

**„Die Prozessierung des humanen Amyloid-
Vorläuferproteins im Verlauf der replikativen
Seneszenz“**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

von

Andreas Kern

geboren am 01. Juni 1975 in Simmern

Mainz, im April 2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	2
1.1 Hintergrund und Relevanz der Untersuchung altersabhängiger neurodegenerativer Erkrankungen	2
1.2 Die Histopathologie der Alzheimer Krankheit	3
1.3 Molekulare Grundlagen der Alzheimer Krankheit	4
1.4 APP: Struktur, Prozessierung und physiologische Funktion	6
1.4.1 Das Amyloid-Vorläuferprotein	6
1.4.2 Die Prozessierung von APP	7
1.4.3 Die physiologische Funktion von APP	9
1.5 Struktur und Funktion von Lipid Rafts	10
1.6 Zelluläre Alterung	11
1.6.1 Replikative Seneszenz	12
1.6.2 Theorien zur zellulären Alterung	13
1.7 Der Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	14
1.8 Zielsetzung der Arbeit	16
2. Materialien und Methoden	18
2.1 Materialien	18
2.1.1 Geräte	18
2.1.2 Chemikalien und Kits	19
2.1.3 Zelllinie	19
2.1.4 Nematoden	19
2.1.3 Bakterienstämme	19
2.1.4 Plasmide	20
2.1.5 Primer	20
2.2 Methoden	20
2.2.1 Zellbiologische Methoden	20
2.2.1.1 Kultivierung von IMR-90 normalen humanen Fibroblasten	20
2.2.1.2 Zelluläre Dauerkulturen	21
2.2.1.3 Bestimmung von Populationsverdopplungen	21
2.2.1.4 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Färbung	21
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	22

2.2.2.1	<i>Proteinpräparation</i>	22
2.2.2.2	<i>Proteinquantifizierung</i>	22
2.2.2.3	<i>Präparation von Lipid Rafts</i>	22
2.2.2.4	<i>Western Blot Analyse</i>	23
2.2.2.5	<i>Immunocytochemie</i>	26
2.2.2.6	<i>Metabolische Markierung von APP (Pulse-Chase)</i>	27
2.2.2.7	<i>Enzymatische Aktivitätsbestimmungen</i>	27
2.2.2.8	<i>Bestimmung des freien Cholesterolgehaltes</i>	28
2.2.3	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	28
2.2.3.1	<i>Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen</i>	28
2.2.3.2	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	28
2.2.3.3	<i>Reverse Transkription / Synthese von cDNA</i>	29
2.2.3.4	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	29
2.2.3.5	<i>Real Time PCR Analyse</i>	30
2.2.3.6	<i>Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA</i>	30
2.2.3.7	<i>Präparative Agarose-Gelelektrophorese</i>	31
2.2.3.8	<i>Plasmid-Präparation</i>	31
2.2.3.9	<i>Restriktionsverdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	32
2.2.3.10	<i>A-tailing von PCR-Produkten</i>	32
2.2.3.11	<i>TOPO-TA-Ligation</i>	32
2.2.3.12	<i>Klonierung mit dem Gateway System</i>	33
2.2.4	<i>Mikrobiologische Methoden</i>	33
2.2.4.1	<i>Bakterienanzucht</i>	33
2.2.4.2	<i>Herstellung chemisch-kompetenter E. coli Bakterien</i>	34
2.2.4.3	<i>Transformation von Bakterien durch Hitzeschock</i>	35
2.2.4.4	<i>Herstellen von bakteriellen Dauerkulturen</i>	35
2.2.5	<i>Methoden für C. elegans</i>	35
2.2.5.1	<i>Kultivierung</i>	35
2.2.5.1.1	<i>Bakterielle Starterkulturen</i>	36
2.2.5.2	<i>Langfristige Aufbewahrung von C. elegans</i>	37
2.2.5.3	<i>Transformation durch Mikroinjektion von DNA</i>	37
2.2.5.4	<i>Proteinpräparation</i>	38
3.1	Ergebnisse	39
3.1	<i>Charakterisierung des zellulären Altersmodells</i>	39

3.1.1	<i>Alterung der Fibroblastenkultur</i>	39
3.1.2	<i>Analyse typischer Altersmarker</i>	40
3.1.3	<i>Altersassoziierte Erhöhung der zellulären Cholesterolspiegel und Disintegration von Lipid Rafts</i>	41
3.2	<i>Untersuchungen zu altersassoziierten Veränderungen der Prozessierung von endogenem APP</i>	43
3.2.1	<i>Altersassoziierte Abnahme der Spiegel von reifem APP und der APP-Spaltfragmente</i>	43
3.2.2	<i>Altersassoziierte Reduktion der Reifung und Prozessierung von APP</i>	47
3.2.3	<i>Altersabhängige erhöhte Cholesterolspiegel inhibieren die Reifung von APP</i>	49
3.2.4	<i>Altersassoziierte Veränderungen der Proteinspiegel der Sekretasen</i>	52
3.2.5	<i>Der Einfluss der altersassoziierten Disintegration von Lipid Rafts auf die Komponenten der APP-Prozessierung</i>	53
3.2.6	<i>Altersassoziierte Erhöhung der enzymatischen β-Sekretaseaktivität und Reduktion der γ-Sekretaseaktivität</i>	55
3.3	<i>C. elegans als Modellsystem der APP-Prozessierung</i>	58
3.3.1	<i>Konstruktion eines APP-exprimierenden Wurms</i>	58
3.3.2	<i>Expressionsmuster von $P_{apl-1}::hAPP::gfp$</i>	59
3.3.3	<i>Phänotypische Charakterisierung der transgenen Würmer</i>	60
3.3.3.1	<i>Eilegedefekt und reduzierte Fertilität</i>	61
3.3.3.2	<i>Verzögerung der post-embryonalen Entwicklung transgener Würmer</i>	62
3.3.4	<i>Biochemische Untersuchung der Prozessierung von humanem APP in transgenen Würmern</i>	62
4.	Diskussion	64
4.1	<i>Untersuchung der endogenen APP-Prozessierung in humanen Fibroblasten als zelluläres Altersmodell</i>	64
4.1.1	<i>Die Auswirkung zellulärer Alterung auf die Reifung von APP</i>	65
4.1.2	<i>Die Auswirkung zellulärer Alterung auf die Proteinspiegel und Aktivitäten der Sekretasen</i>	67
4.1.2.1	<i>α-Sekretase</i>	68
4.1.2.2	<i>β-Sekretase</i>	68
4.1.2.3	<i>γ-Sekretase</i>	70

4.1.3	<i>Der Einfluss der altersassoziierten Disintegration von Lipid Rafts auf die Prozessierung von APP</i>	73
4.2	Relevanz der Ergebnisse für ein besseres Verständnis der Pathomechanismen	74
4.3	Der Einfluss zellulärer Alterung auf die Spiegel und subzelluläre Lokalisation von Cholesterol und Caveolin-1	76
4.4	C. elegans als Modell der APP-Prozessierung	78
4.4.1	<i>hAPP::<i>GFP</i>-vermittelte Phänotypen</i>	79
4.4.2	<i>Weiterführende Experimente mit den transgenen Würmern</i>	80
4.5	Ausblick	81
5. Zusammenfassung/Summary		82
6. Literaturverzeichnis		86
7. Anhang		102

1. Einleitung

1.1 Hintergrund und Relevanz der Untersuchung altersabhängiger neurodegenerativer Erkrankungen

In den industrialisierten Ländern ist die demographische Entwicklung drastischen Veränderungen unterzogen. Nach Berechnungen des Statistischen Bundesamtes wird die Altersgruppe der über 80-jährigen in Zukunft die schnellste wachsende Altersgruppe darstellen, wodurch eine „Überalterung“ der bundesdeutschen Bevölkerung resultieren wird (Abb. 1.1).

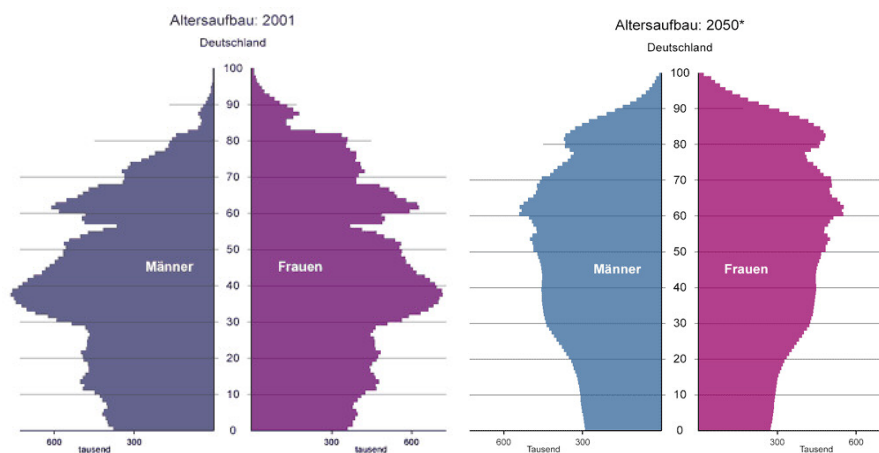


Abb. 1.1 Demographische Entwicklung der BRD (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden).

