

**„Untersuchungen zur Beteiligung der Preseniline an  
den molekularen Mechanismen der Amyloid- $\beta$   
Entstehung“**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des Grades**

**„Doktor der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz**

**Marcus Kostka**

**Geb. in : Hamm (Westf.)**

**Mainz, 2000**

---

Tag der mündlichen Prüfung :

28.02.2000

---

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
1.1 AMYLOIDE PLAQUES UND NEUROFIBRILLÄRE BÜNDEL.....	3
1.2 GENETISCHE FAKTOREN IN DER PATHOGENESE DER ALZHEIMER-ERKRANKUNG .....	5
1.3 APP - STRUKTUR, METABOLISMUS UND FUNKTION .....	6
1.3.1 <i>Der nicht-amyloidogene Stoffwechselweg</i> .....	7
1.3.2 <i>Der amyloidogene Stoffwechselweg</i> .....	9
1.3.3 <i>Neurotoxizität der A<math>\beta</math>-Peptide</i> .....	10
1.4 PRESENILINE - STRUKTUR, METABOLISMUS UND FUNKTION .....	11
1.5 DIE AMYLOID-HYPOTHESE ODER ENTSTEHUNG VON PATHOGENEN MECHANISMEN DURCH APP- UND PS-MUTATIONEN.....	15
1.6 SIND DIE PRESENILINE DIE GESUCHTE $\gamma$ -SEKRETASE ? .....	17
1.7 ZIEL DER ARBEIT.....	18
<b>2. MATERIAL</b> .....	<b>20</b>
2.1 BAKTERIENSTÄMME .....	20
2.2 ZELLINIEN.....	20
2.3 TIERSTÄMME.....	20
2.4 PLASMIDE .....	21
2.5 ANTIKÖRPER.....	22
2.6 STAMMLÖSUNGEN UND PUFFER.....	23
2.7 OLIGONUKLEOTIDE .....	29
2.8 MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE BAKTERIENKULTUR .....	29
2.9 MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE KULTIVIERUNG VON SÄUGERZELLEN .....	30
<b>3. METHODEN</b> .....	<b>31</b>
3.1 KULTIVIERUNG UND LAGERUNG VON BAKTERIENZELLEN .....	31
3.1.1 <i>Anzuchtbedingungen</i> .....	31
3.1.2 <i>Anlegen von Glycerinkulturen</i> .....	31
3.2 METHODEN ZUR KULTIVIERUNG UND MANIPULATION VON SÄUGERZELLEN.....	31
3.2.1 <i>Einfrieren von humanen Zellen</i> .....	31
3.2.2 <i>Transfektion von Plasmid-DNA in humane Zelllinien</i> .....	32
3.2.3 <i>Stabile Transfektion und Zellklonierung</i> .....	32
3.3 IMMUNFLUORESCENZ MIT HUMANEN ZELLEN .....	32
3.4 METABOLISCHES MARKIEREN MIT S <sup>35</sup> -METHIONIN .....	33
3.5 METHODEN ZUR HERSTELLUNG REKOMBINANTER PLASMIDE.....	33
3.5.1 <i>Präparation von Plasmid-DNA</i> .....	33
3.5.2 <i>Isolierung von DNA-Fragmenten</i> .....	34
3.5.3 <i>Enzymatische Modifikation von DNA-Fragmenten</i> .....	34
3.5.4 <i>Rekombination mit modifizierten DNA - Fragmenten</i> .....	36
3.5.5 <i>DNA - Sequenzierung</i> .....	37
3.6 PROTEINBIOCHEMISCHE ARBEITSMETHODEN .....	37
3.6.1 <i>Quantitative Proteinbestimmung</i> .....	37
3.6.2 <i>Immunpräzipitation von Proteinen</i> .....	37
3.6.3 <i>Vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese</i> .....	38
3.6.4 <i>Coomassie-brilliantblue Färbung</i> .....	41
3.6.5 <i>Silberfärbung</i> .....	41
3.6.6 <i>Westernimmunblot</i> .....	41
3.7 BIOCHEMISCHE ARBEITSMETHODEN .....	42
3.7.1 <i>Fraktionierung von Meerschweinchengewebe</i> .....	42
3.8 KOMPONENTEN DES ZELLFREIEN $\gamma$ -SEKRETASE TESTSYSTEMS .....	43
3.8.1 <i>Mikrosomenfraktion aus H4-LC99 Zellen</i> .....	43
3.8.2 <i>Präparation von Cytosol aus Meerschweinchenleberzellen</i> .....	44
3.8.3 <i>Präparation von Cytosol aus humanen Neurogliomazellen</i> .....	44
3.8.4 <i>Stringentes Waschen der Mikrosomenfraktion</i> .....	44
3.8.5 <i>Inkubation der mikrosomalen Membranen</i> .....	45

<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>46</b>
4.1 INTRAZELLULÄRE LOKALISIERUNG DER PRESENILINE UND INTERAKTION MIT C- TERMINALEN FRAGMENTEN DES APP.....	46
4.1.1 <i>Expression von Presenilin 1 Wildtyp und FAD-Mutante (A246E) in humanen Neuroglioma-Zellen (H4).....</i>	<i>.....</i>
4.1.2 <i>Induzierbare Expression von PS-2 Wildtyp und PS-2 FAD-Mutante (A141I) in humanen Astrocytomazellen (U373 MG).....</i>	<i>47</i>
4.1.3 <i>Interaktion von Presenilin und C-terminalen Fragmenten des APP in rekombinanten Zelllinien .</i>	<i>51</i>
4.2 ANREICHERUNG VON GOLGIMEMBRANEN AUS LEBERGeweBE DES MEERSCHWEINCHENS.....	53
4.3 INTERAKTION VON PS-2 UND C-TERMINALEN FRAGMENTEN DES APP .....	59
4.4 FRAKTIONIERUNG VON CORTEX UND HIPPOCAMPUS DES MEERSCHWEINCHENS.....	59
4.5 INTERAKTION VON PS-2 UND APP C-TERMINALEN FRAGMENTEN IM CORTEX UND HIPPOCAMPUS.....	62
4.6 ZELLFREIES TESTSYSTEM ZUR BESTIMMUNG DER $\gamma$ -SEKRETASE AKTIVITÄT.....	64
4.6.1 <i>Induzierbare Expression von LC99 in H4 Neurogliomazellen.....</i>	<i>64</i>
4.6.2 <i>Fraktionierung von H4-ind-LC99 Zellen.....</i>	<i>66</i>
4.6.3 <i>Das zellfreie Testsystem.....</i>	<i>69</i>
4.6.4 <i>Einfluß der Preseniline auf die zellfreie <math>\gamma</math>-Sekretase Aktivität .....</i>	<i>77</i>
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>82</b>
5.1 LOKALISIERUNG ENDOGENER PRESENILINE.....	83
5.2 INTERAKTION DER PRESENILINE MIT C-TERMINALEN FRAGMENTEN DES APP .....	85
5.3 EINFLUß DER PRESENILIN MUTATIONEN AUF DEN KOMPLEX ZWISCHEN DEN PRESENILINEN UND DEM C-TERMINALEN APP FRAGMENT.....	87
5.4 EINE INTERAKTION VON PS-1 UND PS-2 MIT DEM DIREKTEN $\gamma$ -SEKRETASE SUBSTRAT C99 KONNTE NICHT NACHGEWIESEN WERDEN .....	88
5.5 DAS ZELLFREIE TESTSYSTEM .....	89
5.5.1 <i>Die <math>\gamma</math>-Sekretase ist eine transmembrane Protease.....</i>	<i>90</i>
5.5.2 <i><math>A\beta</math> wird durch eine Calcium-abhängige Protease degradiert .....</i>	<i>91</i>
5.5.3 <i>Der <math>\gamma</math>-Sekretase Aktivität liegt kein bekannter Proteasemechanismus zugrunde.....</i>	<i>92</i>
5.5.4 <i>PS-1 ist für die zellfreie Entstehung von <math>A\beta</math> notwendig .....</i>	<i>93</i>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>95</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>97</b>

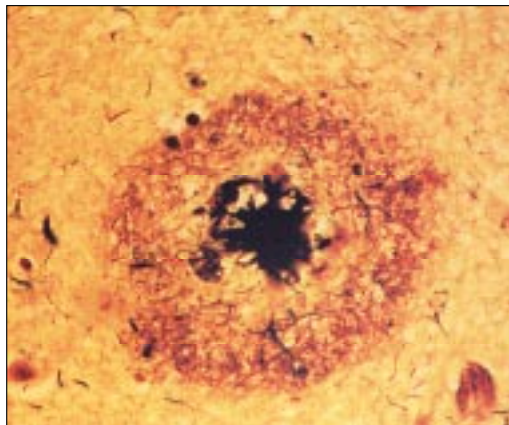
# 1. Einleitung

Schon in der Mitte des 19. Jahrhunderts faßte der Franzose Esquirol (1845) cerebrale Erkrankungen, die durch Herabsetzen des Verstandes und des Willens sowie Minderung von Gedächtnisleistungen und Urteilsvermögen charakterisiert sind, unter dem Begriff Demenz zusammen. An der Wende vom 19. zum 20. Jahrhundert wurde diese klinische Diagnose durch neuropathologische Befunde präzisiert, die vor allem das Auftreten von senilen Plaques und neurofibrillären Bündeln umfaßte. In den Arbeiten von Alois Alzheimer wurde anhand des Falles der Patientin Auguste D. deutlich, daß es sich beim Auftreten dieser beiden neuropathologischen Befunde, um eine eigenständige Form von Demenz handelt. Dies wurde 1907 in der „Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin“ unter dem Titel „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ veröffentlicht (Alzheimer, 1907).

Heute steht fest, daß die Alzheimer-Erkrankung die häufigste Form der Demenz mit weltweit über 20 Millionen betroffener Patienten ist (Haass und De Strooper, 1999). Die Demenz vom Alzheimer Typ ist neuropathologisch und pathophysiologisch neben den bereits beschriebenen Merkmalen durch neuronalen Zelltod (Apoptose), cholinergen Synapsen Verlust (Synapoptose), verminderte Neurotransmitter Ausschüttung und cerebrale Entzündungsprozesse gekennzeichnet (Fuhrmann *et al.*, 1995). Besonders betroffen ist das cholinerge System im Gehirn von Alzheimerpatienten, indem ein Verlust an cholinergem Innervierung und eine drastische Reduktion der Cholinacetyltransferase Aktivität festgestellt werden kann (Geula und Mesulam, 1999). Das klinische Bild manifestiert sich anfänglich durch die Beeinträchtigung der Merkfähigkeit (anterograde Amnesie) und des Denkvermögens über Konfusion und verminderte kognitive Leistungen bis hin zur absoluten Hilfsbedürftigkeit der Patienten (Fuhrmann *et al.*, 1995). Medikamente, die eine kausale Therapie zulassen, sind zur Zeit nicht verfügbar, da die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung der Erkrankung führen, nicht hinreichend geklärt sind. Die Entwicklung neuer *in vitro* und *in vivo* Modelle ist daher notwendig, um molekulare und zellbiologische Untersuchungen der pathologischen Mechanismen durchzuführen. Denn erst durch die Aufklärung dieser Mechanismen wird es möglich werden, bestehende Angriffspunkte der Erkrankung zu validieren und neue Angriffspunkte zu identifizieren, die eine effektive Behandlung ermöglichen.

## 1.1 Amyloide Plaques und neurofibrilläre Bündel

Bisher ist eine eindeutige Diagnose der Alzheimer-Erkrankung auf die neuropathologische Untersuchung *post mortem* beschränkt. Eine Alzheimer-Erkrankung wird unter anderem durch die CERAD Kriterien (Heyman *et al.*, 1990; Mirra *et al.*, 1994) diagnostiziert. Demnach müssen neuritische Plaques in Verbindung mit neurofibrillären Bündeln („Tangles“) im Gehirn von Patienten nachzuweisen sein (Ball *et al.*, 1997).



**Abb.1 : Histochemischer Nachweis von amyloiden Plaques und neurofibrillären Bündeln (aus Selkoe, 1991)**

Schnitt aus der Amygdala eines Alzheimer-Patienten. Die modifizierte Bielschowsky Silber- Färbung zeigt einen neuritischen Plaque mit aggregiertem A $\beta$ -Peptiden in der Mitte. Der „Core-Plaque“ ist von dystrophischen Neuriten und aktivierten Mikroglia umgeben.

Durch modernere Arbeitsmethoden der Zellbiologie wurden diese filamentösen, intraneuronalen und extrazellulären Läsionen als pathologische Hauptmerkmale einer Alzheimer-Erkrankung näher charakterisiert.

Neuritische Plaques im Gehirn von Alzheimer-Patienten werden vorwiegend im Cortex und Hippocampus gefunden und bestehen aus etwa 8 nm großen filamentösen Ablagerungen. Sie sind sowohl mit dystrophen Axonen und Dendriten als auch mit aktivierten Astrozyten und Mikroglia assoziiert (Abb.1). Plaques, die nicht von dystrophen Neuriten umgeben sind, werden als diffuse Plaques bezeichnet und werden bei der Diagnose einer Alzheimer-Erkrankung nicht berücksichtigt. Neuritische Plaques zusammen mit neurofibrillären Bündeln kommen vorwiegend im Hippocampus, Cortex, Cerebellum und in der Amygdala vor (Selkoe, 1996).

Neurofibrilläre Bündel bestehen aus 10-20 nm großen zytoplasmatischen Fibrillen, die auch gepaarte helikale Filamente („paired helical filaments“, PHF) genannt werden. Sie sind sowohl im Soma von Neuronen zu finden, wo sie sich zu massiven neurofibrillären Bündeln zusammenlagern („neurofibrillary tangles“), als auch in Axonen und Dendriten, die dann als dystrophische Neurite bezeichnet werden. Weiterführende immunocytochemische und biochemische Untersuchungen der intraneuronalen fibrillären „Tangles“ haben ergeben, daß die Fibrillen ausschließlich aus dem Protein Tau bestehen (Lee, 1995; Goedert *et al.*, 1996). Das Tau Protein gehört zur MAP („microtubule-associated proteins“)-Proteinfamilie. Es unterstützt den Einbau von Tubulin in Mikrotubuli und erhöht die Stabilisierung axonaler Mikrotubuli, welche ihrerseits Aufgaben in der Entwicklung von Zellpolarität und im intrazellulären Transport besitzen (Drewes *et al.*, 1998). Die Modifikation des normalerweise löslichen neuronalen Proteins Tau in unlösliche filamentöse Polymere ist vermutlich eine Folge einer Disregulation von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Kaskaden. Bis heute sind die auslösenden Faktoren für dieses Ungleichgewicht nicht bekannt (Mandelkow und Mandelkow, 1998; Selkoe, 1998).

## 1.2 Genetische Faktoren in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung

Die meisten Alzheimer-Erkrankungen treten sporadisch auf. Nur bei 10% aller Alzheimer-Erkrankungen kann eine genetische, autosomal dominant vererbte Prädisposition festgestellt werden (Haass, 1996). Schon früh versuchte man die genetischen Faktoren der erblichen Form der Erkrankung (FAD; Familiar-Alzheimer-Disease) zu finden, um Aufschlüsse über die beteiligten Proteine und damit über die zugrunde liegenden Mechanismen zu erhalten. Biochemische Analysen der Gehirne von Alzheimer-Patienten brachten dabei weitere Erkenntnisse, welche Proteine an der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung beteiligt sind.

So konnte durch Extraktion neuritischer Plaques aus Alzheimer und Down Syndrom Patienten 1985 erstmals deren „Grundbaustein“ isoliert werden (Glennner und Wong, 1984; Masters *et al.*, 1985). Es handelte sich um ein 4 kDa großes Peptid, das Amyloid- $\beta$  Peptid oder kurz A $\beta$  genannt wurde. Durch molekularbiologische und gentechnische Methoden fand man heraus, daß das A $\beta$  Peptid ein Spaltprodukt eines größeren Vorläuferproteins, dem Amyloid Precursor Protein (APP), ist (Kang, *et al.*, 1987). Durch *in situ* Hybridisierung wurde das APP-Gen auf dem Chromosom 21 q21.105-q21.05 lokalisiert (Tanzi *et al.*, 1987; Korenberg *et al.*, 1989). In Analysen von Stammbäumen von FAD-Familien, in denen eine genetische Verbindung zum Chromosom 21 nachzuweisen war, wurden bis heute acht verschiedene Fehlsinn-Mutationen im APP-Gen gefunden (Goate *et al.*, 1991; Chartie-Harlin *et al.*, 1991; Murrell *et al.*, 1991; Mullan *et al.*, 1992; Hendriks *et al.*, 1992) (Abb. 2). Obwohl die Mutationen in diesem Gen bei vermutlich weniger als 0,1 % aller Alzheimer Fälle auftreten (Tabelle 1), erbrachten Analysen über die Einflüsse der APP-Mutationen auf den Metabolismus des APP entscheidende Erkenntnisse über die Entstehung der Erkrankung.

**Tabelle 1 : Genetische Faktoren in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung**  
(modifiziert nach Hardy, 1997; Mattson, 1998)

Gen	Chromosom	Krankheitsausbruch in Jahren	% der FAD Fälle	% aller AD Fälle
<i>APP</i>	21	45–66	<1	<0.1
<i>PS1</i>	14	28–62	40-60	1–10
<i>PS2</i>	1	40–85	<1	<0.1
<i>Apo <math>\epsilon 4^1</math></i>	19	>60	-	>50
<i><math>\alpha</math>-2M<sup>2</sup></i>	12	>70	-	?

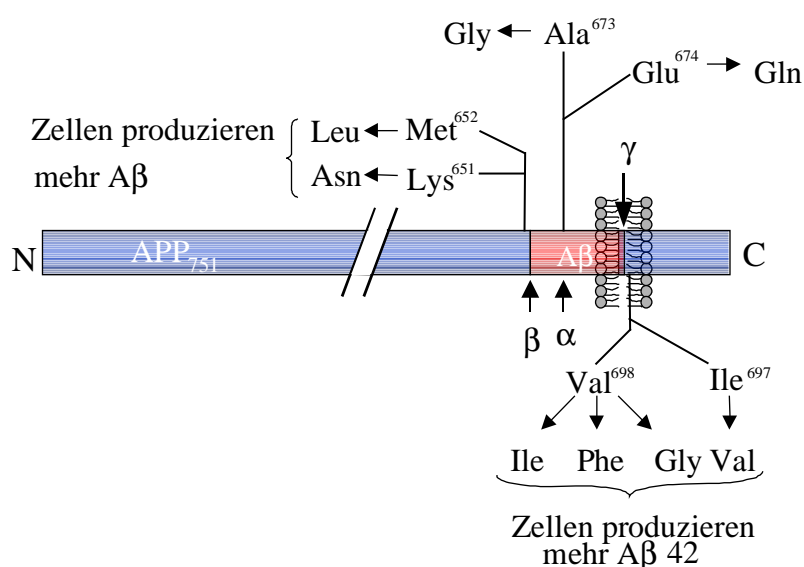
<sup>1</sup> Apolipoprotein allelische Form  $\epsilon 4$

<sup>2</sup>  $\alpha$ -2 Makroglobulin

Neben den Mutationen im *APP*-Gen sind weitere Genmutationen und Risikofaktoren entdeckt worden, die zur Entstehung der Alzheimer-Erkrankung beitragen. Darunter sind vor allem Mutationen in den beiden *Presenilin*-Genen zu nennen, die mit einer Prävalenz von 0,1-10 % aller Alzheimer Fälle auftreten (s. Tabelle1). Diese FAD-Mutationen führen zu einem frühzeitigen Auftreten der Erkrankung schon ab dem 28. Lebensjahr (Hardy, 1997). Als Risikofaktoren sind bisher die allelische Form  $\epsilon 4$  des Apolipoproteins und Mutationen im  $\alpha 2$ -Makroglobulin bekannt. Viele Faktoren in der Entstehung einer Alzheimer-Erkrankung sind jedoch noch unbekannt (s. Abb. 6), daher ist die Suche nach neuen Genmutationen noch nicht abgeschlossen. Die Tabelle 1 faßt die bekannten Genmutationen und Risikofaktoren zusammen.

### 1.3 APP - Struktur, Metabolismus und Funktion

APP ist ein ubiquitär exprimiertes, transmembranes Glykoprotein mit einer kurzen N- terminalen Signalsequenz (Kang *et al.*, 1987). Es wird konstitutiv sezerniert und posttranslational über N- und O-Glykosylierung, Phosphorylierung und Sulfatierung modifiziert (Weidemann *et al.*, 1989; Oltersdorf *et al.*, 1990; Overly *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1992, Suzuki *et al.*, 1994; Hung und Selkoe, 1994). APP ist ein Mitglied einer Familie homologer Proteine, die in verschiedenen evolutiven Stufen wie *Drosophila* und *C.elegans* vorkommen (Luo *et al.*, 1992; Daigle und Li, 1993).



**Abb. 2 : APP Mutationen**

Auch im Menschen gibt es zwei APP Homologe, das APLP1 und APLP2 (Wasco *et al.*, 1992; Wasco *et al.*, 1993). Deletionen im *Drosophila*-Gen können durch das humane *APP*-Gen ersetzt werden, was auf eine phylogenetisch konservierte Funktion zwischen den Homologen hinweist (Yankner, 1996).



Allen Homologen ist jedoch gemeinsam, daß sie im Vergleich zum humanen APP keine A $\beta$  Domäne besitzen.

Im Gehirn sind drei verschieden lange Spleißvarianten bekannt (APP<sub>770, 751, 695</sub>), wobei die kürzeste Isoform mit 695 Aminosäuren ausschließlich in Neuronen zu finden ist (Koo *et al.*, 1990, Yamazaki *et al.*, 1995). Der neuronalen Isoform fehlt im Unterschied zu den beiden kürzeren Formen ein Kunitz-Protease-Inhibitor-Motif. Dies könnte auf eine unterschiedliche biologische Funktion der Isoformen hindeuten (Kitaguchi *et al.*, 1988, Ponte *et al.*, 1988, Tanzi *et al.*, 1988).

APP enthält am C-Terminus ein NPTY-Signal für die Reinternalisierung von der Plasmamembran über „coated pits“ (Lai *et al.*, 1995). Sowohl bei der Sezernierung als auch nach der Reinternalisierung wird es durch spezifische Proteasen endoproteolytisch gespalten. Diese Proteolyse erfolgt über zwei verschiedene Stoffwechselwege einen nicht-amyloidogen und einen amyloidogenen Weg, wobei drei unterschiedliche Proteasen beteiligt sind (Abb.3).

### 1.3.1 Der nicht-amyloidogene Stoffwechselweg

Im nicht-amyloidogenen Stoffwechselweg, über den das APP verstärkt in nicht neuronalen Zellen abgebaut wird (Sisodia *et al.*, 1990), schneidet eine sogenannte  $\alpha$ -Sekretase das APP zwischen dem Lys16-Leu17 der A $\beta$  Region (Esch *et al.*, 1990). Dadurch entsteht eine große, lösliche Ektodomäne des APP ( $\alpha$ -APPs), die über die Plasmamembran nach außen sezerniert wird. Intrazellulär ist kein  $\alpha$ -APPs nachzuweisen (Chyung *et al.*, 1997). In der Membran verbleibt ein 83 Aminosäuren großes C-terminales Fragment (C83), das entweder reinternalisiert und in Lysosomen abgebaut wird (Haass *et al.*, 1992) oder durch eine zweite Protease, die sogenannte  $\gamma$ -Sekretase, innerhalb der Membran zu den Produkten P7 und P3 gespalten wird (Abb. 3).

P3 wird anders als P7, das vermutlich schnell degradiert wird, sofort nach außen sezerniert, so daß es intrazellulär selbst in APP überexprimierenden Zellen nicht nachzuweisen ist (Haass *et al.*, 1992). Diese Beobachtungen lassen sich durch die Lokalisierung der  $\alpha$ -Sekretase nahe an der Zelloberfläche erklären (Sisodia, 1992, Koo und Squazzo, 1994). Eine Lokalisierung im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) oder in Endosomen kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden (Sambamurti *et al.*, 1992; De Strooper *et al.*, 1993, Kuentzel *et al.*, 1993). Da das sezernierte P3 im Gegensatz zum A $\beta$  keine Aggregate bildet (Näslund *et al.*, 1994), entstehen durch die Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase aus dem APP keine amyloidogenen Produkte. Man spricht deshalb vom nicht-amyloidogenen Stoffwechselweg des APP (Abb. 3).

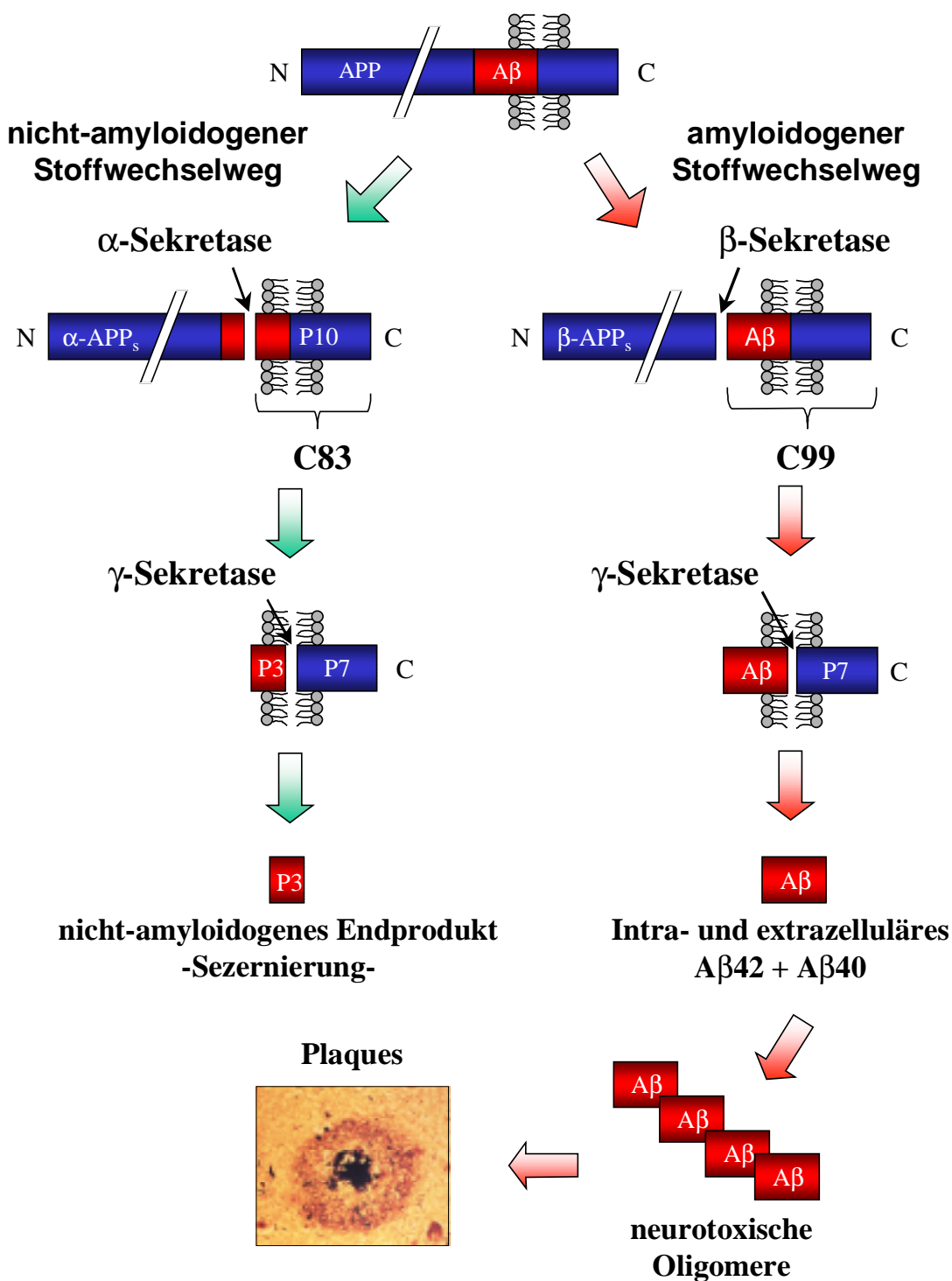


Abb. 3 : Der APP Metabolismus

Das lösliche  $\alpha$ -APPs übernimmt im Organismus verschiedene biologische Funktionen wie zum Beispiel Stimulierung von Zellproliferation, Verstärkung von Zelladhäsion und Inhibierung von Serinproteasen (Saitoh *et al.*, 1989; Schubert *et al.*, 1989; Sinha *et al.*, 1990; Chen und Yankner, 1991). Eine weitere wichtige Funktion ist die neuroprotektive Wirkung auf Neurone gegen verschiedenste Arten von

zellulärem Stress. Dieser protektive Effekt des  $\alpha$ -APPs kann auf die Stabilisierung der intrazellulären Calcium-Hömeostase in Neuronen zurückgeführt werden (Mattson *et al.*, 1993; Schubert und Behl, 1993).

Die  $\alpha$ -Sekretase Aktivität kann durch Aktivatoren des Phospholipase C/Protein Kinase C Stoffwechselweges wie Phorbol ester (Caporaso *et al.*, 1992; Slack *et al.*, 1993; Dyrks *et al.*, 1994; Efthimiopoulos *et al.*, 1994) oder M1 und M3 muskarinische Agonisten (Buxbaum *et al.*, 1992; Nitsch *et al.*, 1992) stimuliert werden. Inhibitoren dieser beiden Stoffwechselwege können jedoch die Sezernierung von  $\gamma$ -APPs nicht völlig reduzieren, so daß ein regulativer und ein konstitutiver  $\alpha$ -Sekretaseweg des APP unterschieden werden (Buxbaum *et al.*, 1998). Für die Aktivität des regulativen  $\alpha$ -Sekretasestoffwechselweges wurden bestimmte Metalloproteasen, die auch andere Proteine wie TNF („tumor necrosis factor“)- $\alpha$  spalten und zur Familie der ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) Proteasen gehören, verantwortlich gemacht (Buxbaum *et al.*, 1998). Diese Proteasen sind nicht sequenzspezifisch, benötigen jedoch einen genauen Abstand zur Membran, um die Proteolyse durchzuführen. Die gleiche Beobachtung wurde auch für die  $\alpha$ -Sekretase gemacht (Sisodia *et al.*, 1992). Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, daß ein weiteres Mitglied der ADAM Familie, die ADAM-10 Protease,  $\alpha$ -Sekretase Aktivität besitzt. Sie ist im Gegensatz zur der von Buxbaum *et al.* publizierten ADAM-17 Protease sowohl für den regulativen als auch für den konstitutiven Weg verantwortlich (Lammich *et al.*, 1999).

### 1.3.2 Der amyloidogene Stoffwechselweg

Die aus der Proteolyse des APP entstehenden Peptide, A $\beta$  und P3, werden von humanen Zellen konstitutiv sezerniert. Sie sind im Plasma und in der Cerebrospinalflüssigkeit von gesunden Menschen in pico- bis nanomolaren Konzentrationen nachzuweisen (Seubert *et al.*, 1992). Die Bildung dieser Proteolyseprodukte aus APP ist also kein ausschließliches pathologisches Phänomen, sondern ein normaler physiologischer Vorgang.

Der N-Terminus von A $\beta$  entsteht durch die Aktivität der sogenannten  $\beta$ -Sekretase, die hauptsächlich die Peptidbindung zwischen Met<sub>671</sub>-Asp<sub>672</sub> (Nummerierung nach APP<sub>770</sub>) spaltet (Haass *et al.*, 1992b, Mori *et al.*, 1992; Seubert *et al.*, 1992, Maruyama *et al.*, 1994). Es wurden einige Proteasen wie Cathepsine (Sahasrabudhe *et al.*, 1993; Dreyer *et al.*, 1994; Ladror *et al.*, 1994), verschiedene Metalloproteasen (McDermott *et al.*, 1992; Schönlein *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1997; Huber *et al.*, 1999) oder eine Calcium abhängige Protease (Abraham *et al.*, 1991) als  $\beta$ -Sekretase Kandidaten vorgeschlagen, jedoch konnten sich diese Hinweise nicht bestätigen. Dagegen konnte kürzlich in einer umfassenden Arbeit mit Hilfe einer Expressions-Klonierungs Strategie eine neue Aspartatprotease, namens BACE („beta-site-APP-cleaving enzyme“), identifiziert werden, die in Zellkultur die A $\beta$  Bildung modulierte und alle Charakteristika der  $\beta$ -Sekretase besaß (Vassar *et al.*, 1999). Durch eine Datenbanksuche konnte eine

homologe  $\beta$ -Sekretase identifiziert werden, die BACE2 genannt wurde (Saunders *et al.*, 1999). Andere Arbeitsgruppen konnten unabhängig davon über alternative Ansätze die  $\beta$ -Sekretasesequenz bestätigen (Hussain *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999). Deshalb wird zur Zeit angenommen, daß diese Proteasen die lang gesuchten  $\beta$ -Sekretasen sind.

Durch die Aktivität der  $\beta$ -Sekretase entsteht ein lösliches, C-terminal verkürztes APP, das von Zellen sezerniert wird und als  $\beta$ -APPs bezeichnet wird (Seubert *et al.*, 1993) (Abb. 3). Das in der Membran verbleibende C-terminale Fragment (C99) wird innerhalb der Transmembranregion durch die  $\gamma$ -Sekretase(n) am Valin 711 (Nummerierung nach APP<sub>770</sub>) oder am Isoleucin 713 (Nummerierung nach APP<sub>770</sub>) gespalten, welches zur Bildung des amyloidogenen A $\beta$  mit 40 oder 42 Aminosäuren (A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42) führt (Busciglio *et al.*, 1993). Durch die Aktivität der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase(n) wird das APP auf dessen Stoffwechselweg in verschiedenen zellulären Kompartimenten der Zelle zu A $\beta$  gespalten (Wilson *et al.*, 1999). Neben der schon früh postulierten A $\beta$  Bildung im endosomalen/lysosomalen System (Golde *et al.*, 1992; Haass, 1992a; Shoji *et al.*, 1992; Koo *et al.*, 1994) und in sekretorischen Vesikeln aus dem Golgi, die vom Golgi abgeschnürt werden und in Richtung Zellmembran wandern (Thinakaran *et al.*, 1996b; Xu *et al.*, 1997), wird A $\beta$  auch in den frühen Kompartimenten ER, ERGIC und cis-Golgi gebildet (Cook *et al.*, 1997; Wild-Bode *et al.*, 1997; Chyung *et al.*, 1997). Die beiden A $\beta$  Spezies entstehen jedoch zum Teil an unterschiedlichen Stellen innerhalb der Zelle. Das sezernierte A $\beta$ 40 wird sowohl im endosomalen/lysosomalen System als auch im TGN gebildet (Koo *et al.*, 1994; Thinakaran *et al.*, 1996). Ein Teil des A $\beta$ 42, der von der Zelle sezerniert wird, entsteht ebenfalls im TGN (Greenfield *et al.*, 1999). Dagegen wird bereits in den frühen Kompartimenten ER, ERGIC und cis-Golgi A $\beta$ 42 gebildet, das nicht sezerniert wird, sondern innerhalb der Zelle verbleibt (Wild-Bode *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 1997; Skovronsky *et al.*, 1998; Greenfield *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999). Man unterscheidet also einen sezernierten und einen intrazellulären A $\beta$  „Pool“ (Wilson *et al.*, 1999).

### 1.3.3 Neurotoxizität der A $\beta$ -Peptide

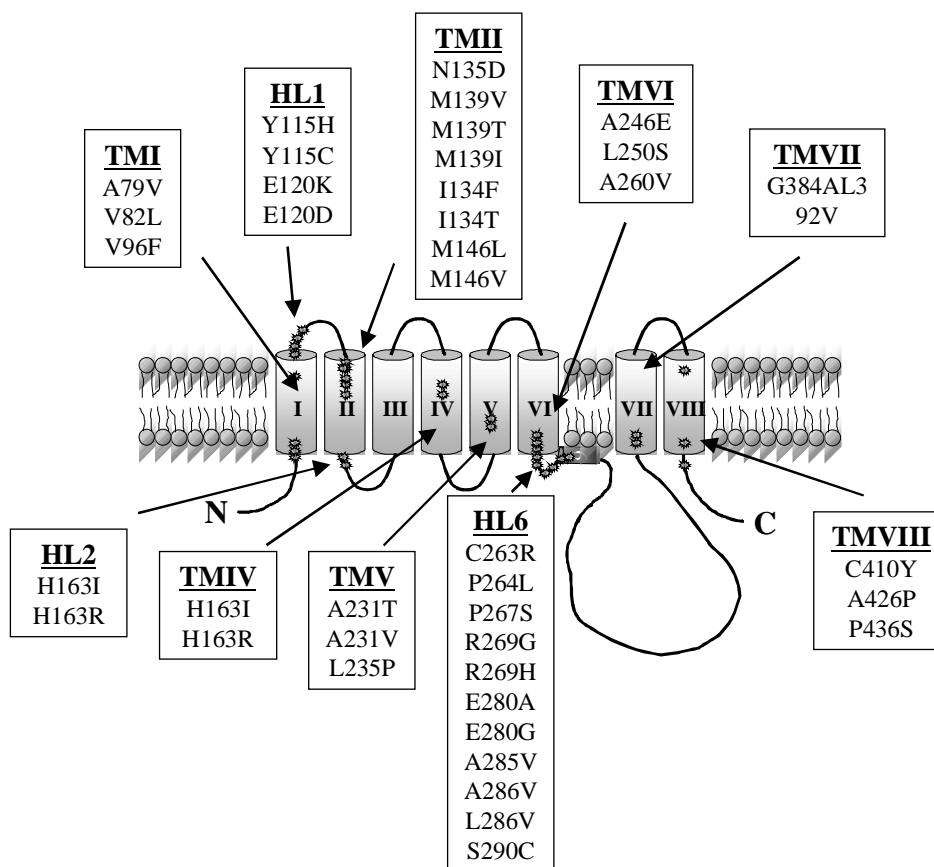
Das extrazelluläre, sezernierte A $\beta$  lagert sich bedingt durch eine Umlagerung von einer  $\alpha$ -Helix zu einer  $\beta$ -Faltblatt-Konformation zunächst zu Oligomeren zusammen. Daraus bilden sich dann Protofibrillen und schließlich entstehen Fibrillen-Strukturen, die die Vorstufe der neuritischen Plaques sind (Jarrett *et al.*, 1993; Pike *et al.*, 1993; Lorenzo und Jankner, 1994). Welche A $\beta$ -Aggregationszustände für Neurone toxisch sind, ist bis heute umstritten. Einerseits konnte gezeigt werden, daß fibrilläre A $\beta$ -Strukturen aus synthetischen A $\beta$ -Peptiden in Zellkultur neurotoxisch wirkten, wobei jedoch unphysiologische Mengen an A $\beta$  eingesetzt wurden (Lorenzo und Jankner, 1994; Roher *et al.*, 1996; Howlett *et al.*, 1995). Andererseits wirkten diffuse, nicht-fibrilläre A $\beta$ -Derivate schon in geringen Konzentrationen und unter Beteiligung von Zelloberflächenproteinen neurotoxisch, was auf eine

Rezeptor-vermittelte neurotoxische Wirkung des A $\beta$  hinwies (Lambert *et al.*, 1998). Auf Mikroglia wurden bereits die beiden Rezeptoren RAGE („receptor for advanced glycation end products“) und Scavenger gefunden, die A $\beta$  binden und dadurch eine toxische Wirkung auslösen konnten (Paresce *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996). Dagegen wurden auf Neuronen bisher keine Rezeptoren identifiziert, die diese neurotoxische Wirkung vermitteln konnten (Lambert *et al.*, 1998).

Neben dem neurotoxischen, extrazellulären A $\beta$  wird auch für das in der Zelle verbleibende A $\beta$ 42 eine neurotoxische Wirkung angenommen (Wilson *et al.*, 1999). Im ER, ERGIC und im cis-Golgi soll demnach die lokale Konzentration an intrazellulärem A $\beta$ 42 soweit ansteigen, bis es zur Bildung von Aggregaten kommt. Die Entstehung mehrerer Erkrankungen lassen sich auf aggregierte Proteine zurückführen. Sie führen in der Zelle zu einer massiven „ER-Streß“-Antwort, wodurch die Zelle geschädigt wird und letztendlich abstirbt (Aridoe und Balch, 1999). So würden die A $\beta$ 42 Aggregate zur Degeneration des Neurons und zur Entstehung eines „Core-Plaques“ führen, an den das extrazelluläre A $\beta$ 40 und andere Proteine binden (Wilson *et al.*, 1999). Nach dieser Hypothese ist die Wirkung des sezernierten A $\beta$ s auf die Entstehung einer Neurodegeneration nur von sekundärer Bedeutung. In PS1 transgenen Mäusen konnte bereits eine Neurodegeneration nur durch intrazelluläres A $\beta$  festgestellt werden, was diese Hypothese unterstützt (Chui *et al.*, 1999). Die Toxizität des intrazellulären A $\beta$ 42 könnte daher, anders als bisher vermutet, den größten Anteil an der neurotoxischen Wirkung des A $\beta$ s ausmachen (Wilson *et al.*, 1999).

#### 1.4 Preseniline - Struktur, Metabolismus und Funktion

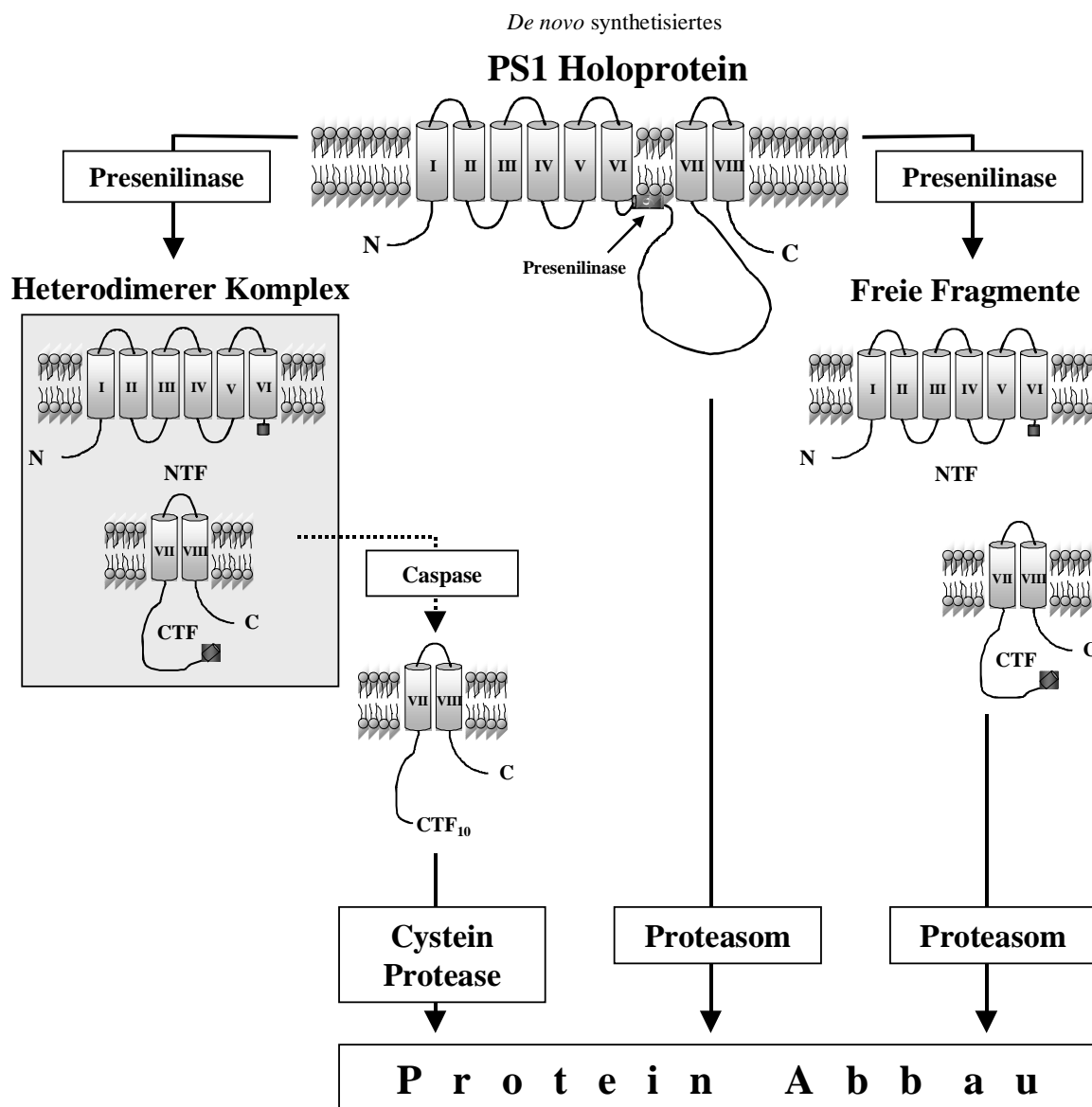
Neben Mutationen im APP werden in Verbindung mit der ursächlichen Entstehung der familiären Form der Alzheimer-Erkrankung auch Mutationen in der Proteinfamilie der Preseniline verantwortlich gemacht. Mutationen in diesen Genloci führen zu einer aggressiven Form der Alzheimer-Erkrankung, indem die Erkrankung schon zwischen dem 30.-60. Lebensjahr ausbricht (s. Tabelle1). Die Preseniline wurden durch positionale Klonierungsstrategien gefunden. Es sind zwei homologe Transmembranproteine (67 % Homologie), die als Presenilin 1 (PS1 ; Chromosom 14) und Presenilin 2 (PS2; Chromosom 1) bezeichnet werden (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995). Sie werden ubiquitär expremiert (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995) und sind im Gehirn vorwiegend in Neuronen zu finden (Kovacs *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; Page *et al.*, 1996). Bis heute wurden ca. 40 Mutationen im *PS1*-Gen und 2 Mutationen im *PS2*-Gen gefunden (Mattson *et al.*, 1998; Abb. 3). Bis auf eine *PS1*-Mutation, in der das gesamte Exon 9 deletiert ist (Perez-Tur *et al.*, 1995), sind alle anderen Fehlsinn-Mutationen (Mattson *et al.*, 1998). Obwohl die *PS*-Mutationen mehr oder weniger über die gesamte Sequenz verteilt sind, tritt eine Anhäufung von Mutationen sowohl in der Transmembranregion 2 (15 Mutationen), als auch im Bereich des großen hydrophilen „Loops“(11 Mutationen) auf (Hardy, 1997; Abb.4).



