lysate wurden mit Hilfe des *BCA Protein Assay Kits* der Firma Pierce (Bonn) bestimmt. Der *BCA Protein Assay* kombiniert die Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch Proteine bei alkalischen Bedingungen mit der kolorimetrischen Quantifizierung des Chelatkomplexes bestehend aus einem einwertigen Kupferkation (Cu¹⁺) und zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA). Der sich bildende violette Farbstoff wurde bei 560 nm gemessen und die Proteinkonzentration relativ zu einer BSA-Standardkurve bestimmt. Die BSA-Standardkurve (0 µg/ml – 500 µg/ml) wurde nach dem angegebendem Pipettierschema in einem Volumen von 25 µl angesetzt. 2,5 µl der zu untersuchenden Lysatprobe wurden mit 22,5 µl H₂O_{dd} gemischt. Das BCA Reagenz A wurde 50:1 mit dem BCA Reagenz B gemischt und jeweils 500 µl des Gemisches wurden zu jeder Probe gegeben. 2 x

200 µl der Proben wurden nach 30minütiger Inkubation bei 60°C zur Doppelbestimmung in eine 96-well-Platte überführt und der Farbumschlag bei 560 nm gemessen. Anhand der BSA-Standardkurve wurde die Proteinkonzentration in den Lysaten berechnet.

Pipettierschema der BSA-Standardkurve		
BSA-Konzentration (µg/ml)	H₂O_{dd} (µl)	BSA-Standard 1 mg/ml (µl)
0	25	0
100	22,5	2,5
200	20	5
300	17,5	7,5
400	15	10
500	12,5	12,5

2.2.4.4 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation wurde zur Aufkonzentration der Medienmetabolite APPs_{β_{wt}} und A_β verwendet. Die einzusetzenden Medienvolumina wurden anhand der Proteinkonzentration der Lysate (2.2.4.3) normalisiert. 25 µl ProteinA-Agarose wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt, die Proben hinzugegeben und mit frischem Medium auf 600 µl aufgefüllt. Nach Zugabe des monoklonalen Antikörpergemisches 1G7-5A3 bzw. des monoklonalen Antikörpers IC16 (jeweils 1:300) wurde das zu untersuchende Protein über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler immunopräzipitiert. Der Komplex aus dem Antigen und dem an die Protein A Agarose gebundenen Antikörper wurde für 1 min bei 500 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Kügelchen mit 1 ml NP40 Lysispuffer gewaschen, erneut für 1 min bei 500 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einem weiteren Waschschrift wurde der Überstand entfernt und der Immunkomplex mit 10 µl 2x Ladepuffer versetzt, durch Ansnipsen gemischt, für 5 min bei 95°C gekocht und anschließend auf Eis gekühlt. Nach einer kurzen Abzentrifugation der Agarosekügelchen bei 10000 g wurde der gesamte Überstand mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.4.5). Durch Western Blot Analyse (2.2.4.7) wurden anschließend die Medienmetabolite detektiert. Zur Messung des APPs_{β_{wt}} wurde der spezifische, polyklonale Antikörper 192wt verwendet, während zur Detektion von A_β die monoklonalen Antikörper IC16 oder 26D6 eingesetzt wurden. Zur Vermeidung der Kreuzreaktivität des zur Immunopräzipitation eingesetzten Antikörpers in der Immundetektion wurde bei der Visualisierung des A_β die Membran nach der Ponceau Färbung (2.2.4.7.1) unterhalb der IgG Bande abgeschnitten.

NP40 Lysis-Puffer	
50 mM Tris (M 238,3)	10 ml 1 M Tris, pH 7,4
150 mM Natriumchlorid (NaCl, M 58,44)	6 ml 5 M NaCl
0,02 % Natriumazid (NaN ₃ , M 65,01)	2 ml 2% NaN ₃
1 % Nonidet TM P40 (NP40, chemisch identisch: IGEPAL [®] CA-630)	2 ml Nonidet TM P40 (NP40, chemisch identisch: IGEPAL [®] CA-630)
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt und pH auf 7,4 eingestellt. Bei 4°C lagern.	Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt und pH auf 7,4 eingestellt. Bei 4°C lagern.

4 x Ladepuffer	
62,5 mM Tris (M 121,14)	1 ml/7,6 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
10 % Glycerol	0,8 ml/7,6 ml Glycerol
0,2 % w/v Natriumdodecylsulfat (SDS, M 288,38)	1,6 ml/7,6 ml 10 % SDS
0,0125 % w/v Bromphenolblau	0,2 ml/7,6 ml 0,5 % (w/v) Bromphenolblau
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt und den pH auf 6,8 eingestellt. 40 µl β-Mercaptoethanol wurden vor der Benutzung zu 760 µl Ladepuffer gegeben. Zur Herstellung des 2x Ladepuffers wurde der 4x Ladepuffer 1:2 mit H ₂ O _{dd} verdünnt.	

2.2.4.5 Tris/Tris-Glycin SDS-PAGE

Durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) überdeckt die Eigenladungen der Proteine und es bilden sich Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit.

Zur Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss an SDS bei 95°C gekocht, wodurch die durch Wasserstoffbrücken erzeugte räumliche Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins aufgelöst wird. Zur vollständigen Auftrennung des Proteins in seine lineare Primärstruktur werden die Schwefelbrücken durch die Zugabe des reduzierenden β-Mercaptoethanol aufgelöst.

Zur Untersuchung von Proteinen mit einem Molekulargewicht größer als 20 kDa wurde das von U.K. Laemmli (299) eingeführte SDS-haltige Tris-Glycin-Puffersystem und das Mini-Protean Gelsystem der Firma BioRAD (Hercules, CA) verwendet. Dabei wurden die Proteine zuerst in einem niederprozentigen Sammelgel bei pH 6,8 an einer gemeinsamen Lauffront konzentriert und anschließend im Trenngel bei pH 8,8 entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

Die mit Seife gereinigten und mit Wasser gespülten Glasplatten wurden in die Gießvorrichtung eingespannt und das überschüssige Wasser mit Filterpapier entfernt. Da die Trennfähigkeit des Trenngels von der Höhe des Acrylamid-Anteils im Gel und der sich daraus ergebenden Vernetzung abhängt, wurde das Trenngel entsprechend der Größe der zu untersuchenden Proteine angesetzt. Je höher der Anteil des Acrylamids im Gel, desto kleinere Proteine können aufgetrennt werden. Unmittelbar nach dem Start der Gelpolymerisation durch die Zugabe von Temed wurde das Trenngel zwischen die beiden Glasplatten bis ca. 2 cm unterhalb des oberen Glasplattenrandes gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels wurde das Isopropanol mit Wasser

entfernt, welches anschließend mit Filterpapier vollständig aufgenommen wurde. Danach wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Probentaschenkamm ohne Luftblasen eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisation des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt, die Taschen mit Wasser gespült und das Gel in die Trennkammer eingesetzt. Die innere Pufferkammer wurde bis zur oberen Glaskante und die äußere bis zum oberen Anfang des Trenngels mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt, so dass ein durch das Gel laufender Stromkreislauf zwischen der inneren Kathode und der äußeren Anode aufgebaut werden konnte.

Zur Auftrennung der Lysate in der SDS-PAGE wurden gleichmäßige Proteinmengen (meistens 20 µg), die anhand der BCA Messung bestimmt wurden (2.2.4.3), eingesetzt. Zur Untersuchung der Medienmetabolite wurden die Medienmengen zu den Proteinkonzentrationen in den korrespondierenden Lysaten normalisiert. Die Proben wurden mit H₂O_{dd} auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt, mit 4 x Ladepuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt, kurz abzentrifugiert und anschließend in die Probentaschen pipettiert. Als Größenmarker wurden zusätzlich 1,5 µl des *peqGOLD Markers IV* (PEQLab, Erlangen) aufgetragen. Nach dem Einlaufen der Proben in das Gel bei 100 V wurden die Proteine bei 130 V aufgetrennt, bis die Bromphenollaufront das Ende der Glasplatte erreichte. Anschließend konnte das Proteingel für die Western-Blot-Analyse (2.2.4.7) verwendet werden.

Pipettierschema der 1,5 mm Tris SDS-PAGE Gele			
Trenngele			
	Acrylamid – Konzentration		
	8 %	10 %	12 %
Wasser	4,4 ml	4 ml	3,6 ml
40% Acrylamid (29:1)	1,6 ml	2 ml	2,4 ml
Trenngel Puffer	2 ml	2 ml	2 ml
10% APS	80 µl	80 µl	80 µl
Temed	8 µl	8 µl	8 µl
Sammelgel			
	5 % Acrylamid – Konzentration		
Wasser	1,56 ml		
40% Acrylamid (29:1)	0,312 ml		
Sammelgel Puffer	0,625 ml		
10% APS	25 µl		
Temed	2,5 µl		

4x Trenngelpuffer	
1,5 M Tris (M 121,14)	36,94 g / 200ml
0,4 % Natriumdodecylsulfat (SDS, M 288,38)	0,8 g / 200 ml
Der pH wurde mit HCl auf 8,8 eingestellt.	

4x Sammelgelpuffer	
0,6 M Tris-HCl (M 157,6)	18,91 g/200 ml
0,4 % Natriumdodecylsulfat (SDS, M 288,38)	0,8 g/200 ml
Der pH wurde mit NaOH auf 6,8 eingestellt.	

10 % APS	
10 % Ammoniumpersulfat (APS, M 228,2)	5 g/50 ml
Das APS wurde in H ₂ O _{dd} gelöst und bei 4°C gelagert.	

10x Laufpuffer	
250 mM Tris (M 121,14)	30,2 g/l
1,92 M Glycin	144 g/l
1 % w/v Natriumdodecylsulfat (SDS, M 288,38)	10 g/l
Der pH wurde <i>nicht</i> eingestellt. 100 ml des 10 x Laufpuffers wurden mit 900 ml H ₂ O _{dd} zur Herstellung des in der Gelelektrophorese verwendeten 1 x Laufpuffers verdünnt.	

4 x Ladepuffer	
62,5 mM Tris (M 121,14)	1 ml/7,6 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
10 % Glycerol	0,8 ml/7,6 ml Glycerol
0,2 % w/v Natriumdodecylsulfat (SDS, M 288,38)	1,6 ml/7,6 ml 10 % SDS
0,0125 % w/v Bromphenolblau	0,2 ml/7,6 ml 0,5 % (w/v) Bromphenolblau
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt und den pH auf 6,8 eingestellt. 40 µl β-Mercaptoethanol wurden vor der Benutzung zu 760 µl Ladepuffer gegeben.	

10 % SDS	
10 % Natriumdodecylsulfat (SDS, M 288,38)	1,0 g/10 ml
Beim Abwiegen des SDS wurden Handschuhe, Brille, Kittel und Atemschutz getragen. Anschließend wurde es in H ₂ O _{dd} gelöst.	

0,5 M Tris, pH 6,8	
0,5 M Tris-HCl (M 157,6)	15,76 g/200 ml
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt, pH mit NaOH auf 6,8 eingestellt. Steril autoklaviert. Achtung: Der pH Wert eines Tris-Puffers ist Temperatur abhängig.	

0,5 % Bromphenolblau	
0,5 % Bromphenolblau	50 mg/ml
Bromphenolblau wurde in H ₂ O _{dd} gelöst.	

2.2.4.6 *Bis-Tris / Mes-Tris - SDS-PAGE*

Die Bis-Tris / MES-Tris-SDS-PAGE wurde zur Auftrennung von niedermolekularen Proteinen wie Aβ verwendet. Die Gele basieren auf der Arbeit von Tim Updyke und Sheldon Engelhorn von der Firma Invitrogen und sind detailliert im U.S. Patent 6162338 beschrieben. Sie ähneln den von Invitrogen vertriebenen NuPAGE Bis-Tris-Gelen, die zusätzlich in einigen Fällen zur Auftrennung von Proteinen benutzt wurden. Der in der „standard“ SDS-PAGE (wie z.B. dem Laemmli-Puffer-

System) verwendete pH-Wert liegt zwischen acht und neun und kann zur Deaminierung und Alkylierung der Proteine sowie der Reoxidierung der reduzierten Cysteine während der Elektrophorese führen. Dagegen erfolgt die Auftrennung der Proteine durch das Bis-Tris / MES-Tris-Gel-System sowohl im Sammelgel als auch im Trenngel bei neutralem pH, wodurch diese negativen Effekte vermieden werden. Der niedrigere und einheitliche pH-Wert im Sammel- und im Trenngel ermöglicht zusätzlich die Langzeitlagerung der Gele. Der entscheidende Vorteil der Bis-Tris / MES-Tris-SDS-PAGE ist ihr sehr großer Auftrennungsbereich, der einem Gradientengel oder den Tris-Tricine-Gelen (300) ähnelt, so dass auch kleine Proteine mit einem Molekulargewicht bis zu 2 kDa untersucht werden können.

Das NuPAGE®-Elektrophorese-System der Firma Invitrogen (Karlsruhe) wurde für die Bis-Tris / MES-Tris SDS-PAGE verwendet. Das Gießen der Gele in Plastik-Kassetten (Invitrogen, Karlsruhe) erfolgte wie bei den Tris / Tris-Glycine-Gelen (2.2.4.5). Nach dem Einlaufen der Proben in das Gel bei 100 V wurden die Proteine bei 130 V aufgetrennt. Anschließend konnte das Proteingel für die Western-Blot-Analyse (2.2.4.7) verwendet werden.

Pipettierschema der 1 mm Bis-Tris SDS-PAGE Gele		
Trenngele		
	Acrylamid – Konzentration	
	10 %	12 %
Wasser	2,7 ml	2,26 ml
30% Acrylamid (37,5:1)	2,20 ml	2,64 ml
Bis-Tris Gelpuffer	1,65 ml	1,65 ml
10% APS	33 µl	33 µl
Temed	11 µl	11 µl
Sammelgel		
	5 % Acrylamid – Konzentration	
Wasser	1,23 ml	
30% Acrylamid (37,5:1)	0,260 ml	
Bis-Tris Gelpuffer	0,500 ml	
10% APS	20 µl	
Temed	5 µl	

4x Bis-Tris Gelpuffer	
1,6 M Bis-Tris (M 157,6)	33,47 g/100 ml
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt und den pH mit HCl auf 6,4 eingestellt.	

10 % APS	
10 % Ammoniumpersulfat (APS, M 228,2)	5 g/50 ml
Das APS wurde in H ₂ O _{dd} gelöst und bei 4°C gelagert.	

20 x MES Laufpuffer	
1 M MES (M 292,25)	292,25 g/l
1 M Tris (M 121,14)	121,14 g/l
69,3 mM Natriumdodecylsulfat (SDS, M 288,38)	19,98 g/l
20,5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, M 292,25)	5,99 g/l
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt. Zur Verwendung 1:20 mit H ₂ O _{dd} verdünnt.	

4 x Ladepuffer	
1,44 M Bis-Tris (M 209,24)	3,01 g/10 ml
0,64 M Bicine (163,17)	1,04 g/10 ml
4 % w/v Natriumdodecylsulfat (SDS, M 288,38)	4 ml/10 ml 10 % SDS
100 mM Dithiothreitol (DTT, M 154,25)	1 ml/10 ml 1 M DTT
0,05 % w/v Bromphenolblau	1 ml/10 ml 0,5 % (w/v) Bromphenolblau
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt und bei -20°C gelagert.	

10 % SDS	
10 % Natriumdodecylsulfat (SDS, M 288,38)	1,0 g/10 ml
Beim Abwiegen des SDS wurden Handschuhe, Brille, Kittel und Atemschutz getragen. Anschließend wurde es in H ₂ O _{dd} gelöst.	

0,5 % Bromphenolblau	
0,5 % Bromphenolblau	50 mg/ml
Bromphenolblau wurde in H ₂ O _{dd} gelöst.	

1 M DTT	
1 M Dithiothreitol (DTT, M 154,25)	1,54 g/10 ml
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.	

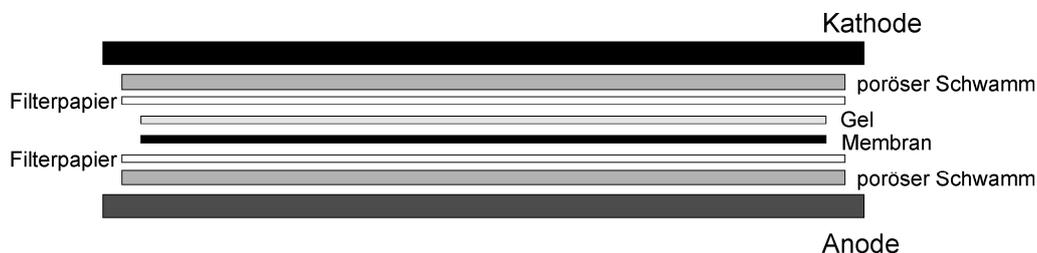
2.2.4.7 Western-Blot-Analyse

Der Western-Blot wurde zur immunologischen Detektion von Proteinen eingesetzt. Dabei werden die bei der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine während des Elektrophoretischen Transfers aus dem Polyacrylamidgel über ein zum Gel senkrecht angelegtes elektrisches Feld auf eine Membran transferiert (2.2.4.7.1). Anschließend werden die immobilisierten Proteine durch indirekte Immundetektion visualisiert (2.2.4.7.2). Hierbei bindet ein antigenspezifischer Antikörper (2.1.14) mit den beiden Fab-Fragmenten an „sein“ Epitop auf dem Antigen. Die Fc-Region des Antikörpers wird wiederum durch einen sekundären Antikörper erkannt (2.1.14), über den die eigentliche Detektion erfolgt. Der indirekte Nachweis des untersuchten Proteins erfolgt durch die Oxidierung des Luminols durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP), wobei die entstehende Lumineszenz detektiert und dokumentiert wird.

2.2.4.7.1 Elektroblothing

Die zum Elektrobloblot verwendeten Filterpapiere und die porösen Schwämme wurden in 1x Transferpuffer equilibriert. In 1x Transferpuffer equilibrierte Nitrozellulose Membranen wurden zum Blotten der Tris / Tris-Glycine Gele verwendet, während für 5 Min in Methanol aktivierte Polyvinylidenfluoridmembranen (PVDF, Immobilon P, Millipore, Schwalbach) zum Transfer der Bis-Tris / MES-Tris Gele verwendet wurden. Der Blot wurde wie abgebildet zusammengesetzt und in die mit 1x Transferpuffer gefüllte Blotting-Kammer (Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell, BioRAD, Hercules, CA) gestellt. Um die Wechselwirkung der Proteine, hier besonders der kleineren wie A β , mit der hydrophoben Membranoberfläche zu begünstigen, wurde dem Transferpuffer beim Blotten auf PVDF-Membranen 20% Methanol zugesetzt. Der Transfer erfolgte gekühlt und durch einen Magnetrührer gemischt bei 25 V über Nacht oder bei 70 V für 2 Std.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran zur Entfernung der Salze mit Wasser gewaschen. Zur Kontrolle der Transferqualität (z.B. Luftblasen) und der gleichmäßigen Beladung wurden die Proteine anschließend durch Einlegen in Ponceau S Lösung gefärbt. Der reversibel an die positiven Ladungen der Proteine gebundene Farbstoff wurde anschließend durch mehrfaches Waschen mit TBST wieder entfernt.



10x Transferpuffer	
250 mM Tris (M 121,14)	30,2 g/l
1,92 M Glycin (M 75,07)	144 g/l
Der pH wurde <i>nicht</i> eingestellt. 100 ml des 10 x Laufpuffers wurden zum Transfer auf Nitrozellulosemembranen mit 900 ml H ₂ O _{dd} bzw. mit 700 ml H ₂ O _{dd} und 200 ml Methanol zum Blotten auf PVDF Membranen zur Herstellung des im Western Blot verwendeten 1 x Transferpuffers verdünnt. Nach dem Verdünnen sollte der pH bei ungefähr 8,3 liegen.	

Ponceau S Lösung	
0,5 % (w/v) Ponceau S	1 g/200 ml
1 % (v/v) Essigsäure	2 ml/200 ml
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt.	

2.2.4.7.2 Immundetektion

Zur Durchführung der indirekten Immundetektion wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran nach dem Blotten und der Ponceau-Färbung (2.2.4.7.1) durch einstündige Inkubation in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper eingeschweift (2.1.14) und über Nacht auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Antikörper abgenommen und die Membran zur Entfernung des überschüssigen bzw. unspezifisch gebundenen primären Antikörpers in einer Inkubationskammer viermal für 10 Min mit TBST gewaschen. Danach wurde der zum primären Antikörper passende sekundäre Antikörper 1:5000 in 5% Magermilchpulver in TBST verdünnt und auf die Membran gegeben. Nach einstündiger Inkubation wurde der überschüssige bzw. unspezifisch gebundene sekundäre Antikörper durch viermaliges Waschen mit TBST unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur entfernt. Nachdem die Membran kurz mit TBS abspült wurde, erfolgte die Visualisierung der mit den Antikörpern gekoppelten Proteine durch die HRP-vermittelte Oxidierung des Chemilumineszenzsubstrates nach Angaben des Herstellers (ECL Western Blotting Substrate, Pierce, Bonn; Immobilon Western HRP Substrate, Millipore, Schwalbach). Das emittierte bläuliche Licht wurde mit Hilfe eines LAS-3000 Mini Luminescent Image Analyser der Firma Fujifilm (Düsseldorf) dokumentiert.

10 x TBS	
1,37 M Natriumchlorid (NaCl, M 58,44)	80 g/l
27 mM Kaliumchlorid (KCL, M 74,55)	2,01 g/l
250 mM Tris (M 121,14)	30,28 g/l
In H ₂ O _{dd} gelöst und den pH auf 7,4 eingestellt.	

1 x TBS
100 ml 10x TBS auf einen Liter mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt.

1 x TBST
100 ml 10 x TBS auf einen Liter mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt. 1 ml Tween-20 zugesetzt und gemischt.

5% Magermilchpulver in TBST	
5% (w/v) Magermilchpulver	0,5 g/50 ml
Mit 1 x TBST aufgefüllt.	

2.2.4.8 Herstellung HRP-gekoppelter Antikörper

Als Detektionsantikörper für den ELISA (2.2.4.9) wurden die Aβ40 und Aβ42 spezifischen Antikörper an die Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt. Zur Kopplung wurde das EZ-Link™ Plus Activated Peroxidase Kit (Pierce, Bonn) verwendet. Für die Dialysen vor und nach der Kopplung wurden Slide-A-Lyzer 10K MWCO Dialysis Kassetten (Pierce, Bonn) benutzt.

Die Dialysekassette wurde für 30 s in Carbonatpuffer eingelegt. Eine Spritze wurde mit 1 mg Antikörper (ca. 500 µl bis 1 ml) gefüllt. Zu geringes Volumen wurde mit Carbonatpuffer aufgefüllt. Eine Nadel wurde in eine der Öffnungen der Dialysekassette eingeführt, die Flüssigkeit injiziert und die überschüssige Luft aus der Kammer entfernt. Der Antikörper wurde anschließend über Nacht bei 4°C unter leichtem Rühren gegen Carbonatpuffer dialysiert. Zur Entnahme des Antikörpers wurde eine frische Spritze durch eine neue Öffnung eingeführt, ein Luftpolster in die Kammer vorgelegt und der Antikörper aufgenommen. Die dialysierte Probe wurde direkt in eine HRP Ampulle injiziert und für 1 Std. bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 10 µl Natrium-Cyanoborohydrid wurde die Bindung für 15 min reduziert und die aktivierte HRP durch Zugabe von 20 µl Quenching Puffer für weitere 15 min bei RT „gequencht“. Die HRP-Antikörper Lösung wurde anschließend über Nacht bei 4°C gegen 1x PBS dialysiert. Zur langfristigen Lagerung wurde der HRP-gekoppelte Antikörper 1:1 mit SuperFreeze™ peroxidase conjugate stabilizer (Pierce, Bonn) gemischt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Carbonatpuffer, pH 9,4	
60 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃ , M 84,01)	5,04 g/l
140 mM Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃ , M 105,99)	14,83 g/l
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt und pH auf 9,4 eingestellt. Autoklaviert und bei RT gelagert.	

10x PBS	
1,4 M Natriumchlorid (NaCl, M 58,44)	81,816 g/l
27 mM Kaliumchlorid (KCl, M 74,55)	2,01 g/l
100 mM Dinatriumhydrogenphosphat, Anhydrat (Na ₂ HPO ₄ , M 141,96)	14,186 g/l
17,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat, (KH ₂ PO ₄ , M 136,1)	2,381 g/l
pH mit HCl auf 7,2 eingestellt und autoklaviert. Zur Herstellung von 1x PBS 1:10 mit H ₂ O _{dd} verdünnt.	

2.2.4.9 Sandwich-ELISA

Der Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Sandwich-ELISA) wurde zur spezifischen Quantifizierung der sezernierten Aβ₄₀- bzw. Aβ₄₂-Mengen eingesetzt. Dabei wurden zwei Antikörper eingesetzt, die gegen zwei unterschiedliche Stellen des Aβ Peptides gerichtet waren. Nachdem die in der Probe vorhandenen Aβ-Peptide durch den gegen Gesamt-Aβ gerichteten Antikörper IC16 gebunden waren, wurden die Aβ₄₀- bzw. Aβ₄₂-Mengen mittels HRP-gekoppelter Antikörper BAP24 bzw. BAP15 quantifiziert.

Zum Einsammeln der Aβ-Peptide wurde der Primärantikörper IC16, der gegen die N-terminalen 8 Aminosäuren des Aβ-Peptids gerichtet ist, fest an eine *high binding* Mikrotiterplatte (Corning, Sigma, Deisenhofen) gebunden. Dazu wurde der Antikörper 1:250 in 1x PBS, pH 7,2 verdünnt und jeweils

100 µl in ein *well* pipettiert. Die Platte wurde abgedeckt und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der synthetische Aβ-Standard im Probenpuffer angesetzt.

Mischtablette der Aβ-Standardreihe		
Aβ-Endkonzentration	Assaybuffer	Synthetisches Aβ-Peptid
3 ng/ml	5 ml	6 µl Aβ - Stock (10 ng/µl)
1,5 ng/ml	2,5 ml	2,5 ml 3 ng/ml Aβ
0,75 ng/ml	2,5 ml	2,5 ml 1,5 ng/ml Aβ
2 ng/ml	2,5 ml	4 µl Aβ - Stock (10 ng/µl)
1 ng/ml	2,5 ml	2,5 ml 2 ng/ml Aβ
0,5 ng/ml	2,5 ml	2,5 ml 1 ng/ml Aβ
0,25 ng/ml	2,5 ml	2,5 ml 0,5 ng/ml Aβ

Der primäre Antikörper wurde von der Mikrotiterplatte abgenommen, 50 µl Probenpuffer in jedes *well* vorgelegt und anschließend jeweils 50 µl der Aβ-Standardreihe geladen. Da die sezernierte Aβ-Menge sowohl von der Zelllinie, der Aβ-Spezie als auch von dem spezifischen Experiment selbst abhängt, wurden unterschiedliche Probenvolumina zur Quantifizierung von Aβ40 und Aβ42 eingesetzt. Im Allgemeinen wurden 10 µl konditioniertes Medium für Aβ40 und 50 µl für Aβ42 geladen. Entsprechende Volumina frisches Medium wurden zum Angleichen zu der Aβ-Standardreihe gegeben, so dass alle Proben die gleiche Menge an Serum enthielten. Der HRP-gekoppelte Aβ40- bzw. Aβ42-spezifische Sekundärantikörper, welcher spezifisch das entsprechende C-terminale Ende des Aβ-Peptides detektiert, wurde 1:1000 bzw. 1:500 in Probenpuffer verdünnt und jeweils 50 µl in jedes *well* überführt. Anschließend wurden alle *wells* mit Probenpuffer auf 200 µl aufgefüllt, die Platte abgedeckt und bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Proben abgegossen und die *wells* fünfmal mit 1x PBS-T gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1x PBS wurden die Platten zur vollständigen Entfernung des Puffers vorsichtig auf einem Papiertuch abgeklopft. Nach der Zugabe von 100 µl 1-Step Ultra TMB ELISA Substrat (Pierce, Bonn) erfolgte die Reaktionsentwicklung im Dunkeln für drei bis 15 Minuten. Nachdem die Reaktion durch die Zugabe von 100 µl 2 M H₂SO₄ abgestoppt wurde, wurde die Platte bei 450 nm ausgelesen.

10x PBS	
1,4 M Natriumchlorid (NaCl, M 58,44)	81,816 g/l
27 mM Kaliumchlorid (KCl, M 74,55)	2,01 g/l
100 mM Dinatriumhydrogenphosphat, Anhydrat (Na ₂ HPO ₄ , M 141,96)	14,186 g/l
17,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat, (KH ₂ PO ₄ , M 136,1)	2,381 g/l
Den pH mit HCl auf 7,2 eingestellt und das PBS autoklaviert. Zur Herstellung von 1x PBS 1:10 mit H ₂ O _{dd} verdünnt.	

Probenpuffer	
0,5 % BSA	0,25 g / 50ml
In 1x PBS-T, pH 7,2 gelöst. Jedes Mal frisch ansetzen und sterilfiltrieren.	

2.2.4.10 Zelloberflächenbiotinylierung

Biotinylierung wurde zur Untersuchung der Expression, Regulation und Lokalisation von Proteinen auf der Zelloberfläche verwendet. N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) Ester des Biotins können zur spezifischen Markierung von Zelloberflächenproteinen verwendet werden, weil sie wasserlöslich sind und auf Grund ihrer geladenen Sulfonsäuregruppe nicht durch die Zellmembran dringen können. Sulfo-NHS-Biotin Reagenzien reagieren mit primären Aminogruppen, welche in der Seitenkette von Lysin und am N-Terminus eines Proteins vorkommen, bei einem pH von 7-9 unter Bildung von stabilen Amidbindungen. Biotinylierte Proteine wurden mit immobilisiertem NeutrAvidin (-Neutarvidin-Agarose (Pierce, Bonn)), einem Avidinderivat, das sich durch niedrige unspezifische Bindungseigenschaften auszeichnet, isoliert und anschließend über SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen.

Konfluente 60 mm Zellkulturplatten wurden aus dem Inkubator genommen und direkt auf Eis gestellt. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen viermal mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für zweimal 20 min mit 1 ml Biotinylierungs-Lösung (0,5 mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Pierce, Bonn) in kaltem PBS) unter langsamem Schaukeln auf einem Horizontalschüttler bei 4°C inkubiert. Nach erfolgter Biotinylierung wurde unverbrauchtes Sulfo-NHS-Biotin durch viermaliges Waschen mit 2 ml eiskaltem 50 mM Glycin in PBS abgesättigt und entfernt. Nach einem weiteren Waschschrift mit eiskaltem PBS wurden die Zellen von den Platten gekratzt, pelletiert und in NP40 Puffer lysiert (2.2.4.2). Zur Isolierung der biotinylierten Proteine wurden nach der Konzentrationsbestimmung gleiche Proteinmengen auf 600 µl mit NP40-Puffer aufgefüllt und mit 25 µl NeutrAvidin-Agarose (Pierce, Bonn) über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die NeutrAvidin-Agarose wurde bei 500 g für 1 min abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet zweimal mit 1 ml NP40-Puffer gewaschen. Abschließend wurde der Überstand sehr vorsichtig vollständig abgenommen und das Pellet mit 10 µl 2 x Ladepuffer versetzt und durch leichtes Anschneiden gemischt. Die Proben wurden 5 min bei 95°C gekocht, auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Die so erhaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE (2.2.4.5) aufgetrennt und im Western Blot (2.2.4.7) mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinexpression wurden jeweils 20 µg der biotinylierten Zelllysate in der SDS-PAGE parallel aufgetragen.

2.2.4.11 AICD *in vitro* Assay

Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit kann die durch γ -Sekretase-Spaltung der APP-CTFs freigesetzte intrazelluläre Domäne (AICD) nur sehr schwer in Lysaten nachgewiesen werden. Zur Untersuchung von AICD verwendet man daher die *in vitro* Generation von AICD aus Membranpräparationen.

Die APP stabil überexprimierenden Zellen wurden in 10 cm Schalen ausgesät. Nach zwei Tagen wurde das Medium erneuert und die Zellen bis zur Konfluenz weitere 24 Stunden gezüchtet. Die Zellen wurden aus dem Inkubator genommen, direkt auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und die Zellen mit 8 ml eiskaltem 1x PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 5 ml eiskaltem 1x PBS wurden die Zellen vollständig mit einem Zellkulturschaber von den Platten gekratzt. Die Zellen wurden in dem 1 x PBS resuspendiert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die restlichen Zellen wurden durch erneutes Waschen der Zellkulturplatten mit 5 ml eiskaltem 1 x PBS vollständig eingesammelt und in das gleiche Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 4 min bei 1200 U/min und 4°C abzentrifugiert und anschließend in exakt 10 ml eiskaltem 1x PBS resuspendiert. 1 ml der gleichmäßig resuspendierten Zellen wurde zur Herstellung eines Zelllysats in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, abzentrifugiert und in NP40 Lysispuffer lysiert (2.2.4.2). Die restlichen 9 ml der Zellsuspension wurden für den AICD *in vitro* Assay verwendet. Die Zellen wurden erneut 4 min bei 1200 U/min und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 500 μ l eiskaltem hypotonischen Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal für 10 s vorsichtig ultrasonifiziert (Einstellung: 30% Intensität), wobei die Suspension zwischen den Sonifikationsschritten auf Eis gekühlt wurde. Zur Entfernung der Zellkerne und größerer Trümmerfragmente wurde die Suspension für 15 min bei 1000 g und 4°C zentrifugiert. Der postnukleare Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Membranen für 45 min bei 20000 g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 60 μ l Assay Puffer aufgenommen und anschließend jeweils 30 μ l in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Einer der beiden Ansätze wurde zur Generation des AICD für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Der andere wurde als Negativkontrolle entweder für 2 Std. auf Eis oder als γ -Sekretase-Inhibitor-Kontrolle nach Zusatz von 2,5 μ M L-685,458 (Bachem AG, Weil am Rhein) bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend 30 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 4x Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden anhand der Proteinkonzentrationen der korrespondierenden NP40-Lysate normalisiert und auf einem 12% Bis-Tris-Gel aufgetrennt.

Hypotonischer Puffer	
10 mM Tris (M 121,14)	121 mg/100 ml
1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, M 292,25)	29 mg/100 ml
1 mM Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (EGTA, M 380,35)	38 mg/100 ml
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt und pH auf 7,4 eingestellt.	

10x PBS	
1,4 M Natriumchlorid (NaCl, M 58,44)	81,816 g/l
27 mM Kaliumchlorid (KCl, M 74,55)	2,01 g/l
100 mM Dinatriumhydrogenphosphat, Anhydrat (Na ₂ HPO ₄ , M 141,96)	14,186 g/l
17,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat, (KH ₂ PO ₄ , M 136,1)	2,381 g/l
Den pH mit HCl auf 7,4 eingestellt und das PBS autoklaviert. 1:10 mit H ₂ O _{dd} zur Herstellung von 1x PBS verdünnen.	

Assay Puffer	
150 mM Natrium-Citrat Dihydrat (M 294,10)	4,41 g/100 ml
Mit H ₂ O _{dd} auffüllen und pH auf 6,4 einstellen.	

4 x Ladepuffer	
1,44 M Bis-Tris (M 209,24)	3,01 g/10 ml
0,64 M Bicine (163,17)	1,04 g/10 ml
4 % w/v Natriumdodecylsulfat (SDS, M 288,38)	4 ml/10 ml 10 % SDS
100 mM Dithiothreitol (DTT, M 154,25)	1 ml/10 ml 1 M DTT
0,05 % w/v Bromphenolblau	1 ml/10 ml 0,5 % (w/v) Bromphenolblau
Mit H ₂ O _{dd} aufgefüllt und bei -20°C gelagert.	

2.2.4.12 Gal4-Assay

Zur Untersuchung der potenziellen transkriptionellen Aktivität der intrazellulären Domäne des APP (AICD) wurde die DNA-Bindedomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors Gal4 in den zytoplasmatischen C-Terminus von APP an der Grenze der Transmembrandomäne zum intrazellulären Schwanz eingebaut (169). Die Transkription des Gal4-abhängigen Luciferase Reportergenes wird dabei durch die Translokation eines potentiellen Komplexes aus dem AICD, dem nukleären Adaptorprotein Fe65 und der Histon Acetyltransferase Tip60 in den Kern stimuliert.

CHOKI bzw. HEK 293T Zellen mit verschiedenen, stabil überexprimierenden APPGal Mutationen wurden in 12-well Platten mit gleicher Zellzahl ausplattiert und am folgenden Tag mit FugeneTM6 (Roche, Mannheim) transfiziert (2.2.3.4.2). Alle Transfektionen enthielten 0,2 µg des Luciferase Reporter Plasmids pG5E1B und zur Transfektionskontrolle 0,05 µg des die β-Galaktosidase konstitutiv exprimierenden Plasmids pcDNA3.1 myc-his LacZ (+). Zusätzlich wurden die Zellen entweder mit 0,2 µg pcDNA3 oder zur Aktivierung der APP-abhängigen Transkription des Luciferasegens mit 0,2 µg des Transaktivatorplasmides pcDNA3-Fe65 ko-transfiziert. Die Zellen wurden 48 Std. nach der Transfektion in 150 µl *Passive Lysis Buffer* (PLB, Promega, Mannheim) lysiert und die Proteinkonzentration durch die BCA Methode gemessen (2.2.4.3).

Anschließend wurde zur Bestimmung der Transaktivierung die Luciferaseaktivität durch das *Luciferase Assay Kit* (Promega, Mannheim) nachgewiesen (2.2.4.12.1) und die β-

Galactosidaseaktivität mit der *O*-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG)-Methode zur Standardisierung der Transfektionseffizienz gemessen (2.2.4.12.2).

2.2.4.12.1 Luciferase Assay

Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte gemäß dem vom Hersteller angegebenen Protokoll. Das lyophilisierte Luciferasesubstrat wurde im Luciferase-Probenpuffer zur Herstellung des Luciferase-Probenreagenzes resuspendiert. 20 μ l der Probenlysate wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Platte anschließend in ein Luminometer (Victor, Rodgau-Jügesheim) gestellt. Die Messung erfolgte automatisch nach einem programmierten Protokoll. Nach der Zugabe von 100 μ l des Luciferase-Probenreagenzes erfolgte eine Verzögerungsphase von 2 s. Das durch die Luciferase-vermittelte Oxidation des Luciferins produzierte Licht wurde anschließend in einem 10 s Zeitabschnitt gemessen.

2.2.4.12.2 β -Galactosidase Assay

Zur Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität wurden 20 μ l der Lysate mit 30 μ l des *Passive Lysis Buffers* in einem *well* einer Mikrotiterplatte gemischt. Zusätzlich wurden Lysate von untransfizierten Zellen zur Bestimmung der Hintergrundaktivität verwendet, da Zellen endogene β -Galactosidase besitzen oder ein Isozym exprimieren können. Zum Start der Reaktion wurden zu den 50 μ l der Probe 50 μ l 2 x ONPG Probenpuffer gegeben und durch pipettieren gemischt. Die Platten wurden abgedeckt und bei 37°C für 30 min oder bis zur Entstehung einer schwachen gelben Farbe inkubiert. Die Reaktion konnte durch die Zugabe von 150 μ l 1 M Natriumcarbonat gestoppt werden. Die Absorption der Proben wurde bei 420 nm gemessen.