Gleichzeitig stellt das Alter den größten Risikofaktor für viele degenerative Erkrankungen dar. Insbesondere neurodegenerative Krankheiten, wie die Alzheimer oder die Parkinson Krankheit, weisen dabei eine hohe Prävalenz auf (Riedel-Heller *et al.*, 2001). Weltweit sind circa 24 Millionen Menschen von der Alzheimer Krankheit betroffen und es wird erwartet, dass sich die Zahl der Erkrankten alle 20 Jahre verdoppelt (Ferri *et al.*, 2005). Die Altersabhängigkeit wird bei der Alzheimer Erkrankung besonders deutlich (Abb. 1.2). Im Allgemeinen zeichnen sich neurodegenerative Erkrankungen durch einen langsamen Krankheitsverlauf aus.

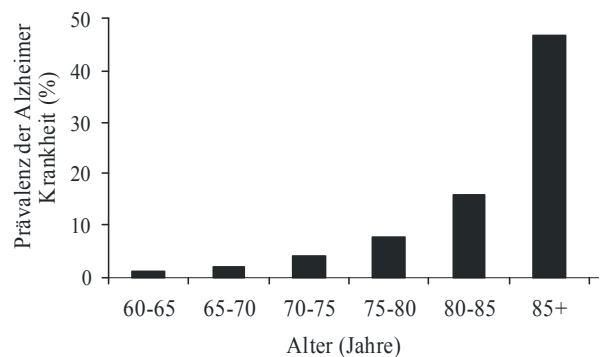


Abb. 1.2 Altersabhängigkeit der Alzheimer Krankheit (verändert nach www.alzheimers-disease.com).

Sie sind vielfach mit Störungen und letztlich dem Verlust von Gehirnleistungen und damit der individuellen Persönlichkeit verbunden. Neben persönlichen Problemen erwachsen daraus zukünftig sozioökonomische (Ankri und Poupard, 2003). Aus diesem Grund sind die Erforschung und das Verständnis altersassoziierter Mechanismen, die mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung stehen, von großer Bedeutung. Insbesondere Erkenntnisse, die zur Entwicklung neuer Präventionen und Therapien führen, bedeuten eine Steigerung der Lebensqualität für den Einzelnen und gleichzeitig eine Entlastung der Gesundheits- und Sozialsysteme.

1.2 Die Histopathologie der Alzheimer Krankheit

Alois Alzheimer beschrieb 1906 im Gehirn der 51-jährig verstorbenen Patientin Auguste D. erstmalig die klinischen Symptome der später nach ihm benannten Alzheimer Krankheit (Abb. 1.3) (Alzheimer, 1907). Die beiden charakteristischen pathologischen Merkmale, Amyloid-Plaques und neurofibrilläre Bündel („*tangles*“), stellen bis heute die Grundlage der post-mortem Diagnose der Krankheit dar und treten überwiegend in den Gehirnregionen Neocortex, Hippocampus sowie im Limbischen System auf (Braak *et al.*, 1996; Thal *et al.*, 2005).

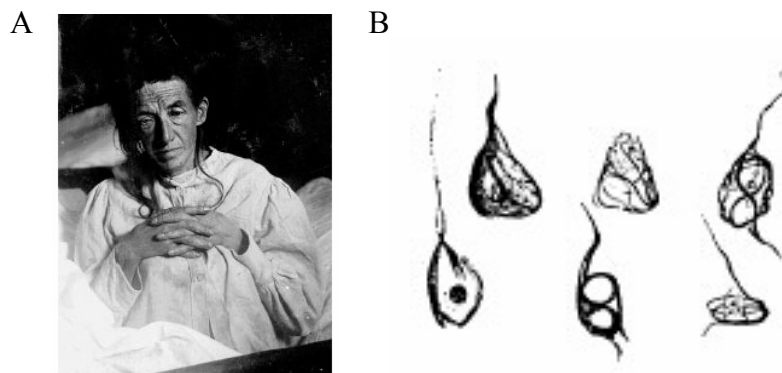


Abb. 1.3 (A) Fotografie von Auguste D., der ersten Patientin von A. Alzheimer. (B) Neurofibrilläre Bündel, gezeichnet von A. Alzheimer nach lichtmikroskopischer Untersuchung (verändert nach Maurer *et al.*, 1997).

Neurofibrilläre Bündel liegen vorwiegend intrazellulär im somato-dendritischen oder axonalen Kompartiment von Neuronen vor. Sie entstehen durch Aggregation von gepaarten helikalen Filamenten aus hyperphosphorylierten Formen des Proteins Tau (Goedert *et al.*, 1996; Iqbal *et al.*, 2005). Dieses Mikrotubuli-assoziierte Protein ist für die Stabilisierung oder Bildung der axonalen Mikrotubuli verantwortlich (Friedhoff *et*

al., 2000). Die Hyperphosphorylierung von Tau ist auf eine Störung des Gleichgewichts bestimmter Kinasen und Phosphatasen zurückzuführen, deren Auslöser oder Ursache bisher nicht vollständig erklärt werden kann (Mandelkow und Mandelkow, 1998). Als Folge wird der Aufbau des Mikrotubuli-Apparates verändert und/oder der axonale Transport blockiert, was den neuronalen Zelltod zur Folge hat. Neurofibrilläre Bündel sind neben der Alzheimer Krankheit auch mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Niemann Pick Typ C Krankheit (Auer *et al.*, 1995), assoziiert und sind daher nicht spezifisch für die Alzheimer Krankheit.

Amyloid-Plaques, das zweite pathologische Merkmal der Alzheimer Krankheit, treten im extrazellulären Raum des Gehirns sowie im zerebralen Blutgefäßsystem auf (Selkoe, 1999). Mikroskopisch unterscheidet man zwei Klassen von Amyloid-Plaques, die neuritischen und die diffusen Plaques. Die neuritischen Plaques sind durch einen dichten Amyloidkern gekennzeichnet, der von dystrophen Neuriten, in denen neurofibrilläre Bündel abgelagert sind, sowie aktivierten Mikrogliazellen und Astrozyten umgeben ist (Braak *et al.*, 1996; Meyer-Luehmann *et al.*, 2003; Pike *et al.*, 1994). Diese kompakten neuritischen Plaques sind spezifisch für die Alzheimer Krankheit, während Plaques aber auch in Gehirnen gealterter nicht-dementer Menschen nachweisbar sind (Braak und Braak, 1997; Hardy und Selkoe, 2002). Diffuse Plaques treten hauptsächlich im Cerebellum auf und sind in der Regel mit keinen bis wenigen zellulären Veränderungen verbunden (Yamaguchi *et al.*, 1989).

1.3 Molekulare Grundlagen der Alzheimer Krankheit

Als Ursache für die Alzheimer Demenz wird der neuronale Zelltod angesehen und erkrankte Gehirne weisen einen signifikanten Verlust von neuronaler Zellmasse auf (Casas *et al.*, 2004; Hardy und Selkoe, 2002; Pietrzik und Behl, 2005; Spire und Hyman, 2005). Obwohl ein direkter Zusammenhang zwischen Amyloid-Plaques, der Entstehung der Alzheimer Pathologie und der neuronalen Degeneration bisher nicht geklärt werden konnte, wird der Bildung der Amyloid-Ablagerungen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Krankheit zugesprochen (Citron, 2004; Hardy, 2006). Die Hauptkomponente der Amyloid-Plaques ist Amyloid β ($A\beta$), ein kurzes amphipatisches Peptid, das aus der Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) hervorgeht. Durch diese Prozessierung werden $A\beta$ -Peptide unterschiedlicher

Größe gebildet, wobei die häufigsten vorkommenden Formen 40 und 42 Aminosäuren lang sind und demnach als A β 40 beziehungsweise A β 42 bezeichnet werden (Pietrzik und Behl, 2005; Selkoe, 2001). Vor allem A β 42 weist *in vitro* eine hohe Tendenz zur Aggregation auf und besitzt somit das größte neurotoxische Potential (Murakami *et al.*, 2003b). Zusätzlich ist A β 42 gegenüber Degradation stabiler als A β 40, wodurch die Akkumulation im Gehirn verstärkt wird (Iwatsubo *et al.*, 1994).

Einen entscheidenden Hinweis auf die Bedeutung von APP und seiner Spaltprodukte bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit liefern autosomal-dominante Formen der Krankheit, die zu einer frühen Ausprägung der Demenz führen (Selkoe, 2001). Mutationen in den Genen für APP oder den Komponenten der APP-prozessierenden γ -Sekretase, Presenilin-1 und -2, führen zu einer verstärkten Bildung von A β , oftmals insbesondere A β 42. Weiterhin treten frühe Formen der Alzheimer Krankheit in Down Syndrom Patienten auf, die durch die Trisomie des Chromosoms 21 erhöhte APP-Gendosen aufweisen (Head und Lott, 2004; Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006).