**Abb. 4 : Verteilung der PS-Mutationen**

(modifiziert nach Hardy, 1997)

Die bisherigen immunocytochemischen Analysen mit transfizierten neuronalen und nicht-neuronalen Zellen konnten die Preseniline ausschließlich im ER und im Golgi, sowie in Dendriten von neuronalen Zellen nachweisen (Cook *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1996; Kovacs *et al.*, 1996; Elder *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; Walter *et al.*, 1996; De Strooper *et al.*, 1997). Sie wurden auch an der Zelloberfläche (Dewji und Singer, 1996) und in der Kernmembran detektiert (Li *et al.*, 1997). Untersuchungen zur Topologie der Preseniline zeigten ein heterogenes Bild. So variierten die Anzahl der Transmembran-Domänen zwischen 6 bis 8. Allen gemeinsam ist die cytosolische Ausrichtung der terminalen Enden und des großen hydrophilen „Loops“ (De Strooper *et al.*, 1997; Doan *et al.*, 1996; Lehmann *et al.*, 1997; Li und Greenwald, 1996; Nakai *et al.*, 1999). Eine aktuelle Arbeit favorisiert jedoch ein Modell, in dem der C-Terminus der Preseniline ins ER-Lumen gerichtet ist (Nakai *et al.*, 1999).



**Abb. 5 : Stoffwechselwege der Presenilase**

(modifiziert nach Steiner *et al.*, 1998)

In der Proteolyse und dem Abbau der Presenilase sind drei verschiedene Stoffwechselwege beteiligt (Abb.5). Hauptsächlich werden sie endoproteolytisch zwischen der Transmembranregion 6 und 7 in ein größeres N-terminales (~30 kDa; NTF) und ein kleineres C-terminales Fragment (~20 kDa; CTF) gespalten (Borchelt *et al.*, 1997; Thinakaran *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997a), weshalb sie auch in vielen Zelltypen als Holoprotein kaum nachzuweisen sind (Thinakaran *et al.*, 1996a; Podlisny *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997a; Tomita *et al.*, 1997). Bis *dato* ist nicht geklärt, ob die Endoproteolyse durch eine Autokatalyse der Presenilase oder eine Protease (Presenilase) ausgeführt wird (Thinakaran *et al.*, 1996a; Steiner *et al.*, 1998). Beide Fragmente binden aneinander und bilden in der Zelle einen heterodimeren Komplex, der vermutlich mit anderen Proteinen verbunden ist und die aktive Form der

Preseniline darstellt (Seeger *et al.*, 1997; Capell *et al.*, 1998; Thinakaran *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998; Saura *et al.*, 1999). Die Bildung des Komplexes ist hoch reguliert, so daß eine Überexpression der Preseniline nicht zu einem linearen Anstieg der Fragmente führt (Thinakaran *et al.*, 1997). Außerdem wird durch die Überexpression des PS1 sowohl das endogene PS1 ersetzt, als auch die Synthese des endogenen PS2 inhibiert und *vice versa* (Thinakaran *et al.*, 1996a; Thinakaran *et al.*, 1997). Die PS-Holoproteine sind nicht in dem Komplex integriert (Capell *et al.*, 1998). Bis jetzt ist jedoch noch nicht geklärt, ob die Gesamtproteine die gleiche biologische Funktion ausüben können wie die Fragmente. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß eine A $\beta$ 42 Erhöhung verursacht durch eine FAD-Mutation im PS1, unabhängig von der Spaltbarkeit des Proteins ist (Steiner *et al.*, 1999a). Es stellt sich damit die Frage, warum die Preseniline überhaupt gespalten werden, wenn auch die Gesamtproteine biologisch aktiv sind. Die Antwort liegt höchstwahrscheinlich in der unterschiedlichen Stabilität der PS-Fragmente. Während die Fragmente im Komplex sehr stabil sind (Capell *et al.*, 1998; Steiner *et al.*, 1998), werden die PS-Fragmente, die nicht im Komplex integriert sind, genau wie überexprimiertes Holoprotein von der Zelle über einen unspezifischen, Proteasom abhängigen Mechanismus abgebaut (Kim *et al.*, 1997a; Thinakaran *et al.*, 1997; Steiner *et al.*, 1998; Marambaud *et al.*, 1998; s. Abb.5). Zusätzlich sind die Preseniline auch Substrate der Proteinasen der Caspase Superfamilie (Kim *et al.*, 1997b; Loetscher *et al.*, 1997; Brockhaus *et al.*, 1998; Grünberg *et al.*, 1998). In diesem Stoffwechselweg bildet das im Komplex vorliegende CTF der Preseniline das Substrat für die Caspasespaltung, wodurch ein etwa 10 kDa großes C-terminales Fragment (CTF<sub>10</sub>) entsteht (Steiner *et al.*, 1998; Abb.5). Das CTF<sub>10</sub> wird letztendlich durch eine Cystein Protease abgebaut (Steiner *et al.*, 1998; Abb.5). Während diese Caspase Aktivität unter normalen Bedingungen beobachtet werden kann, werden die Preseniline in der Apoptose distal von ihrer normalen Schnittstelle von der Caspase 3 gespalten (Kim *et al.*, 1997b; Vito *et al.*, 1997).

Die Funktion der Preseniline ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Hinweise gibt es über die Homologie zu anderen Proteinen wie dem SPE-4, das für den Proteintransport im Golgi verantwortlich ist (L'Herault *et al.*, 1992). Bis heute gibt es jedoch keine Daten, die belegen, daß die Preseniline tatsächlich Funktionen im Proteintransport besitzen. Außerdem sind sie zu 48% homolog zum SEL-12, das als positiver Modulator des Notch Homologs LIN-12 in *C.elegans* eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung spielt (Levitan *et al.*, 1996; Li und Greenwald, 1997). Daß auch die Preseniline in der Notch-Signalkaskade beteiligt sind, wird durch mehrere Ergebnisse deutlich. Zum einen konnte ein Eiablagedefekt bei *C.elegans*, der durch eine *sel-12* Mutante hervorgerufen wurde, durch beide Preseniline wieder komplementiert werden (Levitan und Greenwald, 1998; Baumeister *et al.*, 1997). Dieses Phänomen weist auf eine gemeinsame Funktion beider Proteine hin. Zum anderen führte eine „loss of function“ Mutation im einzigen PS-Gen von *D.melanogaster* zu einem klassischen Notch-ähnlichen Phänotyp (Struhl und Greenwald, 1999; Ye *et al.*, 1999). Außerdem führten homozygote PS1 Null-Mutationen (PS1<sup>-/-</sup>) bei transgenen Mäusen zum Absterben der Föten kurz vor der Geburt. Die



Gehirne dieser Mäuse zeigten eine Unterentwicklung der subventrikulären Zone, schwere vaskuläre Läsionen und Hämorrhagien (Shen *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1997). Diese cerebralen Veränderungen zusammen mit der gestörten Somitogenese in den transgenen Mäusen können teilweise durch einen fehlerhaften Notch-Signalweg erklärt werden, da in Mäusen mit einem inaktiven Notch-1 vergleichbare Symptome beobachtet wurden (Swiatek *et al.*, 1994; Conlon *et al.*, 1995).

Hinweise über eine Funktion der Preseniline im adulten Organismus gibt es durch die Auswirkungen der PS-Mutationen auf den APP Stoffwechsel. PS-Mutationen sind ebenso wie APP-Mutationen an einer Veränderung der A $\beta$  Entstehung beteiligt. Alle bisher untersuchten PS-Mutationen beeinflussen die Spaltung des C-terminalen Endes von A $\beta$ , so daß anstelle von A $\beta$ 40 mehr A $\beta$ 42 entsteht (Borchelt *et al.*, 1996; Duff *et al.*, 1996; Scheuner *et al.*, 1996; Borchelt *et al.*, 1997; Citron *et al.*, 1997; Tomita *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1997a; Holcomb *et al.*, 1998). Kürzlich wurde in Neuronen von PS-1 defizienten Mäusen eine deutliche Reduzierung des  $\gamma$ -Sekretase Produktes A $\beta$  und die Akkumulation des Vorläuferpeptides C99, sowie des P3 Vorläufers C83 nachgewiesen (De Strooper *et al.*, 1998; Naruse *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die Preseniline für die Proteolyse des APP zu A $\beta$  auf der Ebene der  $\gamma$ -Sekretase notwendig sind. Die Preseniline könnten also Aktivatoren der  $\gamma$ -Sekretase sein oder selbst  $\gamma$ -Sekretase Aktivität besitzen.

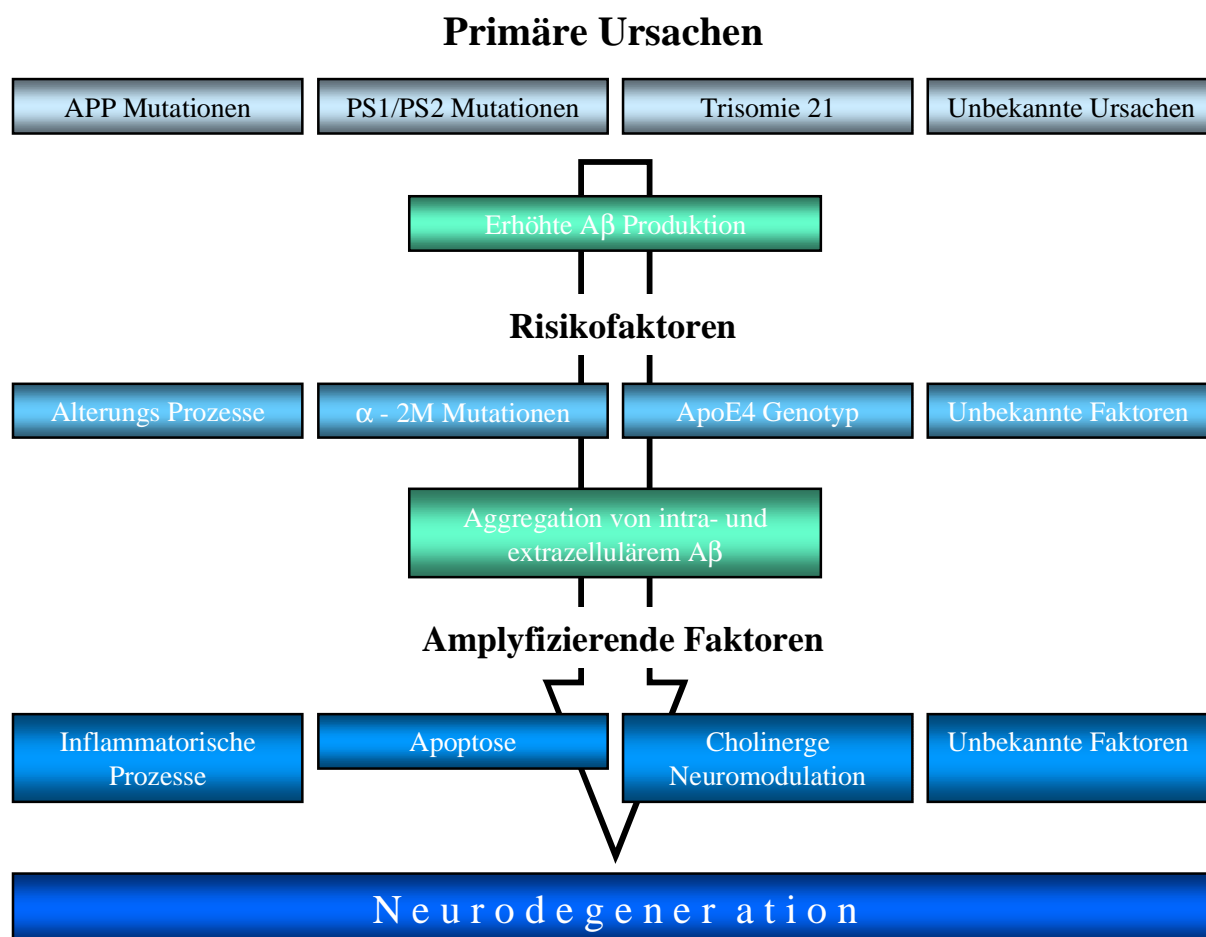
## **1.5 Die Amyloid-Hypothese oder Entstehung von pathogenen Mechanismen durch APP- und PS-Mutationen**

Es wurden mehrere Ätiologien zur Alzheimer-Erkrankung aufgestellt, die alle die gleiche Pathogenese beschreiben. Die Tabelle 2 faßt die wichtigsten Hypothesen zur Entstehung der Alzheimer-Erkrankung zusammen. Die Amyloid-Hypothese ist eine Ätiologie, in der das amyloidogene A $\beta$ -Peptide der zentrale Faktor in der Entstehung der Erkrankung ist (Abb. 6). Diese Annahme wurde schon früh durch die Beobachtung unterstützt, daß Down Syndrom-Patienten, die ein zusätzliches *APP*-Gen besitzen und erhöhte A $\beta$  Bildung aufweisen, eine für die Alzheimer-Erkrankung charakteristische Symptomatik entwickeln (Wisniewski *et al.*, 1985). Ein weiteres wichtiges Argument für die Hypothese ist die Tatsache, daß FAD-Mutationen im APP in der Nähe der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase Schnittstellen lokalisiert sind und dadurch direkt die A $\beta$ -Bildung beeinflussen (Abb. 2). So erhöht eine Doppelmutation in der Nähe der  $\beta$ -Sekretase Schnittstelle („Schwedenmutation“), die Konzentration an sezerniertem A $\beta$  um den Faktor 6 bis 8, was in Patientenfibroblasten und in transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen gezeigt werden konnte (Citron *et al.*, 1992; Cai *et al.*, 1993; Haass *et al.*, 1995; Thinakaran *et al.*, 1996b). In einer flämischen FAD-Familie wurde eine Mutation an der  $\alpha$ -Sekretase Schnittstelle gefunden, die auch dazu führt, daß vermehrt A $\beta$ 42 gebildet wird (Hardy, 1997; Abb.2).

**Tabelle 2 : Hypothesen zur Entstehung der Alzheimer-Erkrankung**

Hypothesen	Primäre Ursachen der Demenz	Referenz
Amyloid-Hypothese	Aggregation des A $\beta$ -Peptides	Selkoe, 1999
Inflammations-Hypothese	Chronische Mikrogliaaktivierung	McGeer und McGeer, 1995
Oxidativer Stress-Hypothese	Entstehung von ROS „reactive oxygen species“	Behl, 1999
Cholinerge-Hypothese	Verringerte Acetylcholinmengen	Lemiere <i>et al.</i> , 1999
Tau-Hypothese	Aggregation des Tau-Proteins	Mandelkow, 1999

Nach der Entdeckung der Presenilinen wurde sofort der Einfluß der Mutationen auf die Bildung des A $\beta$  untersucht, um festzustellen, ob die Mutationen im APP und in den Presenilinen gemeinsame Auswirkungen auf die Entstehung von A $\beta$  haben. Durch Quantifizierung von A $\beta$  aus Plasma und aus Zellkulturüberständen von Fibroblasten der FAD-Patienten mit PS-Mutationen konnte eine deutliche Erhöhung des A $\beta$ 42 Spiegels nachgewiesen werden (Scheuner *et al.*, 1996). Zusätzlich wurden auch erhöhte Konzentrationen des extrazellulären A $\beta$ 42 in konditionierten Medien von Zellen gefunden, die mit FAD-Mutationen-tragenden PS1 oder PS2 transfiziert worden waren (Borchelt *et al.*, 1996; Duff *et al.*, 1996; Citron *et al.*, 1997). Die Beobachtungen, daß die FAD-Mutationen im APP und in den Presenilinen beide die Bildung des amyloidogenen A $\beta$ 42 erhöhten, das, wie bereits beschrieben, neurotoxisch wirkt, unterstützt die Amyloid-Hypothese. Andere in der Alzheimer-Erkrankung auftretende Merkmale wie inflammatorische Prozesse, veränderter Tau-Metabolismus, Apoptose und cholinerge Neuromodulation werden im Rahmen der Amyloid-Hypothese nur als amplifizierende Faktoren in der Entwicklung einer Demenz aufgefasst (s. Abb.6).



**Abb. 6 : Die Amyloid-Hypothese**

### 1.6 Sind die Preseniline die gesuchte $\gamma$ -Sekretase ?

Es ist bis heute nicht geklärt, wie Mutationen in den Presenilinen selektiv die Bildung von A $\beta$ 42 erhöhen. Zwei mögliche Hypothesen werden zur Zeit diskutiert. Die Preseniline könnten Transportproteine sein, die das APP, ohne mit ihm direkt zu interagieren, zur  $\gamma$ -Sekretase bringen oder es der  $\gamma$ -Sekretase präsentieren. Diese Hypothese wird von den Wissenschaftlern unterstützt, die keine Interaktion der Preseniline mit APP finden (Thinakaran *et al.*, 1998). Andere Gruppen haben jedoch diese Interaktion nachweisen können, was auf einen direkten Einfluß der Preseniline auf den  $\gamma$ -Sekretase Schnitt deutet (Weidemann *et al.*, 1997; Waragai *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1997b; Xia *et al.*, 1998; Pradier *et al.*, 1999). Hinweise darauf, daß die Preseniline ungewöhnliche Aspartat Proteasen sein könnten, die die Aktivität einer  $\gamma$ -Sekretase besitzen, gibt es aus dem Labor von Dennis Selkoe (Wolfe *et al.*, 1999a). Dort konnte gezeigt werden, daß nur durch den Austausch von zwei konservierten Aspartaten D257A oder D385A in der Transmembranregion 6 oder 7 des PS1 sowohl die Endoproteolyse des Presenilins, als auch die A $\beta$  Bildung in humanen, transfizierten Zellen und in einem zellfreien System vollkommen reduziert werden konnte (Wolfe *et al.*, 1999a).

Gleichzeitig akkumulierten C-terminale APP Fragmente, die Substrate der  $\gamma$ -Sekretase darstellen. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den bereits beschriebenen Befunden in Neuronen von PS1 defizienten transgenen Mäusen (De Strooper *et al.*, 1999; Naruse *et al.*, 1999). Untersuchungen, in denen die äquivalenten Aspartate im PS2 ausgetauscht wurden, führten zum gleichen dominant negativen Effekt (Steiner *et al.*, 1999b). Darüber hinaus sind sie auch für die Proteolyse des Notch und des *C-elegans* homologs LIN-12 innerhalb der Notch-Signalkaskade notwendig, was zur Freisetzung der intrazellulären Domäne der Rezeptoren führt, die in den Kern wandern und durch die Bindung an spezifische Transkriptionsfaktoren die Genexpression modulieren (Stuhl und Greenwald, 1999; Ye *et al.*, 1999). Diese Spaltung der Notch/LIN-12 Proteine ist vergleichbar mit der intramembranen Spaltung des APP durch die  $\gamma$ -Sekretase (Stuhl und Greenwald, 1999; Ye *et al.*, 1999). Untersuchungen mit potentiellen  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren, die mit dem gleichen  $IC_{50}$  Werten sowohl den Stoffwechsel von APP, als auch von Notch inhibierten, lassen darauf schließen, daß gleiche Mechanismen an der Spaltung der Proteine beteiligt sind. Die Preseniline könnten demnach also Aspartyl-Proteasen sein, die für die intramembrane Spaltung verschiedener Proteine verantwortlich sind. Die Hypothese „Preseniline sind die  $\gamma$ -Sekretase(n)“ erklärt jedoch nicht wie die Preseniline, die in der Zelle nicht in post-Golgi-Kompartimenten zu finden sind, die Proteolyse des APP zu A $\beta$  im endosomalen/lysosomalen System ausführen können. Außerdem konnten die bisherigen Experimente nicht zweifelsfrei belegen, daß die Preseniline die  $\gamma$ -Sekretase(n) sind, da keine direkte Proteinase Aktivität nachgewiesen wurde. Letztendlich wird durch die Experimente aber deutlich, daß die  $\gamma$ -Sekretase(n) oder die Preseniline hervorragende therapeutische Angriffsziele darstellen, um das neurotoxische A $\beta$  spezifisch zu reduzieren. Damit würde eine kausale Therapie der Alzheimer-Erkrankung ermöglicht werden.

## 1.7 Ziel der Arbeit

Um die molekularen Mechanismen der A $\beta$  Entstehung und die Beteiligung der Preseniline daran zu untersuchen, wurden drei Problemstellungen bearbeitet :

### 1) Lokalisierung der Preseniline

Die bisherigen Lokalisierungsanalysen der Preseniline wurden vorwiegend in PS- überexprimierenden Zellen nicht-neuronalen Ursprungs durchgeführt. Da dadurch eine artifizielle Verteilung der Preseniline nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde die zelluläre Verteilung der Preseniline unter physiologischen Bedingungen untersucht. Dazu sollte zunächst ein spezieller Saccharosestufengradienten etabliert werden (Taylor *et al.*, 1997), um Membranen des ER und des Golgi-Apparates aus Leber und Gehirn des Meerschweinchens biochemisch zu trennen. Da die bisherigen Untersuchungen beide Preseniline sowohl im ER, als auch im Golgi-Apparat nachgewiesen haben (Cook *et al.*, 1996; Elder *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1996; Kovacs *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996;

Walter *et al.*, 1996; De Strooper *et al.*, 1997), sollte mit Hilfe dieser Methode überprüft werden, ob es unter physiologischen Bedingungen Unterschiede in der Kompartiment-spezifischen Verteilung zwischen PS1 und PS2 gibt. Außerdem sollte untersucht werden, ob es einen Unterschied in der Lokalisierung der Preseniline zwischen neuronalem und nicht-neuronalem Gewebe gibt.

## **2) Interaktion der Preseniline mit C-terminalen APP Fragmenten**

Es gibt Hinweise, daß die Preseniline entweder Modulatoren der  $\gamma$ -Sekretase oder selbst die  $\gamma$ -Sekretasen sein könnten (De Strooper *et al.*, 1999; Naruse *et al.*, 1999; Wolfe *et al.*, 1999a). Aufgrund dieser Annahme ist es jedoch notwendig, daß die Preseniline mit dem Substrat der  $\gamma$ -Sekretase in Kontakt treten. C-terminale APP Fragmente bilden dabei die Vorstufen oder direkte Substrate der  $\gamma$ -Sekretase. Die bisherigen Untersuchungen wurden in transfizierten Zellen durchgeführt, in denen eine artifizielle Aggregation der Preseniline und damit unspezifische Proteininteraktionen nicht ausgeschlossen werden konnten (Xia *et al.*, 1997b; Weidemann *et al.*, 1997). Aus diesem Grund sollten die Preseniline zunächst in einem induzierbaren System exprimiert werden. Anschließend sollte untersucht werden, ob die Preseniline mit C-terminalen APP-Fragmenten assoziiert sind. Darüber hinaus sollte die gleiche Interaktion unter physiologischen Expressionsbedingungen in Zellsaten aus Meerschweinchengewebe untersucht werden, um jegliche Überexpressionsartefakte auszuschließen.

## **3) Aufbau eines zellfreien System zur indirekten Bestimmung der $\gamma$ -Sekretase Aktivität**

Um spezifische Inhibitoren der  $\gamma$ -Sekretase identifizieren zu können, sollte ein Testsystem entwickelt werden, das eine zellfreie Messung der  $\gamma$ -Sekretase zuläßt und gleichzeitig unabhängig von zellulären Einflüssen funktioniert. Außerdem sollte mit Hilfe dieses Testsystems die  $\gamma$ -Sekretase einerseits indirekt biochemisch näher charakterisiert werden und andererseits Aufschluß über den Proteasemechanismus erhalten werden:

## 2. Material

### 2.1 Bakterienstämme

*E. coli* -

Stammbezeichnung	Genotyp	Quelle
XL1blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI <sup>q</sup> Z <sub>Δ</sub> M15Tn10(Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene
JM110	rpsL (Str <sup>r</sup> ) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 <sub>Δ</sub> (lac-proAB) [F'traD36 proAB lacI <sup>q</sup> Z <sub>Δ</sub> M15]	Stratagene

### 2.2 Zelllinien

Name	Eigenschaften	Quelle
H4	Neuroglioma; Gehirn; human	ATCC-Nr. HTB-148
U-373MG	Glioblastoma, Astrocytoma, grade III, human	ATCC-Nr. HTB-17

### 2.3 Tierstämme

Stammbezeichnung	Quelle
DHPW Meerschweinchen	Interfauna

## 2.4 Plasmide

Name	Eigenschaften	Referenz
pBluescriptSK <sup>+</sup>	Klonierungsvektor	[Short <i>et al.</i> ;1988]
pCEP4 <sup>-</sup> Hyg	Expressionsvektor ohne EBNA-1 und oriP; mit Hygromycin Resistenzgen	Invitrogen (modifiziert nach Susanne Adams)
pcDNA3neo	Expressionsvektor mit Neomycin Resistenzgen	Invitrogen
pcDNA3neo-PS-1 WT	Expressionsvektor mit mit PS-1 cDNA	
pcDNA3neo-PS-1 A246E	Expressionsvektor mit mit PS-1 cDNA	
pcDNA3.1zeo	Expressionsvektor mit Zeozin Resistenzgen	Invitrogen
pcDNA3.1zeo- PS1-D386N	Expressionsvektor mit PS1-D386N cDNA	
pcDNA3.1zeo- PS2-D366A	Expressionsvektor mit PS1-D366A cDNA	
pRCCMV	Expressionsvektor	Invitrogen
pCMV/SEAP	Expressionsvektor zur Expression der sekretorischen alkalischen Phosphatase	Tropix [Berger <i>et al.</i> ;1988]
pUHD15-1neo	„Regulatorvektor“	[Gossen und Bujard; 1992]
pUHD13-1	„Responsevektor“ Zur induzierbaren Expression von Genen	[Gossen und Bujard; 1992]
pUHD13-1-LC99	„Responsevektor“ mit Tetrazyklin abhängiger LC99 Expression	
pUHD13-1-PS-2 WT	„Responsevektor“ mit Tetrazyklin abhängiger PS-2 Expression	
pUHD13-1-PS-2 A14II	„Responsevektor“ mit Tetrazyklin abhängiger PS-2 Expression	

## 2.5 Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Quelle	Referenz
<b>Antikörper gegen APP und A<math>\beta</math></b>			
6E10 (mAK)	A $\beta$ (aa1-17)	Senetek PLC	Kim <i>et al.</i> , 1990
4G8 (mAK)	A $\beta$ (aa17-24)	Senetek PLC	Kim <i>et al.</i> , 1990
5818 (pAK)	APP-CT (aa652-695)	C.Haass	Leimer <i>et al.</i> , 1999
SAD3138 (pAK)	GYENPTYKFF EQMQN	LABGEN	Stephens und Austen, 1996
BI.40 (mAK)	A $\beta$ 40	-	Steiner <i>et al.</i> , 1998
BI.42 (mAK)	A $\beta$ 42	-	Steiner <i>et al.</i> , 1998
<b>Antikörper gegen PS-1</b>			
BI.3D7 (mAK)	PS-1“Loop“ (aa263-407)	-	Steiner <i>et al.</i> , 1999a
5023 (pAK)	PS-1“Loop“ (aa263-407)	C.Haass	Walter <i>et al.</i> , 1997
2953 (pAK)	PS-1NT (aa2-80)	C.Haass	Walter <i>et al.</i> , 1997 Grünberg <i>et al.</i> , 1998
<b>Antikörper gegen PS-2</b>			
BI.HF5C (mAK)	PS-2“Loop“ (aa297-356)	-	Steiner <i>et al.</i> , 1999c
BI.5D3 (mAK)	PS-2NT (aa2-87)	-	-
<b>Antikörper gegen kompartimentspezifische Proteine</b>			
Calretikulin (pAK)	Humanes Caretikulin (aa405-417)	Stressgen	Vaux <i>et al.</i> , 1990
Rab5 (pAK)	Humanes Rab5 (aa1-215)	Transduction Laboratories	Li und Stahl, 1993
Lamp1 (pAK)	Humanes Lamp1 (aa25-224)	Transduction Laboratories	Fukuda <i>et al.</i> , 1988



## 2.6 Stammlösungen und Puffer

Alle Chemikalien wurden als analysenreine Reagenzien von den Firmen Boehringer Mannheim, Grüssing, Fluka, Merk, Gibco/BRL, Serva oder Sigma bezogen. Radioaktives S-35 Methionin stammte von der Firma Amersham, Vektoren und Enzyme von den Firmen Boehringer Mannheim, Stratagene, Clontech, New England Biolabs, Promega Biotech, Invitrogen, Stressgen und Santa Cruz.

### Elektrophorese :

#### Agarosegelelektrophorese

TAE - Puffer (50x)	2	M	Tris - Eisessig ( pH=8.0)
	1	M	NaAcetat
	50	mM	Na <sub>2</sub> EDTA

#### DNA - Probenpuffer (6x)

0.25	%	Bromphenolblau
40	%	(w/v) Saccharose
6	mM	EDTA

Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)

TBE - Puffer (10x)	1	M	Tris - Base
	0.83	M	Borsäure (HBO <sub>4</sub> )
	10	mM	Na <sub>2</sub> EDTA

#### Polyacrylamidgelelektrophorese

##### Tris - Glycin Gele

Elektrodenpuffer (10x)	25	mM	Tris/HCl
	192	mM	Glycin
	0.1	%	SDS (w/v)
	pH	8,3	

Laemmli - Puffer (2x)	250	mM	Tris/HCl pH 6,8
	8	%	SDS (w/v)
	40	%	Glycerin (v/v)
	20	%	$\beta$ -Mercaptoethanol (v/v)
	0,004	%	Bromphenolblau (w/v)

### Tris - Bicine Gele

2 x Probenpuffer	0,72	M	Bis-Tris
	0,32	M	Bicine
	2	%	SDS (w/v)
	5	%	$\beta$ -Mercaptoethanol (v/v)
	30	%	Saccharose (w/v)

Anodenpuffer	0,2	M	Tris
	0,05	M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

Kathodenpuffer	0,2	M	Bicine
	0,25	%	SDS (w/v)
	0,1	M	NaOH (w/v)

Slotpuffer	0,36	M	Bis-Tris
	0,16	M	Bicine
	0,1	%	SDS (w/v)

Trenngelpuffer	1,6	M	Tris
	0,4	M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

Spacergelpuffer	0,2	M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	0,8	M	Bis-Tris

Sammelpuffer	0,72	M	Bis-Tris
	0,32	M	Bicine

Acryl-/Bisacrylamid - Lösung	40	%	(19:1; 5%C)
------------------------------	----	---	-------------

**Tris - Tricine Gele**

2X Probenpuffer	100	mM	Tris -HCl (pH 6,8)
	4	%	β-Mercaptoethanol (v/v)
	8	%	SDS (w/v)
	24	%	Glycerin (v/v)
	0,02	%	Serva blue G (w/v)
Anodenpuffer	0,2	M	Tris-HCl (pH 8,9)
Kathodenpuffer	0,1	M	Tris
	0,1	M	Tricine
	0,1	M	SDS
Gelpuffer	3	M	Tris-HCl (pH 8,45)
	0,3	M	SDS
Acryl-/Bisacrylamid Lösung 49,5%t, 6%C	46,5	%	Acrylamid (w/v)
	3,0	%	Bisacrylamid (w/v)
<b>Proteinfärbungen</b>			
Coomassie-Färbelösung	45	%	Methanol (v/v)
	10	%	Essigsäure (v/v)
	0.1	%	Coomassie-brilliantblue (w/v)
Entfärber	25	%	Methanol (v/v)
	10	%	Essigsäure (v/v)
Kolloidale – Coomassie - Färbelösung	20	ml	Methanol
	60	ml	ddH <sub>2</sub> O
	20	ml	Roti-Blue
Amidoblack-Färbelösung	0,1	%	Amidoblack (w/v)
	25	%	Isopropanol (w/w)
	10	%	Essigsäure (v/v)

**Silberfärbung**

Vorbehandlungs -Lösung	450	µl	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (0,35M)
	ad 300 ml mit ddH <sub>2</sub> O		
Färbung - Lösung	0,6	g	AgNO <sub>3</sub>
	225	µl	37% Formaldehyd
	ad 300 ml mit ddH <sub>2</sub> O		
Entwicklungs - Lösung	30	g	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	25	µl	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (0,35M)
	250	µl	37% Formaldehyd
	ad 500 ml mit ddH <sub>2</sub> O		

Stopplösung 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA

**Western Blot**

Transferpuffer	25	mM	Tris
	190	mM	Glycin
	10	%	Methanol (v/v)
	(20% Methanol (v/v) für PVDF Membranen)		
Blockierungspuffer	0,2	%	I - Block (w/v) (Tropix) in PBS - Puffer
PBST	0,1	%	Tween (v/v) in PBS – Puffer
RIPA – Puffer	150	mM	NaCl
	50	mM	Tris (pH8,0)
	0,1	%	SDS (w/v)
	1	%	NP40 (v/v)

**Immunfluoreszenz**

Extraktionspuffer	0,01	%	Saponin (w/v)
	0,1	%	Triton X-100 (v/v)
in PBS - Puffer			
Blockierungspuffer	0,2%		Gelatine (v/v)
	0,05	%	Saponin (w/v)
in PBS – Puffer			
PBS <sup>++</sup> - Puffer	1	mM	CaCl <sub>2</sub>
	1	mM	MgCl <sub>2</sub> (in PBS – Puffer)
Moviol (Calbiochem)	15	%	Hoechst 488 (Moviol)
	50	mg/ml	Diazabicyclo(2.2.2)octan DABCO (Sigma D-2522)
In PBS oder ddH <sub>2</sub> O			
Rühren ü/n eventuell erwärmen bei 50°C, zentrifugieren (10000xg20 min, RT)			
oder filtrieren, bei –20°C lagern			

**Sonstige Lösungen**

MOPS – Puffer	200	mM	MOPS 3(N-Morpholino)- propansulfonsäure
	50	mM	NaAcetat (pH 7,0)
	10	mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	(Lösung steril filtrieren !)		
PBS - Puffer	0,8	%	(w/v) NaCl
	0,02	%	(w/v) KCl
	0,114	%	(w/v) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	0,02	%	(w/v) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 7,4		

STEN – Puffer	50	mM	Tris (pH7,6)
	150	mM	NaCl
	2	mM	Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8.0)
	0,2	%	NP-40 (v/v)
	1	mM	PMSF
	5	µg/ml	Leupeptin
STEN/NaCl – Puffer	50	mM	Tris (pH7,6)
	500	mM	NaCl
	2	mM	Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8.0)
	0,2	%	NP-40 (v/v)
	1	mM	PMSF
	5	µg/ml	Leupeptin
STEN/SDS – Puffer	50	mM	Tris (pH7,6)
	150	mM	NaCl
	2	mM	Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8.0)
	0,2	%	NP-40 (v/v)
	0,1	%	SDS (w/v)
	1	mM	PMSF
	5	µg/ml	Leupeptin
STN – Puffer	50	mM	Tris (pH7,6)
	150	mM	NaCl
	0,5	%	NP-40 (v/v)
TE - Puffer	10	mM	Tris-HCl
	1	mM	Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8.0)
Tfb1 - Lösung : (pH 5.8)	30	mM	K-Acetat
	50	mM	MnCl <sub>2</sub>
	100	mM	RbCl
	10	mM	CaCL <sub>2</sub>
	15	%	(v/v) Gyzerin

- sterilfiltrieren -

Tfb2 - Lösung :	10	mM	Na-MOPS (pH 7.0)
	10	mM	RbCl
	15	%	(v/v) Glyzerin
	-sterilfiltrieren -		
5xLigationspuffer	250	mM	Tris-HCl (pH7.6)
	50	mM	MgCl <sub>2</sub>
	5	mM	ATP
	5	mM	DTT
	25	%	(w/v) PEG -8000
Reaktionspuffer (zellfreies Testsystem)	250	mM	Saccharose
	50	mM	KCl
	5	mM	Mg(OAc) <sub>2</sub>
	20	mM	Hepes (pH6,8)
HIS - Puffer	250	mM	Saccharose
	5	mM	Imidazol
	10	mM	Hepes (pH 6,8)
ATP regenerierendes System	10	mM	ATP
10 X Puffer	1	mM	GTP
	pH 7,0		
	80	mM	Phosphocreatin
	310	mM	Creatinphosphokinase

## 2.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biometra synthetisiert.

## 2.8 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

Alle Medien für die Bakterienkultur wurden 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die hitzelabilen Antibiotika gibt man nach Abkühlung des Mediums auf etwa 55°C mit einer Endkonzentrations von 100 µg/ml (Ampicillin), 50 µg/ml (Chloramphenicol) oder 25 µg/ml (Kanamycin) steril zu.

LB - Medium	1%	(w/v) Bakto - Tryptone
(Luria und Broth )	0.5%	(w/v)Yeast Extrakt
	0.5%	(w/v) NaCl

LB - Agarplatten	LB - Medium und Agar (15g/l)
LB - Agarplatten ( $\alpha$ -Komplementation)	Zugabe von 4 ml/l X - Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid) und 400 $\mu$ l/l IPTG (200 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O;steril filtrieren) Optional kann kurz vor Gebrauch der Agarplatten 40 $\mu$ l X -Gal und 4 $\mu$ l IPTG aus den Stammlösungen ausgestrichen werden
YT <sup>++</sup> -Medium	0.8 % Bakto - Tryptone 0.5 % Yeast Extrakt 0.5 % NaCl pH = 7.5 , ad 1l Aqua <sub>bidest</sub> Nach dem Abkühlen auf 20 mM MgCl <sub>2</sub> und 10 mM KCl bringen

## 2.9 Medien und Zusätze für die Kultivierung von Säugerzellen

Die Medien, das Trypsin, L-Glutamin, fötales Kälberserum und das Penicillin/Strepavidin – Gemisch für die Zellkultur wurden von der Firma BioWittaker bezogen.

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, mit 4, 5g/l Glucose, ohne L-Glutamin
L-Glutamin	200mM in 0,85% NaCl
Penicillin/ Strepavidin	10 000 U Penicillin/ 10 000 mcg Strepavidin
Trypsin Versene	200 mg/l EDTA, 500 mg/l Trypsin
FCS	Fötales Kälberserum

### Antibiotika für die Zellkultur

G418Sulfat	40 mg/ml aktive Substanz in PBS (PAA Laboratories)
Hygromycin B	50 mg/ml in PBS (Boehringer Mannheim)
Zeocin	100 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O (Invitrogen)
Doxycyclin	1 mg/ml in PBS als Stammlösung (Sigma)



### **3. Methoden**

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Zentrifugationsschritte in Mikrogefäßen (Eppendorf) in der Beckmann Zentrifuge Avanti-30 mit dem Rotor F3620 durchgeführt. Alle Ultrazentrifugationsschritte wurden mit den Beckmann Zentrifugen Optima TLX oder Optima LE-POK durchgeführt.

#### **3.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterienzellen**

##### **3.1.1 Anzuchtbedingungen**

Die *E.coli* Stämme XL1 Blue und JM110 wurden bei 37°C in LB - Flüssigmedium im Rundschtüttler mit 210 rpm bzw. auf LB - Agarplatten bei 37°C im Brutschrank angezogen.

##### **3.1.2 Anlegen von Glycerinkulturen**

Ein Milliliter einer Übernachtbakterienkultur wird bei 4000xg für zwei Minuten abzentrifugiert. Das Sediment nimmt man in 300 µl LB- Medium auf und gibt 60 %iges (v/v) Glycerin in einer Endkonzentration von 20 % (v/v) hinzu. Diese Bakterien können bei -20 °C oder -70°C für mehrere Monate gelagert werden.

#### **3.2 Methoden zur Kultivierung und Manipulation von Säugerzellen**

Die Kultivierung aller in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien erfolgte bei 37°C in wassergesättigter, mit 5 % CO<sub>2</sub> begaster Atmosphäre in DMEM mit 5% Glutamin, 5% Pen/Strep und 10% FCS in einem Brutschrank der Firma Haereus. Die Sedimentierung von Zellen erfolgte bei 400xg für 5 Minuten in einer Haereus Minifuge. Allgemeine Arbeitsschritte der Zellkultur wurden wie in dem Buch „Culture of Animal Cells“ beschrieben durchgeführt (Freshney, 1988).

Medien mit labilen Zusätzen wie das Antibiotikum Doxzyklin wurden maximal eine Woche verwendet oder die labilen Zusätze wurden nachträglich zugesetzt.

##### **3.2.1 Einfrieren von humanen Zellen**

Alle Zellen wurden in Vollmedium (mit FCS, ohne Antibiotika) mit 5 % DMSO zunächst über Nacht in Kryo-Boxen (Firma Nunc) bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die gefrorenen Zellen für die Langzeit-Lagerung in flüssigen Stickstoff tiefgefroren oder für die Kurzzeit-Lagerung in normale Einfrierboxen umgepackt.

### **3.2.2 Transfektion von Plasmid-DNA in humane Zelllinien**

Zur Transfektion von Plasmid-DNA in die Astrocytoma Zelllinie U373 MG wurde eine modifizierte Form der von Graham und van de Erb aufgezeichnete Methode (Graham, und van de Erb, 1973) der Kalzium Phosphat Transfektion durchgeführt (Jordan *et al.*, 1996).

Die Neuroglioma Zelllinie H4 wurde mit dem kationischen Lipid Lipofectamin der Firma Gibco/BRL nach den Angaben des Herstellers transfiziert.

### **3.2.3 Stabile Transfektion und Zellklonierung**

Nach der Transfektion von Plasmid-DNA (s. 3.2.2) in humane Zellen wurden für eine stabile Transfektion diejenigen Zellen nach 48 Stunden durch Selektion auf die Plasmid kodierte Antibiotika Resistenz isoliert, die die Plasmid-DNA stabil ins Genom integrierte hatten. Die Selektion auf stabile Integration war abgeschlossen, wenn die Zellen der Transfektion mit Kontroll-Plasmid-DNA abgestorben waren.

Zur anschließenden Zellklonierung wurden die selektionierten, rekombinanten Zellen in Medium so verdünnt, daß nach Aussaat von je 5 mal 150 µl auf eine Mikrotiterplatte (96-Well) 20-40 Zellen pro Well ausgezählt werden konnten (mehrere Verdünnungen aussäen). Durch Ermittlung des Mittelwertes der fünf Wells wurde die Zellzahl in der Ausgangsverdünnung berechnet und 1 bzw. 1,5 Zellen pro Mikrotitervertiefung in Selektionsmedium mit einer Achtkanalpipette ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die Mikrotitervertiefungen mit nur einer Zelle markiert und weiterkultiviert. Ab einer entsprechenden Zellzahl (ab 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche) wurden die Zellklone eingefroren (s 3.2.1) und zur Bestimmung des Expressionsniveaus des eingebrachten Proteins ausgesät. Die Expressionsrate wurde durch Westernblot-Analysen (s. 3.6.5) oder Immunfluoreszenzen (s 3.3) ermittelt.

## **3.3 Immunfluoreszenz mit humanen Zellen**

Zu untersuchende Zellen wurden ein Tag vor der Immunfluoreszenz auf 10 cm Kulturpetrischalen ausgesät. Zur Immunfluoreszenz wurden die Zellen zunächst intensiv zweimal mit eiskaltem PBS<sup>++</sup> und einmal mit eiskaltem PBS für je fünf Minuten gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf den Kulturschalen fixiert. Überschüssiges Paraformaldehyd wurde durch dreimaliges Waschen mit PBST entfernt. Um unspezifische Bindungen für Antikörper abzusättigen, wurden die fixierten Zellen für eine Stunde mit Blockpuffer inkubiert. Zur Antikörperinkubation wurden kleine runde Bereiche mit einem hydrophoben Stift (SCI, München) markiert, in denen dann die Bindung des ersten Antikörpers in 30 µl Blockpuffer für eine Stunde erfolgte. Durch diese Methode können gleichzeitig verschiedene Antikörper für ein Zellklon getestet werden. Nach dreimaligem Waschen der Kulturpetrischale mit PBST für je 5 Minuten erfolgte die zweite Antikörperbindung mit einen Fluoreszenzfarbstoff markierten sekundären Antikörper für eine

weitere Stunde in Dunkelheit. Die Zellen wurden wiederum dreimal für 5 Minuten mit PBST im dunkeln gewaschen. Auf jeden markierten Bereich wurde nach Zugabe von einem Tropfen Moviol ein Deckgläschen aufgelegt.

### **3.4 Metabolisches Markieren mit S<sup>35</sup>-Methionin**

Um „Puls-Chase“ Experimente und Immunpräzipitation von Proteinen mit geringer Expressionsrate durchzuführen, wurden Proteine aus Kulturzellen mit S<sup>35</sup>-Methionin markiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit Methionin freiem Medium (mit Glutamin und 10% dialysiertes FCS) für 30 Minuten ausgehungert. Die Markierung erfolgte mit 100 - 300 µCi/ml S<sup>35</sup> - Methionin für 40-90 Minuten in Methionin freiem Medium.

Zur Bestimmung von sekretiertem A $\beta$  wurde der Zellkulturüberstand abgehoben und für 5 Minuten bei 14 000xg zentrifugiert. Der Überstand konnte dann in einer Immunpräzipitation eingesetzt werden (s. 3.6.2).