Die Luciferaseaktivitäten der einzelnen Proben wurden an Hand der β -Galactosidaseaktivitäten standardisiert.

2 x ONPG Probenpuffer	
2 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂ , M 95,21)	0,2 ml/50 ml 0,5 M MgCl ₂
100 mM β -Mercaptoethanol (M 78,13)	0,34 ml/50 ml
1,33 mg/ml <i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG, M 301,25)	66,5 mg/50 ml
In 200 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,3 angesetzt und bei -20°C gelagert.	

500 mM Magnesiumchlorid	
500 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂ , M 95,21)	2,38 g/50 ml
In H ₂ O _{dd} lösen.	

200 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,3	
5,52 g/l Natriumdihydrogenphosphat Anhydrous (NaH ₂ PO ₄ , M 119,98)	
41,31 g/l Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat (Na ₂ HPO ₄ * 7H ₂ O, M 268,07)	
In H ₂ O _{dd} gelöst.	

Stoplösung	
1 M Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃ , M 105,99)	5,3 g/50 ml
In H ₂ O _{dd} gelöst.	

2.2.4.13 Seap Assay

Zur einfachen und schnellen Quantifizierung von APPs wurden Alkalische Phosphatase Fusionsproteine von APP (SEAP-APP) verwendet (219). Stabil in HEK 293T oder CHOKI Zellen exprimierte SEAP-APP Fusionsproteine werden wie die Wildtyp-Proteine prozessiert. Daher konnte die Messung der ins Medium sezernierten Alkalischen Phosphatase zur Quantifizierung von sezerniertem APPs (SEAP-APPs) genutzt werden.

Zur Messung von SEAP-APPs wurden stabil exprimierende Zellen und zur Bestimmung der endogenen Alkalischen Phosphatase nicht transfizierte Zellen in 12-well Schalen ausgesät. Zwei Tage nach der Aussaat wurde das Medium gewechselt und für 24 Std. konditioniert. Das konditionierte Medium wurde vorsichtig abgenommen, für 5 min bei 14000 U/min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand anschließend in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden lysiert (2.2.4.2) und die Proteinkonzentration bestimmt (2.2.4.3). Sowohl die Lysate als auch das konditionierte Medium wurden bei -80°C gelagert.

Im Gegensatz zu der von den meisten Zellen exprimierten endogenen Alkalischen Phosphatase ist die für die Fusionskonstrukte verwendete AP für wenigstens 30 min bei 65°C stabil. Vor der Messung von SEAP-APPs wurden daher Aliquots der konditionierten Überstände zur Hitzeinaktivierung der endogenen Alkalischen Phosphatase bei 65°C inkubiert.

Zur Messung der Alkalischen Phosphatase wurden 20 µl der konditionierten und hitzeinaktivierten Medien in eine Multititerplatte überführt und 200 µl des frisch angesetzten Substratpuffers hinzugeben. Die Platte wurde 30 min bei RT inkubiert und die Reaktion konnte durch die Zugabe von 40 µl 3 M NaOH gestoppt werden. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei 405 nm gemessen. Die Resultate wurden anhand der Proteinkonzentrationen der korrespondierenden Lysate korrigiert und zur SEAP-APPs Messung des SEAP-APP695wt normalisiert (ausgedrückt als % SEAP-APP695wt).

Alkalische Phosphatase Substratpuffer	
0,1 M Glycin (M 75,07)	7,51 g/l
1 mM Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ *6H ₂ O, M 203,3)	0,203 g/l
1 mM Zinkchlorid (ZnCl ₂ , M 136,29)	0,136 g/l
Mit H ₂ O _{dd} auf 1 l aufgefüllt und den pH mit NaOH auf 10,4 eingestellt. Das Optimum der alkalischen Phosphatase liegt zwischen 9,5 und 10,5. Sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.	
Unmittelbar vor der Verwendung eine Tablette pNPP (p-Nitrophenyl-Phosphat, Sigma, N-9389, 5mg, bei -20°C gelagert) in 5 ml Alkalische Phosphatase Substratpuffer gelöst.	

3 Ergebnisse

Ein zentrales Ereignis der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung ist die Aggregation des Amyloid- β ($A\beta$)-Peptids im extrazellulären Raum des Gehirns. Das $A\beta$ -Peptid wird durch β - und γ -Sekretase-Prozessierung aus dem Vorläuferprotein APP herausgeschnitten. Während die Entfernung des zytosolischen Schwanzes inklusive des Internalisierungssignals YENPTY die $A\beta$ -Sekretion von *wildtyp* APP vollständig unterdrückte, hatte die C-terminale Verkürzung von APP mit der schwedischen Mutation (APP_{swe}) keinen Einfluss auf die $A\beta$ -Sekretion (37, 108). Dies deutet darauf hin, dass die Freisetzung des $A\beta$ -Peptids beim *wildtyp* APP in endozytotischen Kompartimenten wie den Endosomen erfolgt (99, 123), während es beim APP_{swe} im sekretorischen Transportweg freigesetzt wird. Dabei schneidet die β -Sekretase APP_{swe} im sekretorischen Transportweg, wahrscheinlich in vom Golgi abgeschnürten sekretorischen Vesikeln (275, 280). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl das β -Sekretase-*Shedding* als auch der γ -Sekretease-Schnitt von APP_{swe} im sekretorischen Transportweg lokalisiert ist.

In einer kürzlich veröffentlichten Publikation haben Cirrito et al. die Endozytose-abhängige Produktion von $A\beta$ und dessen anschließende Sekretion in die Interstitialflüssigkeit an APP_{swe} überexprimierenden Mäusen (Tg2576) untersucht (282). Die Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose durch die Infusion eines Dynamamin-Peptidinhibitors reduzierte in diesem Mausmodell die $A\beta$ -Sekretion um 70%. Zudem zeigte die Untersuchung der Prozessierung eines C99-GFP Fusionsprotein, dass die AICD-Freisetzung durch die γ -Sekretase nicht im ER, im Golgi/Trans-Golgi-Netzwerk oder in sekretorischen Vesikeln, sondern an der Zelloberfläche oder in Endosomen erfolgt (278). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zum gängigen Modell der APP_{swe}-Prozessierung.

Zur Untersuchung dieser abweichenden Beobachtungen sollten die Unterschiede zwischen der *wildtyp* APP- und APP_{swe}-Prozessierung herausgearbeitet und die Lokalisation der einzelnen Spaltungsereignisse bestimmt werden.

Zahlreiche Arbeiten haben gezeigt, dass die APP-Prozessierung in Zellkultur sehr ähnlich zum *in vivo* Metabolismus ist. Die prinzipielle Prozessierung von APP ist dabei in unterschiedlichen Zelltypen identisch (111) und das Prozessierungsmuster unabhängig von endogener Expression oder exogener Überexpression (99, 111, 301, 302).

Die APP-Prozessierung wurde weitgehend in humanen embryonalen Nierenzellen, HEK293, und in Ovarienzellen des chinesischen Hamsters, CHOKI (*Chinese Hamster Ovary Cells*), aufgeklärt (37, 99, 100, 111, 303). Beide Zelltypen sind daher geeignete Modellsysteme zur Untersuchung des APP-Metabolismus. Da BACE1 nur schwach in HEK293-Zellen exprimiert ist (110, 196, 197), lassen sich insbesondere die Fragmente der amyloidogenen Prozessierung von *wildtyp* APP schwieriger nachweisen als in CHOKI-Zellen. Dagegen ermöglicht die höhere BACE-Aktivität der CHOKI-Zellen eine einfache Detektion der APP β - und $A\beta$ -Sekretion. Da die Messungen von $A\beta$ - und APP β -Sekretion wesentliche Bestandteile der Untersuchung der spezifischen Unterschiede zwischen *wildtyp*

APP- und APP_{swe}-Prozessierung war, basiert der größte Teil dieser Arbeit auf Untersuchungen in CHOKI-Zellen.

Um die Analyse der einzelnen Spaltungsfragmente zu erleichtern bzw. zu ermöglichen wurden durch virale Transfektion für alle Mutanten APP stabil überexprimierende Zellen erzeugt und nach der Selektion als Massenkulturen verwendet, um klonale Effekte zu vermeiden.

3.1 Antikörper zum Nachweis der APP-Prozessierungsfragmente

In dieser Arbeit wurden eine Vielzahl an Mutationen in den zytoplasmatischen Teil von APP eingefügt. Diese Mutationen liegen im Epitop des gegen die C-terminalen 15 AS gerichteten Antikörpers CT15, wodurch die Verwendung dieses Antikörpers ausgeschlossen wurde. Die meisten der in dieser Arbeit verwendeten APP-Expressionskonstrukte wurden daher am zytoplasmatischen Ende mit einem *Tag* versehen, der der C-terminalen Sequenz des c-Myc-Proteins entsprach. Diese Fusionsproteine ermöglichten den Nachweis der APP-Expression durch die Verwendung des gegen die c-Myc-Sequenz gerichteten und kommerziell erhältlichen Antikörpers 9E10.

Die verschiedenen Spaltprodukte des amyloidogenen und des nicht-amyloidogenen Prozessierungsweges wurden durch spezifische Antikörper und durch die Größe bzw. Größenunterschiede der Fragmente detektiert und identifiziert. Die amyloidogene Prozessierung von APP führt durch den β -Sekretase-Schnitt zu dem im Zellkultur-Überstand detektierbaren APP β und dem im Lysat nachweisbaren C99 (β CTF). Die aus *wildtyp* APP und dem APP_{swe} hervorgehenden APP β Fragmente (~100-110 kDa) unterscheiden sich nur durch die beiden C-terminalen Aminosäuren, KM in der *wildtyp* Form und NL bei der schwedischen Mutante. Die Detektion dieser beiden Aminosäuren durch die Antikörper 192wt bzw. 192swe ermöglichte den spezifischen Nachweis von APP β_{wt} bzw. APP β_{swe} . Sowohl das ca. 12 kDa große C99 als auch das durch die γ -Sekretase-Prozessierung von C99 ins Zytosol freigesetzte AICD wurden wiederum mit dem Antikörper 9E10 nachgewiesen. Das parallel sezernierte A β -Peptid (A β) wurde entweder durch den Antikörper 26D6 oder durch den Antikörper IC16, beide gegen den N-terminalen Bereich der A β -Sequenz gerichtet, nachgewiesen. Die A β -Peptide zeichnen sich durch eine C-terminale Sequenzvariabilität aus. Daher wurde mittels ELISA die A β -Gesamtmenge in die entstandenen A β 40- und A β 42-Mengen aufgeschlüsselt. Dazu wurden der A β 40-spezifische Antikörper BAP24 bzw. der A β 42-spezifische Antikörper BAP15 als Detektionsantikörper verwendet.

Im nicht-amyloidogenen Weg entstehen durch den α -Sekretase-Schnitt das sezernierte APP α (~100-110 kDa) und das im Lysat nachweisbare C-terminale Fragment C83 (α CTF). Das im Vergleich zum APP β C-terminal etwas längere APP α enthält zusätzlich die N-terminalen 16 Aminosäuren der A β -Sequenz und konnte somit durch die beiden Antikörper 26D6 und IC16 vom APP β unterschieden werden. C83 (~10 kDa) wurde wie C99 mit dem Antikörper 9E10 detektiert und durch das etwas kleinere Molekulargewicht vom C99 (~12 kDa) abgegrenzt. Die γ -Sekretase-Prozessierung von C83

erzeugt wiederum das ins Zytosol freigesetzte AICD und das in den Überstand sezernierte p3-Peptid. Das aus dem C83 generierte AICD ist identisch mit dem aus C99 freigesetzten AICD und wurde wiederum mit dem Antikörper 9E10 nachgewiesen. Die Detektion des p3-Peptids war in dieser Arbeit nicht möglich.

Die Gesamtmenge der APPs-Sekretion, also die Summe aus APPs α und APPs β , wurde mit Hilfe des gegen die N-terminale Domäne des APP gerichteten Antikörpers 63D im Überstand gemessen.

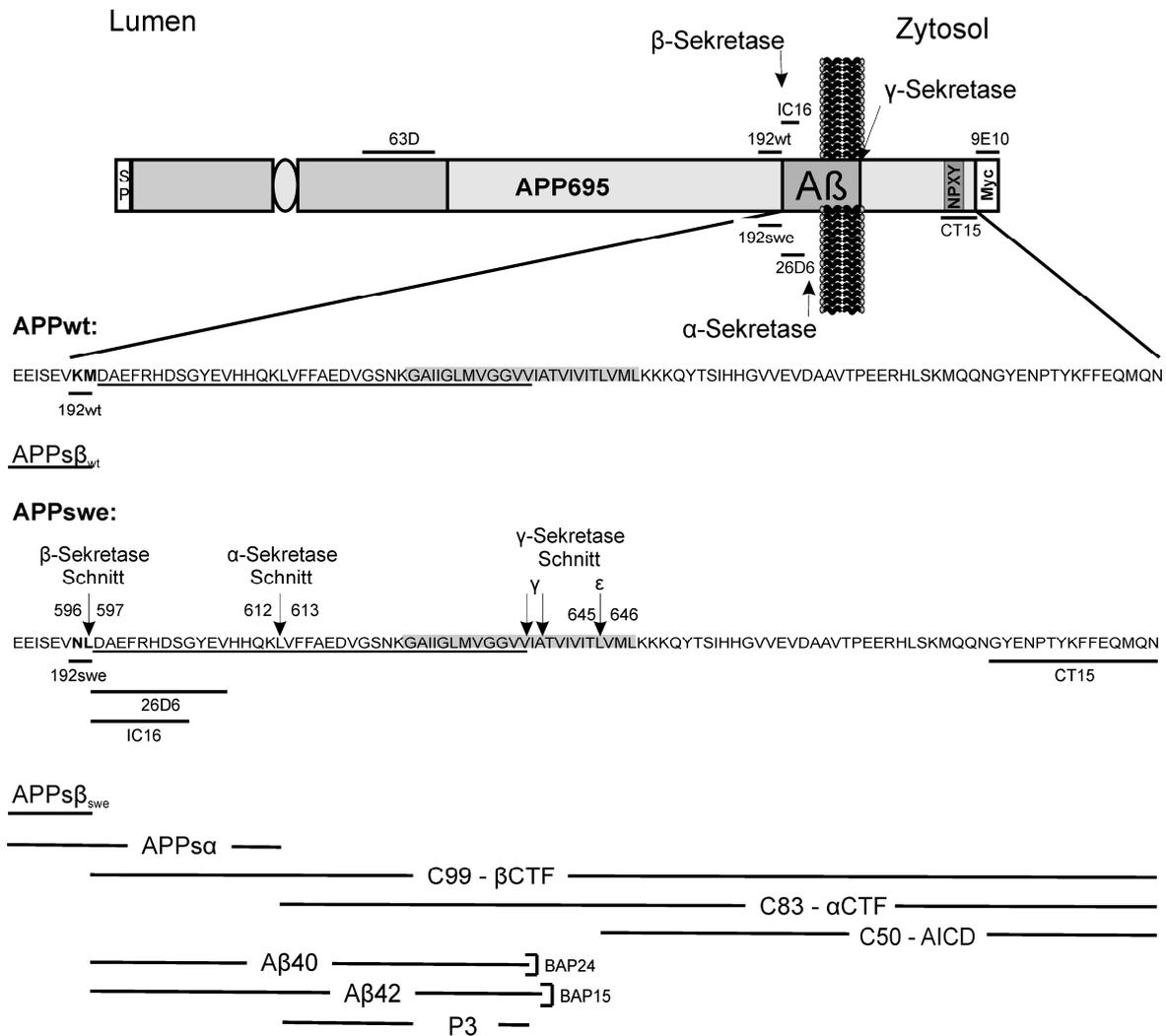


Abb. 9: Schematische Darstellung von APP, der Prozessierungsfragmente und der zur Detektion verwendeten Antikörper.

Das APP besteht aus einer großen luminalen Domäne mit einem N-terminalen Signalpeptid, einer einzelnen Transmembrandomäne und einem 47 AS großen zytosolischen Schwanz. Die Lage des A β -Peptids und der Sekretase-Schnittstellen im APP sind gekennzeichnet. Zudem ist das bei einigen APP-Konstrukten C-terminal angefügte c-Myc-Epitop dargestellt. Zur Verdeutlichung der durch α -, β - und γ -Sekretase-Prozessierung von APP entstehenden Fragmente ist der Sequenzbereich von 8 AS N-terminal der β -Sekretase-Schnittstelle bis zum C-Terminus für das *wildtyp* APP und das schwedische APP hervorgehoben und im Einbuchstabencode wiedergegeben. Durch die schwedische Mutation werden die beiden Aminosäuren unmittelbar N-terminal der β -Sekretase-Schnittstelle ausgetauscht (K595N, N596L). Die Transmembrandomäne ist grau unterlegt und der A β 40-Sequenzbereich unterstrichen dargestellt. Die Lage der β -Sekretase-Schnittstelle an Position 1 des A β -Peptids (die angegebenen AS Nummern beziehen sich auf die APP695-Sequenz) und die α -Sekretase-Schnittstelle zwischen AS 16 und 17 des A β -Peptids sind eingezeichnet. Die γ -Sekretase schneidet APP mehrfach in der Transmembrandomäne. Durch den ϵ -Schnitt wird wahrscheinlich zuerst ein A β 49-Peptid erzeugt, welches nachfolgend durch weitere γ -Sekretase-Schnitte zu A β 42 und A β 40 verkürzt wird. Die durch die APP-Prozessierung entstehenden Fragmente sind entsprechend ihrem Sequenzbereich dargestellt. Zusätzlich sind die Epitope der verwendeten Antikörper angegeben.

3.2 Unterschiedliche Mechanismen reduzieren die A β -Sekretion der internalisierungsdefizienten NPXY-Deletionsmutanten von wildtyp APP und schwedischem APP

Zunächst sollte der Einfluss der Internalisierung von der Zelloberfläche in die endozytotischen Kompartimente auf die APP-Prozessierung untersucht werden. Zur Herstellung von Endozytose-defizienten APP695wt- und APPswe-Expressionskonstrukten wurde die zytoplasmatische Konsensussequenz der Clathrin-vermittelten Internalisierung von Zelloberflächenproteinen, NPTY, entfernt (Δ NPTY)(90). Da die NPTY-Domäne von APP im Epitop des gegen die letzten 15 AS von APP gerichteten Antikörpers CT15 liegt, wurde zur Detektion ein c-Myc-Tag an den C-Terminus von APP angefügt.

Die stabilen Massenkulturen der APP695myc bzw. APP695 Δ NPTYmyc überexprimierenden CHO-KI-Zellen zeigten im Western Blot eine gleichmäßige Expression (Abb. 10B, 1. Feld). Die Entfernung des Endozytosesignals NPTY verursachte einen starken Anstieg der APPs α - und der APPs-Sekretion (Abb. 10B, 2. und 3. Feld). Gleichzeitig wurde die β -Sekretase-Spaltung und somit die APPs β _{wt}-Sekretion durch die Entfernung des NPTY-Motivs stark erniedrigt (Abb. 10B, 4. Feld). Die Abnahme der β -Sekretase-Prozessierung verursachte zudem eine Verminderung der C99-Menge (Abb. 10B, 5. Feld, obere Bande) und infolgedessen eine starke Abnahme der A β -Sekretion (Abb. 10B, 6. Feld).

Frühere Arbeiten haben bereits gezeigt, dass die Entfernung der Konsensussequenz NPTY die Internalisierung von APP inhibiert und so eine starke Akkumulation von APP an der Zelloberfläche verursacht. Dabei führt die Erhöhung der Substratkonzentration zu einer verstärkten α -Sekretase-Prozessierung von APP, wodurch die APPs- und APPs α -Sekretion stark erhöht wird (100, 123). Demzufolge deutet die gleichzeitige Abnahme der APPs β _{wt}-Sekretion der internalisierungsdefizienten APP-Proteine (Abb. 10B, 4. Feld) darauf hin, dass der größte Teil der β -Sekretase-Prozessierung in endozytotischen Kompartimenten erfolgt. Dies führt zu der Annahme, dass die starke Verminderung der A β -Produktion in Folge der erniedrigten Internalisierung von *wildtyp* APP hauptsächlich durch die reduzierte β -Sekretase-Prozessierung verursacht wird.

Untersuchungen von schwedischem APP haben gezeigt, dass diese Mutation die A β -Produktion um das 6-8fache erhöht ((37, 108, 304) siehe auch Abb. 19). APPswe ist im Vergleich zum *wildtyp* APP ein besseres Substrat der β -Sekretase. In Folge der verstärkten β -Sekretase-Spaltung kommt es zu einer Erhöhung der C99-Menge (vergleiche CTF-Verhältnis in Abb. 10C, 5. Feld mit Abb. 10B, 5. Feld, oder auch Abb. 19), deren Prozessierung durch die γ -Sekretase zu einer verstärkten A β -Sekretion führt. Wie beim *wildtyp* APP (Abb. 10B) verursachte die Entfernung des Endozytosesignals NPTY im APPswe (APP695swe Δ NPTYmyc) eine verstärkte APPs α -Sekretion (Abb. 10C, 3. Feld). Infolgedessen stieg auch die Freisetzung der Gesamt-APPs-Menge stark an (Abb. 10C, 2. Feld). Im Gegensatz zum *wildtyp* APP wurde die β -Sekretase-Spaltung von APP695swe durch die Entfernung des NPTY-Motivs nur geringfügig beeinträchtigt (Abb. 10C, 4. Feld). Dagegen waren die durch das β -Sekretase-*Shedding* erzeugten C-terminalen Fragmente (C99) in APP695swe Δ NPTYmyc

Entgegen vorherigen Veröffentlichungen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Veränderungen in der Konsensussequenz für die Clathrin-vermittelten Internalisierung von schwedischem APP wie beim *wildtyp* APP eine starke Erniedrigung der A β -Sekretion hervorrufen. Interessanterweise bestätigen diese Ergebnisse, dass der größte Teil des β -Sekretase-Schnittes von APP_{swe} im späten sekretorischen Transportweg erfolgt, da die APP_{swe}-Sekretion ungeachtet der inhibierten Internalisierung weitgehend unverändert blieb (280). Die Reduzierung der A β -Sekretion wurde somit nicht durch eine verminderte β -Sekretase-Prozessierung hervorgerufen, sondern ist die direkte Folge der erniedrigten C99-Menge. Die beobachtete erhöhte APP α -Sekretion deutet auf eine verminderte Endozytose der NPTY-Deletionkonstrukte von APP_{swe} hin. Die Akkumulation von APP_{swe} an der Zelloberfläche würde zu einem Anstieg der Substratkonzentration der α -Sekretase führen. Diese wiederum hätte eine verstärkte α -Sekretase-Prozessierung von APP695_{swe} und somit den detektierten Anstieg der APP α -Sekretion zur Folge.

3.3 Verminderte C99-Fragmente und A β -Sekretion der NPTY-Deletionsmutanten von APP770_{swe}

Während in Neuronen überwiegend APP695 exprimiert wird, sind die beiden längeren Isoformen APP751 und APP770 die häufigsten Isoformen in nicht-neuronalen Zellen. Um einen Isoform spezifischen Effekt auszuschließen, wurden zusätzlich APP770_{swe}myc bzw. APP770_{swe} Δ NPTYmyc Expressionskonstrukte kloniert und durch virale Transfektion überexprimierende CHOKI-Massenkulturen hergestellt. Die Zellpools wurden auf gleichmäßige Expression untersucht (Abb. 11, 1. Feld) und das Prozessierungsmuster analysiert. Die Analyse wurde zur Quantifizierung bis zu sechsmal wiederholt. Der Vergleich der beiden Zellpools führte zu ähnlichen Ergebnissen wie bei den zuvor analysierten APP695_{swe}myc überexprimierenden Zellen. Die Entfernung der NPTY-Domäne verursachte im Vergleich zu APP770_{swe}myc eine 4fache Steigerung der APP α -Sekretion in APP770_{swe} Δ NPTYmyc überexprimierenden Zellen (Abb. 11A, 3. Feld, B). Die β -Sekretase-Spaltung und somit die APP_{swe}-Sekretion wurde durch die Deletion der NPTY-Domäne leicht, aber statistisch nicht signifikant erniedrigt (Abb. 11 A, 4. Feld, C). Resultierend aus der starken Erhöhung der APP α -Sekretion und unveränderten APP_{swe}-Freisetzung ergab sich eine erhöhte Gesamt-APPs-Menge (Abb. 11 A, 2. Feld). Während die erhöhte α -Sekretase-Prozessierung die C83-Menge in den APP770_{swe} Δ NPTYmyc exprimierenden Zellen erhöhte, waren die C99-Fragmente, entgegen den Erwartungen, um mehr als 50% erniedrigt (Abb. 11 A, 5. Feld, D). Die verminderte C99-Menge in APP770_{swe} Δ NPTYmyc exprimierenden Zellen korrespondierten mit einer über 50%igen Abnahme der A β -Sekretion gegenüber APP770_{swe}myc exprimierenden Zellen (Abb. 11 A, 6. Feld, E). Auf Grund dieser Ergebnisse konnte ein Isoform-spezifischer Effekt der fehlenden NPTY-Domäne auf die APP-Prozessierung ausgeschlossen werden. Zudem bestätigten sie unsere Beobachtung, dass die

Deletion des NPTY-Motivs von APP_{swe} trotz unveränderter APP_{swe}-Sekretion eine starke Abnahme der C99-Menge und der A β -Sekretion verursacht (Abb. 11A, 4. Feld).

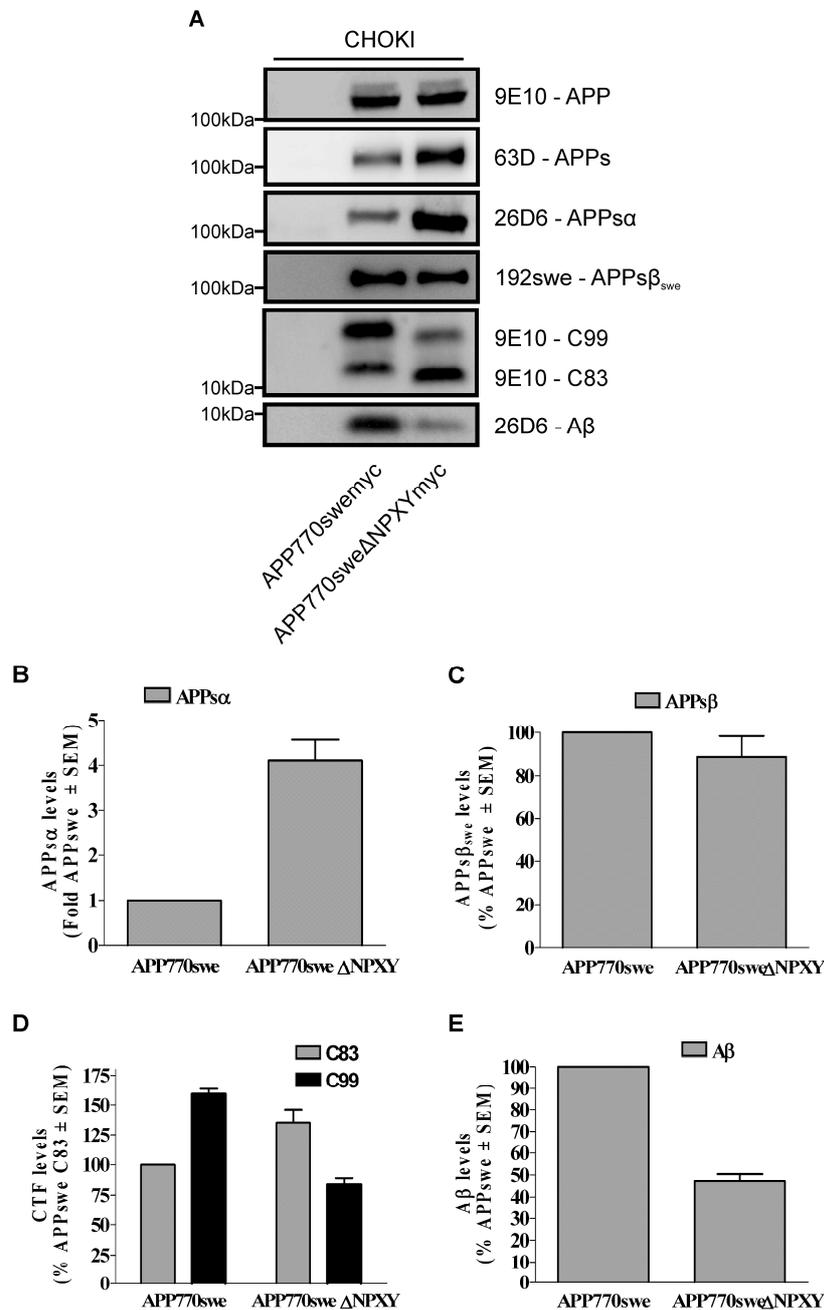


Abb. 11: Die Deletion der NPTY-Domäne von APP770swe verringert sowohl die C99-Menge als auch die A β -Sekretion bei gleichzeitig unveränderter β -Sekretase-Prozessierung.

A Vergleich des Prozessierungsmusters der längsten APP-Isoform, APP770swe, mit der NPTY-Deletionsmutante APP770swe Δ NPTYmyc. 2 Tage nach der Aussaat wurden die Medien der stabil überexprimierenden Zellen gewechselt. Anschließend wurden die für weitere 24 Std. konditionierten Medien und die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Zellen auf gleichmäßige APP-Expression untersucht. Die Deletion der NPTY-Domäne verursachte eine 4fache Erhöhung der APPs α -Sekretion (B). Da gleichzeitig die β -Sekretase-vermittelte APPs β_{swe} -Sekretion durch die Entfernung der NPTY-Domäne nur geringfügig beeinflusst wurde (C), führte der starke Anstieg der APPs α -Freisetzung auch zu einem Anstieg der Gesamt-APPs-Menge. Ungeachtet der unveränderten APPs β_{swe} -Freisetzung verursachte die Deletion des Internalisierungssignals NPTY sowohl eine mehr als 50 %ige Abnahme der C99-Menge (D) als auch der A β -Sekretion (E).

3.4 Die Deletion der NPTY-Domäne verursacht eine Akkumulation von APP_{swe} an der Zelloberfläche

Die bisherige Interpretation der beobachteten Eigenschaften von APP Δ NPTY-Konstrukten beruhte auf der Annahme, dass diese Domäne die Internalisierung von APP-Zelloberflächenmolekülen vermittelt. Untersuchungen der Sortierungssignale von APP haben gezeigt, dass insbesondere die NPTY-Domäne für die Endozytose von *wildtyp* APP verantwortlich ist (98, 100). Punktmutationen innerhalb des Motivs inhibierten die Internalisierung von *wildtyp* APP und verursachten eine Akkumulation von APP an der Zelloberfläche (100).

Um zu untersuchen, ob die Deletion der NPTY-Domäne auch im schwedischen APP zu einer starken Anhäufung von APP_{swe} an der Zelloberfläche führt, wurde die Oberflächenmenge von APP mittels Oberflächenflächenbiotinylierung bestimmt. Analog zum *wildtyp* APP verursachte die Deletion der NPTY-Domäne eine starke Akkumulation von APP770_{swe}myc an der Plasmamembran (Abb. 12). Interessanterweise akkumulierte dabei nur die maturierte Form von APP an der Oberfläche (Abb. 12, obere Bande). Gleichzeitig wurde aber keine Erhöhung der maturierten APP-Formen in den Lysaten beobachtet, so dass das Verhältnis von maturiertem zu nicht-maturiertem APP_{swe} unverändert blieb (Abb. 12, obere Bande).

Die Deletion des NPTY-Motivs blockierte somit einerseits die Internalisierung von APP_{swe}, hatte aber andererseits keinen Einfluss auf die Reifung von APP. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beobachteten Veränderungen der APP-Prozessierung durch die Entfernung der NPTY-Domäne größtenteils auf die Inhibition der APP-Endozytose zurückzuführen sind.

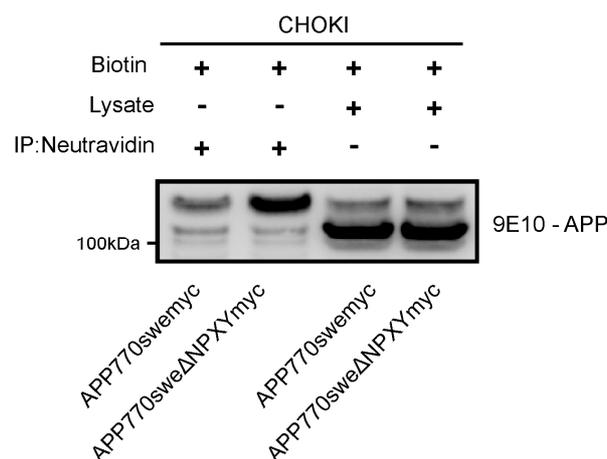


Abb. 12: Die Entfernung der NPTY-Domäne im APP770_{swe} verursacht eine Akkumulierung von maturiertem APP an der Zelloberfläche

APP770_{swe}myc bzw. APP770_{swe} Δ NPTYmyc überexprimierende CHOKI-Zellen wurden mit Biotin oberflächenmarkiert. Nach der Immunpräzipitation mit Neutravidin-Beads wurden die markierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und APP mit dem Antikörper 9E10 nachgewiesen. Die Deletion der NPTY-Domäne im APP770_{swe} verursachte eine starke Akkumulation von maturiertem APP an der Zelloberfläche. Die Kontrollanalyse der Lysate zeigte eine gleichmäßige Expression der APP-Konstrukte. Zudem konnte keine Veränderung der maturierten APP770_{swe}-Menge durch die Deletion des NPTY-Motivs beobachtet werden.

3.5 Punktmutationen der Internalisierungsdomäne YENPTY verursachen bei gleichbleibender APPs β_{swe} -Sekretion eine starke Reduktion der C99- und A β -Mengen

Der Bereich um das NPTY-Motiv von APP, GYENPTY, besteht theoretisch aus drei voneinander unabhängigen Domänen - NPTY, YENP und GY. Diese Überlappungen mehrerer eigenständiger Signalsequenzen haben uns dazu bewogen, die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren der GYENPTY-Domäne von APP zu untersuchen. Zur Ermittlung des Einflusses einzelner Aminosäuren auf die APP-Prozessierung wurden einzelne Aminosäuren des GYENPTY-Motivs gegen Alanin ausgetauscht und anschließend stabil überexprimierende CHOKI-Zellen durch virale Infektion gewonnen. Die Untersuchung des APP-Metabolismus zeigte einen starken Anstieg der APPs-Sekretion bei allen Mutationen (Abb. 13B, 2. Feld). Dabei wurde deutlich, dass der Anstieg der APPs-Sekretion durch unterschiedliche Effekte der Mutationen auf die α - und β -Sekretase-Prozessierung hervorgerufen wurde. Während die G681A Mutation die APPs α -Sekretion nur leicht erhöhte, wurde sie durch alle anderen Mutationen um ein Vielfaches gesteigert (Abb. 13B, 3. Feld, Abb. 14A). Während die APPs β_{swe} -Sekretion durch die Y682A oder die P685A Mutation im YENPTY-Motiv im Vergleich zum APP695swemyc leicht anstieg, wurde sie durch die Punktmutationen N684A, Y687A und die Doppelmutation Y682A/P685A geringfügig erniedrigt (Abb. 13 B, 4. Feld, Abb. 14B). Wie zuvor bei den NPTY-Deletionsmutanten deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die β -Sekretase-Prozessierung von APPs β_{swe} weitgehend unabhängig vom Internalisierungssignal YENPTY ist. Erstaunlicherweise wurde durch die Mutation des N-terminal vor dem YENPTY gelegenen Glycins 65% mehr APPs β_{swe} sezerniert als von APP695swemyc exprimierenden Zellen (Abb. 13 B, 4. Feld, Abb. 14B). Zusammen mit dem leichten Anstieg der APPs α -Sekretion erklärt diese Steigerung der APPs β_{swe} -Sekretion die starke Erhöhung der Gesamt-APPs-Menge in APP695swe-G681A-myc exprimierenden CHOKI-Zellen (Abb. 13A, 2. Feld, Abb. 14C).

Die Analyse der APP-CTFs in diesen Zellen zeigte einen ähnlichen Effekt der Punktmutationen wie zuvor bei der Deletion der gesamten NPTY-Domäne. So verursachte die G681A Mutation im APP695swemyc neben dem Anstieg der APPs β_{swe} -Sekretion auch eine Erhöhung der C99-Fragmente (Abb. 13B, 5. Feld, Abb. 14D). Dagegen wurde die C99-Menge durch die anderen Mutationen stark erniedrigt (Abb. 13B, 5. Feld, Abb. 14D), obwohl die β -Sekretase-vermittelte APPs β_{swe} -Sekretion gleichzeitig nur wenig beeinträchtigt wurde (Abb. 13 B, 3. Feld, Abb. 14B). Zudem waren die C83-Mengen leicht erhöht (Abb. 13B, 5. Feld, Abb. 14D). Im Vergleich zu APPs β_{swe} führten die Mutationen in der YENPTY-Domäne im APPs β_{swe} somit zu einem invertierten C99 zu C83-Verhältnis (siehe Abb. 13A, 5. Feld). Übereinstimmend mit den NPTY-Deletionskonstrukten war die A β -Sekretion der Punktmutanten des YENPTY-Motivs stark erniedrigt (siehe Abb. 13B, 6. Feld). Quantifizierungen der A β 40- und A β 42-Mengen von konditioniertem Überstand durch ELISA zeigten eine parallele Abnahme von A β 40 und A β 42 um ca. 50 % (Abb. 14E). Die A β 40- und A β 42-Freisetzung aus

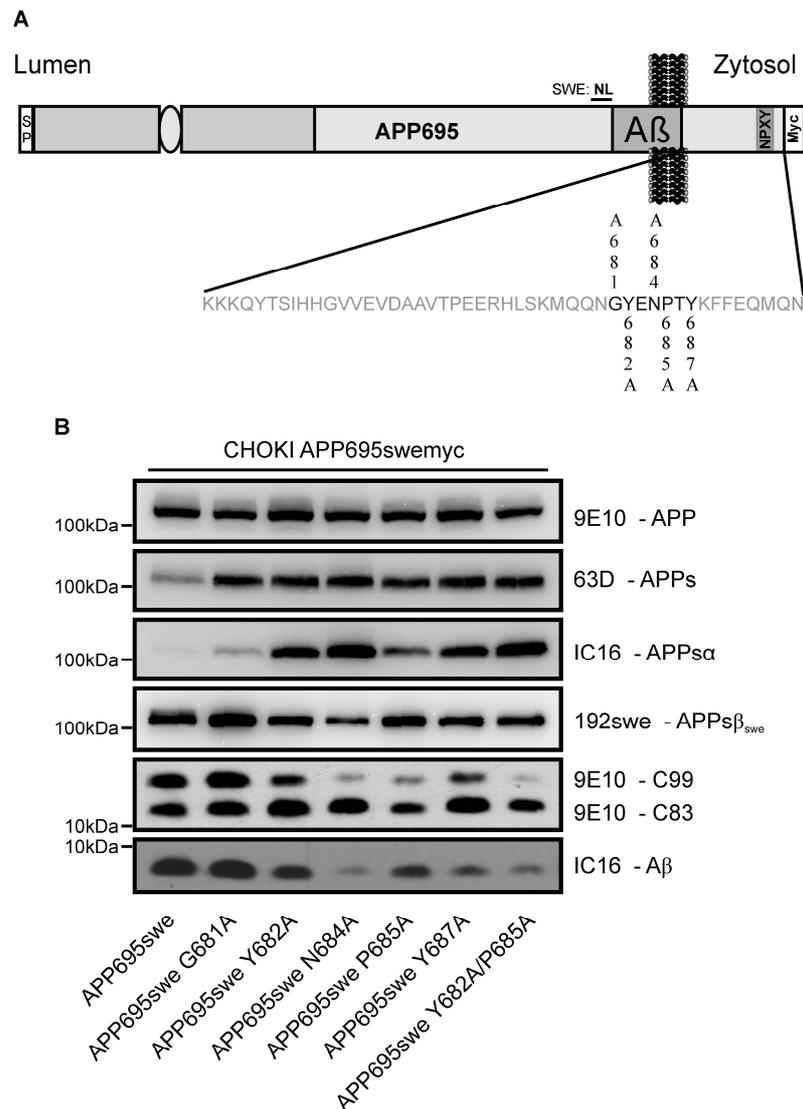


Abb. 13: Punktmutationen innerhalb des Endozytose-Motivs von APP_{swe} haben keine signifikanten Einfluss auf die β -Sekretase-Prozessierung, verursachen aber eine starke Abnahme der A β -Sekretion.