Der Wirkmechanismus oder die Entstehung der Neurodegeneration in der Alzheimer Krankheit sind nicht geklärt. Einer populären Hypothese nach („Amyloid Hypothese“; Abb.1.4), steht die progressive Akkumulation von aggregiertem A β 42 am Anfang einer Kaskade, die eine Gliose und inflammatorische Reaktion zur Folge hat. Die zunehmende Schädigung der Neuronen, beziehungsweise die Akkumulation von oxidativem Stress, führt zu einem veränderten intrazellulären Milieu, wodurch die Aktivitäten von Kinasen oder Phosphatasen modifiziert werden und in der Hyperphosphorylierung von Tau resultieren. Dadurch werden die Funktion und die synaptische Transmission der Neuronen gestört, was den Beginn der Demenz bewirkt und letztlich den neuronalen Zelltod zur Folge hat (Citron, 2004; Hardy, 2006; Hardy und Selkoe, 2002).

Die „Amyloid Hypothese“ ist bis heute nicht unumstritten, wobei vor allem die Bedeutung von A β unklar ist. Häufig wird der Aggregation von Tau eine bedeutendere Rolle zugesprochen und diese nicht ausschließlich als Folge („*downstream*“) der A β -Plaques verstanden. Mutationen im Tau-Gen konnten bisher nicht mit familiären Formen der Alzheimer Krankheit in Verbindung gebracht werden, sondern sind mit einer Klasse von frontotemporalen Demenzen assoziiert

(Clark *et al.*, 1998). Die dabei entwickelten Tau-Aggregate verursachen einen neuronalen Zelltod, ohne dass A β -Ablagerungen auftreten (Foster *et al.*, 1997).

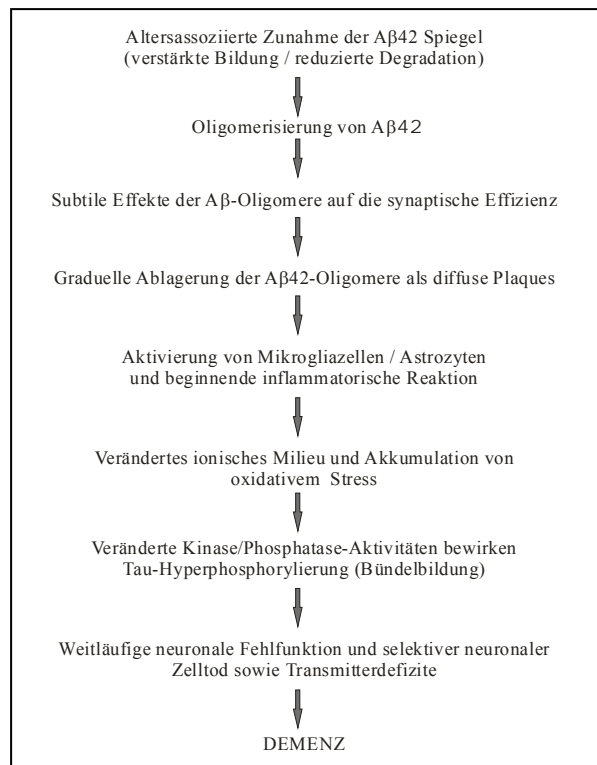


Abb. 1.4 Die „Amyloid Hypothese“
(verändert nach www.alzforum.org).

1.4 APP: Struktur, Prozessierung und physiologische Funktion

1.4.1 Das Amyloid-Vorläuferprotein

APP ist ein glykosyliertes Typ-I-Transmembranprotein, das eine große N-terminale Ektodomäne, eine Transmembrandomäne und eine kurze C-terminale zyttoplasmatische Domäne aufweist (zur Übersicht Selkoe, 2001) (Abb. 1.5). APP wird ubiquitär in nahezu allen Zellen und Geweben exprimiert. Dabei werden drei Isoformen des Proteins unterschieden, die in unterschiedlichen Geweben auftreten und durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen (Selkoe, 2001). Die kürzeste Form, APP₆₉₅, wird fast ausschließlich in Neuronen exprimiert, während APP₇₅₁ die häufigste Isoform in nicht-neuronalen Zellen repräsentiert (Wertkin *et al.*, 1993). Die beiden längeren Isoformen, APP₇₅₁ und APP₇₇₀, enthalten eine zusätzliche Domäne innerhalb der Ektodomäne, die eine Homologie zu dem Kunitz-Protease-Inhibitor (KPI) aufweist (Kitaguchi *et al.*, 1988; Tanzi *et al.*, 1988). Alle APP-Isoformen

weisen eine Kupfer-, Eisen- sowie eine Zink-Bindungsstelle in der Ektodomäne auf (Bush *et al.*, 1993; Hesse *et al.*, 1994; Maynard *et al.*, 2002). Für die Bindung von Zink wurde nachgewiesen, dass sie die Aggregation von A β *in vitro* und *in vivo* beeinflusst (Bush *et al.*, 1994). Die A β -Region tritt in allen drei Isoformen auf und wird N-Terminal durch die Schnittstelle der β -Sekretase und C-Terminal durch die Schnittstellen der γ -Sekretase begrenzt. Die zytoplasmatische Domäne ist von *C. elegans* bis zum Menschen hoch konserviert und interagiert mit den meisten der identifizierten Bindungspartnern von APP (Reinhard *et al.*, 2005).

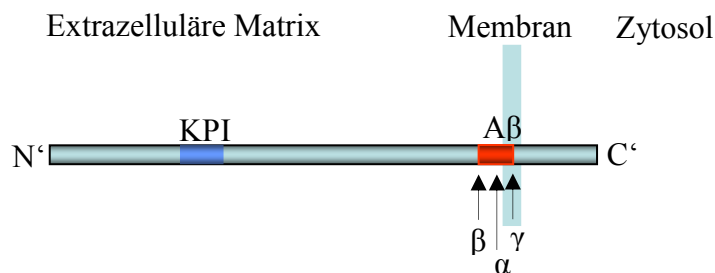


Abb. 1.5 Schematische Darstellung des Amyloid-Vorläuferproteins. KPI = Kunitz-Protease-Inhibitor; A β = Amyloid β -Domäne; N'/C' = N- beziehungsweise C-Terminus; α, β, γ = Schnittstellen der entsprechenden Sekretasen (verändert nach Reinhard *et al.*, 2005).

1.4.2 Die Prozessierung von APP

Die Prozessierung von APP wurde aufgrund der engen Verknüpfung der Amyloid-Plaques mit der Alzheimer Krankheit intensiv erforscht. In einem Zusammenspiel von mindestens drei Sekretasen wird APP in unterschiedliche Fragmente gespalten, woraus unter anderem das A β -Peptid resultiert (zur Übersicht Pietrzik und Behl, 2005; Selkoe, 2001) (Abb 1.6).

Den initialen Prozess der A β -Synthese stellt die proteolytische Aktivität der β -Sekretase dar. Dieses Enzym, auch BACE (**β -site APP Cleaving Enzyme**) genannt, schneidet APP am N-Terminus der A β -Domäne, wobei intrazellulär das Fragment C99 (auch β -CTF) gebildet wird (Haniu *et al.*, 2000; Vassar *et al.*, 1999). Dieses Fragment wird von der γ -Sekretase innerhalb der Transmembrandomäne von APP weiter prozessiert, wobei das etwa 4 kDa große A β -Peptid freigesetzt wird. Die γ -Sekretase stellt einen hochmolekularen Proteinkomplex dar, dessen enzymatische Aktivität die Anwesenheit von Presenilin, APH-1, PEN-2 und Nicastrin erfordert (Francis *et al.*, 2002; Goutte *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002b; Levitan *et al.*, 2001;

Thinakaran *et al.*, 1996). Die Schnittstelle des γ -Sekretasekomplexes ist dabei nicht von einer exakten Aminosäuresequenz abhängig, weswegen die γ -Sekretase hauptsächlich zwei verschiedene C-Termini des A β -Peptides bildet. Daraus resultieren Peptide, die 40 oder 42 Aminosäuren lang sind. Zusätzlich treten auch verkürzte Formen auf, die allerdings sehr selten sind. Normalerweise liegen A β 40 und A β 42 in einem Verhältnis von etwa 90% zu 10% vor, jedoch kommt es bei familiären Formen der Alzheimer Krankheit, die mit Mutationen im APP- oder den Presenilin-Genen einhergehen, häufig zu einer Verschiebung zugunsten von A β 42 (Selkoe, 2004).

Diese amyloidogene Prozessierung von APP unterscheidet sich von der sehr viel häufiger vorkommenden nicht-amyloidogenen Prozessierung dadurch, dass APP anstelle der β -Sekretase initial durch die α -Sekretase gespalten wird. Eine α -Sekretase, ADAM10 (**A Disintegrin And Metalloproteinase 10**), schneidet APP innerhalb der A β -Domäne, wodurch die Synthese von A β verhindert wird (Lammich *et al.*, 1999; Postina *et al.*, 2004). Das intrazelluläre Fragment C83 (auch α -CTF) wird wiederum durch die γ -Sekretase gespalten, wobei das kurze Peptid p3 entsteht. Durch die Aktivitäten der α - und β -Sekretase werden zusätzlich zu den intrazellulären CTFs lösliche Fragmente (sAPP α und sAPP β) gebildet, die sezerniert werden.