### **3.5 Methoden zur Herstellung rekombinanter Plasmide**

#### **3.5.1 Präparation von Plasmid-DNA**

##### **3.5.1.1 Großisolierung von Plasmid-DNA**

Die Isolierung reiner Plasmid-DNA für die Sequenzierungen und die Subklonierungen wurden mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kit durchgeführt (Qiagen, Hilden). Dabei schließt man die Bakterienzellen nach der Methode der alkalischen Lyse auf (Birnboim and Doly, 1979) und isoliert die Plasmid-DNA über eine Affinitätssäule (Weber et al., 1995). Dazu wird eine Einzelkolonie, die das entsprechende Plasmid beinhaltet, morgens in 3 ml LB Flüssigmedium angeimpft. Abends wird diese Vorkultur logarithmisch wachsender, rekombinanter Bakterien zum Animpfen von 500 ml Selektionsmedium (mit entsprechendem Antibiotikum) eingesetzt. Morgens werden die Bakterien für 10 Minuten mit 4000xg bei 4°C sedimentiert und anschließend die Plasmid-DNA entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Durch eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt man die Ausbeute an Plasmid-DNA, wobei eine optischen Dichte von 1,0 annähernd einer DNA Menge von 50 µg/ml entspricht.

##### **3.5.1.2 Schnellisolierung von Plasmid-DNA**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA für Restriktionsanalysen wurde eine modifizierte alkalische Lyse durchgeführt (Birnboim and Doly, 1979). Dazu wird eine Einzelkolonie in 3 ml LB Selektionsmedium angeimpft und bei 37°C ü/n auf dem Rundschüttler (Infors AG CH4103) mit 180 UpM geschüttelt.

Morgens werden die Bakterien bei 4000xg für 10 Minuten bei 4°C sedimentiert. Nach dem Resuspendieren der Bakterien in 100 µl P1- Puffer (50 mM Tris –HCl pH8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml Rnase A) wird zum Aufschluß der Zellen 100 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zugegeben. Nach 5 Minuten wird das lysierte Gemisch mit Puffer P3 (3,0 M NaAcetat, pH 5,5) neutralisiert. Die denaturierten Proteine werden anschließend für 30 Minuten bei 20 000xg bei 4°C vom Überstand abgetrennt. Die DNA in diesem wässrigen Überstand wird durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und sofort bei 14000xg für 30 Minuten bei 4°C sedimentiert. Nach dem Waschen der DNA mit 70% Ethanol und anschließender Zentrifugation wie oben beschrieben, wird die DNA getrocknet und in TE-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **3.5.2 Isolierung von DNA-Fragmenten**

#### **3.5.2.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese eignet sich zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA Molekülen im Bereich von 100 bp bis 20 kb. Die Agarose Konzentration wird nach der Größe der zu trennenden DNA Fragmenten gewählt. Die Standard- Konzentration von 1% Agarose wurde bei DNA Fragmenten zwischen 700 bp und 10 kp eingesetzt. Die Agarose wird in TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlung auf 65°C gibt man Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 0,5 µg/ml) hinzu. Die DNA-Proben werden vor dem Auftragen mit 6 X Probenpuffer versetzt und bei 5 V/cm mit TAE-Puffer als Laufpuffer aufgetrennt. Bei präparativen Gelen wurde die DNA durch UV Licht mit 302 nm Wellenlänge, gegenüber 280 nm bei analytischen Gelen so kurz wie möglich visualisiert.

#### **3.5.2.2 DNA-Isolierung aus Agarosegelen**

Zur DNA - Isolierung aus Agarosegelen diente das ‘Qiaex gel extraction Kit’ (Qiagen, Hilden). Das Prinzip beruht auf der Auflösung der Gelmatrix durch NaJ/NaClO<sub>4</sub>- Lösung. Anschließend läßt sich die DNA unter hohen Salzkonzentrationen an Kunststoffpartikel binden, von denen man sie mit Niedersalzpuffern oder mit Wasser eluieren kann (Vogelstein and Gillespie, 1979). Die Elution mit Wasser bietet den Vorteil, daß ein größeres Elutionsvolumen in einer Vakuumapparatur eingeeengt werden kann. Die so behandelte DNA läßt sich in einer Ligation verwenden.

### **3.5.3 Enzymatische Modifikation von DNA-Fragmenten**

#### **3.5.3.1 Restriktionspaltungen und Dephosphorylierung von Plasmiden**

Plasmide für die Ligation wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen, Restriktionspuffer (eventuell RNase [500 µg/ml]) bis auf ein Endvolumen von 10 µl mit autoklaviertem Wasser aufgefüllt

und für eine Stunde bei der entsprechenden Temperatur gespalten. Um eine Rezirkulation der Plasmide in der Ligation zu verhindern, werden die Plasmidenden mit der alkalischen Phosphatase (1U CIAP/Ansatz) für 40 Minuten im jeweiligem Restriktionsansatz dephosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 100 mM EDTA gestoppt und das Enzym bei 70°C für 10 Minuten inaktiviert. Anschließend wurden die Plasmide über die Agarosegelelektrophorese von ungeschnittenen Plasmidmolekülen getrennt und über das 'Qiaex gel extraction Kit' wieder isoliert (s.3.5.2.2).

### **3.5.3.2 Glätten überstehender Einzelstrangenden**

Zur Erzeugung von glatten Enden wurde DNA nach einem Restriktionsverdau mit 5 µl 10xT4 Polymerase Puffer, 1µl BSA-Lösung (NEB), 2µl dNTP's (2,5 mM), 1µl T4 DNA Polymerase(3U/µl) für 15 Minuten bei 11 °C inkubiert. Die so behandelte DNA wurde wie unter 3.5.3.3 beschrieben aufgereinigt und konnte in einer Ligation eingesetzt werden.

### **3.5.3.3 Restriktionspaltung von PCR - Produkten**

PCR-Produkte wurden vor einem Restriktionsverdau entweder mit dem 'QIAquick PCR Purification Kit' aufgereinigt (Vogelstein and Gillespie, 1979) oder durch eine Fällung isoliert. Dabei gibt man 1/10 Volumen 2,5 M NaAcetat/2,5 M KAcetat und das dreifache Volumen an eiskaltem Ethanol zum PCR-Ansatz. Nach dem Vortexen inkubiert man die Fällung zunächst für 15 Minuten bei -20 °C und zentrifugiert den Ansatz anschließend 10 Minuten bei 15000xg und 4°C. Der Überstand wird abdekantiert und das Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen. Die gefällte DNA wird in der Vakuumapparatur getrocknet und in bidestilliertem Wasser aufgenommen. Die Restriktion erfolgt mit 1/10 Volumen 10X Restriktionspuffer und 0,2 U der Restriktionsendonuklease in 10 µl für eine Stunde bei der jeweiligen Temperatur. Der gesamte Restriktionsansatz wird in einem Agarosegel aufgetrennt und die entsprechende Bande isoliert (s.3.5.2).

### **3.5.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten**

In einem 10 µl Gesamtansatz einer bimolekularen Ligation werden 10 ng dephosphorylierter Vektor-DNA mit 2-3 fachem molarem Überschuß an Passagier -DNA und 1/5 Volumen 5 X Ligationspuffer gemischt. Die Ligation erfolgt über Nacht mit 0,5 U T<sub>4</sub>-DNA-Ligase bei 15-17 °C. Bei einer 'blunt-end' Ligation wird nach ca. 6 Stunden erneut 0,5 U T<sub>4</sub>-DNA-Ligase hinzugegeben.

Zur Rezirkularisierung von DNA-Molekülen wird mit 0,1-1ng DNA bei Raumtemperatur für 3 Stunden ligiert (King und Blakesley ; 1986).

### 3.5.4 Rekombination mit modifizierten DNA - Fragmenten

#### 3.5.4.1 Präparation transformations-kompetenter Zellen

Die angewandte Methode wurde nach Anlehnung an eine modifizierte Form der Douglas Hanahan Methode (Hanahan, 1983) durchgeführt. Dabei behalten die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten kompetenten Zellen mehrere Monate ihre Kompetenz. Alle Bakterien-Kultivierungen wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Rundschtüttler bei 210 rpm durchgeführt. Eine Einzelkolonie wird mit 2 ml  $\text{YT}^{++}$ -Medium als Übernachtskultur inokuliert, die dann ihrerseits als Starterkultur 1:100 mit frischem  $\text{YT}^{++}$ -Medium versetzt wird. Diese Vorkultur wird bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (ca. 2 Std.) inkubiert. Danach impft man die gesamten 5 ml in 100 ml frisches  $\text{YT}^{++}$ -Medium über und kultiviert diese bis zu einer optischen Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) von 0.5. Die Kultur wird sofort in einem Eiswasserbad für 5 Minuten abgekühlt. Nach dem Verteilen auf gekühlte 50 ml Zentrifugenröhrchen beläßt man sie weitere 5 Minuten auf Eis und sedimentiert sie anschließend für 8 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $4000\times g$ . Die Zellen werden in 10 ml eiskalter Tfb1-Lösung durch vortexen resuspendiert (Kühlraum!) und 10 Minuten im Eiswasserbad behalten. Nach erneutem Sedimentieren (s.o.) wird das Bakterienpellet aus je 50 ml Ausgangskultur in 2 ml Tfb2-Lösung wieder durch vortexen resuspendiert (Kühlraum !). Das Aliquotieren erfolgt mit vorgekühlten Pipetten im Kühlraum. Dabei werden jeweils 100  $\mu\text{l}$  der Resuspension in Mikrogefäße pipettiert und so schnell wie möglich in einem Ethanol/Trockeneisbad schockgefroren. Die kompetenten Zellen werden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.5.4.2 Transformation mit Ligationsansätzen

(modifiziert nach Mandel and Higa, 1970)

Zu 100  $\mu\text{l}$  aufgetauten kompetenten Zellen gibt man die Hälfte des Ligationsansatzes. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgt ein Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 45 Sekunden. Die Bakterienzellen werden weitere 2 Minuten auf Eis belassen und anschließend mit 900  $\mu\text{l}$  LB-Medium gemischt. Der Ansatz wird für 60 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit 210 rpm geschüttelt. Durch Zentrifugation bei  $4000\times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 2 Minuten werden die Zellen sedimentiert. Sie werden mit 100  $\mu\text{l}$  Rücklauf wieder resuspendiert und sofort auf Selektionsagarplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgt über Nacht im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.5.4.3 Analyse rekombinanter Bakterienklone

Rekombinante Bakterienklone, die über Nacht zu Kolonien herangewachsen sind, werden in Selektionsflüssigmedium überimpft. Nach 12 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf dem Rundschtüttler mit 210 rpm können die Plasmide aus den Bakterienzellen isoliert werden (siehe 3.5.1). Positive Bakterienklone werden mit Hilfe einer Größenbestimmung der in den Vektor einligierten Fragmente durch

entsprechenden Restriktionsverdau und anschließende Auftrennung in einem Agarosegel identifiziert (siehe 3.5.2).

### 3.5.5 DNA - Sequenzierung

DNA Sequenzen wurden von der Firma Medigenomix (Martinsried) durchgeführt

## 3.6 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

### 3.6.1 Quantitative Proteinbestimmung

(Schmith *et al.*, 1985)

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen wurde mit dem BCA Protein Assay Kit von der Firma Pierce nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde Rinderserumalbumin als Standard verwendet.

### 3.6.2 Immunpräzipitation von Proteinen

Bei Immunpräzipitationen, die zum ersten mal durchgeführt wurden oder bekanntermaßen unspezifische Bindungen auftraten, wurden die Zellysate mit je 10  $\mu$ l Sepharosebeads für 30 Minuten präadsorbiert. Zu den Zellysaten wurden die entsprechenden Antikörper zugegeben und für mindestens eine Stunde bei 4°C auf einen Kippschüttler inkubiert. Für die A $\beta$  Immunpräzipitationen wurde dieser Schritt weggelassen, da keine unspezifische Bindung von Proteinen erfolgte. Zu jedem Immunpräzipitationsansatz wurde 20  $\mu$ l gewaschene Sepharose zugegeben und wie oben mindestens eine Stunde inkubiert. Der Sepharose-Immunkomplex wurde bei 500x sedimentiert und dreimal mit STN-oder STEN- Puffer 5 Minuten gewaschen. Der Immunkomplex wurde durch Zugabe von Ladepuffer der entsprechenden Polyacrylamid-Geltrennverfahren von der Sepharose abgelöst und beide wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 10000xg von einander getrennt.

#### 3.6.2.1 Immunpräzipitation zur intra- und extrazellulären Bestimmung von A $\beta$

Da die Bildung von A $\beta$  von Kulturzellen selbst bei rekombinanten Zellen, die einen Vorläufer des A $\beta$ s (APP, C99) exprimieren, gering ist, mußte für eine Analyse das A $\beta$  durch eine Immunpräzipitation aus Zellkulturüberständen oder Zellysaten angereichert werden.

Zum Nachweis von sekretiertem A $\beta$  aus Zellkulturüberständen wurde zunächst eine metabolische Markierung von Proteinen mit radioaktivem S<sup>35</sup>-Methionin durchgeführt (s. 3.4). Die Präparation von Zellysaten zur Bestimmung von intrazellulärem A $\beta$  wurde bei der metabolischen Markierung mit S<sup>35</sup>-Methionin mit Detergenz und bei der nicht radioaktiven Immunpräzipitation in Verbindung mit einem hoch sensitiven Westernblot ohne Detergenz durchgeführt.

Zur Präparation von Zellysaten mit Detergenz wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 500 µl (für 10 cm Petrischale) PBS abgeschabt. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit 500 X g bei 4°C sedimentiert. Die Zellen wurden in 500 µl STEN-Puffer mit 1 % NP-40 (Endkonzentration) aufgenommen und durch Vortexen resuspendiert. Der Ansatz wurde für zwanzig Minuten auf Eis gestellt und alle 5 Minuten gemischt. Die Zellkerne und Zelltrümmer wurden bei 10 000xg für 10 Minuten abgetrennt. Der Überstand ist das detergenzhaltige Zellysat und kann so in die Immunpräzipitation eingesetzt werden. Eine Ausnahme bildeten die Membranen der SIII-Fraktion aus H4-LC99 Zellen, die für die zellfreie Inkubation eingesetzt wurden. Vor einer Immunpräzipitation wurden die Ansätze auf 2 % SDS (Endkonzentration) eingestellt und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Zellysate ohne Detergenz wurden wie bei der Präparation eines Post - Nukleären - Überstandes (PNS) für H4-Zellen beschrieben durchgeführt (s.3.8.1).

Die Immunpräzipitationen wurden wie in 3.6.2 beschrieben durchgeführt. Mit der einzigen Ausnahme, daß die Antikörper jeweils über Nacht mit der Sepharose und dem Zellysat inkubiert worden waren.

### **3.6.2.2 Immunpräzipitation der Preseniline**

Zur Immunpräzipitation der Preseniline wurden Zellysate mit Detergenz (s. 3.6.2.1) hergestellt. Die Immunpräzipitation wurde wie unter 3.6.2 beschrieben durchgeführt. Eine Ausnahme bildete das stringente Waschen des Sepharose-Immunkomplexes, um unspezifische Bindungen so gering wie möglich zu halten. Der Komplex wurde zunächst mit STEN-Puffer, dann mit STEN/NaCl-Puffer und schließlich mit STEN/SDS-Puffer jeweils für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen.

### **3.6.3 Vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese**

#### **Tris-Glycin Gele**

(Laemmli, 1970; teilweise modifiziert)

Alle Tris-Glycin Gele wurden mit den Gelapparaturen der Firma Biorad durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in zwei unterschiedlichen Puffersystemen, die man als Trenn - und Sammelgel bezeichnet. Zur Herstellung der Gele wurde von einer 30 %igen Acrylamid-Stammlösung (27,5%T; 3%C) ausgegangen. Eine Auftrennung der Proteine in diesem System ist, je nach Prozentigkeit des Trenngels zwischen 14 und 200 kDa möglich. Standardmäßig wurde dieses System für den Nachweis des Amyloid-Precursor Proteins (120 kDa) und in Verbindung mit 4M Harnstoff im Trenngel auch für den Nachweis der Preseniline und deren Fragmenten verwendet.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit gleichem Volumen 2x Laemmliprobenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Eine Ausnahme bildete der Nachweis der Preseniline und deren Fragmenten. Dabei wurden die Proben vor dem Gelauftrag nur bei 42 °C für 10 Minuten inkubiert, um



die Aggregation der hydrophoben Preseniline zu verhindern. Ternn- und Sammelgele wurden wie folgt pipettiert :

<b>Trenngel</b>	7 %	8 %	10 %	12 %	15 %
30% Acrylamid	5,6 ml	6,4 ml	8,0 ml	9,6 ml	12 ml
5 X Gel-Puffer	4,8 ml	4,8 ml	4,8 ml	4,8 ml	4,8 ml
H <sub>2</sub> O/8M Urea	13,4 ml	12,6 ml	11 ml	9,6 ml	7,2 ml
10 % AMPS	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

<b>Sammelgel</b>	
30% Acrylamid	0,66 ml
2 X Gel-Puffer	2,5 ml
H <sub>2</sub> O/8M Urea	1,8 ml
10 % AMPS	50 µl
TEMED	10 µl

### Tris-Tricine Gele

(Schägger und Jagow, 1987)

Die Methode des Tris-Tricine Gelsystems erlaubt eine Auftrennung von Proteinen zwischen 1 und 100 kDa. Der besondere Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, kleine Proteine zwischen 1 und 20 kDa hoch auflösend zu trennen. Die Methode basiert auf einem dreiphasigen Gelaufbau mit Sammelgel, „Spacergel,, und Trenngel, wobei Tricine als „trailing,-Ion verwendet wird. Es wurde von Polyacrylamid-/Bisacrylamid Stammlösungen mit 49,5%T / 6%C und 49,5%T / 3%C ausgegangen. Dieses System wurde standardmäßig für den Nachweis der kleinen Peptide Aß (4kDa) und P3 (3kDa) benutzt. Dazu wurde das optionale „Spacergel,, verwendet und kein Urea im Trenngel benötigt. Die Einzelkomponenten wurden wie folgt zusammengegeben :

	<b>Sammelgel</b> 4% T, 3% C	<b>„Spacergel,,</b> 10% T, 3% C	<b>Trenngel</b> 16,5% T, 6% C
	Sammelgel	„Spacergel,,	Trenngel
49,5%T / 3%C	1 ml	6,1 ml	-
49,5%T / 6%C	-	10 ml	10 ml
Gelpuffer 2X	3,1	10 ml	10 ml
Glycerin	-	-	4 g
Endvolumen (add mit ddH <sub>2</sub> O)	12,5	30 ml	30 ml

### Tris-Bicine Gele

(Klafki *et al.*, 1996)

Alle Tris-Tricine und Tris-Bicine Gele wurden mit Apparaturen der Firma Hoefer durchgeführt.

Die Methode des Tris-Bicine Gelsystems wurde entwickelt, um die beiden in der Alzheimer Erkrankung relevanten A $\beta$  Spezies mit 40 und 42 Aminosäuren (siehe Einleitung) von einander getrennt in einer Probe nachzuweisen. Auch diese Methode basiert wie die Tris-Tricine Methode auf einem dreiphasigen Trennvorgang mit Sammelgel, „Spacergel und Trenngel, wobei diesmal Bicine als „trailing,-Ion fungiert. PH-Werte der Pufferkomponenten wurden nur durch Zugabe von vorgegebenen Mengen an Säure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) bzw. Base (NaOH) eingestellt (siehe Material). Nach dem Auftragen der Proben wurden die Proteine zunächst für 10 Minuten bei 12 mA pro Gel langsam in das Sammelgel laufen gelassen. Danach wurde die Stromstärke auf 24 mA pro Gel erhöht. Der Gellauf wurde beendet, sobald der Bromphenolblaumarker als Lauffront aus dem Gel herauslief (ca. 3 Stunden). Die Einzelkomponenten des Gels setzen sich wie folgt zusammen :

	<b>Sammelgel</b>	<b>„Spacergel,,</b>	<b>Trenngel</b>
Gelpuffer	1,5 ml	1 ml	2,5 ml
PAA37,5%T,3%C	563 $\mu$ l	300 $\mu$ l	3,75 ml
Harnstoff	-	-	4,8 g
10 % SDS	30 $\mu$ l	20 $\mu$ l	100 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	876 $\mu$ l	670 $\mu$ l	-
10% AMPS	24 $\mu$ l	8 $\mu$ l	40 $\mu$ l
TEMED	3 $\mu$ l	2 $\mu$ l	5 $\mu$ l

### **3.6.4 Coomassie-brilliantblue Färbung**

Die Polyacrylamidgele wurden für eine Stunde in einer Petrischale mit Färbelösung auf dem Rundschüttler bei 40 rpm inkubiert. Zur sukzessiven Entfärbung des blauen Hintergrundes wurde entweder 2-3 Stunden mit wechselnder Entfärberlösung gewaschen oder das Gel über Nacht in Entfärberlösung unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Gele fotografiert und getrocknet.

### **3.6.5 Silberfärbung**

Das Polyacrylamidgel wird zum Fixieren der Proteine 3 mal 20 Minuten mit 50% Ethanol gewaschen. Anschließend wird die Vorbehandlungslösung auf dem Gel für eine Minute bei Raumtemperatur einwirken lassen. Überschüssige Lösung wird durch dreimaliges Waschen für zwanzig Sekunden mit bidestilliertem Wasser entfernt. Nach dieser Vorbehandlung beginnt die Färbung durch eine zwanzigminütige Inkubation mit Färbelösung. Wiederum wird überschüssige Färbelösung durch dreimaliges Waschen für zwanzig Sekunden mit bidestilliertem Wasser entfernt. Es schließt sich die Entwicklung an, in der das Gel mehrmals mit Entwicklerlösung unter Schütteln inkubiert wird, bis eine ausreichende Bandenintensität erreicht ist. Die Entwicklung wird durch Zugabe von Stopplösung beendet. Das Gel kann dann in Stopplösung aufbewahrt werden.

### **3.6.6 Westernimmunblot**

Der Proteintransfer von Polyacrylamidgelen auf PVDF- oder Nitrocellulose-Membranen wurde mit der Tankblotapparatur TE22 von Hoefer durchgeführt.

#### **3.6.6.1 Transfer und Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen**

Zum Nachweis der aufgetrennten Proteine im Polyacrylamidgel wurden diese zunächst auf einer hydrophoben PVDF-Membran mit 0,45 µm Porendurchmesser (Polyscreen NEN Life Science) für eine Stunde bei 400 mA im Tankblot-Verfahren transferriert. Während des Transfers wurde der Puffer durch eine Wasserkühlung gekühlt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsmöglichkeiten der Membran mit Blockpuffer für eine Stunde abgesättigt. Der Nachweis der Proteine beruht letztendlich auf der Chemilumineszenz des Substrates Luminol, daß durch die Aktivität einer Peroxidase, die an dem sekundären Antikörper konjugiert ist, umgesetzt wird. Diese Nachweise wurden mit dem Western ECL-Kit der Firma Amersham nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **3.6.6.2 Transfer und Nachweis von A $\beta$ auf Nitrocellulose Membranen**

A $\beta$  wurde aus Zellkulturüberständen oder aus Zellysaten von Zellen, die mit Vorläufer-Proteinen des A $\beta$ 's (APP oder LC99) stabil transfiziert wurden, durch Immunpräzipitation angereichert (s. 3.6.2.1)

und anschließend für 45 Minuten im Tankblot-Verfahren (20% Methanol im Transferpuffer) unter Wasserkühlung auf eine Nitrocellulose Membran (ECL-Membran Amersham) transferriert. Die Proteine der rekombinanten Zellen wurden vor dem Nachweis von A $\beta$  entweder metabolisch mit S<sup>35</sup>-Methionin markiert (s. 3.4.) oder nicht radioaktiv in einem hochsensitiven Westernblot nachgewiesen (Klafki *et al.*, 1996). Dabei wurde die nicht radioaktive Methode bevorzugt.

Dazu wurde die Nitrocellulose-Membran nach dem Transfer der Proteine sofort für 5 Minuten in kochendes PBS inkubiert und danach für 45 Minuten mit Blockpuffer abgesättigt. Der Nachweis von A $\beta$  erfolgte durch die Bindung der monoklonalen Antikörper 6E10 (anti A $\beta$  1-16; Senetek) und 4G8 (anti A $\beta$  16-28, Senetek) in Verbindung mit einem mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-Maus IgG Antikörper. Als Chemilumineszenzsubstrat für die alkalische Phosphatase wurde CDP-Star der Firma Tropix verwendet. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zur ECL-Methode liegt in der lang andauernden Emmission von Licht (mehrere Stunden), wodurch die Nachweisgrenze von 10 pg A $\beta$  im Westernblot erreicht werden konnte.

### **3.7 Biochemische Arbeitsmethoden**

#### **3.7.1 Fraktionierung von Meerschweinchengewebe**

Alle Arbeitsschritte der Fraktionierung des Gewebes wurden strikt auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Rotoren für die Ultrazentrifugation wurden vorgekühlt.

##### **3.7.1.1 Leberfraktionierung**

Um einen Milliliter hochreiner Golgimembranen aus Lebergewebe zu erhalten, wurde eine Leber eines etwa 250 g schweren Meerschweinchen präpariert. Alle Arbeiten dazu wurden wie in Taylor *et al.* beschrieben durchgeführt (Taylor *et al.*, 1997). Zunächst wurde das Meerschweinchen durch Dekaptieren mit einer Guillotine getötet und so schnell wie möglich die Leber entnommen. Diese wurde auf einer gekühlten Petrischale mit einem Skalpell in kleine Teile zerschnitten und in ein 50 ml Röhrchen (Falcon) zur Bestimmung des Feuchtgewichtes überführt. Die zerschnittene Leber wurde in 6g / 10ml 0.5 M KPi-Puffer (0,5 M Saccharose, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6,8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, und Proteaseinhibitoren: Aprotinin, Leupetin, Pefabloc, Pepstatin) aufgenommen. Alle für den Stufengradienten verwendeten Saccharose - Lösungen beinhalteten die gleichen Pufferkomponenten und Proteaseinhibitoren.

Das Lebergewebe wurde mit einem Ultrathoraxgerät (Polytron, Stufe 3) für 30 Sekunden homogenisiert. Um eine möglichst schonende Homogenisierung zu erreichen, wurde der Ultrathoraxstab vom Boden bis zum Rand in nur eine Richtung bewegt. Danach wurde das Homogenat, um Zellkerne, Zellbruchstücke und nicht aufgeschlossene Zellen zu sedimentieren, so schnell wie möglich in Corex-Röhrchen

(Beckmann) bei 1500xg für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der so erhaltene Post-Nukleäre-Überstand (PNS) wurde in die Mitte eines Saccharose-Stufengradienten aufgetragen (siehe Abb.11). Der Stufengradient wurde in einem Sw41 Ti - Rotor (Beckmann) bei 100 000xg für 1,5 Stunden bei 2°C zentrifugiert.

Die Fraktionen nach der Zentrifugation wurden mit einer abgeschnittenen 1 ml Spitze von oben nach unten fraktionsweise abgenommen. Die erhaltene SII-Fraktion wurde für den zweiten Stufengradienten mit Hilfe eines Refraktometers und einer 2 molaren Saccharose-Stammlösung auf 1,15 M Saccharose eingestellt. Die so eingestellte SII-Fraktion wurde auf den Boden eines neuen Zentrifugenröhrchens gegeben und mit gleichen Volumina (etwa 4 ml) an 1.0 , 0.86 und 0.25 M Saccharose-Lösung überschichtet. Der zweite Gradient wurde für 3,5 Stunden bei 76 000xg und 2°C zentrifugiert (siehe Abb.6). Die Fraktion zwischen der 0.86 M und 0.25 M Saccharose ist die „stacked Golgi fraction“ (SGF1).

### **3.7.1.2 Fraktionierung von Cortex und Hippocampus**

Zur Präparation von Golgimembranen aus Cortex und Hippocampus von Meerschweinchen wurden je Ansatz 6 Meerschweinchen durch Dekaptieren mit der Guillotine getötet. Der Cortex und Hippocampus wurden wie die Leber auf gekühlten Glaspetrischalen präpariert. Alle Homogenisierungs- und Fraktionierungs-Schritte wurden analog der beschriebenen Leberfraktionierung durchgeführt.

### **3.7.1.3 Verteilung von Markerenzymen im Saccharose-Stufengradienten**

Um festzustellen, in welchen Fraktionen die Membranen einzelner Kompartimente der Zelle angereichert wurden und ob in der Golgifraktion (SGF1) aus der Leberfraktionierung tatsächlich Golgimembranen angereichert wurden, wurden Enzymaktivitäten von Markerenzymen der einzelnen Kompartimente wie Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Golgi-Apparat bestimmt. Unterstützend dazu wurden verschiedene „Markerproteine“ einzelner Kompartimente auch durch Westerimmunblots über spezifische Antikörper nachgewiesen (s. 3.6.6).

Die Enzymaktivitäten für charakteristische Golgiproteine wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dieter Jeckel, Biochemie der Universität Heidelberg durchgeführt. Die einzelnen Enzymaktivitäten wurden wie beschrieben bestimmt: Galaktosyltransferase und Esterase (Beaufay *et al.*, 1974); Glykosylceramidsynthase und Sphingomyelinsynthase (Jeckel *et al.*, 1992).

## **3.8 Komponenten des zellfreien $\gamma$ -Sekretase Testsystems**

### **3.8.1 Mikrosomenfraktion aus H4-LC99 Zellen**

Die Expression der C-terminalen 99 Aminosäuren des APP's fusioniert mit dessen N-terminaler

Signalsequenz (LC99) wird durch dreitägigen Entzug von Doxyzyklin im Medium induziert. Die Zellen werden zur Bereitung einer Mikrosomenfraktion auf 15 cm Kulturschalen (Gibco/BRL) ausgesät. Für die Zellyse werden die Zellen zunächst drei mal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS von den Kulturschalen abgeschabt und für 5 Minuten bei 500xg und 4°C sedimentiert. Nach vorsichtigem Resuspendieren der Zellen im HIS-Puffer werden die Zellen wie oben beschrieben sedimentiert. Nach erneutem resuspendieren in HIS<sup>+</sup> Puffer werden die Zellen 3-8 mal durch eine Kanüle gedrückt (G22 Nadel, 1 ml Primospitzen). Der Zellaufschluß kann durch Phasenkontrast-Mikroskopie kontrolliert werden. Aus dem Zellhomogenat werden die Zellkerne durch Zentrifugieren bei 4°C, 1500xg für 10 Minuten abgetrennt. Der Überstand (PNS) wird auf einen Saccharose-Stufengradienten (s. 3.7.1) aufgetragen. Im Unterschied zu der Anreicherung von Golgimembranen aus der Leber von Meerschweinchen mußte das Zellysat aus H4-LC99 Zellen vor dem Auftrag auf den Gradienten auf 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mit einer 0.4 M Stammlösung gebracht werden.

Die Fraktion zwischen 0.86 M und 1.3 M Saccharose ist die Interphase III (SIII-Fraktion; Mikrosomenfraktion) und wird mit KPi Puffer (100 mM KPi pH 6,8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) auf 250 mM Saccharose verdünnt. Die Membranen der SIII-Fraktion wurden bei 200 000xg und 4°C für 20 Minuten sedimentiert. Anschließend wurden sie mit Reaktionspuffer im Douncer homogenisiert und wie oben sedimentiert. Die Membranen wurden erneut homogenisiert s.o. und zu 100 µl in flüssigem Stickstoff aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### **3.8.2 Präparation von Cytosol aus Meerschweinchenleberzellen**

PNS aus der Leber eines Meerschweinchens wurde wie beschrieben durch Homogenisieren und Zentrifugieren gewonnen (s. 3.7.1). Dieser Überstand wurde über den beschriebenen Saccharose-Stufengradienten fraktioniert. Die Fraktion B (zwischen 0.86 M und 0.5 M Saccharose) wurde mit 1 X KPi-Puffer auf 250 mM Saccharose verdünnt und die Membranen bei 200 000xg und 4°C für 20 Minuten sedimentiert. Der Überstand ist das Cytosol (Jones *et al.*, 1998).

### **3.8.3 Präparation von Cytosol aus humanen Neurogliomazellen**

H4 Neurogliomazellen wurden auf 15 cm Kulturschalen ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz für die Präparation von Cytosol eingesetzt. Pro Ansatz wurden dazu 25 Kulturschalen benötigt. PNS wurde wie zur Herstellung der Mikrosomenfraktion (s.3.8.1) hergestellt. Dieses PNS wurde für eine Stunde bei 100 000xg bei 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand ist das Cytosol.

### **3.8.4 Stringentes Waschen der Mikrosomenfraktion**

Die von H4-LC99 Zellen durch Saccharosedichte-Zentrifugation gewonnene Mikrosomenfraktion SIII (s. 3.8.1) wurde zum Entfernen von membranassoziierten Proteinen mit Hochsalzpuffer oder NaCO<sub>3</sub> -

Puffer behandelt. Die behandelten Membranen wurden danach zur Aktivitätsbestimmung der  $\gamma$  - Sekretase wieder im Zell freien Testsystem eingesetzt.

Zur Behandlung mit Hochsalz wurde die sedimentierte Mikrosomenfraktion SIII in Hochsalzpuffers (1 M KCl, 250 mM Saccharose, 20 mM Hepes pH6,8) mit Hilfe eines Douncers homogenisiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert.

Zur Extraktion mit NaCO<sub>3</sub> wurde die sedimentierte Mikrosomenfraktion SIII in eiskalte 100 mM NaCO<sub>3</sub> Lösung pH 11,5 mit dem Douncer homogenisiert und für 30 Minuten bei 0°C inkubiert (Fujiki *et al.*, 1982).

Die KCl und NaCO<sub>3</sub> behandelten Membranen wurden bei 220 000xg für eine Stunde bei 4°C sedimentiert. Anschließend wurden sie vorsichtig mit eiskaltem bidestilliertem Wasser gewaschen und in Reaktionspuffer homogenisiert. Die äquilibrierten Membranen wurden wie oben sedimentiert und erneut in Reaktionspuffer mit dem Douncer homogenisiert. Danach wurden sie, so schnell wie möglich, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Die Membranen wurden bis zum Gebrauch im -80°C Schrank gelagert.

### 3.8.5 Inkubation der mikrosomalen Membranen

Die Mikrosomen aus H4-ind-LC99 Zellen wurden wie beschrieben hergestellt und zu 100µl Aliquots bei -80°C gelagert (s.3.8.1). Vor jeder Inkubation wurden die Membranen auf Eis aufgetaut. Ein Volumen, das je 30 µg Gesamtprotein entspricht, wurde mit Reaktionspuffer auf 30 µl aufgefüllt und unter Standardbedingungen (pH6,8; 5 mM EDTA; 4 Stunden) bei 37°C in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf) auf einem Eppendorf Thermomixer bei Stufe 10 geschüttelt. Nach der Inkubation wurde der gesamte Ansatz auf 2% SDS eingestellt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Der denaturierte Ansatz wurde auf 1 ml mit IP Puffer (Vollmedium, DMEM mit 10% FCS) aufgefüllt und das A $\beta$  über Nacht durch die spezifischen Antikörper 6E10/4G8 (Galli *et al.*, 1998) oder BI.40/BI.42 und Sepharose G immunpräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden in einem Tris-Bicine Gelsystem (s.3.6.3) aufgetrennt und danach auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (45 Minuten; 385 mA; Hoefer Tankblotkammer). A $\beta$  wurde anschließend in einem hochsensitiven Westernblot mit den Antikörpern 6E10/4G8 nachgewiesen (Ida *et al.*, 1996).

## 4. Ergebnisse

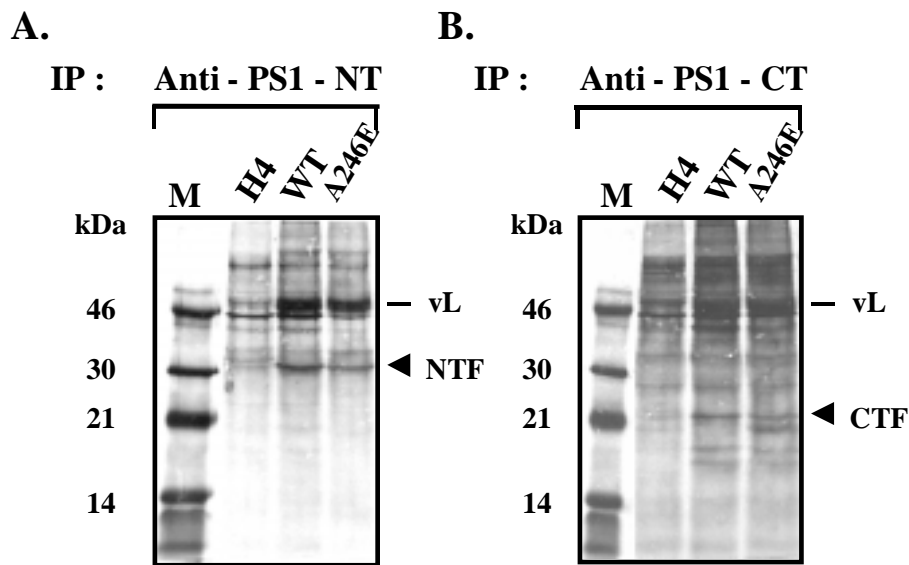
### 4.1 Intrazelluläre Lokalisierung der Preseniline und Interaktion mit C- terminalen Fragmenten des APP

#### 4.1.1 Expression von Presenilin 1 Wildtyp und FAD-Mutante (A246E) in humanen Neuroglioma-Zellen (H4)

Um funktionelle Analysen von Proteinen in Zellkulturen machen zu können, reichen oft endogene Expressionsniveaus nicht aus, so daß die zu untersuchenden Proteine, in diesem Fall die Preseniline, in Zellen überexprimiert werden. An diesen gentechnisch veränderten Zellen lassen sich Untersuchungen wie Lokalisierung, Metabolismus sowie die Identifizierung von Interaktionspartnern der Proteine mit einfachen molekularbiologischen und biochemischen Methoden durchführen. Es wurden H4 Zellen für diese Experimente verwendet, da sie humanen Ursprungs sind und erste Ergebnisse von Untersuchungen über die Stoffwechselwege der Preseniline in diesen Zellen bereits vorlagen (Kim *et al.*, 1997). Das endogene Expressionsniveau des PS-1 in verschiedenen humanen Zellkulturzellen reicht aus, um in den Zellysaten die N- und C-terminalen Fragmente des PS-1 (s. Einleitung) in einem einfachen Westernblot nachzuweisen (Thinakaran *et al.*, 1997; Borchelt *et al.*, 1997). Das Holoprotein des PS-1 dagegen ist einer so schnellen, regulierten proteolytischen Prozessierung unterworfen (Borchelt *et al.*, 1997, Podlinsky *et al.*, 1997, Baumann *et al.*, 1997, Steiner *et al.*, 1998), daß bei endogener Expression oder einer geringen Überexpression das Gleichgewicht zwischen Gesamtprotein und Fragmenten deutlich auf der Seite der proteolytischen Fragmente liegt. Da eine starke Überexpression der Preseniline jedoch toxisch für H4-Zellen ist (Borcholt *et al.*, 1997; Tanzi *et al.*, 1997; Wasco *et al.*, 1997), war wie erwartet bei allen untersuchten rekombinanten Zellklonen nur eine moderate Überexpression des PS-1 festzustellen. Um dennoch die Neusynthese des rekombinanten Presenilins als Gesamtprotein nachzuweisen, wurden die neusynthetisierten Proteine der mit PS-1 stabil transfizierten H4 Neurogliomazellen für eine Stunde mit S<sup>35</sup>-Methionin markiert und anschließend eine Zellyse mit Detergenz durchgeführt (s. Methoden 3.4). Aus diesen Zellysaten wurde das PS-1 mit Antikörpern gegen den C- oder N-Terminus immunpräzipitiert. Dabei konnte sowohl Holoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 54 kDa als auch die beiden C- (22 kDa) und N- (32 kDa) terminalen Fragmente nachgewiesen werden (Abb. 7A,B). In nicht transfizierten H4 Zellen konnte mit dem gleichen Ansatz nur geringste Mengen von PS-1 detektiert werden (Abb. 7A,B Spur H4). Da die endogene Menge von PS-1 Gesamtprotein und der Fragmente in diesem Verfahren nicht quantifizierbar war, konnten keine genauen Aussagen über Rate der Überexpression der rekombinanten Preseniline gemacht werden. Im Vergleich zu dieser stabilen Expression des PS-1 konnte mit der induzierbaren Expression von PS-2 in humanen Astrocytoma Zellen (U373) eine höhere Expressionsrate erzielt werden (Abb.8,9),



die zudem ohne radioaktive Markierung und Immunpräzipitation nachzuweisen war.



**Abb. 7 : Expression von PS1-WT und PS1-FAD - Mutante (A246E) in humanen Neurogliomazellen**

H4 Neurogliomazellen wurden stabil mit pcDNA3-PS1-WT oder pcDNA3-PS1-FAD-A141I transfiziert. In ausgewählten Zellklonen wurden neu synthetisierte Proteine für eine halbe Stunde mit  $S^{35}$ -Methionin metabolisch markiert und anschließend ein Zellysat mit Detergenz hergestellt (s.Methode 3.4 und 3.6.22). Aus diesem Zellysat wurde das PS1 als Gesamtprotein (vL) und als N- oder C-terminale Fragmente (NTF, CTF) immunpräzipitiert. Zur Immunpräzipitation wurden die Antikörper 5023 gegen den N-Terminus (A) und BI.3D7 gegen den C-Terminus (B) von PS1 verwendet. Die präzipitierten Proteine wurden über eine 12 % ige SDS-PAGE mit 4M Harnstoff aufgetrennt und nachfolgend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die radioaktiv markierten Proteine einschließlich der Marker wurden über Autoradiographie nachgewiesen. Es wurden jeweils untransfizierte H4-Zellen (H4) mit den PS1-WT (WT) oder PS1-FAD-Mutante (A246E) transfizierten Zellen verglichen.

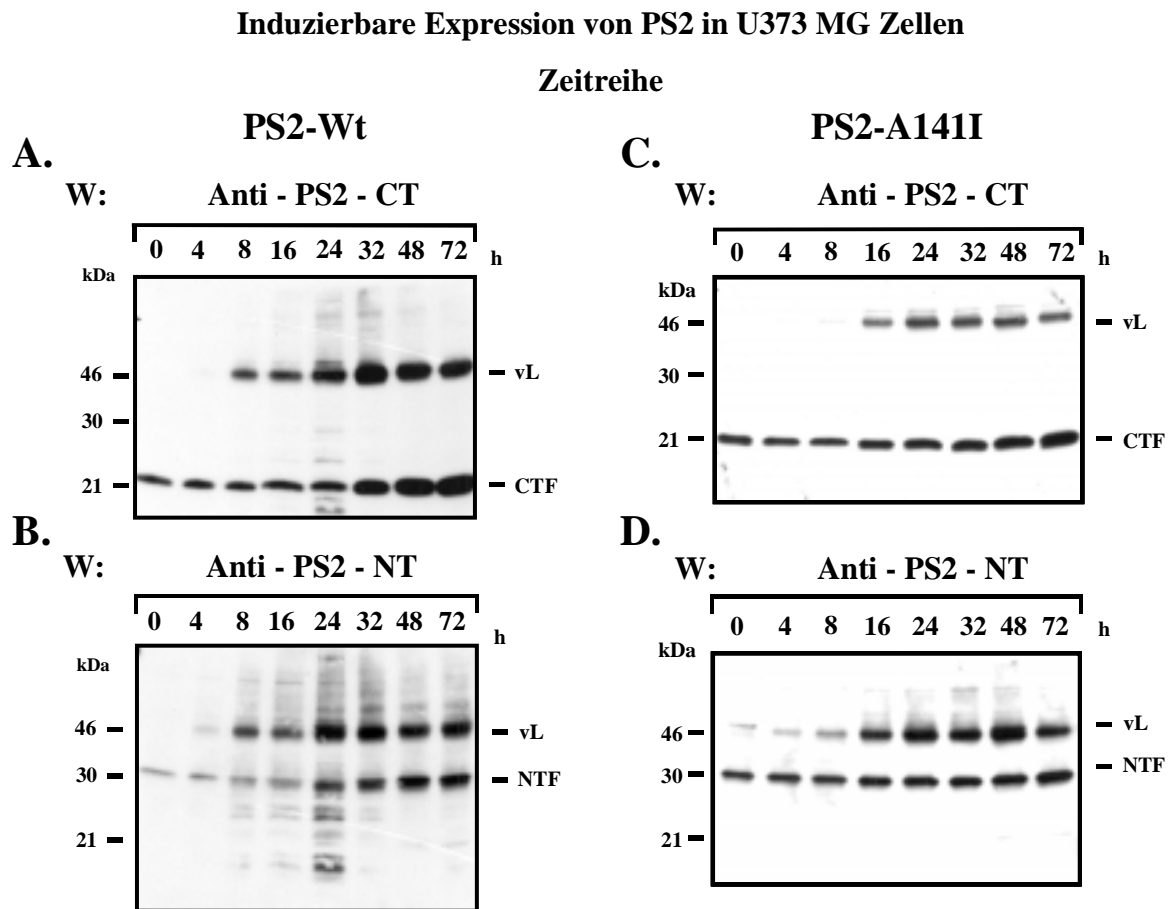
#### 4.1.2 Induzierbare Expression von PS-2 Wildtyp und PS-2 FAD-Mutante (A141I) in humanen Astrocytomazellen (U373 MG)

Zur regulierbaren Expression des PS-2 in humanen Zellen wurde das induzierbare System mit Tetrazyklin-kontrolliertem Transaktivator (tTA) verwendet (Gossen und Bujard, 1992). Die induzierbare Expression von Proteinen bietet den Vorteil, daß Expressionsartefakte minimiert werden, die durch eine starke Überexpression des zusätzlichen Proteins hervorgerufen werden. Desweiteren ist die induzierbare Expression eine elegante Möglichkeit, um auch toxische Proteine zu exprimieren, da die

Zelle im nicht-induzierten Zustand nicht mit diesen toxischen Bestandteilen belastet wird.