A Schematische Darstellung von APP695swemyc. Unmittelbar N-terminal des A β -Peptids ist der doppelte Aminosäureaustausch der schwedischen Mutation kenntlich gemacht. Zudem sind die 47 zytosomatischen Aminosäuren vergrößert und im Einbuchstabencode wiedergegeben. Die im Bereich des Internalisierungssignals eingefügten Punktmutationen sind fett dargestellt und anhand der APP695-Nummerierung bezeichnet.

B Die in A beschriebenen Expressionskonstrukte wurden zur Herstellung von stabil überexprimierenden CHOKI-Zellen verwendet. Das Medium der gleichmäßig ausgesäten Zellen wurde nach 48 Std. gewechselt und für weitere 24 Std. konditioniert. Anschließend wurden die Lysate und die Zellüberstände mit den angegebenen Antikörpern im Western Blot analysiert.

Im Vergleich zum APP695swemyc erhöhten die Mutationen innerhalb der YENPTY-Domäne signifikant die APPs α -Sekretion, während keine dieser Mutationen einen eindeutigen Effekt auf die APPs β_{swe} -Freisetzung zeigten. Nur die G681A Mutation führte zu einem kräftigen Anstieg der APPs β_{swe} -Sekretion. Die Detektion der CTFs zeigte, dass die C83-Mengen durch den Anstieg der APPs α -Sekretion leicht erhöht waren. Auf der anderen Seite waren die C99-Fragmente trotz unveränderter APPs β_{swe} -Sekretion durch die Punktmutationen innerhalb der YENPTY-Domäne stark erniedrigt. Der Reduktion der C99-Menge folgend, zeigten die Mutationen des YENPTY-Motivs auch eine starke Abnahme der A β -Sekretion.

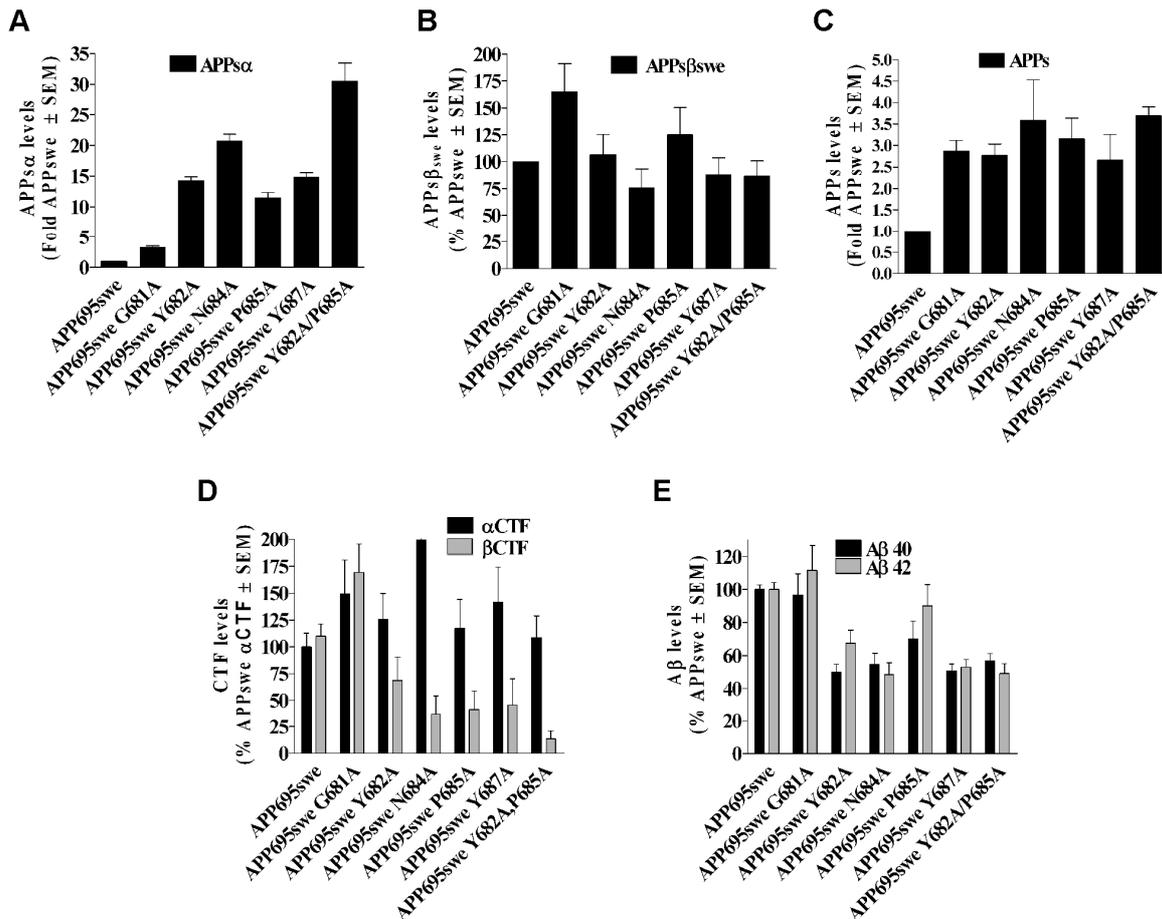


Abb. 14: Quantifizierung des Prozessierungsmusters der APP695swemyc-Konstrukte mit Punktmutationen in der YENPTY-Domäne

Quantifizierung zu den in Abb. 13 gezeigten Ergebnissen. Die Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler aus drei bis sechs Experimenten berechnet und zusätzlich an die APP-Expressionsmenge der stabil überexprimierenden CHOKI-Zellkulturlinien angeglichen.

A Verglichen mit APPswemyc erhöhten die Punktmutationen im YENPTY-Motiv signifikant die APP α -Sekretion, während **B** kein eindeutiger Effekt einer der Mutationen innerhalb des Endozytosesignals YENPTY auf die APP β_{swe} -Sekretion beobachtet wurde. Nur die G681A Mutation führte zu einem substantiellen Anstieg der APP β_{swe} -Freisetzung. **C** Insgesamt führten somit alle Mutationen innerhalb des YENPTY-Motivs zu einem Anstieg der Gesamt-APPs-Sekretion.

D Die Quantifizierung der CTFs zeigte, dass die C83-Menge durch die erhöhte α -Sekretase-Prozessierung leicht anstieg. Im Gegensatz zum nahezu gleichbleibenden APP β_{swe} waren die C99-Mengen durch die Mutationen innerhalb des Internalisierungssignals YENPTY stark erniedrigt. **E** Die Konzentrationen von A β 40 und A β 42 im konditionierten Medium wurden mittels ELISA gemessen. Der Abnahme von C99 folgend, verursachten die Mutationen des YENPTY-Motivs eine parallele 50 %ige Abnahme der Sekretion beider A β -Spezies.

APP695swe ist demnach deutlich von dem intrinsischen Endozytose-Signal abhängig. Obwohl die β -Sekretase-Spaltung von APPswe durch die Mutationen fast nicht beeinträchtigt wurde, verursachte die starke Erniedrigung der C99-Level eine 50 %ige Reduktion der A β -Sekretion.

Die A β -Produktion von Zellen, die die APPswe-Punktmutationen ohne C-terminalen Myc-Tag stabil überexprimierten, war ebenfalls reduziert. Dies zeigt, dass die beobachteten Effekte nicht durch den angehängten *Tag* verursacht wurden (Daten nicht gezeigt)

3.6 Die C-terminale Verkürzung von APP_{swe} erniedrigt die A β -Produktion bei unveränderter APP_{swe} β -Sekretion

Unsere Beobachtung, dass Mutationen innerhalb der YENPTY-Domäne von APP_{swe} die A β -Sekretion beeinträchtigen, steht im Widerspruch zu früheren Berichten, in denen die Entfernung des gesamten zytoplasmatischen Schwanzes einschließlich des YENPTY-Motivs keinen Einfluss auf die A β -Sekretion in transient transfizierten Zellen hatte (37, 108).

Zur Untersuchung der Diskrepanz zwischen dem gängigen Modell der APP_{swe}-Prozessierung und unseren Beobachtungen wurden C-terminal verkürzte APP_{695swe} Expressionskonstrukte kloniert und mittels retroviraler Infektion stabile CHOKI-Massenkulturen gewonnen. Die Konstrukte wurden anhand der Anzahl der verbleibenden zytoplasmatischen Aminosäuren benannt (Abb. 15A). Dabei stimmten APP_{695swe-tailless} und APP_{695swe+4} mit den bei den vorigen Untersuchungen der APP_{swe}-Prozessierung verwendeten Expressionskonstrukten überein und wurden zur Reproduktion dieser Ergebnisse eingesetzt (37, 108).

Die Entfernung der C-terminalen sieben Aminosäuren von APP_{695swe} (APP_{swe+40}) hatte keinen Einfluss auf die APP-Prozessierung. Dagegen löste die zusätzliche Entfernung der GYENPTY-Domäne von schwedischem APP (APP_{swe+32}) eine starke Erhöhung sowohl der APP α - als auch der APP β -Sekretion aus (Abb. 15B, 2. und 3. Feld). Dies deutet darauf hin, dass die durch die Beseitigung des Endozytose-Motivs verursachte Akkumulation von APP_{swe} an der Zelloberfläche eine erhöhte α -Sekretase-Prozessierung induzierte. Im Gegensatz dazu hatte die Entfernung der YENPTY-Domäne, genau wie bei den Punktmutanten und der Deletion des NPTY-Motivs, keinen Einfluss auf die β -Sekretase-vermittelte Freisetzung von APP_{swe} β (Abb. 15B, 4. Feld). Dennoch war die A β -Sekretion stark erniedrigt (Abb. 15B, 5. Feld). Die weitere Verkürzung des zytoplasmatischen Schwanzes bis auf vier Aminosäuren unmittelbar nach der Membran (APP_{swe+4}) verursachte keine weitere Veränderung des APP-Prozessierungsmusters. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aminosäuren zwischen Transmembrandomäne und YENPTY-Domäne nicht an der Vermittlung der Endozytose beteiligt sind und keinen Einfluss auf die Prozessierung von APP_{swe} haben. Die vollständige Entfernung aller zytosolischen Aminosäuren (APP_{swe-tailless}) oder sogar die C-terminale Verkürzung bis zur ϵ -Schnittstelle der γ -Sekretase innerhalb der Transmembrandomäne (APP_{swe-3}) resultierte in einer weiteren Reduktion der A β -Sekretion (Abb. 15B, 5. Feld). Diese Abnahme der A β -Produktion wurde im Wesentlichen durch eine Abnahme der β -Sekretase-Prozessierung hervorgerufen (Abb. 15B, 4. Feld). Zudem verursachte die komplette Entfernung des zytosolischen Schwanzes eine Verringerung der APP α - und APP β -Sekretion (Abb. 15B, 2. und 3. Feld).

Die Unabhängigkeit der APP_{swe} β -Sekretion von dem Endozytosesignal bestätigte die beobachtete β -Sekretase-Prozessierung von APP_{swe} im sekretorischen Transportweg (280). Die A β -Produktion korreliert dabei aber nicht mit der APP_{swe} β -Menge, da die A β -Sekretion der Endozytose-defizienten Mutanten um mehr als 50% reduziert war. Der Rückgang der APP_{swe} β -Sekretion durch die vollständige Entfernung der zytoplasmatischen Domäne wird vermutlich durch die instabile

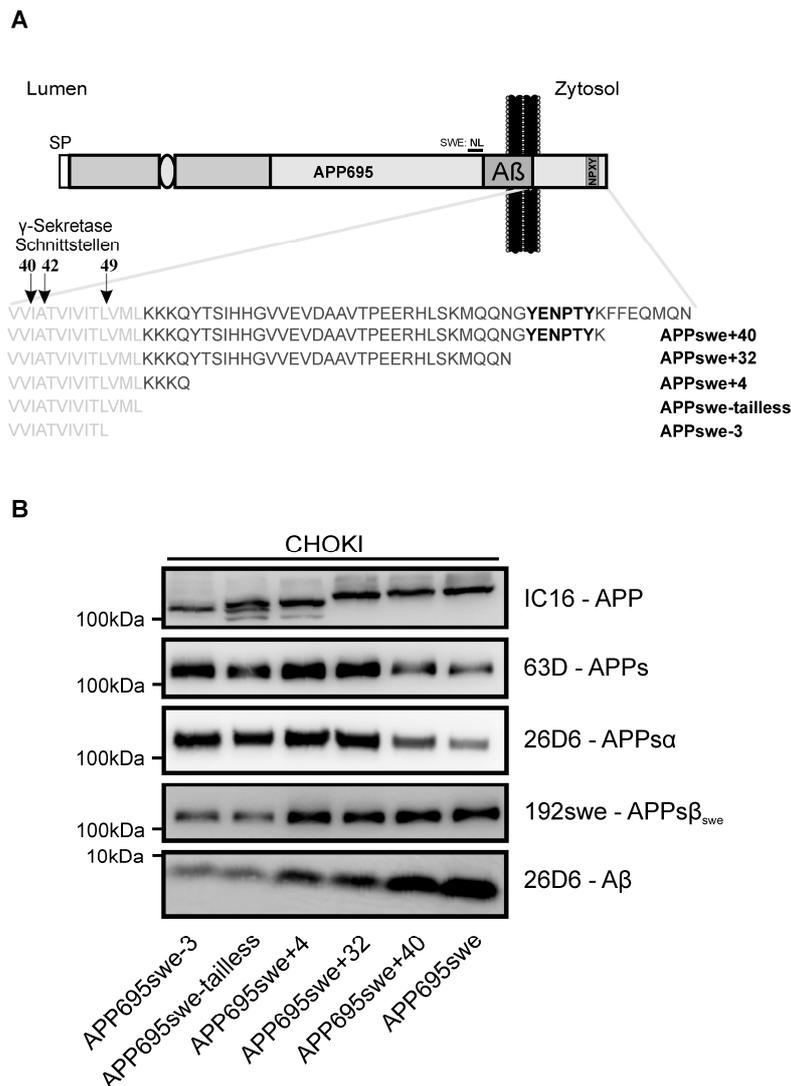


Abb. 15: Stark erniedrigte A β -Produktion bei unveränderter APPs β _{swe}-Sekretion von C-terminal verkürztem schwedischem APP

A Schematische Darstellung der C-terminalen Verkürzungen von APP695swe. Die Sequenz der zyttoplasmatischen Domäne ist vergrößert dargestellt und im Einbuchstabencode wiedergegeben. Die Position des ϵ -Schnittes nach Aminosäure 49 und die A β 40- und die A β 42-Schnittstellen der γ -Sekretase sind dargestellt. Die Expressionskonstrukte wurden anhand der Anzahl der verbleibenden zyttoplasmatischen Aminosäuren benannt.

B Stabile Expression der schrittweise C-terminal verkürzten APPswe-Konstrukte in CHOKI-Zellen deuten darauf hin, dass die β -Sekretase-Spaltung von APP695swe unabhängig vom zyttoplasmatischen Schwanz, aber abhängig von der stabilen Integration von APPswe in die Zellmembran ist. Die Entfernung der C-terminalen 7 AS hatte keinen Einfluss auf die APP-Prozessierung. Dagegen führte die Verkürzung der letzten 15 AS einschließlich des YENPTY-Motivs (APPswe+32) zu einem starken Anstieg der APPs- und APPs α -Sekretion, hatte aber keinen Einfluss auf die Freisetzung von APPs β _{swe}. Dessen ungeachtet verringerte sich jedoch die A β -Produktion durch die Entfernung der YENPTY-Domäne. Die weitere C-terminale Verkürzung bis auf die ersten vier Aminosäuren unmittelbar nach der Transmembrandomäne von APPswe (APPswe+4) hatte keinen weiteren Einfluss auf die APPswe-Prozessierung. Die zusätzliche Entfernung der positiv geladenen Aminosäuren unmittelbar nach der Transmembrandomäne (APPswe-tailless) verminderte die β -Sekretase-Spaltung und führte zu einer weiteren Reduktion der A β -Sekretion.

Integration der Konstrukte APPswe-tailless und APPswe-3 in die Membran hervorgerufen.

Während die Verkürzung bzw. Entfernung des zytosolischen Schwanzes in früheren Untersuchungen keine Reduktion der A β -Sekretion verursachte (37, 108), führten diese Veränderungen von APPswe in

unseren stabilen Zelllinien zu einer starken Abnahme der A β -Produktion. Diese vorherigen Ergebnisse der APP_{swe}-Prozessierung konnten hier somit trotz gleicher cDNA-Konstrukte nicht reproduziert werden. Zusätzlich bestätigen die Ergebnisse der C-terminal verkürzten APP_{swe}-Konstrukte, dass die Reduzierung der A β -Sekretion in APP_{swe} Δ NPXYmyc exprimierenden Zellen kein artifizieller Nebeneffekt des angefügten Myc-Tags ist.

3.7 Inhibition der lysosomalen Aktivität verursacht einen starken Anstieg der C83-Menge, aber keine Stabilisierung der C99-Fragmente

In der amyloidogenen Prozessierung ist die Entstehung von C99 der Freisetzung von A β vorgelagert. Somit bestimmt die Häufigkeit der β -Sekretase-Prozessierung von APP die Substratmenge der γ -Sekretase und infolgedessen die Produktion des A β -Peptids. Eine bestimmte Menge APP_s β führt dabei zur gleichen Anzahl an C99-Fragmenten.

Ungeachtet der unveränderten APP_s β _{swe}-Sekretion waren die C99-Fragmente in Zellen, die internalisierungsdefizientes APP_{swe} exprimierten, in unseren Untersuchungen stark reduziert. Die parallele Abnahme der C99-Fragmente und der A β -Sekretion in diesen Zellen deutet darauf hin, dass die Reduzierung der C99-Menge den Rückgang der A β -Produktion verursachte. In weiteren Experimenten sollte daher die Ursache der verminderten C99-Fragmente in APP695_{swe} Δ NPTYmyc exprimierenden CHOKI-Zellen untersucht werden.

Zunächst wurde angenommen, dass Mutationen im YENPTY-Motiv die Erniedrigung der C99-Menge durch eine schnellere Metabolisierung der entstandenen C99-Fragmente verursachen könnten. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass ein großer Teil von APP in Lysosomen degradiert wird und dass die Inhibition der Lysosomen zu einer starken Akkumulation C-terminaler Fragmente von APP führt (303, 305).

Daher wurde zunächst versucht, die C99-Fragmente durch die Behandlung der Zellen mit NH₄Cl zu stabilisieren. NH₄Cl ist eine schwache Base, die von Zellen aufgenommen wird und saure Kompartimente wie die Lysosomen neutralisiert. Diese Neutralisation verursacht eine Inhibition der sauren Hydrolasen. Es wäre zu erwarten gewesen, dass ein schnellerer lysosomaler Abbau der C99-Fragmente durch die Behandlung mit NH₄Cl zu einer verstärkten Akkumulation von C99 in APP695_{swe} Δ NPTYmyc exprimierenden CHOKI-Zellen führt.

Die Behandlung der APP695_{swe}myc bzw. APP695_{swe} Δ NPTYmyc stabil überexprimierenden Zellen mit NH₄Cl hatte keinen signifikanten Einfluss auf die APP Expression (Abb. 16, 1. Feld). Während die α -Sekretase-Prozessierung nicht beeinflusst wurde, führte die Neutralisierung zu einer leichten Abnahme der APP_s β _{swe}-Sekretion (Abb. 16, 2. und 3. Feld). Diese Verringerung des β -Sekretase-

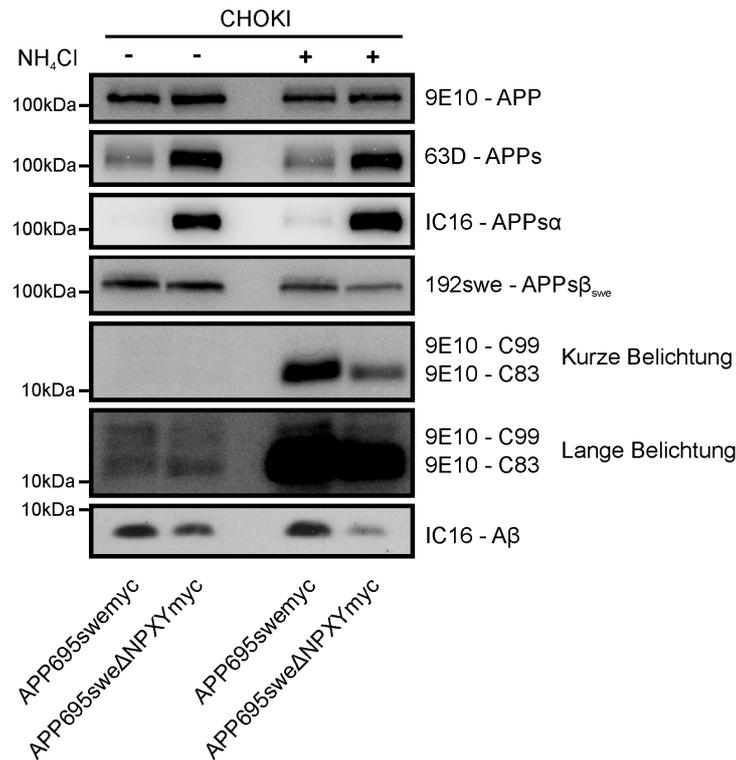


Abb. 16: NH₄Cl stabilisiert die C83-, aber nicht die C99-Fragmente

APP695swemyc und APP695sweΔNPXYmyc stabil überexprimierende CHOKI-Zellen wurden mit 10 mM NH₄Cl behandelt. Die Neutralisierung der sauren Kompartimente verursachte eine geringfügige Verminderung der APPs β_{swe} -Sekretion, wodurch auch die A β -Produktion leicht zurückging. Während die Behandlung eine starke Anreicherung der C83-Fragmente hervorrief, wurde keine Stabilisierung von C99 beobachtet.

Sheddings ist auf das saure pH-Optimum von BACE1 zurückzuführen (110). Die leichte Reduzierung der APPs β_{swe} -Sekretion verursachte eine geringfügige Abnahme der A β -Produktion (Abb16, 7. Feld). Während die NH₄Cl-Behandlung zu einem starken Anstieg der C83-Menge führte, war keine Stabilisierung der C99-Fragmente zu beobachten. Dabei erschwerte die starke Akkumulation von C83 die gleichzeitige Detektion der CTFs unbehandelte Zellen (Abb 16, 6.Feld). Das schwache CTF-Signal der unbehandelten Zellen entsprach dabei den Ergebnissen in Abb. 10C.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch die α -Sekretase-Spaltung von APP erzeugten CTFs im Gegensatz zu den durch β -Sekretase-*Shedding* gebildeten CTFs in Lysosomen abgebaut werden. Interessanterweise war die C83-Menge trotz der stark erhöhten APPs α -Sekretion in den APP695sweΔNPXYmyc exprimierenden Zellen nach der NH₄Cl-Behandlung niedriger als in APP695swemyc exprimierenden Zellen. Dies weist darauf hin, dass die aus APP695sweΔNPXYmyc entstandenen C83-Fragmente weniger effizient von der Zelloberfläche in die lysosomalen Kompartimente transportiert werden als die entsprechenden C83-Fragmente der APPswemyc exprimierenden Zellen.

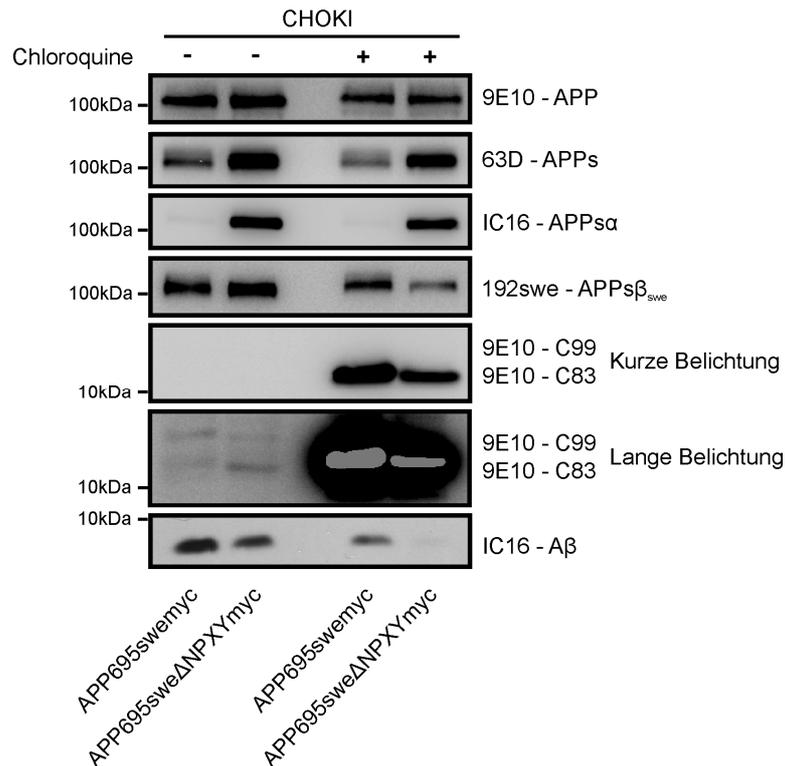


Abb. 17: Chloroquine stabilisiert die C83-Fragmente, hat aber keinen Einfluß auf die C99-Menge

APP695swemyc oder APP695swe Δ NPTYmyc stabil überexprimierende CHOKI-Zellen wurden mit 100 μ M Chloroquine behandelt. Die Neutralisierung saurer Kompartimente verursachte eine Erniedrigung der APPs β_{swe} -Sekretion, wodurch auch die A β -Produktion zurückging. Während die Behandlung eine starke Anreicherung der C83-Fragmente induzierte, wurde keine Stabilisierung von C99 beobachtet.

Die Behandlung der Zellen mit Chloroquine führte zu ähnlichen Ergebnissen. Chloroquine neutralisiert wie NH₄Cl den pH-Wert innerhalb der sauren Vesikel und inhibiert somit die lysosomalen Hydrolasen. Parallel zur APPs β_{swe} -Sekretion sank auch die A β -Freisetzung durch Chloroquine stärker als durch NH₄Cl (Abb. 17, 4. und 7. Feld). Aber wie bei der NH₄Cl-Behandlung resultierte auch die Neutralisierung durch Chloroquine nur in einem starken Anstieg von C83, nicht aber in einer Stabilisierung der C99-Fragmente (Abb. 17, 5. Feld). Erneut zeigte die Inhibition der lysosomalen Degradation durch Chloroquine eine stärkere Akkumulation der α CTFs in den APP695swemyc als in den APP695swe Δ NPTYmyc Zellen (Abb. 17, 5. Feld), obwohl letztere eine höhere α -Sekretase-Prozessierung, d.h. APPs α -Sekretion, aufwiesen (Abb. 17, 3. Feld).

Diese Ergebnisse schließen einen erhöhten lysosomalen Abbau als Ursache der reduzierten C99-Mengen in APP695swe Δ NPTYmyc-Zellen aus.

3.8 Inhibition der γ -Sekretase stabilisiert C99- und C83

Die verminderte C99-Menge der APP695swe Δ NPTYmyc exprimierenden CHOKI-Zellen könnte auch durch eine verstärkte γ -Sekretase-Prozessierung der CTFs verursacht werden. Es wäre vorstellbar, dass C99 durch die Mutationen der NPTY-Domäne ein besseres Substrat der γ -Sekretase ist und dass das entstehende A β -Peptid auf Grund einer veränderten Lokalisierung in geringerem Maße sezerniert wird.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden die APP695swemyc bzw. APP695swe Δ NPTYmyc stabil überexprimierenden CHOKI-Zellen mit dem γ -Sekretase-Inhibitor L-685,458 behandelt. Bei einer erhöhten γ -Sekretase-Prozessierung der C99-Fragmente in APP695swe Δ NPTYmyc-Zellen wäre zu erwarten, dass die γ -Sekretase-Inhibition eine verstärkte Akkumulation von C99 in diesen Zellen verursachen würde.

Die Inhibition der γ -Sekretase durch L-685,458 hatte weder einen Einfluss auf die APP-Expression (Abb. 18, 1. Feld) noch auf die α -Sekretase- oder die β -Sekretase-Prozessierung von APPswe

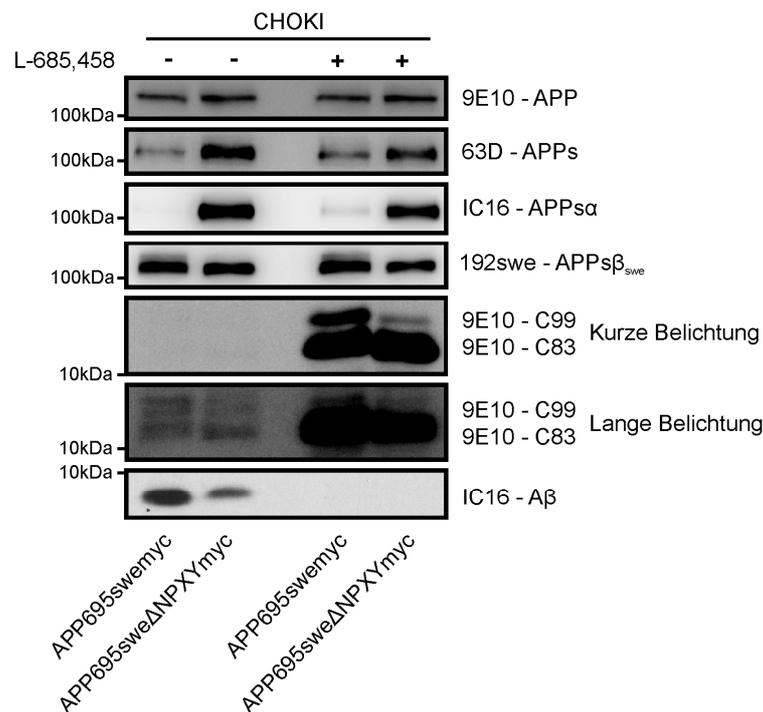


Abb. 18: Inhibition der γ -Sekretase induziert eine Akkumulation der C99- und C83-Fragmente, verursacht aber keine verstärkte Stabilisierung von C99 in APP695swe Δ NPTYmyc exprimierenden Zellen
Behandlung der APP695swemyc bzw. APP695swe Δ NPTYmyc überexprimierenden CHOKI-Zellen mit 2,5 μ M L-685,458, einem γ -Sekretase-Inhibitor, beeinträchtigt weder die α -Sekretase- noch die β -Sekretase-Prozessierung. Dagegen wurde die A β -Produktion durch die γ -Sekretase-Inhibition vollständig unterbunden. Gleichzeitig verursachte die Behandlung mit L-685,458 eine Stabilisierung der CTFs, wobei C83 stärker akkumulierte als C99. Insgesamt wurde das β CTF-Verhältnis der beiden Zelllinien durch die γ -Sekretase-Inhibition nicht verändert, so dass trotz gleicher APPs β_{swe} -Sekretion eine ebenso starke Abnahme der C99-Menge in den APP695swe Δ NPTYmyc-Zellen beobachtet wurde wie bei den unbehandelten Zellen.

(Abb. 18, 3. und 4. Feld). Wie erwartet blockierte der γ -Sekretase-Inhibitor die A β -Sekretion (Abb. 18, 7. Feld). Im Einklang mit früheren Untersuchungen führte die γ -Sekretase-Inhibition sowohl zu einer Akkumulation von C83 als auch von C99, wobei C83 die überwiegend stabilisierte Form war (Abb. 18, 6. Feld). Obwohl C99 viel stärker in APP695swemyc Zellen akkumulierte, wurde auch ein leichter Anstieg in APP695swe Δ NPTYmyc exprimierenden Zellen beobachtet. Insgesamt blieb das C99- Verhältnis zwischen den APP695swemyc- und der APP695swe Δ NPTYmyc-Zellen durch die Behandlung mit L-685,458 unverändert. Die detektierte Differenz der C99-Mengen in den beiden Zelllinien (Abb. 18, 4. Feld) konnte somit durch die γ -Sekretase-Inhibition nicht aufgehoben werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die reduzierten C99-Mengen in Zellen, die Endozytose-defizientes APPswe exprimierten, nicht durch verstärkte γ -Sekretase-Prozessierung der C99-Fragmente verursacht wurden.

3.9 α -Sekretase-Prozessierung von C99 vermindert A β -Sekretion

Die oben beschriebenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Mutationen der YENPTY-Domäne auch die Internalisierung der CTFs beeinträchtigen könnten. In Folge der verminderten Endozytose würden die CTFs an der Zelloberfläche akkumulieren und könnten so zum Substrat der α -Sekretase werden, wodurch C99 in C83 umgewandelt werden würde. Diese Umwandlung würde sowohl die bei der NH₄Cl bzw. Chloroquine-Behandlung beobachtete geringere Akkumulation von C83 in APP695 Δ NPTYmyc exprimierenden Zellen (Abb. 16, Abb. 17) als auch die - relativ zum C99 - verstärkte Stabilisierung von C83 durch die γ -Sekretase-Inhibition (Abb. 18) erklären.

Zur Untersuchung dieser Annahme wurden sowohl das Prozessierungsmuster von *wildtyp* APP als auch von APPswe mit den entsprechenden NPTY-Deletionsmutanten in stabil überprimierenden CHOKI-Zellen verglichen. Zusätzlich zu der Entfernung des NPTY-Motivs wurde die α -Sekretase-Inhibitionsmutation F615P in APP695 Δ NPTYmyc und APP695swe Δ NPTYmyc eingefügt (Abb. 19A). Die F615P Mutation inhibiert die α -Sekretase-Prozessierung von APP, wodurch es zu einer starken Abnahme der APPs α - und p3-Sekretion kommt. Ursächlich für die Unterbindung des α -Sekretase-*Sheddings* ist dabei die Deformation der α -helikalen Struktur in der Nähe der α -Sekretase-Schnittstelle (119, 306).

Die Entfernung des YENPTY-Motivs führte sowohl in *wildtyp* APP als auch APPswe exprimierenden Zellen zu der bereits gezeigten starken Erhöhung der APPs α - und APPs-Sekretion (Abb. 19B, 2. und 3. Feld, vergleiche Spalte 1 und 2 bzw. Spalte 4 und 5). Dagegen reduzierte die zusätzliche F615P Mutation die APPs α - und APPs-Sekretion wieder auf die Menge der APP695myc bzw. APP695swemyc exprimierenden Zellen. Die F615P Mutation verhinderte also den Anstieg der APPs α - und APPs-Sekretion der internalisierungsdefizienten APP-Mutanten (Abb. 19B, 2. und 3.

Feld, vergleiche Spalte 1-3 bzw. Spalte 4-6). Dies bestätigt, dass die α -Sekretase-Prozessierung durch die F615P Mutation demnach stark inhibiert wird.

Der spezifische Nachweis von APPs β_{wt} bzw. APPs β_{swe} zeigte erneut unterschiedliche Prozessierungsmuster von *wildtyp* APP und der schwedischen Mutante. Während die Entfernung der NPTY-Domäne eine starke Verringerung der APPs β_{wt} -Sekretion verursachte (Abb. 19B, 4. Feld), hatte die Deletion im APP695swe keinen Einfluss auf die APPs β_{swe} -Sekretion (Abb. 19B, 5. Feld). Die

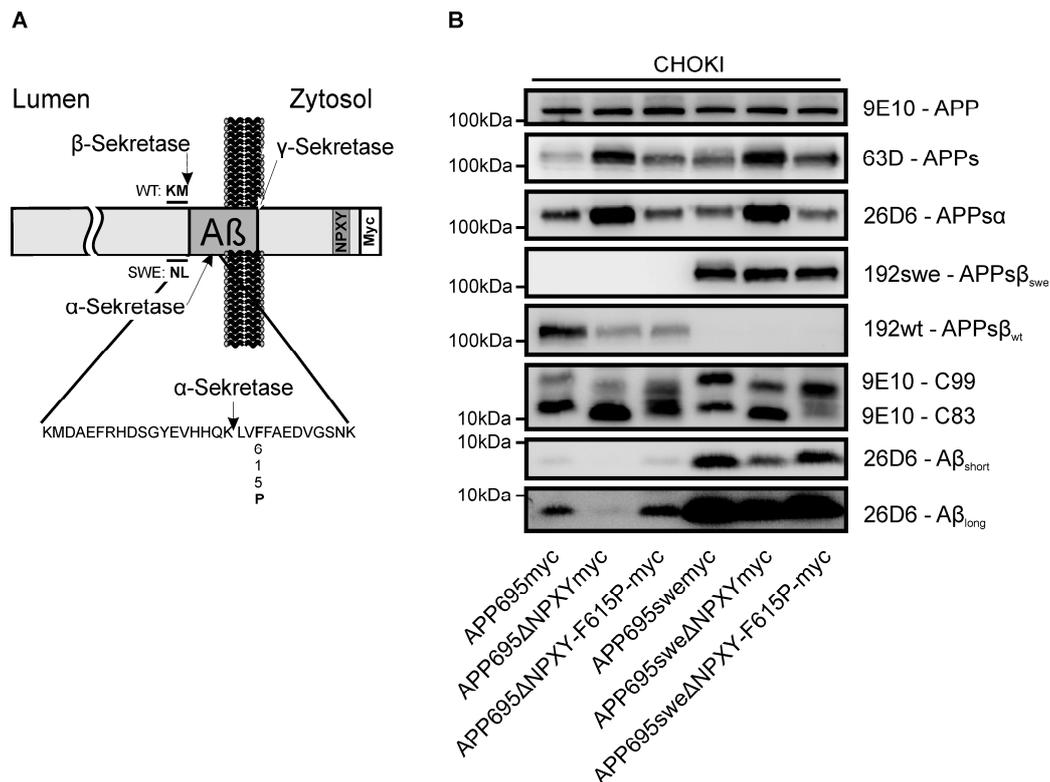


Abb. 19: α -Sekretase-Prozessierung der C99-Fragmente verursacht eine starke Abnahme der C99-Fragmente von internalisierungsdefizientem APPswe und trägt zur Abnahme der A β -Sekretion sowohl in APPswe als auch in *wildtyp* APP exprimierenden Zellen bei.