Aus der Prozessierung von C99 und C83 durch den γ -Sekretasekomplex resultiert intrazellulär das AICD (*APP Intracellular Domain*), das den äußersten C-terminalen Rest von APP repräsentiert.

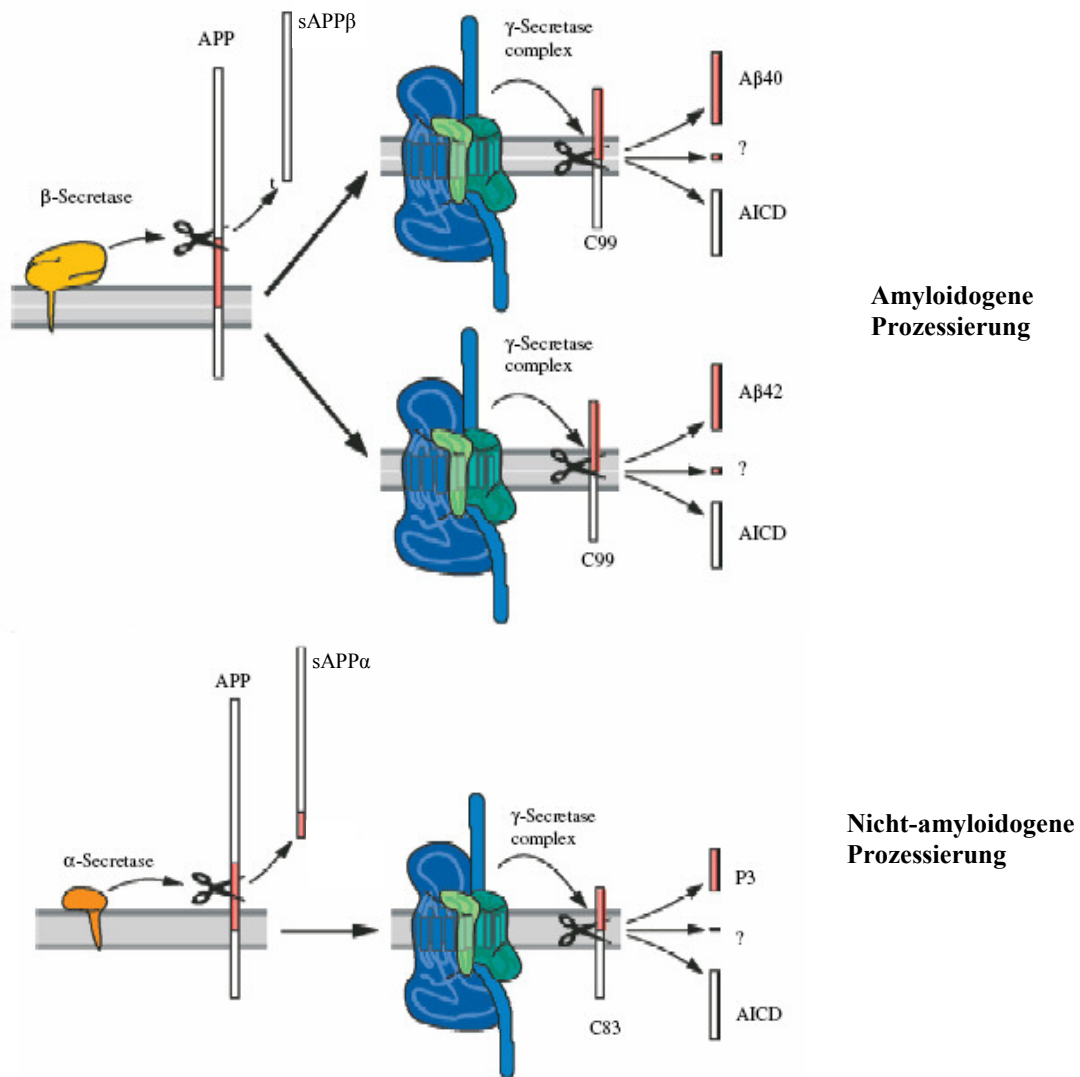


Abb. 1.6 Schematische Darstellung der Prozessierung von APP. Details siehe Text (verändert nach Pietrzik und Behl, 2005).

1.4.3 Die physiologische Funktion von APP

Die physiologische Funktion von APP ist nicht endgültig geklärt, auch wenn zahlreiche mögliche Aktivitäten vorgeschlagen wurden (zur Übersicht Reinhard *et al.*, 2005). Die vermutlich beste Annäherung an die Funktion von APP wird durch *Knock-Out* Mäuse gewonnen. Eine APP-Defizienz weist keine oder nur geringe Phänotypen auf (Zheng *et al.*, 1995), wohingegen *Knock-Out* Mäuse für die gesamte APP-Genfamilie (APP/APLP1/APLP2) prematur sterben und neurologische Defekte aufweisen (Herms *et al.*, 2004). Eine detaillierte Analyse der funktionellen Zusammenhänge steht noch aus. Generell scheint APP in Prozesse der Zell-Zell-Interaktion (Wang und Ha, 2004), Zelladhäsion (Soba *et al.*, 2005) und dem

Zellwachstum, insbesondere dem Auswachsen von Neuriten (Jin *et al.*, 1994; Mattson, 1997; Ninomiya *et al.*, 1993), involviert zu sein. Für die Peptide A β 40/42 wurde vor kurzem neben der zytotoxischen Wirkung auch eine differentielle physiologische Funktion in der Lipid-Homöostase beschrieben (Grimm *et al.*, 2005). Die AICD-Region ist für viele Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich und weist nach Translokation in den Zellkern transkriptionelle Aktivität auf (Cao und Sudhof, 2001; Von Rotz *et al.*, 2004).

1.5 Struktur und Funktion von Lipid Rafts

Die Prozessierung von APP wird unter anderem durch den zellulären Cholesterolspiegel reguliert, was auf die funktionelle Integrität von Lipid Rafts zurückgeführt werden konnte (Abad-Rodriguez *et al.*, 2004; Bodovitz und Klein, 1996; Eehalt *et al.*, 2003; Kojro *et al.*, 2001; Simons und Vaz, 2004). Diese definierten Membrandomänen weisen einen erhöhten Cholesterol- und Glykosphingolipidgehalt auf (Simons und Ikonen, 1997). Aufgrund der hohen Cholesterolkonzentration wird eine geordnete Flüssigkeitsdomäne gebildet, die weniger fluide als die Umgebung ist (Brown und London, 2000). Diese Eigenschaft verleiht Lipid Rafts eine Unlöslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien und erlaubt ihre Aufreinigung von der Nicht-Raft Fraktion der Plasmamembran. Eine spezielle Form der Lipid Rafts wird durch Caveolae repräsentiert (Abb. 1.7) (Stan, 2005). Diese ungefähr 50 nm großen, flaschenförmigen Einstülpungen der Plasmamembran weisen zusätzlich zu den Lipiden das Protein Caveolin als strukturelle Komponente auf. Caveolin wird nach seiner Synthese im Endoplasmatischen Retikulum in die Membran integriert und auf dem Weg zur Plasmamembran palmitoyliert, wodurch die Bindung an Cholesterol und gleichzeitig die Homo-Oligomerisierung des Proteins

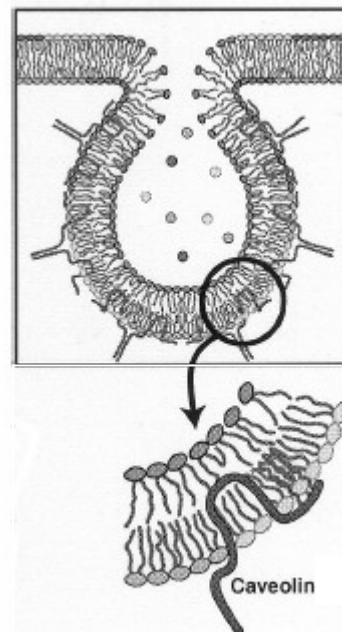


Abb. 1.7 Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus von Caveolae. (verändert nach Parton, 2001).

verstärkt wird (Smart *et al.*, 1996). Funktionell dienen Lipid Rafts/Caveolae als eine Art Floß („rafts“) innerhalb der Plasmamembran, in dem beispielsweise Proteine selektiv aufgenommen und wieder abgegeben werden können. Durch die Selektivität und die Fähigkeit spezielle Proteine in enge Nachbarschaft zueinander zu bringen, sind Lipid Rafts an Prozessen der Signaltransduktion, der Endozytose und an dem Cholesteroltransport beteiligt (Simons und Ikonen, 1997). Die Bedeutung der Lipid Rafts wird durch ihre Assoziation mit bestimmten Erkrankungen deutlich. Neben dem erwähnten Einfluss auf die Alzheimer Krankheit, stehen Lipid Rafts zusätzlich mit der Prion- (Naslavsky *et al.*, 1997) und der HIV-Krankheit (Wang *et al.*, 2000) in Verbindung. Auch im Zuge der zellulären Alterung werden altersassoziierte Modifikationen von Lipid Rafts als ein Faktor für die Ausprägung des seneszenten Phänotyps diskutiert (Park *et al.*, 2000).