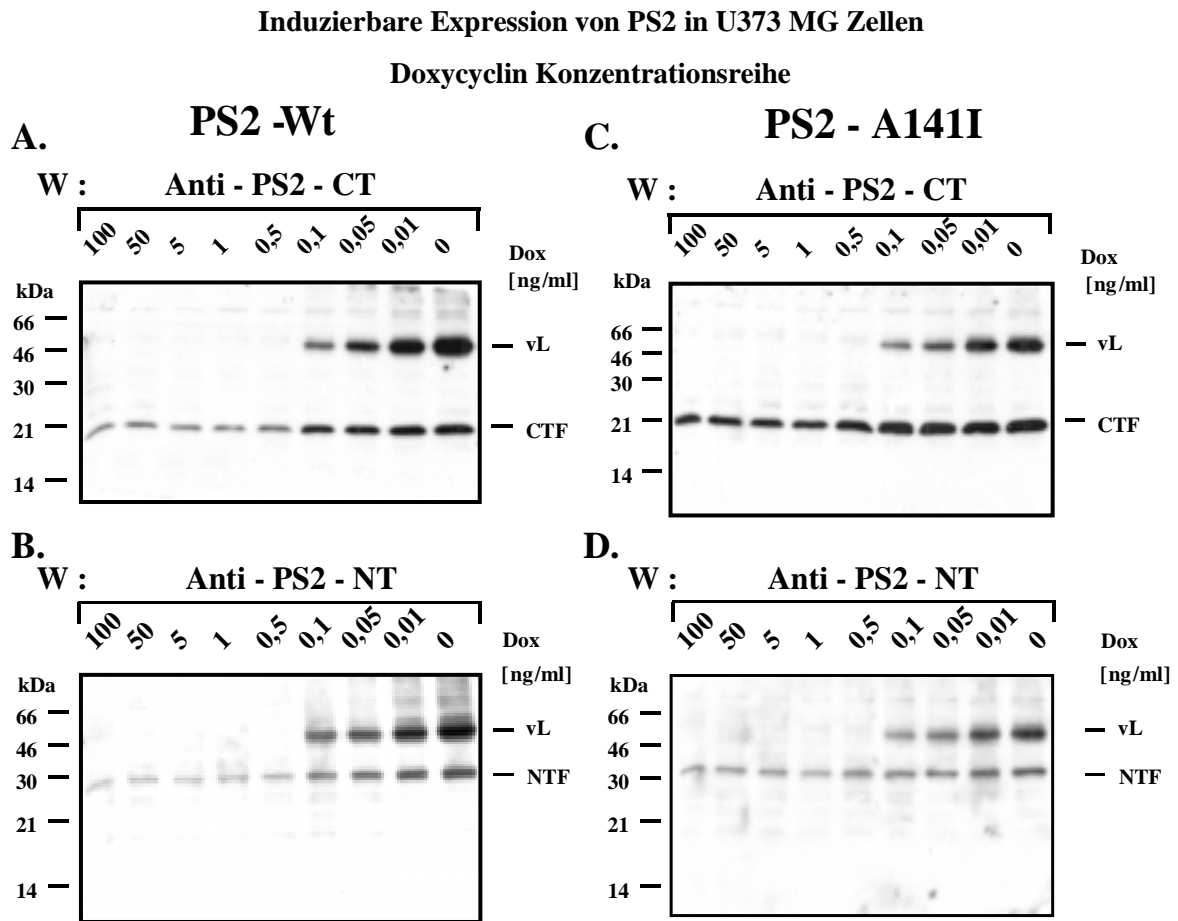
Zur Charakterisierung der induzierbaren Expression des PS-2 in Astrocytomazellen (U373MG) im Tet-Off System (Gossen und Bujard, 1995) wurde die Konzentrations- und Zeit-Abhängigkeit mit Doxyzyklin als Transaktivatorligand untersucht (Abb.8 und 9). Der Nachweis der Preseniline erfolgte in Detergenz-Zellysaten im Westernblot-Verfahren (s. Methode 3.6.2.2). Die beiden rekombinanten Zellklone mit PS-2 Wildtyp oder Mutante (A141I) waren in ihrer zeitlichen- und konzentrations-abhängigen Induzierbarkeit identisch (Vgl. Abb. 8 und 9 A,B und C,D). Mit Doxyzyklin im Medium (Abb.8 Null Stunden-Wert) konnten nur die N- und C- terminalen Fragmente von PS-2 nachgewiesen werden. Das Gesamtprotein war im endogen Expressionszustand, in diesem Falle mit der ausreichenden Menge an Doxyzyklin, nicht nachweisbar. Nachdem das Doxyzyklin (50ng/ml) durch dreimaliges Waschen mit PBS ausgewaschen worden war, wurde schon nach 8 Stunden die Expression der rekombinanten Preseniline als Gesamtprotein mit einem Molekulargewicht von 46 kDa im Westernblot nachweisbar (Abb.8). Nach 24 Stunden Inkubation ohne Doxyzyklin im Medium begann auch die nachweisbare Zunahme der Fragmente, bis dessen Maximum nach 72 Stunden erreicht war. Im allgemeinen Vergleich der Expressionsrate von PS-1 Wildtyp und der Mutante in den beiden untersuchten Zellklonen konnte festgestellt werden, daß die Wildtypform des Presenilins bezogen auf die Fragmente eine höhere Expressionsrate gegenüber dem Mutanten-Protein aufwies.

Nach dreitägiger Inkubation der Zellen mit verschiedenen Doxyzyklin Konzentrationen im Medium (s.Abb.9) war im Westernblot mit Detergenz-Zellysaten zu erkennen, daß eine Konzentration von 0,5 ng/ml Doxyzyklin ausreichte, um die Expression des rekombinanten PS-2 zu unterdrücken. Endogen (Abb. 9 : Doxyzyklin Konzentration > 0,5 ng/ml) waren wie bei der Zeitabhängigkeit nur die N- und C-terminalen Fragmente von PS-2 nachzuweisen. Erst ab einer Konzentration von 0,1 ng/ml Doxyzyklin wurde eine geringe Überexpression sowohl des Gesamtproteins als auch der Fragmente detektiert. Dann stieg die Menge an exprimiertem PS-2 mit abnehmender Doxyzyklin Konzentration an, bis das Maximum in Abwesenheit von Doxyzyklin (Nullwert) erreicht war (Abb.9).



**Abb 8 : Zeitabhängige Expression von PS2 in U373 MG Zellen**

Humane Astrogliazellen (U373MG), die stabil das Regulatorplasmid pUHD15.1-neo integriert hatten, wurden mit dem Plasmid pUHD10-3-PS2WT oder PS2 FAD-Mutante (A141I) stabil transfiziert, um eine durch Doxyzyklin induzierbare Expression zu gewährleisten (Gossen und Bujard, 1992). Zur Untersuchung der zeitabhängigen Expression von PS2 wurde aus je einem ausgewählten Zellklon das Doxyzyklin (50ng/ml) durch dreimaliges Waschen mit Vollmedium entfernt und ein Detergenz- Zellysat nach den angegebenen Zeitpunkten hergestellt. Aliquots der Zellysate (30 µg Gesamtprotein) wurden auf ein 12 % iges SDS-PAGE aufgetragen und die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF- Membran transferriert. Der Nachweis der Preseniline als Gesamtprotein (vL) und den N- bzw. C- terminalen Fragmenten (NTF, CTF) erfolgte über einen Westernblot mit den Antikörpern BI.HF5C, gegen den „Loop“ von PS2 und BI.5D3, gegen den N-Terminus von PS2.



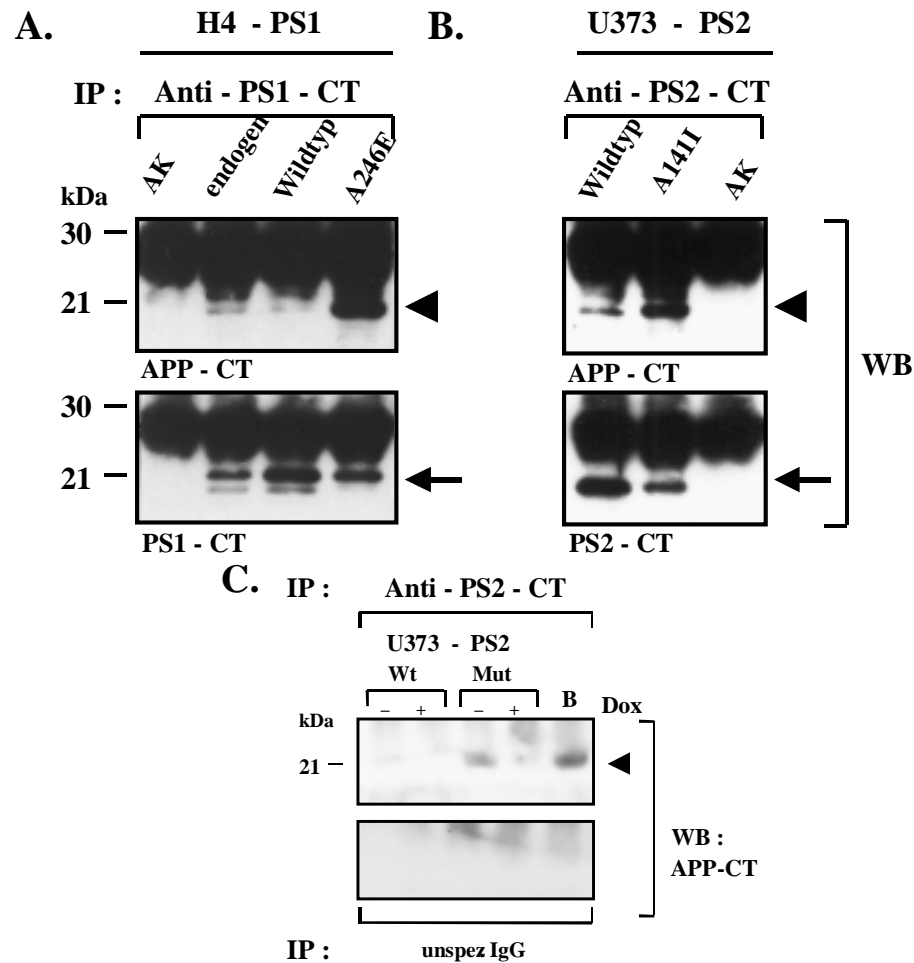
**Abb. 9 : Doxyzyklinabhängige Expression von PS2 in U373 MG Zellen**

Zur induzierbaren Expression von PS2 wurden humane Astrogliazellen (U373MG), die stabil das Regulatorplasmid pUHD15.1-neo integriert hatten, mit dem Plasmid pUHD10-3-PS2WT oder PS2 FAD-Mutante (A141I) stabil transfiziert (Gossen und Bujard, 1992). Zur Untersuchung der Doxyzyklin abhängigen Expression von PS2-Wt oder FAD-Mutante wurde je ein ausgewählter Zellklon ohne Doxyzyklin ausgesät und für drei Tage mit der angegebenen Doxyzyklin Konzentrationen kultiviert. Aus den Detergenz-Zellysaten dieser Zellen wurden Aliquots (30 µg) über eine 12 % ige SDS-PAGE mit 4M Harnstoff aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine PVDF-Membran transferriert. Die induzierbare Expression von PS2-WT (A,B) und PS2-FAD Mutante (C,D) wurde sowohl über den Nachweis des Gesamtproteins (vL), als auch über dessen N- und C-terminalen Fragmente (NTF, CTF) im Westernblot Verfahren bestimmt. Als C-terminal spezifischen Antikörper wurde der BI.HF5C eingesetzt und für den Nachweis des N-terminalen Fragmentes der monoklonale Antikörper BI.5D3.

### 4.1.3 Interaktion von Presenilin und C-terminalen Fragmenten des APP in rekombinanten Zelllinien

Es gibt Hinweise aus Untersuchungen mit überexprimierenden Zelllinien, die sowohl PS-1, als auch APP stabil überexprimieren, sowie mit PS-1 defizienten Mäusen, daß die Preseniline die Synthese des C-terminalen Endes von A $\beta$  und damit letztendlich auch dessen generelle Entstehung beeinflussen, indem sie die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität modulieren oder selbst eine solche Aktivität besitzen (De Strooper *et al.*, 1998; Naruse *et al.*, 1998). Unter dieser Annahme müßten die Preseniline zumindest zeitweise mit dem Substrat (APP oder Fragmente davon) interagieren. Das Hauptaugenmerk bei diesen Untersuchungen lag auf der Interaktion der Preseniline mit C-terminalen Fragmenten des APP, da diese als Vorstufe bei der A $\beta$  Entstehung das Substrat der  $\gamma$ -Sekretase darstellen und in A $\beta$  produzierenden Zellen gefunden werden (Haass *et al.*, 1993). Dazu wurden Co-Immunpräzipitationen mit Detergenz-Zellysaten von PS-1 oder PS-2 überexprimierenden Zellen durchgeführt (Abb.7,8,9). Die Preseniline (entweder PS1 oder PS2) wurden mit einem „Loop“-spezifischen Antikörper aus diesen Lysaten präzipitiert und im Westernblot mögliche co-präzipitierte APP Proteine mit einem C-terminal spezifischen APP Antikörper nachgewiesen (Abb. 10).

In diesen Untersuchungen wurden für beide Preseniline co-präzipitierende C-terminale APP Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 21 kDa nachgewiesen (Abb. 10). Obwohl die Wildtypform beider Preseniline eine höhere Expression aufwies (Abb.10 A unterer Teil; Abb.10 B unterer Teil), wurde nach einer Immunpräzipitation weniger C-terminales APP Fragment im Vergleich zu der mutanten Presenilinform präzipitiert (Abb.10 A und 4 B). Um unspezifische Bindungen oder Expressionsartefakte auszuschließen, wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt. Einerseits wurden Immunpräzipitationsansätze mit Zellysaten der H4- und U373-Zellen anstelle von Presenilin-Antikörpern mit unspezifischen Immunglobulinen durchgeführt. Dabei wurden keine co-präzipitierenden Proteine festgestellt (Abb. 10 C). Andererseits wurden die Preseniline mit spezifischen Antikörpern gegen den C-Terminus aus Zellysaten von induzierten und nicht-induzierten U373-Zellen immunpräzipitiert. Dadurch sollte untersucht werden, ob die Nachweisbarkeit der APP Fragmente von der Anwesenheit der rekombinanten Preseniline abhängt. Dabei konnte nur in induzierten, PS-2 überexprimierenden Zellysaten co-präzipitierende C-terminale Fragmente des APP nachgewiesen werden (Abb. 10 C).



**Abb. 10 : Interaktion von PS1 und PS2 mit C-terminalen Fragmenten des APP in PS1 oder PS2 überexprimierenden Zellen**

(A) H4 Neurogliomazellen wurden stabil mit PS1 Wildtyp oder FAD-Mutante (A246E) transfiziert. Ausgewählte Zellklone und untransfizierte H4 Zellen wurden in Co-Immunpräzitationspuffer lysiert und PS1 wurde aus dem Zelllysate mit dem Antikörper BI.5D3, gegen den „Loop“-Bereich des PS1, präzipitiert.

(B) Zur induzierbaren Expression von PS2-Wildtyp und PS2 FAD-Mutante (A141I) in Astrozytomazellen (U373 MG) wurde das Tet-OFF System benutzt (Gossen und Bujard, 1992). Die Expression von PS2 wurde durch den Entzug von Doxycyclin für drei Tage induziert, bis die Zellen geerntet wurden. Die Zellen wurden in Co-Immunpräzitationspuffer lysiert und PS2 wurde mit dem Antikörper BI.HF5C, gegen den „Loop“-Bereich des PS2, präzipitiert. Die präzipitierten Proteine aus Zelllysaten beider Zelllinien wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und danach auf eine PVDF-Membran transferriert. Um C-terminale Fragmente von APP zu bestimmen wurde mit dem Antikörper SAD 3138 hybridisiert (A und B oben; Dreiecke) und die gleiche Membran zur Bestimmung des PS1 bzw. PS2 Expressionsniveaus wieder mit dem Antikörper BI.5D3 bzw. BI.HF5C rehybridisiert (A und B unten; Pfeile).

(C) Durch die Möglichkeit PS2 in der Astrozytomazelllinie induzierbar zu exprimieren, war es auch möglich Co-Immunpräzitationen mit Zelllysaten aus induzierten und nicht-induzierten Zellen direkt zu vergleichen. Zum Größenvergleich der co-präzipitierenden C-terminalen APP Fragmente wurde die Fraktion B der Cortex und

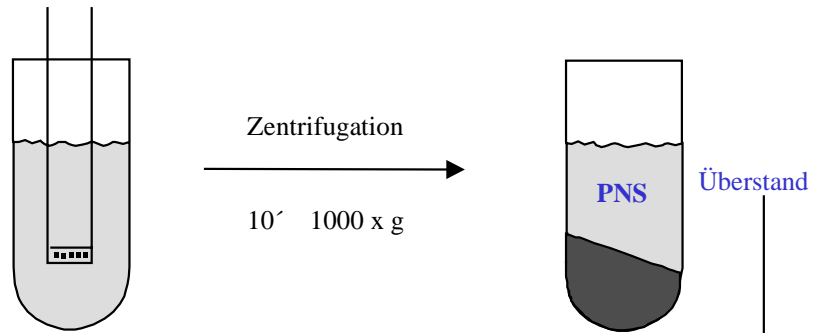
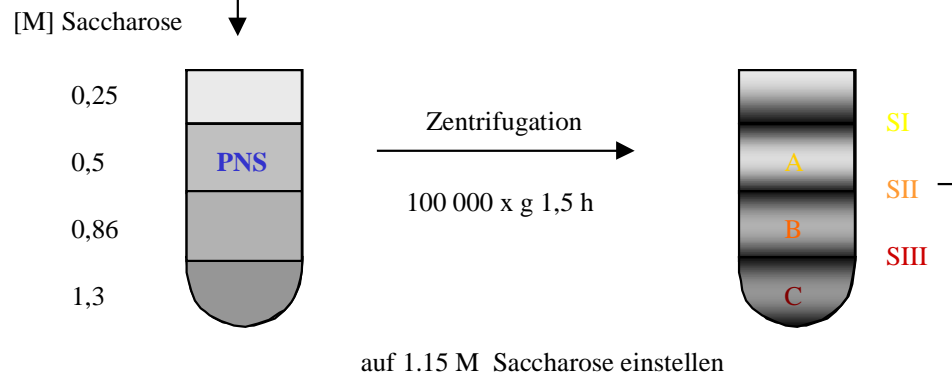
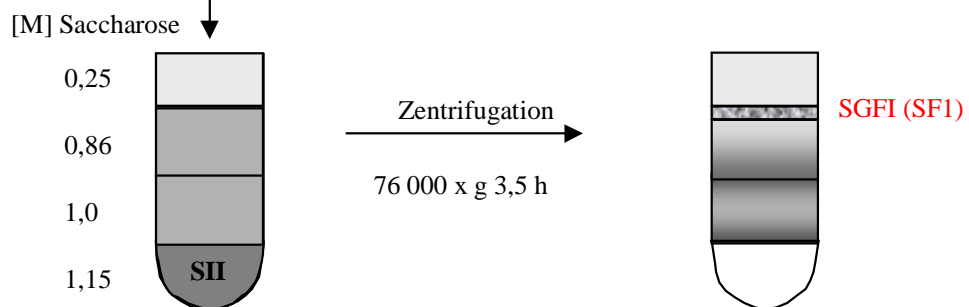
Hippocampus Fraktionierung verwendet (C.Spur 5). Die untere Darstellung in C zeigt ein Kontrollexperiment, indem Co-Immunpräzipitationen der gleichen Zellysate jedoch mit unspezifischen Immunglobulinen durchgeführt worden war.

Neben den C-terminal spezifischen Antikörpern wurden zur Immunpräzipitation der Preseniline auch Antikörper gegen den N-terminalen Bereich eingesetzt. Dabei war kein co-präzipitierendes APP Fragment nachzuweisen. Das gleiche mußte für die Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen APP und dem anschließenden Nachweis der Preseniline im Westernblot-Verfahren festgestellt werden. Dieser Befund könnte durch die PS-APP Komplexbildung erklärt werden, indem nur die Epitope der Antikörper gegen den C-Terminus der Preseniline frei zugänglich sind.

Aus Zellysaten PS-1 oder PS-2 überexprimierender Zellen konnten damit ausschließlich mit Antikörpern gegen die „Loop“-Domäne der Preseniline ein etwa 21 kDa großes C-terminales APP Fragment präzipitieren werden.

#### **4.2 Anreicherung von Golgimembranen aus Lebergewebe des Meerschweinchens**

In fast allen bisher erschienen Veröffentlichungen wurden beide Preseniline innerhalb der Zelle sowohl im ER- als auch im Golgi-Kompartiment nachgewiesen (Cook *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1996; Kovacs *et al.*, 1996; Elder *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; Walter *et al.*, 1996; De Strooper *et al.*, 1997). Diese Arbeiten beruhen vorwiegend auf immunocytochemischen Methoden. Zudem wurden die meisten Untersuchungen mit transfizierten Zellen durchgeführt, wobei eine artifizielle Verteilung der rekombinanten Proteine durch die Überexpression nicht immer ausgeschlossen werden können. Um die intrazelluläre Lokalisierung der endogenen Preseniline zu untersuchen, wurde eine biochemische Fraktionierung der Meerschweinchenleber mit einem Saccharosestufengradienten durchgeführt. Diese, ursprünglich für Rattenleber beschriebene Fraktionierung, wurde von Taylor *et al.* entwickelt, um hochreine intakte Golgizisternen zu erhalten (Taylor *et al.*, 1997). Außer der intrazellulären Lokalisierung der Preseniline sollte mit dieser Aufreinigungsmethode bestimmt werden, in welchem Zellkompartiment die Interaktion der Preseniline mit APP-Fragmenten stattfindet. Zusätzlich sollten die gewonnenen Ergebnisse der Co-Immunpräzipitationsanalysen mit Zellysaten der transfizierten Kulturzellen mit Gewebe des Meerschweinchens bestätigt werden. Als drittes Ziel der biochemischen Fraktionierung sollten die Preseniline in einer Fraktion des Gradienten angereichert werden, um Untersuchungen auf eine mögliche  $\gamma$ -Sekretase Aktivität der Preseniline möglich zu machen (s.4.4.3).

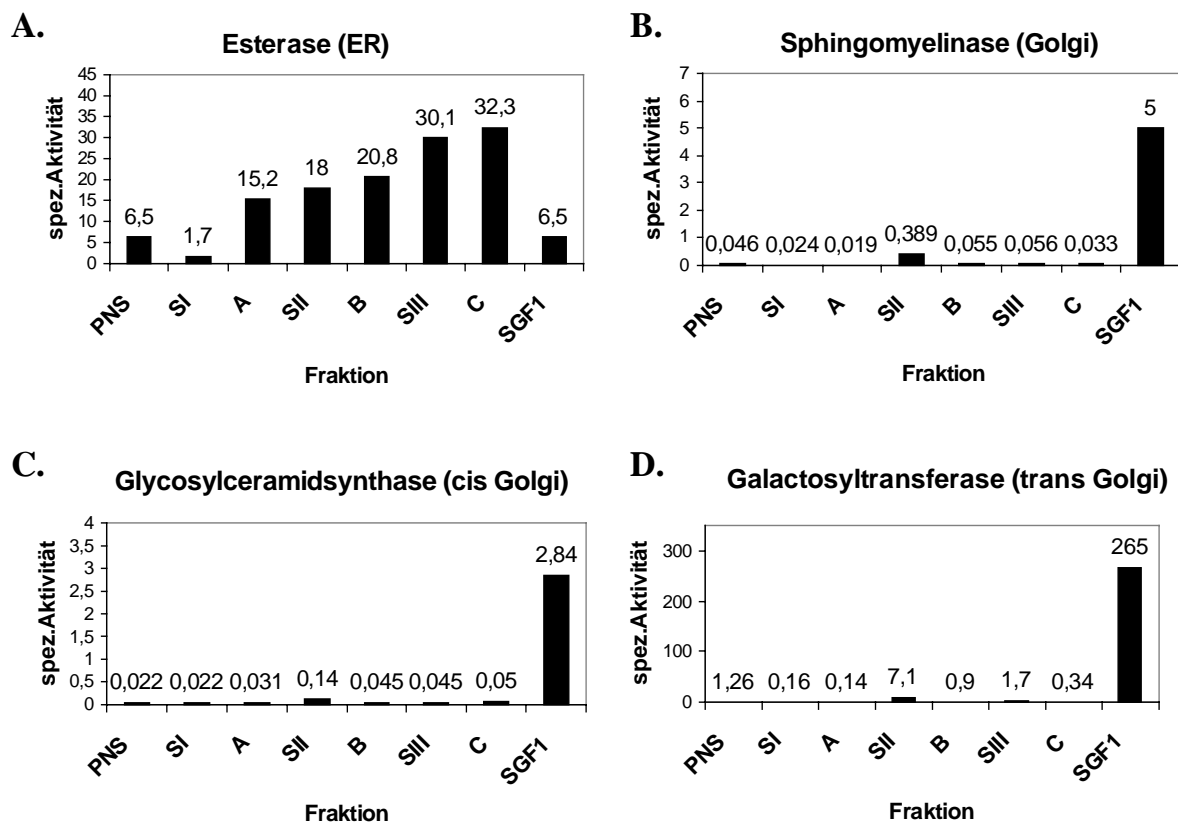
**Homogenisierung****Erster Stufengradient****Zweiter Stufengradient**

**Abb. 11 : Übersichtschema zur Anreicherung von Golgi-Membranen aus Meerschweinchengewebe durch differentielle Gradienten-Zentrifugation**

Frisch präpariertes Cortex- und Hippocampus-Gewebe aus fünf bis sieben Meerschweinchen wurden mit einem Polytron-Ultrathoraxgerät homogenisiert. Nach der ersten Zentrifugation wurde der Überstand (PNS; „post nuclear supernatant“) sofort auf den ersten Saccharosestufengradienten aufgetragen und für 1,5 Stunden bei 100 000xg und 4°C in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Die Verteilung verschiedener Kompartiment spezifischer „Markerproteine“ im Gradienten wurde durch Enzymaktivitäten und Westernblot-Verfahren bestimmt. Die Interphase zwischen 0,86 und 0,5 M Saccharose (SII) wurde auf 1,15 M Saccharose eingestellt und auf einen zweiten Saccharosestufengradienten aufgetragen. Dieser wurde bei 76 000xg und 4°C für 3,5 h zentrifugiert. Golgimembranen wurden in der Fraktion zwischen 0,5 und 0,25 M Saccharose **SGF1** („stacked golgi fraction“) bzw. **SF1** des zweiten Gradienten angereichert. Die Membranen aus den Fraktionen **SGF1** und **SF1** unterscheiden sich nur dadurch, daß die **SGF1** Fraktion aus Lebergewebe und die **SF1** Fraktion aus Cortex- und Hippocampus-Gewebe hergestellt wurde.



Um die Verteilung und Anreicherung der verschiedenen Membranen im Gradienten zu verfolgen, wurden Aktivitäten von „Markerenzymen“ der ER- und Golgi-Kompartimente in den einzelnen Fraktionen des Saccharosegradienten bestimmt (s.Methode 3.7.1.3). Dabei wurde deutlich, daß die Anreicherung von ER-Membranen, charakterisiert durch die Esteraseaktivität, mit steigender Saccharosekonzentration zunimmt. In der dichtesten Fraktion mit 1.3 M Saccharose ist die Esterase etwa fünffach gegenüber dem PNS angereichert. Dagegen wurde in der Fraktion SGF1 (Golgifraktion; s.Abb.11) keine Anreicherung von ER-Membranen gegenüber dem PNS festgestellt (Abb.12).

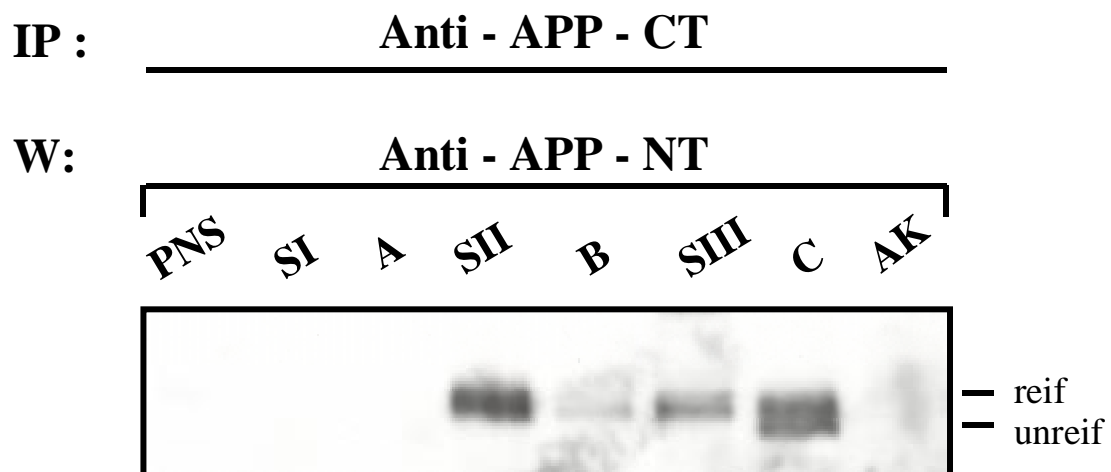


**Abb. 12 : Verteilung von ER- und Golgi-Membranen im Saccharosestufengradienten der Meerschweinchen Leberfraktionierung**

Die Membranen des PNS aus einer frischen Leberpräparation aus Meerschweinchen wurden wie beschrieben in einem Saccharose–Stufengradienten aufgetrennt (Taylor *et al.* 1997). Von dem PNS, den einzelnen Fraktionen des ersten Gradienten und von der Golgifraktion (SGF1) des zweiten Gradienten wurde die Verteilung von ER– und Golgi–Membranen mittels Enzymaktivitäten von kompartiment-spezifischen „Markerproteinen“ bestimmt (s.Methode 3.7.1.3).

Die charakteristischen Golgienzyme Sphingomyelinsynthase (Gesamt-Golgi), Glykosylceramidsynthase (cis-Golgi) und Galaktosyltransferase (trans-Golgi) wurden im ersten Gradienten nur in der SII-Fraktion angereichert (5-8 fach). Die Golgifraktion (SGF1) aus dem zweiten Gradienten zeigte im Vergleich dazu eine 100-200 fache Anreicherung von Golgienzymen. Transgolgi-Membranen, gekennzeichnet durch die Galaktosyltransferase, erzielten mit 200-facher Anreicherung gegenüber dem PNS dabei den höchsten Anreicherungsgrad (Abb.12).

Damit war es gelungen eine hochreine Golgifraktion durch biochemische Fraktionierung aus Meerschweinchenleber herzustellen, in der typische residente Golgienzyme bis zu 200-fach gegenüber dem PNS angereichert waren. Die veröffentlichten Ergebnisse über die Fraktionierung der Rattenleber sind somit auch auf das Meerschweinchen übertragbar.



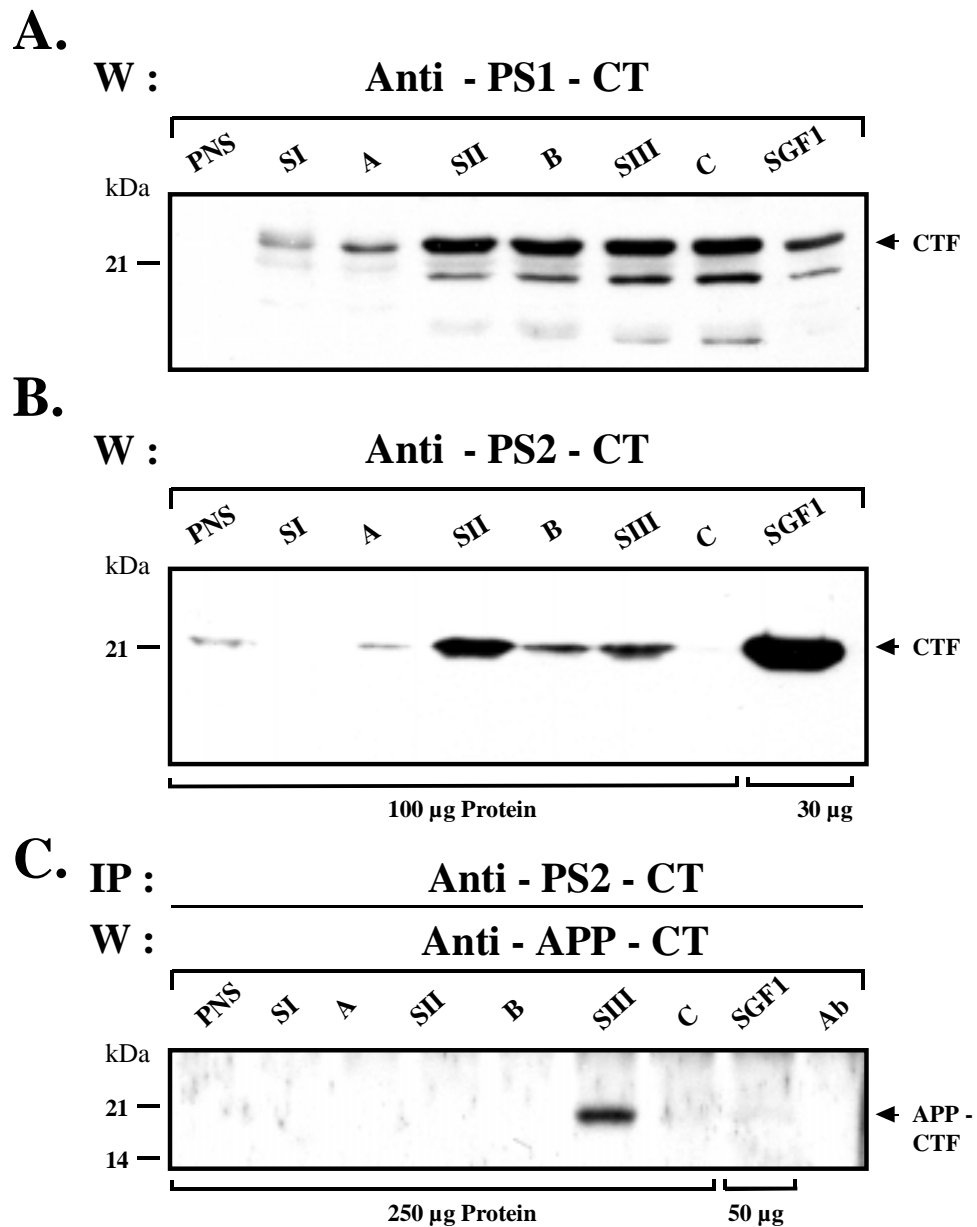
**Abb. 13 : Verteilung von APP im Saccharose-Stufengradienten der Meerschweinchen Leberfraktionierung**

Um die Verteilung der glykosylierten und nicht-glykosylierten APP-Form (reif, unreif) im Saccharose-Stufengradienten zu unterscheiden, wurden mit den Aliquots der Leberfraktionierung (jeweils 250µg) eine Immunpräzipitation mit dem Antikörper 5818, gegen den C-Terminus des APP, durchgeführt. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine auf ein 7 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran transferriert. Die APP-Formen wurden im Westernblot mit dem Antikörper 22C11 nachgewiesen, der gegen den N-Terminus des APP gerichtet ist. Um das Auftreten unspezifische Immunglobulinbanden aus dem Serum auszuschließen, wurden als Kontrolle eine Immunpräzipitation nur mit Serum durchgeführt (AK).

Die Lokalisierung des APP und der Preseniline im Gradienten wurde ebenfalls untersucht. Das endogene APP konnte in Westernblot-Analysen nicht nachgewiesen werden. Deshalb wurde es über ein kombiniertes Immunpräzipitation/Westernblot-Verfahren detektiert, indem zunächst das APP mit einem C-terminal spezifischen Antikörper aus den Fraktionen des Gradienten präzipitiert wurde (s.Methode 3.6.2.2). Anschließend wurde das Gesamtprotein im Westernblot mit einem N-terminal spezifischen Antikörper nachgewiesen. Das APP als Gesamtprotein mit dem höchsten Molekulargewicht, welches die N- und O-glykolysierte Form des APP darstellt, wurde nur in der Fraktion mit angereicherten Golgimembranen (SII) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu befand sich das N-glykolysierte und das nicht-glykolysierte APP ausschließlich in der ER angereicherten Fraktion C (Abb.13).

Die Preseniline konnten im Gegensatz zum APP in einzelnen Fraktionen (30 µg Gesamtprotein) in einem Westernblot nachgewiesen werden. Dabei waren jedoch in allen untersuchten Fraktionen des Saccharosestufengradienten nur die Fragmente der Preseniline zu detektieren. Bei der Verteilung der Preseniline im Gradienten konnte ein Unterschied zwischen PS-1 und PS-2 festgestellt werden. Während die Anreicherung von PS-1 im ersten Gradient mit dem ER-Marker Esterase identisch war (Abb. 12A und 14 A), gab es eine Anreicherung von PS-2 in der mit Golgimembranen angereicherten Fraktion SII (Abb.14 B). Diese Verteilung bestätigte sich auch durch den zweiten Gradienten, da in der Golgifraktion (SGF1) nur das PS-2 drastisch angereichert wurde (Abb.14 B Spur SGF1). Auffällig war dabei, daß auch in der Golgifraktion das PS-2 nicht als Gesamtprotein nachzuweisen war. Im Gegensatz zur Verteilung des PS-2 konnte für PS-1 in der Golgifraktion keine Anreicherung gegenüber dem PNS festgestellt werden (Abb.14 A Spur SGF1).

Mit Hilfe der biochemischen Fraktionierung konnte somit gezeigt werden, daß die beiden endogenen Preseniline in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle angereichert waren, wobei das PS-1 überwiegend im ER und PS-2 hauptsächlich im Golgi lokalisiert war, was bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde. In allen Fraktionen konnten die Holoproteine der beiden Preseniline nicht detektiert werden. Sie konnten im Westernblot nur als N- oder C-terminale Fragmente nachgewiesen werden.



**Abb. 14 : Verteilung von PS1 und PS2 im Saccharose-Stufengradienten der Leber-Fraktionierung und Interaktion von PS2 und C-terminalen Fragmenten des APP**

Aliquots (jeweils 100µg) des PNS und der Fraktionen des Saccharose-Stufengradienten wurden auf ein 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF- Membran transferriert. Zur Bestimmung der Presenilinen wurden die C-terminalen Fragmente (CTF) nachgewiesen. Es wurden Westernblot-Analysen mit dem „Loop“-spezifischen PS1 Antikörper BI.3D7 (A) und mit dem „Loop“-spezifischen Antikörper BI.HF5C durchgeführt (B). Um co-präzipitierte APP Fragmente nachzuweisen, wurden mit den Aliquots der Leberfraktionierung (jeweils 250 µg) eine Immunpräzipitation mit dem Antikörper BI.HF5C und anschließend ein Westernblot mit dem Antikörper 5818, gegen den C-Terminus des APP durchgeführt (C).

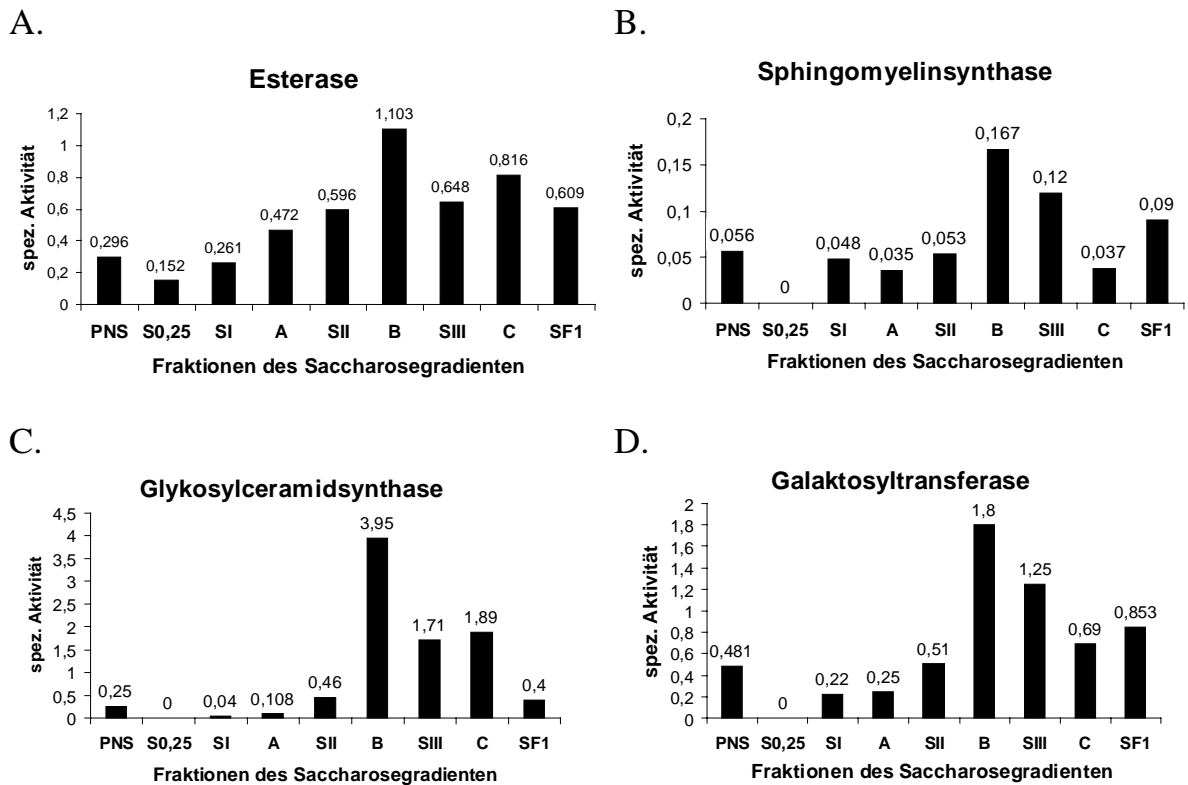
### 4.3 Interaktion von PS-2 und C-terminalen Fragmenten des APP

Um die Interaktion von Presenilin und APP C-terminalen Fragmenten auch unter endogenen Expressionsbedingungen zu bestätigen, wurden Co-Immunpräzipitationen mit einzelnen Gradientenfraktionen wie unter 4.2 beschrieben durchgeführt. Dabei konnte auch ein C-terminales Fragment des APP mit Antikörpern gegen den „Loop“ des PS-2 co-präzipitiert werden (Abb.14 C). Dieses C-terminale Fragment wurde jedoch nur in der mit ER-Membranen angereicherten SIII-Fraktion detektiert. Das C-terminale Fragment des APP hatte mit ca. 21 kDa das gleiche Molekulargewicht wie das co-immunpräzipitierte APP Fragment aus Zellkulturlysaten der PS-1 oder PS-2 überexprimierenden Zellen (Abb.10). Es konnten weder in den Fraktionen mit geringer Dichte (SI-B) des ersten Gradienten noch in der Golgifraktion des zweiten Gradienten (SGF1) C-terminale Fragmente des APP nachgewiesen werden (Abb. 14 C; s. Übersicht der Gradienten Abb.11). Sowohl mit Antikörpern gegen den N-Terminus des PS-2 als auch mit Antikörpern gegen PS-1 konnte kein co-präzipitierendes APP Fragment gefunden werden.

Es konnte damit auch im Gewebe unter endogenen Expressionsbedingungen eine Interaktion zwischen den C-terminalen Fragmenten von PS-2 und APP gezeigt werden. Diese Interaktion wurde jedoch nur in Fraktionen gefunden, die mit ER-Membranen angereichert waren. Auch in der aufgereinigten Golgifraktion SGF1 konnte kein co-präzipitierendes C-terminales Fragment von APP nachgewiesen werden.

### 4.4 Fraktionierung von Cortex und Hippocampus des Meerschweinchens

Das APP ist im Vergleich verschiedener Zelltypen im Nervengewebe am stärksten exprimiert (Kang *et al.*, 1987). Die Menge an endogenem APP aus Cortex und Hippocampus des Meerschweinchens reicht aus, um dessen proteolytisches Spaltprodukt A $\beta$  (s. Einleitung) in einem ELISA zu messen (unveröffentlichte Ergebnisse aus dem Labor von Herrn Dr. Mendla). Außerdem treten die A $\beta$  enthaltenden Plaques bei Alzheimer Patienten vor allem im Cortex und Hippocampus auf, welches auf eine pathologische Veränderung in diesem Gewebe schließen läßt. Zusätzlich ist man mit der Untersuchung von neuronalem Gewebe so nahe wie möglich an der physiologischen Situation im menschlichen Gehirn. Mit Cortex und Hippocampus des Meerschweinchens sollte deshalb die bereits beschriebene Fraktionierung durchgeführt werden. Wenn Preseniline mit dem C-Terminus von APP in bestimmten Kompartimenten im Komplex vorliegen, so sollte diese Interaktion auch in diesen Geweben zu finden sein.



**Abb. 15: Verteilung von ER- und Golgi-Membranen im Saccharosestufengradienten der Cortex und Hippocampus Fraktionierung von Meerschweinchen**

Das PNS aus frischem Meerschweinchen Cortex und Hippocampus wurde wie beschrieben in einem Saccharose-Stufengradienten aufgetrennt (Taylor *et al.*, 1997, s.Methode 3.7.1). Von dem PNS, den einzelnen Fraktionen des ersten Gradienten und von der Fraktion SF1 des zweiten Gradienten wurde die Verteilung von ER- und Golgi-Membranen mittels Enzymaktivitäten von kompartiment-spezifischen „Markerproteinen“ bestimmt (s.Methode 3.6.6.2).