A Schematische Darstellung der verwendeten APP695-Expressionskonstrukte. Die Lage des A β -Fragmentes ist grau dargestellt und die Aminosäuresequenzen von *wildtyp* APP und der schwedischen Mutante unmittelbar N-terminal von der β -Sekretase-Schnittstelle sind angegeben. Zudem sind die Positionen der Sekretase-Schnittstellen relativ zum A β -Peptid eingezeichnet. Zur Detektion wurden die APP-Expressionskonstrukte am zyttoplasmatischen Ende mit einer c-Myc-Sequenz versehen. Der luminale Sequenzbereich des A β -Peptids, d.h. von der β -Sekretase-Schnittstelle bis zur Transmembrandomäne, ist vergrößert dargestellt und im Einbuchstabencode wiedergegeben. Die eingefügte Mutation F615P verursacht eine starke Abnahme des α -Sekretase-*Sheddings*.

B Die Deletion der NPTY-Domäne verursachte im *wildtyp* APP und im schwedischen APP eine starke Zunahme der APPs α -Sekretion. Die zusätzliche α -Sekretase-Inhibitionsmutation F615P reduzierte die erhöhte α -Sekretase-Prozessierung der internalisierungsdefizienten APP-Expressionskonstrukte auf das Niveau der APP695myc bzw. APP695swemyc exprimierenden Zellen. Zudem verringerte die Deletion des NPTY-Motivs die APPs β_{wt} -Sekretion, wodurch auch die A β -Produktion von *wildtyp* APP stark abnahm. Ungeachtet der weiterhin stark erniedrigten β -Sekretase-Prozessierung erhöhte die F615P Mutation im internalisierungsdefizienten *wildtyp* APP die A β -Sekretion. Dagegen hatte die Entfernung der NPTY-Domäne keinen Einfluss auf die APPs β_{swe} -Sekretion von APPswe. Dennoch verursachte die Zerstörung des Internalisierungssignals im APPswe eine starke Erniedrigung von C99 und infolgedessen auch eine starke Erniedrigung der A β -Sekretion. Obwohl die zusätzliche F615P Mutation keine weitere Auswirkung auf die β -Sekretase-Prozessierung hatte, stabilisierte sie sowohl die C99-Menge als auch die A β -Sekretion auf dem Niveau der APPswe exprimierenden Zellen.

zusätzliche Inhibition des α -Sekretase-*Sheddings* durch die F615P Mutation hatte sowohl im *wildtyp* APP als auch im schwedischen APP keine Auswirkung auf die β -Sekretase-Prozessierung im Vergleich zu den NPTY-Deletionsmutanten (Abb. 19B, 4. und 5. Feld).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der β -Sekretase-Schnitt von *wildtyp* APP und der von schwedischem APP zum größten Teil in unterschiedlichen Kompartimenten erfolgt. Auf Grund der Unabhängigkeit vom YENPTY-Endozytosesignal erfolgt die β -Sekretase-Prozessierung von APPswe größtenteils im sekretorischen Transportweg. Dagegen ereignet sich derselbe Schnitt im *wildtyp* APP anscheinend überwiegend in endozytotischen Kompartimenten und ist daher stark abhängig vom Internalisierungssignal.

In *wildtyp* APP exprimierenden Zellen konnte vorwiegend C83 detektiert werden, während C99 nur schwach zu erkennen war. Die Deletion der NPTY-Domäne führte zu einer weiteren Abnahme der C99-Menge und zu einem leichten Anstieg von C83. Infolge der starken Inhibition des α -Sekretase-*Sheddings* durch die F615P Mutation konnten keine C83-Fragmente detektiert werden. Stattdessen verursachte die F615P Mutation im APP695 Δ NPTYmyc mehrere Banden, die alle mit einer langsameren elektrophoretischen Geschwindigkeit als das C83 von APP695 Δ NPTYmyc im SDS-PAGE-Gel liefen (Abb. 19B, 6. Feld).

Im Gegensatz dazu resultierte die Deletion der NPTY-Domäne von APP695swe in einer Umkehrung des C99 zu C83-Verhältnisses. Dabei war die C99-Menge der APP695swe Δ NPTYmyc exprimierenden Zellen trotz unverändertem β -Sekretase-*Sheddings* stark erniedrigt, während gleichzeitig die C83-Menge auf der Grund der verstärkten α -Sekretase-Prozessierung erhöht war (Abb. 19B, 6. Feld). Die zusätzliche F615P Mutation im APP695swe Δ NPTYmyc verminderte die C83-Menge sogar weit unter die beim APPswe beobachtete Menge (Abb. 19B, 6. Feld, 1. und 3. Spalte). Während die C83-Bande kaum zu detektieren war, wurden, wie beim *wildtyp* APP, mehrere schwache Banden mit einer langsameren Laufgeschwindigkeit, d.h. einem höheren Molekulargewicht, beobachtet. Da die F615P Mutation zudem eine starke Stabilisierung von C99 verursachte, wurden in den APP695swe Δ NPTY-F615P-myc Zellen ähnlich hohe oder sogar höhere C99-Mengen als die APP695swemyc exprimierenden Zellen detektiert (Abb. 19B, 6. Feld).

Insgesamt verursachte die Deletion des NPTY-Motivs und die zusätzliche F615P Mutation in *wildtyp* und in schwedischem APP ein ähnliches Muster der A β -Sekretion, wobei die A β -Sekretion von APPswe um ein Vielfaches höher war (Abb. 19B, 7. Feld, 1. und 4. Spalte). Bei beiden Zelllinien verursachte die Deletion des Internalisierungssignals in den APP-Konstrukten eine starke Abnahme der A β -Produktion. Dagegen erhöhte die zusätzliche Inhibition des α -Sekretase-*Sheddings* durch die F615P Mutation die A β -Sekretion wieder auf das Niveau der APP695myc bzw. APP695swemyc überexprimierenden Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Erniedrigung der A β -Sekretion durch unterschiedliche Auswirkungen der deletierten NPTY-Domäne auf die Prozessierung von *wildtyp* APP bzw. schwedischem APP verursacht wird. Die Abnahme der A β -Sekretion beim

internalisierungsdefizienten APP695swe Δ NPTYmyc wird hauptsächlich durch die α -Sekretase-Prozessierung der entstandenen C99-Fragmente verursacht (Abb. 19B, 6. Feld, 4. und 5. Spalte). Dagegen wird die A β -Sekretion der korrespondierenden *wildtyp* APP-Zellen in erster Linie durch die Unterbindung des β -Sekretase-*Sheddings* in endozytotischen Kompartimenten stark erniedrigt (Abb. 19B, 5. Feld, 1. und 2. Spalte). Bemerkenswerterweise wurde die A β -Sekretion auch in den APP695 Δ NPTYmyc exprimierenden Zellen durch die zusätzliche α -Sekretase-Inhibitionsmutante F615P auf das Niveau der APP695myc Zellen erhöht (Abb. 19B, 8. Feld). Dies deutet darauf hin, dass auch ein Teil der aus *wildtyp* APP erzeugten C99-Fragmente durch die α -Sekretase in C83 umgewandelt wird. Die Stabilisierung der C99-Fragmente durch die Inhibition der α -Sekretase-Prozessierung in APP695 Δ NPTY-F615P-myc exprimierenden Zellen erhöht somit die A β -Sekretion.

3.10 Erhöhte Oberflächenmenge von APP und CTFs durch die Deletion des Internalisierungssignals NPTY

Neben dem Anstieg der Expression von APP an der Zelloberfläche weisen diese Ergebnisse auch auf eine Erhöhung der Zelloberflächemenge der CTFs in den Zellen hin, die APP mit Mutationen der YENPTY-Domäne exprimieren. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde die Oberflächemenge sowohl von APP als auch der CTFs durch Oberflächenbiotinylierung in APP770swemyc und APP770swe Δ NPTYmyc überexprimierenden CHOKI-Zellen untersucht. Im Vergleich zu APP770swemyc exprimierenden Zellen verursachte die Zerstörung des Endozytose-Motivs in APP770swe Δ NPTYmyc exprimierenden Zellen eine starke Erhöhung von maturiertem APP an der Zelloberfläche (Abb. 20, 1. Feld). Neben diesem Anstieg akkumulierten dort auch verstärkt die CTFs der APP770swe Δ NPTYmyc exprimierenden Zellen (Abb. 20, 2. Feld).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Mutationen der YENPTY-Domäne sowohl die Internalisierung von APP als auch die der CTFs beeinträchtigen und diese somit an der Zelloberfläche akkumulieren.

Da die an der Oberfläche akkumulierenden APP-Moleküle relativ schnell durch die α -Sekretase metabolisiert werden, wäre zu erwarten, dass die zusätzliche Unterdrückung des α -Sekretase-*Sheddings* durch die F615P Mutation einen weiteren Anstieg der APP-Oberflächenmenge verursachen würde.

Die Oberflächenbiotinylierung zeigte, dass die Entfernung des Endozytosesignals sowohl in *wildtyp* APP als auch in APPswe exprimierenden Zellen zu einem starken Anstieg der APP-Menge an der Zelloberfläche führte. Infolge der zusätzlichen F615P Mutation in den NPTY-Deletionskonstrukten wurde die Oberflächenmenge sowohl von *wildtyp* APP als auch von schwedischem APP um ein Vielfaches erhöht (Abb. 21).

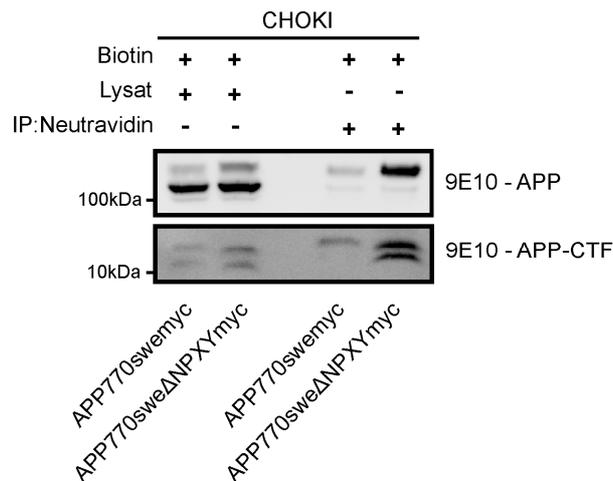


Abb. 20: Starke Akkumulation von maturiertem APP und den CTFs an der Zelloberfläche durch Mutationen des Internalisierungssignals NPTY.

Die APP770swemyc bzw. APP770sweΔNPXYmyc überexprimierenden CHOKI-Zellen wurden mit Biotin oberflächenmarkiert. Nach der anschließenden Immunpräzipitation mit Neutravidin-Beads wurden die markierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und APP durch den Antikörper 9E10 nachgewiesen. Die Zerstörung des Endozytosesignals YENPTY verursachte eine Akkumulation von maturiertem APP und den CTFs an der Zelloberfläche.

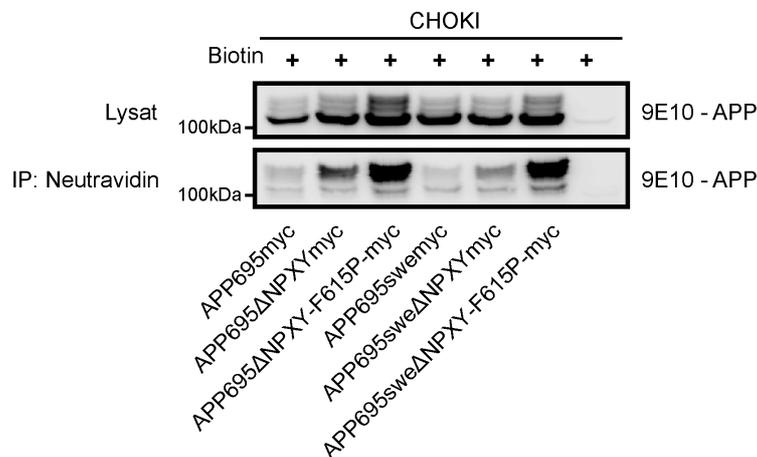


Abb. 21: Zusätzliche Inhibition der α -Sekretase-Prozessierung vervielfacht die Oberflächenmenge von internalisierungsdefizientem APP

Die Abbildung zeigt eine Oberflächenbiotinylierung der *wildtyp* APP oder APP^{swe} exprimierenden Zellen. Die mit Biotin markierten Proteine wurden mit Streptavidin-Beads immunopräzipitiert, anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot detektiert. Die Deletion des NPTY-Motivs verursachte einen Anstieg der Oberflächenmenge beider APP-Formen. Zudem erhöhte die Inhibition der α -Sekretase-Prozessierung von APP durch die zusätzliche F615P Mutation die Akkumulation von APP an der Zelloberfläche nochmals deutlich.

3.11 Reduzierte A β -Sekretion internalisierungsdefizienter C99-Fragmente

Nach unseren bisherigen Beobachtungen erfolgt die β -Sekretase-Prozessierung von APPswe zum größten Teil im sekretorischen Transportweg. Die erzeugten C99-Fragmente werden anschließend an die Zelloberfläche transportiert. Die starke Verringerung der A β -Sekretion durch die Akkumulation von internalisierungsdefizientem C99 an der Zelloberfläche deutet darauf hin, dass zumindest ein Teil der γ -Sekretase-Prozessierung von C99 in endozytotischen Kompartimenten erfolgt.

Diesem Konzept folgend müsste die direkte Expression eines internalisierungsdefizienten C99-Konstruktes gleichermaßen in einer reduzierten A β -Sekretion resultieren. Um die Entstehung des A β -Peptids unabhängig von der β -Sekretase-Prozessierung zu untersuchen, wurde ein C99-Konstrukt verwendet, das aus den C-terminalen 99 Aminosäuren von APP und einem N-terminalen Signalpeptid (SP) besteht. Während der Translation in die ER-Membran wird das SP abgeschnitten. Das membranständige Protein ist somit identisch mit dem durch die β -Sekretase-Prozessierung von APP entstehenden C99 (307). Zudem wurde wie zuvor beim APP die Internalisierungsdomäne NPTY entfernt (C99 Δ NPTY, Abb. 22A).

Die stabile Expression von C99 Δ NPTY zeigte im Vergleich zu C99 eine starke Reduzierung der A β -Sekretion (Abb. 22B, 3. Feld). Während die Inhibition der γ -Sekretase durch L-685,458 die A β -Sekretion vollständig blockierte, verursachte sie gleichzeitig einen Anstieg der C99-Fragmente (Abb. 22B, 1. Feld – lange Belichtung). Die C99-Akkumulation in C99 Δ NPTY-Zellen war dabei geringer als die in C99 exprimierenden Zellen (Abb. 22B, 2. Feld – kurze Belichtung).

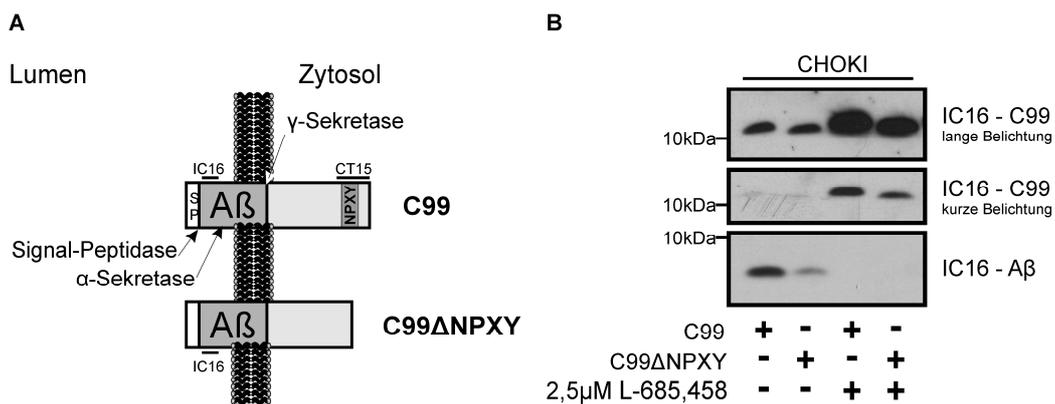


Abb. 22: Reduzierte A β -Sekretion von internalisierungsdefizientem C99

A Darstellung der verwendeten C99-Expressionskonstrukte. Das C99 besteht aus den C-terminalen 99 Aminosäuren von APP einschließlich der A β -Peptidsequenz und des zytoplasmatischen Schwanzes. N-terminal wurde das APP-Signalpeptid angefügt, das während der Insertion in die Membran durch die Signal-Peptidase entfernt wird. Die Sekretase-Schnittstellen und die verwendeten Antikörper sind eingezeichnet. Zur Herstellung eines endozytosedefizienten C99-Konstruktes wurde die NPTY-Domäne deletiert.

B Die Entfernung des Internalisierungsmotivs verursachte eine starke Abnahme der A β -Sekretion. Die Behandlung mit dem γ -Sekretase-Inhibitor L-685,458 blockierte die A β -Sekretion bei gleichzeitiger Akkumulation der C99 Fragmente, wobei es zu einer stärkeren Stabilisierung in C99 als in C99 Δ NPTY exprimierenden Zellen kam.

Diese Ergebnisse zeigten, dass C99 Δ NPTY im Vergleich zum C99 ein schlechteres γ -Sekretase-Substrat ist. Da die Endozytose der C99-Fragmente durch die Deletion der NPTY-Domäne beeinträchtigt wird, deuten sie zudem darauf hin, dass die γ -Sekretase-Prozessierung nicht im sekretorischen Transportweg, sondern hauptsächlich in den endozytotischen Kompartimenten und an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Durch die Retention an der Zelloberfläche würde das C99 durch die α -Sekretase in C83 umgewandelt werden. Dieses würde eine Abnahme des γ -Sekretase-Substrates C99 und somit eine Erniedrigung der A β -Sekretion verursachen.

Zur Untersuchung dieser Annahme wurde versucht, die durch die α -Sekretase-Prozessierung von C99 entstandenen C83-Fragmente zu stabilisieren. Da das Epitop des Antikörpers CT15 durch die Deletion des NPTY-Motivs zerstört wurde, konnten die C83-Fragmente von C99 Δ NPTY mit diesem Antikörper nicht detektiert werden. Daher wurden die C99-Konstrukte C-terminal mit einem c-Myc-Tag versehen. Zudem konnten so die rekombinanten und die endogenen CTFs voneinander unterschieden werden. Rekombinantes C99myc und daraus entstandenes C83myc waren sowohl mit CT15 als auch mit 9E10 detektierbar, während C99 Δ NPTYmyc und C83 Δ NPTYmyc nicht durch CT15 nachgewiesen werden konnten (Abb. 23A).

Die Deletion der NPTY-Domäne verursachte auch im C99myc eine starke Abnahme der A β -Sekretion (Abb. 23B, 3. Feld). Der Myc-Tag hat demzufolge keinen Einfluss auf die C99-Prozessierung.

Während die Inhibition der lysosomalen Aktivität durch NH₄Cl oder Chloroquine einen kräftigen Anstieg der C83-Fragmente in APP695myc exprimierenden Zellen zeigte, blieben die C99-Fragmente weitgehend unverändert (

Abb. 16, Abb. 17). Daher wurde zunächst versucht, die aus C99myc entstandenen C83myc-Fragmente durch NH₄Cl zu stabilisieren. Die Neutralisation der sauren Kompartimente durch NH₄Cl verursachte eine starke Akkumulation von endogenem C83 (Abb. 23B, 2. Feld), während gleichzeitig das rekombinante C99myc (Abb. 23B, 1. Feld) und die A β -Sekretion nicht beeinflusst wurden (Abb. 23B, 3. Feld). Zudem konnte kein rekombinantes C83myc detektiert werden (Abb. 23B, 1. Feld).

Da keine Stabilisierung von C83myc durch NH₄Cl beobachten werden konnte, wurde vermutet, dass die geringe Menge an gebildetem C83myc direkt durch die γ -Sekretase prozessiert werden könnte. Durch die Behandlung der Zellen mit L-685,458 wurde die A β -Sekretion vollständig unterdrückt (Abb. 23C, 3. Feld). Während die γ -Sekretase-Inhibition einen Anstieg von rekombinantem C99myc verursachte, wurde gleichzeitig eine sehr starke Zunahme des exogenen C83myc beobachtet (Abb. 23C, 1. Feld). Begleitend kam es zu einer starken Akkumulation der endogenen C83-Fragmente (Abb. 23C, 2. Feld). Auffallend war, dass die γ -Sekretase-Inhibition eine stärkere Zunahme von C83myc in C99 Δ NPTYmyc Zellen als in C99myc exprimierenden Zellen hervorrief, während umgekehrt weniger C99 Δ NPTYmyc als C99myc akkumulierte. Dies lässt vermuten, dass Mutationen des Endozytosesignals NPTY eine Akkumulation von C99 Δ NPTYmyc an der Zelloberfläche verursachen, wodurch diese verstärkt von der α -Sekretase geschnitten werden. Durch die Retention an der Plasmamembran kommt es zu einer höheren Umwandlung von C99 Δ NPTYmyc in C83 Δ NPTYmyc

als von C99myc in C83myc. Diese Ergebnisse zeigen somit eindeutig, dass C99 durch die α -Sekretase in C83 umgewandelt werden kann.

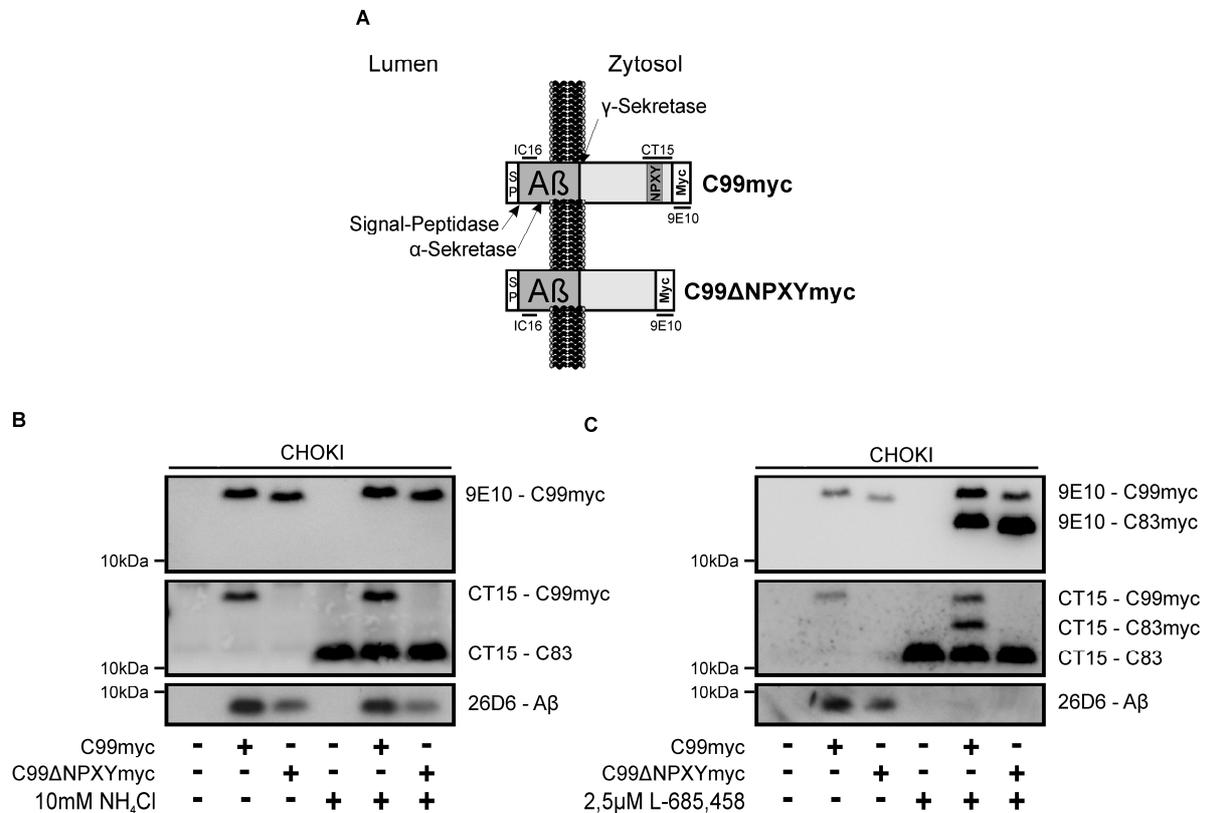


Abb. 23: α -Sekretase-vermittelte Umwandlung von C99myc in C83myc vermindert die A β -Sekretion

A Die in Abb. 22 beschriebenen C99-Konstrukte wurden zur Detektion der C83myc-Fragmente C-terminal mit einem Myc-Tag versehen.

B Die Neutralisierung der sauren Kompartimente, wie z.B. den Lysosomen, durch NH₄Cl hatte keinen Einfluss auf die rekombinante C99myc-Expression oder auf die A β -Sekretion. Gleichzeitig stieg endogenes C83 stark an.

C Neben der Blockade der A β -Produktion verursachte die Behandlung mit dem γ -Sekretase-Inhibitor L-685,458 einen leichten Anstieg von rekombinantem C99myc und eine starke Zunahme der rekombinanten C83-Menge. Interessanterweise akkumulierte C83myc stärker in C99ΔNPXYmyc als in C99myc exprimierenden Zellen. Umgekehrt induzierte die γ -Sekretase-Inhibition einen stärkeren Anstieg der C99-Fragmente in C99myc als in C99ΔNPXYmyc exprimierenden Zellen. Zudem kam es zu einer starken Akkumulation der endogenen C83-Menge.

3.12 Mutationen der YENPTY-Domäne von APPswe haben keinen Einfluss auf die *in vitro* Generation der intrazellulären Domäne von APP (AICD)

Neben den ins Lumen sezernierten A β - bzw. p3-Peptiden wird durch die γ -Sekretase-Prozessierung der CTFs auch die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) ins Zytosol freigesetzt. Es wird vermutet, dass AICD als Baustein eines Transkriptionsfaktors möglicherweise die Transkription anderer Gene reguliert (169, 170). In einem Aktivierungsprozess bindet dabei Fe65 an die zytoplasmatische Domäne von APP. Nach der γ -Sekretase-Prozessierung der CTFs wandert der AICD/Fe65-Komplex in den

Kern. Eine ungelöste Frage ist, ob die APP-abhängige Transaktivierung von Genen über den amyloidogenen oder den nicht amyloidogenen Prozessierungsweg erfolgt.

Zunächst wurde an den APP695swemyc stabil überexprimierenden CHOKI-Zellen untersucht, ob die Punktmutationen der YENPTY-Domäne oder die Deletion des NPTY-Motivs einen Einfluss auf die AICD-Synthese haben. Da AICD eine sehr kurze Halbwertszeit in der Zelle besitzt, wurde die AICD-Produktion mit Hilfe eines *in vitro*-Assays gemessen.

Wie zuvor beschrieben, hatten die Punktmutationen innerhalb der GYENPTY-Domäne und die Deletion des NPTY-Motivs keinen Einfluss auf das β -Sekretase-*Shedding* (Abb. 13). Ungeachtet dessen verursachten die Mutationen eine starke Abnahme der C99-Fragmente bei gleichzeitiger Zunahme der C83-Fragmente (Abb. 24, 2. Feld). Es konnte keine Abhängigkeit der *in vitro* AICD-Generation von der C99- oder der C83-Menge festgestellt werden (Abb. 24, 3. Feld). Stattdessen wurde die Beobachtung gemacht, dass die AICD-Produktion der einzelnen Zelllinien mit der Summe der C99- und C83-Fragmente korrelierte (Abb. 24, 2. Feld). Wie zu erwarten war, wurde die AICD-Freisetzung durch den γ -Sekretase-Inhibitor L-685,458 vollständig unterbunden (Abb. 24, 3. Feld).

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mutationen innerhalb der YENPTY-Domäne die AICD-Produktion nicht beeinträchtigen. Zudem bestätigen sie, dass AICD sowohl aus C83 als auch aus C99 durch die γ -Sekretase freigesetzt wird.

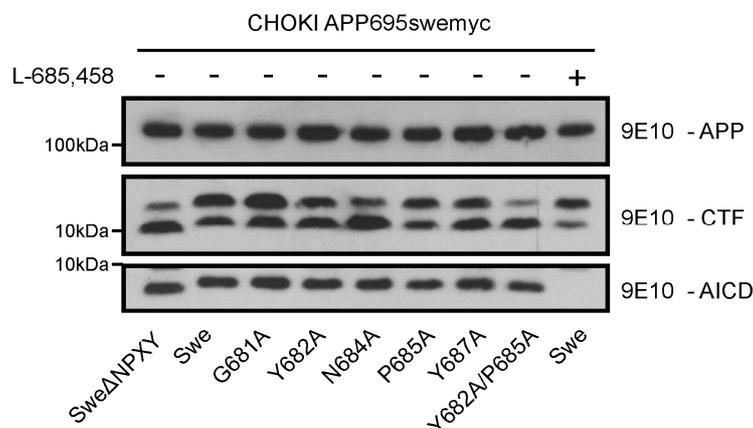


Abb. 24: Mutationen in der YENPTY-Domäne von APP_{swe} haben keinen Einfluss auf die AICD-Produktion

Die APP695swemyc bzw. APP695swemyc mit Mutationen der GYENPTY-Domäne stabil überexprimierenden CHOKI-Zellen wurden zur Untersuchung der *in vitro* AICD-Produktion eingesetzt. Ungeachtet der gleichmäßigen β -Sekretase-Prozessierung verursachten die Mutationen des YENPTY-Motivs eine starke Abnahme der C99-Fragmente bei gleichzeitiger leichter Zunahme der C83-Fragmente. Während keine Abhängigkeit der *in vitro* AICD-Generation von den C99- bzw. C83-Mengen festgestellt werden konnte, schien die γ -Sekretase-vermittelte AICD-Freisetzung der einzelnen Zelllinien mit der Summe der C99- und C83-Fragmente übereinzustimmen. Die Inhibition der γ -Sekretase durch L-685,458 blockierte die AICD-Freisetzung.

3.13 α -Sekretase-Prozessierung von APP initiiert die AICD-vermittelte nukleäre Signalübertragung

Zur Untersuchung der Frage, ob α -Sekretase- oder β -Sekretase-*Shedding* von APP die AICD-vermittelte Transaktivierung anderer Gene initiiert, wurde der Gal4-Transaktivierungsassay eingesetzt. Dazu wurde ein APPGal-Konstrukt verwendet, bei dem die DNA-Bindungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors der Hefe in den intrazellulären Schwanz von APP eingebaut war (Abb. 25). In Abhängigkeit von der γ -Sekretase-vermittelten AICD-Freisetzung stimuliert ein Komplex aus AICD, dem nukleären Adaptorprotein Fe65 und der Histon Acetyltransferase Tip60 die Transkription des Gal4-abhängigen Luciferase-Reportergens (169, 170). Zur spezifischen Inhibition des α -Sekretase-*Sheddings* wurde die bereits beschriebene F615P Mutation eingesetzt, während zur Inhibition des β -Sekretase-*Sheddings* die M596V Mutation verwendet wurde. Die Substitution der Aminosäure Methionin unmittelbar N-terminal der β -Sekretase-Schnittstelle durch Valin verursacht eine sehr starke Beeinträchtigung der β -Sekretase-Prozessierung. Infolge der verminderten C99-Fragmente unterdrückte die M596V Mutation auch die A β -Sekretion (108). Die α -Sekretase-Inhibitionsmutante F615P und die β -Sekretase-Inhibitionsmutante M595V wurden einzeln und in Kombination in das APPGal-Expressionskonstrukt eingefügt. Zusätzlich wurde ein APPGal-Konstrukt mit der schwedischen Doppelmutation K595N-M596L allein und in Kombination mit der α -Sekretase-Inhibitionsmutante F615P hergestellt (Abb. 25).

Zur einfachen und schnellen Quantifizierung von Veränderungen der APPs-Sekretion wurden die gleichen Mutationen parallel in ein Alkalische-Phosphatase-Fusionsprotein von APP (SEAP-APP) eingefügt. Das Reporterenzym Alkalische-Phosphatase befindet sich in diesem Konstrukt zwischen Signalpeptid und der Ektodomäne von APP ((219), Abb. 25).

Sowohl die APPGal- als auch SEAP-APP-Konstrukte wurden zur Herstellung von stabil überexprimierenden CHOKI- und 293T-Zellen verwendet. Die Prozessierungsmuster der 293T SEAP-APP und der 293T APPGal Zellen sind in Abb. 26 dargestellt.

Die stark erhöhte β -Sekretase-Prozessierung der schwedischen Mutante verursachte im Vergleich zu *wildtyp* APP Zellen einen Anstieg der Gesamt APPs-Sekretion (Abb. 26, 2. Feld). Im Gegensatz dazu bestätigte die vollständige Inhibition der APPs β_{wt} -Sekretion von *wildtyp* APP, dass die M596V Mutation das β -Sekretase-*Shedding* stark erniedrigt (Abb. 26, 5. Feld). Die geringfügige Abnahme der APPs-Sekretion in Folge der M596V Mutation verdeutlichte den geringen Anteil des β -Sekretase-*Sheddings* an der Prozessierung von *wildtyp* APP (Abb. 26, 5. Feld). Sowohl in *wildtyp* APP als auch in APPs_{we} exprimierenden Zellen führte die α -Sekretase-Inhibitionsmutation F615P zu einer starken Erniedrigung der APPs α -Sekretion (Abb. 26, 3. Feld). Infolgedessen war auch die Gesamt-APPs-Sekretion stark vermindert (Abb. 26, 2. Feld). Auf Grund des hohen Anteils von APPs β_{swe} an der Gesamt-APPs-Sekretion der APPs_{we} überexprimierenden Zellen war die Abnahme der APPs-Sekretion durch die F615P Mutation in APPs_{we}-Zellen geringer als in den *wildtyp* APP exprimierenden Zellen (Abb. 26, 2. Feld).

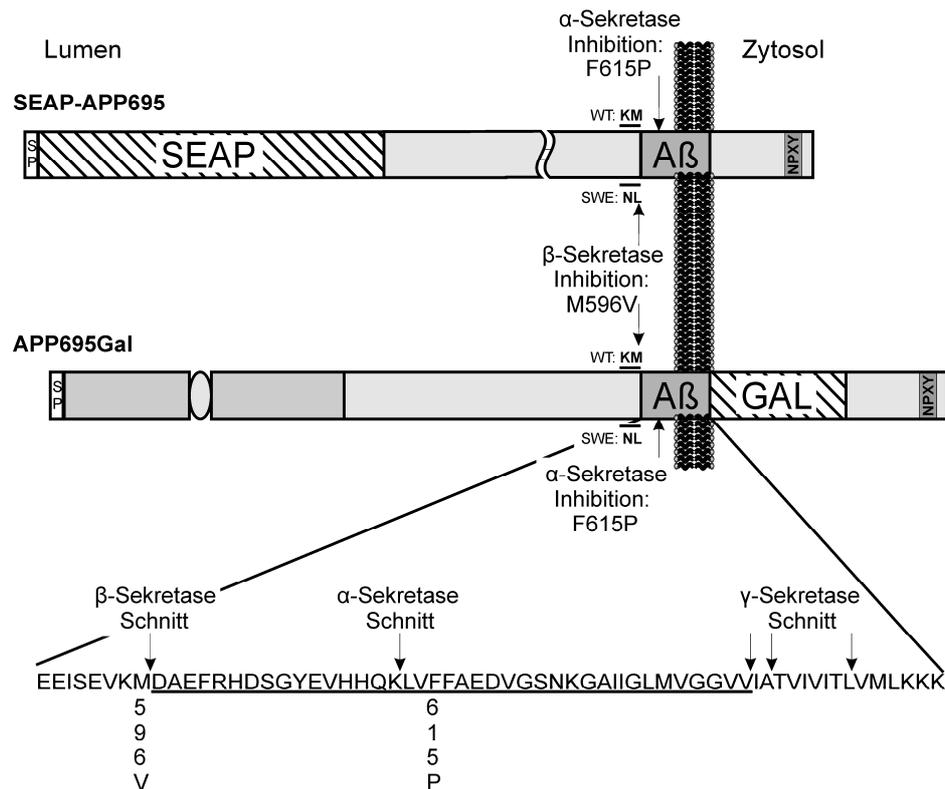


Abb. 25: Schematische Darstellung der SEAP-APP- und der APPGal-Expressionskonstrukte.

Beim APPGal-Konstrukt ist die DNA-Bindedomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors der Hefe in den intrazellulären Schwanz von APP eingebaut. Dagegen ist das Reporterenzym Alkalische-Phosphatase beim SEAP-APP zwischen das Signalpeptid und die extrazelluläre Domäne von APP eingefügt. Die F615P Mutation zur Hemmung der α -Sekretase-Prozessierung und die M596V Mutation zur Inhibition des β -Sekretase-*Sheddings* wurden einzeln und in Kombination in die SEAP-APP- und APP-Gal-Konstrukte eingefügt. Alternativ wurde zur Erhöhung der β -Sekretase-Spaltung die schwedische Doppelmutation allein und zusammen mit der α -Sekretase-Inhibitionsmutation in die Expressionskonstrukte eingebaut. Die Lage der Sekretase-Schnittstellen und der Mutationen sind eingezeichnet. Zusätzlich ist im vergrößerten Sequenzbereich das A β 40-Peptid unterstrichen dargestellt.

Während die erhöhte β -Sekretase-Prozessierung von APP_{swe} die A β -Sekretion im Vergleich zum *wildtyp* APP um ein Vielfaches erhöhte (Abb. 26, 6. Feld), wurde die A β -Produktion durch die β -Sekretase-Inhibition (M596V) vollständig unterbunden (Abb. 26, 6. Feld). Obwohl die F615P Mutation auch die Sekretion von APP β_{wt} und APP β_{swe} leicht beeinträchtigte (Abb. 26, 5. Feld), war die A β -Sekretion der APP-F615P- und APP_{swe}-F615P-Mutanten höher als in den korrespondierenden APP bzw. APP_{swe} Zellen (Abb. 26, 6. Feld). Dies zeigt, dass die α -Sekretase-Prozessierung von C99-Fragmenten die A β -Produktion nicht nur in artifiziellen, internalisierungsdefizienten APP-Konstrukten erniedrigt. Vielmehr deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die α -Sekretase-abhängige Umwandlung der C99-Fragmente in C83 ein natürlicher Vorgang im APP-Metabolismus ist.