1.6 Zelluläre Alterung

Das Phänomen der Alterung kann als eine mit zunehmendem Lebensalter abnehmende Fähigkeit, ursprünglich vorhandene physiologische Prozesse aufrecht zu erhalten, verstanden werden. Worin diese reduzierte Fähigkeit begründet liegt, warum wir also altern, ist bis heute ungeklärt und Grundlage intensiver Forschung (zur Übersicht Kenyon, 2005). Dabei werden unterschiedliche Modellsysteme eingesetzt, die das zelluläre System untransformierter, humaner Fibroblasten und die Organismen *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) oder *Mus musculus* umfassen. Jedes dieser Modelle bietet spezielle Vor- und Nachteile in der Erforschung eines solch komplexen Zusammenhanges wie der Alterung. Die Verwendung humaner Fibroblasten bietet den Vorteil, dass sie durch eine definierte Lebensspanne vergleichsweise rasch und kontrolliert *in vitro* altern, und dass altersassoziierte Veränderungen auf zellulärer Ebene erfasst werden können. Dies wiederum birgt den Nachteil, dass komplexe Interaktionen unterschiedlicher Organe auf der Ebene des Organismus oder der Einfluss des Immunsystems nicht berücksichtigt werden und die Übertragbarkeit in die *in vivo* Situation nur sehr eingeschränkt möglich ist (zur Übersicht Cristofalo *et al.*, 2004).

1.6.1 Replikative Seneszenz

Im Jahre 1961 entdeckten Hayflick und Moorhead, dass humane Fibroblasten nur eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen unterlaufen (Hayflick und Moorhead, 1961). Primäre Fibroblastenkulturen proliferieren anfangs schnell, worauf eine Phase mit progressiv verringerter Teilungsfrequenz folgt. Letztlich stellt die Kultur ihre Teilungsaktivität komplett ein und weist einen seneszenten Phänotyp auf (Hayflick, 1985). Dabei ist nicht der chronologische Zeitraum der Kultivierung für das Erreichen der zellulären Seneszenz ausschlaggebend, sondern die Gesamtzahl der Zellteilungen oder Populationsverdopplungen (PDLs) (Campisi *et al.*, 1996). Dieses Phänomen der „replikativen Seneszenz“ ist für humane Zellen nicht spezifisch, sondern wurde ebenso für primäre Fibroblasten anderer Säuger beschrieben. Darüber hinaus tritt eine Seneszenz neben Fibroblasten auch bei anderen Zelltypen auf. Beschrieben wurde sie für Gliazellen (Flanary und Streit, 2004), Keratinozyten (Rheinwald und Green, 1975), Endothelzellen (Mueller *et al.*, 1980) und einige mehr. Auch auf Ebene der Einzelzell-Organismen, wie für Hefe- (Jazwinski *et al.*, 1993) oder *E. coli*-Kulturen (Lynch, 2005), wird eine replikative Seneszenz beobachtet.

Das auffälligste Merkmal der Seneszenz wird durch den zellulären Proliferationsstopp repräsentiert. Dieser Wachstumsarrest ist irreversibel und kann durch mitogene Stimuli nicht umgangen werden, obwohl die Zellen über einen langen Zeitraum metabolisch aktiv bleiben. Weiterhin ist die Seneszenz mit einer veränderten zellulären Morphologie und einer generellen Deregulation koordinierter zellulärer Prozesse verbunden.

Die Morphologie seneszenten Fibroblasten ist durch einen vergrößerten Zellumfang und eine abgeflachte Struktur gekennzeichnet. Bestimmte Organellen, insbesondere der Zellkern, sind vergrößert und insgesamt erscheint die strukturelle Ordnung innerhalb der Zelle verringert. Zusätzlich zu diesen morphologischen Veränderungen sind alternde Kulturen auch durch ein verändertes Wachstumsverhalten charakterisiert und erreichen aufgrund veränderter Zell-Zell-Interaktionen eine geringere maximale Zelldichte (Cristofalo, 1988).

Die biochemischen und physiologischen Veränderungen im Zuge der Seneszenz sind umfassend und spiegeln den Verlust zellulärer Funktionen wider. Altersassoziierte

Veränderungen betreffen den Zellzyklus (Atadja *et al.*, 1995; Campisi *et al.*, 1996), die Proteindegradation (Sitte *et al.*, 2000), den intrazellulären Transport (Benvenuti *et al.*, 2002a) und die Stress-Resistenz beziehungsweise apoptotische Mechanismen (Campisi, 2003; Hampel *et al.*, 2005). Zusätzlich treten Modifikationen von Proteinen, der DNA und Lipiden auf, die zum größten Teil oxidativer Natur sind (Chen *et al.*, 1995; Grune *et al.*, 2005; Kil *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2002). Weiterhin werden zahlreiche Proteine im Zuge der Alterung differentiell reguliert und können somit als Altersmarker herangezogen werden (Benvenuti *et al.*, 2002b; Trougakos *et al.*, 2006).

1.6.2 Theorien zur zellulären Alterung

Verschiedene Theorien versuchen die Ursachen und molekularen Veränderungen, die zu alternden Zellen und Organismen führen, zu beschreiben (zur Übersicht Behl, 2004). Zu den wichtigsten Theorien gehören die altersassoziierte Akkumulation freier Sauerstoffradikale, die Verkürzung der Telomere und die Aktivität spezifischer Gerontogene/Seneszenzgene.

Theorie der freien Radikale

Die „Theorie der freien Radikale“ beschreibt ein Ungleichgewicht zwischen radikalbildenden und protektiven Mechanismen, das im Zuge der Alterung zu einer Akkumulation freier Radikale führt (Harman, 1956). Hauptsächlichste Quelle der entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies sind die Mitochondrien. Demnach ist die Ansammlung von oxidativen Schäden ausschlaggebend und limitierend für die Lebensspanne.

Telomer-Theorie

Die „Telomer-Theorie“ beschreibt, dass die Enden der Chromosomen bei jeder Zellteilung um ein Stück verkürzt werden, da für diese Bereiche in somatischen Zellen kein Replikationsmechanismus existiert. Diese Verkürzung kann als eine „mitotische Uhr“ verstanden werden, durch welche die Anzahl der möglichen Zellteilungen limitiert wird (Allsopp *et al.*, 1992; Harley, 1991).

Theorie der Gerontogene

Die „Theorie der Gerontogene“ beschreibt die Annahme, dass einzelne spezielle Gene für die Alterung verantwortlich sind und durch ihre spezifische Aktivität den seneszenten Phänotyp bedingen (Johnson und Lithgow, 1992). Diese Gene scheinen der natürlichen Selektion entgangen zu sein, da sie erst im Anschluss an die Fortpflanzungsperiode zum Tragen kommen.

1.7 Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

Der Fadenwurm *C. elegans* (Nematoda) ist als frei lebender Nematode im Boden weit verbreitet. Der Wurm ist morphologisch und genetisch sehr einfach organisiert (Abb. 1.8) und stellt aufgrund seiner einzigartigen Eigenschaften einen wichtigen Modellorganismus für die Untersuchungen biologischer Fragestellungen dar.

Der ungefähr 1 mm große Wurm lässt sich in großer Zahl auf Agarplatten kultivieren und ernährt sich dabei von Bakterien. Laborpopulationen bestehen unter normalen Kulturbedingungen fast ausschließlich aus Hermaphroditen (Zwitter), die sich durch Selbstbefruchtung vermehren. Ein Hermaphrodit bringt dabei rund 300 Nachkommen hervor, so dass sich vergleichsweise einfach klonale Populationen heranziehen lassen (Hodgkin, 1988). Während einer Generationszeit von drei Tagen (bei 20 °C) entwickelt sich aus einer befruchteten Eizelle über vier unterschiedliche Larvenstadien (L1-L4) ein adulter Wurm (Sulston und Horvitz, 1977) (Abb.1.9). Unter ungünstigen Lebensbedingungen kann der Entwicklungszyklus im L2-Stadium unterbrochen werden und es entstehen Dauerlarven (Riddel, 1988). Diese sind durch eine extrem verdickte Cuticula und einen reduzierten Stoffwechsel in der Lage bis zu mehreren Monaten zu überleben.

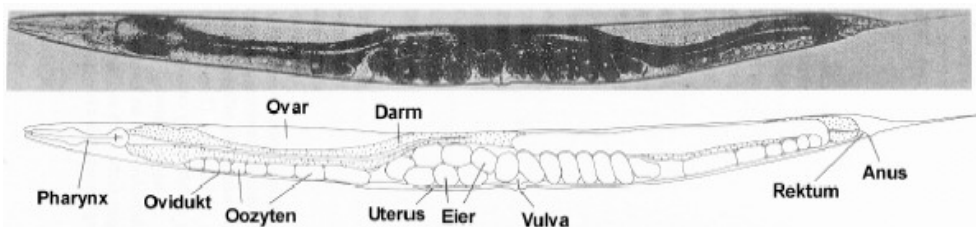


Abb. 1.8 Anatomie von *C. elegans*. DIC-mikroskopische Abbildung und schematische Darstellung eines adulten Hermaphroditen (verändert nach Sulston und Horvitz, 1977).