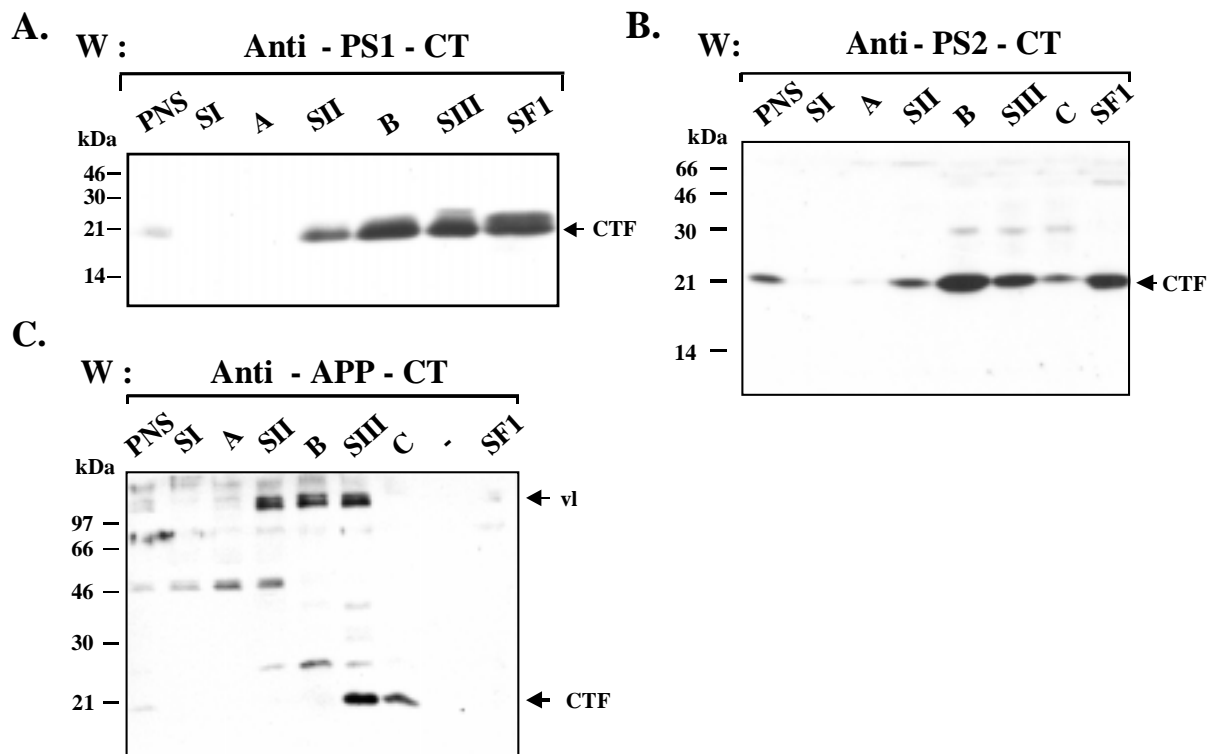
Die Fraktionierung des Cortex und Hippocampus wurde analog der Leber-Fraktionierung durchgeführt (s.Methode 3.7.1.1). Die einzelnen Fraktionen des Saccharosestufengradienten wurden durch Aktivitätsbestimmung von „Markerenzymen“ der ER- und Golgi-Kompartimente auf die Anreicherung und Verteilung dieser Zellkompartimente untersucht. ER- und Golgi-Membranen von Cortex und Hippocampus wurden im Gradienten nicht getrennt (Abb. 15). Die Aktivitätsbestimmung von „Markerenzymen“ machte deutlich, daß sowohl ER-Membranen als auch Golgi-Membranen in der Fraktion B des ersten Gradienten gering angereichert waren (Abb. 15). Die Esterase-Aktivität (ER-„Markerenzym“) des Cortex- und Hippocampus-Gewebe stieg nicht wie im Lebergradienten mit zunehmender Dichte der Fraktionen an (Vgl. Abb. 12), sondern hierbei verteilte sich die Aktivität auf die Fraktionen SII-C (Abb.15 A). Die drei charakteristischen Golgizyme Sphingomyelinsynthase

(Gesamt-Golgi), Glykosylceramidsynthase (cis-Golgi) und Galaktosyltransferase (trans-Golgi) verteilten sich über die letzten drei Fraktionen B, SIII und C, wobei in der Fraktion B die höchste Aktivität zu finden war (Abb. 15 B-D; s. auch Gradientenübersicht Abb. 11). Von allen untersuchten Golgienzymen erreichte die Glykosylceramidsynthase in dieser Fraktion mit einer 16-fachen Anreicherung gegenüber dem PNS den höchsten Anreicherungsgrad (Abb. 15 C). Die beiden anderen Golgi-„Markerenzyme“ zeigten lediglich eine dreifache Anreicherung gegenüber dem PNS in der Fraktion B des Gradienten (Abb. 15 B, D). Damit waren Golgi-Membranen des Cortex und Hippocampus im Vergleich zur Leberfraktionierung allgemein in dichteren Fraktionen des Gradienten nachzuweisen. Die weitere Fraktionierung der SII-Fraktion in einem zweiten Gradienten ergab deshalb auch nur eine zweifache Anreicherung von Golgi-Membranen gegenüber dem PNS.

Um die Verteilung der Preseniline und des APP im Gradienten zu verfolgen, wurden Westernblot-Analysen mit dem PNS, den einzelnen Fraktionen des ersten Gradienten und mit der Fraktion SF1 des zweiten Gradienten durchgeführt (s. Methoden 3.6.6). Die Preseniline waren wie die Golgi- und ER-Membranen ebenfalls vorwiegend in der Fraktion B angereichert. In weniger dichten Fraktionen des Gradienten (SI,A) wurden keine Preseniline gefunden. Auch im Cortex- und Hippocampus-Gewebe waren nur die endogenen Fragmente der Preseniline nachzuweisen. Hierbei gab es im Gegensatz zur Leberfraktionierung keine Unterschiede in der Verteilung von PS-1 und PS-2 im Gradienten (Abb. 16 A,B). Diese unterschiedlichen Befunde können dadurch erklärt werden, daß in der Fraktionierung des Cortex und Hippocampus eine Trennung zwischen ER- und Golgi-Membranen nicht möglich war.

Das Expressionsniveau des APP reichte im Gegensatz zum Lebergewebe aus, um die „volle Länge“ des Proteins in 30 µg der einzelnen Fraktion zu detektieren. Die beiden Reifeformen des APP (N- bzw. N- und O- glykolysierte Form) wurden in den Fraktionen SII, B und SIII also ebenso wie die Preseniline in Fraktionen mit ER- und Golgi-Membranen nachgewiesen (Abb. 16 C). Außerdem konnte ein C-terminales Fragment von APP mit einem Molekulargewicht von ca. 21 kDa in den Fraktionen SIII und C detektiert werden.

Die Fraktionierung des Cortex und Hippocampus des Meerschweinchens mit der verwendeten Methode des Saccharosestufengradienten erzielte nicht die Trennung der Membranen der ER- und Golgi-Kompartimente. Diese Membranen liegen in ihrer Dichte so nahe beieinander, daß sie beide in der Fraktion B angereichert (3-5 fach) waren, in der auch bevorzugt die Preseniline gefunden wurden. Dadurch war es letztendlich auch nicht möglich, eine hochreine Golgifraktion im zweiten Gradienten zu erhalten.



**Abb. 16 : Verteilung von PS1, PS2 und APP im Saccharose-Stufengradienten der Cortex und Hippocampus Fraktionierung vom Meerschweinchen**

Aliquots (jeweils 30µg) des PNS und der Fraktionen des Saccharose-Stufengradienten der Cortex und Hippocampus Fraktionierung vom Meerschweinchen wurden auf ein 12 % SDS - Polyacrylamidgel aufgetragen und die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Zur Bestimmung der Preseniline wurden die C-terminale Fragmente (CTF) nachgewiesen. Es wurden Westernblot-Analysen durchgeführt mit dem „Loop“-spezifischen PS1 Antikörper BI.3D7 (A) und mit dem „Loop“-spezifischen PS2 Antikörper BI.HF5C (B). Die Verteilung von APP (vl) und dessen C-terminaler Fragmente (CTF) im Gradienten wurden mit dem APP C-terminal spezifischen Antikörper SAD 3138 nachgewiesen.

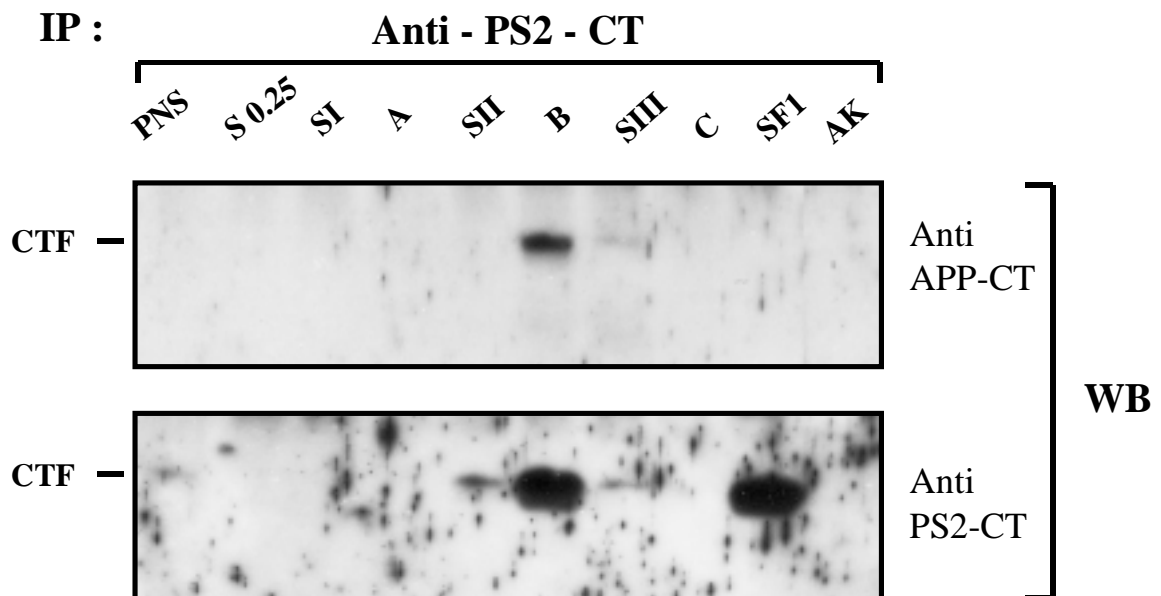
#### 4.5 Interaktion von PS-2 und APP C-terminalen Fragmenten im Cortex und Hippocampus

Obwohl die Herstellung einer aufgereinigten Golgifraktion aus Cortex und Hippocampus mit der gewählten Methode nicht möglich war, wurden mit Hilfe von Co-Immunpräzitationen untersucht, ob eine Interaktion zwischen den Presenilinen und dem APP auch in diesen Fraktionen nachzuweisen war. Durch Immunpräzitationen mit Antikörpern gegen den „Loop“-Bereich des PS-2 konnte in der Fraktion B des Saccharosestufengradienten ein C-terminales APP-Fragment co-präzipitiert werden (Abb.17, s.Methode 3.6.2). In dieser Fraktion waren neben dem PS-2 auch Golgi- und ER-Membranen



angereichert (Abb. 15, 16). Mit einem Molekulargewicht von etwa 21 kDa hatte das C-terminale APP Fragment die gleiche Größe wie die co-präzipitierten APP Fragmente aus der Leberfraktionierung und den Zellysaten der Presenilin-überexprimierenden Zelllinien (Abb. 10, 14). Sowohl mit Antikörpern gegen den N-Terminus von PS-2 als auch mit Antikörpern gegen PS-1 konnte kein APP Fragment co-präzipitiert werden.

Sowohl in Presenilin überexprimierenden, humanen Zelllinien als auch in zwei unterschiedlichen Organen des Meerschweinchens konnten somit durch Co-Immunpräzitationen gezeigt werden, daß die proteolytischen, C-terminalen Fragmente des PS-2 mit einem 21 kDa großem C-terminalen Fragment des APP interagieren.



**Abb. 17 : Interaktion von PS-2 und C-terminaler Fragmente des APP im Meerschweinchen Cortex/Hippocampus**

Mit den Aliquots der Cortex/Hippocampus Fraktionierung (jeweils 250 µg) wurde eine Immunpräzitation mit dem Antikörper BI.HF5C, gegen den „Loop“-Bereich von PS-2, durchgeführt. Um co-präzipitierte APP Fragmente nachzuweisen, wurde anschließend ein Westernblot mit dem Antikörper 5818, gegen den C-Terminus des APP, durchgeführt. Zur Bestimmung der PS-2 Verteilung im Saccharosegradienten wurde die Membran mit dem Antikörper BI.HF5C rehybridisiert.

## 4.6 Zellfreies Testsystem zur Bestimmung der $\gamma$ -Sekretase Aktivität

In der Entstehung der Alzheimer Erkrankung wird im Zuge der Amyloid-Hypothese die Bildung von A $\beta$  als der zentrale Faktor angesehen (s. Einleitung). Die Preseniline sind für die physiologische Entstehung von A $\beta$  notwendig. Dies wurde einerseits in Untersuchungen mit Neuronen von Mäuseembryonen deutlich, bei denen das *PS-1*-Gen auf gentechnischem Wege ausgeschaltet wurde, und dadurch keine A $\beta$  Bildung beobachtet wurde (De Strooper *et al.*, 1998; Naruse *et al.*, 1998). Andererseits zeigte ein Austausch von konservierten Aspartate in den Presenilinen einen dominant negativen Effekt, indem die A $\beta$  Bildung in rekombinanten Zellen vollkommen verhindert werden konnte (Steiner *et al.*, 1999; Wolfe *et al.*, 1999). Zur Etablierung eines zellfreien  $\gamma$ -Sekretase Testsystems müßten also zunächst zwei Voraussetzungen erfüllt werden. Zum einen müßte ein geeignetes Substrat der  $\gamma$ -Sekretase vorliegen und zum anderen müßte in der gleichen Fraktion die Preseniline vorhanden sein. Darüber hinaus konnte in der Arbeitsgruppe von K. Beyreuther gezeigt werden, daß für eine A $\beta$  Bildung das Substrat der  $\gamma$ -Sekretase unbedingt als transmembranes Peptid in der Membran verankert sein muß (Dyrks *et al.*, 1992). Deshalb mußte zur Etablierung eines zellfreien  $\gamma$ -Sekretase Testsystems ein Membransystem etabliert werden, das die genannten Voraussetzungen erfüllt.

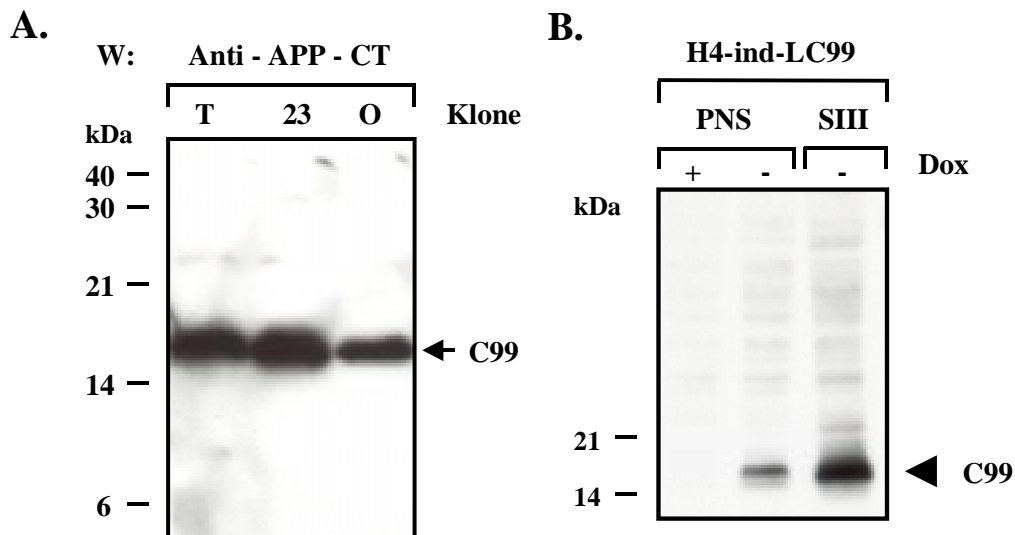
In einem ersten Schritt wurde zur Bereitstellung des transmembranen  $\gamma$ -Sekretase-Substrates humane Neurogliomazellen stabil mit einem N-terminal verkürzten APP-Konstrukt transfiziert, das nur die letzten 99 Nukleotide des APP enthielt (C99). Ein hochexprimierender Zellklon wurde in einem zweiten Schritt ausgesucht, um über eine biochemische Fraktionierung Membranen anzureichern, die das Substrat der  $\gamma$ -Sekretase und die Preseniline enthielten. Zur Etablierung eines zellfreien  $\gamma$ -Sekretase Testsystems wurde schließlich in einem letzten Schritt diese Fraktion mit einem geeigneten Puffersystem inkubiert und die  $\gamma$ -Sekretaseaktivität indirekt über die zellfreie Bildung des Proteolyseproduktes A $\beta$  bestimmt.

### 4.6.1 Induzierbare Expression von LC99 in H4 Neurogliomazellen

Als Substrat der  $\gamma$ -Sekretase wurde bisher in Zellkultur-Systemen entweder das gesamte APP oder das, durch den proteolytischen Schnitt der  $\beta$ -Sekretase entstehende C-terminale Fragment (C99) von APP (s. Einleitung) eingesetzt. Die Verwendung des C99 als Substrat der  $\gamma$ -Sekretase bietet den Vorteil, gegenüber dem Gesamt-APP, daß in einem zellfreien System nur noch die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität zur Generierung von A $\beta$  notwendig ist. Um eine richtige Membranverankerung des Substrates zu gewährleisten, wurde durch gentechnische Verfahren vor die C99 kodierenden Nukleotide die humane APP Signalsequenz wie beschrieben angehängt (Shoji *et al.* 1992, s.Methode 3.5-3.5.5). Dadurch entstand ein Fusionsprotein (LC99), das aus N-terminaler Signalsequenz und den letzten 99 Aminosäuren des APP bestand. Die für das Fusionsprotein kodierende Sequenz wurde in H4-Zellen

stabil integriert. Es stellte sich in drei unabhängigen Transfektionsansätzen heraus, daß nach der Einzelzellklonierung nur sehr schwach exprimierende Zellklone identifiziert wurden (s.Methode 3.2-3.3). Deshalb wurde eine induzierbare Expression des LC99 mit dem Tet-Off System etabliert (Gossen und Bujard, 1995). Dazu wurde das LC99 über die Restriktionsendonukleaseschnittstellen BamHI und SacII in den Vektor pUHD10-3 kloniert und in H4 Zellen, die schon stabil das Regulatorplasmid des Tet-Off Systems ,pUHD15-1neo, ins Genom integriert hatten, stabil transfiziert (s.Methode 3.2-3.5). Einzelne rekombinante Zellklone wurden vor jeder Analyse neu ausgesät und zur Induktion der Expression für drei Tage ohne Doxyzyklin im Medium kultiviert. Die induzierbare Expression des LC99 wurde über Immunfluoreszenz und Westernblot Verfahren mit dem Antikörper 5818 gegen den C-Terminus des APP überprüft (s.Methode 3.2-3.3). In ausgesuchten Zellklonen, die in einer Immunfluoreszenzanalyse eine Expression des C99 gezeigt hatten, wurde die Expression des rekombinanten, induzierten C99 auch im Westernblot bestätigt (Abb.18 A).

Zusätzlich wurden diese Ergebnisse durch eine Reklonierung der drei Zellklone mit der höchsten C99-Expression nochmals überprüft. Die Induzierbarkeit der C99 Expression wurde mit Doxyzyklin als Transaktivatorligand untersucht. Der Zellklon mit der höchsten C99 Expression wurde drei Tage mit oder ohne Doxyzyklin im Medium kultiviert (Abb.18; Klon23). Anschließend wurde das rekombinante C99 in Detergenz-Zellysaten im Westernblot-Verfahren nachgewiesen (Abb.18 B). In 30µg Zellysat der nicht-induzierten H4 Zellen konnte das endogene C99 nicht nachgewiesen werden (Abb.18 B). Dieser Zellklon, der das C99 induzierbar und in großen Menge exprimieren konnte, wurde H4-ind-LC99 Klon 23 genannt.



**Abb. 18 : Induzierbare Expression von LC99 in H4 Neurogliomazellen**

Die letzten 99 Aminosäuren des APP (C99) wurden mit dem Tet-Off-System (Gossen und Bujard, 1992) induzierbar in H4 Neurogliomazellen exprimiert. Die Zellklone wurden zur Expression des LC99 für drei Tage ohne Doxycyclin im Medium kultiviert. Nach einer Detergenzlyse der Zellen wurden Aliquots (30µg) auf ein 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert.

A) Vergleich des C99 Expressionsniveaus in verschiedenen Neuroglioma- Zellklonen

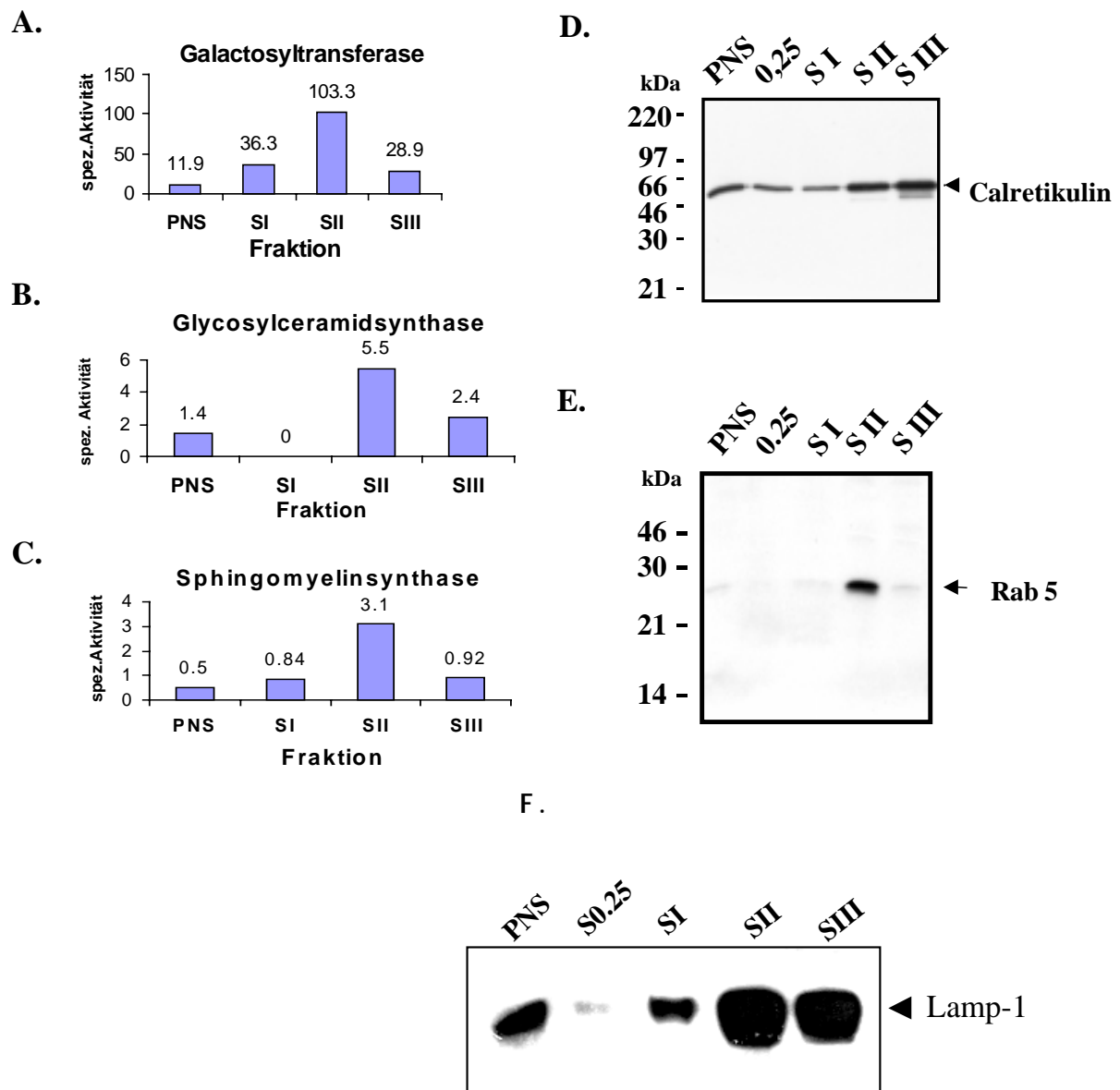
Die Expressionsniveaus des C99 in ausgewählten Zellklone, die bereits in einer Immunfluoreszenz- Analyse die Expression des rekombinanten Peptides gezeigt hatten, wurden auch über Westernblot- Analysen verglichen. Die Membran wurde dazu mit dem APP C-terminal spezifischen Antikörper 5818 hybridisiert.

B) Induzierbare Expression von LC99 durch Entzug des Doxycyclins

Zur Bestimmung der Induzierbarkeit der Expression des LC99 wurde PNS vom Zellklon 23 (A Spur 2) präpariert, der in An- und Abwesenheit von Doxycyclin kultiviert worden war. Die Westernblot- Analyse wurde wie unter A beschrieben mit dem Antikörper 5818 durchgeführt. Als Vergleich der Anreicherung wurde die SIII-Fraktion aus der Fraktionierung der H4-ind-LC99 Zellen mit aufgetragen (s.Abb 20).

#### 4.6.2 Fraktionierung von H4-ind-LC99 Zellen

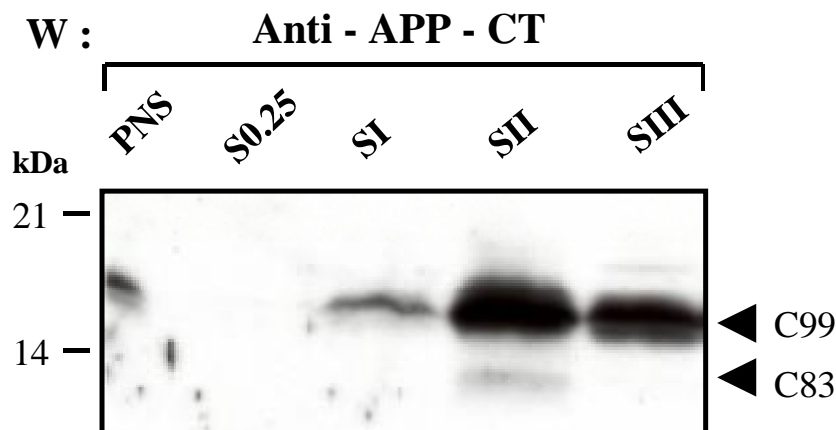
Die H4-ind-LC99 Zellen wurden zur biochemischen Fraktionierung über einen Saccharosestufengradienten eingesetzt. Diese Fraktionierung wurde vergleichbar mit der Methode der Meerschweinchen Leberfraktionierung durchgeführt (s. 4.2). Dadurch sollte eine Membranfraktion isoliert werden, in der sowohl das C99 als auch die Preseniline angereichert sind. Diese Membranen sollten dann wie beschrieben (s.4.4) zur Etablierung eines zellfreien  $\gamma$ -Sekretase Testsystems eingesetzt werden. Auch nach dieser Fraktionierung wurde die Verteilung und Anreicherung der Zellkompartimente über „Markerproteine“ dargestellt.



**Abb. 19 : Charakterisierung des Saccharose-Stufengradienten mit H4-ind-LC99 Zellen**

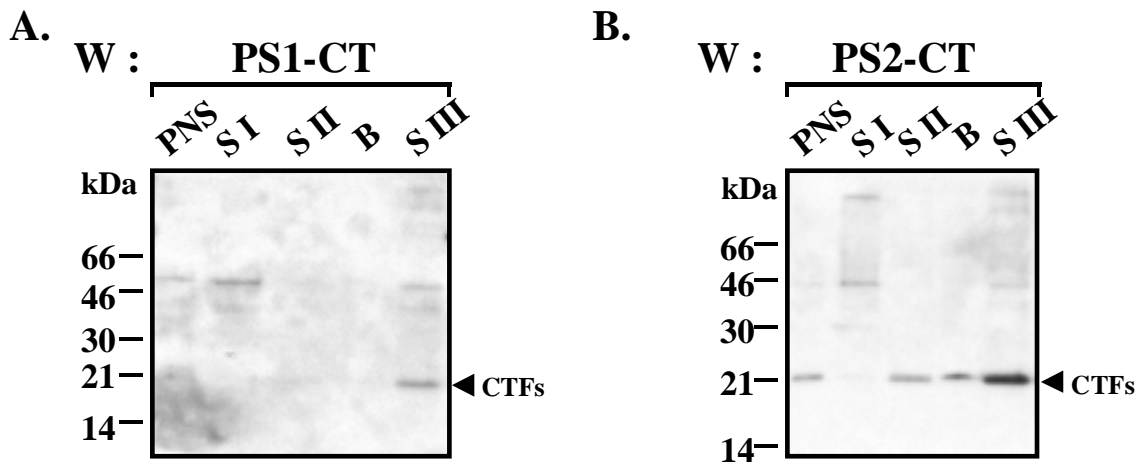
Mit dem PNS aus H4-ind-LC99 Zellen wurde ein Saccharose-Stufengradient durchgeführt (s.Methode) und die Verteilung verschiedener Kompartimente der Zelle über kompartiment- spezifische „Markerproteine“ bestimmt. (A,B,C) Von dem PNS und den einzelnen Interphasen des Gradienten wurde die Verteilung von Golgi-Membranen durch Enzymaktivitäten spezifischer, residenter Golgizyme bestimmt. Westernblot-Analysen wurden mit 30 µg Gesamtprotein der jeweiligen Fraktion und einer 12 % SDS - PAGE durchgeführt.(D) Zur Bestimmung der Verteilung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) wurde ein Westernblot mit Antikörpern gegen das lumenale ER-Protein Calretikulin durchgeführt. (E) Die Verteilung von endosomalen Vesikeln wurden mit Anti-Rab5 Antikörpern im Westernblot bestimmt. (F) Die Verteilung der Lysosomen wurde über den Nachweis des lysosomalen Proteins LAMP-1 nachgewiesen (s.Material 2.5).

Für diese Analysen wurden ausschließlich die Interphasen des Gradienten entnommen, da der Proteingehalt der anderen Fraktionen zu gering war. Die Verteilung der residenten Golgienzyme Sphingomyelinsynthase (Golgi), Glykosylceramidsynthase (cis-Golgi) und Galaktosyltransferase (trans-Golgi) wurden wieder über Enzymaktivitäten bestimmt. Im Westernblot wurde die Verteilung von Endosomen mit Hilfe von Antikörper gegen Rab5 und von Mikrosomen über den Nachweis von Calretikulin ermittelt. Lysosomale Membranen wurden über das Protein LAMP-1 (lysosomal-associated membrane protein-1) im Westernblot nachgewiesen. Neben einem geringen Anreicherungsgrad an Golgiproteinen (drei bis fünffach gegenüber dem PNS) waren Rab5 positive Endosomen ausschließlich in der SII-Fraktion angereichert (Abb.19). Obwohl die ER-Membranen über den ganzen Gradienten verteilt waren, zeigte die SIII-Fraktion das stärkste Signal (Abb.19 D), so daß diese Fraktion die mikrosomale Fraktion genannt wurde. Das rekombinante C99 war zudem in der Fraktionen SII und der mikrosomalen Fraktion SIII stark angereichert (Abb.20). In dieser Fraktion wurden jedoch auch Lysosomen nachgewiesen (Abb.19 F). In der mikrosomalen Fraktion SIII waren auch beide endogenen Preseniline über den Nachweis ihrer C-terminalen Fragmente angereichert (Abb.21).



**Abb. 20 : Verteilung von C99 aus H4-ind-LC99 Zellen im Saccharose-Stufengradienten**

Mit dem PNS aus H4-ind-LC99 Zellen wurde ein Saccharose-Stufengradient durchgeführt (s.Methode 3.7.1). Aliquots (30µg) des PNS und der Interphasen des Gradienten (SI-SIII) wurden auf eine 12 % SDS - PAGE aufgetragen und die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Expression des C99 und dessen Verteilung im Gradienten wurde durch einen Westernblot mit dem APP C-terminal spezifischen Antikörper 5818 bestimmt. Die ursprüngliche PNS Fraktion im Gradienten wurde nach der Zenrifugation zur Westernblot-Analyse als Fraktion S0.25 bezeichnet. Das C83 ist das aus C99 entstandene  $\alpha$ -Sekretaseprodukt.



**Abb. 21: Verteilung der Preseniline im Saccharose-Stufengradienten mit H4-ind-LC99**

#### Zellen

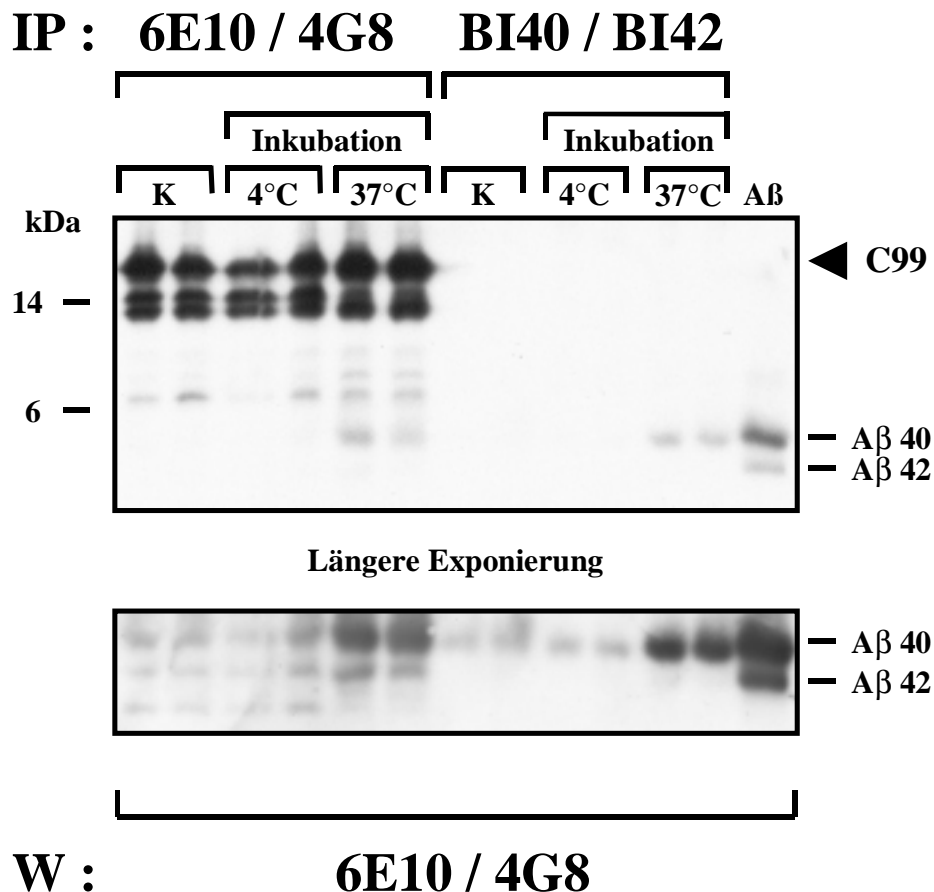
Mit dem PNS aus H4-ind-LC99 Zellen wurde ein Saccharose-Stufengradient durchgeführt (s.Methode 3.7.1). 30 µg Gesamtprotein der jeweiligen Fraktion wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Verteilung der Preseniline wurde über die C-terminalen Fragmente im Gradienten nachgewiesen. Für PS1 wurde dafür der „Loop“-spezifische Antikörper 5023 (A) und für PS2 der „Loop“-spezifische Antikörper BI.HF5C (B) eingesetzt.

Zusammengenommen ergab die Fraktionierung der H4-ind-LC99 Zellen durch einen Saccharosestufengradienten eine Membranfraktion, in der sowohl das  $\gamma$ -Sekretase-Substrat C99 als auch beide Preseniline angereichert worden waren. In dieser Fraktion wurden mikrosomale Membranen angereichert. Sie enthielt darüberhinaus Lysosomen, dagegen waren Endosomen nicht nachzuweisen. Damit erfüllte die mikrosomale Fraktion alle Voraussetzungen, um zur Etablierung eines zellfreien  $\gamma$ -Sekretase Testsystem eingesetzt zu werden.

#### 4.6.3 Das zellfreie Testsystem

Die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität wurde bisher nur in Zellkultursystemen indirekt über die Sezernierung des Proteolyseproduktes A $\beta$  bestimmt (Tischer und Cordell, 1996; Lichtenthaler *et al.*, 1997; Schrader-Fischer *et al.*, 1997). Es kann dabei jedoch nicht ermittelt werden, ob ein vermuteter  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor das Enzym direkt inhibiert. Er könnte auch indirekt zum Beispiel durch die Beeinflussung des intrazellulären Transportes eine Minderung der A $\beta$  Bildung oder Sezernierung herbeiführen. Ein zellfreies System zur Bestimmung der  $\gamma$ -Sekretase Aktivität, das ohne gerichteten Transport funktionierte, würde eine Aktivitätsbestimmung ohne diese zellulären Einflüsse möglich machen. Damit könnten spezifische Inhibitoren der  $\gamma$ -Sekretase ermittelt werden. Zusätzlich ermöglicht ein zellfreies System erste Untersuchungen zum Proteasemechanismus über die Sensitivität des Enzyms gegenüber allgemeinen Proteaseinhibitoren. Eine genaue biochemische Charakterisierung des Enzyms wird jedoch

erst möglich, wenn es in gereinigter Form vorliegt. Die zellfreie Bestimmung der  $\gamma$ -Sekretaseaktivität schafft darüber hinaus aber noch die Voraussetzung, um die Aktivität des Enzyms bei klassisch biochemischen Aufreinigungsmethoden zu verfolgen. Damit würde eine mögliche Alternative zu einem genetischen Ansatz geschaffen.



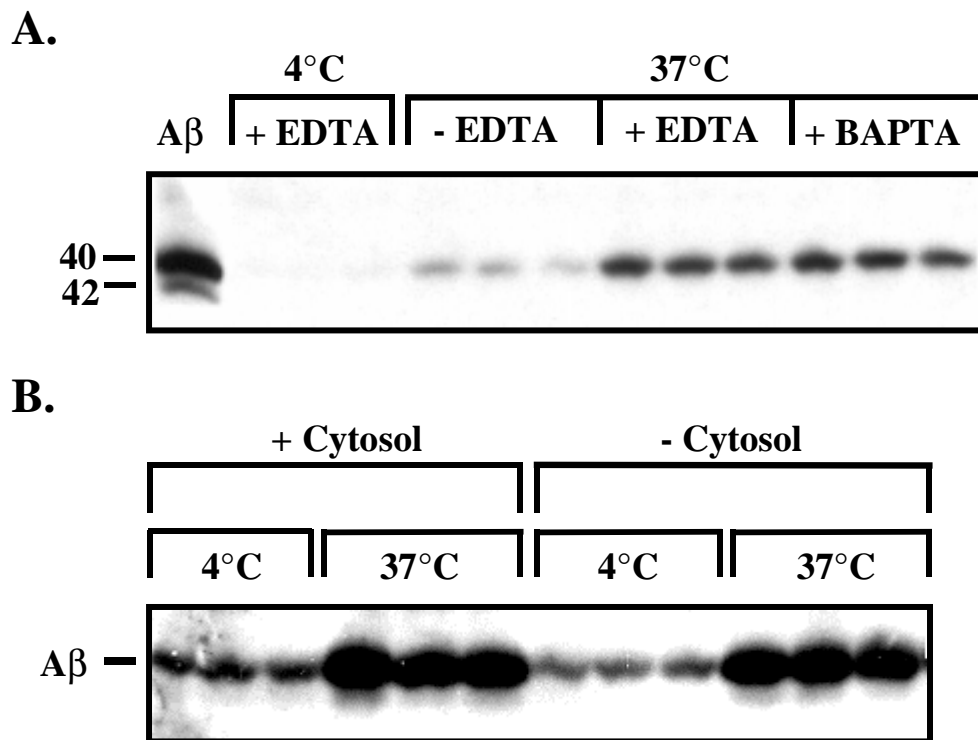
**Abb. 22 : Zellfreie Generierung von A $\beta$  40 und A $\beta$  42 aus isolierten Mikrosomen der H4-ind-LC99 Zellen**

*De novo* A $\beta$  Entstehung im zellfreien System mit isolierten Mikrosomen aus H4 Zellen, die mit den Nukleotiden für APP-LC99 stabil und induzierbar transfiziert wurden. Mikrosomen wurden wie beschrieben präpariert und bei 37°C unter Standardbedingungen (4 Stunden; pH6,8; 5mM EDTA) inkubiert. Nach der Inkubation wurde A $\beta$  entweder durch 6E10/4G8 oder durch die spezifischen Antikörper BI.40 und BI.42 präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden in einem Tris-Bicine Gelsystem aufgetrennt und danach auf eine Nitrocellulose-Membran transferriert (Klafki *et al.*, 1996). Das präzipitierte A $\beta$  wurde mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 (Kim *et al.*, 1990) in einem hochsensitiven Westernblot-Verfahren nachgewiesen (Ida *et al.*, 1996). Um den basalen intrazellulären A $\beta$  Gehalt der H4-ind-LC99 Zellen zu bestimmen, wurden Immunpräzipitationen direkt mit der bei -80°C gelagerten mikrosomalen Fraktion durchgeführt (Spuren K). Das Ausgangssubstrat C99 (Dreieck) wurde nicht von den spezifischen Antikörper BI.40 und BI.42 erkannt. Die untere Abbildung ist eine längere Exposition des unteren Drittel der oberen Abbildung.



Durch die Anreicherung des  $\gamma$ -Sekretase Substrates C99 und der Preseniline in der Mikrosomenfraktion aus H4-ind-LC99 Zellen wurden alle Voraussetzungen geschaffen, um daraus ein zellfreies  $\gamma$ -Sekretase Testsystem zu etablieren. Dazu wurde die mikrosomale Fraktion SIII mit einem geeigneten Puffersystem bei 37°C inkubiert. Die  $\gamma$ -Sekretaseaktivität wurde anschließend indirekt über die Bildung des proteolytischen Produktes A $\beta$  bestimmt. Dieser Nachweis erfolgte durch eine Immunpräzipitation des A $\beta$  mit Antikörpern spezifisch gegen das C-terminale Ende der beiden Spezies A $\beta$  40 und A $\beta$  42 mit anschließender Auftrennung der präzipitierten Proteine in einem Tris-Bicine Gelsystem (Klafki *et al.*, 1997) und einem angeschlossenen sensitiven Westernblot (Ida *et al.*, 1997; s. Methode 3.6.6.2). Als Kontrolle jeder Inkubationreihe diente ein Ansatz bei 4°C, der genauso lange inkubiert wurde wie die 37°C Proben. Als Größenstandard der beiden A $\beta$  Spezies wurden in jeder Gelelektrophorese synthetische A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 Peptide verwendet (Abb. 22).

In den ersten Ansätzen konnte eine *de novo* Entstehung von A $\beta$  bei einer Inkubation bei 37°C festgestellt werden (Abb. 22). Demgegenüber fand bei einer Inkubation bei 4°C keine *de novo* Entstehung von A $\beta$  statt. Durch Variationen in den Inkubationsbedingungen zeigte sich, daß bei Anwesenheit von Chelatbildnern wie EDTA während der Inkubation die Ausbeute an nachweisbarem, *de novo* gebildetem A $\beta$ , drastisch gesteigert werden konnte. Das gleiche Ergebnis wurde auch unter Anwesenheit des spezifischen Calciumchelators BAPTA gemacht (Abb. 23 A). Aus diesem Grund wurden alle Inkubationen mit 5 mM EDTA im Reaktionspuffer durchgeführt (s. Methode 3.8.5). Da Transportprozesse zwischen Membranen ATP abhängig sind, werden sie unter EDTA Einfluß gehemmt. Ein Transport zwischen Membranen ist einerseits energieabhängig, andererseits sind zusätzlich cytosolische Kofaktoren notwendig (Lupashin *et al.*, 1996). Um letztendlich auszuschließen, daß ein Cytosol- und ATP-abhängiger Transport an der A $\beta$  Bildung beteiligt war, wurden Inkubationen mit und ohne Cytosol aus H4-ind-LC99 Zellen bzw. ATP regenerierendem System, in der Fähigkeit A $\beta$  zu bilden, verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, daß ein Cytosol und ATP abhängigiger Transport nicht für die A $\beta$  Bildung notwendig war. Außerdem beeinflussten cytosolische Faktoren die zellfreie A $\beta$  Bildung nicht (Abb. 23 B). Durch die Fraktionierung der Meerschweinchenleber wurden Golgi-Membranen in der Fraktion SGF1 angereichert, die im hohen Maße PS-2 Fragmente enthielten (s. 4.2).