Diese Beobachtungen zeigen zusätzlich, dass weder der Einbau des Gal-Proteins in den zytoplasmatischen Schwanz noch das N-terminale Anfügen der Alkalischen-Phosphatase einen

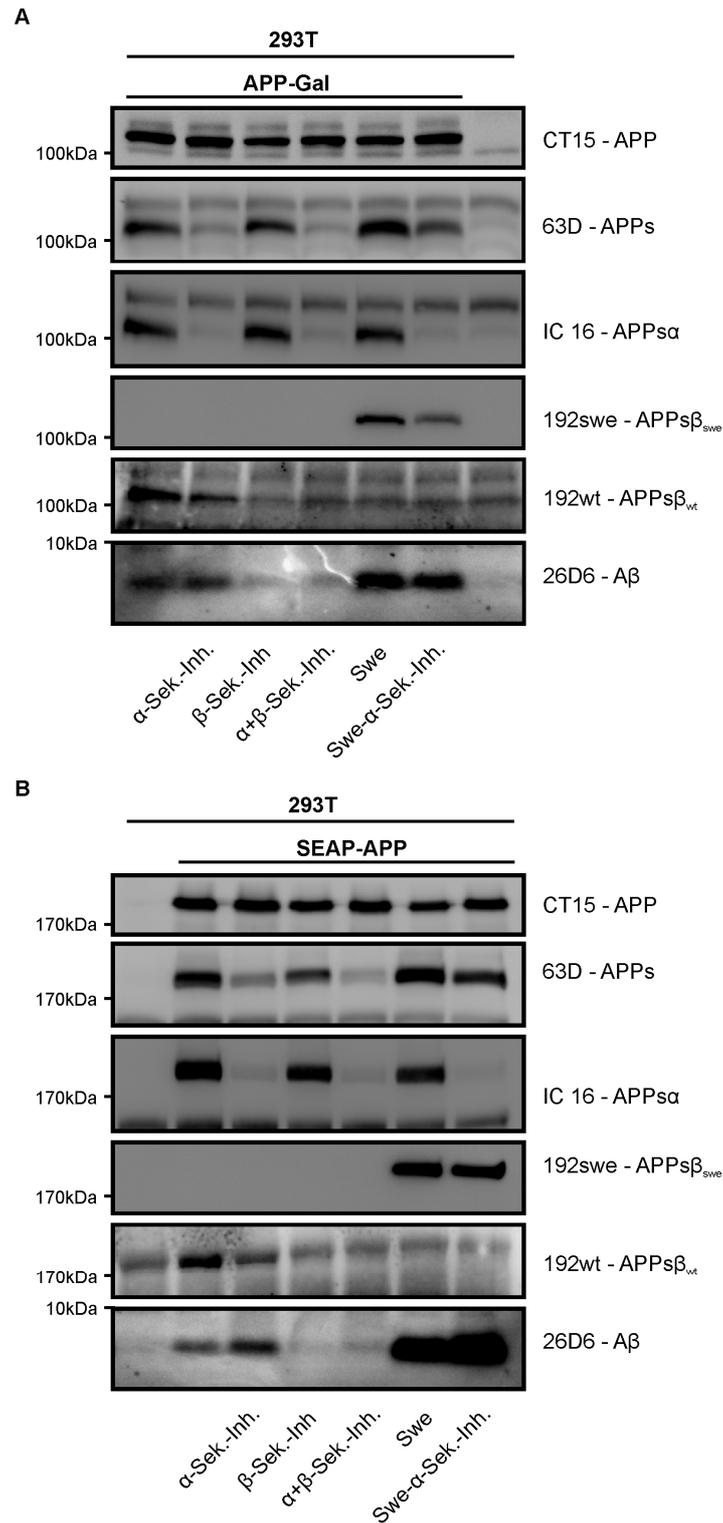


Abb. 26: Prozessierungsmuster der APPGal oder SEAP-APP stabil überexprimierenden 293T-Zellen

Im Vergleich zum *wildtyp* APP wurde die β -Sekretase-Prozessierung durch die schwedische Doppelmutation K595N-M596L (Swe) stark erhöht. Dadurch stiegen auch die APPs-Sekretion und die A β -Produktion von APPswe stark an. Im Gegensatz zur schwedischen Mutation verursachte die M596V Mutation (β -Inh.) eine Inhibition des β -Sekretase-*Sheddings* und infolgedessen eine vollständige Unterdrückung der A β -Sekretion. Dagegen bewirkte die F615P Mutation eine starke Reduktion der α -Sekretase-Prozessierung (α -Inh.). Die Kombination der Mutationen resultierte in einer additiven Wirkung der Mutationen.

Einfluss auf die APP-Prozessierung haben. Des Weiteren konnte durch diese Untersuchungen nochmals bestätigt werden, dass die F615P Mutation die α -Sekretase- und die M596V Mutation die β -Sekretase-Prozessierung von APP inhibieren. Die Expression diese Konstrukte in CHOKI-Zellen ergab ähnliche Ergebnisse.

Als nächstes wurden die APPGal überexprimierenden Zellen in dem bereits beschriebenen heterologen Reporterassay verwendet (169, 170). Die stabile Überexpression der APPGal-Konstrukte resultierte im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen nur in einer minimalen Transaktivierung des Luciferase-Gens (Abb. 27A, - Fe65). Die zusätzliche Transfektion von Fe65 induzierte eine starke Stimulation der Luciferase-Expression in allen APPGal überexprimierenden Zellen (Abb. 27A, + Fe65). Die vollständige Unterdrückung der β -Sekretase-Prozessierung durch die M596V Mutation im *wildtyp* APP hatte keinen Einfluss auf die Transaktivierung, so dass die Luciferase-Aktivität nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 27A, + Fe65, APPGal- β -Inh). Obwohl das β -Sekretase-*Shedding* und die A β -Produktion im APPsweGal stark erhöht war, wurde die Transaktivierung durch die schwedische Mutation im Vergleich zum *wildtyp* APPGal nur geringfügig gesteigert (Abb. 27A, + Fe65, APPsweGal). Dagegen reduzierte die Inhibition der α -Sekretase-Prozessierung durch die F615P Mutation die Luciferase-Aktivität im Vergleich zum *wildtyp* APPGal bzw. APPsweGal um 35 % (Abb. 27A, + Fe65, APPGal- α -Inh, APPGal- α + β -Inh, APPsweGal- α -Inh). Ähnliche Ergebnisse wurden in stabil überexprimierenden CHOKI-Zellen gemessen (Daten nicht gezeigt).

An Hand der SEAP-APP überexprimierenden Zellen wurde zusätzlich untersucht, wie stark die Mutationen die APPs-Sekretion beeinträchtigen bzw. verstärken. Die Messung der SEAP-APP-Aktivität im Zellüberstand zeigte, dass die schwedische Mutation die APPs-Sekretion im Vergleich zum *wildtyp* APP ungefähr verdoppelte (Abb. 27B, SEAP-APPswe). Während die Inhibition der APPs β_{wt} -Sekretion durch die M596V Mutation im *wildtyp* APP die APPs-Sekretion nur geringfügig erniedrigte (Abb. 27B, SEAP-APP- β -Inh.), verursachte die Inhibition der α -Sekretase-Prozessierung durch die F615P Mutation eine über 30 %ige Reduzierung der SEAP-Aktivität im Zellüberstand (Abb. 27B, SEAP-APP- α -Inh. bzw. SEAP-APPswe- α -Inh.). Auch die gleichzeitige Einfügung der F615P und der M596V Mutation erniedrigte die APPs-Sekretion nur um ca. 35 %. Dies deutet darauf hin, dass die Mutationen auch zusammen keine vollständige Inhibition des APP-*Sheddings* bewirken.

Da die vollständige Unterdrückung des β -Sekretase-*Sheddings* keinen negativen Einfluss und die stark erhöhte β -Sekretase-Prozessierung von APPswe keine verstärkende Wirkung auf die AICD-vermittelte Transaktivierung der Luciferase-Expression hatte, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der amyloidogene Prozessierungsweg von APP nicht zur nuklearen Signalübermittlung beiträgt. Dagegen zeigt die Abnahme der Reporter-Expression durch die α -Sekretase-Inhibition, dass der nicht-amyloidogene Prozessierungsweg die AICD-vermittelte Signaltransduktion initiiert. Die Korrelation der Abnahme der APPs-Sekretion und der Erniedrigung der Transaktivierung durch die Reduzierung der α -Sekretase-Prozessierung bestärkt diese Aussage der Ergebnisse.

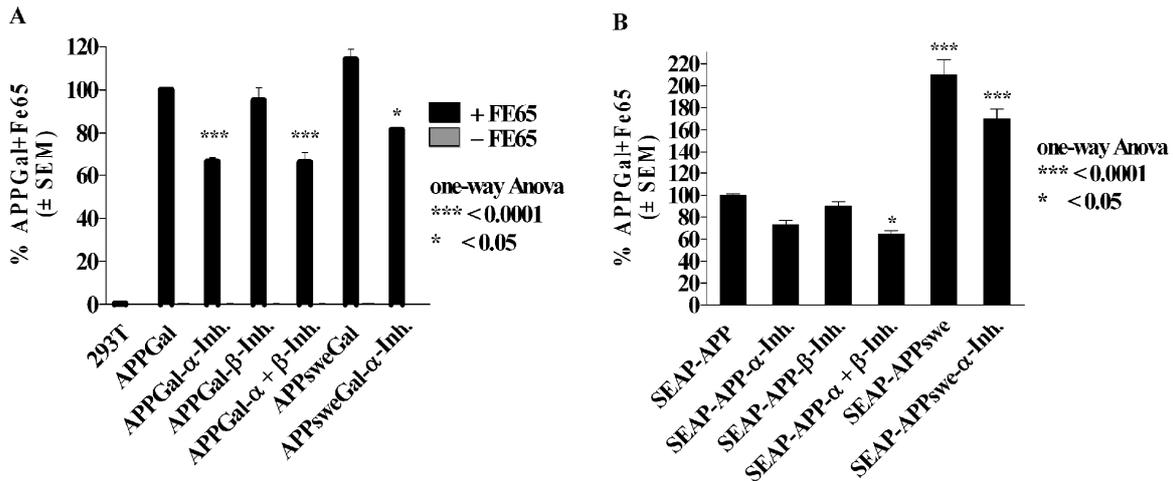


Abb. 27: α -Sekretase-abhängige Initiierung der AICD-vermittelten transkriptionalen Transaktivierung

A Die APPGal stabil überexprimierenden 293T-Zellen wurden in einem heterologen Reporterassay verwendet. Die Translokation eines Komplexes aus AICD und dem Adaptorprotein Fe65 in den Kern vermittelt dabei die Transkription des Gal4-abhängigen Luciferase-Reportergens. Die stabile Überexpression der APPGal-Konstrukte resultierte nur in einer minimalen Transaktivierung des Luciferase-Gens. Im Gegensatz dazu induzierte die zusätzliche Expression von Fe65 eine starke Stimulation der Luciferase-Expression. Weder die stark erhöhte β -Sekretase-Prozessierung von APPswe noch die vollständige Inhibition des β -Sekretase-*Sheddings* (β -Inh.) hatte einen signifikanten Einfluss auf die AICD-vermittelte Transaktivierung. Dagegen reduzierte die verminderte α -Sekretase-Prozessierung (α -Inh.) die Luciferase Expression um mehr als 30 %.

B Quantitative Messung der APPs-Sekretion der SEAP-APP überexprimierenden Zellen.

Während die schwedische Mutation die APPs-Sekretion ungefähr verdoppelte, wurde die APPs-Freisetzung durch die Inhibition der β -Sekretase-Prozessierung geringfügig erniedrigt. Die Reduktion des α -Sekretase-*Sheddings* durch die F615P Mutation senkte die APPs-Sekretion um ungefähr 30%.

3.14 LRP1-abhängige Modulation des APP-Transports beeinflusst die APPswe-Prozessierung

Das hier herausgearbeitete Modell der internalisierungsabhängigen γ -Sekretase-Prozessierung von schwedischem APP beruht auf der Analyse von Mutationen des endogenen Endozytosemotivs YENPTY. Diese Untersuchungen zeigten eine Abhängigkeit der A β -Produktion vom Transport der im sekretorischen Transportweg erzeugten C99-Fragmente von der Zelloberfläche in die endosomalen Kompartimente. Wir haben daher zusätzlich untersucht, ob Proteine, die den Transport von APP beeinflussen, die Sekretion des A β -Peptids beeinträchtigen können.

LRP1-defiziente Zellen zeigen eine um 50% reduzierte Internalisierung von *wildtyp* APP von der Zelloberfläche. Wie bei den Mutationen der YENPTY-Domäne von APP verursachte die erniedrigte Endozytose einen Anstieg der APPs-Sekretion bei gleichzeitig stark verminderter A β -Sekretion (284). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass LRP1 den Transport von APP beeinflusst und die APP-Prozessierung reguliert. Analog zur den Untersuchungen der *wildtyp* APP-Prozessierung (284, 285) wurde daher die LRP1-abhängige Prozessierung von schwedischem APP betrachtet. Dazu wurden APP695swemyc und APP695swe Δ NPTYmyc sowohl in CHOKI als auch in 13-5-1 Zellen stabil exprimiert. 13-5-1 Zellen sind aus CHOKI gewonnene LRP1-defiziente Zellen (Abb. 28, 1. Feld). Sowohl in den CHOKI als auch in 13-5-1 Zellen hatte die Deletion der NPTY-Domäne von

APP695swemyc nur einen geringfügigen Einfluss auf die jeweilige APPs β_{swe} -Sekretion (Abb. 28, 5. Feld). Diese Unabhängigkeit vom Endozytosemotiv YENPTY bestätigte, dass die β -Sekretase-Prozessierung von APPswe hauptsächlich im sekretorischen Transportweg und nur ein sehr kleiner Teil in endozytotischen Kompartimenten erfolgt. Auf der anderen Seite verursachte die LRP1-Defizienz der 13-5-1 Zellen im Vergleich zu den CHOKI Zellen einen Anstieg der APPs β_{swe} -Sekretion (Abb. 28, 5. Feld). Parallel führte dieser Anstieg der β -Sekretase-Prozessierung zu einer Erhöhung der C99-Fragmente (Abb. 28, 6. Feld). Trotz der starken Erhöhung des β -Sekretase-*Sheddings* und dem sich daraus ergebenden Anstieg der C99-Fragmente konnte keine korrespondierende Steigerung der A β -Sekretion in 13-5-1 Zellen beobachtet werden (Abb. 28, 7. Feld). Zudem kam es in den 13-5-1-Zellen zu einem starken Anstieg der C83-Fragmente. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die LRP-Defizienz den Transport von APP durch den sekretorischen Transportweg dahingehend beeinträchtigt, dass es zu einer erhöhten Spaltung von APPswe durch die β -Sekretase kommt (Abb. 28, 5. Feld).

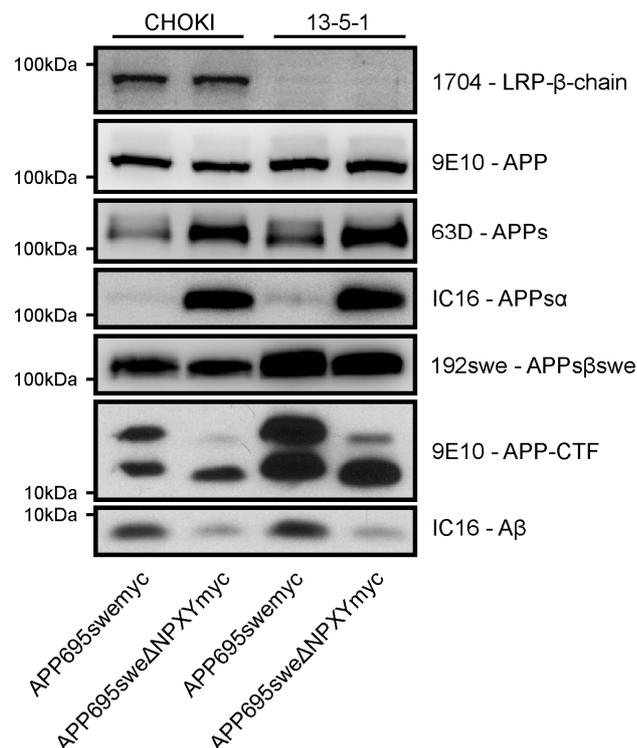


Abb. 28: LRP1-abhängige Modulation des APP-Transports beeinflusst die APPswe-Prozessierung

APP695swemyc und APP695swe Δ NPTYmyc wurden stabil in CHOKI bzw. in den korrespondierenden LRP1-defizienten 13-5-1 Zellen exprimiert. Die LRP1-Defizienz der 13-5-1 Zellen verursachte einen Anstieg der APPs β_{swe} -Sekretion und eine starke Akkumulation sowohl der C99- als auch der C83-Fragmente. Ungeachtet dessen konnte nur ein leichter Anstieg der A β -Produktion beobachtet werden. Die zusätzliche Deletion des NPTY-Motivs von APP695swemyc induzierte eine verstärkte APP α - und Gesamt-APPs-Sekretion. Trotz gleichmäßiger APPs β_{swe} -Sekretion waren die C99-Fragmente in beiden Zelltypen stark erniedrigt. Infolge der verminderten β CTFs war auch die A β -Menge durch die Deletion der NPTY-Domäne stark vermindert.

Zudem scheint auch der Transport der C99-Fragmente in den LRP1-defizienten Zellen beeinträchtigt zu sein, da die stark erhöhte β -Sekretase-Prozessierung keinen Anstieg der A β -Sekretion verursachte (Abb. 28, 5 und 7. Feld). Dies könnte wiederum durch eine verminderte Internalisierung der C99-Fragmente in den LRP-defizienten Zellen hervorgerufen worden sein. Infolge der Akkumulation an der Zelloberfläche würde die C99-Fragmente Substrate der α -Sekretase werden. Durch eine verstärkte α -Sekretase-vermittelte Umwandlung der C99-Fragmente in C83 würde es zusätzlich zu einer starken Zunahme der C83-Fragmente kommen (Abb. 28, 6. Feld). Zudem würde eine reduzierte Endozytose den Transport zur γ -Sekretase verringern, so dass nur ein Teil der C99-Fragmente zu A β prozessiert werden könnte (Abb. 28, 7. Feld).

Die Untersuchung der NPTY-Deletionsmutanten (Abb. 28) bestätigte, dass die Endozytose bzw. der Transport von APP in LRP1-defizienten Zellen nur teilweise (~50%) beeinträchtigt ist (284). Die NPTY-Deletion verursachte sowohl in CHOKI als auch in 13-5-1 Zellen einen starken Anstieg der APPs α -Sekretion, wodurch auch die Gesamt-APPs-Sekretion anstieg (Abb. 28, 3. und 4. Feld). Trotz gleichmäßiger APPs β_{swe} -Sekretion (Abb. 28, 5. Feld) waren die C99-Fragmente von APP695swe Δ NPTYmyc im Vergleich zu APP695swemyc exprimierenden CHOKI bzw. 13-5-1 Zellen stark reduziert (Abb. 28, 6. Feld). Die Abnahme der C99-Fragmente verursachte folglich die starke Reduktion der A β -Sekretion (Abb. 28, 7. Feld).

3.15 Kompetitive Inhibition der γ -Sekretase-Prozessierung von C99 zu A β durch LRP1

Da LRP1 ein Substrat der γ -Secretase ist und ein verkürztes LRP1-Konstrukt (LRPCT) die Sekretion von A β und p3 in *wildtyp* APP überexprimierenden Zellen reduzierte (308), wurde untersucht, ob die im Vergleich zum *wildtyp* APP stark erhöhte A β -Sekretion von schwedischem APP durch das gleiche LRPCT-Konstrukt inhibiert werden kann. LRPCT besteht aus dem zytoplasmatischen Schwanz, der Transmembrandomäne und einem kurzen Stück der extrazellulären Domäne von LRP1. Zur richtigen Integration von LRPCT in die Membran wurde das Signalpeptid des LRP1 N-terminal angefügt (Abb. 29A).

Die Überexpression von LRPCT in den APP695swemyc bzw. APP695swe Δ NPTYmyc exprimierenden Zellen hatte weder einen Einfluss auf die APP-Expression, noch auf die APPs-, APPs α - oder APPs β_{swe} -Sekretion oder die C99- und C83-Mengen (Abb. 29B, 1.-5. Feld). Gleichzeitig wurde die A β -Sekretion vollständig blockiert (Abb. 29B, 6. Feld). Diese Ergebnisse zeigen, dass LRP1 als Substrat der γ -Sekretase mit den C-terminalen Fragmenten von APP um die γ -Sekretase-Aktivität konkurriert und infolgedessen die A β -Sekretion vermindert.

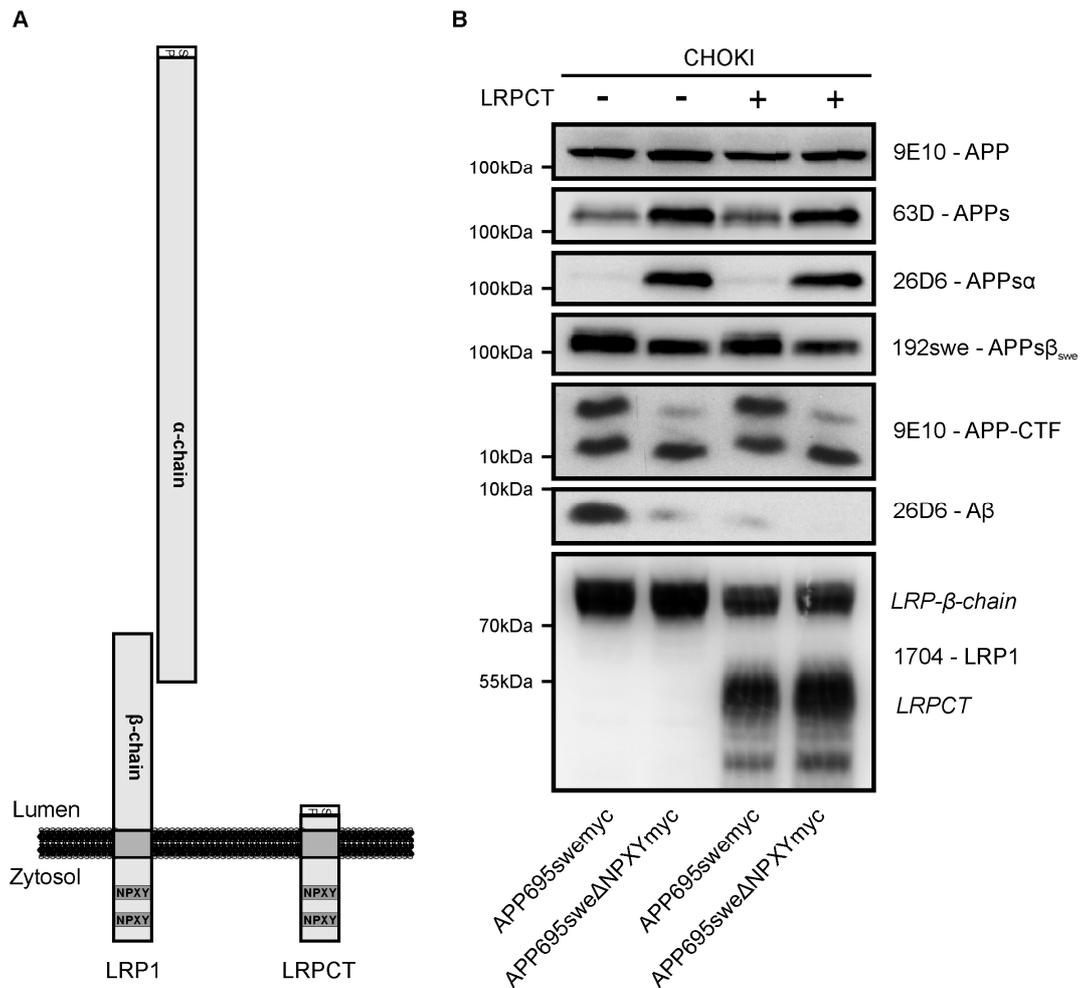


Abb. 29: Kompetitive Inhibition der γ -Sekretase-Prozessierung von APP durch LRP1

A Schematische Darstellung von LRP1 und LRPCT. LRP1 ist ein 600 kDa großes Typ-I-Transmembranprotein, das posttranslational durch Furin in der extrazellulären Domäne gespalten wird. Die dabei entstehende α -Chain bleibt mit der β -Chain nicht-kovalent verbunden. Das verkürzte LRP1-Konstrukt LRPCT besteht aus einem kurzen Abschnitt der extrazellulären Domäne, der Transmembrandomäne und dem zytosolischen Schwanz der β -chain. Zur korrekten Integration des Proteins in die Membran wurde N-terminal das Signalpeptid (SP) von LRP1 angefügt.

B Transiente Expression von LRPCT in APP695swemyc bzw. APPswe Δ NPTYmyc exprimierenden CHOKI-Zellen hatte weder einen Einfluss auf die APP-Expression, noch auf die APP α -, die APPs β_{swe} -Sekretion oder die CTF-Menge. Gleichzeitig wurde die A β -Produktion durch die LRPCT-Expression vollständig unterbunden.

4 Diskussion

Der Großteil des heutigen Wissens über die Entstehung der Alzheimer Krankheit beruht auf Erkenntnissen von Untersuchungen familiärer Formen der Erkrankung, welche durch Mutationen in den Genen von APP, Presenilin 1 oder Presenilin 2 (PS1, PS2) verursacht werden. Die meisten dieser Mutationen verändern die γ -Sekretase-Prozessierung von APP. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Sekretion der um zwei Aminosäuren längeren A β -Form, A β 42. Dies geschieht in den meisten Fällen durch eine Erhöhung des A β 42/A β 40-Verhältnisses bei gleichbleibender A β -Sekretion. Das A β 42-Peptid aggregiert leichter und schneller als A β 40. Dies führt zu einer verstärkten Bildung von löslichen Oligomeren, die durch weitere Aggregation präzipitieren. Die anfänglich zu beobachtenden diffusen Ablagerungen sowie die zentralen Bereiche der daraus hervorgehenden neuritischen Plaques bestehen fast ausschließlich aus A β 42. Dies deutet darauf hin, dass eine aberrante A β 42-Sekretion sowohl die Entstehung der familiären als auch der sporadischen Form der Alzheimer Krankheit auslöst.

4.1 **Eigenschaften der schwedischen Mutation und ihre Bedeutung in der Erforschung der Alzheimer Krankheit**

Unter den familiären Mutationen hat die schwedische Mutation, welche in der Aminosäuresequenz unmittelbar N-terminal von der β -Sekretase-Schnittstelle gelegen ist, eine herausgehobene Position. Im Vergleich zum *wildtyp* APP wird das β -Sekretase-*Shedding* von APP durch die schwedische Mutation so stark erhöht (37, 304), dass die APPs-Sekretion bei leicht erniedrigtem APPs α verdoppelt wird (Abb. 19, Abb. 27). Der Anstieg der β -Sekretase-Prozessierung resultiert zudem in einer starken Erhöhung der membranständigen C99-Fragmente (Abb. 19). Die anschließende γ -Sekretase-Prozessierung der β CTFs führt zu einer 6-8fachen Steigerung der A β -Sekretion (Abb. 19, (37)). Im Gegensatz zu Mutationen, die die γ -Sekretase-Aktivität beeinflussen, kommt es durch die schwedische Mutation nicht zu einer Veränderung des A β 42/A β 40-Verhältnisses, sondern zu einer parallelen Steigerung der A β 40- und A β 42-Sekretion (16). Die gesamte amyloidogene Prozessierung von APP wird demnach durch die schwedische Mutation stark erhöht. Dabei löst die schwedische Mutation die Alzheimer Erkrankung vermutlich durch den Anstieg der A β 42-Produktion aus. Die bei leicht erniedrigter APPs α -Sekretion doppelt so hohe APPs-Sekretion (Abb. 19, Abb. 27) und die im Verhältnis zum C83 höhere C99 Menge deuten darauf hin (Abb. 10, Abb. 19), dass mehr als die Hälfte der APPswe-Proteine über den amyloidogenen Weg prozessiert werden. Diese Eigenschaften haben die schwedische Mutation in den letzten Jahren zu einem wichtigen Hilfsmittel der Erforschung der Entwicklung der Alzheimer Krankheit gemacht. Untersuchungen der amyloidogenen Prozessierung von *wildtyp* APP werden durch die geringe β -Sekretase-Prozessierung und die sich daraus ergebenden niedrigen C99- und A β -Mengen erschwert. Darüber hinaus zeigte die Überexpression von *wildtyp*

APP in Mäusen keine Pathologie, die der Alzheimer Krankheit ähnlich wäre (309). Im Gegensatz dazu erleichtert die schwedische Mutation durch die verstärkte β -Sekretase-Prozessierung die Detektion der C99-Fragmente und der A β -Sekretion. Zudem konnten durch die Verwendung der schwedischen Mutation die ersten Mausmodelle entwickelt werden, bei denen A β -Ablagerungen und Merkfähigkeitsstörungen beobachtet wurden (281, 310). Zur Generierung besserer und vollständigerer Alzheimer-Modelle wurde die schwedische Mutation daher in fast allen weiteren Mausmodellen in Kombination mit weiteren familiären APP-Mutationen verwendet (siehe <http://www.alzforum.org/res/com/tra/app/default.asp>). Mausmodelle, die neben den A β -Plaques auch Tau-Pathologien und neuronalen Zelltod zeigten, wurden durch die zusätzliche Expression von PS und Tau, welche jeweils familiäre Mutationen trugen, entwickelt (311-313).

Die Verwendung der schwedischen Mutation in den meisten Mausmodellen der Alzheimer Krankheit setzt eine genaue Kenntnis der Auswirkungen des doppelten Aminosäureaustausches unmittelbar N-terminal der β -Sekretase-Schnittstelle voraus. Bereits die ersten Untersuchungen zeigten, dass die schwedische Mutation nicht nur die Affinität von APP zur β -Sekretase erhöht, sondern auch die zelluläre Lokalisierung der amyloidogenen Prozessierung beeinflusst.

So wurde beobachtet, dass die A β -Produktion die Internalisierung von *wildtyp* APP von der Zelloberfläche erfordert. Während an der Zelloberfläche markiertes APP nach der Internalisierung zu A β metabolisiert wurde, verhinderte die Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne von *wildtyp* APP, d.h. die Entfernung des Endozytose-Motivs, die A β -Sekretion (37, 99, 123). Korrespondierende Untersuchungen von APP^{swe} überexprimierenden Zellen ergaben uneinheitliche Ergebnisse. Zum einen hatte die C-terminale Verkürzung von APP^{swe} keinen Einfluss auf die A β -Sekretion (37, 108). Dies deutet darauf hin, dass APP^{swe} hauptsächlich im sekretorischen Transportweg zu A β prozessiert wird. Zum anderen zeigte die Iodierung von Oberflächenproteinen, dass die A β -Produktion von markiertem APP in APP^{swe}-Zellen doppelt so hoch war wie in *wildtyp* APP-Zellen (303). Dies weist darauf hin, dass ein Teil der A β -Produktion nach der Internalisierung von APP^{swe} erfolgt und dass die schwedische Mutation auch die amyloidogene Prozessierung in endozytotischen Kompartimenten im Vergleich zu *wildtyp* APP exprimierenden Zellen erhöht.

Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass die Inhibition der Endozytose durch einen Dynamin-Peptidinhibitor die A β -Konzentration in der Interstitialflüssigkeit von Tg2576 Mäusen, welche APP695 mit der schwedischen Mutation überexprimieren (281), um bis zu 70 % reduzierte (282). Diese neuen Beobachtungen widersprechen dem langjährigen Modell, das besagt, dass die A β -Generation der schwedischen Mutation unabhängig von der Clathrin-vermittelten Endozytose ist und hauptsächlich vor dem Erreichen der Zelloberfläche im sekretorischen Transportweg erfolgt.

Auf Grund dieser abweichenden Beobachtungen haben wir in dieser Arbeit die Prozessierung von schwedischem APP detailliert untersucht. Durch den Vergleich der Prozessierungsmuster sollten die Unterschiede der *wildtyp* APP- und der APP^{swe}-Prozessierung herausgearbeitet und die zellulären Kompartimente, in denen die einzelnen Prozessierungsschritte erfolgen, bestimmt werden.

4.2 Die Prozessierung von *wildtyp* APP

Zur Untersuchung der in 4.1 geschilderten widersprüchlichen Ergebnisse wurde die Clathrin-vermittelte Endozytose durch Mutationen der AP-2/*Clathrin-coated pit*-Konsensussequenz YENPTY im zytoplasmatischen Schwanz von APP inhibiert. Diesem Sequenzmotiv wird eine zentrale Funktion zugeschrieben, da es in allen Mitgliedern der APP-Familie konserviert ist (314). Punktmutationen in dieser Domäne oder die vollständige Entfernung des Motivs zeigten, dass dieses Sequenzmotiv auch im APP für die Clathrin-vermittelte Endozytose erforderlich ist (98, 100).

Während die Deletion der NPTY-Domäne im *wildtyp* APP die APPs-Sekretion stark erhöhte, wurde gleichzeitig die A β -Produktion substantiell beeinträchtigt (Abb. 10, Abb. 19; (37, 99, 100, 123)). Dabei verursachten Punktmutationen des YENPTY-Motivs eine parallele Abnahme der A β 40- und A β 42-Sekretion (100). Die Aufschlüsselung der erhöhten APPs-Sekretion zeigte, dass die Erhöhung ausschließlich durch verstärktes α -Sekretase-*Shedding* hervorgerufen wurde (Abb. 10, Abb. 19). Durch den spezifischen Nachweis von APPs β_{wt} konnten wir erstmals zeigen, dass die β -Sekretase Prozessierung von *wildtyp* APP in Folge der Entfernung des NPTY-Sequenzmotivs sehr stark erniedrigt, aber nicht vollständig inhibiert wurde. Veränderungen der NPTY-Domäne verursachen in erster Linie eine Beeinträchtigung der Internalisierung von APP von der Zelloberfläche in die endozytotischen Kompartimente und infolgedessen eine Akkumulation von APP an der Zelloberfläche (98, 100). Diese Erhöhung der Substratkonzentration verstärkt die α -Sekretase-Prozessierung von APP und somit die APPs-Sekretion (Abb. 10, Abb. 19). Unsere Ergebnisse deuten zusätzlich darauf hin, dass die Entfernung des NPTY-Motivs gleichzeitig den Transport von *wildtyp* APP zur aktiven β -Sekretase in den endozytotischen Kompartimenten beeinträchtigt. Die damit verbundene Abnahme der Substratkonzentration vermindert das β -Sekretase-*Shedding* von *wildtyp* APP in endozytotischen Kompartimenten, vermutlich den Endosomen, und infolgedessen die APPs β_{wt} -Sekretion (Abb. 10, Abb. 19). Die nach der Deletion der NPTY-Domäne verbleibende APPs β -Sekretion wird vermutlich durch β -Sekretase-Prozessierung in Endozytose unabhängigen Kompartimenten, z.B. im sekretorischen Transportweg, hervorgerufen. Auf der anderen Seite reduzierte die vollständige Entfernung des zytoplasmatischen Schwanzes die Internalisierungsrate von APP nur auf ca. 25 % (100). Die geringe APPs β -Sekretion der NPTY-Deletionsmutanten könnte daher auch durch die verbleibende unspezifische Internalisierung von APP verursacht werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das β -Sekretase-*Shedding* von *wildtyp* APP entweder vollständig oder aber zum größten Teil in endozytotischen Kompartimenten erfolgt. In letzterem Fall würde ein kleiner Teil der APPs β -Sekretion durch eine β -Sekretase-Aktivität im sekretorischen Transportweg hervorgerufen werden (Abb. 30). Auf Grund der verminderten Entstehung von C99 verursacht die Inhibition der Internalisierung auch eine starke Reduzierung der A β -Produktion (Abb. 10, Abb. 19). Die parallele Abnahme von A β 40 und A β 42 (100) deutet darauf hin, dass beide Formen hauptsächlich aus den in

den Endosomen hergestellten C99-Fragmenten und durch dieselbe γ -Sekretase-Aktivität erzeugt werden.

Die A β -Produktion wird durch das β -Sekretase-*Shedding* eingeleitet. Unsere Untersuchungen an *wildtyp* APP zeigen, dass dieser limitierende Schritt nahezu vollständige von der Internalisierung von der Zelloberfläche abhängt und somit in endozytotischen Kompartimenten erfolgt. Jegliche Beeinträchtigung der *wildtyp* APP-Endozytose limitiert daher die A β -Produktion primär durch die Verhinderung der β -Sekretase-Prozessierung (Abb. 30).

4.3 Die Prozessierung von schwedischem APP

Wie beim *wildtyp* APP verursacht die Deletion des NPTY-Motivs infolge der beeinträchtigten Internalisierung eine Akkumulation von schwedischem APP an der Zelloberfläche (Abb. 12). Durch die erhöhte Substratkonzentration an der Zelloberfläche kommt es zu einer verstärkten α -Sekretase-Prozessierung von internalisierungsdefizientem APP_{swe} und somit zu einer starken Erhöhung sowohl der APP α - als auch der Gesamt-APPs-Sekretion (Abb. 10, Abb. 19). Im Gegensatz zur *wildtyp* APP-Prozessierung hat die Deletion des NPTY-Motivs, Punktmutationen der YENPTY-Domäne oder sogar die vollständige Entfernung des zytoplasmatischen Schwanzes von schwedischem APP nahezu keinen Einfluss auf die APP_{swe}-Sekretion (Abb. 10, Abb. 19, Abb. 13, Abb. 15). Dies zeigt, dass die β -Sekretase-Prozessierung von APP_{swe} nahezu unabhängig von der Internalisierung von der Zelloberfläche in die endozytotischen Kompartimente ist.

Diese Ergebnisse stimmen mit vorherigen Beobachtungen überein, dass die Initiierung des amyloidogenen Prozessierungsweges durch das β -Sekretase-*Shedding* von APP_{swe} hauptsächlich im späten sekretorischen Transportweg, vermutlich in vom Golgi abgeschnürten Vesikeln, erfolgt (275, 280). Zudem wurde die β -Sekretase, BACE1, durch immunohistochemische Färbungen hauptsächlich im Golgi und in den Endosomen lokalisiert, wohingegen nur geringe Mengen im ER oder in den Lysosomen detektiert wurden (110). Diese Resultate deuten daher darauf hin, dass der β -Sekretase-Schnitt im *wildtyp* APP in erster Linie in den Endosomen erfolgt, während der amyloidogene Prozessierungsweg von APP_{swe} durch eine β -Sekretase-Aktivität in vom Golgi abgeschnürten Vesikeln initiiert wird (Abb. 30).

Ungeachtet der nahezu unveränderten APP_{swe}-Sekretion wurde die γ -Sekretase-vermittelte A β -Freisetzung durch Mutationen der YENPTY-Domäne von schwedischem APP um mehr als 50 % vermindert (Abb. 10, Abb. 11, Abb. 13, Abb. 14, Abb. 15). Obwohl bei gleicher APP_{swe}-Sekretion auch gleiche C99-Mengen produziert werden, zeigten alle Zelllinien, die Mutationen der YENPTY-Domäne von APP_{swe} stabil exprimierten, stark erniedrigte C99-Fragmente (Abb. 10, Abb. 13). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Erniedrigung der A β -Sekretion der internalisierungsdefizienten APP_{swe}-Konstrukte nicht durch eine Erniedrigung der β -Sekretase-Prozessierung, sondern durch

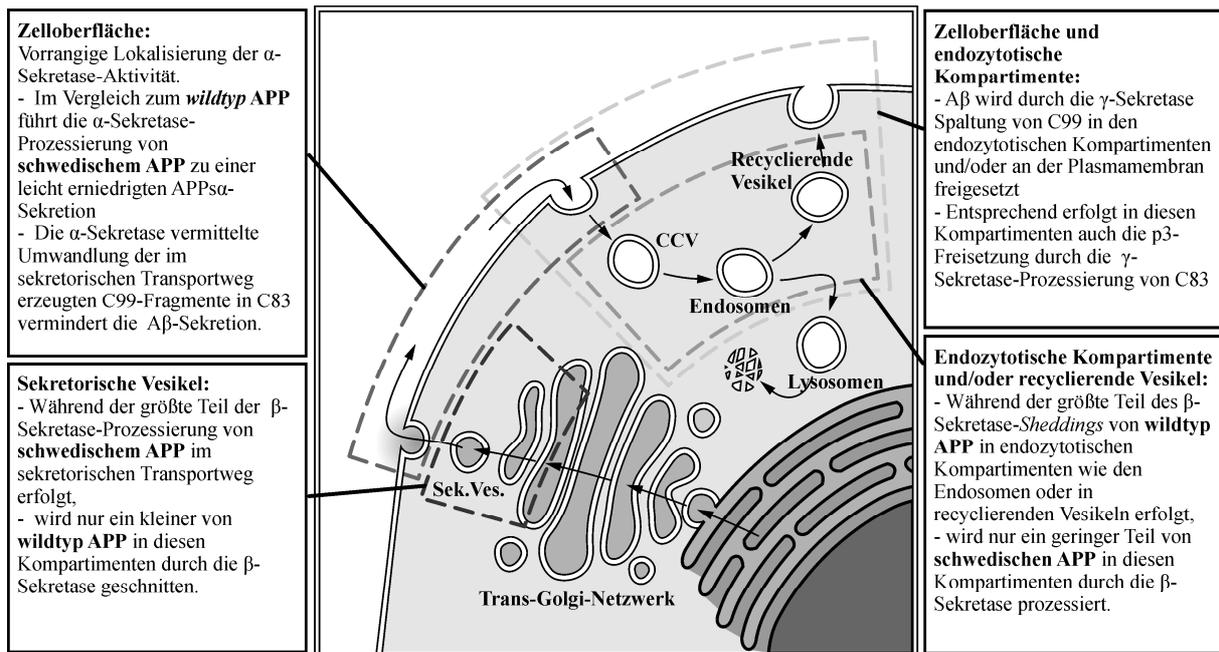


Abb. 30: Lokalisierung der einzelnen Prozessierungsschritte von *wildtyp* und schwedischem APP.