Aufgrund der Transparenz und der damit verbundenen einfachen mikroskopischen Analyse wurde die exakte Zellzahl der Würmer bestimmt. Ein Hermaphrodit weist 959 somatische Zellen auf, wovon insgesamt 302 das Nervensystem bilden (Hodgkin, 1988). Durch das Phänomen der Zellkonstanz ist das Schicksal jeder Zelle von ihrer Entstehung bis zu ihrer Position im adulten Wurm zeitlich und räumlich festgelegt (Sulston und Horvitz, 1977), so dass sich definierte Zellgruppen leicht analysieren lassen.

Ein breites Spektrum molekularbiologischer Methoden ermöglicht die genetische Manipulation von *C. elegans*. Transgene Hermaphroditen lassen sich über Mikroinjektion von DNA generieren (Fire, 1986). Die RNA-vermittelte Interferenz (RNAi) oder auch die chemische Mutagenese sind weitere Standardmethoden der genetischen Manipulation (Fire *et al.*, 1998). *C. elegans* ist darüber hinaus der erste Modellorganismus dessen Genom 1998 vollständig sequenziert wurde (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

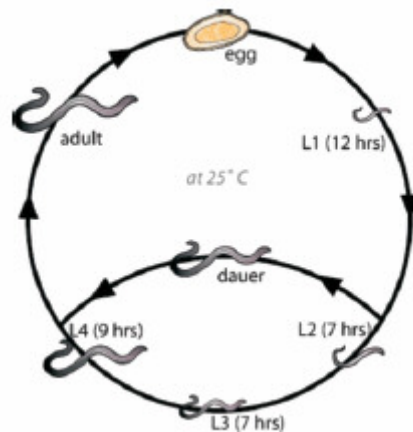


Abb. 1.9 Der Lebenszyklus von *C. elegans*. L1-L4= 1. bis 4. Larvenstadium; hrs= Stunden. (nach Riddel, 1988).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die weitaus häufigste Zahl der Alzheimer Erkrankungen wird durch sporadische Formen repräsentiert (~99%) (Spiros und Hyman, 2005), deren größter Risikofaktor das Alter darstellt. Die Prozessierung von APP, die in der Generierung von A β resultiert, ist ein möglicherweise zentraler Prozess der Alzheimer Pathologie, weswegen die Biochemie der Spaltung, sowie zahlreiche regulative Mechanismen, intensiv erforscht wurden (Selkoe, 2001). Der Zusammenhang zwischen Alter und Prävalenz der Alzheimer Erkrankung ist bislang weitestgehend ungeklärt. Die Aufklärung altersassoziierter Modifikationen der Prozessierung von APP erlaubt ein besseres Verständnis der Pathogenese der Alzheimer Krankheit und ist zugleich für die Entwicklung neuer präventiver oder therapeutischer Ansätze von Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss altersassoziierter zellulärer Veränderungen auf die Biochemie der Prozessierung von endogenem APP untersucht werden. Dazu sollten zunächst primäre, humane Fibroblasten als zelluläres Altersmodell etabliert und charakterisiert werden, wobei insbesondere altersabhängige Modifikationen des Cholesterol-Metabolismus und der Konstitution von Lipid Rafts im Mittelpunkt standen. Anhand dieses Altersmodells sollte im Weiteren der Einfluss der zellulären Alterung auf die Biochemie der APP-Prozessierung untersucht werden. Dafür sollte die Bildung von APP-Spaltfragmenten in Kulturen mit aufsteigendem PDL analysiert werden. Des Weiteren sollten zelluläre Faktoren bestimmt werden, durch die altersabhängige Veränderungen der APP-Prozessierung sowie Reifung reguliert werden. Dafür sollte der Einfluss altersassoziierter erhöhter Cholesterolspiegel auf die APP-Reifung, sowie Regulationen der Proteinspiegel und Aktivitäten der APP-prozessierenden Sekretasen im Verlauf der Zellalterung untersucht werden. Weiterhin sollte die Lokalisation von Komponenten, die an der APP-Prozessierung beteiligt sind, innerhalb von Lipid Rafts analysiert werden, um zu bestimmen, ob die altersabhängige strukturelle Disintegration dieser Membransubdomänen die Spaltung von APP beeinträchtigt.

Darüber hinaus sollten transgene *C. elegans* konstruiert werden, die humanes APP exprimieren, um die Beobachtungen aus dem zellulären Altersmodell auf die Ebene eines Gesamtorganismus zu übertragen. Die transgenen Würmer sollten bezüglich

ihrer auftretenden Phänotypen und einer möglichen Prozessierung des Transgens durch die endogenen Sekretasen charakterisiert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Zellbiologie

Inkubatoren	Binder, Tuttlingen
Sterilbänke	Heraeus, Hanau
Absaug-System VacuSafe	Integra, Fernwald
Axiovert Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss, Göttingen

Proteinbiochemie

Mikrotiterplatten-Lesegerät	Thermo LabSystems,
Brutschränke	Binder, Tuttlingen
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Mini Protean III, Western Blotting System	BioRad, München
Trans-Blot	BioRad, München
XCell Sure Lock Western Blotting System (NuPAGE)	Invitrogen, Karlsruhe
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckmann, München
Swing-Out Rotor (TLS 55)	Beckmann, München

Molekularbiologie

PCR DNA Thermozykler	Biometra, Göttingen
iQ Real-Time-PCR Thermozykler	BioRad, München
Sub-CellGT Agarose Gel Elektrophorese System	BioRad, München

C. elegans-Kultivierung

Stereomikroskop SZ61	Olympus, Hamburg
Inkubatoren	Thermo, Dreieich
Mikroinjektionsequipment	Eppendorf, Hamburg
Axiovert Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss, Göttingen

Allgemeines

Dampfsterilisator VarioClav	H+P, Oberschleißheim
Power Pack 300	BioRad, München
Spektrophotometer	Beckmann, München
pH-Meter	inoLab, Weilheim

Zentrifuge Universal 32 R

Hettich, Tuttlingen

2.1.2 Chemikalien und Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Kits wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Biomol (Hamburg), Boehringer (Mannheim), Gibco/Invitrogen (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren), Merck (Frankfurt a.M.), New England BioLabs (Frankfurt a.M.), SERVA (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) erworben und jeweils nach Angaben des Herstellers aufbewahrt und verwendet.

2.1.3 Zelllinie

In dieser Arbeit wurden normale humane IMR-90 Fibroblasten (*Coriell Institut for Medical Research*, Camden, USA) verwendet. Diese wurden 1975 aus Lungengewebe eines klinisch normalen 16 Wochen alten weiblichen Fötus (Karyotyp: 46, XX) gewonnen (Nichols *et al.*, 1977).

2.1.4 Nematoden

In dieser Arbeit wurde der *Caenorhabditis elegans* Wildtypstamm Variation Bristol (N2) (*Caenorhabditis Genetics Center*, Minnesota, USA) verwendet. Dieser wurde 1946 erstmals in Großbritannien isoliert und hat sich aufgrund seiner vergleichsweise niedrigen Rate spontaner Mutationen als üblicher Referenzstamm durchgesetzt.

Des Weiteren wurde der vom N2 Wildtyp abgeleitete *unc-119(ed3)III*-Stamm (DP38, *Caenorhabditis Genetics Center*, Minnesota, USA) verwendet. Die *unc-119* Mutation ist eine neuronale Mutation, durch die Würmer einen Bewegungsdefekt aufweisen. Diese Hermaphroditen wurden für die Generierung von transgenen Linien herangezogen.

2.1.3 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
DH5 α (Invitrogen, Karlsruhe)	supE44 .lacU169 (F80 lacI q Z .? 15) hsdR17 recA1 end A1 gyr A96 thi-1 rel A1
HB101 (CGC, Minnesota, USA)	F- Δ (gpt-proA)62 leuB6 glnV44 ara-14 galK2 lacY1 Δ (mcrC-mrr) rpsL20 (Str r) xyl-5 mtl-1 recA13

2.1.4 Plasmide

Bezeichnung	Verwendung
TOPO-GW Vektor	TOPO-GW Klonierungsvektor
pRL1899	Gateway Zielvektor (inkl. gfp und <i>unc54</i> 3'UTR)
pRL1902	P _{apl-1} ::hAPP::gfp Expressionsplasmid

Die Karten und Sequenzen der aufgeführten Plasmide sind dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 7.2).