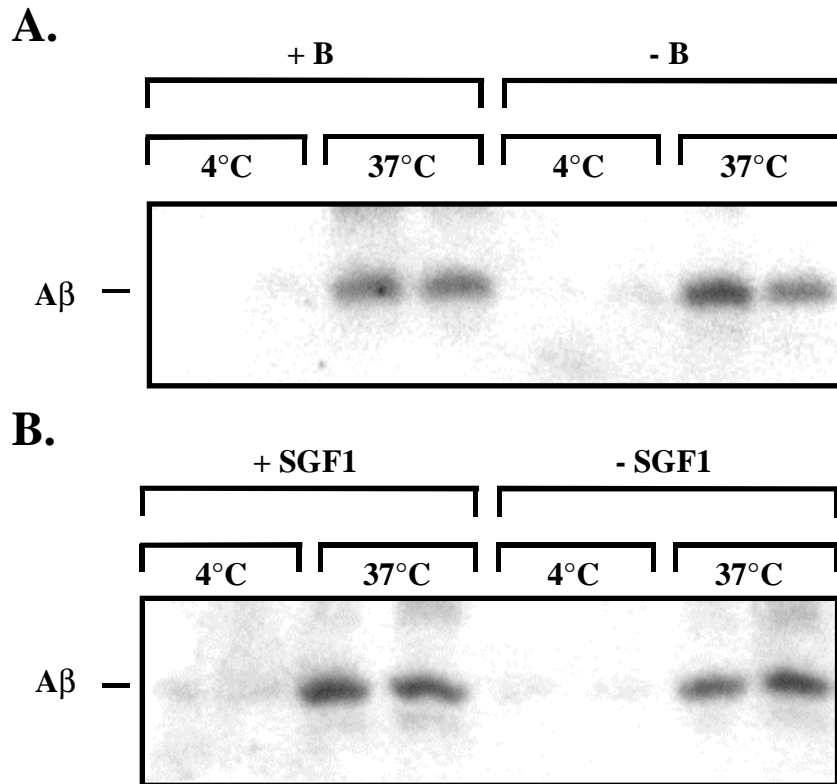
**Abb. 23 : Einfluß von Cytosol und Chelatbildnern auf die zellfreie A $\beta$  Entstehung**

Mikrosomen wurden wie beschrieben aus H4-ind-LC99 Zellen präpariert und bei 37 °C oder 4 °C unter neutralen Bedingungen inkubiert. Die mikrosomalen Membranen wurden in An- oder Abwesenheit von Kationenchelatoren, wie EDTA und BAPTA, bei 37°C inkubiert (A). Als Kontrolle wurden die mikrosomalen Membranen bei 4°C in der Anwesenheit von EDTA inkubiert. Alle Ansätze wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Der Einfluß von Cytosol auf die A $\beta$  Entstehung wurde durch An- oder Abwesenheit von Cytosol aus der Meerschweinchenleber während der Inkubationen untersucht (B).

A $\beta$  wurde nach der Inkubation mit den hochspezifischen Antikörpern BI.40 und BI.42 präzipitiert und die Proteine über ein Tris-Bicine Polyacrylamid-Gelsystem aufgetrennt (Klafki *et al.*, 1996). Die beiden A $\beta$  Spezies wurden anschließend mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 (Kim *et al.*, 1990) über einen hochsensitiven Westernblot nachgewiesen (Ida *et al.*, 1996).

Um zu überprüfen, ob das PS-2 aus dieser Golgifraktion die beobachtete *de novo* Entstehung von A $\beta$  stimulieren konnte, wurde diese Fraktion zusammen mit der SIII Fraktion der H4-ind-LC99 Zellen inkubiert. Dabei gab es jedoch keinen Unterschied in der A $\beta$  Entstehung zwischen einem Ansatz mit Golgi-Fraktion und der Inkubation nur mit mikrosomalen Membranen der H4-ind-LC99 Zellen (Abb. 18).



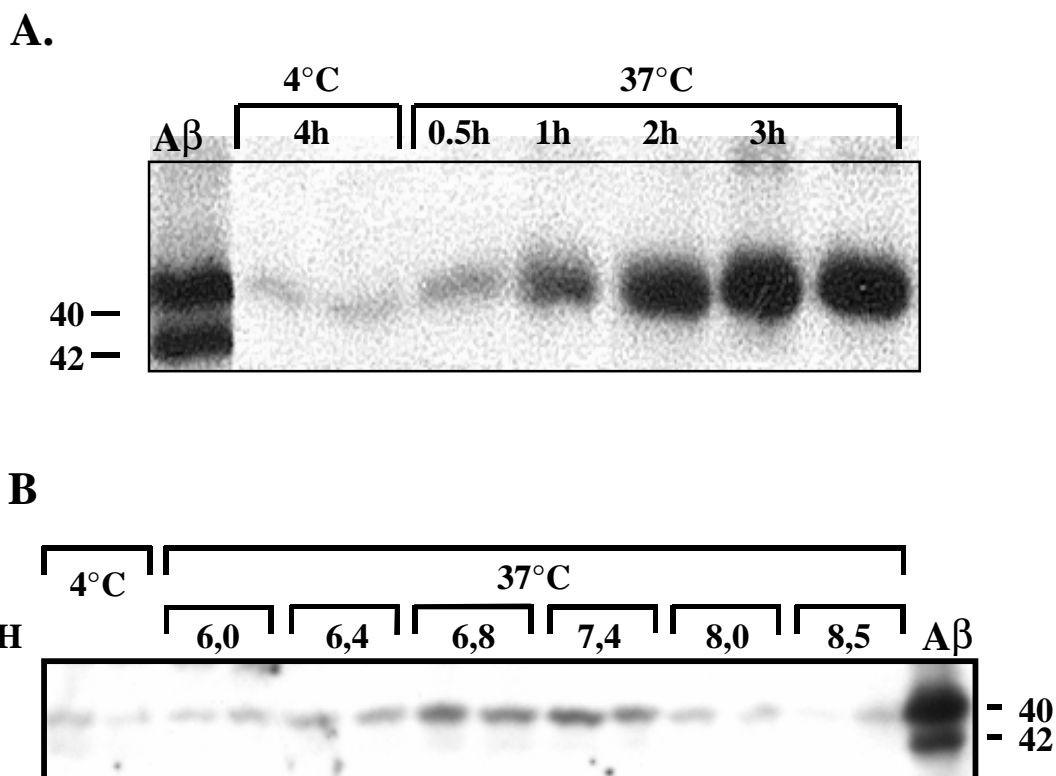
**Abb. 24 : Zellfreie A $\beta$  Generierung ohne Beteiligung von Membranen aus dem Meerschweinchen**

Mikrosomen wurden wie beschrieben aus H4-ind-LC99 Zellen präpariert und bei 37 °C oder 4 °C unter neutralen Bedingungen inkubiert. Die A $\beta$  Entstehung wurde unter An- oder Abwesenheit einerseits der Membranen der Golgifraktion (s. Abb. 11 und 14) aus der Leberfraktionierung (A) und andererseits der Fraktion B aus der Cortex und Hippocampus Fraktionierung (s. Abb. 11 und 15) vom Meerschweinchen (B) durchgeführt. A $\beta$  wurde nach der Inkubation mit den hochspezifischen Antikörpern BI.40 und BI.42 präzipitiert und die Proteine über ein Tris-Bicine Polyacrylamid-Gelsystem aufgetrennt (Klafki *et al.*, 1996). Die beiden A $\beta$  Spezies wurden anschließend mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 (Kim *et al.*, 1990) über einen hochsensitiven Westernblot nachgewiesen (Ida *et al.*, 1996).

Geringe Mengen an A $\beta$  waren auch in den Kontrollansätzen (4°C Inkubation) nachzuweisen. Es handelte sich hier bei um A $\beta$ , das schon vor der Präparation der Mikrosomenfraktion in den H4-ind-LC99 Zellen aus dem C99 gebildet worden war (Abb. 22; Spur 1 und 2). Auffällig im zellfreien Ansatz war der geringe proteolytische Umsatz des Substrates C99 in A $\beta$  (Abb 22; Spuren 5,6). Dieser Ansatz zeigte weiterhin deutlich die Spezifität der monoklonalen Antikörper BI.40 und BI.42, die spezifisch

gegen den C-Terminus von A $\beta$  40 bzw. A $\beta$  42 gerichtet sind (Abb. 22). Diese Antikörper erkannten im Gegensatz zu den Antikörpern 6E10 und 4G8, die auch das Substrat C99 und kleinere N-terminal verkürzte APP-Fragmente präzipitierten (Abb.22; Spuren 5,6 und 11,12) nur das A $\beta$  mit dem spezifischen Ende auf Aminosäure 40 oder 42. Dabei präzipitierte der Antikörper BI.42 sein Antigen A $\beta$ 42 wesentlich schlechter (Abb.22; Spuren 11,12) als die Antikörper 6E10 und 4G8 (Abb.22; Spuren 5,6).

Durch verschieden lange Inkubationen der mikrosomalen Fraktion konnte festgestellt werden, daß die zellfreie A $\beta$  Bildung zeitabhängig war und nach drei bis vier Stunden ein Optimum erreichte (Abb.25 A).

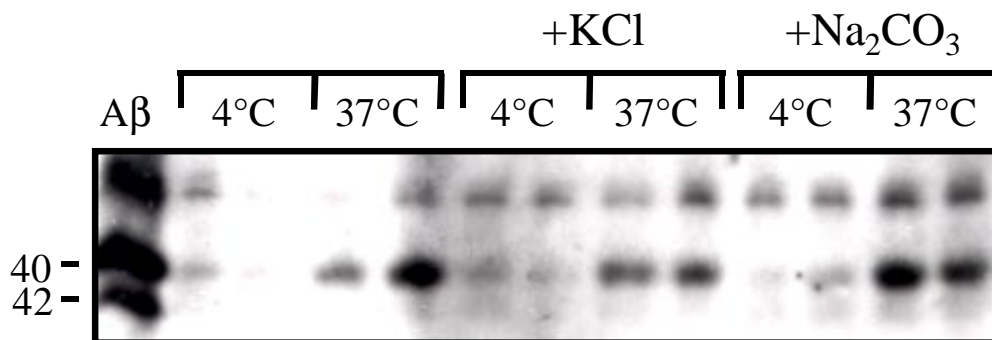


**Abb. 25 : Zeit- und pH-Abhängigkeit der *de novo* Entstehung im zellfreien System**

Die mikrosomale Fraktion wurde wie beschrieben präpariert (s.Methode 3.8.1) und unter Standardbedingungen (4 Stunden; 5mM EDTA; pH 6,8) bei 4°C oder 37°C inkubiert. A $\beta$  wurde nach der Inkubation mit den hochspezifischen Antikörpern BI.40 und BI.42 präzipitiert und die Proteine über ein Tris-Bicine Polyacrylamid - Gelsystem aufgetrennt (Klafki *et al.*, 1996). Die beiden A $\beta$  Spezies wurden anschließend mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 (Kim *et al.*, 1990) über einen hochsensitiven Westernblot nachgewiesen (Ida *et al.*, 1996). Synthetische A $\beta$  40 und A $\beta$  42 Peptide wurden als Standard verwendet. (A) Die zellfreie  $\gamma$ -Sekretase Aktivität wurde nach den angegebenen Zeitpunkten durch die Zugabe von 2% SDS gestoppt und das A $\beta$  in IP-Puffer wie angegeben präzipitiert (s.Methode 3.8.5). (B) Die mikrosomale Membranen wurden mit den geeigneten Puffersystemen mit den angegebenen pH-Werten als Doppelbestimmungen inkubiert. Die pH-Werte wurden in jedem Testgefäß nochmals bestätigt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es gelungen war, ein zellfreies System zu etablieren, in dem eine *de novo* Entstehung von A $\beta$  nachgewiesen werden konnte. Diese A $\beta$  Bildung war einerseits unabhängig von cytosolischen Faktoren und ATP und andererseits war sie steigerbar durch die Zugabe von chelatbildenden Agenzien.

Mit Hilfe des Systems zur zellfreien Bildung von A $\beta$  konnten die biochemischen Eigenschaften der  $\gamma$ -Sekretase erstmals ohne zelluläre Einflüsse näher untersucht werden. Das pH-Optimum der  $\gamma$ -Sekretase Aktivität im zellfreien System lag im neutralen Bereich (pH 6,8-7,4). Sowohl ein schwach saurer pH (6,0-6,4) als auch ein schwach alkalischer pH (8,0-8,4) hatten eine drastische Reduktion der  $\gamma$ -Sekretaseaktivität zur Folge (Abb.25 B).



**Abb. 26 : Die  $\gamma$ -Sekretase ist eine transmembrane Protease**

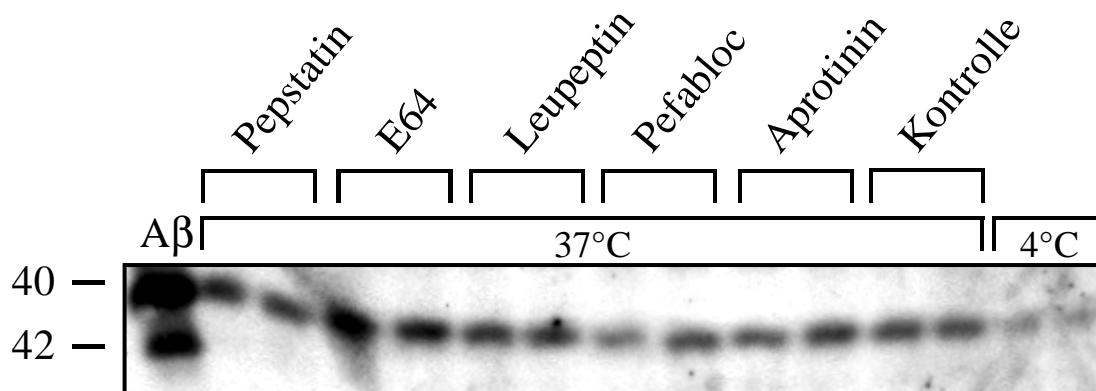
Die mikrosomale Fraktion wurde wie beschrieben präpariert (s.Methode) und unter Standardbedingungen (4 Stunden; 5mM EDTA; pH 6,8) bei 4°C oder 37°C inkubiert. Die mikrosomalen Membranen wurden vor der Inkubation entweder mit KCl-Puffer behandelt oder mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer extrahiert (s.Methode). A $\beta$  wurde nach der Inkubation mit den hochspezifischen Antikörpern BI.40 und BI.42 präzipitiert und die Proteine über ein Tris-Bicine Polyacrylamid - Gelsystem aufgetrennt (Klafki *et al.*, 1996). Die beiden A $\beta$  Spezies wurden anschließend mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 (Kim *et al.*, 1990) über ein hochsensitiven Westernblot nachgewiesen (Ida *et al.*, 1996). Synthetische A $\beta$  40 und A $\beta$  42 Peptide wurden als Standard verwendet.

Bei Beginn der Experimente war nicht bekannt, ob die  $\gamma$ -Sekretase eine cytosolische, membranassoziierte oder transmembrane Protease ist. Um diese Frage näher zu untersuchen, wurde die Mikrosomenfraktion SIII vor der Inkubation mit einer 1 molaren KCl-Lösung behandelt oder mit einem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer extrahiert (s. Methode 3.8.4). Anschließend wurden die aus einem Ansatz stammenden unbehandelten, behandelten oder extrahierten Membranen auf die *de novo* A $\beta$  Bildung durch Inkubation bei 37°C verglichen. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den drei Membranfraktionen in bezug auf die A $\beta$  Bildung festgestellt werden (Abb. 26). Das Experiment wurde zur Überprüfung der

Reproduzierbarkeit viermal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt. Dieser Versuchsansatz zeigte damit deutlich, daß die Behandlung der Mikrosomenmembranen mit KCl- oder  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffer auf die  $\gamma$ -Sekretaseaktivität keinen Einfluß hatte.

Die weitere biochemische Charakterisierung ergab somit, daß die  $\gamma$ -Sekretase eine transmembrane, oder zumindest stark membranassoziierte Protease ist, die ihr pH- Optimum im neutralen Bereich hat.

Um über den Proteasemechanismus der  $\gamma$ -Sekretase näheren Aufschluß zu erhalten, wurden verschiedene kommerziell erhältliche Proteaseinhibitoren in dem zellfreien Testsystem eingesetzt und anschließend deren Einfluß auf die *de novo* Entstehung von A $\beta$  ermittelt. Mit den Proteaseinhibitoren wurden alle vier bekannten Klassen von Proteasen abgedeckt. Es stellte sich jedoch heraus, daß alle getesteten Proteaseinhibitoren keine Wirkung auf die zellfreie Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase hatten. Damit wurde deutlich, daß kein klassischer Proteasemechanismus alleine für die zellfreie Entstehung von A $\beta$  verantwortlich war (Abb. 27).



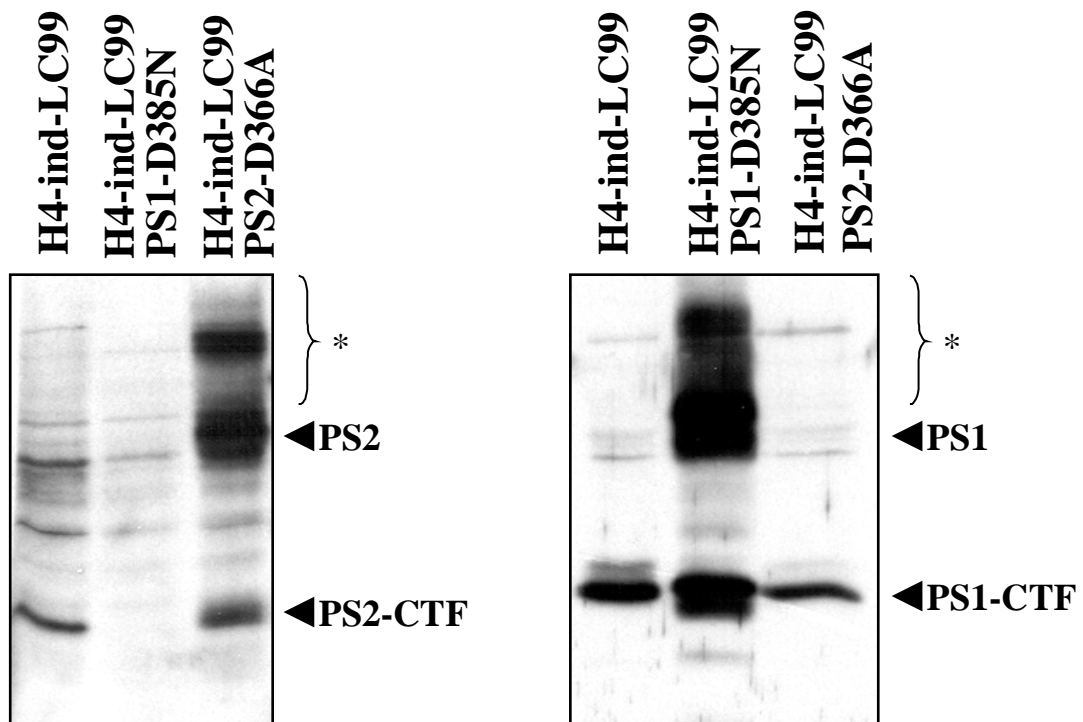
**Abb. 27 : Der zellfreien A $\beta$  Entstehung liegt kein allgemeiner Proteasemechanismus zugrunde**

Die mikrosomale Fraktion wurde wie beschrieben präpariert (s.Methode 3.8.1) und unter Standardbedingungen (4 Stunden; 5mM EDTA; pH 6,8) bei 4°C oder 37°C inkubiert. Die angegebenen Proteaseinhibitoren wurden in den entsprechenden Wirkkonzentrationen vor der Inkubation des Ansatzes zugegeben. A $\beta$  wurde nach der Inkubation mit den hochspezifischen Antikörpern BI.40 und BI.42 präzipitiert und die Proteine über ein Tris-Bicine Polyacrylamid - Gelsystem aufgetrennt (Klafki *et al.*, 1996). Die beiden A $\beta$  Spezies wurden anschließend mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 (Kim *et al.*, 1990) über einen hochsensitiven Westernblot nachgewiesen (Ida *et al.*, 1996). Synthetische A $\beta$  40 und A $\beta$  42 Peptide wurden als Standard verwendet.

#### 4.6.4 Einfluß der Preseniline auf die zellfreie $\gamma$ -Sekretase Aktivität

Zur Etablierung eines zellfreien  $\gamma$ -Sekretase Testsystems wurden Membranen aus humanen Neurogliomazellen isoliert, in denen sowohl das  $\gamma$ -Sekretase-Substrat C99 als auch die endogenen Preseniline angereichert worden waren. Die Preseniline sind wie bereits beschrieben für die Bildung von A $\beta$  essentiell (De Strooper *et al.*, 1998; Naruse *et al.*, 1998; Steiner *et al.*, 1999; Wolfe *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, ob sie auch im zellfreien System die beschriebene Aufgabe erfüllen, wurde in einem neuen Ansatz der Einfluß der Preseniline aus der Mikrosomenfraktion der H4-ind-LC99 Zellen auf die *de novo* Entstehung von A $\beta$  untersucht. Dazu wurden zunächst H4-ind-LC99 Zellen mit einem Konstrukt stabil transfiziert, das für PS-1 D385N oder PS-2 D366A kodierte. Durch die Untersuchungen von Wolfe *et al.* und Steiner *et al.* wurde deutlich, daß der Austausch dieser konservierten Aspartate in transfizierten Zellen sowohl die Endoproteolyse der Preseniline, als auch die A $\beta$  Bildung verhinderte (Steiner *et al.*, 1999; Wolfe *et al.*, 1999). Diese PS-Mutationen wirken sich also dominant negativ auf die A $\beta$  Bildung aus. Darüber hinaus konnte bei Überexpression der Preseniline in verschiedenen Zellen mehrfach gezeigt werden, daß die endogenen Preseniline durch rekombinante Proteine ersetzt werden (Thinakaran *et al.*, 1996; Thinakaran *et al.*, 1997; Tomita *et al.*, 1997; Thinakaran *et al.*, 1998; Leimer *et al.*, 1999). Die Regulierung dieses Phänomens ist bis heute noch nicht geklärt. Aufgrund dieser beiden Befunde sollte durch die stabile Überexpression der Presenilin Aspartat-Mutanten ein „funktioneller knockout“ erzeugt werden, der die Spezifität des zellfreien  $\gamma$ -Sekretase Systems belegen sollte.

Nach der Selektion der stabil transfizierten Zellen wurde durch Westernblot-Analysen mit Detergenz-Zellysaten der H4-ind-LC99/ PS-1 D385N bzw. PS-2 D366A Zellen die Expression der rekombinanten Preseniline im Vergleich zu den endogenen Mengen festgestellt (Abb. 28, s. Methode 3.6f.). Die fehlende Endoproteolyse der Presenilin Aspartat-Mutanten wurde dadurch deutlich, daß die Holoprotein mit ca. 46 kDa (PS-2) und ca. 54 kDa (PS-1) stark angereichert wurden (Abb. 28). In den PS-1 D385N Zellen ersetzte das rekombinante PS-1 vollständig das endogene PS-2. Jedoch konnte das endogene PS-1 Fragment nicht von dem rekombinanten Protein reduziert werden. Die Überexpression des PS-2 D366A reichte ebenfalls nicht aus, um die endogene Expression beider Preseniline zu unterdrücken (Abb. 28).

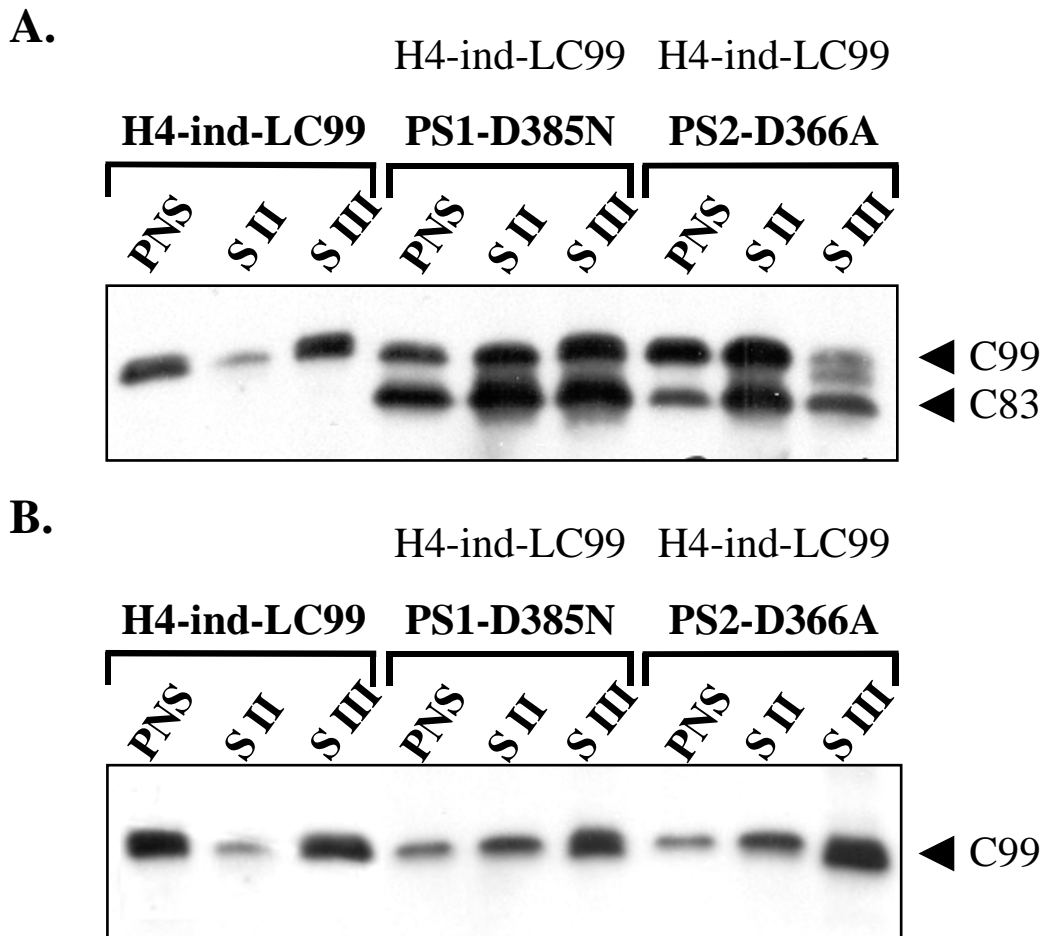


**Abb.22 : Überexpression von PS-1 D385N und PS-2 D366A in H4-ind-LC99 Zellen**

H4-ind-LC99 Zellen wurden stabil entweder mit pcDNA3.1zeoPS-1-D385N oder mit pcDNA3.1zeoPS-2-D366A transfiziert. Nach der Selektion mit Zeocin wurde die Expression der Preseniline mit Detergenzzellysaten (30 $\mu$ g) im Westernblot-Verfahren nachgewiesen. Als Kontrolle der endogenen Expression der Preseniline wurden Zellysate der Ausgangszelllinie mit aufgetragen. Die endogenen Preseniline lagen ausschließlich als Fragmente vor (PS1-CTF; PS2-CTF). Die rekombinanten Preseniline mit den ausgetauschten Aspartate können nicht endoproteolytisch gespalten werden (Wolfe *et al.*, 1999; Steiner *et al.*, 1999) und akkumulieren als ungeschnittene Proteine (PS1; PS2). Höhermolekulare Presenilin Aggregate sind durch die hohe Überexpression bedingt (\*).

Dies könnte einerseits darauf zurückzuführen sein, daß kein einzelner Zellklon vorlag und damit Zellen ohne Expression rekombinanter Preseniline vorhanden waren. Andererseits konnte festgestellt werden, daß die Preseniline mit den ausgetauschten Aspartate bei hoher Überexpression zum Teil noch endoproteolytisch gespalten werden (persönliche Mitteilung C. Haass). Die PS-1 Fragmente könnten also zum Teil auch von dem rekombinanten Protein stammen.





**Abb. 23 : Einfluß der Presenilin Aspartat-Mutanten auf die Verteilung des C99 im Saccharosegradienten**

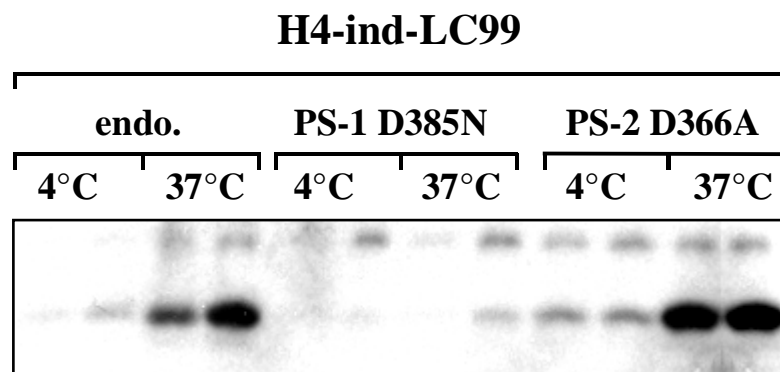
Mit dem PNS aus H4-ind-LC99 Zellen und den entsprechenden PS-1-D385N oder PS-2-D366A Zellen wurde ein Saccharosestufengradient durchgeführt. Um die Verteilung des C99 der drei Zelllinien im Gradienten zu vergleichen, wurden die Proteine (30µg) des PNS und der beiden Interphasen SII und SIII in einem Tris-Tricinegel aufgetrennt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF Membran übertragen und spezifische Proteine im einem Westernblot-Verfahren nachgewiesen. A) C-terminale Fragmente wurden mit dem Antikörper 5818 detektiert. B) Um zu überprüfen, ob die als C83 bezeichnete Bande das Produkt der  $\alpha$ -Sekretase darstellt, wurde die Membran mit dem Antikörper 6E10 rehybridisiert, der nur die ersten 16 Aminosäuren des C99 erkennt.

Die Interphase SIII ist die mikrosomale Fraktion, die zur zellfreien Inkubation eingesetzt wird (s.Abb.30). Es ist zu beachten, daß aufgrund der geringen Proteinkonzentration der SII Fraktion der H4-ind-LC99 Zellen nur 10 µg Gesamtprotein aufgetragen werden konnte.

Aus den H4-ind-LC99/ PS-1 D385N bzw. PS-2 D366A Zellen wurde wie für die H4-ind-LC99 Zellen beschrieben, die mikrosomale Fraktion SIII isoliert (s. 4.4.2). Der Einfluß der Preseniline in der zellfreien Generierung von A $\beta$  wurde durch den Vergleich der A $\beta$  Bildung in dieser Fraktion zur Inkubation der mikrosomalen Fraktion der H4-ind-LC99 Zellen festgestellt. Um zunächst Aufschluß zu bekommen, ob der Austausch der Aspartate in den Presenilinen Einfluß auf den Metabolismus oder auf die zelluläre Lokalisierung des C99 hatte, wurden die Fraktionen des Gradienten in einem Tris-Tricine Gelssystem aufgetrennt und die C-terminalen APP Fragmente mit dem APP C-terminal spezifischen Antikörper 5818 nachgewiesen. Durch die Expression der Preseniline mit Aspartat-Mutation akkumulierte in den Fraktionen SII und SIII im Vergleich zu den Fraktionen der H4-ind-LC99 Zellen das, durch die  $\alpha$ -Sekretase aus C99 entstandene N-terminal verkürzte Fragment C83 (Abb. 29). Durch die Rehybridisierung der Membran mit den Antikörper 6E10, der nur die ersten 16 Aminosäuren des A $\beta$ s erkennt, wurde bestätigt, daß es sich bei dem C-terminalen APP-Fragment um das C83 handelt. Dieses C83-Fragment wurde schon in geringen Mengen in der Fraktionierung der H4-ind-LC99 Zellen in der SII Fraktion nachgewiesen (Abb. 20). Die Ausgangsmenge des Substrates C99 in den SIII-Fraktionen wurde zwischen der Ausgangszelllinie und der Zelllinie mit den PS-Aspartat Mutanten nicht signifikant verändert. Obwohl die rekombinanten Preseniline die endogenen Preseniline in den transfizierten Zellen nicht vollständig ersetzen konnten, war bei beiden Mutanten Presenilinen die in der Literatur beschriebene Akkumulation des C83 Fragmentes festzustellen (Abb. 29). Diese Ergebnisse bestätigen damit Untersuchungen, die zeigten, daß durch die Expression des PS-1 D385N oder des PS-2 D366A vorwiegend das C83 akkumulierte (Steiner *et al.*, 1999; Wolfe *et al.*, 1999).

Die Expression der Proteine PS-1 (D385N) oder PS-2 (D366A) in APP transfizierten 293 Zellen konnte die Bildung von sekretiertem A $\beta$  komplett verhindert (Steiner *et al.*, 1999; Wolfe *et al.*, 1999). Auf der Basis dieser publizierten Daten, sollte die A $\beta$  *de novo* Entstehung im zellfreien System ebenfalls inhibiert werden.

Obwohl in der SIII Fraktion der H4-ind-LC99/PS-1 D385N Zellen gegenüber der SIII Fraktion der H4-ind-LC99 Zellen kein signifikanter Unterschied in der C99 Menge vorlag (Abb. 29), zeigte der Vergleich der A $\beta$  Entstehung durch Inkubation der Mikrosomenfraktionen, daß die Anwesenheit des PS-1 D385N eine drastische Reduktion der zellfreien A $\beta$  *de novo* Entstehung zur Folge hatte (Abb. 30). Für die mikrosomale Fraktion aus H4-ind-LC99/PS-2 D366A konnte im Gegensatz dazu keine Reduktion der A $\beta$  Bildung nach Inkubation bei 37°C im Vergleich zur Mikrosomenfraktion der H4-ind-LC99 Zellen festgestellt werden (Abb. 30). Trotzdem das  $\alpha$ -Sekretaseprodukt C83 in der SIII beider Zelllinien mit Presenilin Aspartat-Mutanten stark angereichert wurde, konnte keine *de novo* Entstehung von P3 festgestellt werden. Da keine allgemeinen Proteaseinhibitoren im zellfreien Ansatz vorhanden waren, könnte dieser Befund auf einen rapiden Abbau des P3 zurückzuführen sein.



**Abb. 24 : Einfluß von PS-1-D385N und PS-2 D366A auf die zellfreie Entstehung von A $\beta$**

Mikrosomen wurden wie beschrieben aus H4-ind-LC99-PS-1 D385N bzw. PS-2 D366A Zellen und H4-ind-LC99 Zellen präpariert und unter Standardbedingungen (4 Stunden; 5mM EDTA; pH 6,8) bei 4°C oder 37°C inkubiert. A $\beta$  wurde nach der Inkubation mit den spezifischen Antikörpern BI.40 und BI.42 präzipitiert und die Proteine über ein Tris-Bicine Polyacrylamid-Gelsystem aufgetrennt (Klafki *et al.*, 1996). Die beiden A $\beta$  Spezies wurden anschließend mit den Antikörpern 6E10 und 4G8 (Kim *et al.*, 1990) über einen hochsensitiven Westernblot nachgewiesen (Ida *et al.*, 1996). Synthetische A $\beta$  40 und A $\beta$  42 Peptide wurden als Standard verwendet.

## 5. Diskussion

Zur Behandlung der Alzheimer Erkrankung werden bereits Acetylcholinesterase-Inhibitoren (z.B. Tacrine) eingesetzt. Außerdem befinden sich verschiedene Substanzen in klinischen Phasen der Entwicklung. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Hemmstoffe allgemeiner endzündlicher Prozesse (COX2-Inhibitoren) oder um Antioxidantien. Alle genannten Substanzen ermöglichen jedoch nur eine symptomatische Behandlung der Alzheimer Erkrankung. Um den progressiven Krankheitsverlauf zu beeinflussen oder sogar aufzuhalten, ist eine frühe Diagnose in Verbindung mit einer kausalen Therapie notwendig. Allerdings sind die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung der Erkrankung führen, nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt verschiedene Hypothesen, die versuchen die Pathogenese der Alzheimer Erkrankung zu erklären, wobei jeweils unterschiedliche auslösende Faktoren postuliert werden. Deshalb ist es notwendig, weiterführende Experimente durchzuführen, die zur Aufklärung dieser pathologischen Mechanismen beitragen und einer der Hypothesen belegt. Dabei nehmen neue *in vitro* und *in vivo* Modelle eine entscheidende Rolle ein.

Eine zur Zeit stark favorisierte Hypothese ist die Amyloid-Hypothese (s.Einleitung). Darin nimmt die Bildung, Aggregation und neurotoxische Wirkung des A $\beta$ -Peptides eine zentrale Rolle in der Entstehung der Alzheimer Erkrankung ein. Da die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität für die Entstehung von A $\beta$  essentiell ist (s.Einleitung), bildet sie einen möglichen Ansatzpunkt, um grundlegend in den Prozeß der A $\beta$  Bildung einzugreifen. Die  $\gamma$ -Sekretase ist allerdings noch nicht identifiziert und kloniert. Jedoch gibt es Hinweise, daß die Preseniline die  $\gamma$ -Sekretasen sein könnten (Wolfe *et al.*, 1999). Diese Theorie, die insbesondere von der Arbeitsgruppe um D.Selkoe vertreten wird, ist zur Zeit stark umstritten. Eindeutig nachgewiesen ist bis heute nur, daß die Preseniline notwendige Faktoren für die Entstehung von A $\beta$  sind (De Strooper *et al.*, 1998; Naruse *et al.*, 1998). Ob sie dabei selbst  $\gamma$ -Sekretase Aktivität besitzen, Aktivoren der  $\gamma$ -Sekretase sind oder Transportproteine darstellen, ist noch völlig offen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde sowohl die subzelluläre Verteilung der endogenen Preseniline untersucht, als auch nach möglichen Interaktionen der Preseniline mit APP Fragmenten gesucht. Es konnte gezeigt werden, daß PS-1 vorwiegend im ER lokalisiert war, wohingegen PS-2 stark im Golgi angereichert war. Weiterhin wurde eine Interaktion der Preseniline mit einem 21 kDa APP Fragment nachgewiesen, wobei die Mutante-Form des Presenilins mehr C-terminalen APP Fragment band als die Wildtyp-Form.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Entwicklung eines zellfreien Systems zur indirekten Bestimmung der  $\gamma$ -Sekretase Aktivität vorgestellt. Mit Hilfe dieses Systems wird es möglich, spezifische Inhibitoren der  $\gamma$ -Sekretase zu identifizieren. Darüber hinaus ermöglicht dieses System indirekt die Untersuchung des Proteasemechanismus der  $\gamma$ -Sekretase über die Sensitivität des Enzyms gegenüber allgemeinen Proteaseinhibitoren. Mit diesem zellfreien  $\gamma$ -Sekretase Systems konnte gezeigt werden, daß

neben A $\beta$ -produzierenden ( $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase) auch A $\beta$ -degradierende Proteasen vorliegen. Zudem wurde ein pH-Optimum im neutralen Bereich für die  $\gamma$ -Sekretase festgestellt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die  $\gamma$ -Sekretase eine transmembrane oder zumindest sehr stark membranassoziierte Protease sein muß, die auch ohne cytosolische Faktoren aktiv ist. Die Spezifität des Testsystems konnte einerseits dadurch deutlich gemacht werden, daß das PS-1, das schon in Zellkultur als essentielle Proteinkomponente zur Entstehung von A $\beta$  beschrieben wurde (De Strooper *et al.*, 1998; Naruse *et al.*, 1998), auch in diesem zellfreien  $\gamma$ - System notwendig ist. Andererseits zeigten allgemeine Proteaseinhibitoren, die alle bekannten Proteasemechanismen abdeckten, keinen Einfluß auf die A $\beta$  *de novo* Entstehung im zellfreien System. Dadurch erscheint eine unspezifische A $\beta$  Entstehung durch lysosomale Proteasen unwahrscheinlich.

## 5.1 Lokalisierung endogener Preseniline

Einige experimentelle Beobachtungen sind nur sehr schwer mit der Hypothese vereinbar, daß die Preseniline, die  $\gamma$ -Sekretasen sind. So konnte die A $\beta$ 40 Entstehung in späten sekretorischen Kompartimenten wie TGN und im endosomalen/lysosomalen System nachgewiesen werden (Koo und Squazzo, 1994; Cook *et al.*, 1997; Hartmann *et al.*, 1997; Wild-Bode *et al.*, 1997). Die Preseniline wurden in Kulturzellen jedoch nicht in post-Golgi Kompartimenten detektiert (Cook *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1996; Kovacs *et al.*, 1996; Elder *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; Walter *et al.*, 1996; De Strooper *et al.*, 1997). Dieses räumliche Paradoxon („spatial paradox“) läßt daher eher die Schlußfolgerung zu, daß die Preseniline indirekt die Bildung von A $\beta$  beeinflussen (Annaert und De Strooper, 1999). Deshalb ist die Untersuchung der intrazellulären Lokalisierung der Preseniline und des APP wichtig, um Hinweise über die Kompartimente zu bekommen, in denen beide Proteine direkt oder indirekt zur Bildung von A $\beta$  führen könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die subzelluläre Verteilung der endogenen Preseniline und des APP in Leber- und Gehirnzellen des Meerschweinchens bestimmt. Dazu wurde eine beschriebene biochemische Fraktionierung, die ursprünglich für die Rattenleber entwickelt wurde (Taylor *et al.*, 1997), auf das Meerschweingewebe übertragen und in unserem Labor etabliert. Die Ergebnisse der Leberfraktionierung zeigten, daß das PS-1 vorwiegend im ER lokalisiert war, wohingegen das PS-2 fast ausschließlich im Golgi zu finden war (Abb. 14). Über die Lokalisierung der Preseniline liegen kontroverse Literaturdaten vor. Durch Kombination von subzellulären Fraktionierungen mit konvokalen mikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, daß die Preseniline in Neuronen im glatten und rauhen ER, im ER-Golgi intermediate Kompartiment (ERGIC) und im cis-Golgi lokalisiert sind (Culvenor *et al.*, 1997; Lah *et al.* 1997). Durch rein immunocytochemische Nachweismethoden in PS überexprimierenden Zellen haben verschiedene Arbeitsgruppen beide Preseniline sowohl im ER, als auch im Golgi lokalisiert (Kovacs *et al.*, 1996; De Strooper *et al.*, 1997). Andere Publikationen zeigen, daß das PS-1 fast ausschließlich im ER lokalisiert

ist (Cook *et al.*, 1996; Takashima *et al.*, 1996; Baumann *et al.*, 1997). In der Arbeit von Zhang *et al.*, wurde die subzelluläre Presenilin Verteilung in transfizierten Zellen ebenfalls mit einer Gradientenzentrifugation untersucht (Zhang *et al.*, 1998). Dabei wurden PS-2 Fragmente wie in dieser Arbeit ausschließlich in Golgi-Vesikel lokalisiert. Zhang *et al.* fanden allerdings Unterschiede in der Verteilung des Gesamtproteins und der Fragmente der Preseniline. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden, da endogen die Preseniline nur als Fragmente nachweisbar waren (Abb. 14; Abb. 16). Für die Verteilung von PS-1 und PS-2 Fragmenten wurde kein Unterschied nachgewiesen. Bei den beschriebenen Arbeiten mit kultivierten Zellen wurden ausschließlich Presenilin überexpressierende Zellen verwendet, da dabei das endogene Expressionsniveau der Preseniline nicht ausreicht, um mit den genannten Methoden die Lokalisierung nachzuweisen. Die Interpretation der publizierten Daten wird dadurch erschwert, daß kürzlich gezeigt werden konnte, daß polytopische Membranproteine wie CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) oder Preseniline durch eine Überexpression in sogenannten Aggresomen akkumulieren. Diese Strukturen entstehen als Folge von zellulärem Streß und der Überlastung des Proteasoms (Johnston *et al.*, 1998). Die Unterschiede zwischen den Literaturdaten und den Ergebnissen dieser Arbeit könnten damit zum Teil durch eine artifizielle Verteilung der Preseniline durch die Überexpression in den humanen Zellen erklärt werden. Der große Vorteil in der hier beschriebenen biochemischen Fraktionierung der Meerschweinchengewebe liegt in der Möglichkeit, bei endogenem Expressionsniveau die Verteilung der Preseniline zu untersuchen. Ein weiterer Nachteil in vielen Arbeiten ist die verwendete Nachweismethode der Immunfluoreszenz, da dadurch eine eindeutige Trennung zwischen ER und Golgi schwierig ist. Dagegen ist die in dieser Arbeit vorgestellte biochemische Fraktionierung speziell für die Trennung von ER- und Golgi-Membranen entwickelt worden (Taylor *et al.*, 1997), wodurch die genaue intrazelluläre Lokalisierung der Preseniline erst möglich wurde.

In der gleichen Fraktionierung der Meerschweinchenleber wurde das endogene APP vorwiegend im ER und im Golgi nachgewiesen (s. Ergebnisse Abb. 13; Abb. 16). Diese Daten werden durch Immunfluoreszenzanalysen unterstützt, die APP in humanen Kulturzellen neben der Lokalisierung in Transportvesikeln und an der Plasmamembran hauptsächlich in diesen beiden Kompartimenten nachwiesen (Slunt *et al.*, 1994). Da APP ein konstitutiv sekretiertes Protein ist (Selkoe, 1996), das in Neuronen durch Transcytose vom Axon bis zu den Dendriten transportiert wird (Simons *et al.*, 1996), ist die vorwiegende Lokalisierung im ER und im Golgi erklärbar.

Zusammenfassend machen die Ergebnisse zur subzellulären Lokalisierung von APP und den Presenilinen in der Meerschweinchenleber deutlich, daß APP mit PS-1 im ER und mit PS-2 erst im Golgi co-lokalisiert. Mutationen im PS-1 und im PS-2 könnten deshalb in den entsprechenden Kompartimenten Einfluß auf die Bildung von A $\beta$  nehmen. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, daß ein Teil des intrazellulären A $\beta$ 42 ebenfalls im ER und im frühen Golgi entsteht (Cook *et al.*, 1997; Hartmann *et al.*, 1997; Wild-Bode *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1998). Ob der Einfluß der

Presenilin Mutationen jedoch durch eine direkte Interaktion oder durch indirekte Transportprozesse verursacht wird, konnte dadurch nicht geklärt werden. Deshalb wurden zusätzlich Untersuchungen zur Interaktion der beiden Preseniline mit APP durchgeführt.