Die eingezeichnete Route (Pfeile) markiert den physiologischen Transportweg von APP. Die α -Sekretase-Prozessierung von APP an der Zelloberfläche führt zur Sekretion von APP α und zur Entstehung des membrangebundenen C83. Beim *wildtyp* APP erfolgt nur ein kleiner Teil des β -Sekretase-*Sheddings* im sekretorischen Transportweg, während der größte Teil der amyloidogenen Prozessierung in den endozytotischen Kompartimenten wie den Endosomen initiiert wird. Die schwedische Mutation verstärkt die β -Sekretase-Prozessierung von APP. Im Gegensatz zum *wildtyp* APP ereignet sich der größte Teil des β -Sekretase-*Sheddings* von APP^{sw} in den sekretorischen Vesikeln, während nur ein kleiner Teil der amyloidogenen Prozessierung in endozytotischen Kompartimenten initiiert wird. Nach dem Transport der im sekretorischen Transportweg erzeugten C99-Fragmente zur Plasmamembran wird ein Teil davon durch die α -Sekretase geschnitten. Diese Konversion von C99 zu C83 vermindert die A β -Produktion. Die γ -Sekretase-Prozessierung der C99- und C83-Fragmente ereignet sich in den endozytotischen Kompartimenten und/oder an der Zelloberfläche und führt zur Sekretion der A β - bzw. p3-Peptide bei gleichzeitiger Freisetzung von AICD ins Zytosol (CCV-Clathrin coated vesicles, Sek. Ves – sekretorische Vesikel).

verminderte Zugänglichkeit der C99-Fragmente zur γ -Sekretase-Aktivität hervorgerufen wurde. Um diese Hypothese zu untersuchen, haben wir ein C99-Konstrukt stabil in CHOKI-Zellen exprimiert.

Dieses Konstrukt bildete das nach dem β -Sekretase-*Shedding* in der Membran zurückbleibende C99-Fragment nach. Da sich die schwedische Mutation N-terminal von der β -Sekretase-Schnittstelle befindet, unterscheidet sich das C99 von *wildtyp* APP nicht vom C99 von APP^{sw}. Die Untersuchung der C99-Prozessierung zeigte, dass auch die γ -Sekretase-vermittelte Freisetzung von A β aus C99 abhängig vom Endozytosemotiv NPTY ist (Abb. 22) Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die γ -Sekretase-Aktivität zum größten Teil in den endozytotischen Kompartimenten oder in der Nähe der Zelloberfläche lokalisiert ist. Die γ -Sekretase ist ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Proteinkomplex, wobei das polytope Presenilin, PS1 oder PS2, das katalytische Zentrum des Komplexes bildet (315). Immunohistochemische Färbungen von Presenilin deuten darauf hin, dass die γ -Sekretase hauptsächlich oder sogar ausschließlich im Endoplasmatischen Retikulum oder in den frühen Golgi-Kompartimenten lokalisiert ist (16). Während die einzelnen Mitglieder der γ -Sekretase keine Aktivität besitzen, erhöht der Zusammenbau des maturierten γ -Sekretase-Komplexes, bestehend

aus Presenilin, Nicastrin, APH-1 und PEN-2, die γ -Sekretase-Prozessierung der Substrate. Die Assoziierung der γ -Sekretase erfolgt vermutlich im ER, wobei ER-Golgi-Recycling-Mechanismen eine entscheidende Rolle spielen (256, 257). Dies weist darauf hin, dass die Maturierung des γ -Sekretase-Komplexes und die endgültige Lokalisierung der γ -Sekretase-Aktivität in der Zelle räumlich nicht übereinstimmen. Zur genaueren Lokalisierung der aktiven γ -Sekretase wurde daher ein C99-GFP-Fusionsprotein verwendet (278). Durch die Blockade ausgewählter Teilstrecken des sekretorischen Transportweges konnte mit Hilfe des Reporterproteins GFP gezeigt werden, dass die γ -Sekretase-Prozessierung des Substrates nicht im ER, dem Trans-Golgi-Netzwerk oder in sekretorischen Vesikeln erfolgt. Dagegen zeigte die Inhibition der Endozytose, dass die intrazelluläre Domäne an der Zelloberfläche oder in den Endosomen freigesetzt wird (278). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die einzelnen Preseniline wie die anderen Komponenten der γ -Sekretase im ER lokalisiert sind und erst der vollständig maturierte γ -Sekretase-Komplex an den Ort der γ -Sekretase-Aktivität transportiert wird.

Obwohl die A β -Freisetzung sowohl aus *wildtyp* als auch aus schwedischem APP zum größten Teil in endozytotischen Kompartimenten erfolgt, zeigen unsere Resultate, dass sich die Prozessierung von schwedischem APP und *wildtyp* APP deutlich unterscheidet. Im Gegensatz zum *wildtyp* APP ist die Initiierung der amyloidogenen Prozessierung von schwedischem APP nahezu internalisierungsunabhängig. Das β -Sekretase-*Shedding* von APP_{swe} erfolgt fast ausschließlich im sekretorischen Transportweg, vermutlich in vom Golgi abgeschnürten sekretorischen Vesikeln. Die geringfügige Abnahme der APP_{swe}-Sekretion durch Mutationen des NPTY-Motivs weist darauf hin, dass ein kleiner Teil der Prozessierung von schwedischem APP durch die β -Sekretase-Aktivität in endozytotischen Kompartimenten, vermutlich den Endosomen, erfolgt. Dieser kleine Anteil der APP_{swe}-Sekretion wird somit vermutlich durch die gleiche β -Sekretase-Aktivität verursacht, die für den größten Teil des β -Sekretase-*Sheddings* von *wildtyp* APP verantwortlich ist. Dies zeigt, dass die schwedische Mutation nicht nur die β -Sekretase-Prozessierung stark erhöht, sondern auch eine räumliche Verschiebung der amyloidogenen Prozessierung verursacht (Abb. 30).

Die Beeinträchtigung der Internalisierung von *wildtyp* APP durch die Deletion des Internalisierungsmotivs führte zu einer starken Erniedrigung der β -Sekretase-Prozessierung und somit der C99-Produktion. Infolge der verminderten C99-Menge kam es zu einer Reduzierung der A β -Sekretion. Dagegen ist die Bildung der C99-Fragmente von APP_{swe} durch die erniedrigte Endozytose nicht beeinträchtigt. Die um mehr als 50% reduzierte A β -Sekretion der internalisierungsdefizienten APP_{swe}- bzw. C99-Konstrukte zeigt, dass die γ -Sekretase-Prozessierung von C99 stark von der Endozytose in die Endosomen abhängt (Abb. 10, Abb. 14, Abb. 22). Dies deutet darauf hin, dass die γ -Sekretase-Prozessierung von *wildtyp* und schwedischem APP durch die gleiche Aktivität und in den gleichen Kompartimenten, vermutlich an der Zelloberfläche, in Endosomen oder in recycelnden Vesikeln, erfolgt. Während die β - und die γ -Sekretase-Prozessierung von *wildtyp* APP somit räumlich in den gleichen Kompartimenten stattfinden, deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Initiierung

der amyloidogenen Prozessierung von schwedischem APP durch die β -Sekretase von der A β -Freisetzung durch die γ -Sekretase-Prozessierung räumlich und somit auch zeitlich getrennt ist. Nach dem β -Sekretase-*Shedding* im sekretorischen Transportweg werden die C99-Fragmente zur Zelloberfläche transportiert. Die stark reduzierte A β -Sekretion durch Mutationen der YENPTY-Domäne von APP_{swe} (Abb. 11, Abb. 13, Abb. 15) weist darauf hin, dass die γ -Sekretase-Prozessierung teilweise von der Endozytose der C99-Fragmente abhängig ist und somit in endozytotischen Kompartimenten erfolgt. Die nach der Zerstörung des Internalisierungssignals verbleibende A β -Sekretion wird vermutlich durch eine γ -Sekretase-Aktivität an der Zelloberfläche freigesetzt (278). Auf der anderen Seite könnte auch diese γ -Sekretase-Prozessierung in Folge von unspezifischer Internalisierung der C99-Fragmente in den endozytotischen Kompartimenten erfolgen, da trotz vollständiger Entfernung des zytoplasmatischen Schwanzes die Internalisierungsrate von APP nur auf 25 % reduziert wurde ((100), Abb. 30). Die Deletion der NPTY-Domäne von APP_{swe} führte neben einer Akkumulation von APP_{swe} auch zu einer Zunahme der C99-Fragmente an der Zelloberfläche (Abb. 20). Dies zeigt, dass auch die Internalisierung der CTFs durch die AP-2/*Clathrin-coated pit*-Konsensussequenz NPTY aktiv vermittelt wird. Da die Größenordnung der verbleibenden unspezifischen Endozytose der C99-Fragmente nicht bekannt ist, kann nur vermutet werden, dass der größte Teil der γ -Sekretase-Aktivität in endozytotischen Kompartimenten und ein kleinerer Teil an der Zelloberfläche lokalisiert ist (Abb. 30).

Das langjährige Modell postuliert, dass die A β -Generation von schwedischem APP unabhängig von der Clathrin-vermittelten Endozytose stattfindet und hauptsächlich vor dem Erreichen der Zelloberfläche im sekretorischen Transportweg erfolgt (37, 108). Diese Hypothese wurde kürzlich durch Ergebnisse in Frage gestellt, die zeigten, dass in APP_{swe} überexprimierenden Mäusen die Inhibition der Endozytose die A β -Sekretion um 70 % erniedrigt. (282). Unsere Resultate erhärten diese Internalisierungsabhängigkeit der A β -Freisetzung aus APP_{swe} und zeigen, dass die amyloidogene Prozessierung von schwedischem APP nicht unabhängig von der zytoplasmatischen Domäne ist. Nichtsdestotrotz können wir bestätigen, dass die β -Sekretase-Prozessierung durch den doppelten Aminosäureaustausch der schwedischen Mutation überwiegend im sekretorischen Transportweg erfolgt (280).

4.4 Die Internalisierungsdomäne YENPTY von APP

Die NPTY-Domäne von APP ähnelt der 6-Aminosäure langen Internalisierungsdomäne FDNPVY des Low-density-Lipoprotein Rezeptors (LDLR). Die Aktivität des LDLR-Endozytosesignals ist dabei abhängig von dem N-terminalen Phenylalanin-Rest (90, 316). Mehrere lysosomale Transmembranglykoproteine enthalten ein weiteres 4 AS langes Internalisierungssignal mit dem Sequenzmuster Y-x-x-aromatischen/große hydrophobe Aminosäure, welches bei einigen auf der N-terminalen Seite durch ein konserviertes Glycin flankiert wird (317, 318). Es konnte gezeigt werden,

dass dieser Glycinrest wichtig für die Internalisierung einiger lysosomaler saurer Phosphatasen ist (319). Auf der anderen Seite scheint das GY-Motiv des lysosomalen Glykoproteins LGP120 eine Rolle im direkten intrazellulären Transport vom Golgi in die endosomalen-lysosomalen Kompartimente zu spielen (318, 320). Der Bereich um das NPTY-Motiv von APP, GYENPTY, besteht somit theoretisch aus drei voneinander unabhängigen Domänen - NPTY, YENP und GY.

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Deletion der NPTY-Domäne eine Akkumulation von APP_{swe} an der Zelloberfläche und infolgedessen einen Anstieg der APP α -Sekretion verursacht (Abb. 10, Abb. 11, Abb. 12). Zudem führten Punktmutationen innerhalb des YENPTY-Motivs zu einer starken Erhöhung der APP α -Sekretion (Abb. 13). Dies deutet darauf hin, dass die APP-Internalisierung durch die beiden überlappenden Endozytosesignale YENP und NPTY vermittelt wird. Dagegen verursachte die Mutation des N-terminal vor dem YENPTY-Motiv gelegenen Glycins einen 60%igen Anstieg der APP β_{swe} -Sekretion (Abb. 13, Abb. 14). Analog zum GY-Motiv des lysosomalen Glykoproteins LGP120 (318, 320) könnte der Anstieg der β -Sekretase-Prozessierung darauf hindeuten, dass dieses Glycin den intrazellulären APP-Transport vom Golgi in die endosomalen-lysosomalen Kompartimente vermittelt. Die Verminderung des intrazellulären Transports durch die G681A Mutation könnte somit eine Retention von APP im Trans-Golgi-Netzwerk hervorrufen. Da der größte Teil der β -Sekretase-Prozessierung von APP_{swe} im sekretorischen Transportweg erfolgt, würde eine Erhöhung der Substratkonzentration eine verstärkte APP β_{swe} -Sekretion verursachen. Obwohl die G681A Mutation sowohl die β -Sekretase-Prozessierung als auch die C99-Menge erhöhte, resultierte sie nicht in einem Anstieg der A β -Sekretion (Abb. 13, Abb. 14). Die leicht erhöhte APP α -Sekretion deutet darauf hin, dass auch die G681A Mutation die APP-Internalisierung von der Zelloberfläche beeinträchtigt. Eine erhöhte α -Sekretase von APP_{swe} und den C99-Fragmenten würden den leichten Anstieg der C83-Fragmente und die trotz erhöhter β -Sekretase-Prozessierung unveränderte A β -Sekretion erklären. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass die YENPTY-Domäne die Endozytose von APP_{swe} vermittelt, während das N-terminal des Internalisierungsmotivs gelegene Glycin möglicherweise den intrazellulären Transport reguliert.

4.5 Die α -Sekretase-Prozessierung des C99-Fragmentes

Theoretisch wäre auf Grund der unbeeinträchtigten β -Sekretase-Prozessierung von schwedischem APP (Abb. 10, Abb. 11) und der reduzierten Internalisierung der CTFs durch Mutationen der YENPTY-Domäne (Abb. 20) ein starker Anstieg der C99-Fragmente zu erwarten gewesen. Die Deletion des NPTY-Motivs oder die Punktmutationen der YENPTY-Domäne verursachten jedoch eine starke Abnahme der C99-Fragmente (Abb. 10, Abb. 11). Unsere Untersuchungen zeigten, dass die Erniedrigung der β CTFs nicht durch erhöhte γ -Sekretase-Prozessierung (Abb. 18) oder durch verstärkte lysosomale Degradation (

Abb. 16, Abb. 17) von C99 hervorgerufen wurde. Diese Ergebnisse und die Beobachtung, dass auch die CTFs durch die Mutation der Internalisierungsdomäne an der Zelloberfläche akkumulierten (Abb. 20), führten zu der Annahme, dass die α -Sekretase bei der Degradation der C99-Fragmente eine Rolle spielen könnte. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde die α -Sekretase-Prozessierung durch die F615P Mutation im APP695^{swe} Δ NPTYmyc inhibiert. Diese Hemmung des α -Sekretase-*Sheddings* erniedrigte nicht nur die APP α -Sekretion, sondern verhinderte zudem die Abnahme der C99-Fragmente von internalisierungsdefizientem schwedischem APP (Abb. 19). Dies zeigte, dass die Abnahme der β CTF durch die Umwandlung der C99-Fragmente in C83 verursacht wurde. In Folge der stabilisierten C99-Fragmente stieg auch die A β -Sekretion von Endozytose-defizientem schwedischem APP (Abb. 19).

Interessanterweise verursachte die F615P Mutation auch im internalisierungsdefizienten *wildtyp* APP, APP695 Δ NPTYmyc, eine Stabilisierung der A β -Sekretion auf dem Niveau von nicht mutiertem APP695 (Abb. 19). Wie geschildert verursachte die Deletion der NPTY-Domäne eine starke, aber nicht vollständige Erniedrigung der β -Sekretase-Prozessierung. Die Inhibition der α -Sekretase-Prozessierung durch die F615P Mutation führte zu einer Stabilisierung der durch diese verbleibende β -Sekretase-Prozessierung erzeugten C99-Fragmente. Diese Ergebnisse zeigten, dass die durch die verbleibende β -Sekretase-Prozessierung von *wildtyp* APP entstehenden C99-Fragmente einer starken Umwandlung in C83 durch die α -Sekretase unterliegen. Die verbleibende APP β -Sekretion von internalisierungsdefizientem *wildtyp* APP wird vermutlich durch die β -Sekretase-Aktivität im sekretorischen Transportweg verursacht, die auch für den größten Teil der APP β _{swe}-Sekretion von schwedischem APP verantwortlich ist. Der Anstieg der A β -Sekretion durch die α -Sekretase-Inhibition deutet darauf hin, dass dieses C99 von *wildtyp* APP wie die C99-Fragmente von schwedischem APP zur Zelloberfläche transportiert und dort auf Grund der Deletion des Endozytosesignals zurückgehalten werden. In Folge der Retention werden diese β CTFs durch die α -Sekretase in C83 umgewandelt. Die zusätzliche Inhibition der α -Sekretase-Prozessierung unterbindet die Umwandlung von C99 in C83 und stabilisiert so das γ -Sekretase-Substrat C99. Infolge der erhöhten C99-Mengen verstärkt die Inhibition der α -Sekretase-Prozessierung die A β -Sekretion von internalisierungsdefizientem *wildtyp* APP. Dies zeigt, dass die Konversion der C99-Fragmente in C83 neben der reduzierten β -Sekretase-Prozessierung zu der Abnahme der A β -Sekretion von internalisierungsdefizientem *wildtyp* APP beiträgt (Abb. 31).

Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass jegliche Erniedrigung der Internalisierung von *wildtyp* und schwedischem APP eine Erniedrigung der A β -Produktion verursacht. Während die Inhibition der Internalisierung das β -Sekretase-*Shedding* in endozytotischen Kompartimenten stark erniedrigt, bleibt die β -Sekretase-Prozessierung im sekretorischen Transportweg unverändert. Ungeachtet der Initiierung der amyloidogenen Prozessierung im sekretorischen Transportweg, vermindert die erniedrigte Endozytose die Freisetzung von A β durch die α -Sekretase-vermittelte Umwandlung von C99 in C83. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Eingreifen in die Endozytose von APP die A β -

Produktion sowohl durch das verminderte endozytotische β -Sekretase-*Shedding* als auch durch die α -Sekretase-Prozessierung von C99 stark erniedrigt kann. Zudem machte die Verwendung der α -Sekretase-Inhibitionsmutation F615P in den SEAP-APP und APP-Gal Konstrukten deutlich, dass die α -Sekretase-vermittelte Konversion von C99 in C83 ein physiologisches Ereignis der APP-Prozessierung ist. Obwohl in diesen Konstrukten die Endozytose nicht beeinträchtigt war, erhöhte die Inhibition der α -Sekretase-Prozessierung bei leicht verminderter APPs β -Sekretion die A β -Produktion (Abb. 26). Auf Grund dieser Ergebnisse haben wir das Modell des Prozessierungsschemas von APP um die α -Sekretase-Prozessierung von C99 erweitert (Abb. 31).

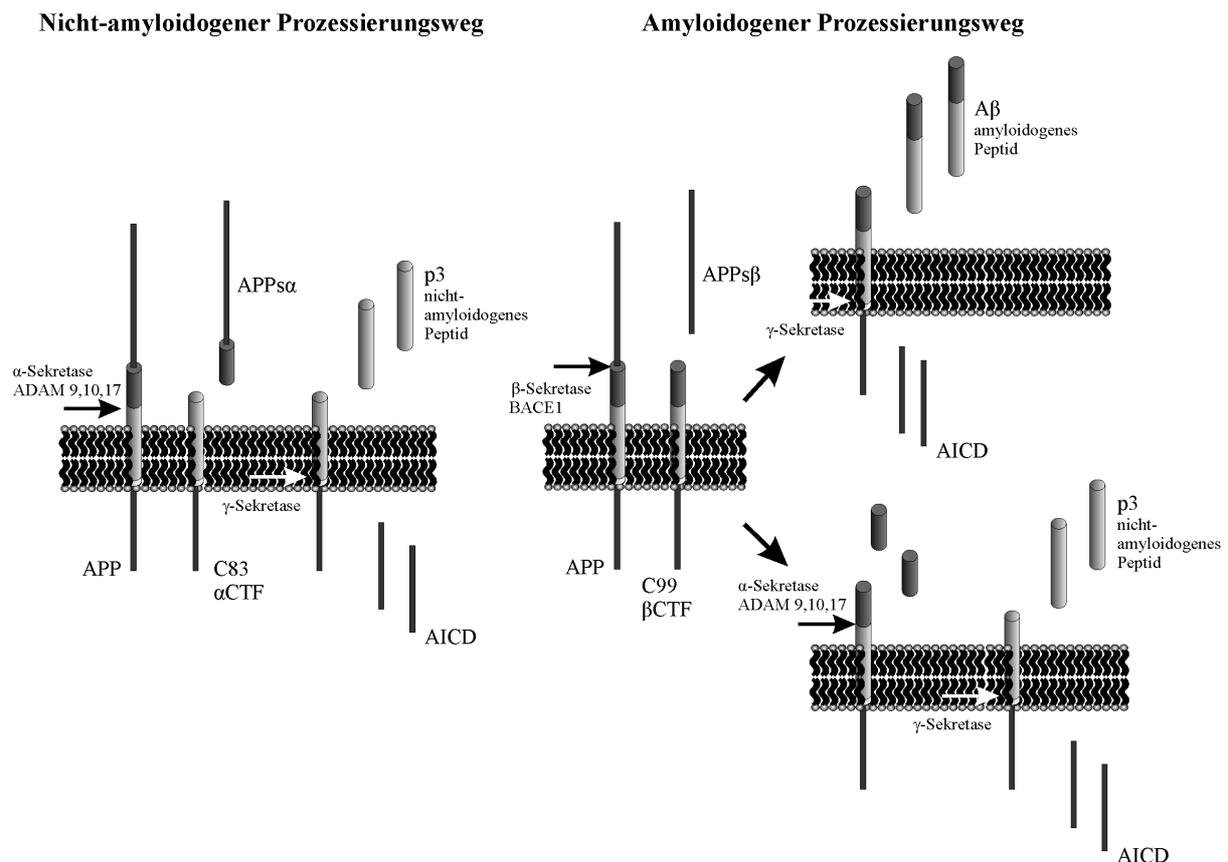


Abb. 31: Schematische Darstellung der APP-Prozessierung

APP wird entweder über den nicht-amyloidogenen (links) oder den amyloidogenen Prozessierungsweg metabolisiert. Im nicht amyloidogenen Weg wird APP zuerst durch die α -Sekretase in der A β -Domäne geschnitten, wodurch der größte Teil der extrazellulären Domäne als APPs α sezerniert wird und ein 83 AS langes Fragment (C83, CTF α) in der Membran zurückbleibt. Anschließend wird das C83 durch die γ -Sekretase in der Transmembrandomäne geschnitten. Hierbei wird die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) ins Zytosol freigegeben, während das nicht-amyloidogene p3 ins Lumen sezerniert wird. Im amyloidogenen Prozessierungsweg wird APP nacheinander durch die β -Sekretase und die γ -Sekretase geschnitten. Die β -Sekretase legt den N-Terminus des A β -Peptids durch die Sekretion von APPs β , welches etwas kürzer als das im nicht-amyloidogenen Weg gebildete APPs α ist, frei. Das dabei in der Membran zurückbleibende 99 AS lange C-terminale Fragment (C99, β CTF) wird anschließend durch die γ -Sekretase prozessiert, wodurch der C-Terminus des A β -Peptids gebildet wird. Dabei wird neben der Freisetzung von AICD ins Zytosol das A β -Peptid ins Lumen freigegeben. Alternativ zur γ -Sekretase-Prozessierung kann das C99 zunächst durch die α -Sekretase in C83 überführt werden. Anschließende γ -Sekretase-Prozessierung von C83 führt wie im nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg zur Freisetzung von AICD ins Zytosol und zur Sekretion des nicht-amyloidogenen p3-Peptids. Die α -Sekretase-vermittelte Konversion von C99 in C83 vermindert somit die Bildung des amyloidogenen A β -Peptids.

Die hier gezeigten Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen der APP-Prozessierung in ADAM10-überexprimierenden Mäusen überein. Neben ADAM9 und ADAM17 wurde ADAM10 als einer der potenziellen α -Sekretase-Kandidaten identifiziert. Die erhöhte α -Sekretase-Aktivität in diesen Mäusen reduzierte die A β -Produktion und verhinderte die Plauebildung (321). Bisher wurde angenommen, dass eine verstärkte α -Sekretase-Spaltung von APP eine Erniedrigung des β -Sekretase-Substrates und somit eine Abnahme der APPs β -Sekretion und der C99-Bildung verursacht (321, 322). Die Abnahme der A β -Sekretion in Folge der erhöhten α -Sekretase-Aktivität wurde somit als Reduzierung der β -Sekretase-Prozessierung interpretiert. Unsere Ergebnisse deuten zusätzlich darauf hin, dass eine Erhöhung der α -Sekretase-Aktivität die A β -Produktion durch den Abbau des γ -Sekretase-Substrates C99 vermindern kann.

Die Mutationen der familiären Alzheimer Krankheit im APP liegen in der Nähe der Sekretase-Schnittstellen. Während die schwedische Mutation N-terminal der β -Sekretase-Schnittstelle die β -Sekretase-Prozessierung verstärkt, beeinflussen die C-terminal der γ -Sekretase-Schnittstelle lokalisierten Mutationen die γ -Sekretase-Prozessierung und verursachen eine Erhöhung des A β 42/A β 40-Verhältnisses. Zudem liegen mehrere Mutationen der FAK innerhalb der A β -Sequenz in Nähe der α -Sekretase-Schnittstelle. Die arktische (E693G), iowanische (D694N) und die holländischen Mutation (E693Q) der 21. bzw. der 22. Aminosäure des A β -Peptids verstärken die *in vitro* Aggregation. Dies deutet darauf hin, dass diese Mutationen die Krankheit durch die Bildung eines schneller aggregierenden A β -Peptids auslösen. Dagegen zeigte die flämische Mutation (A692G) der 20. Aminosäure, eine Aminosäure näher an der α -Sekretase-Schnittstelle, eine verminderte Aggregation (135). Zudem verursachte die flämische Mutation einen Anstieg der A β -Produktion bei gleichzeitiger Abnahme der p3-Sekretion (306). Während die holländische Mutation keinen Einfluss auf die A β -Menge hatte, führte die flämische Mutation zu einer parallelen Verdopplung der A β 40- und A β 42-Sekretion (323). Wie die schwedische Mutation löst die flämische Mutation die Alzheimer-Krankheit dabei vermutlich durch die Erhöhung des schneller aggregierenden A β 42 aus. Während die verstärkte β -Sekretase-Prozessierung der schwedischen Mutation den Anstieg der A β -Produktion verursacht, ist die Ursache der verdoppelten A β -Sekretion der flämischen Mutation noch unbekannt.

In dieser Arbeit haben wir gezeigt, dass eine verminderte α -Sekretase-Prozessierung eine erhöhte A β -Sekretion hervorruft. Dieser Anstieg der A β -Produktion könnte eine Parallele zu den Auswirkungen der flämischen Mutation darstellen, da bei der flämischen Mutation die α -Sekretase-Prozessierung durch die nah an der Schnittstelle gelegene Mutation beeinträchtigt sein könnte. Die Stabilisierung der C99-Fragmente in Folge der verminderten α -Sekretase-Prozessierung könnte den parallelen Anstieg der A β 42- und A β 40-Peptide verursachen, während gleichzeitig die p3-Sekretion vermindert werden würde (306, 323).

Diese Ergebnisse erhärten die Hypothese, dass eine Abnahme der α -Sekretase-Aktivität zur Entwicklung der Alzheimer Krankheit beiträgt und dass eine Aktivierung der α -Sekretase ein vielversprechendes therapeutisches Target zur Prävention der Alzheimerschen Krankheit ist (321).

4.6 α -Sekretase-Prozessierung von APP initiiert die Transaktivierung der Gentranskription

Neben dem APP sind viele weitere Substrate der γ -Sekretase identifiziert worden. Untersuchungen der Funktion der intramembranösen Prozessierung dieser Substrate durch den γ -Sekretase-Komplex deuten darauf hin, dass die entstehenden Produkte bei einigen Proteinen in der Signalübermittlung in den Kern und der Transkriptionsaktivierung bestimmter Zielgene eine Rolle spielen. Auf der anderen Seite scheint die γ -Sekretase als „Proteasom der Membran“ an der Degradation von Transmembranproteinen beteiligt zu sein (168).

Die Funktion der Prozessierung der membranständigen Fragmente von APP durch die γ -Sekretase ist nicht eindeutig geklärt. Auf Grund der ähnlichen Prozessierungswege von APP und dem Notch-Rezeptor wurde postuliert, dass die Freisetzung der intrazellulären Domäne von APP (AICD) ins Zytosol an der nukleären Signalübertragung beteiligt ist. Im Rahmen der Notch-Signalgebung vermittelt die γ -Sekretase die Freisetzung von NICD, die in der embryonalen Entwicklung bei der Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle spielt. Analog konnte für APP gezeigt werden, dass die γ -Sekretase-abhängige AICD-Freisetzung die Transkription eines artifiziellen Reportergens aktivieren kann. Dabei kommt es vermutlich zu der Ausbildung eines ternären Komplexes aus AICD, Fe65 und der Histone Acetyltransferase Tip60 (169). Fe65 wird dabei durch die Bindung an membrangebundenes AICD, d.h. durch Rekrutierung an APP oder an die CTFs, aktiviert. Anschließende γ -Sekretase-Prozessierung setzt das AICD zusammen mit Fe65 zur Translokation in den Kern frei (170). Diese Daten deuten darauf hin, dass die transkriptionale Aktivierung von APP und NOTCH durch unterschiedliche Mechanismen erfolgt. Während das NICD selbst das Signal in den Kern überträgt, scheint das AICD die Information indirekt über Fe65 zu übermitteln (170). Eine weiterhin offene Frage ist, welche Gene durch die APP-abhängige Signalgebung reguliert werden. Obwohl für mehrere Kandidatengene eine AICD-vermittelte Aktivierung der Transkription beschrieben wurde (APP (171), GSK3 β (324), Nephrilysin (172), CD82 (325)), sind diese weiterhin sehr umstritten. Entgegen den ursprünglichen Berichten zeigte eine genauere Untersuchung, dass γ -Sekretase-Inhibitoren, das Fehlen der γ -Sekretase-Aktivität in PS1 $-/-$, PS2 $-/-$ doppel-*knockout* Zellen und die genetische Entfernung der APP $-/-$, APLP2 $-/-$ Gene keinen einheitlichen Effekt auf die Expression dieser Proteine haben (175, 326). Detaillierte Untersuchungen konnten kürzlich zeigen, dass die direkte Bindung von AICD und Fe65 an den Promotor von EGFR (174) oder LRP1 (173) die Expression von EGFR bzw. LRP1 reprimiert. Dabei zeigten sowohl PS1/PS2- als auch APP/APLP2-doppel-*knockout* Zellen einen Anstieg der EGFR- bzw. der LRP1-Expression.

Durch den γ -Sekretase-Schnitt wird das AICD sowohl über den nicht-amyloidogenen aus C83, als auch über den amyloidogenen Prozessierungsweg aus C99 ins Zytoplasma freigesetzt. Trotz stark unterschiedlicher C99- und C83-Mengen zeigten Mutationen in der schwedischen APP YENPTY-Domäne keine von der amyloidogenen oder der nicht-amyloidogenen Prozessierung abhängige *in vitro* Produktion von AICD (Abb. 24). Um zu untersuchen, ob die AICD-vermittelte Transaktivierung der

Zielgene durch α -Sekretase- oder β -Sekretase-*Shedding* initiiert wird, wurde der APPGal-Transaktivierungsassay eingesetzt. Obwohl die APPs-Sekretion in Folge der verstärkten β -Sekretase-Prozessierung verdoppelt wurde (Abb. 26, Abb. 27), hatte die schwedische Mutation nur einen geringfügigen Einfluss auf die AICD-vermittelte Transaktivierung des Luciferase-Reportergens (Abb. 27). Zudem wurde keine Abnahme der Reportergen-Transkription durch die vollständige Inhibition der β -Sekretase-Prozessierung in Folge der M596V Mutation im APP beobachtet. Auf der anderen Seite verursachte die Hemmung der α -Sekretase-Prozessierung durch die F615P Mutation sowohl im *wildtyp* als auch im schwedischen APP eine Reduzierung der transkriptionalen Aktivierung um 35% (Abb. 27). Die quantitative Bestimmung der APPs-Sekretion durch den SEAP-APP Assay zeigte, dass die F615P-Mutation zudem die α -Sekretase-Prozessierung um mehr als 30% reduzierte (Abb. 27). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das α -Sekretase-*Shedding* von APP die AICD-vermittelte Transaktivierung der Transkription initiiert. Die parallele Abnahme der APPs-Sekretion und der Luciferase-Transkription durch die F615P-Mutation deutet darauf hin, dass eine stärkere Reduzierung der α -Sekretase-Prozessierung auch die Transaktivierung eines potentiellen Zielgens weiter vermindern würde. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass die durch die β -Sekretase initiierte amyloidogene Prozessierung nicht zur AICD-vermittelten nukleären Signalgebung beiträgt. Zum einen hatte die vollständige Inhibition der β -Sekretase-Prozessierung keinen Einfluss auf die Transaktivierung, zum anderen verursachte die schwedische Mutation nur eine geringfügige Erhöhung. Unsere Untersuchungen der APPswe-Prozessierung lassen vermuten, dass diese geringfügige Erhöhung der Luciferase-Aktivität auf die Konversion der im sekretorischen Transportweg erzeugten C99-Fragmente in C83 durch die α -Sekretase zurückzuführen ist (Abb. 32). Diese Ergebnisse zeigen, dass die nukleäre Signalgebung von APP der des Notch-Rezeptors ähnelt. Wie beim Notch-Rezeptor initiiert das *Shedding* durch eine Metalloprotease die Signalübermittlung von APP. Die anschließende Prozessierung des membrangebundenen Zwischenproduktes „*Notch extrazellulär Truncation*“ (NEXT) bzw. des C83-Fragments durch die Presenilin-abhängige γ -Sekretase vermittelt die Freisetzung der intrazellulären Domänen NICD bzw. AICD. Trotz der ähnlichen Prozessierung beider Rezeptoren, unterscheiden sie sich in der Induktion der Signalkaskade. Während das *Shedding* des Notch-Rezeptors durch die Bindung der Liganden Jagged1, Jagged2 oder Delta1 ausgelöst wird, scheint APP konstitutiv durch die α -Sekretase prozessiert zu werden. Zudem bindet das NICD nach der proteolytischen Freisetzung und der Translokation in den Kern an den transkriptionsaktivierenden Komplex CSL und vermittelt so die Transkription verschiedener Zielgene (168). Dagegen wird Fe65 an der Zellmembran durch die Bindung ans APP aktiviert. Nach der Freisetzung des AICD/Fe65-Komplexes durch die γ -Sekretase werden beide oder nur das aktivierte Fe65 in den Kern transportiert (170). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob an der Regulation der Transkription beschriebener oder potenzieller Zielgene noch weitere Faktoren beteiligt sind. Die konstitutive α -Sekretase-Prozessierung von APP und die Beobachtungen, dass AICD die Expression von EGFR (174) oder LRP1 (173) erniedrigt, deuten darauf hin, dass die AICD-vermittelte

Signalübertragung nicht an der Aktivierung, sondern an der Repression der Transkription bestimmter Gene beteiligt sein könnte.

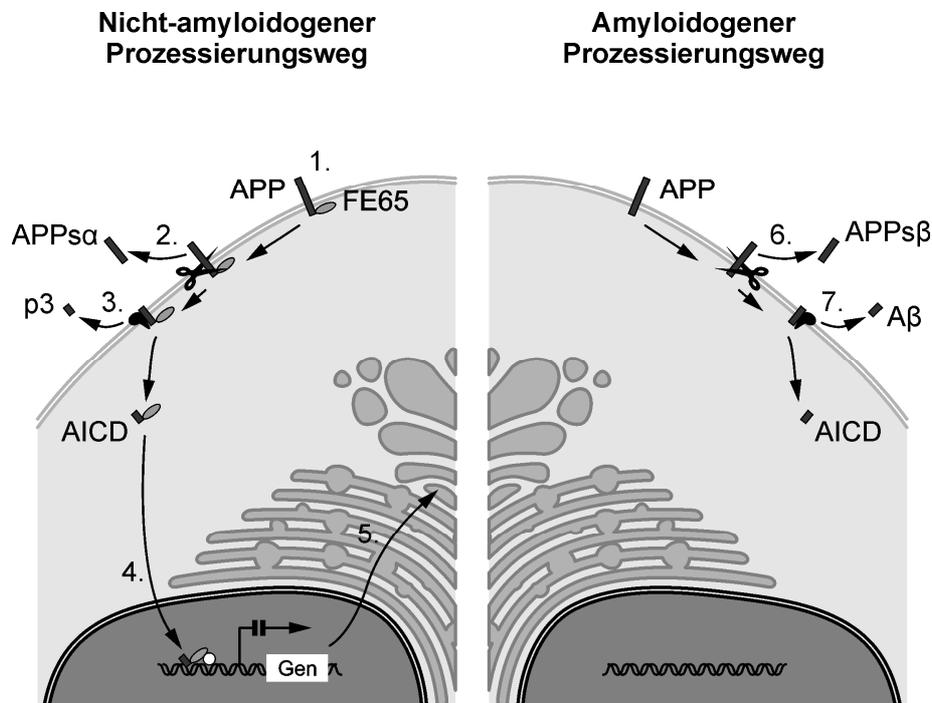


Abb. 32: Potentieller Mechanismus der AICD-abhängige Genregulation

Die AICD-vermittelte Genregulierung wird in diesem Modell durch α -Sekretase-*Shedding* und nicht durch β -Sekretase-Prozessierung von APP initiiert. Fe65 nimmt in der Zelle durch eine intramolekulare Interaktion eine geschlossene Konformation ein. Diese intramolekulare Interaktion inhibiert die Transaktivierungsaktivität von Fe65. Durch die Bindung von Fe65 an das membrangebundene AICD, d.h. an APP oder das CTF, wird diese geschlossene Konformation durch die Aufhebung der intramolekulare Bindung geöffnet, wodurch weitere Faktoren an Fe65 binden können (1.). Im nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg führt die α -Sekretase-Prozessierung von APP zur Sekretion der großen extrazellulären Domäne und zur Entstehung des membrangebundenen C-terminalen Fragments C83 (2.). Infolge der anschließenden γ -Sekretase-Prozessierung von C83 wird das p3-Peptid ins Lumen sezerniert und das AICD im Komplex mit dem aktivierten Fe65 ins Zytosol freigesetzt (3.). Nach der Translokation in den Kern (4.) interagiert Fe65 mit Tip60 und anderen Transkriptionsfaktoren. Dieser Komplex reguliert die Transkription potentieller Zielgene durch die Bindung an deren Promotorregionen (5.).