2.1.5 Primer

APP <i>sense</i> (Real Time PCR Analyse)	5'-GGAGCTCCTTCCCGTGAATGG-3'
APP <i>antisense</i> (Real Time PCR Analyse)	5'-CGTAGCCGTTCTGCTGCATC-3'
apl-1 Promoter <i>sense</i>	5'-CCTTGGTCAGGCAGACTCAT-3'
apl-1 Promoter <i>antisense</i>	5'-GGATGGATAAGCCTGAAACG-3'
APP cDNA <i>sense</i> inkl. apl-1 Promoter Extension	5'-ATCTCGTTTCAGGCTTATCCATCCATGCTGCCCGGTTTGGCACT-3'
APP cDNA <i>antisense</i>	5'-GGATGGATAAGCCTGAAACG-3'
Fusion apl-1 Promoter <i>sense</i>	5'-GTGGATCCTGTGGGATATGA-3'
Fusion APP cDNA <i>antisense</i>	5'-GTTCTGCATCTGCTCAAAGAAC-3'

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von IMR-90 normalen humanen Fibroblasten

Adhärente IMR-90 Fibroblasten wurden in Zellkulturmedium (phenolrot-freies DMEM, 10% Aktivkohle-behandeltes FBS, 1x Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin) in geeigneten Zellkulturschalen ausplattiert. Die Verwendung des Wachstumsfaktor-defizienten Mediums sollte den gealterten zellulären Phänotyp nicht beeinflussen, sondern ausschließlich die Alterung beschleunigen (Atamna *et al.*, 2001). Die Kultivierung der Zellen erfolgte im

Brutschrank bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und einer Kohlenstoffdioxid-Konzentration von 5%. Um die Zellen zu passagieren, wurden sie unter Verwendung von 1x Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst und in geeigneten Zellzahlen auf neue Schalen ausplattiert.

2.2.1.2 Zelluläre Dauerkulturen

Für die langfristige Aufbewahrung wurden Fibroblasten in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden subkonfluente Zellen von den Zellkulturschalen trypsinisiert und die aktuelle PDL bestimmt. Durch milde Zentrifugation wurden die Zellen pelletiert und anschließend in Kulturmedium, supplementiert mit 10% DMSO, resuspendiert. In einer Isopropanol-haltigen Einfrierbox wurden die Zellen bei –80 °C langsam eingefroren und nach 6-8 h in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.3 Bestimmung von Populationsverdopplungen

Die PDLs wurden bei jeder Passage ermittelt, um das aktuelle Alter der Kultur zu bestimmen. Sie wurden nach folgender Gleichung errechnet:

$$(\log C_h - \log C_s) / \log(2)$$

Dabei entspricht C_h der Lebendzellzahl geernteter Zellen und C_s der Zahl ausgesäter Zellen.

Die Lebendzellzahl wurde unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension nach Trypsinierung mit 10 µl Trypanblau versehen, um tote Zellen zu visualisieren. Die Zellzahl errechnete sich wie folgt:

$\text{Lebendzellzahl/ml} = \text{Mittelwert lebender Zellen der 4 Großquadrate} \times 2 \times 10^4$,
wobei 2 dem Verdünnungsfaktor mit Trypanblau entspricht und 10^4 dem Umrechnungsfaktor auf 1 ml.

2.2.1.4 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Färbung

Die zelluläre Seneszenz wurde mittels der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase Färbung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ermittelt. Dazu wurden subkonfluente Zellen in einer 35 mm Kulturschale mit 4% Paraformaldehyd fixiert und die Färbung wie vom Hersteller vorgesehen durchgeführt. Mindestens 400 Zellen pro Kulturschale wurden bezüglich ihrer Blaufärbung analysiert und die Prozente gefärbter Zellen gegen die Gesamtzellzahl errechnet.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinpräparation

Subkonfluente IMR-90 Fibroblasten wurden mit kaltem 1x PBS gewaschen und nach Zugabe von frisch angesetzttem 1x Lysispuffer (45 µl bei einer 35 mm Kulturschale; 250 µl bei einer 100 mm Kulturschale) mechanisch von den Zellkulturschalen geschabt. Die Lysate wurden kurz sonifiziert und anschließend für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Lagerung der Proteinpräparate erfolgte bei -80 °C.

1x Lysispuffer

Tris-HCl (pH 6,8)	60 mM
SDS	2% (w/v)
Saccharose	10% (w/v)
Aprotinin	5 µg/ml
PMSF	10 mM

2.2.2.2 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der BCA-Methode und wurde wie vom Hersteller (BioRad, München) beschrieben durchgeführt. Die Proteinproben wurden mit dem BCA-Reagenz versehen und bei 60 °C für 15 min inkubiert. Im Anschluss wurden sie photometrisch bei 562 nm gemessen und mittels einer Rinderserumalbumin-Standardkurve quantifiziert.

2.2.2.3 Präparation von Lipid Rafts

Subkonfluente IMR-90 Zellen wurden mit kaltem 1x PBS gewaschen und in 1x PBS von der Kulturschale geschabt. Durch Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm) wurden die Zellen pelletiert und im Anschluss in 300 µl CHAPS-Lysispuffer resuspendiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens 80% (w/v) Saccharose (in CHAPS-Lysispuffer ohne CHAPS) wurde die Lösung in ein Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt und mit 1300 µl einer 30% (w/v), sowie 250 µl einer 5% (w/v) Saccharose-Lösung überschichtet. Dieser Stufengradient wurde für 2 h bei 4 °C und 100.000xg unter Verwendung eines Swing-Out Rotors (TLS 55, 55.000 rpm, Beckmann, München) zentrifugiert. Der Gradient wurde in Fraktionen von 4x 200 µl und 5x 300 µl von der Spitze bis zum Boden abgenommen. Die Fraktionen wurden entweder direkt in die weiteren Untersuchungen eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

CHAPS-Lysispuffer

CHAPS	20 mM
Tris-HCl (pH 7,4)	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM
PMSF	1 mM

2.2.2.4 Western Blot Analyse**Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die von Laemmli beschriebene Methode der denaturierenden SDS-PAGE eingesetzt (Laemmli, 1970).

Die Auftrennung erfolgte unter Verwendung der Miniblot-Kammer der Firma BioRad. Falls gleichzeitig Proteine mit großen und kleinen Molekulargewicht untersucht werden sollten, wurde das NuPAGE System (Invitrogen, Karlsruhe) mit kommerziellen, vorgegossenen 4-12% NuPAGE Bis-Tris-Gradientengelen (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Polyacrylamidgelen (PAA-Gele) wurden nach folgendem Pipettierschema gegossen, wobei das Trenngel zunächst mit H₂O überschichtet wurde und nach vollständiger Polymerisation mit der Präparation des Sammelgels fortgefahren wurde. Die angegebenen Volumina entsprechen zwei 1,5 mm Gelen.

Lösung	Trenngel (8%)	Trenngel (12%)	Sammelgel (4,5%)
40% Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	2 ml	3 ml	0,75 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4% SDS	2,5 ml	2,5 ml	-
0,6 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4% SDS	-	-	2,5 ml
dH ₂ O	5,5 ml	4,5 ml	6,5 ml
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Die Gele wurden entweder unmittelbar zur Gelelektrophorese eingesetzt oder für bis zu zwei Wochen bei 4 °C gelagert.

Vor dem Auftragen auf das PAA-Gel wurden die Proteine mit 1x Auftragspuffer versehen und 1 min bei 100 °C inkubiert. Als Größenstandard wurde der Prestained Marker der Firma Peqlab (Erlangen) eingesetzt. Die Proben wurden zunächst bei 70 V in das Sammelgel einlaufen gelassen und dann bei 150 V getrennt. Als Laufpuffer diente 1x SDS-Laufpuffer. Für die NuPAGE Bis-Tris-Gradientengele wurde 1x MES Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet und der Gellauf erfolgte bei 200 V.

3-4x Auftragspuffer

Tris-HCl (pH 6.8)	100 mM
SDS	4 % (w/v)
Glycerin	24 % (v/v)
Bromphenolblau	20 mM
β-Mercaptoethanol	1,4 M

1x SDS-Laufpuffer

Tris-HCl (pH 8,3)	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)

Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen

Die in einem PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch einen elektrophoretischen *Wet Blot* auf die Oberfläche einer Nitrocellulosemembran übertragen. Auf dieser Trägermembran waren die Proteine immobilisiert und besser für Antikörper zugänglich.

Nach beendeter PAGE wurde das PAA-Gel, wie vom Hersteller vorgesehen, zusammen mit der Membran, Schaumstoff und Filterpapier in eine Transfereinheit gespannt. Alle Komponenten wurden zuvor in 1x Transferpuffer äquilibriert. Die Transfereinheit wurde in eine Tankblot-Kammer eingesetzt und die Kammer mit kaltem 1x Transferpuffer gefüllt. Während des Blottens bei 100 V für 3 h beziehungsweise bei 30 V über Nacht wurde die Kammer ständig auf 4 °C gekühlt.

Im Anschluss wurden die transferierten Proteine mittels Ponceau S-Färbung reversibel angefärbt, um den Erfolg und die Qualität des Transfers zu überprüfen. Dafür wurde die geblottete Nitrocellulosemembran für einige Minuten in Ponceau S-Lösung inkubiert und danach mit dH₂O gewaschen. Die Proteinbanden wurden

sichtbar sobald der Hintergrund entfärbt war. Anschließend wurde die Membran bis zur vollständigen Entfärbung in dH₂O gewaschen.