## 5.2 Interaktion der Preseniline mit C-terminalen Fragmenten des APP

Die Beobachtung, daß Fibroblasten von Alzheimer Patienten mit Mutationen in den Presenilinen auch eine erhöhte Sezernierung von A $\beta$ 42 aufweisen, machen den Einfluß der Presenilin-Mutationen auf den Stoffwechsel des APP deutlich (Lemere *et al.*, 1996; Scheuner *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen an transgenen Mäusen mit PS-1 Mutationen bestätigt, da in Gehirnen dieser Tiere ebenfalls erhöhte A $\beta$ 42 Spiegel nachgewiesen wurden (Duff *et al.*, 1996). Durch Experimente mit Neuronen transgener Mäuse, bei denen das PS-1 Gen auf gentechnischem Wege ausgeschaltet wurde (PS-1<sup>-/-</sup>), konnte eine drastisch reduzierte A $\beta$  Sezernierung im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen festgestellt werden. Außerdem akkumulierten in den PS-1<sup>-/-</sup> Neuronen C-terminale APP Fragmente, die die Substrate der  $\gamma$ -Sekretase darstellen (De Strooper *et al.*, 1998; Naruse *et al.*, 1998). Diese Daten machen deutlich, daß das PS-1 für die Entstehung von A $\beta$  notwendig ist. Die Preseniline sind also sowohl an dem normalen, als auch an dem pathogenen Stoffwechsel des APP beteiligt. Diese Experimente konnten jedoch keine Aussage darüber machen, ob die Preseniline direkt mit dem  $\gamma$ -Sekretase Substrat interagieren oder nur einen indirekten Einfluß auf die A $\beta$  Entstehung ausüben. Obwohl das räumliche Paradoxon zwischen der Presenilin- Lokalisierung und der intrazellulären A $\beta$  Entstehung gegen einen direkten Einfluß der Preseniline spricht, kann dieser in den frühen Kompartimenten ER und Golgi, in denen die Preseniline und APP co-lokalisieren, nicht ausgeschlossen werden (Cook *et al.*, 1996; Kovacs *et al.*, 1997). Um einen Hinweis auf einen direkten Einfluß der Preseniline in der Bildung von A $\beta$  zu bekommen, sollte untersucht werden, ob die Preseniline mit einem Vorläufer des A $\beta$ s in den frühen Kompartimenten direkt assoziiert sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Preseniline sowohl in PS-1 und PS-2 überexprimierenden Zellen als auch bei endogenem Expressionsniveau in Leber bzw. Cortex/Hippocampus Gewebe vom Meerschweinchen mit einem 21 kDa großen C-terminalen APP Fragment interagieren. Schon früh wurde ein stabiles C-terminales APP Fragment mit dieser Größe aus humanen Gehirngefäßwänden isoliert (Tamaoka *et al.*, 1992), was auf die Bedeutung dieses Fragmentes hindeuten könnte. Zusätzlich wurde in der Beyreuther Arbeitsgruppe eine weitere Spaltstelle ( $\delta$ -Spaltstelle) N-terminal zur  $\beta$ -Sekretase Spaltstelle postuliert. Durch die Aktivität einer unbekannt Protease an der  $\delta$ -Stelle sollte in neuronalen Zellen ein 19-22 kDa großes C-terminales APP-Fragment entstehen (Simons *et al.*, 1996). Da die Entstehung dieses Fragmentes von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt wurde, ist der Existenz des 21 kDa APP-Fragmentes keine große Beachtung geschenkt worden. Durch die beschriebene Fraktionierung des Cortex und Hippocampus vom Meerschweinchen konnte die Existenz des Fragmentes im Gehirngewebe

jedoch bestätigt werden (s. Abb. 16C). Weder in Lebergewebe vom Meerschweinchen noch in kultivierten humanen Zellen mit endogener APP Expression konnten APP-Fragmente dieser Größe nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, daß normalerweise das 21 kDa Fragment schnell abgebaut wird. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, daß nur durch Überexpression von APP in HEK 293 Zellen in Verbindung mit einer Zugabe von Protease-Inhibitoren wie E64 und Leupeptin neben kleineren C-terminalen APP Fragmenten vor allem auch das 21 kDa APP-Fragment in Lysosomen akkumulierte (Haass *et al.*, 1992a). Diese Ergebnisse könnten einerseits bedeuten, daß APP C-terminale Fragmente zu den Lysosomen transportiert und dort abgebaut werden. Andererseits könnte das APP von der Plasmamembran reinternalisiert werden und über das 21 kDa Fragment als Zwischenprodukt vollkommen abgebaut werden. Schon früh wurde die Hypothese aufgestellt, daß das APP nach der Reinternalisierung in Endosomen proteolytisch geschnitten wird und die C-terminalen Fragmente in Lysosomen abgebaut werden (Haass *et al.*, 1992a). Allerdings kann dabei nicht ausgeschlossen werden, daß C-terminale APP Fragmente schon zu einem früheren Zeitpunkt im sekretorischen Weg entstehen könnten. Diese Annahme wird durch zwei Beobachtungen unterstützt. Zum einen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß das 21 kDa APP Fragment in Fraktionen zu finden war, die mit ER-Membranen angereichert waren (Abb. 14,15). Weiterhin konnte in Fibroblasten von Mäusen mit einer PS-1 „knockout“-Mutation ebenfalls C-terminale APP Fragmente in ER- und Golgi-Vesikel detektiert werden (Xia *et al.*, 1998). Bei der Analyse der Gradientenfraktionen der H4-ind-LC99 Zellen stellte sich jedoch heraus, daß mit dieser Methode des Stufengradienten ER-Membranen nicht von Lysosomen getrennt werden konnten (Abb. 19). Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, daß die co-präzipitierenden APP-Fragmente ebenfalls aus Lysosomen der Zellen stammen. Allerdings wurden die Preseniline nicht in Lysosomen nachgewiesen. Da jedoch das C-terminale APP Fragment erst über die Präzipitation der Preseniline detektiert wurde, ist es höchst unwahrscheinlich, daß die co-präzipitierten APP-Fragmente in Lysosomen lokalisiert waren. Bisher wurden dem 21 kDa Fragment keine physiologische Bedeutung zugeschrieben, da es nicht als direkte Vorstufe des sezernierten A $\beta$  angesehen wurde. Eine Arbeitsgruppe hat demgegenüber die Hypothese aufgestellt, daß das APP Fragment durch einen nicht-sekretorischen Stoffwechselweg des APP im endosomal/lysosomalen System entsteht und ein direkte Vorstufe von A $\beta$  darstellt (Knops *et al.*, 1992). Die in dieser Arbeit nachgewiesene Interaktion zwischen den Presenilinen und dem C-terminalen APP-Fragment weist darauf hin, daß die physiologische Bedeutung des 21 kDa Fragmentes in der A $\beta$  Entstehung größer sein könnte, als bisher angenommen wurde.

Die bisher genannten Ergebnisse stimmen nicht mit den Daten aus zwei Arbeitsgruppen überein, die eine Interaktion der Preseniline ausschließlich mit der unreifen Form des APP beschrieben haben (Weidemann *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1997b), was darauf hindeutet, daß diese Interaktion in frühen Kompartimenten der Zelle stattfand. Ein C-terminales APP Fragment ließ sich dabei nicht mit den Presenilinen co-präzipitieren. Diese Ergebnisse werden zur Zeit noch kontrovers diskutiert, da in



anderen Gruppen weder die Interaktion mit dem unreifen APP, noch mit Fragmenten davon nachgewiesen werden konnte (Kim *et al.*, 1997; Steiner *et al.*, 1998; Thinakaran *et al.*, 1998; Ray *et al.* 1999). Auch in dieser Arbeit konnte die Interaktion zwischen dem unreifen APP und den Presenilinen nicht bestätigt werden. Die Unterschiede in den hier vorgestellten Ergebnissen mit den Literaturdaten könnten darauf zurückzuführen sein, daß in der vorliegenden Arbeit humane Gehirnzellen verwendet wurden. In allen anderen Arbeiten wurden CHO, COS oder HEK 293 Zellen benutzt, die im Vergleich zu den hier verwendeten Zelllinien einen anderen APP Metabolismus besitzen könnten. Hinweise auf derartige Unterschiede gibt es aus Beobachtungen in unserem Labor. Die Behandlung von HEK 293 und H4 Zellen mit gleichen Substanzen führte nur in den HEK 293 Zellen zur Reduzierung des sezernierten A $\beta$ . Die Substanz hatte auf die A $\beta$  Sezernierung der H4 Zellen keine Auswirkungen (unveröffentlichte Daten). Es ist bereits bekannt, daß es zelltypspezifische Unterschiede im APP Metabolismus gibt.

So ist in neuronalen Zellen zum Beispiel der amyloidogene Metabolismus des APP dominanter als in nicht-neuronalen Zellen (Chung *et al.*, 1997).

### **5.3 Einfluß der Presenilin Mutationen auf den Komplex zwischen den Presenilinen und dem C-terminalen APP Fragment**

Durch die Expression der Mutation-tragenden Preseniline konnte, trotz geringeren Expressionsniveaus, im Vergleich zum Wildtyp mehr C-terminales Fragment des APP co-präzipitiert werden. Im Gegensatz dazu wurde bei den Arbeiten von Xia *et al.* und Weidemann *et al.* kein Unterschied in der Interaktion der Mutanten- und der Wildtyp-Form der Preseniline mit APP festgestellt (Weidemann *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1997b). Die unterschiedliche Interaktion der beiden Presenilinformen mit APP könnte auf die Intermediärprodukte des APP Stoffwechsels beschränkt sein und würde damit bei der Interaktion der Preseniline mit der unreifen Form des APP nicht auftreten. Aufgrund der bisherigen Befunde zur Interaktion der Preseniline mit APP, wurde die Hypothese aufgestellt, daß schon geringe konformelle Veränderungen im Komplex zwischen APP und den Presenilinen den Zugang der  $\gamma$ -Sekretase für den spezifischen Schnitt, der zur Bildung des A $\beta$ 42 führt, erleichtern könnte (Xia *et al.*, 1997b). Dieses Modell würde erklären, warum alle Fehlsinn-Mutationen der Preseniline, die an verschiedenen Regionen der Preseniline verteilt sind, eine erhöhte A $\beta$ 42 Sezernierung zur Folge haben. Durch die Mutationen in den Presenilinen könnte ein Konformationsunterschied hervorgerufen werden. Diese Konformationsänderung könnte zwei mögliche Auswirkungen haben. Zum einen könnte der Protein-Komplex zwischen den Presenilinen und APP stabilisiert werden. Zum anderen könnte die Affinität der Preseniline erhöht werden, um den Komplex mit APP einzugehen. Da die Beobachtung gemacht wurde, daß nur ein geringer Teil des APP mit dem Presenilin interagiert (Xia *et al.* 1997b), würden beide Annahmen erklären, warum durch die Mutationen der Preseniline mehr C-terminales APP Fragment co-präzipitiert. Letztendlich konnte durch die Ergebnisse in dieser Arbeit zum erstenmal gezeigt werden,

daß die Mutationen in den Presenilinen auf Proteinebene Veränderungen im Komplex mit einem APP Intermediat verursacht. Die Mutationen in den Presenilinen könnten im Rahmen der vorgestellten Hypothese also durch die Stabilisierung oder durch eine konformelle Änderung des Komplexes die Bildung des amyloidogeneren A $\beta$ 42 begünstigen.

#### **5.4 Eine Interaktion von PS-1 und PS-2 mit dem direkten $\gamma$ -Sekretase Substrat C99 konnte nicht nachgewiesen werden**

Das C99 wird als direkter Vorläufer von A $\beta$  angesehen (Shoji *et al.*, 1992; Selkoe, 1996; Lichtenthaler *et al.*, 1997; Lichtenthaler *et al.*, 1999). Es konnte in den hier vorgestellten Analysen nicht mit den Presenilinen co-präzipitiert werden. Das APP wird im Zuge des amyloidogenen Stoffwechselweges auf seinem sekretorischen Transport durch die Zelle in verschiedenen Kompartimenten zu A $\beta$  metabolisiert (Wilson *et al.*, 1999; s. Einleitung). Dabei führt zunächst der  $\beta$ -Sekretaseschnitt zur Bildung des C99 und nachfolgend entsteht durch die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase das A $\beta$  (s. Einleitung). Die  $\gamma$ -Sekretase scheint ihr Substrat C99 sehr schnell umzusetzen, so daß es selbst in APP transfizierten Zellen nicht nachzuweisen ist (Haass *et al.*, 1992b). Wird die  $\beta$ -Sekretion des APP zum Beispiel durch Mutationen an der  $\beta$ -Sekretaseschnittstelle erhöht, so erhöht sich auch entsprechend das sezernierte A $\beta$  (Citron *et al.*, 1992; Cai *et al.*, 1993; Felsenstein *et al.*, 1994). Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß die  $\beta$ -Sekretase der limitierende Schritt in der Entstehung von A $\beta$  ist. Auch in den hier beschriebenen Untersuchungen könnte das C99 in den verwendeten Zellen so schnell umgesetzt werden, daß es mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationen nicht zu detektieren ist. Im Gegensatz dazu müßte das 21 kDa Fragment zunächst durch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der  $\beta$ -Sekretase zu C99 umgesetzt werden und könnte damit noch in dem Komplex präzipitiert werden.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten Pradier *et al.* eine Interaktion der Preseniline mit dem C99 feststellen, die nicht allein auf die A $\beta$  Sequenz beschränkt war. Ein Sequenzbereich der direkt N-terminal nach der  $\beta$ -Sekretasespaltstelle liegt, reichte aus, um die Interaktion des PS-2 mit dem intrazellulären  $\beta$ -APPs nachzuweisen (Pradier *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse unterstützen Befunde, die zeigten, daß das APP Homolog APLP2, das keine A $\beta$  Region besitzt, ebenfalls mit PS-2 interagiert (Weidemann *et al.*, 1997). Damit wird bestätigt, daß die Sequenz bis zur bereits beschriebenen  $\delta$ -Schnittstelle (Simons *et al.*, 1996), die zur Bildung des 21 kDa APP Fragmentes führt, für die Interaktion mit den Presenilinen wichtig ist. Jedoch belegen die Autoren eine luminale Interaktion des C99 mit dem N-Terminus der Preseniline (Pradier *et al.*, 1999). Zum einen konnte dieses Ergebnis in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da nur Antikörper gegen den C-Terminus der Preseniline ein APP Fragment co-präzipitierten. Zum anderen wurde in mehreren Untersuchungen gezeigt, daß der N-Terminus der Preseniline zum Cytoplasma gerichtet ist (Doan *et al.*, 1996; Li und Greenwald, 1996; De Strooper *et al.*, 1997; Lehmann *et al.*, 1997; Nakai *et al.*, 1999), wodurch eine luminale Interaktion

dieses Endes mit der A $\beta$  Region schwer erklärbar wird. Außerdem wurde für die Untersuchungen der Interaktionen ein artifizielles Zellkultursystem benutzt, indem Presenilin und C99 in einem Zellklon stark überexprimiert wurden. Aufgrund dieses Versuchsansatzes stellt sich die Frage, ob die beobachtete Interaktion der Proteine auf die *in vivo* Situation übertragbar ist. Demgegenüber können unspezifische Interaktionen, die durch eine Überexpression verursacht wurden, durch die Untersuchungen im Meerschweinchengewebe ausgeschlossen werden. Weiterhin konnte durch die Verwendung eines induzierbaren Expressionssystems in dieser Arbeit eine ständige Überexpression verhindert werden, was artifizielle Protein-Interaktionen minimiert.

## 5.5 Das zellfreie Testsystem

Durch die Anreicherung sowohl der Preseniline als auch des  $\gamma$ -Sekretase Substrates C99 in der Mikrosomenfraktion aus H4-ind-LC99 Zellen wurde die Möglichkeit geschaffen, um mit Hilfe dieser Membranfraktion ein zellfreies  $\gamma$ -Sekretase Testsystem aufzubauen. Es konnte erfolgreich ein zellfreies System etabliert werden, indem eine *de novo* Entstehung von A $\beta$  nachgewiesen werden konnte (Abb.22). Durch das Ergebnis wird deutlich, daß alle Faktoren für die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase in der Mikrosomenfraktion der H4-ind-LC99 Zellen vorhanden waren. Allerdings war der Umsatz des C99 zu A $\beta$  sehr ineffizient. Dieser Befund könnte einerseits auf unzureichende Mengen an vorhandenen Kofaktoren der  $\gamma$ -Sekretase, wie zum Beispiel die Menge an Presenilinen, zurückzuführen sein, da unter anderem die Preseniline für die Entstehung von A $\beta$  notwendig sind (De Strooper *et al.*, 1998; Naruse *et al.*, 1998; Steiner *et al.*, 1999b; Wolfe *et al.*, 1999a). Andererseits könnte das Zusammentreffen des C99 mit der  $\gamma$ -Sekretase aufgrund des Fehlens einer Kompartimentierung und eines gerichteten Transportes im zellfreien System ein seltenes Ereignis sein, das nur durch die Steigerung der Substratmenge erhöht werden kann.

Eine *de novo* Entstehung von A $\beta$  im zellfreien System wurde nur unter neutralen Bedingungen festgestellt (Abb.25). Bisher wiesen verschiedene Untersuchungen mit synthetischen Peptidsubstraten darauf hin, daß Cathepsine, insbesondere Cathepsin D, für die Entstehung des C-Terminus von A $\beta$  verantwortlich sein könnten (Ladror *et al.*, 1994; Evin *et al.*, 1995; Mackay *et al.*, 1997). Auch in der mikrosomalen Fraktion, die für die zellfreie Bildung von A $\beta$  eingesetzt worden war, konnten Lysosomen nachgewiesen werden (Abb.13). Ein wichtiges Argument spricht jedoch dagegen, daß lysosomale Proteasen für die hier beschriebenen zellfreie Generierung von A $\beta$  verantwortlich sind. Alle lysosomale Proteasen haben gerade im sauren pH-Bereich ihr Aktivitätsoptimum. In den pH-Bereichen unter 6,8 konnte in dem hier vorgestellten System jedoch keine *de novo* A $\beta$  Bildung mehr nachgewiesen werden (Abb.25). Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu einem kürzlich veröffentlichten zellfreien System, indem nur eine *de novo* A $\beta$  Bildung im sauren Bereich bis zu einem pH-Wert von 6,4 erkennbar war (Wolfe *et al.*, 1999a). In diesem System kann damit nicht ausgeschlossen werden, daß

die zellfreie A $\beta$  Generierung durch die Aktivität lysosomaler Proteasen verursacht wurde. Allerdings wurde diese lysosomale Aktivität nicht durch die Zugabe allgemeiner Cystein- und Serin-Protease-Inhibitoren wie E64 oder Leupeptin inhibiert, die einen Großteil der lysosomalen Proteasen inhibieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß diese Serin- und Cystein-Protease-Inhibitoren keinen Einfluß auf die zellfreie Generierung von A $\beta$  haben (Abb.27). Diese beiden Befunde unterstützen die Annahme, daß die hier vorgestellte zellfreie *de novo* A $\beta$  Entstehung nicht durch lysosomale Proteasen hervorgerufen wurde.

Durch Untersuchungen mit Agenzien wie Chloroquine oder Ammoniumchlorid, die den pH im endosomalen/lysosomalen System erhöhen und damit Proteaseaktivitäten innerhalb dieser Kompartimente herabsetzen, wurde in nicht-neuronalen Zellen eine Reduktion des sezernierten A $\beta$ s erkennbar (Shoji *et al.*, 1992; Haass *et al.*, 1993). Außerdem konnten C-terminale APP-Fragmente, die die Vorstufen für A $\beta$  darstellen, ebenfalls in diesen späten Kompartimenten der Zelle nachgewiesen werden (Koo und Squazzo, 1994). Diese Ergebnisse belegen, daß das endosomale/lysosomale System in nicht-neuronalen Zellen der Entstehungsort des sezernierten A $\beta$ s ist. Neben dem sezernierten A $\beta$  wird noch einen intrazellulärer A $\beta$  „Pool“ beschrieben, der nicht sezerniert wird, sondern innerhalb der Zelle verbleibt und experimentell nur durch Extraktion mit Ameisensäure nachzuweisen ist (Skovronski *et al.*, 1998; Greenfield *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). In neuronalen Zellen dagegen wird durch die Blockierung des lysosomalen Abbaus die Bildung von A $\beta$  für den intrazellulären „Pool“ nicht beeinflusst (Tienari *et al.*, 1997). Zusätzlich konnte als Bildungsort des intrazellulär verbleibenden A $\beta$  das ER und der Golgi-Apparat bestimmt werden (Cook *et al.*, 1997; Hartmann *et al.*, 1997; Wild-Bode *et al.*, 1997; Greenfield *et al.*, 1999). Zusammengefaßt weisen die Daten darauf hin, daß unterschiedliche Kompartimente und damit auch unterschiedliche Proteasen an der Bildung des sezernierten und des intrazellulären A $\beta$ s beteiligt sein könnten. In dem Testsystem von Wolfe *et al.* könnte die beobachtete A $\beta$  Bildung durch Aktivitäten endosomaler oder lysosomaler Proteasen verursacht worden sein, die für die Bildung des sezernierten A $\beta$ s verantwortlich sind. Dagegen weist das hier vorgestellte Testsystem die Proteasen nach, die das A $\beta$  für den intrazellulären A $\beta$  „Pool“ bilden (s.auch Einleitung).

### 5.5.1 Die $\gamma$ -Sekretase ist eine transmembrane Protease

Bisher ist nicht bekannt, ob die  $\gamma$ -Sekretase eine cytosolische oder eine membrangebundene Protease ist. Weiterhin konnte noch nicht geklärt werden, ob cytosolische Komponenten für eine aktive  $\gamma$ -Sekretase notwendig sind. Auch mit dem zellfreien System von Wolfe *et al.* konnte diese Frage nicht geklärt werden, da zusätzliche Faktoren für die beobachtete A $\beta$  Entstehung in dem zugegebenen Retikulozyten-Lysat enthalten sein konnten (Wolfe *et al.*, 1999). Im vorliegenden Testsystem sind für die zellfreie A $\beta$  Bildung keine cytosolischen Proteine oder Kofaktoren notwendig (Abb.23). Alle cytosolischen Komponenten wurden vor der 37°C Inkubation durch eine Ultrazentrifugation von den Membranen

abgetrennt. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, daß die  $\gamma$ -Sekretase keine cytosolische Protease ist. Darüber hinaus wurde durch die Extraktion der Membranen vor der Inkubation deutlich, daß die  $\gamma$ -Sekretase höchstwahrscheinlich eine in der Membran verankerte Protease ist, da durch die Extraktion die Bildung von A $\beta$  nicht beeinträchtigt wurde. Zusätzlich müssen eventuelle Komponenten, die für die Proteolyse zu A $\beta$  notwendig sind, ebenfalls fest in oder an der Membran verankert sein.

### 5.5.2 A $\beta$ wird durch eine Calcium-abhängige Protease degradiert

Das ER hat in der Zelle die wichtige Aufgabe, sicherzustellen, daß Proteine ihre richtige Konformation einnehmen, bevor sie zu ihrem Bestimmungsort in der Zelle transportiert werden (Gaut *et al.*, 1993). Dazu besitzt das ER ein effizientes Qualitäts-Kontrollsystem, das falsch gefaltete Proteine sofort abbaut. Man unterscheidet dabei einen Proteasom-abhängigen von einem Proteasom-unabhängigen ER-Degradationsprozeß (Plemper und Wolf, 1999). Intrazelluläre Proteasen schützen also die Zelle vor falsch gefaltete Proteine, die aggregieren könnten und damit eine zellschädigende Wirkung hätten.

In dem hier vorgestellten zellfreien Testsystem zur Bestimmung der  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität konnte festgestellt werden, daß die Menge an nachweisbarem A $\beta$  durch die Zugabe von Chelatbildnern wie EDTA verstärkt werden konnte (Abb.23A). Daraus läßt sich schließen, daß auch in den H4-ind-LC99 Zellen intrazelluläre-A $\beta$  abbauende Proteasen vorhanden sind, die im Inkubationsansatz aktiv waren und durch die Zugabe von Chelatbildnern gehemmt wurden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der A $\beta$ -abbauenden Proteasen von zweiwertigen Calciumionen anhängig war (Abb.23A). Es ist bekannt, daß Metalloproteasen von chelatierenden Agenzien wie EDTA oder EGTA gehemmt werden (Ramchandran *et al.*, 1995). Deshalb liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei den A $\beta$ -abbauenden Proteasen um intrazelluläre Calcium-abhängige Metalloproteasen handeln könnte. Außerdem deuten die Ergebnisse darauf hin, daß die A $\beta$ -Produktion und der A $\beta$ -Abbau zwei unterschiedliche Prozesse sind, die bereits beide im ER stattfinden können. Diese Ergebnisse werden durch die Daten von Bunnell *et al.* unterstützt, die mit Hilfe eines  $\gamma$ -Sekretase-Substrates, das mit speziellen Peptiden an den Enden markiert wurde, ebenfalls diese beiden Prozesse im ER unterscheiden konnten. In ihrem Zellkultursystem ist ein Proteasom-unabhängiger Mechanismus für den Abbau des A $\beta$ s verantwortlich (Bunnell *et al.*, 1998). In dem hier vorgestellten Testsystem kann ein Proteasom-abhängiger Abbaumechanismus ausgeschlossen werden, da die cytosolischen Bestandteile des Proteasoms durch Zentrifugation von den Membranen abgetrennt wurden. Somit könnten die A $\beta$ -abbauenden Proteasen ein Bestandteil des von Bunnell *et al.* beschriebenen Proteasom-unabhängigen ER-Abbau-Mechanismus sein. Da sich neben mikrosomalen Membranen in der SIII Fraktion, die für die Inkubationen eingesetzt wurde, auch Lysosomen befanden (Abb.19), kann nicht ausgeschlossen werden, daß lysosomale Proteasen an dem Abbau des A $\beta$  beteiligt sind.

Es gibt zahlreiche Beispiele für A $\beta$ -degradierende Enzyme (Kurochkin *et al.*, 1994; Naidu *et al.*, 1995;

Qiu *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 1996; Qiu *et al.*, 1998; Yamin *et al.*, 1999). Sie besitzen die Gemeinsamkeit, daß sie ausschließlich sezerniertes A $\beta$  degradieren, was eine wichtige physiologische Funktion in der Entfernung des neurotoxischen A $\beta$ s aus dem extrazellulär Raum darstellt. Nimmt man jedoch an, daß bereits das intrazelluläre A $\beta$  neurotoxisch ist, kommt den intrazellulären A $\beta$ -abbauenden Proteasen eine entscheidende Rolle beim Schutz vor der A $\beta$  ausgelösten Toxizität zu. Diese These wird durch Untersuchungen an primären Neuronen unterstützt, die zeigten, daß ein Teil des A $\beta$ 42 schon in frühen Kompartimenten der Zelle entsteht und nicht sezerniert wird (Skovronsky *et al.*, 1998). Neueste Ergebnisse mit transgenen Tiermodellen unterstreichen die Wichtigkeit des intrazellulären A $\beta$ , da festgestellt werden konnte, daß eine Neurodegeneration schon allein durch intrazelluläre A $\beta$ -Aggregate, also ohne eine Beteiligung von extrazellulären Plaques ausgelöst werden kann (Chui *et al.*, 1999). Aufgrund diese Ergebnisse wurde von Wilson *et al.* ein Modell zur Entstehung der Alzheimer Erkrankung aufgestellt. Danach ist die Aggregation des intrazellulären A $\beta$ 42 einer der frühen Ereignisse, die zum neuronalen Zelltod führen und damit einen ursächlichen Faktor in der Entstehung der Erkrankung darstellt (Wilson *et al.*, 1999). Eine Neurodegeneration könnte demnach sowohl durch die Erhöhung des intrazellulären A $\beta$ 42 Spiegels als auch durch einen unzureichende Abbau des intrazellulären A $\beta$ s verursacht werden. Im Zuge dieses Modells würden die intrazellulären A $\beta$ -abbauenden Proteasen eine wichtige Funktion in der Beseitigung des neurotoxischen A $\beta$ s einnehmen. Eine Reduktion oder ein Ausfall dieses Kontrollsystems, wie im zellfreien System durch die Zugabe von EDTA simuliert, hätte die pathologische Aggregation von A $\beta$  im ER zur Folge und würde nach dem Modell mit einer Neurodegeneration enden. Deshalb müßten Menschen mit Mutationen in diesen A $\beta$ -abbauenden Proteasen eigentlich potentielle Alzheimer Patienten sein. Es wurden bisher jedoch keine Alzheimer Patienten gefunden, die Mutationen in Genen tragen, die für Mitglieder des ER-Kontrollsystems codieren. Die Ursache dafür liegt höchstwahrscheinlich darin, daß die Auswirkungen eines fehlerhaften ER-Kontrollsystems für einen Organismus lethal wären (Aridor und Balch, 1999).

### 5.5.3 Der $\gamma$ -Sekretase Aktivität liegt kein bekannter Proteasemechanismus zugrunde

Es sind vier verschiedene Protease Familien bekannt : Cystein-Proteasen; Serin-Proteasen; Metallo-Proteasen und Aspartat-Proteasen. Die Mitglieder einer Familie besitzen die gleichen grundlegenden proteolytischen Mechanismen. Deshalb können neue Proteasen durch ihre Sensitivität auf allgemeine Proteaseninhibitoren, die spezifisch für einzelne Familien sind, klassifiziert werden (Powers *et al.*, 1993).

Um festzustellen, ob der  $\gamma$ -Sekretase Aktivität einer der vier Proteasemechanismen zugrunde liegt, wurde der Einfluß fünf verschiedener Proteaseinhibitoren auf die zellfreie Entstehung von A $\beta$  untersucht. Es zeigt sich, daß kein Proteaseinhibitor eine Reduktion der *de novo* Entstehung von A $\beta$  im zellfreien System verursachte (Abb.27). Es gibt bereits Proteasen, die in keiner der vier Proteasfamilien

anhören, da sie einen ungeklärten Proteasemechanismus besitzen. Es besteht die Möglichkeit, daß Proteasen dabei sind, die einen völlig neuen Mechanismus zur Hydrolyse einer Peptidbindung aufweisen (Powers *et al.*, 1993). Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß die  $\gamma$ -Sekretase ebenfalls eine Protease mit einem neuen Proteasemechanismus sein könnte. Bereits die Lage der Schnittstelle innerhalb der Membran unterstreicht die Besonderheit der Protease (Kang *et al.*, 1987).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten Murphy *et al.* durch Mutationsstudien im Bereich der  $\gamma$ -Sekretaseschnittstelle eine Pepstatin sensitive von einer Pepstatin insensitive  $\gamma$ -Sekretaseaktivität unterscheiden (Murphy *et al.*, 1999). Die Autoren folgerten daraus, daß mehr als eine  $\gamma$ -Sekretase für die Bildung von A $\beta$  verantwortlich ist. Die Auswirkungen der Mutationen an der  $\gamma$ -Sekretaseschnittstelle zusammen mit der Pepstatin Behandlung wurde jedoch nur über die Änderung der sezernierten A $\beta$  Spezies gemessen. Veränderungen im intrazellulären A $\beta$  wurden dabei nicht berücksichtigt. Da das sezernierte A $\beta$  im endosomalen/lysosomalen System der Zelle gebildet wird (Haass *et al.*, 1993; Koo *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1999), könnte die von Murphy *et al.* beschriebene Pepstatin-sensitive A $\beta$  Bildung durch die  $\gamma$ -Sekretaseaktivität verursacht worden sein, die ausschließlich für die A $\beta$  Entstehung in diesen sauren Kompartimenten verantwortlich ist. Damit würde die Wirkung des Pepstatins auf die Entstehung des sezernierten A $\beta$ s beschränkt sein. Diese Annahme wird durch das Wirkspektrum von Pepstatin unterstützt, da Pepstatin ausschließlich Aspartat-Proteasen inhibiert, die aufgrund ihres pH-Optimums in der Zelle im endosomalen/lysosomalen System zu finden sind (Kay, 1985). Da im Gegensatz zu dem System von Murphy *et al.* in dem hier vorgestellten zellfreien  $\gamma$ -Sekretase Testsystem vorwiegend die Proteasen betrachtet werden, die für die A $\beta$  Entstehung des intrazellulären „Pools“ im ER und im Golgi verantwortlich sind (s.4.5), wird der fehlende Einfluß von Pepstatin erklärbar.

#### **5.5.4 PS-1 ist für die zellfreie Entstehung von A $\beta$ notwendig**

In der mikrosomalen Fraktion aus H4-ind-LC99 Zellen, die zur Etablierung des zellfreien  $\gamma$ -Sekretase Testsystems eingesetzt wurde, waren beide Preseniline gegenüber dem PNS angereichert (Abb.21). Durch Untersuchungen mit PS-1 und PS-2, bei denen ein konserviertes Aspartat ausgetauscht wurde, konnte gezeigt werden, daß durch diese dominant negative Mutation sowohl die Endoproteolyse der Preseniline als auch eine A $\beta$  Bildung inhibiert wurde (Steiner *et al.* 1999; Wolfe *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse bestätigen, daß die Preseniline für den Prozeß der A $\beta$  Bildung essentiell sind. Um die Spezifität des zellfreien  $\gamma$ -Sekretase Testsystems zu beweisen, sollte untersucht werden, ob die Preseniline in der mikrosomalen Fraktion ebenfalls notwendig für die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität sind. Dazu wurden stabil transfizierte Zellen hergestellt, die neben dem induzierbaren LC99 die Preseniline mit dem ausgetauschten Aspartat exprimierten. Da bekannt ist, daß die Auswirkungen der rekombinanten Presenilin Aspartat-Mutanten auf die A $\beta$  Bildung dominant gegenüber der endogenen Presenilin

Funktion sind (Steiner *et al.* 1999; Wolfe *et al.*, 1999), sollte durch die Überexpression der Presenilin Aspartat-Mutanten ein funktioneller „knockout“ der Preseniline hergestellt werden. Es konnte gezeigt werden, daß durch die Anwesenheit des PS-1-D385N in der mikrosomalen Fraktion die zellfreie *de novo* A $\beta$  Bildung vollständig verhindert wurde (Abb.30). Dieses Ergebnis macht einerseits deutlich, daß im zellfreien System ein spezifischer Presenilin-abhängiger Mechanismus für die Entstehung von A $\beta$  verantwortlich ist. Andererseits sprechen die Ergebnisse gegen eine unspezifische Bildung von A $\beta$  zum Beispiel durch lysosomale Proteasen.

Im Gegensatz dazu konnte für PS-2 trotz des Austausches des konservierten Aspartates kein Einfluß in der zellfreien *de novo* A $\beta$  Bildung nachgewiesen werden (Abb.30). Damit belegen diese Befunde, daß es Unterschiede im bezug auf die A $\beta$  Bildung zwischen PS-1 und PS-2 geben könnte. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu Untersuchungen mit PS-2-D366A transfizierten Zellen, die den dominant negativen Effekt auf die A $\beta$ -Sekretion durch das veränderte PS-2 nachgewiesen haben (Steiner *et al.*, 1999). Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte sein, daß das PS-2 nur für die Bildung des sezernierten A $\beta$ s essentiell ist. Da in dem zellfreien System wahrscheinlich die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität nachgewiesen wurde, die das A $\beta$  für den intrazellulären „Pool“ bildet, würde man für die PS-2 Aspartat-Mutante keine Auswirkungen auf die *de novo* A $\beta$  Bildung erwarten. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt, die PS-2 in „späteren“ Kompartimenten als PS-1 nachwies.

Andererseits könnten die Daten auch dadurch erklärt werden, daß die Expressionsmenge an PS-2-D366A nicht ausreichte, um den dominant negativen Effekt der A $\beta$  Reduktion hervorzurufen. Diese Annahme wird durch die Untersuchung der Expressionsmengen der Presenilin Aspartat-Mutanten in H4-ind-LC99 Zellen unterstützt, die zeigten, daß die Expression des PS-2-D366A nicht ausreichte, um das endogene PS-1 zu ersetzen (Abb. 28). Demgegenüber reduzierte die Überexpression des PS-1-D385N das endogene PS-2 vollständig (Abb. 28). Die Anwesenheit des endogenen PS-1 in der mikrosomalen Fraktion der PS-2-D366A Zellen könnte damit die Ursache für die beobachtete A $\beta$  Entstehung sein. Gegen diese Erklärungsmöglichkeit spricht allerdings, daß es keinen Unterschied zwischen der PS-2 und der PS-1 Aspartat-Mutante bei der Akkumulation des C-terminalen APP-Fragmentes C83 in den SII und SIII Fraktionen des Gradienten gab (Abb.29). Dadurch wird deutlich, daß auch die Expression der PS-2 Aspartat-Mutante ausreichte, um diesen dominanten Effekt auf den APP Metabolismus auszuüben.

Es ist gelungen, die Spezifität des zellfreien  $\gamma$ -Sekretase Testsystems durch den dominant negativen Effekt des PS-1-D385N auf die *de novo* A $\beta$  Bildung zu belegen. Dagegen konnte ein dominant negativer Effekt des PS-2-D366A im zellfreien System nicht nachgewiesen werden. Letztendlich kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, daß auch das PS-2 an der *de novo* Entstehung des A $\beta$ s im zellfreien System beteiligt ist.



## 6. Zusammenfassung

Morbus Alzheimer ist eine progressive, neurodegenerative Erkrankung, die weltweit die häufigste Form der Demenz darstellt und im mittleren bis späten Lebensabschnitt auftritt. Die neuropathologischen Merkmale beinhalten das Auftreten von extrazellulären Ablagerungen aus fibrillogenen A $\beta$ 2 Peptiden in senilen Plaques und intraneuronalen Akkumulationen von hyperphosphoryliertem Tau in sogenannten neurofibrillären Bündeln. Obwohl die meisten Alzheimer Fälle sporadisch und Alters-assoziiert auftreten, gibt es eine autosomal dominant vererbte Form (FAD; Familial Alzheimer Disease), die schon in einem frühen Lebensabschnitt (ab 28 Jahren) ausbrechen kann. Diese aggressive Alzheimer Form wird durch Mutationen im *Amyloid-Precursor-Protein*-Gen (*APP*) oder den *Presenilin*-Genen (*PS-1* und *PS-2*) ausgelöst. Die Presenilin (PS) Proteine sind entscheidend an der Entstehung von A $\beta$  beteiligt. So erhöhen FAD-assoziierte Mutationen in PS-1 und PS-2 die Bildung von A $\beta$ 42. Außerdem verhindern sowohl homozygote PS-1 Null-Mutationen (PS-1<sup>-/-</sup>) in transgenen Mäusen, als auch dominant negative PS-1 Mutationen in Kulturzellen die A $\beta$  Bildung. Diese Belege sprechen für die zur Zeit favorisierte Amyloid Hypothese, in der die toxische Wirkung des A $\beta$ -Peptides in der Entstehung der Alzheimer Erkrankung eine zentrale Rolle einnimmt. Die  $\gamma$ -Sekretase ist eine Protease, deren Aktivität für die Entstehung von A $\beta$  aus dem Vorläuferprotein APP essentiell ist. Damit bildet sie einen möglichen Ansatzpunkt, um grundlegend in den Prozeß der A $\beta$  Bildung einzugreifen. Die  $\gamma$ -Sekretase ist allerdings noch nicht identifiziert oder kloniert. Es gibt Hinweise, daß die Preseniline  $\gamma$ -Sekretase Aktivität besitzen könnten. Diese Theorie ist bis heute jedoch nicht eindeutig belegt.

In dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen der A $\beta$  Entstehung und insbesondere die Beteiligung der Preseniline an diesem Prozeß untersucht werden. Dazu wurde zunächst die subzelluläre Verteilung der endogenen Preseniline analysiert. Es konnte erstmalig ein Unterschied in der subzellulären Verteilung zwischen PS-1 und PS-2 festgestellt werden. PS-1 war vorwiegend im ER lokalisiert, wogegen PS-2 stark im Golgi-Apparat angereichert war. Im zweiten Teil der Arbeit wurde nach möglichen Interaktionen der Preseniline mit C-terminalen APP Fragmenten gesucht, die die Substrate der  $\gamma$ -Sekretase darstellen. Es konnte gezeigt werden, daß die Preseniline mit einem 21 kDa großen C-terminalen APP Fragment interagieren. Dabei band die Mutante-Form der Preseniline mehr C-terminales APP Fragment als die Wildtyp-Form. Weiterhin wurde ein zellfreies System zur indirekten Bestimmung der  $\gamma$ -Sekretase Aktivität etabliert. Mit Hilfe dieses Systems wird es möglich, Inhibitoren der  $\gamma$ -Sekretase zu identifizieren. Die Spezifität des zellfreien Testsystems konnte dadurch deutlich gemacht werden, daß das PS-1, das schon in Zellkultur als essentielle Proteinkomponente zur Entstehung von A $\beta$  beschrieben wurde, auch in diesem zellfreien  $\gamma$ -Sekretase System notwendig war. Allgemeine Proteaseinhibitoren, die alle bekannten Proteasemechanismen abdeckten, zeigten keinen

Einfluß auf die *de novo* Bildung von A $\beta$ . Es konnte festgestellt werden, daß neben der  $\gamma$ -Sekretase als A $\beta$  produzierende Protease auch A $\beta$  abbauende Proteasen vorlagen. Das pH-Optimum der  $\gamma$ -Sekretase wurde im neutralen Bereich festgestellt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die  $\gamma$ -Sekretase eine transmembrane oder zumindest membranassoziierte Protease ist, die keine cytosolischen Komponenten benötigt.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Abraham, C.R., J. Driscoll, H. Potter, W.E. Van Nostrand, and P. Tempst.** 1991. A calcium-activated protease from Alzheimer's disease brain cleaves at the N-terminus of the amyloid beta-protein. *Biochem Biophys Res Commun* 174:790.
2. **Alzheimer, A.** 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin* 30:177-179.
3. **Annaert, W. and B. de Strooper.** 1999. Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction. *Trends Neurosci* 22:439.
4. **Aridor, M. and W.E. Balch.** 1999. Integration of endoplasmic reticulum signaling in health and disease. *Nat Med* 5:745.
5. **Ball, M.J. and G.H. Murdoch.** 1997. Neuropathological criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: are we really ready yet? *Neurobiol Aging* 18:S3.
6. **Baumann, K., P.A. Paganetti, C. Sturchler-Pierrat, C. Wong, H. Hartmann, R. Cescato, P. Frey, B.A. Yankner, B. Sommer, and M. Staufenbiel.** 1997. Distinct processing of endogenous and overexpressed recombinant presenilin 1. *Neurobiol Aging* 18:181.
7. **Baumeister, R., U. Leimer, I. Zweckbronner, C. Jakubek, J. Grunberg, and C. Haass.** 1997. Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate *Caenorhabditis elegans* Notch signalling independently of proteolytic processing. *Genes Funct* 1:149.
8. **Beaufay, H., A. Amar-Costesec, E. Feytmans, D. Thines-Sempoux, M. Wibo, M. Robbi, and J. Berthet.** 1974. Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. I. Biochemical methods. *J Cell Biol* 61:188.
9. **Behl, C.** 1999. Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog Neurobiol* 57:301.
10. **Berger, J., J. Hauber, R. Hauber, R. Geiger, and B.R. Cullen.** 1988. Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene* 66:1.

11. **Birnboim, H.C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513.
12. **Borchelt, D.R., G. Thinakaran, C.B. Eckman, M.K. Lee, F. Davenport, T. Ratovitsky, C.M. Prada, G. Kim, S. Seekins, D. Yager, H.H. Slunt, R. Wang, M. Seeger, A.I. Levey, S.E. Gandy, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, D.L. Price, S.G. Younkin, and S.S. Sisodia.** 1996. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17:1005.
13. **Borchelt, D.R., T. Ratovitski, J. van Lare, M.K. Lee, V. Gonzales, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, D.L. Price, and S.S. Sisodia.** 1997. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19:939.
14. **Brockhaus, M., J. Grunberg, S. Rohrig, H. Loetscher, N. Wittenburg, R. Baumeister, H. Jacobsen, and C. Haass.** 1998. Caspase-mediated cleavage is not required for the activity of presenilins in amyloidogenesis and NOTCH signaling. *Neuroreport* 9:1481.
15. **Bunnell, W.L., H.V. Pham, and C.G. Glabe.** 1998. gamma-secretase cleavage is distinct from endoplasmic reticulum degradation of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 273:31947.
16. **Busciglio, J., D.H. Gabuzda, P. Matsudaira, and B.A. Yankner.** 1993. Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2092.
17. **Buxbaum, J.D., M. Oishi, H.I. Chen, R. Pinkas-Kramarski, E.A. Jaffe, S.E. Gandy, and P. Greengard.** 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.
18. **Buxbaum, J.D., K.N. Liu, Y. Luo, J.L. Slack, K.L. Stocking, J.J. Peschon, R.S. Johnson, B.J. Castner, D.P. Cerretti, and R.A. Black.** 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.
19. **Cai, X.D., T.E. Golde, and S.G. Younkin.** 1993. Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor [see comments]. *Science* 259:514.

20. **Capell, A., J. Grunberg, B. Pesold, A. Diehlmann, M. Citron, R. Nixon, K. Beyreuther, D.J. Selkoe, and C. Haass.** 1998. The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. *J Biol Chem* 273:3205.
21. **Caporaso, G.L., S.E. Gandy, J.D. Buxbaum, T.V. Ramabhadran, and P. Greengard.** 1992. Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3055.
22. **Chartier-Harlin, M.C., F. Crawford, H. Houlden, A. Warren, D. Hughes, L. Fidani, A. Goate, M. Rossor, P. Roques, and J. Hardy.** 1991. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353:844.
23. **Chen, M. and B.A. Yankner.** 1991. An antibody to beta amyloid and the amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types. *Neurosci Lett* 125 :223.
24. **Chui, D.H., H. Tanahashi, K. Ozawa, S. Ikeda, F. Checler, O. Ueda, H. Suzuki, W. Araki, H. Inoue, K. Shirovani, K. Takahashi, F. Gallyas, and T. Tabira.** 1999. Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat Med* 5:560.
25. **Chyung, A.S.C., B.D. Greenberg, D.G. Cook, R.W. Doms, and V.M. Lee.** 1997. Novel beta-secretase cleavage of beta-amyloid precursor protein in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *J Cell Biol* 138:671.
26. **Citron, M., T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A.Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg, and D.J. Selkoe.** 1992. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672.
27. **Citron, M., D.B. Teplow, and D.J. Selkoe.** 1995. Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* 14:661.
28. **Citron, M., T.S. Diehl, G. Gordon, A.L. Biere, P. Seubert, and D.J. Selkoe.** 1996. Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13170.