Obwohl das AICD auch durch β -Sekretase- (6.) und γ -Sekretase-Prozessierung (7.) von APP freigesetzt wird, trägt der amyloidogene Prozessierungsweg nicht zur AICD-vermittelten Transaktivierung der Gentranskription bei.

4.7 LRP1-abhängige APP-Prozessierung

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass Veränderungen des Transports von APP einen starken Einfluss auf die APP-Prozessierung haben. Das herausgearbeitete Modell beruht dabei auf Mutationen der Internalisierungsdomäne, die APP an der Plasmamembran zurückhalten und den aktiven Transport in die endozytotischen Kompartimente verhindert. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass das *Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1* (LRP1) den Transport von *wildtyp* APP an mehreren Stellen moduliert bzw. vermittelt und infolgedessen die APP-Prozessierung beeinflusst. So

verlangsamte die Retention von LRP1 im ER den Transport von APP durch den sekretorischen Transportweg (286). Zudem wurde in LRP1-defizienten Zellen eine um 50% verminderte APP-Internalisierung von der Zelloberfläche beobachtet (284). Übereinstimmend damit wurde in LRP1-defizienten Zellen eine erhöhte APPs-Sekretion gefunden, während gleichzeitig die A β -Sekretion sehr stark erniedrigt war. Diese Ergebnisse führten zu dem Konzept, dass APP zusammen mit LRP1 durch die Zelle transportiert wird. Die verminderte Internalisierung von APP konnte durch die Überexpression von LRPCT in LRP1-defizienten Zellen wieder vollständig hergestellt werden. Während die APPs-Sekretion in Folge der wiederhergestellten Endozytose reduziert wurde, stieg die A β -Produktion wieder auf das Niveau der LRP1-exprimierenden Zellen an (284). Dies zeigte, dass der LRP1-abhängige Transport von APP durch den C-terminalen Teil von LRP1 vermittelt wird. Im Gegensatz zu APP besitzt LRP1 zwei NPxY Domänen in seiner zytoplasmatischen Domäne. Die genauere Untersuchung zeigte, dass das distale NPVY-Motiv für die Regulierung der APP-Prozessierung verantwortlich ist, wobei die Ausbildung eines trimeren Komplexes eine besondere Bedeutung zugeschrieben wird. Sowohl der zytoplasmatische Schwanz von LRP1 als auch von APP können unabhängig voneinander an das Adaptorprotein Fe65 binden. Während LRP1 an die Amino-terminale *Protein Interaction Domain* (PID) von Fe65 bindet, kann APP mit der C-terminale PID-Domäne interagieren. Die Assoziation von allen drei Proteinen führt zur Entstehung eines trimeren Komplexes, bei dem LRP1 und APP durch das Fe65 miteinander verbunden sind. Sowohl die siRNA-vermittelte Hemmung der Fe65-Expression als auch die Expression von Fe65 Δ PID2 führte zu einer Auflösung des trimeren Komplexes. Die Zerstörung des Komplexes verursachte wiederum einen Anstieg der APPs-Sekretion, die auf eine verminderte Internalisierung von APP schließen ließ (285). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression eines internalisierungsdefizienten LRP1-Minirezeptors eine Akkumulation von APP an der Zelloberfläche hervorrief (327). Dagegen verursachte die Expression eines LRP1-Minirezeptors in APP-transgenen Mäusen einen Anstieg der löslichen A β -Mengen in den Gehirnen der Mäuse (328). Dies bestätigte, dass die LRP1-abhängige Internalisierung von APP die A β -Produktion erhöht.

Unsere Untersuchung der LRP1-abhängigen Prozessierung von APP_{swe} zeigte, dass die β -Sekretase-Prozessierung von schwedischem APP in LRP1-defizienten Zellen stark erhöht war (Abb. 28). Dieser Anstieg des β -Sekretase-*Sheddings* verursachte auch einen Anstieg der APPs-Sekretion. Die zusätzliche Deletion der NPTY-Domäne von schwedischem APP hatte keinen Einfluss auf diese erhöhte APPs β_{swe} -Sekretion der LRP1-defizienten Zellen (Abb. 28). Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen von LRP1 die β -Sekretase-Prozessierung von schwedischem APP im sekretorischen Transportweg verstärkt. Dabei verursacht vermutlich der verlangsamte Transport von APP durch den sekretorischen Transportweg (286) eine Erhöhung der Substratkonzentration, die wiederum das erhöhte β -Sekretase-*Shedding* und somit die vermehrte APPs β_{swe} -Sekretion hervorruft. In Folge der verstärkten β -Sekretase-Prozessierung kam es in den 13-5-1 Zellen zu einem starken Anstieg der C99-Menge. Ungeachtet dessen war die A β -Sekretion der LRP1-defizienten 13-5-1 Zellen nur ungleich

höher als die der CHOKI Zellen. Da gleichzeitig auch die C83-Menge der 13-5-1 Zellen anstieg, könnte auch der Transport der C99-Fragmente beeinträchtigt sein. Nach unserem Modell der APPswe-Prozessierung (Abb. 30, Abb. 31) deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die C99-Fragmente an die Plasmamembran transportiert und dort zurückgehalten werden. Wie bei den internalisierungsdefizienten APPswe- (Abb. 11) und C99-Konstrukten (Abb. 22) würde die Akkumulation an der Zelloberfläche (Abb. 20) eine verstärkte α -Sekretase-Prozessierung der C99-Fragmente verursachen, wodurch die Erhöhung der C83-Menge zu erklären wäre. Überraschenderweise konnte in den LRP1-defizienten Zellen keine Erhöhung der APPs α -Sekretion beobachtet werden (Abb. 28). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass in APPswe exprimierenden Zellen normalerweise weniger APPs α gefunden wird als in korrespondierenden *wildtyp* APP Zellen (Abb. 19). Dies wird wiederum darauf zurückgeführt, dass die stark erhöhte β -Sekretase-Prozessierung von APPswe im sekretorischen Transportweg die an die Zelloberfläche gelangende APP-Menge erniedrigt. Die verminderte Substratkonzentration verursacht dann eine erniedrigte APPs α -Sekretion. Da die β -Sekretase-Prozessierung von schwedischem APP in LRP1-defizienten Zellen stark erhöht ist (Abb. 28), könnte die APP-Oberflächenmenge zusätzlich erniedrigt sein. Daher wäre es möglich, dass die verminderte Substratkonzentration an der Zelloberfläche die verstärkte α -Sekretase-Prozessierung der LRP1-defizienten Zellen kompensiert und so die beobachtete gleichbleibende APPs α -Sekretion zur Folge hätte.

Diese Ergebnisse erhärten das Konzept, dass LRP1 den Transport von APP vermittelt und somit die APP-Prozessierung moduliert.

Wie APP kann LRP1 durch Metalloproteasen (329) oder durch BACE1 (218) geschnitten werden, wodurch der größte Teil der extrazellulären Domäne entfernt wird. Zusätzlich wird durch γ -Sekretase-Prozessierung des in der Membran verbleibenden CTFs die intrazelluläre Domäne von LRP1 (LICD) ins Zytosol freigesetzt (329). In Analogie zum Notch-Rezeptor wurde auch für das LICD postuliert, dass es in den Kern wandert und an der Transkriptionsregulation noch unbekannter Kandidatengene beteiligt ist (329). Zudem konnte gezeigt werden, dass die LRP-CTFs mit den APP-CTFs um die γ -Sekretase-Aktivität konkurrieren. So resultierte die Überexpression von LRPCT in *wildtyp* APP exprimierenden Zellen in einer vollständigen Inhibition der A β - und p3-Sekretion. Zudem verminderte die LRPCT-Expression die AICD-vermittelte Transaktivierung der Luciferase-Expression im APPGal-Assay (308). In dieser Arbeit konnten wir zusätzlich zeigen, dass die Überexpression von LRPCT auch die stark erhöhte A β -Sekretion der schwedischen Mutante vollständig blockieren kann (Abb. 29). Dies deutet darauf hin, dass eine verminderte LRP1-Expression oder die verminderte Expression eines anderen γ -Sekretase-Substrates die γ -Sekretase-Prozessierung von APP-CTFs erhöht. Über die Initiierung der Amyloid-Kaskade würde dieser Anstieg der A β -Sekretion letztendlich zur Entstehung der Alzheimer-Krankheit führen.

4.8 Ausblick

Die Entwicklung von neuen Behandlungsansätzen für die Alzheimer Krankheit ist auf Grund der globalen Belastung für die Gesellschaft und das Gesundheitssystem eine zentrale Herausforderung der neurobiologischen Forschung. Eine Voraussetzung für die Entwicklung von dringend benötigten Therapien ist dabei die Erforschung der Ursachen der Alzheimer-Krankheit. Die Erkenntnisse der Grundlagenforschung beruhen weitestgehend auf Untersuchungen von Mutationen im Presenilin- oder APP-Gen, die für die familiäre Form der Krankheit verantwortlich sind. Viele Indizien sprechen dafür, dass die Alzheimer Krankheit durch eine aberrante Produktion von A β 42 ausgelöst wird. Von diesem Peptid ist bekannt, dass es zu einer schnelleren Aggregation neigt als das überwiegend sezernierte A β 40. Während die FAK-Mutationen einen Anstieg der A β 42-Generation hervorrufen, ist der Hintergrund einer erhöhten A β - bzw. A β 42-Sekretion in den sporadischen Fällen unbekannt. Da weniger als 5% der Alzheimer Patienten eine autosomal dominante Mutation tragen, ist es von herausragender Bedeutung die Ursachen der Entwicklung spontaner Alzheimer Erkrankungen zu untersuchen. Der größte Teil der heutigen Alzheimer-Modelle beruht auf der Verwendung von familiären Mutationen. Es ist daher entscheidend, die Auswirkungen dieser Veränderungen genau zu kennen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Unterschiede der Prozessierung von *wildtyp* APP und der familiären schwedischen Mutation untersucht. Die schwedische Mutation im APP-Gen wird in der Alzheimer Forschung oft verwendet, da sie die amyloidogene Prozessierung um ein vielfaches verstärkt. Neben der Erhöhung der β -Sekretase-Prozessierung verursacht die schwedische Mutation auch eine Verschiebung der Lokalisierung der APPs β_{swe} -Freisetzung. Daher muss zukünftig darauf geachtet werden, dass die Regulation des β -Sekretase-*Sheddings* der schwedischen Mutation wahrscheinlich stark von der des *wildtyps* APP abweicht. Insbesondere für das Verständnis der Entwicklung der spontanen Alzheimer Krankheit ist die Erforschung von potentiellen Modulatoren des APP-Metabolismus von besonderer Wichtigkeit. Die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen der LRP1-abhängigen APP-Prozessierung deuten darauf hin, dass Modulatoren auf die *wildtyp* APP- und APP $_{swe}$ -Prozessierung eine unterschiedliche Auswirkung haben können. Somit können an APP $_{swe}$ durchgeführte Untersuchungen der amyloidogenen Prozessierung nicht unmittelbar auf den Metabolismus von *wildtyp* APP übertragen werden.

Das Ziel zahlreicher Arbeiten ist die Senkung der A β -Sekretion. Sowohl die Inhibition der β - als auch der γ -Sekretase sind auf Grund ihrer wichtigen Funktionen problematisch. Neben APP hat die γ -Sekretase viele unterschiedliche Substrate, so spielt z.B. die γ -Sekretase-Prozessierung von Notch eine Rolle in der embryonalen Entwicklung. Dagegen führt die Inhibition der β -Sekretase zu einer verminderten Myelinisierung, beeinträchtigt somit die effiziente Signalweiterleitung von Nervenzellen. Während sich die Entwicklung potenzieller Medikamente daher auf γ -Sekretase-Modulatoren konzentriert, die eine Senkung des A β 42/A β 40-Verhältnisses hervorrufen, wird für die β -Sekretase-Inhibition ein dosiertes Vorgehen nötig sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf

hin, dass die Aktivierung der α -Sekretase-Aktivität ein ebenso vielversprechendes therapeutisches Ziel ist. So ist die α -Sekretase in mehrere Teilschritte der APP-Prozessierung involviert und führt so zu einer Absenkung der A β -Sekretion. Ein verstärktes α -Sekretase-*Shedding* von APP verursacht eine verminderte β -Sekretase-Prozessierung. Zudem kann die α -Sekretase die amyloidogene Prozessierung unterbrechen, indem sie die C99-Fragmente in C83 umwandelt und erstere somit in den nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg umleitet. Beide Ereignisse verursachen eine Verminderung der A β -Sekretion. Auf Grund dieser Beobachtungen könnten α -Sekretase-Aktivatoren einen vielversprechenden Therapieansatz darstellen.

Weitgehend ungeklärt ist weiterhin die Funktion der APP-Proteine. Neben einer Rolle von APPs als neurotrophischer Faktor wird auch über eine Aufgabe der APP-Prozessierung in der zellulären Signalübermittlung spekuliert. Zahlreiche therapeutische Ansätze zielen auf eine Manipulation der β -Sekretase- und γ -Sekretase-Prozessierung von APP. Es wurde vermutet, dass dies neben einer Senkung der A β -Produktion auch eine Unterdrückung der nukleären Signalübertragung hervorrufen könnte. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeiten zeigen, dass eine vollständige Abrogation der β -Sekretase-abhängigen AICD-Freisetzung keinen Einfluss auf die Transkriptionsregulation noch unbekannter Kandidatengene hat. Somit sollte eine therapeutische Unterdrückung der A β -Produktion keine negativen Auswirkungen auf die APP-abhängige Signalgebung haben.

5 Zusammenfassung

Die Alzheimer Krankheit ist die häufigste Form der Demenz. Charakteristische Merkmale der Erkrankung sind die Entstehung von neurofibrillären Bündeln und die Ablagerung von A β -Plaques im Gehirn der Betroffenen. Die A β -Plaques bestehen hauptsächlich aus Amyloid β -Peptiden (A β), welche durch sequentielle proteolytische Spaltung des *Amyloid-Precursor-Proteins* (APP) durch β -Sekretasen und γ -Sekretasen freigesetzt werden.

Die schwedische Doppelmutation im APP (APP_{swe}) verstärkt die β -Sekretase-Prozessierung und verursacht so eine stark erhöhte A β -Sekretion. Wir zeigen durch den Vergleich von stabil überexprimierenden Zellen, dass *wildtyp* APP und APP_{swe} zum größten Teil durch unterschiedliche β -Sekretase-Aktivitäten geschnitten werden. Während die β -Sekretase-Prozessierung von *wildtyp* APP hauptsächlich oder ausschließlich in endozytotischen Kompartimenten erfolgt, wird die amyloidogene Prozessierung beim APP mit der schwedischen Mutation größtenteils im sekretorischen Transportweg, vermutlich in vom Golgi abgeschnürten sekretorischen Vesikeln, initiiert. Ungeachtet der unveränderten APP_{swe}-Sekretion verursachen Mutationen im Endozytosesignal von schwedischem APP eine starke Abnahme der C99-Fragmente und infolgedessen eine 50%ige Abnahme sowohl der A β 40- als auch der A β 42-Produktion. Wir zeigen, dass diese stark erniedrigte C99-Menge von internalisierungsdefizientem APP_{swe} durch eine α -Sekretase-vermittelte Umwandlung der C99-Fragmente in C83 verursacht wird. Neben der verminderten β -Sekretase-Prozessierung trägt die Prozessierung der C99-Fragmente durch die α -Sekretase auch zu der stark erniedrigten A β -Produktion von internalisierungsdefizientem *wildtyp* APP bei. Somit verursachte die Inhibition der α -Sekretase-Prozessierung sowohl von schwedischem APP, von *wildtyp* APP als auch von C99 eine stark erhöhte A β -Sekretion. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die α -Sekretase-Prozessierung von C99 ein physiologisches Ereignis der APP-Prozessierung ist, das die A β -Sekretion limitiert.

Neben der Bedeutung der APP-Prozessierung in der Entwicklung der Alzheimer Krankheit wurde postuliert, dass die γ -Sekretase-vermittelte AICD-Freisetzung an der Transkriptionsregulation unbekannter Kandidatengene beteiligt ist. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die AICD-vermittelte Transaktivierung durch das α -Sekretase-*Shedding* von APP initiiert wird. Somit erfolgt die nukleäre Signalübermittlung von APP möglicherweise ausschließlich über den nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Hemmung der A β -Produktion die APP-abhängige Genregulation nicht beeinträchtigen würde.

6 Summary

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. AD is characterised by the formation of neurofibrillary bundles and A β plaques in the brain. The A β plaques consist mainly of the amyloid- β peptide (A β). According to the Amyloid-Hypothesis aberrant production of A β peptides, in particular of the longer more aggregation-prone A β 42, is the primary cause driving AD pathogenesis. The A β peptides are released by sequential proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by β -secretase and γ -secretase.

It has been suggested that the Swedish familial Alzheimer disease (APP^{swe}) mutation not only amplifies β -secretase cleavage of the amyloid-precursor-protein (APP), but also shifts the liberation of A β to a different location within the cell. By comparison of stable expressed APP^{wildtype} with APP^{swe} that comprise mutations of the endocytosis motif NPXY, we show here the existence of two different sites of BACE activity for APP^{swe} and APP^{wildtype}, respectively. While our results reveal that β -secretase cleavage of APP^{wildtype} occurs mainly in endocytotic compartments, we confirm that the shedding of APP^{swe} results from an activity localised in the late secretory pathway. Anyway, despite of unchanged β -secretase shedding several different mutations of the APP^{swe} internalization motif strongly reduced C99 levels, which substantially decreased the release of A β . We point out, that α -secretase mediated conversion of C99 into C83 is the main cause of this A β reduction. Additionally, this α -secretase mediated processing of C99 also contributes to the strongly decreased A β -production of internalisation deficient *wildtype* APP. Therefore, inhibition of α -secretase cleavage of *wildtype* APP, APP^{swe} as well as C99 increased A β -secretion. This indicates that the α -secretase processing of C99 is a physiological event, which limits A β generation.

Besides the importance of the APP processing in the development of Alzheimer's disease, it has been postulated that the γ -secretase-mediated release of AICD is involved in the transcriptional regulation of unknown candidate genes. The investigations of the present work show that the AICD-mediated transactivation is initiated by the α -secretase shedding of APP. Thus, the nuclear signalling of APP may occur exclusively through the non-amyloidogenic pathway, while the amyloidogenic processing is not involved. These results suggest that the inhibition of A β production will not affect the APP-dependent gene regulation.

7 Literaturverzeichnis

1. **Bickel H.** (2000). [Dementia syndrome and Alzheimer disease: an assessment of morbidity and annual incidence in Germany]. *Gesundheitswesen* **62**, 211-8.
2. **Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN and Murtagh FR.** (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat* **8**, 429-31.
3. **Alzheimer A.** (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Centralblatt für Nervenheilkunde und Psychiatrie*, 177–179.
4. **Alzheimer A.** (1906). Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt*, 1129–1136.
5. **Hendriks L and Van Broeckhoven C.** (1996). A beta A4 amyloid precursor protein gene and Alzheimer's disease. *Eur J Biochem* **237**, 6-15.
6. **Thorsett ED and Latimer LH.** (2000). Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 377-82.
7. **Braak H and Braak E.** (1996). Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis. *Acta Neuropathol* **92**, 197-201.
8. **Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ and Binder LI.** (1986). Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4040-3.
9. **Kosik KS, Joachim CL and Selkoe DJ.** (1986). Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4044-8.
10. **Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM and Binder LI.** (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4913-7.
11. **Mandelkow E, von Bergen M, Biernat J and Mandelkow EM.** (2007). Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* **17**, 83-90.
12. **Ballatore C, Lee VM and Trojanowski JQ.** (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**, 663-72.
13. **Mandelkow EM and Mandelkow E.** (1998). Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* **8**, 425-7.
14. **Haass C and Selkoe DJ.** (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 101-12.
15. **Blurton-Jones M and Laferla FM.** (2006). Pathways by which Abeta facilitates tau pathology. *Curr Alzheimer Res* **3**, 437-48.
16. **Selkoe DJ.** (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**, 741-66.
17. **Glennner GG and Wong CW.** (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 885-90.
18. **Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL and Beyreuther K.** (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4245-9.
19. **Jarrett JT, Berger EP and Lansbury PT, Jr.** (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**, 4693-7.

20. **Hilbich C, Kisters-Woike B, Reed J, Masters CL and Beyreuther K.** (1991). Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol* **218**, 149-63.
21. **Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C and Glabe C.** (1992). Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* **267**, 546-54.
22. **Iwatsubo T, Mann DM, Odaka A, Suzuki N and Ihara Y.** (1995). Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome. *Ann Neurol* **37**, 294-9.
23. **Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N and Ihara Y.** (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* **13**, 45-53.
24. **Lemere CA, Blusztajn JK, Yamaguchi H, Wisniewski T, Saido TC and Selkoe DJ.** (1996). Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis* **3**, 16-32.
25. **Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E and Ball MJ.** (1993). beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10836-40.
26. **Dickson DW.** (1997). The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 321-39.
27. **Hardy J and Allsop D.** (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 383-8.
28. **Selkoe DJ.** (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **6**, 487-98.
29. **Hardy J and Selkoe DJ.** (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-6.
30. **Winklhofer KF, Tatzelt J and Haass C.** (2008). The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *Embo J* **27**, 336-49.
31. **Robakis NK, Ramakrishna N, Wolfe G and Wisniewski HM.** (1987). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 4190-4.
32. **Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K and Muller-Hill B.** (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-6.
33. **Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U and Gajdusek DC.** (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* **235**, 877-80.
34. **Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM and Neve RL.** (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* **235**, 880-4.
35. **Olson MI and Shaw CM.** (1969). Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism. *Brain* **92**, 147-56.
36. **Wisniewski K, Howe J, Williams DG and Wisniewski HM.** (1978). Precocious aging and dementia in patients with Down's syndrome. *Biol Psychiatry* **13**, 619-27.
37. **Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I and Selkoe DJ.** (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* **360**, 672-4.

38. **Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, Golde TE and Younkin SG.** (1994). An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* **264**, 1336-40.
39. **Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W and Frangione B.** (1990). Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* **248**, 1124-6.
40. **Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, et al.** (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* **17**, 1005-13.
41. **Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, et al.** (1996). Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* **383**, 710-3.
42. **Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, et al.** (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* **2**, 864-70.
43. **Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, et al.** (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* **3**, 67-72.
44. **Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, et al.** (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* **38**, 24-6.
45. **Theuns J, Brouwers N, Engelborghs S, Sleegers K, Bogaerts V, Corsmit E, De Pooter T, van Duijn CM, De Deyn PP and Van Broeckhoven C.** (2006). Promoter mutations that increase amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* **78**, 936-46.
46. **Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, et al.** (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* **393**, 702-5.
47. **Spillantini MG, Bird TD and Ghetti B.** (1998). Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol* **8**, 387-402.
48. **Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J and Hutton M.** (1998). Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci* **1**, 355-8.
49. **Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, et al.** (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* **293**, 1487-91.
50. **Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL and Pericak-Vance MA.** (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921-3.
51. **Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS and Roses AD.** (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1977-81.

52. **Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al.** (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **43**, 1467-72.
53. **Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK and Hyman BT.** (1993). Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* **11**, 575-80.
54. **Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D and Roses AD.** (1993). Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9649-53.
55. **Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, et al.** (1997). Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet* **17**, 263-4.
56. **Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, et al.** (2000). Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2892-7.
57. **Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML and Neve RL.** (1989). Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* **245**, 417-20.
58. **Yankner BA, Caceres A and Duffy LK.** (1990). Nerve growth factor potentiates the neurotoxicity of beta amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9020-3.
59. **Yankner BA, Duffy LK and Kirschner DA.** (1990). Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* **250**, 279-82.
60. **Roher AE, Ball MJ, Bhave SV and Wakade AR.** (1991). Beta-amyloid from Alzheimer disease brains inhibits sprouting and survival of sympathetic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **174**, 572-9.
61. **Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG and Cotman CW.** (1993). Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* **13**, 1676-87.
62. **Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG and Cotman CW.** (1991). In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res* **563**, 311-4.
63. **Busciglio J, Lorenzo A and Yankner BA.** (1992). Methodological variables in the assessment of beta amyloid neurotoxicity. *Neurobiol Aging* **13**, 609-12.
64. **Mattson MP, Tomaselli KJ and Rydel RE.** (1993). Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated beta-amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain Res* **621**, 35-49.
65. **Lorenzo A and Yankner BA.** (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12243-7.
66. **Lorenzo A and Yankner BA.** (1996). Amyloid fibril toxicity in Alzheimer's disease and diabetes. *Ann N Y Acad Sci* **777**, 89-95.
67. **Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J and Yankner BA.** (1995). beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* **14**, 879-88.
68. **Howlett DR, Jennings KH, Lee DC, Clark MS, Brown F, Wetzel R, Wood SJ, Camilleri P and Roberts GW.** (1995). Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. *Neurodegeneration* **4**, 23-32.
69. **Tsai J, Grutzendler J, Duff K and Gan WB.** (2004). Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nat Neurosci* **7**, 1181-3.

70. **Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW, Jr. and Morris JC.** (2001). Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* **56**, 127-9.
71. **Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K and McConlogue L.** (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* **20**, 4050-8.
72. **Sze CI, Bi H, Kleinschmidt-DeMasters BK, Filley CM and Martin LJ.** (2000). Selective regional loss of exocytotic presynaptic vesicle proteins in Alzheimer's disease brains. *J Neurol Sci* **175**, 81-90.
73. **Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P and Buxbaum JD.** (2000). Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *Jama* **283**, 1571-7.
74. **Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE and Rogers J.** (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **155**, 853-62.
75. **McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI and Masters CL.** (1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **46**, 860-6.
76. **Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ and Lee VM.** (1999). The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol* **158**, 328-37.
77. **Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB and Selkoe DJ.** (1999). Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci* **19**, 8876-84.
78. **Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, et al.** (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6448-53.
79. **Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ and Selkoe DJ.** (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**, 535-9.
80. **Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S and Malinow R.** (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron* **37**, 925-37.
81. **Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, et al.** (2005). Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **95**, 834-47.
82. **Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M and Ashe KH.** (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**, 352-7.
83. **Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC and Oltersdorf T.** (1988). Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7341-5.
84. **Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shiojiri S and Ito H.** (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* **331**, 530-2.

85. **Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, Villa-Komaroff L, Gusella JF and Neve RL.** (1988). Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* **331**, 528-30.
86. **Ponte P, Gonzalez-DeWhitt P, Schilling J, Miller J, Hsu D, Greenberg B, Davis K, Wallace W, Lieberburg I and Fuller F.** (1988). A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* **331**, 525-7.
87. **Weidemann A, Konig G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL and Beyreuther K.** (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* **57**, 115-26.
88. **Haass C, Hung AY and Selkoe DJ.** (1991). Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J Neurosci* **11**, 3783-93.
89. **Wertkin AM, Turner RS, Pleasure SJ, Golde TE, Younkin SG, Trojanowski JQ and Lee VM.** (1993). Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9513-7.
90. **Chen WJ, Goldstein JL and Brown MS.** (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* **265**, 3116-23.
91. **Small DH, Nurcombe V, Reed G, Clarris H, Moir R, Beyreuther K and Masters CL.** (1994). A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci* **14**, 2117-27.
92. **Bush AI, Multhaup G, Moir RD, Williamson TG, Small DH, Rumble B, Pollwein P, Beyreuther K and Masters CL.** (1993). A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **268**, 16109-12.
93. **Bush AI, Pettingell WH, Jr., de Paradis M, Tanzi RE and Wasco W.** (1994). The amyloid beta-protein precursor and its mammalian homologues. Evidence for a zinc-modulated heparin-binding superfamily. *J Biol Chem* **269**, 26618-21.
94. **Hesse L, Beher D, Masters CL and Multhaup G.** (1994). The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett* **349**, 109-16.
95. **Oltersdorf T, Ward PJ, Henriksson T, Beattie EC, Neve R, Lieberburg I and Fritz LC.** (1990). The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J Biol Chem* **265**, 4492-7.
96. **Hung AY and Selkoe DJ.** (1994). Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *Embo J* **13**, 534-42.
97. **Walter J, Capell A, Hung AY, Langen H, Schnolzer M, Thinakaran G, Sisodia SS, Selkoe DJ and Haass C.** (1997). Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J Biol Chem* **272**, 1896-903.
98. **Lai A, Sisodia SS and Trowbridge IS.** (1995). Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **270**, 3565-73.
99. **Koo EH and Squazzo SL.** (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* **269**, 17386-9.
100. **Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, Chen X, Stokin GB and Koo EH.** (1999). Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J Biol Chem* **274**, 18851-6.
101. **Golde TE, Estus S, Younkin LH, Selkoe DJ and Younkin SG.** (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* **255**, 728-30.

102. **Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY and Selkoe DJ.** (1992). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* **357**, 500-3.
103. **Koo EH, Squazzo SL, Selkoe DJ and Koo CH.** (1996). Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *J Cell Sci* **109** (Pt 5), 991-8.
104. **Yamazaki T, Koo EH and Selkoe DJ.** (1996). Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *J Cell Sci* **109** (Pt 5), 999-1008.
105. **Wasco W, Bupp K, Magendantz M, Gusella JF, Tanzi RE and Solomon F.** (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10758-62.
106. **Sprecher CA, Grant FJ, Grimm G, O'Hara PJ, Norris F, Norris K and Foster DC.** (1993). Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry* **32**, 4481-6.
107. **Wasco W, Gurubhagavatula S, Paradis MD, Romano DM, Sisodia SS, Hyman BT, Neve RL and Tanzi RE.** (1993). Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* **5**, 95-100.
108. **Citron M, Teplow DB and Selkoe DJ.** (1995). Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* **14**, 661-70.
109. **Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, et al.** (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* **402**, 537-40.
110. **Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, et al.** (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735-41.
111. **Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al.** (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**, 322-5.
112. **Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, Condron MM, Teplow DB and Haass C.** (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* **2**, 835-41.
113. **Weidemann A, Eggert S, Reinhard FB, Vogel M, Paliga K, Baier G, Masters CL, Beyreuther K and Evin G.** (2002). A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* **41**, 2825-35.
114. **Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H and Haass C.** (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* **5**, 486-8.
115. **Gu Y, Misonou H, Sato T, Dohmae N, Takio K and Ihara Y.** (2001). Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. *J Biol Chem* **276**, 35235-8.
116. **Qi-Takahara Y, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Dolios G, Hirotsu N, Horikoshi Y, Kametani F, Maeda M, Saido TC, Wang R, et al.** (2005). Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci* **25**, 436-45.
117. **Zhao G, Cui MZ, Mao G, Dong Y, Tan J, Sun L and Xu X.** (2005). gamma-Cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain. *J Biol Chem* **280**, 37689-97.

118. **Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D and Ward PJ.** (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* **248**, 1122-4.
119. **Sisodia SS.** (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6075-9.
120. **Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP and Black RA.** (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* **273**, 27765-7.
121. **Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, Okuyama A, Fujisawa-Sehara A, Ohno S, Suzuki K and Ishiura S.** (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* **343 Pt 2**, 371-5.
122. **Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C and Fahrenholz F.** (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3922-7.
123. **Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB and Selkoe DJ.** (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* **268**, 3021-4.
124. **Maat-Schieman ML, van Duinen SG, Bornebroek M, Haan J and Roos RA.** (1996). Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type (HCHWA-D): II--A review of histopathological aspects. *Brain Pathol* **6**, 115-20.
125. **Bornebroek M, Haan J, Maat-Schieman ML, Van Duinen SG and Roos RA.** (1996). Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type (HCHWA-D): I--A review of clinical, radiologic and genetic aspects. *Brain Pathol* **6**, 111-4.
126. **Herzig MC, Winkler DT, Burgermeister P, Pfeifer M, Kohler E, Schmidt SD, Danner S, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Burki K, et al.** (2004). Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci* **7**, 954-60.
127. **Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, Van Hul W, van Harskamp F, Warren A, McInnis MG, Antonarakis SE, Martin JJ, et al.** (1992). Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet* **1**, 218-21.
128. **Cras P, van Harskamp F, Hendriks L, Ceuterick C, van Duijn CM, Stefanko SZ, Hofman A, Kros JM, Van Broeckhoven C and Martin JJ.** (1998). Presenile Alzheimer dementia characterized by amyloid angiopathy and large amyloid core type senile plaques in the APP 692Ala-->Gly mutation. *Acta Neuropathol* **96**, 253-60.
129. **Grabowski TJ, Cho HS, Vonsattel JP, Rebeck GW and Greenberg SM.** (2001). Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* **49**, 697-705.
130. **Kumar-Singh S, Cras P, Wang R, Kros JM, van Swieten J, Lubke U, Ceuterick C, Serneels S, Vennekens K, Timmermans JP, et al.** (2002). Dense-core senile plaques in the Flemish variant of Alzheimer's disease are vasocentric. *Am J Pathol* **161**, 507-20.
131. **Sahlin C, Lord A, Magnusson K, Englund H, Almeida CG, Greengard P, Nyberg F, Gouras GK, Lannfelt L and Nilsson LN.** (2007). The Arctic Alzheimer mutation favors intracellular amyloid-beta production by making amyloid precursor protein less available to alpha-secretase. *J Neurochem* **101**, 854-62.

132. **Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condrón MM, Axelman K, Forsell C, Stenh C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, et al.** (2001). The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci* **4**, 887-93.
133. **Kamino K, Orr HT, Payami H, Wijsman EM, Alonso ME, Pulst SM, Anderson L, O'Dahl S, Nemens E, White JA, et al.** (1992). Linkage and mutational analysis of familial Alzheimer disease kindreds for the APP gene region. *Am J Hum Genet* **51**, 998-1014.
134. **Tagliavini F, Rossi G, Padovani A, Magoni M, Andora G, Sgarzi M, Bizzi A, Savioardo M, Carella F, Morbin M, et al.** (1999). A new bPP mutation related to hereditary cerebral haemorrhage. *Alzheimer's Rep* **2**, S28.
135. **Betts V, Leissring MA, Dolios G, Wang R, Selkoe DJ and Walsh DM.** (2008). Aggregation and catabolism of disease-associated intra-Abeta mutations: reduced proteolysis of AbetaA21G by neprilysin. *Neurobiol Dis* **31**, 442-50.
136. **Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B and Lannfelt L.** (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* **1**, 345-7.
137. **Kumar-Singh S, De Jonghe C, Cruts M, Kleinert R, Wang R, Mercken M, De Strooper B, Vanderstichele H, Lofgren A, Vanderhoeven I, et al.** (2000). Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a gamma(42)-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated A beta(42) in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* **9**, 2589-98.
138. **Pasalar P, Najmabadi H, Noorian AR, Moghimi B, Jannati A, Soltanzadeh A, Krefft T, Crook R and Hardy J.** (2002). An Iranian family with Alzheimer's disease caused by a novel APP mutation (Thr714Ala). *Neurology* **58**, 1574-5.
139. **Ancolio K, Dumanchin C, Barelli H, Warter JM, Brice A, Champion D, Frebourg T and Checler F.** (1999). Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4119-24.
140. **De Jonghe C, Esselens C, Kumar-Singh S, Craessaerts K, Serneels S, Checler F, Annaert W, Van Broeckhoven C and De Strooper B.** (2001). Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and APP C-terminal fragment stability. *Hum Mol Genet* **10**, 1665-71.
141. **Cruts M, Dermaut B, Rademakers R, Van den Broeck M, Stogbauer F and Van Broeckhoven C.** (2003). Novel APP mutation V715A associated with presenile Alzheimer's disease in a German family. *J Neurol* **250**, 1374-5.
142. **Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, Graff-Radford N, Hinder P, Yager D, Zenk B, et al.** (1997). A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum Mol Genet* **6**, 2087-9.
143. **Terreni L, Fogliarino S, Franceschi M and Forloni G.** (2002). Novel pathogenic mutation in an Italian patient with familial Alzheimer's disease detected in APP gene. *Neurobiology of Aging* **23** (1S), S319.
144. **Murrell J, Farlow M, Ghetti B and Benson MD.** (1991). A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* **254**, 97-9.
145. **Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J, et al.** (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* **353**, 844-6.
146. **Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al.** (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-6.

147. **Murrell JR, Hake AM, Quaid KA, Farlow MR and Ghetti B.** (2000). Early-onset Alzheimer disease caused by a new mutation (V717L) in the amyloid precursor protein gene. *Arch Neurol* **57**, 885-7.
148. **Kwok JB, Li QX, Hallupp M, Whyte S, Ames D, Beyreuther K, Masters CL and Schofield PR.** (2000). Novel Leu723Pro amyloid precursor protein mutation increases amyloid beta42(43) peptide levels and induces apoptosis. *Ann Neurol* **47**, 249-53.
149. **Theuns J, Marjaux E, Vandenbulcke M, Van Laere K, Kumar-Singh S, Bormans G, Brouwers N, Van den Broeck M, Vennekens K, Corsmit E, et al.** (2006). Alzheimer dementia caused by a novel mutation located in the APP C-terminal intracytosolic fragment. *Hum Mutat* **27**, 888-96.
150. **Maruyama K, Tomita T, Shinozaki K, Kume H, Asada H, Saido TC, Ishiura S, Iwatsubo T and Obata K.** (1996). Familial Alzheimer's disease-linked mutations at Val717 of amyloid precursor protein are specific for the increased secretion of A beta 42(43). *Biochem Biophys Res Commun* **227**, 730-5.
151. **Li ZW, Stark G, Gotz J, Rulicke T, Gschwind M, Huber G, Muller U and Weissmann C.** (1996). Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6158-62.
152. **Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJ, Hopkins R, Smith DW, Heavens RP, Dawson GR, Boyce S, Conner MW, et al.** (1995). beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* **81**, 525-31.
153. **Muller U, Cristina N, Li ZW, Wolfer DP, Lipp HP, Rulicke T, Brandner S, Aguzzi A and Weissmann C.** (1994). Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Cell* **79**, 755-65.
154. **Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, Bowery BJ, Boyce S, Trumbauer ME, Chen HY, et al.** (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* **90**, 1-13.
155. **von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, van der Ploeg LH, Price DL and Sisodia SS.** (1997). Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging* **18**, 661-9.
156. **Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rulicke T, von Kretschmar H, von Koch C, Sisodia S, Tremml P, et al.** (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* **20**, 7951-63.
157. **Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretschmar H, Sisodia S and Muller U.** (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *Embo J* **23**, 4106-15.
158. **Wang P, Yang G, Mosier DR, Chang P, Zaidi T, Gong YD, Zhao NM, Dominguez B, Lee KF, Gan WB, et al.** (2005). Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci* **25**, 1219-25.
159. **Saitoh T, Sundsmo M, Roch JM, Kimura N, Cole G, Schubert D, Oltersdorf T and Schenk DB.** (1989). Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* **58**, 615-22.
160. **Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I and Rydel RE.** (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* **10**, 243-54.