29. **Citron, M., D. Westaway, W. Xia, G. Carlson, T. Diehl, G. Levesque, K. Johnson-Wood, M. Lee, P. Seubert, A. Davis, D. Kholodenko, R. Motter, R. Sherrington, B. Perry, H. Yao, R. Strome, I. Lieberburg, J. Rommens, S. Kim, D. Schenk, P. Fraser, H. St George, and D.J. Selkoe.** 1997. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice [see comments]. *Nat Med* 3:67.
30. **Conlon, R.A., A.G. Reaume, and J. Rossant.** 1995. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* 121:1533.
31. **Cook, D.G., J.C. Sung, T.E. Golde, K.M. Felsenstein, B.S. Wojczyk, R.E. Tanzi, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, and R.W. Doms.** 1996. Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: localization in cell bodies and dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9223.
32. **Cook, D.G., M.S. Forman, J.C. Sung, S. Leight, D.L. Kolson, T. Iwatsubo, V.M. Lee, and R.W. Doms.** 1997. Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat Med* 3:1021.
33. **Culvenor, J.G., F. Maher, G. Evin, F. Malchiodi-Albedi, R. Cappai, J.R. Underwood, J.B. Davis, E.H. Karran, G.W. Roberts, K. Beyreuther, and C.L. Masters.** 1997. Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in neuronal cells: evidence for localization to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *J Neurosci Res* 49:719.
34. **Daigle, I. and C. Li.** 1993. apl-1, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:12045.
35. **de Strooper, B., L. Umans, F. Van Leuven, and H. Van Den Berghe.** 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.
36. **De Strooper, B., M. Bullens, B. Contreras, L. Levesque, K. Craessaerts, B. Cordell, D. Moechars, M. Bollen, P. Fraser, P.S. George-Hyslop, and F. Van Leuven.** 1997. Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *J Biol Chem* 272:3590.

37. **De Strooper, B., P. Saftig, K. Craessaerts, H. Vanderstichele, G. Guhde, W. Annaert, K. Von Figura, and F. Van Leuven.** 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein [see comments]. *Nature* 391:387.
38. **Dewji, N.N. and S.J. Singer.** 1996. Specific transcellular binding between membrane proteins crucial to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12575.
39. **Doan, A., G. Thinakaran, D.R. Borchelt, H.H. Slunt, T. Ratovitsky, M. Podlisny, D.J. Selkoe, M. Seeger, S.E. Gandy, D.L. Price, and S.S. Sisodia.** 1996. Protein topology of presenilin 1. *Neuron* 17:1023.
40. **Drewes, G., A. Ebner, and E.M. Mandelkow.** 1998. MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci* 23:307.
41. **Dreyer, R.N., K.M. Bausch, P. Fracasso, L.J. Hammond, D. Wunderlich, D.O. Wirak, G. Davis, C.M. Brini, T.M. Buckholz, and G. Konig.** 1994. Processing of the pre-beta-amyloid protein by cathepsin D is enhanced by a familial Alzheimer's disease mutation. *Eur J Biochem* 224:265.
42. **Duff, K., C. Eckman, C. Zehr, X. Yu, C.M. Prada, J. Perez-Tur, M. Hutton, L. Buee, Y. Harigaya, D. Yager, D. Morgan, M.N. Gordon, L. Holcomb, L. Refolo, B. Zenk, J. Hardy, and S. Younkin.** 1996. Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383:710.
43. **Dyrks, T., U. Monning, K. Beyreuther, and J. Turner.** 1994. Amyloid precursor protein secretion and beta A4 amyloid generation are not mutually exclusive. *FEBS Lett* 349:210.
44. **Efthimiopoulos, S., K.M. Felsenstein, K. Sambamurti, N.K. Robakis, and L.M. Refolo.** 1994. Study of the phorbol ester effect on Alzheimer amyloid precursor processing: sequence requirements and involvement of a cholera toxin sensitive protein. *J Neurosci Res* 38:81.
45. **Elder, G.A., N. Tezapsidis, J. Carter, J. Shioi, C. Bouras, H.C. Li, J.M. Johnston, S. Efthimiopoulos, V.L.J. Friedrich, and N.K. Robakis.** 1996. Identification and neuron specific expression of the S182/presenilin I protein in human and rodent brains. *J Neurosci Res* 45:308.

46. **Esch, F.S., P.S. Keim, E.C. Beattie, R.W. Blacher, A.R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure, and P.J. Ward.** 1990. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248:1122.
47. **Evin, G., R. Cappai, Q.X. Li, J.G. Culvenor, D.H. Small, K. Beyreuther, and C.L. Masters.** 1995. Candidate gamma-secretases in the generation of the carboxyl terminus of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid: possible involvement of cathepsin D. *Biochemistry* 34:14185.
48. **Felsenstein, K.M., L.W. Hunihan, and S.B. Roberts.** 1994. Altered cleavage and secretion of a recombinant beta-APP bearing the Swedish familial Alzheimer's disease mutation. *Nat Genet* 6:251.
49. **Freshney, R. I. Culture of Animal Cells.** 1988. Alan R.Liss, Inc., New York.
50. **Fuhrmann, I., Gutzmann, H., Neumann, E.-M., and Niemann-Mirmehdi, M.** Abschied vom ich - Stationen der Alzheimer Erkrankung. Herder Verlag . 1995. 51.
51. **Fujiki, Y., A.L. Hubbard, S. Fowler, and P.B. Lazarow.** 1982. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 93:97.
52. **Fukuda, M., J. Viitala, J. Matteson, and S.R. Carlsson.** 1988. Cloning of cDNAs encoding human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Comparison of their deduced amino acid sequences. *J Biol Chem* 263:18920.
53. **Gaut, J.R. and L.M. Hendershot.** 1993. The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 5:589.
54. **Geula, C. and Mesulam, M. M. Cholinergic Systems in Alzheimer Disease. Terry, R. D., Katzman, R., Bick, K. L, and Sisodia, S. S.** second edition, 269-292. 1999. Lippincott Williams&Wilkins. Alzheimer Disease.
55. **Glenner, G.G. and C.W. Wong.** 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885.



56. **Goate, A., M.C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, and L. James.** 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease [see comments]. *Nature* 349:704.
57. **Goedert, M., R. Jakes, M.G. Spillantini, M. Hasegawa, M.J. Smith, and R.A. Crowther.** 1996. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans [see comments]. *Nature* 383:550.
58. **Golde, T.E., S. Estus, L.H. Younkin, D.J. Selkoe, and S.G. Younkin.** 1992. Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives [see comments]. *Science* 255:728.
59. **Golde, T.E., X.D. Cai, M. Shoji, and S.G. Younkin.** 1993. Production of amyloid beta protein from normal amyloid beta-protein precursor (beta APP) and the mutated beta APPS linked to familial Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 695:103.
60. **Gossen, M. and H. Bujard.** 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547.
61. **Grünberg, J., J. Walter, H. Loetscher, U. Deuschle, H. Jacobsen, and C. Haass.** 1998. Alzheimer's disease associated presenilin-1 holoprotein and its 18-20 kDa C-terminal fragment are death substrates for proteases of the caspase family. *Biochemistry* 37:2263.
62. **Graham, F.L. and A.J. Eb.** 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456.
63. **Greenfield, J.P., J. Tsai, G.K. Gouras, B. Hai, G. Thinakaran, F. Checler, S.S. Sisodia, P. Greengard, and H. Xu.** 1999. Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:742.
64. **Guo, Q., K. Furukawa, B.L. Sopher, D.G. Pham, J. Xie, N. Robinson, G.M. Martin, and M.P. Mattson.** 1996. Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide. *Neuroreport* 8:379.

65. **Haass, C., E.H. Koo, A. Mellon, A.Y. Hung, and D.J. Selkoe.** 1992. Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357:500.
66. **Haass, C., M.G. Schlossmacher, A.Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B.L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E.H. Koo, D. Schenk, and D.B. Teplow.** 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism [see comments]. *Nature* 359:322.
67. **Haass, C., C.A. Lemere, A. Capell, M. Citron, P. Seubert, D. Schenk, L. Lannfelt, and D.J. Selkoe.** 1995. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* 1:1291.
68. **Haass, C.** 1996. Presenile because of presenilin: the presenilin genes and early onset Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurol* 9:254.
69. **Haass, C., J. Grunberg, A. Capell, C. Wild-Bode, U. Leimer, J. Walter, T. Yamazaki, I. Ihara, I. Zweckbronner, C. Jakubek, and R. Baumeister.** 1998. Proteolytic processing of Alzheimer's disease associated proteins. *J Neural Transm Suppl* 53:159.
70. **Haass, C. and B. de Strooper.** 1999. The presenilins in Alzheimer's disease--proteolysis holds the key. *Science* 286:916.
71. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166:557.
72. **Hardy, J.** 1997. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease [see comments]. *Trends Neurosci* 20:154.
73. **Hartmann, T., S.C. Bieger, B. Bruhl, P.J. Tienari, N. Ida, D. Allsop, G.W. Roberts, C.L. Masters, C.G. Dotti, K. Unsicker, and K. Beyreuther.** 1997. Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med* 3:1016.
74. **Hendriks, L., C.M. van Duijn, P. Cras, M. Cruys, W. Van Hul, F. van Harskamp, A. Warren, M.G. McInnis, S.E. Antonarakis, and J.J. Martin.** 1992. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet* 1:218.

75. **Heyman, A., G.G. Fillenbaum, and S.S. Mirra.** 1990. Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD): clinical, neuropsychological, and neuropathological components. *Aging (Milano)* 2:415.
76. **Holcomb, L., M.N. Gordon, E. McGowan, X. Yu, S. Benkovic, P. Jantzen, K. Wright, I. Saad, R. Mueller, D. Morgan, S. Sanders, C. Zehr, K. O'Campo, J. Hardy, C.M. Prada, C. Eckman, S. Younkin, K. Hsiao, and K. Duff.** 1998. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 4:97.
77. **Howlett, D.R., K.H. Jennings, D.C. Lee, M.S. Clark, F. Brown, R. Wetzel, S.J. Wood, P. Camilleri, and G.W. Roberts.** 1995. Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. *Neurodegeneration* 4:23.
78. **Huber, A.B., C. Brosamle, H. Mechler, and G. Huber.** 1999. Metalloprotease MP100: a synaptic protease in rat brain. *Brain Res* 837:193.
79. **Hung, A.Y., C. Haass, R.M. Nitsch, W.Q. Qiu, M. Citron, R.J. Wurtman, J.H. Growdon, and D.J. Selkoe.** 1993. Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J Biol Chem* 268:22959.
80. **Hung, A.Y. and D.J. Selkoe.** 1994. Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J* 13:534.
81. **Hussain, I., D. Powell, D.R. Howlett, D.G. Tew, T.D. Meek, C. Chapman, I.S. Gloger, K.E. Murphy, C.D. Southan, D.M. Ryan, T.S. Smith, D.L. Simmons, F.S. Walsh, C. Dingwall, and G. Christie.** 1999. Identification of a Novel Aspartic Protease (Asp 2) as beta-Secretase. *Mol Cell Neurosci* 14:419.
82. **Jarrett, J.T., E.P. Berger, and P.T.J. Lansbury.** 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.
83. **Jeckel, D., A. Karrenbauer, K.N. Burger, G. van Meer, and F. Wieland.** 1992. Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J Cell Biol* 117:259.
84. **Johnston, J.A., C.L. Ward, and R.R. Kopito.** 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143:1883.

85. **Jones, S.M., J.G.J. Alb, S.E. Phillips, V.A. Bankaitis, and K.E. Howell.** 1998. A phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol transfer protein act synergistically in formation of constitutive transport vesicles from the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 273:10349.
86. **Kang, J., H.G. Lemaire, A. Unterbeck, J.M. Salbaum, C.L. Masters, K.H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, and B. Muller-Hill.** 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733.
87. **Kay, J.** 1985. Aspartic proteinases and their inhibitors. *Biochem Soc Trans* 13:1027.
88. **Kim, K.S., G.Y. Wen, C. Bancher, J. Chen, V.J. Sapienza, H. Hong, and H.M. Wisniewski.** 1990. Detection and Quantification of Amyloid- $\beta$  Peptide with 2 Monoclonal Antibodies. *Neuroscience Research Communications* 7:113.
89. **Kim, S.S., Y.M. Choi, and Y.H. Suh.** 1997. Lack of interactions between amyloid precursor protein and hydrophilic domains of presenilin 1 and 2 using the yeast two hybrid system. *J Mol Neurosci* 9:49.
90. **Kim, T.W., W.H. Pettingell, O.G. Hallmark, R.D. Moir, W. Wasco, and R.E. Tanzi.** 1997a. Endoproteolytic cleavage and proteasomal degradation of presenilin 2 in transfected cells. *J Biol Chem* 272:11006.
91. **Kim, T.W., W.H. Pettingell, Y.K. Jung, D.M. Kovacs, and R.E. Tanzi.** 1997b. Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. *Science* 277:373.
92. **Kitaguchi, N., Y. Takahashi, Y. Tokushima, S. Shiojiri, and H. Ito.** 1988. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331:530.
93. **Knops, J., I. Lieberburg, and S. Sinha.** 1992. Evidence for a nonsecretory, acidic degradation pathway for amyloid precursor protein in 293 cells. Identification of a novel, 22-kDa, beta-peptide-containing intermediate. *J Biol Chem* 267:16022.
94. **Koo, E.H., S.S. Sisodia, L.C. Cork, A. Unterbeck, R.M. Bayney, and D.L. Price.** 1990. Differential expression of amyloid precursor protein mRNAs in cases of Alzheimer's disease and in aged nonhuman primates. *Neuron* 4:97.

95. **Koo, E.H. and S.L. Squazzo.** 1994. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 269:17386.
96. **Korenberg, J.R., S.M. Pulst, R.L. Neve, and R. West.** 1989. The Alzheimer amyloid precursor protein maps to human chromosome 21 bands q21.105-q21.05. *Genomics* 5:124.
97. **Kovacs, D.M., H.J. Fausett, K.J. Page, T.W. Kim, R.D. Moir, D.E. Merriam, R.D. Hollister, O.G. Hallmark, R. Mancini, K.M. Felsenstein, B.T. Hyman, R.E. Tanzi, and W. Wasco.** 1996. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med* 2:224.
98. **Kuentzel, S.L., S.M. Ali, R.A. Altman, B.D. Greenberg, and T.J. Raub.** 1993. The Alzheimer beta-amyloid protein precursor/protease nexin-II is cleaved by secretase in a trans-Golgi secretory compartment in human neuroglioma cells. *Biochem J* 295 ( Pt 2):367.
99. **Kurochkin, I.V. and S. Goto.** 1994. Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett* 345:33.
100. **L'Hernault, S.W. and P.M. Arduengo.** 1992. Mutation of a putative sperm membrane protein in *Caenorhabditis elegans* prevents sperm differentiation but not its associated meiotic divisions. *J Cell Biol* 119:55.
101. **Ladror, U.S., S.W. Snyder, G.T. Wang, T.F. Holzman, and G.A. Krafft.** 1994. Cleavage at the amino and carboxyl termini of Alzheimer's amyloid-beta by cathepsin D. *J Biol Chem* 269 :18422.
102. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.
103. **Lah, J.J., C.J. Heilman, N.R. Nash, H.D. Rees, H. Yi, S.E. Counts, and A.I. Levey.** 1997. Light and electron microscopic localization of presenilin-1 in primate brain. *J Neurosci* 17:1971.
104. **Lai, A., S.S. Sisodia, and I.S. Trowbridge.** 1995. Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 270:3565.

105. **Lambert, M.P., A.K. Barlow, B.A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T.E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K.L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C.E. Finch, G.A. Krafft, and W.L. Klein.** 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448.
106. **Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass, and F. Fahrenholz.** 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.
107. **Lee, M.K., H.H. Slunt, L.J. Martin, G. Thinakaran, G. Kim, S.E. Gandy, M. Seeger, E. Koo, D.L. Price, and S.S. Sisodia.** 1996. Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J Neurosci* 16:7513.
108. **Lee, V.M.** 1995. Disruption of the cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 5:663.
109. **Lehmann, S., R. Chiesa, and D.A. Harris.** 1997. Evidence for a six-transmembrane domain structure of presenilin 1. *J Biol Chem* 272:12047.
110. **Leimer, U., K. Lun, H. Romig, J. Walter, J. Grunberg, M. Brand, and C. Haass.** 1999. Zebrafish (*Danio rerio*) presenilin promotes aberrant amyloid beta-peptide production and requires a critical aspartate residue for its function in amyloidogenesis. *Biochemistry* 38:13602.
111. **Lemere, C.A., F. Lopera, K.S. Kosik, C.L. Lendon, J. Ossa, T.C. Saido, H. Yamaguchi, A. Ruiz, A. Martinez, L. Madrigal, L. Hincapie, J.C. Arango, D.C. Anthony, E.H. Koo, A.M. Goate, and D.J. Selkoe.** 1996. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med* 2:1146.
112. **Lemiere, J., D. Van Gool, and R. Dom.** 1999. Treatment of Alzheimer's disease: an evaluation of the cholinergic approach. *Acta Neurol Belg* 99:96.
113. **Levitan, D., T.G. Doyle, D. Brousseau, M.K. Lee, G. Thinakaran, H.H. Slunt, S.S. Sisodia, and I. Greenwald.** 1996. Assessment of normal and mutant human presenilin function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14940.
114. **Levitan, D. and I. Greenwald.** 1998. Effects of SEL-12 presenilin on LIN-12 localization and function in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125:3599.

115. **Levy-Lahad, E., W. Wasco, P. Poorkaj, D.M. Romano, J. Oshima, W.H. Pettingell, C.E. Yu, P.D. Jondro, S.D. Schmidt, and K. Wang.** 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus [see comments]. *Science* 269:973.
116. **Li, G. and P.D. Stahl.** 1993. Structure-function relationship of the small GTPase rab5. *J Biol Chem* 268:24475.
117. **Li, J., M. Xu, H. Zhou, J. Ma, and H. Potter.** 1997. Alzheimer presenilins in the nuclear membrane, interphase kinetochores, and centrosomes suggest a role in chromosome segregation. *Cell* 90:917.
118. **Li, X. and I. Greenwald.** 1996. Membrane topology of the *C. elegans* SEL-12 presenilin. *Neuron* 17 :1015.
119. **Li, X. and I. Greenwald.** 1997. HOP-1, a *Caenorhabditis elegans* presenilin, appears to be functionally redundant with SEL-12 presenilin and to facilitate LIN-12 and GLP-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12204.
120. **Lichtenthaler, S.F., N. Ida, G. Multhaup, C.L. Masters, and K. Beyreuther.** 1997. Mutations in the transmembrane domain of APP altering gamma-secretase specificity. *Biochemistry* 36:15396.
121. **Lichtenthaler, S.F., R. Wang, H. Grimm, S.N. Uljon, C.L. Masters, and K. Beyreuther.** 1999. Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer's disease gamma-secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein . *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3053.
122. **Loetscher, H., U. Deuschle, M. Brockhaus, D. Reinhardt, P. Nelboeck, J. Mous, J. Grunberg, C. Haass, and H. Jacobsen.** 1997. Presenilins are processed by caspase-type proteases. *J Biol Chem* 272:20655.
123. **Lorenzo, A. and B.A. Yankner.** 1994. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12243 .
124. **Luo, L., T. Tully, and K. White.** 1992. Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for *Appl* gene. *Neuron* 9:595.
125. **Lupashin, V.V., S. Hamamoto, and R.W. Schekman.** 1996. Biochemical requirements for the targeting and fusion of ER-derived transport vesicles with purified yeast Golgi membranes. *J Cell Biol* 132:277.

126. **Mackay, E.A., A. Ehrhard, M. Moniatte, C. Guenet, C. Tardif, C. Tarnus, O. Sorokine, B. Heintzelmann, C. Nay, J.M. Remy, J. Higaki, A. Van Dorselaer, J. Wagner, C. Danzin, and P. Mamont.** 1997. A possible role for cathepsins D, E, and B in the processing of beta-amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Eur J Biochem* 244:414.
127. **Mandel, M. and A. Higa.** 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53:159.
128. **Mandelkow, E.** 1999. Alzheimer's disease. The tangled tale of tau. *Nature* 402:588.
129. **Mandelkow, E.M. and E. Mandelkow.** 1998. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8:425.
130. **Marambaud, P., K. Ancolio, E. Lopez-Perez, and F. Checler.** 1998. Proteasome inhibitors prevent the degradation of familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 and potentiate A beta 42 recovery from human cells. *Mol Med* 4:147.
131. **Maruyama, K., Y. Kawamura, H. Asada, S. Ishiura, and K. Obata.** 1994. Cleavage at the N-terminal site of Alzheimer amyloid beta/A4 protein is essential for its secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 202:1517.
132. **Masters, C.L., G. Simms, N.A. Weinman, G. Multhaup, B.L. McDonald, and K. Beyreuther.** 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4245.
133. **Matsumoto, A., T. Enomoto, Y. Fujiwara, H. Baba, and R. Matsumoto.** 1996. Enhanced aggregation of beta-amyloid-containing peptides by extracellular matrix and their degradation by the 68 kDa serine protease prepared from human brain. *Neurosci Lett* 220:159.
134. **Mattson, M.P., S.W. Barger, B. Cheng, I. Lieberburg, V.L. Smith-Swintosky, and R.E. Rydel.** 1993. beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16:409.
135. **Mattson, M.P., Q. Guo, K. Furukawa, and W.A. Pedersen.** 1998. Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 70:1.



136. **McDermott, J.R., J.A. Biggins, and A.M. Gibson.** 1992. Human brain peptidase activity with the specificity to generate the N-terminus of the Alzheimer beta-amyloid protein from its precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 185:746.
137. **McGeer, P.L. and E.G. McGeer.** 1995. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 21:195.
138. **Mirra, S.S., M. Gearing, D.W.J. McKeel, B.J. Crain, J.P. Hughes, G. van Belle, and A. Heyman.** 1994. Interlaboratory comparison of neuropathology assessments in Alzheimer's disease: a study of the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) [published erratum appears in *J Neuropathol Exp Neurol* 1994 Jul;53(4):425] [see comments]. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:303.
139. **Mori, H., K. Takio, M. Ogawara, and D.J. Selkoe.** 1992. Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 267:17082.
140. **Mullan, M., F. Crawford, K. Axelman, H. Houlden, L. Lilius, B. Winblad, and L. Lannfelt.** 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1:345.
141. **Murphy, M.P., L.J. Hickman, C.B. Eckman, S.N. Uljon, R. Wang, and T.E. Golde.** 1999. gamma-Secretase, evidence for multiple proteolytic activities and influence of membrane positioning of substrate on generation of amyloid beta peptides of varying length. *J Biol Chem* 274:11914.
142. **Murrell, J., M. Farlow, B. Ghetti, and M.D. Benson.** 1991. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 254:97.
143. **Näslund, J., M. Jensen, L.O. Tjernberg, J. Thyberg, L. Terenius, and C. Nordstedt.** 1994. The metabolic pathway generating p3, an A beta-peptide fragment, is probably non-amyloidogenic. *Biochem Biophys Res Commun* 204:780.
144. **Naidu, A., D. Quon, and B. Cordell.** 1995. beta-Amyloid peptide produced in vitro is degraded by proteinases released by cultured cells. *J Biol Chem* 270:1369.
145. **Nakai, T., A. Yamasaki, M. Sakaguchi, K. Kosaka, K. Mihara, Y. Amaya, and S. Miura.** 1999. Membrane topology of Alzheimer's disease-related presenilin 1. Evidence for the existence of a molecular species with a seven membrane-spanning and one membrane-embedded structure. *J Biol Chem* 274:23647.

146. **Naruse, S., G. Thinakaran, J.J. Luo, J.W. Kusiak, T. Tomita, T. Iwatsubo, X. Qian, D.D. Ginty, D.L. Price, D.R. Borchelt, P.C. Wong, and S.S. Sisodia.** 1998. Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* 21:1213.
147. **Nitsch, R.M., B.E. Slack, R.J. Wurtman, and J.H. Growdon.** 1992. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258:304.
148. **Oltersdorf, T., P.J. Ward, T. Henriksson, E.C. Beattie, R. Neve, I. Lieberburg, and L.C. Fritz.** 1990. The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J Biol Chem* 265:4492.
149. **Overly, C.C., L.C. Fritz, I. Lieberburg, and L. McConlogue.** 1991. The beta-amyloid precursor protein is not processed by the regulated secretory pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 181:513.
150. **Page, K., R. Hollister, R.E. Tanzi, and B.T. Hyman.** 1996. In situ hybridization analysis of presenilin 1 mRNA in Alzheimer disease and in lesioned rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14020.
151. **Paresce, D.M., R.N. Ghosh, and F.R. Maxfield.** 1996. Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* 17:553.
152. **Perez-Tur, J., S. Froelich, G. Prihar, R. Crook, M. Baker, K. Duff, M. Wragg, F. Busfield, C. Lendon, and R.F. Clark.** 1995. A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene. *Neuroreport* 7:297.
153. **Pike, C.J., D. Burdick, A.J. Walencewicz, C.G. Glabe, and C.W. Cotman.** 1993. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13:1676.
154. **Plemper, R.K. and D.H. Wolf.** 1999. Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome. *Mol Biol Rep* 26:125.

155. **Podlisny, M.B., M. Citron, P. Amarante, R. Sherrington, W. Xia, J. Zhang, T. Diehl, G. Levesque, P. Fraser, C. Haass, E.H. Koo, P. Seubert, P. St. George-Hyslop, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe.** 1997. Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. *Neurobiol Dis* 3:325.
156. **Podlisny, M.B., D.M. Walsh, P. Amarante, B.L. Ostaszewski, E.R. Stimson, J.E. Maggio, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe.** 1998. Oligomerization of endogenous and synthetic amyloid beta-protein at nanomolar levels in cell culture and stabilization of monomer by Congo red. *Biochemistry* 37:3602.
157. **Ponte, P., P. Gonzalez-DeWhitt, J. Schilling, J. Miller, D. Hsu, B. Greenberg, K. Davis, W. Wallace, I. Lieberburg, and F. Fuller.** 1988. A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 331:525.
158. **Powers, J.C., S. Odake, J. Oleksyszyn, H. Hori, T. Ueda, B. Boduszek, and C. Kam.** 1993. Proteases--structures, mechanism and inhibitors. *Agents Actions Suppl* 42:3.
159. **Qiu, W.Q., W. Borth, Z. Ye, C. Haass, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe.** 1996. Degradation of amyloid beta-protein by a serine protease-alpha2-macroglobulin complex. *J Biol Chem* 271:8443.
160. **Qiu, W.Q., D.M. Walsh, Z. Ye, K. Vekrellis, J. Zhang, M.B. Podlisny, M.R. Rosner, A. Safavi, L.B. Hersh, and D.J. Selkoe.** 1998. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* 273:32730.
161. **Querfurth, H.W. and D.J. Selkoe.** 1994. Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells. *Biochemistry* 33:4550.
162. **Ramchandran, R. and I. Sen.** 1995. Cleavage processing of angiotensin-converting enzyme by a membrane-associated metalloprotease. *Biochemistry* 34:12645.
163. **Ray, W.J., M. Yao, J. Mumm, E.H. Schroeter, P. Saftig, M. Wolfe, D.J. Selkoe, R. Kopan, and A.M. Goate.** 1999. Cell surface presenilin-1 participates in the gamma-secretase-like proteolysis of notch [In Process Citation]. *J Biol Chem* 274:36801.

164. **Roher, A.E., M.O. Chaney, Y.M. Kuo, S.D. Webster, W.B. Stine, L.J. Haverkamp, A.S. Woods, R.J. Cotter, J.M. Tuohy, G.A. Krafft, B.S. Bonnell, and M.R. Emmerling.** 1996. Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271:20631.
165. **Sahasrabudhe, S.R., A.M. Brown, J.D. Hulmes, J.S. Jacobsen, M.P. Vitek, A.J. Blume, and J.L. Sonnenberg.** 1993. Enzymatic generation of the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *J Biol Chem* 268:16699.
166. **Saitoh, T., M. Sundsmo, J.M. Roch, N. Kimura, G. Cole, D. Schubert, T. Oltersdorf, and D.B. Schenk.** 1989. Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 58:615.
167. **Sambamurti, K., L.M. Refolo, J. Shioi, M.A. Pappolla, and N.K. Robakis.** 1992. The Alzheimer's amyloid precursor is cleaved intracellularly in the trans-Golgi network or in a post-Golgi compartment. *Ann N Y Acad Sci* 674:118.
168. **Saunders, A.J., T.W. Kim, and R. Tanzi.** 1999. BACE Maps to Chromosome 11 and a BACE Homolog, BACE2, Reside in the Obligate Down Syndrome Region of Chromosome 21. *Science* 286:1255a.
169. **Saura, C.A., T. Tomita, F. Davenport, C.L. Harris, T. Iwatsubo, and G. Thinakaran.** 1999. Evidence that intramolecular associations between presenilin domains are obligatory for endoproteolytic processing. *J Biol Chem* 274:13818.
170. **Schagger, H., H. Aquila, and G. Von Jagow.** 1988. Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem* 173:201.
170. **Scheuner, D., C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T.D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, E. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D. Selkoe, and S. Younkin.** 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 [see comments]. *Nat Med* 2:864.

172. **Schonlein, C., J. Loffler, and G. Huber.** 1994. Purification and characterization of a novel metalloprotease from human brain with the ability to cleave substrates derived from the N-terminus of beta-amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 201:45.
173. **Schrader-Fischer, G., M. Staufenbiel, and P.A. Paganetti.** 1997. Insertion of lysosomal targeting sequences to the amyloid precursor protein reduces secretion of beta A4. *J Neurochem* 68:1571.
174. **Schubert, D., L.W. Jin, T. Saitoh, and G. Cole.** 1989. The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion [published erratum appears in *Neuron* 1990 May;4(5):813]. *Neuron* 3:689.
175. **Schubert, D. and C. Behl.** 1993. The expression of amyloid beta protein precursor protects nerve cells from beta-amyloid and glutamate toxicity and alters their interaction with the extracellular matrix. *Brain Res* 629:275.
176. **Seeger, M., C. Nordstedt, S. Petanceska, D.M. Kovacs, G.K. Gouras, S. Hahne, P. Fraser, L. Levesque, A.J. Czernik, P.S. George-Hyslop, S.S. Sisodia, G. Thinakaran, R.E. Tanzi, P. Greengard, and S. Gandy.** 1997. Evidence for phosphorylation and oligomeric assembly of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5090.
177. **Selkoe, D.J.** 1991. Amyloid protein and Alzheimer's disease. *Sci Am* 265:68.
178. **Selkoe, D.J.** 1996. Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271:18295.
179. **Selkoe, D.J.** 1998. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8:447.
180. **Selkoe, D.J.** 1999. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399:A23.
181. **Seubert, P., C. Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, S. Sinha, M. Schlossmacher, J. Whaley, and C. Swindlehurst.** 1992. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids [see comments]. *Nature* 359:325.
182. **Shen, J., R.T. Bronson, D.F. Chen, W. Xia, D.J. Selkoe, and S. Tonegawa.** 1997. Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89:629.

183. **Sherrington, R., E.I. Rogaev, Y. Liang, E.A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, and K. Holman.** 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease [see comments]. *Nature* 375:754.
184. **Shoji, M., T.E. Golde, J. Ghiso, T.T. Cheung, S. Estus, L.M. Shaffer, X.D. Cai, D.M. McKay, R. Tintner, and B. Frangione.** 1992. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258:126.
185. **Short, J.M., J.M. Fernandez, J.A. Sorge, and W.D. Huse.** 1988. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* 16:7583.
186. **Simons, M., B. de Strooper, G. Multhaup, P.J. Tienari, C.G. Dotti, and K. Beyreuther.** 1996. Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 16:899.
187. **Sinha, S., H.F. Dovey, P. Seubert, P.J. Ward, R.W. Blacher, M. Blaber, R.A. Bradshaw, M. Arici, W.C. Mobley, and I. Lieberburg.** 1990. The protease inhibitory properties of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 265:8983.
188. **Sinha, S., J.P. Anderson, R. Barbour, G.S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H.F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S.M. Suomensari, S. Wang, D. Walker, and V. John.** 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain [see comments]. *Nature* 402:537.
189. **Sisodia, S.S., E.H. Koo, K. Beyreuther, A. Unterbeck, and D.L. Price.** 1990. Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248:492.
190. **Sisodia, S.S.** 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6075.
191. **Skovronsky, D.M., R.W. Doms, and V.M. Lee.** 1998. Detection of a novel intraneuronal pool of insoluble amyloid beta protein that accumulates with time in culture. *J Cell Biol* 141:1031.

192. **Slack, B.E., R.M. Nitsch, E. Livneh, G.M.J. Kunz, J. Breu, H. Eldar, and R.J. Wurtman.** 1993. Regulation by phorbol esters of amyloid precursor protein release from Swiss 3T3 fibroblasts overexpressing protein kinase C alpha. *J Biol Chem* 268:21097.
193. **Slunt, H.H., G. Thinakaran, C. Von Koch, A.C. Lo, R.E. Tanzi, and S.S. Sisodia.** 1994. Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem* 269:2637.
194. **Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid [published erratum appears in *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279]. *Anal Biochem* 150:76.
195. **Steiner, H., A. Capell, B. Pesold, M. Citron, P.M. Kloetzel, D.J. Selkoe, H. Romig, K. Mendla, and C. Haass.** 1998. Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. *J Biol Chem* 273:32322.
196. **Steiner, H., K. Duff, A. Capell, H. Romig, M.G. Grim, S. Lincoln, J. Hardy, X. Yu, M. Picciano, K. Fichtler, M. Citron, R. Kopan, B. Pesold, S. Keck, M. Baader, T. Tomita, T. Iwatsubo, R. Baumeister, and C. Haass.** 1999b. A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling. *J Biol Chem* 274:28669.
197. **Steiner, H., H. Romig, M.G. Grim, U. Philipp, B. Pesold, M. Citron, R. Baumeister, and C. Haass.** 1999a. 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.
198. **Steiner, H., H. Romig, B. Pesold, U. Philipp, M. Baader, M. Citron, H. Loetscher, H. Jacobsen, and C. Haass.** 1999c. Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis. *Biochemistry* 38:14600.
199. **Stephens, D.J. and B.M. Austen.** 1996. Metabolites of the beta-amyloid precursor protein generated by beta-secretase localise to the trans-Golgi network and late endosome in 293 cells. *J Neurosci Res* 46:211.

200. **Struhl, G. and I. Greenwald.** 1999. Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila* [see comments]. *Nature* 398:522.
201. **Suzuki, T., A.C. Nairn, S.E. Gandy, and P. Greengard.** 1992. Phosphorylation of Alzheimer amyloid precursor protein by protein kinase C [letter]. *Neuroscience* 48:755.
202. **Suzuki, T., M. Oishi, D.R. Marshak, A.J. Czernik, A.C. Nairn, and P. Greengard.** 1994. Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein. *EMBO J* 13:1114.
203. **Swiatek, P.J., C.E. Lindsell, F.F. del Amo, G. Weinmaster, and T. Gridley.** 1994. Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev* 8:707.
204. **Takashima, A., M. Sato, M. Mercken, S. Tanaka, S. Kondo, T. Honda, K. Sato, M. Murayama, K. Noguchi, Y. Nakazato, and H. Takahashi.** 1996. Localization of Alzheimer-associated presenilin 1 in transfected COS-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227:423.
205. **Tamaoka, A., R.N. Kalaria, I. Lieberburg, and D.J. Selkoe.** 1992. Identification of a stable fragment of the Alzheimer amyloid precursor containing the beta-protein in brain microvessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1345.
206. **Tanzi, R.E., J.F. Gusella, P.C. Watkins, G.A. Bruns, P. St George-Hyslop, M.L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D.M. Kurnit, and R.L. Neve.** 1987. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235:880.
207. **Tanzi, R.E., A.I. McClatchey, E.D. Lamperti, L. Villa-Komaroff, J.F. Gusella, and R.L. Neve.** 1988. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331:528.
208. **Taylor, R.S., S.M. Jones, R.H. Dahl, M.H. Nordeen, and K.E. Howell.** 1997. Characterization of the Golgi complex cleared of proteins in transit and examination of calcium uptake activities. *Mol Biol Cell* 8:1911.



209. **Thinakaran, G., D.R. Borchelt, M.K. Lee, H.H. Slunt, L. Spitzer, G. Kim, T. Ratovitsky, F. Davenport, C. Nordstedt, M. Seeger, J. Hardy, A.I. Levey, S.E. Gandy, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, D.L. Price, and S.S. Sisodia.** 1996. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17:181.
210. **Thinakaran, G., D.B. Teplow, R. Siman, B. Greenberg, and S.S. Sisodia.** 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.
211. **Thinakaran, G., C.L. Harris, T. Ratovitski, F. Davenport, H.H. Slunt, D.L. Price, D.R. Borchelt, and S.S. Sisodia.** 1997. Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *J Biol Chem* 272 :28415.
212. **Thinakaran, G., J.B. Regard, C.M. Bouton, C.L. Harris, D.L. Price, D.R. Borchelt, and S.S. Sisodia.** 1998. Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP. *Neurobiol Dis* 4:438.
213. **Thompson, A., F. Grueninger-Leitch, G. Huber, and P. Malherbe.** 1997. Expression and characterization of human beta-secretase candidates metalloendopeptidase MP78 and cathepsin D in beta APP-overexpressing cells. *Brain Res Mol Brain Res* 48:206.
214. **Tienari, P.J., N. Ida, E. Ikonen, M. Simons, A. Weidemann, G. Multhaup, C.L. Masters, C.G. Dotti, and K. Beyreuther.** 1997. Intracellular and secreted Alzheimer beta-amyloid species are generated by distinct mechanisms in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4125.
215. **Tischer, E. and B. Cordell.** 1996. Beta-amyloid precursor protein. Location of transmembrane domain and specificity of gamma-secretase cleavage. *J Biol Chem* 271:21914.
216. **Tomita, T., K. Maruyama, T.C. Saido, H. Kume, K. Shinozaki, S. Tokuhira, A. Capell, J. Walter, J. Grunberg, C. Haass, T. Iwatsubo, and K. Obata.** 1997. The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2025.

217. **Vassar, R., B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, and M. Citron.** 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE [see comments]. *Science* 286:735.
218. **Vaux, D., J. Tooze, and S. Fuller.** 1990. Identification by anti-idiotypic antibodies of an intracellular membrane protein that recognizes a mammalian endoplasmic reticulum retention signal [retracted by Vaux D, Tooze J, Fuller S. In: *Nature* 1992 Nov 26;360(6402):372] [see comments]. *Nature* 345:495.
219. **Vito, P., T. Ghayur, and L. D'Adamio.** 1997. Generation of anti-apoptotic presenilin-2 polypeptides by alternative transcription, proteolysis, and caspase-3 cleavage. *J Biol Chem* 272:28315.
220. **Vogelstein, B. and D. Gillespie.** 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:615.
221. **Walter, J., A. Capell, J. Grunberg, B. Pesold, A. Schindzielorz, R. Prior, M.B. Podlisny, P. Fraser, P.S. Hyslop, D.J. Selkoe, and C. Haass.** 1996. The Alzheimer's disease-associated presenilins are differentially phosphorylated proteins located predominantly within the endoplasmic reticulum. *Mol Med* 2:673.
222. **Walter, J., J. Grunberg, A. Capell, B. Pesold, A. Schindzielorz, M. Citron, K. Mendla, P.S. George-Hyslop, G. Multhaup, D.J. Selkoe, and C. Haass.** 1997. Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5349.
223. **Wasco, W., K. Bupp, M. Magendantz, J.F. Gusella, R.E. Tanzi, and F. Solomon.** 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.
224. **Wasco, W., J.D. Brook, and R.E. Tanzi.** 1993. The amyloid precursor-like protein (APLP) gene maps to the long arm of human chromosome 19. *Genomics* 15:237.

225. **Weber, M., K. Moller, M. Welzeck, and J. Schorr.** 1995. Short technical reports. Effects of lipopolysaccharide on transfection efficiency in eukaryotic cells. *Biotechniques* 19:930.
226. **Wegiel, J., H.M. Wisniewski, J. Dziwiatkowski, M. Tarnawski, A. Dziwiatkowska, J. Morys, Z. Soltysiak, and K.S. Kim.** 1996. Subpopulation of dogs with severe brain parenchymal beta amyloidosis distinguished with cluster analysis. *Brain Res* 728:20.
227. **Wild-Bode, C., T. Yamazaki, A. Capell, U. Leimer, H. Steiner, Y. Ihara, and C. Haass.** 1997. Intracellular generation and accumulation of amyloid beta-peptide terminating at amino acid 42. *J Biol Chem* 272:16085.
228. **Wilson, C.A., R.W. Doms, and V.M. Lee.** 1999. Intracellular APP processing and A beta production in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:787.
229. **Wisniewski, K.E., A.J. Dalton, C. McLachlan, G.Y. Wen, and H.M. Wisniewski.** 1985. Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology* 35:957.
230. **Wolfe, M.S., A. De Los, D.D. Miller, W. Xia, and D.J. Selkoe.** 1999b. Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 38:11223.
231. **Wolfe, M.S., W. Xia, B.L. Ostaszewski, T.S. Diehl, W.T. Kimberly, and D.J. Selkoe.** 1999a. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity [see comments]. *Nature* 398:513.
232. **Wolfe, M.S., W. Xia, C.L. Moore, D.D. Leatherwood, B. Ostaszewski, T. Rahmati, I.O. Donkor, and D.J. Selkoe.** 1999c. Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry* 38:4720.
233. **Wong, P.C., H. Zheng, H. Chen, M.W. Becher, D.J. Sirinathsinghji, M.E. Trumbauer, H.Y. Chen, D.L. Price, L.H. Van der Ploeg, and S.S. Sisodia.** 1997. Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 387:288.
234. **Xia, W., J. Zhang, R. Perez, E.H. Koo, and D.J. Selkoe.** 1997b. Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8208.

235. **Xia, W., J. Zhang, D. Kholodenko, M. Citron, M.B. Podlisny, D.B. Teplow, C. Haass, P. Seubert, E.H. Koo, and D.J. Selkoe.** 1997a. Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins. *J Biol Chem* 272:7977.
236. **Xia, W., J. Zhang, B.L. Ostaszewski, W.T. Kimberly, P. Seubert, E.H. Koo, J. Shen, and D.J. Selkoe.** 1998. Presenilin 1 regulates the processing of beta-amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid beta-protein in endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochemistry* 37:16465.
237. **Xu, H., D. Sweeney, R. Wang, G. Thinakaran, A.C. Lo, S.S. Sisodia, P. Greengard, and S. Gandy.** 1997. Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3748.
238. **Yamazaki, T., D.J. Selkoe, and E.H. Koo.** 1995. Trafficking of cell surface beta-amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons. *J Cell Biol* 129:431.
239. **Yamin, R., E.G. Malgeri, J.A. Sloane, W.T. McGraw, and C.R. Abraham.** 1999. Metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 is necessary for Alzheimer's amyloid- beta peptide degradation. *J Biol Chem* 274:18777.
240. **Yan, R., M.J. Bienkowski, M.E. Shuck, H. Miao, M.C. Tory, A.M. Pauley, J.R. Brashier, N.C. Stratman, W.R. Mathews, A.E. Buhl, D.B. Carter, A.G. Tomasselli, L.A. Parodi, R.L. Heinrikson, and M.E. Gurney.** 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity [see comments]. *Nature* 402:533.
241. **Yan, S.D., X. Chen, J. Fu, M. Chen, H. Zhu, A. Roher, T. Slattery, L. Zhao, M. Nagashima, J. Morser, A. Migheli, P. Nawroth, D. Stern, and A.M. Schmidt.** 1996. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease [see comments]. *Nature* 382:685.
242. **Yankner, B.A.** 1996. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16:921.

243. **Ye, Y., N. Lukinova, and M.E. Fortini.** 1999. Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila* Presenilin mutants [see comments]. *Nature* 398:525.
244. **Yu, G., F. Chen, G. Levesque, M. Nishimura, D.M. Zhang, L. Levesque, E. Rogaeva, D. Xu, Y. Liang, M. Duthie, P.H. St George-Hyslop, and P.E. Fraser.** 1998. The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains beta-catenin. *J Biol Chem* 273:16470.
245. **Zhang, J., D.E. Kang, W. Xia, M. Okochi, H. Mori, D.J. Selkoe, and E.H. Koo.** 1998. Subcellular distribution and turnover of presenilins in transfected cells. *J Biol Chem* 273:12436.

## Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	Amyloid $\beta$
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
AD	„Alzheimer Disease“
AK	Antikörper
APP	„Amyloid-Precursor-Protein“
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	„Bovine Serum Albumin“
CTF	„C-terminal Fragments“
ddH <sub>2</sub> O	dideionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay“
ER	Endoplasmatischer Retikulum
ERGIC	„ER-Golgi-Intermediate Compartment“
FAD	„Familial-Alzheimer-Disease“
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
mAB	monoklonaler Antikörper
M	Molar
mg	Milligram
mM	Millimolar
MUT	Mutante
PBS	„Phospho-Buffered-Saline“
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	Post-Nukleärer-Überstand
PS-1	Presenilin 1
PS-2	Presenilin 2
pAB	polyklonaler Antikörper
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
s.	siehe

**SDS**

**TGN**

**Vgl.**

**WT**

**Sodiumdodecylsulfat**

**Transgolginetzwerk**

**Vergleiche**

**Wildtyp**