161. **Perez RG, Zheng H, Van der Ploeg LH and Koo EH.** (1997). The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J Neurosci* **17**, 9407-14.
162. **Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M, et al.** (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci* **27**, 7817-26.
163. **Sinha S, Dovey HF, Seubert P, Ward PJ, Blacher RW, Blaber M, Bradshaw RA, Arici M, Mobley WC and Lieberburg I.** (1990). The protease inhibitory properties of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **265**, 8983-5.
164. **Smith RP, Higuchi DA and Broze GJ, Jr.** (1990). Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* **248**, 1126-8.
165. **Multhaup G.** (1994). Identification and regulation of the high affinity binding site of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor (APP) to glycosaminoglycans. *Biochimie* **76**, 304-11.
166. **Behr D, Hesse L, Masters CL and Multhaup G.** (1996). Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J Biol Chem* **271**, 1613-20.
167. **Soba P, Eggert S, Wagner K, Zentgraf H, Siehl K, Kreger S, Lower A, Langer A, Merdes G, Paro R, et al.** (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *Embo J* **24**, 3624-34.
168. **Kopan R and Ilagan MX.** (2004). Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 499-504.
169. **Cao X and Sudhof TC.** (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* **293**, 115-20.
170. **Cao X and Sudhof TC.** (2004). Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem* **279**, 24601-11.
171. **von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM and Konietzko U.** (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci* **117**, 4435-48.
172. **Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Alves da Costa C, Vincent B, Ring S, D'Adamio L, Shen J, Muller U, et al.** (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* **46**, 541-54.
173. **Liu Q, Zerbinatti CV, Zhang J, Hoe HS, Wang B, Cole SL, Herz J, Muglia L and Bu G.** (2007). Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron* **56**, 66-78.
174. **Zhang YW, Wang R, Liu Q, Zhang H, Liao FF and Xu H.** (2007). Presenilin/gamma-secretase-dependent processing of beta-amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10613-8.
175. **Hebert SS, Serneels L, Tolia A, Craessaerts K, Derks C, Filippov MA, Muller U and De Strooper B.** (2006). Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO Rep* **7**, 739-45.
176. **Ho A and Sudhof TC.** (2004). Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2548-53.

177. **Ma QH, Futagawa T, Yang WL, Jiang XD, Zeng L, Takeda Y, Xu RX, Bagnard D, Schachner M, Furley AJ, et al.** (2008). A TAG1-APP signalling pathway through Fe65 negatively modulates neurogenesis. *Nat Cell Biol* **10**, 283-94.
178. **De Strooper B, Umans L, Van Leuven F and Van Den Berghe H.** (1993). Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway. *J Cell Biol* **121**, 295-304.
179. **Buxbaum JD, Oishi M, Chen HI, Pinkas-Kramarski R, Jaffe EA, Gandy SE and Greengard P.** (1992). Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10075-8.
180. **Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ and Growdon JH.** (1992). Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* **258**, 304-7.
181. **Checler F.** (1995). Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **65**, 1431-44.
182. **Mills J and Reiner PB.** (1999). Regulation of amyloid precursor protein cleavage. *J Neurochem* **72**, 443-60.
183. **Caporaso GL, Gandy SE, Buxbaum JD, Ramabhadran TV and Greengard P.** (1992). Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3055-9.
184. **Buxbaum JD, Koo EH and Greengard P.** (1993). Protein phosphorylation inhibits production of Alzheimer amyloid beta/A4 peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9195-8.
185. **Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ and Hooper NM.** (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* **74**, 342-52.
186. **Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, et al.** (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729-33.
187. **Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhardt W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, et al.** (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* **385**, 733-6.
188. **Killar L, White J, Black R and Peschon J.** (1999). Adamalysins. A family of metzincins including TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Ann N Y Acad Sci* **878**, 442-52.
189. **Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA and Israel A.** (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* **5**, 207-16.
190. **Chantry A, Gregson NA and Glynn P.** (1989). A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization. *J Biol Chem* **264**, 21603-7.
191. **Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, Umans L, Lubke T, Lena Illert A, von Figura K, et al.** (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* **11**, 2615-24.
192. **Roghani M, Becherer JD, Moss ML, Atherton RE, Erdjument-Bromage H, Arribas J, Blackburn RK, Weskamp G, Tempst P and Blobel CP.** (1999). Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem* **274**, 3531-40.
193. **Simons M, de Strooper B, Multhaup G, Tienari PJ, Dotti CG and Beyreuther K.** (1996). Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons. *J Neurosci* **16**, 899-908.

194. **Weskamp G, Cai H, Brodie TA, Higashyama S, Manova K, Ludwig T and Blobel CP.** (2002). Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol Cell Biol* **22**, 1537-44.
195. **Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, et al.** (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* **14**, 419-27.
196. **Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A and Tang J.** (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1456-60.
197. **Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, et al.** (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* **402**, 533-7.
198. **Bennett BD, Denis P, Haniu M, Teplow DB, Kahn S, Louis JC, Citron M and Vassar R.** (2000). A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J Biol Chem* **275**, 37712-7.
199. **Haniu M, Denis P, Young Y, Mendiaz EA, Fuller J, Hui JO, Bennett BD, Kahn S, Ross S, Burgess T, et al.** (2000). Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J Biol Chem* **275**, 21099-106.
200. **Benjannet S, Elagoz A, Wickham L, Mamarbachi M, Munzer JS, Basak A, Lazure C, Cromlish JA, Sisodia S, Checler F, et al.** (2001). Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J Biol Chem* **276**, 10879-87.
201. **Seubert P, Oltersdorf T, Lee MG, Barbour R, Blomquist C, Davis DL, Bryant K, Fritz LC, Galasko D, Thal LJ, et al.** (1993). Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* **361**, 260-3.
202. **Zhao J, Paganini L, Mucke L, Gordon M, Refolo L, Carman M, Sinha S, Oltersdorf T, Lieberburg I and McConlogue L.** (1996). Beta-secretase processing of the beta-amyloid precursor protein in transgenic mice is efficient in neurons but inefficient in astrocytes. *J Biol Chem* **271**, 31407-11.
203. **Haass C, Capell A, Citron M, Teplow DB and Selkoe DJ.** (1995). The vacuolar H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 differentially affects proteolytic processing of mutant and wild-type beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **270**, 6186-92.
204. **Knops J, Suomensaaari S, Lee M, McConlogue L, Seubert P and Sinha S.** (1995). Cell-type and amyloid precursor protein-type specific inhibition of A beta release by bafilomycin A1, a selective inhibitor of vacuolar ATPases. *J Biol Chem* **270**, 2419-22.
205. **Huse JT, Pijak DS, Leslie GJ, Lee VM and Doms RW.** (2000). Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem* **275**, 33729-37.
206. **Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, et al.** (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* **4**, 231-2.
207. **Roberds SL, Anderson J, Basi G, Bienkowski MJ, Branstetter DG, Chen KS, Freedman SB, Frigon NL, Games D, Hu K, et al.** (2001). BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet* **10**, 1317-24.

208. **Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, Wen H, Chiang HC, Xu G, Koliatsos VE, et al.** (2005). BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* **25**, 11693-709.
209. **Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL and Wong PC.** (2001). BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci* **4**, 233-4.
210. **Fukumoto H, Rosene DL, Moss MB, Raju S, Hyman BT and Irizarry MC.** (2004). Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *Am J Pathol* **164**, 719-25.
211. **Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT and Irizarry MC.** (2002). Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol* **59**, 1381-9.
212. **Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL and Evin G.** (2002). Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **51**, 783-6.
213. **Li R, Lindholm K, Yang LB, Yue X, Citron M, Yan R, Beach T, Sue L, Sabbagh M, Cai H, et al.** (2004). Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3632-7.
214. **Li Q and Sudhof TC.** (2004). Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *J Biol Chem* **279**, 10542-50.
215. **Pastorino L, Ikin AF, Lamprianou S, Vacaresse N, Revelli JP, Platt K, Paganetti P, Mathews PM, Harroch S and Buxbaum JD.** (2004). BACE (beta-secretase) modulates the processing of APLP2 in vivo. *Mol Cell Neurosci* **25**, 642-9.
216. **Wong HK, Sakurai T, Oyama F, Kaneko K, Wada K, Miyazaki H, Kurosawa M, De Strooper B, Saftig P and Nukina N.** (2005). beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J Biol Chem* **280**, 23009-17.
217. **Kim DY, Carey BW, Wang H, Ingano LA, Binshtok AM, Wertz MH, Pettingell WH, He P, Lee VM, Woolf CJ, et al.** (2007). BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol* **9**, 755-64.
218. **von Arnim CA, Kinoshita A, Peltan ID, Tangredi MM, Herl L, Lee BM, Spoelgen R, Hshieh TT, Ranganathan S, Battey FD, et al.** (2005). The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J Biol Chem* **280**, 17777-85.
219. **Lichtenthaler SF, Dominguez DI, Westmeyer GG, Reiss K, Haass C, Saftig P, De Strooper B and Seed B.** (2003). The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem* **278**, 48713-9.
220. **Kitazume S, Tachida Y, Oka R, Shirotani K, Saido TC and Hashimoto Y.** (2001). Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13554-9.
221. **Kitazume S, Nakagawa K, Oka R, Tachida Y, Ogawa K, Luo Y, Citron M, Shitara H, Taya C, Yonekawa H, et al.** (2005). In vivo cleavage of alpha2,6-sialyltransferase by Alzheimer beta-secretase. *J Biol Chem* **280**, 8589-95.
222. **Kuhn PH, Marjaux E, Imhof A, De Strooper B, Haass C and Lichtenthaler SF.** (2007). Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *J Biol Chem* **282**, 11982-95.
223. **Hu X, Hicks CW, He W, Wong P, Macklin WB, Trapp BD and Yan R.** (2006). Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* **9**, 1520-5.

224. **Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, DeStrooper B, Saftig P, Birchmeier C and Haass C.** (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* **314**, 664-6.
225. **Saunders AJ, Kim TW, Tanzi TE, Fan W, Bennett BD, Babu-Khan S, Luo Y, Louis JC, McCaleb M, Citron M, et al.** (1999). BACE Maps to Chromosome 11 ;and a BACE Homolog, BACE2, Reside in the Obligate Down Syndrome Region of Chromosome 21 *Science* **286**, 1255a.
226. **Sun X, Wang Y, Qing H, Christensen MA, Liu Y, Zhou W, Tong Y, Xiao C, Huang Y, Zhang S, et al.** (2005). Distinct transcriptional regulation and function of the human BACE2 and BACE1 genes. *Faseb J* **19**, 739-49.
227. **Bennett BD, Babu-Khan S, Loeloff R, Louis JC, Curran E, Citron M and Vassar R.** (2000). Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem* **275**, 20647-51.
228. **Marcinkiewicz M and Seidah NG.** (2000). Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem* **75**, 2133-43.
229. **Yan R, Munzner JB, Shuck ME and Bienkowski MJ.** (2001). BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells. *J Biol Chem* **276**, 34019-27.
230. **Farzan M, Schnitzler CE, Vasilieva N, Leung D and Choe H.** (2000). BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9712-7.
231. **Basi G, Frigon N, Barbour R, Doan T, Gordon G, McConlogue L, Sinha S and Zeller M.** (2003). Antagonistic effects of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzymes 1 and 2 on beta-amyloid peptide production in cells. *J Biol Chem* **278**, 31512-20.
232. **Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT and Selkoe DJ.** (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* **398**, 513-7.
233. **Brown MS, Ye J, Rawson RB and Goldstein JL.** (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**, 391-8.
234. **Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, Song YQ, Rogueva E, Chen F, Kawarai T, et al.** (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* **407**, 48-54.
235. **Goutte C, Tsunozaki M, Hale VA and Priess JR.** (2002). APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 775-9.
236. **Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS and Selkoe DJ.** (2003). Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6382-7.
237. **Zhou S, Zhou H, Walian PJ and Jap BK.** (2005). CD147 is a regulatory subunit of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease amyloid beta-peptide production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7499-504.
238. **Chen F, Hasegawa H, Schmitt-Ulms G, Kawarai T, Bohm C, Katayama T, Gu Y, Sanjo N, Glista M, Rogueva E, et al.** (2006). TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity. *Nature* **440**, 1208-12.
239. **Laudon H, Hansson EM, Melen K, Bergman A, Farmery MR, Winblad B, Lendahl U, von Heijne G and Naslund J.** (2005). A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem* **280**, 35352-60.

240. **Oh YS and Turner RJ.** (2005). Topology of the C-terminal fragment of human presenilin 1. *Biochemistry* **44**, 11821-8.
241. **Spasic D, Tolia A, Dillen K, Baert V, De Strooper B, Vrijens S and Annaert W.** (2006). Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway. *J Biol Chem* **281**, 26569-77.
242. **Nyabi O, Bentahir M, Horre K, Herreman A, Gottardi-Littell N, Van Broeckhoven C, Merchiers P, Spittaels K, Annaert W and De Strooper B.** (2003). Presenilins mutated at Asp-257 or Asp-385 restore Pen-2 expression and Nicastrin glycosylation but remain catalytically inactive in the absence of wild type Presenilin. *J Biol Chem* **278**, 43430-6.
243. **Brunkan AL, Martinez M, Walker ES and Goate AM.** (2005). Presenilin endoproteolysis is an intramolecular cleavage. *Mol Cell Neurosci* **29**, 65-73.
244. **Steiner H, Romig H, Grim MG, Philipp U, Pesold B, Citron M, Baumeister R and Haass C.** (1999). The biological and pathological function of the presenilin-1 Deltaexon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J Biol Chem* **274**, 7615-8.
245. **Haass C and Steiner H.** (2002). Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol* **12**, 556-62.
246. **Herreman A, Van Gassen G, Bentahir M, Nyabi O, Craessaerts K, Mueller U, Annaert W and De Strooper B.** (2003). gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation. *J Cell Sci* **116**, 1127-36.
247. **Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, Ball H, Dann CE, 3rd, Sudhof T and Yu G.** (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* **122**, 435-47.
248. **Hebert SS, Serneels L, Dejaegere T, Horre K, Dabrowski M, Baert V, Annaert W, Hartmann D and De Strooper B.** (2004). Coordinated and widespread expression of gamma-secretase in vivo: evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiol Dis* **17**, 260-72.
249. **Shirotani K, Edbauer D, Prokop S, Haass C and Steiner H.** (2004). Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APH-1 variants. *J Biol Chem* **279**, 41340-5.
250. **De Strooper B.** (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* **38**, 9-12.
251. **Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G and Iwatsubo T.** (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* **422**, 438-41.
252. **Shirotani K, Edbauer D, Kostka M, Steiner H and Haass C.** (2004). Immature nicastrin stabilizes APH-1 independent of PEN-2 and presenilin: identification of nicastrin mutants that selectively interact with APH-1. *J Neurochem* **89**, 1520-7.
253. **Niimura M, Isoo N, Takasugi N, Tsuruoka M, Ui-Tei K, Saigo K, Morohashi Y, Tomita T and Iwatsubo T.** (2005). Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions. *J Biol Chem* **280**, 12967-75.
254. **LaVoie MJ, Fraering PC, Ostaszewski BL, Ye W, Kimberly WT, Wolfe MS and Selkoe DJ.** (2003). Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem* **278**, 37213-22.
255. **Capell A, Beher D, Prokop S, Steiner H, Kaether C, Shearman MS and Haass C.** (2005). Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway. *J Biol Chem* **280**, 6471-8.

256. **Kaether C, Scheuermann J, Fassler M, Zilow S, Shirotani K, Valkova C, Novak B, Kacmar S, Steiner H and Haass C.** (2007). Endoplasmic reticulum retention of the gamma-secretase complex component Pen2 by Rer1. *EMBO Rep* **8**, 743-8.
257. **Spasic D, Raemaekers T, Dillen K, Declerck I, Baert V, Serneels L, Fullekrug J and Annaert W.** (2007). Rer1p competes with APh-1 for binding to nicastrin and regulates gamma-secretase complex assembly in the early secretory pathway. *J Cell Biol* **176**, 629-40.
258. **Parks AL and Curtis D.** (2007). Presenilin diversifies its portfolio. *Trends Genet* **23**, 140-50.
259. **Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ and Kopan R.** (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* **5**, 197-206.
260. **Okochi M, Steiner H, Fukumori A, Tanii H, Tomita T, Tanaka T, Iwatsubo T, Kudo T, Takeda M and Haass C.** (2002). Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *Embo J* **21**, 5408-16.
261. **Okochi M, Fukumori A, Jiang J, Itoh N, Kimura R, Steiner H, Haass C, Tagami S and Takeda M.** (2006). Secretion of the Notch-1 Abeta-like peptide during Notch signaling. *J Biol Chem* **281**, 7890-8.
262. **Thomas PQ and Rathjen PD.** (1992). HES-1, a novel homeobox gene expressed by murine embryonic stem cells, identifies a new class of homeobox genes. *Nucleic Acids Res* **20**, 5840.
263. **Kopan R, Nye JS and Weintraub H.** (1994). The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* **120**, 2385-96.
264. **Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ and Tonegawa S.** (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* **89**, 629-39.
265. **Wong PC, Zheng H, Chen H, Becher MW, Sirinathsinghji DJ, Trumbauer ME, Chen HY, Price DL, Van der Ploeg LH and Sisodia SS.** (1997). Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* **387**, 288-92.
266. **De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K and Van Leuven F.** (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* **391**, 387-90.
267. **Herreman A, Hartmann D, Annaert W, Saftig P, Craessaerts K, Serneels L, Umans L, Schrijvers V, Checler F, Vanderstichele H, et al.** (1999). Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11872-7.
268. **Donoviel DB, Hadjantonakis AK, Ikeda M, Zheng H, Hyslop PS and Bernstein A.** (1999). Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev* **13**, 2801-10.
269. **Naruse S, Thinakaran G, Luo JJ, Kusiak JW, Tomita T, Iwatsubo T, Qian X, Ginty DD, Price DL, Borchelt DR, et al.** (1998). Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* **21**, 1213-21.
270. **Zhang Z, Nadeau P, Song W, Donovan D, Yuan M, Bernstein A and Yankner BA.** (2000). Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat Cell Biol* **2**, 463-5.
271. **Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al.** (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**, 754-60.

272. **Moehlmann T, Winkler E, Xia X, Edbauer D, Murrell J, Capell A, Kaether C, Zheng H, Ghetti B, Haass C, et al.** (2002). Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8025-30.
273. **Bentahir M, Nyabi O, Verhamme J, Tolia A, Horre K, Wiltfang J, Esselmann H and De Strooper B.** (2006). Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* **96**, 732-42.
274. **Sambamurti K, Shioi J, Anderson JP, Pappolla MA and Robakis NK.** (1992). Evidence for intracellular cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor in PC12 cells. *J Neurosci Res* **33**, 319-29.
275. **Thinakaran G, Teplow DB, Siman R, Greenberg B and Sisodia SS.** (1996). Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the "beta-secretase" site occurs in the golgi apparatus. *J Biol Chem* **271**, 9390-7.
276. **Hartmann T, Bieger SC, Bruhl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, Roberts GW, Masters CL, Dotti CG, Unsicker K, et al.** (1997). Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med* **3**, 1016-20.
277. **Cook DG, Forman MS, Sung JC, Leight S, Kolson DL, Iwatsubo T, Lee VM and Doms RW.** (1997). Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat Med* **3**, 1021-3.
278. **Kaether C, Schmitt S, Willem M and Haass C.** (2006). Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated after transport of their precursors to the cell surface. *Traffic* **7**, 408-15.
279. **Chyung JH and Selkoe DJ.** (2003). Inhibition of receptor-mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid beta-protein at the cell surface. *J Biol Chem* **278**, 51035-43.
280. **Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L and Selkoe DJ.** (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* **1**, 1291-6.
281. **Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F and Cole G.** (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* **274**, 99-102.
282. **Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S and Holtzman DM.** (2008). Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron* **58**, 42-51.
283. **Jaeger S and Pietrzik CU.** (2008). Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **5**, 15-25.
284. **Pietrzik CU, Busse T, Merriam DE, Weggen S and Koo EH.** (2002). The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *Embo J* **21**, 5691-700.
285. **Pietrzik CU, Yoon IS, Jaeger S, Busse T, Weggen S and Koo EH.** (2004). FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. *J Neurosci* **24**, 4259-65.
286. **Waldron E, Heilig C, Schweitzer A, Nadella N, Jaeger S, Martin AM, Weggen S, Brix K and Pietrzik CU.** (2008). LRP1 modulates APP trafficking along early compartments of the secretory pathway. *Neurobiol Dis* **31**, 188-97.
287. **Puck TT, Cieciora SJ and Robinson A.** (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* **108**, 945-56.

288. **FitzGerald DJ, Fryling CM, Zdanovsky A, Saelinger CB, Kounnas M, Winkles JA, Strickland D and Leppla S.** (1995). Pseudomonas exotoxin-mediated selection yields cells with altered expression of low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Cell Biol* **129**, 1533-41.
289. **Kounnas MZ, Morris RE, Thompson MR, FitzGerald DJ, Strickland DK and Saelinger CB.** (1992). The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. *J Biol Chem* **267**, 12420-3.
290. **Leuchtenberger S, Maler J, Czirr E, Ness J, Lichtenthaler SF, Esselmann H, Pietrzik CU, Wiltfang J and Weggen S.** (2009). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and ectodomain shedding of the amyloid precursor protein. *Neurodegener Dis* **6**, 1-8.
291. **Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, Chevallier N, Merriam DE, Kounnas MZ, Wagner SL, Troncoso JC, Kawas CH, Katzman R, et al.** (2000). Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest* **106**, 1159-66.
292. **Brockhaus M, Grunberg J, Rohrig S, Loetscher H, Wittenburg N, Baumeister R, Jacobsen H and Haass C.** (1998). Caspase-mediated cleavage is not required for the activity of presenilins in amyloidogenesis and NOTCH signaling. *Neuroreport* **9**, 1481-6.
293. **Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
294. **Birnboim HC and Doly J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
295. **Graham FL and van der Eb AJ.** (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-67.
296. **Ausubel FM, Brent, R., Kingdom, R. E., Moore, D. M., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K.** (1995).
297. **Coffin JMV, H. E.** (1996). Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
298. **Emi N, Friedmann T and Yee JK.** (1991). Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **65**, 1202-7.
299. **Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
300. **Schagger H and von Jagow G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79.
301. **Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al.** (1992). Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* **258**, 126-9.
302. **Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P and Yankner BA.** (1993). Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2092-6.
303. **Perez RG, Squazzo SL and Koo EH.** (1996). Enhanced release of amyloid beta-protein from codon 670/671 "Swedish" mutant beta-amyloid precursor protein occurs in both secretory and endocytic pathways. *J Biol Chem* **271**, 9100-7.
304. **Felsenstein KM, Hunihan LW and Roberts SB.** (1994). Altered cleavage and secretion of a recombinant beta-APP bearing the Swedish familial Alzheimer's disease mutation. *Nat Genet* **6**, 251-5.
305. **Caporaso GL, Gandy SE, Buxbaum JD and Greengard P.** (1992). Chloroquine inhibits intracellular degradation but not secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2252-6.

306. **Haass C, Hung AY, Selkoe DJ and Teplow DB.** (1994). Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem* **269**, 17741-8.
307. **Lichtenthaler SF, Multhaup G, Masters CL and Beyreuther K.** (1999). A novel substrate for analyzing Alzheimer's disease gamma-secretase. *FEBS Lett* **453**, 288-92.
308. **Lleo A, Waldron E, von Arnim CA, Herl L, Tangredi MM, Peltan ID, Strickland DK, Koo EH, Hyman BT, Pietrzik CU, et al.** (2005). Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) interacts with presenilin 1 and is a competitive substrate of the amyloid precursor protein (APP) for gamma-secretase. *J Biol Chem* **280**, 27303-9.
309. **Lamb BT, Sisodia SS, Lawler AM, Slunt HH, Kitt CA, Kearns WG, Pearson PL, Price DL and Gearhart JD.** (1993). Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]. *Nat Genet* **5**, 22-30.
310. **Lamb BT, Call LM, Slunt HH, Bardel KA, Lawler AM, Eckman CB, Younkin SG, Holtz G, Wagner SL, Price DL, et al.** (1997). Altered metabolism of familial Alzheimer's disease-linked amyloid precursor protein variants in yeast artificial chromosome transgenic mice. *Hum Mol Genet* **6**, 1535-41.
311. **Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y and LaFerla FM.** (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409-21.
312. **Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, et al.** (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* **26**, 10129-40.
313. **Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, Calhoun ME, Jaggi F, Wolburg H, Gengler S, et al.** (2006). Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* **7**, 940-6.
314. **King GD, Perez RG, Steinhilb ML, Gaut JR and Turner RS.** (2003). X11alpha modulates secretory and endocytic trafficking and metabolism of amyloid precursor protein: mutational analysis of the YENPTY sequence. *Neuroscience* **120**, 143-54.
315. **Haass C.** (2004). Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *Embo J* **23**, 483-8.
316. **Collawn JF, Kuhn LA, Liu LF, Tainer JA and Trowbridge IS.** (1991). Transplanted LDL and mannose-6-phosphate receptor internalization signals promote high-efficiency endocytosis of the transferrin receptor. *Embo J* **10**, 3247-53.
317. **Trowbridge IS, Collawn JF and Hopkins CR.** (1993). Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol* **9**, 129-61.
318. **Bonifacino JS and Traub LM.** (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**, 395-447.
319. **Lehmann LE, Eberle W, Krull S, Prill V, Schmidt B, Sander C, von Figura K and Peters C.** (1992). The internalization signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase consists of the hexapeptide PGYRHV. *Embo J* **11**, 4391-9.
320. **Harter C and Mellman I.** (1992). Transport of the lysosomal membrane glycoprotein Igp120 (Igp-A) to lysosomes does not require appearance on the plasma membrane. *J Cell Biol* **117**, 311-25.
321. **Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, et al.** (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* **113**, 1456-64.

322. **Skovronsky DM, Moore DB, Milla ME, Doms RW and Lee VM.** (2000). Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem* **275**, 2568-75.
323. **De Jonghe C, Zehr C, Yager D, Prada CM, Younkin S, Hendriks L, Van Broeckhoven C and Eckman CB.** (1998). Flemish and Dutch mutations in amyloid beta precursor protein have different effects on amyloid beta secretion. *Neurobiol Dis* **5**, 281-6.
324. **Kim HS, Kim EM, Lee JP, Park CH, Kim S, Seo JH, Chang KA, Yu E, Jeong SJ, Chong YH, et al.** (2003). C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3beta expression. *Faseb J* **17**, 1951-3.
325. **Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK and Rosenfeld MG.** (2002). Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* **110**, 55-67.
326. **Waldron E, Isbert S, Kern A, Jaeger S, Martin AM, Hebert SS, Behl C, Weggen S, De Strooper B and Pietrzik CU.** (2008). Increased AICD generation does not result in increased nuclear translocation or activation of target gene transcription. *Exp Cell Res* **314**, 2419-33.
327. **Cam JA, Zerbinatti CV, Li Y and Bu G.** (2005). Rapid endocytosis of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates cell surface distribution and processing of the beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **280**, 15464-70.
328. **Zerbinatti CV, Wozniak DF, Cirrito J, Cam JA, Osaka H, Bales KR, Zhuo M, Paul SM, Holtzman DM and Bu G.** (2004). Increased soluble amyloid-beta peptide and memory deficits in amyloid model mice overexpressing the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1075-80.
329. **May P, Reddy YK and Herz J.** (2002). Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J Biol Chem* **277**, 18736-43.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
ADAM	α -Sekretase, <i>A Disintegrin and Metallo-Proteinase</i>
AICD	<i>APP intracellular domain</i> , durch die γ -Sekretase Prozessierung der CTFs ins Zytosol freigesetzte intrazelluläre Domäne des APP
AK	Alzheimer Krankheit, Morbus Alzheimer, <i>Alzheimer disease</i>
APH-1	<i>Anterior Pharynx Defective-1</i>
APLP	Familie der APP ähnlichen Proteine, <i>Amyloid Precursor-like Proteins</i>
APP	Amyloid Vorläuferprotein, <i>Amyloid Precursor Protein</i>
APPs α	Durch die α -Sekretase freigesetzte N-terminale lösliche Domäne von APP
APPs β	Durch BACE1 freigesetzte N-terminale lösliche Domäne von APP
APPs β_{swe}	Durch BACE1 freigesetzte N-terminale lösliche Domäne von APP $_{\text{swe}}$
APPs β_{wt}	Durch BACE1 freigesetzte N-terminale lösliche Domäne von wildtyp APP
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>The American Type Culture Collection</i>
A β	Amyloid- β -Peptid
A β 40	aus 40 Aminosäuren bestehendes A β -Peptid
A β 42	aus 42 Aminosäuren bestehendes A β -Peptid, aggregiert leichter als A β 40-Peptide
BACE1	β -Sekretase, <i>β-site APP cleaving Enzyme</i>
C83	Durch α -Sekretase-Prozessierung von APP erzeugtes 83 Aminosäuren langes CTF
C99	Durch β -Sekretase-Prozessierung von APP erzeugtes 99 Aminosäuren langes CTF
CAA	Zerebroarterielle Amyloidose, <i>Cerebral Amyloid Angiopathy</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
CDK5	<i>Cyclin-dependent Kinase 5</i>
Cfu	<i>Colony forming unit</i>
CH ₃ COOK	Kaliumacetat
CHO	Ovarienzellen des Chinesische Hamsters, <i>Cricetulus griseus (Chinese Hamster Ovary Cells)</i>
cm	Zentimeter
CTF	Carboxy-terminales Fragment
Cu	Kupfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat

DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor, <i>Epidermal-Growth-Factor</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
Etbr	Ethidiumbromid
FAK	Familiäre Alzheimer Erkrankung
FCS	Fötale Kälber Serum, <i>fetal calf serum</i>
FTDP-17	Frontotemporale Demenz und Parkinsonismus des Chromosom 17, <i>Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to Chromosome 17</i>
FTLD	<i>Frontotemporal Lobar Degeneration</i>
G	Schwerebeschleunigung
GSK3-β	Glykogen-Synthase-Kinase 3-β
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HEK 293	humane embryonale Nierenzellen (<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>)
ICD	Intrazelluläre Domäne
IL-1R2	Interleukin-1 Rezeptor Typ II
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KPI	Kunitz-Proteasen-Inhibitions Motiv
L	Liter
LDLR	<i>Low-density Lipoprotein Receptor</i>
LRP1	<i>Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1</i>
LTP	Langzeit Potenzierung
M	Mol
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
Mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Milli-Mol
MnCl ₂	Manganchlorid
N	Asparagin
N,N,N',N'- Tetramethylethan-1,2- diamin	Temed
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaN ₃	Natriumazid

NaOH	Natriumhydroxid
NFT	neurofibrilläre Bündel, <i>neurofibrillar tangles</i>
NICD	intrazelluläre Domäne von Notch, <i>Notch intracellular domain</i>
Nm	Nanometer
NRG1	Neuregulin-1
NTF	Amino-terminales Fragment
OPNG	O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
P	Prolin
p3	3 kDa großes Fragment von APP. Wird aus C83 durch die γ -Sekretase freigesetzt und anschließend sekretiert.
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEN-2	<i>Presenilin Enhancer Protein 2</i>
<i>PHF</i>	<i>Paired Helical Filaments</i>
PKC	Protein-Kinase C
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
PSGL-1	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand 1</i>
PVDF	Polyvinylidenfluoridmembranen
RbCl	Rubidiumchlorid
RIP	regulierte intramembranöse Proteolyse
s	Sekunde
SAE	subkortikale arteriosklerotische Enzephalopathie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SP	Signalpeptid
ST6Gal1	β -Galaktosid α -2,6-Sialyltransferase
Std	Stunde
TACE	α -Sekretase, <i>Tumor-Necrosis-Factor-α converting Enzym</i> ,
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
UpM	Umdrehung pro Minute
VGSC	Spannungsabhängiger Natriumkanal, <i>Voltage-gated Sodium Channel</i>
w/v	Gewicht pro Volumen, <i>weight per volume</i>
X	irgendeine Aminosäure
Y	Tyrosin
Zn	Zink
ZnCl ₂	Zinkchlorid
α CTF	Durch α -Sekretase-Prozessierung von APP erzeugtes 83 Aminosäuren langes CTF
β CTF	Durch β -Sekretase-Prozessierung von APP erzeugtes 99 Aminosäuren langes CTF

8.2 Publikationen des Autors

Publikationen:

- **Jäger S**, Leuchtenberger S, Czirr E, Wesselowski J, Martin A, Dieckmann M, Waldron E, Korth C, Koo EH, Heneka M, Weggen S and Pietrzik CU: **A β generation from APP carrying the Swedish mutation is largely dependent on the NPTY endocytosis signal of full length APP.** Zur Publikation eingereicht.
- Waldron E, Heilig C, Schweitzer A, Nadella N, **Jaeger S**, Martin AM, Weggen S, Brix K, Pietrzik CU: **LRP1 modulates APP trafficking along early compartments of the secretory pathway.** *Neurobiol Dis.* 2008; 31(2): 188-97
- Waldron E, Isbert S, Kern A, **Jaeger S**, Martin AM, Hébert SS, Behl C, Weggen S, De Strooper B, Pietrzik CU: **Increased AICD generation does not result in increased nuclear translocation or activation of target gene transcription.** *Exp Cell Res.* 2008; 314 (13): 2419-33
- Martin AM, Kuhlmann C, Trossbach S, **Jaeger S**, Waldron E, Roebroek A, Luhmann HJ, Laatsch A, Weggen S, Lessmann V and Pietrzik CU: **The functional role of the second NPXY motif of LRP1 beta-chain in tPA-mediated activation of NMDA receptors.** *J Biol Chem.* 2008; 283(18): 12004-13
- **Jaeger S** and Pietrzik CU: **Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease.** *Curr Alzheimer Res.* 2008; 5(1): 15-25
- Waldron E, **Jaeger S** and Pietrzik CU: **Functional role of the low-density lipoprotein receptor-related protein in Alzheimer's disease.** *Neurodegener Dis.* 2006; 3(4-5):233-8
- Neumann S, Schöbel S, **Jäger S**, Haass C, Pietrzik CU, Lichtenthaler SF: **APLP1 influences endocytosis and proteolytic processing of the amyloid precursor protein.** *J Biol Chem.* 2006; 281(11):7583-94
- Pietrzik CU, Yoon I-S, **Jaeger S**, Busse T, Weggen S and Koo EH: **FE65 constitutes the functional link between the LDL receptor-related protein (LRP) and the amyloid precursor protein (APP).** *J. Neuroscience,* 2004; 24(17):4259-65

Poster:

– Pietrzik CU, **Jaeger S**, Wesselowski J, Cirr E, Korth C, Weggen S, Koo EH and Pietrzik KF: **γ -secretase dependent APP processing occurs either at the plasma membrane or in the endocytic compartments independent of the APP wild-type or APP Swedish variant.** International Conference on Alzheimer's Disease 2008, Chicago, USA, July 26 - 31, 2008

– **Jaeger S**, Rogge B, Koo EH and Pietrzik CU: **Functional consequences of LRP expression on familiar Alzheimer disease APP mutations.** The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Madrid, Spain, July 15 - 20, 2006

8.3 Lebenslauf

Zur Person:

Name: Sebastian Jäger

Geburtstag: 07.03.1976

Geburtsort: Berlin

Adresse:

Wissenschaftliche Ausbildung

Seit 06/2003 **Doktorarbeit** in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Pietrzik, Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie an der Johannes Gutenberg Universität Mainz

01/2005 - 12/2005 **Forschungsaufenthalt am UT Southwestern Medical Center, Dallas, Tx, USA**, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Joachim Herz, Department of Molecular Genetics, finanziert durch ein Stipendium des Boehringer Ingelheim Fonds

10/1996 - 02/2003 Studium der **allgemeinen Biotechnologie** an der **Technischen Universität Berlin (Abschluss: Dipl.-Ing.)**

2002 Dreimonatige **Studienarbeit** an der **University of Wales, Bangor, Wales, GB**, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Tomos **Thema:** Investigation of single cell samples of *Chara corallina* by Matrix-assisted-laser-desorption/ionisation Time-of-Flight mass spectrometry (MALDI-TOF)

2001 Externe **Diplomarbeit** am **Max-Planck-Institut** für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Willmitzer **Thema:** Produktion des Polyesters Polyhydroxybutyrat (PHB) in *Arabidopsis thaliana*

Schulbildung

08/86 - 04/95 Friedrich Bährens Gymnasium, Schwerte, Allgemeine Hochschulreife

8.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbstständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Weiter erkläre ich, dass ich nicht schon andersweitig einmal die Promotionsabsicht angemeldet oder ein Promotionseröffnungsverfahren beantragt habe.

Düsseldorf, den

Sebastian Jäger

8.5 Danksagungen

Ein spezieller Dank gilt Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl von der Technischen Universität Berlin für die langjährige Begleitung meiner wissenschaftlichen Ausbildung und der Übernahme der offiziellen Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Claus U. Pietrzik danke ich für die Möglichkeit in einem neurowissenschaftlichen Bereich zu forschen. Seine unermüdliche Unterstützung, die hervorragende Betreuung und sein großes Vertrauen ermöglichten die erfolgreiche Bearbeitung dieses Projektes. Den unzähligen Berichten aus seiner Zeit in San Diego und seiner großen Flexibilität verdanke ich die Inspiration und die Umsetzung des wissenschaftlichen Austauschjahres am UT Southwestern Medical Center in Texas.

Dem „wissenschaftlichen Überzeugungstäter“ Prof. Dr. Joachim Herz danke ich für den wunderbaren Aufenthalt in Dallas und den Einblick in die amerikanische Forschungswelt, der bei mir einen bleibenden Eindruck hinterlassen hat. Dem Boehringer Ingelheim Fonds danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Den Mitgliedern des Pietrzik Labors, Elaine, Anne, Anna, Thorsten, Marco und Timo, danke ich für die nette Zusammenarbeit, die gute Laune und Harmonie im Labor, manchem leckeren Bierchen, unterhaltsamen Abenden und dem Ertragen des ewigen Frittengeruchs. Insbesondere danke ich Hanne für die wunderbare enge Zusammenarbeit und Hilfe bei den unendlichen vielen Proben und Western Blots des letzten Jahres, nachdem wir sie erfolgreich vom Weggen-Labor abwerben konnten.

Ein herzlicher Dank gilt dem gesamten „Weggen-Labor“, das großen Anteil am Aufbau des Methodenspektrums der neu gegründeten Arbeitsgruppen hatte. Besonders Eva Czirr gilt ein großer Dank für die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen, die unermüdlichen Vorschläge zur Behebung methodischer Probleme, die gegenseitige Unterstützung in schwierigen Zeiten und die gemeinsamen, einsamen Abendstunden im Labor. Sascha Weggen danke ich für die konstruktive Kritik und die unendlichen Einblicke in die Abläufe der Forschungswelt.

Ein superdickes Dankeschön gilt meiner Familie für den Rückhalt und den bedingungslosen Glauben, dass ich es zu Ende bringen werde.

Zum Schluß möchte ich mich ganz herzlich bei meiner wissenschaftlichen Beraterin, Unterstützerin und Lebenspartnerin Stefanie bedanken, insbesondere für das große Geschenk des letzten Jahres. Dem kleinen Mann danke ich für die freudigsten Momente des Zusammenschreibens.