1x Transferpuffer

Tris-HCl (pH 8,3)	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20% (v/v)

1x Ponceau S

Ponceau	0,02% (w/v)
Trichloressigsäure	0,3% (w/v)
Sulphosalicylsäure	0,3% (w/v)

Immunologischer Nachweis der Proteine

Nach erfolgreichem Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte ihr immunologischer Nachweis: Dazu wurde die Nitrocellulosemembran zunächst unter Schütteln für 1-2 h in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit einer geeigneten Verdünnung des primären Antikörpers über Nacht bei 4 °C. Im Allgemeinen wurden monoklonale Antikörper in TBS/Tween-20 angesetzt und polyklonale Antikörper in Blockierungspuffer. Danach wurde die Membran dreimal für je 15 min mit TBS/Tween-20 gewaschen und anschließend für 1-2 h mit einem geeigneten sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit TBS/Tween-20 erfolgte die Nachweisreaktion mit Hilfe des ECL-Protokolls der Firma Amersham (Freiburg). Die Membran wurde mit 1 ml ECL-Lösung benetzt, in Folie eingepackt und auf einem Röntgenfilm exponiert.

Blockierungspuffer

TBS	1x
Tween-20	0,05% (v/v)
Trockenmilchpulver	5% (w/v)

TBS/Tween-20

TBS	1x
Tween-20	0,05% (v/v)

10x TBS

Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM
NaCl	1,5 M

Primär-Antikörper

APP zytoplasmatische Domäne, polyklonaler Antikörper CT-15 (privat)

APP mittlere Region polyklonales Antiserum 863 (privat)

APP monoklonaler Antikörper (Klon 6E10) (Biocat, Heidelberg)

Actin (Santa Cruz, Santa Cruz, USA)

ADAM10 (Chemicon, Hofheim)

BACE (Ab-2) (Oncogene, Schwalbach)

Caveolin-1 (Transduction Laboratories, San Diego, USA)

Nicastrin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Notch (Santa Cruz, Santa Cruz, USA)

PS1-NT (Klon 3110) (privat)

2.2.2.5 Immunocytochemie

Mit Hilfe der Immunocytochemie werden Proteine *in situ* in Einzelzellen detektiert. IMR-90 Zellen wurden zunächst auf einem poly-L-Ornithin-beschichteten Deckglas unter Standardbedingungen kultiviert, bis eine Konfluenz von circa 60-80% erreicht wurde. Zur Vorbereitung der Immunodetektion wurden die Zellen kurz mit 1x PBS gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur für 45 min in 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Nachdem das Paraformaldehyd entfernt wurde, wurden die Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS/Tween-20 für jeweils 5 min permeabilisiert. Im Anschluss wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine 45-minütige Inkubation der Zellen mit Blockierungspuffer abgesättigt. Daraufhin wurden die Zellen für 1 h mit 5 μ M 6-Dansyl-Cholestanol (DChol, einem fluoreszierenden Cholesterolanalogon; detaillierte Beschreibung siehe Wiegand *et al.*, 2003) behandelt und nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS für 2 h mit Caveolin-1 Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal 5 min mit PBS/Tween-20 gewaschen und schließlich 1-2 h mit dem sekundären, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper (Cy3) in PBS/Tween-20, supplementiert mit 10% FBS, bei Raumtemperatur inkubiert. Der ungebundene sekundäre Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS/Tween-20 entfernt. Zuletzt wurden die Zellen in Prolong Antifade (Molecular Probes, Karlsruhe) eingebettet und das Deckglas mit Nagellack auf den Objektträgern fixiert. Prolong Antifade verhindert das rasche Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs nach Anregung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge. Nach Aushärten des Nagellacks wurden die Präparate unter einem

Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Dabei wurde DChol bei 395 nm und Cy3 bei 545 nm analysiert.

PBS/Tween-20

PBS	1x
Tween-20	0,1% (v/v)

Blockierungspuffer

PBS	1x
FBS	10% (v/v)

Primär-Antikörperlösung

Antikörper	1:100
PBS	1x
Tween-20	0,1% (v/v)
FBS	10% (v/v)

10x PBS

NaCl	1,3 M
KCl	27 mM
NaH ₂ PO ₄	70 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM

Der pH wurde auf 7,4 eingestellt.

2.2.2.6 Metabolische Markierung von APP (Pulse-Chase)

Die metabolische Markierung von APP wurde von der AG Prof. J. W., Universität Bonn, durchgeführt. Die Methode wird an dieser Stelle kurz erläutert: Subkonfluente IMR-90 Kulturen wurden mit Methionin-freiem DMEM, supplementiert mit 150 µCi/ml [³⁵S]Methionin/Cystein, für 15 min inkubiert (*pulse*). Die Zellen wurden entweder direkt oder zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert (*chase*). APP sowie die APP-Spaltfragmente wurden im Anschluss unter Verwendung des APP C-terminalen Antikörpers #140 immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und die radiomarkierten Proteine mittels Phosphoimaging detektiert und quantifiziert.

2.2.2.7 Enzymatische Aktivitätsbestimmungen

Die enzymatische Aktivität der β- und γ-Sekretase wurde unter Verwendung des β-Sekretase- (BioVision, Freiburg) beziehungsweise γ-Sekretase-Aktivitätsassay Kit (R&D Systems, Wiesbaden) ermittelt. Dabei wurde jeweils wie vom Hersteller vorgesehen verfahren. Zur Bestimmung der Aktivität im totalen Zelllysat wurden 25

µg Protein eingesetzt. Für die Bestimmung der β -Sekretaseaktivität in Fraktionen aus Lipid Raft Isolationen wurden 50 µl jeder Fraktion eingesetzt.

2.2.2.8 Bestimmung des freien Cholesterolgehaltes

Freie, unveresterte Cholesterolspezies wurden unter Verwendung des Amplex Red Cholesterol Assay Kits der Firma Molecular Probes (Karlsruhe) ermittelt. Dabei wurde wie vom Hersteller vorgesehen vorgegangen. Zur Bestimmung des Cholesterolgehaltes im totalen Zelllysate wurden 15 µg Protein eingesetzt. Für die Bestimmung in Fraktionen aus Lipid Raft Isolationen wurden 50 µl jeder Fraktion eingesetzt.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen

RNA ist im Vergleich zu DNA anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse, weswegen das Arbeiten mit RNA spezielle Vorkehrungen verlangt. Daher wurde RNA stets mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem, bidestilliertem Wasser behandelt. DEPC inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikation eines Histidinrestes im aktiven Zentrum.

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde das RNA RT-PCR Miniprep Kit der Firma Stratagene (Amsterdam, Niederlande) verwendet und wie vom Hersteller vorgesehen vorgegangen. Das Kit erlaubt die Phenol/Chloroform-freie Gewinnung von RNA über ein Silika-Säulenprinzip. Eine zusätzliche 15-minütige Behandlung mit DNasen bei 37 °C verringerte die Gefahr von DNA-Kontaminationen.

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA basiert auf der Absorption der Nukleinsäuren bei 260 nm.

Die Messung wurde in Quarzküvetten gegen destilliertes Wasser als Nullwert durchgeführt. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde durch das Lambert-Beer Gesetz ermittelt.

2.2.3.3 Reverse Transkription / Synthese von cDNA

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase PCR (RT-PCR) lassen sich spezifisch RNA-Sequenzen in cDNA umschreiben.

Gesamt-RNA (~500 ng) wurde mit DEPC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt und 5 min bei 75 °C im Thermocycler inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren. Der Reaktionsansatz wurde anschließend sofort auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der RNA-Moleküle zu verhindern. Zum gleichen Ansatz wurden 2 µl 10x Puffer (Qiagen, Hilden), 2 µl 5 mM dNTPs, 2 µl 10 µmol Oligo-dT₁₅-Primer, 0,25 µl RNase-Inhibitor (40 U, Promega, Mannheim) und 4 U Reverse Transkriptase (Omniscript, Qiagen, Hilden) in einem Endvolumen von 20 µl gegeben. Eine Kontrolle, die keine Reverse Transkriptase enthielt, wurde zum Nachweis auf Kontamination mit DNA mitgeführt (Mock). Der Ansatz wurde 60 min bei 37 °C inkubiert. Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation spezifischer Nukleinsäureabschnitte. Dieser Prozess wird durch die hitzestabile *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) katalysiert oder im Falle von Klonierungen durch die korrekturlesende *Phusion High-Fidelity* DNA- Polymerase (NEB, Frankfurt).

Die PCR wurde unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt: ein PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl enthielt 1-5 ng Plasmid-DNA, 10 ng genomischer DNA oder 1 µl cDNA, jeweils 15 pmol *sense* sowie *antisense* Primer, 2,5 µl 10x PCR-Puffer, jeweils 0,5 µl 10 mM dNTPs, MgCl₂ in einer Endkonzentration von 1 mM sowie 0,5 U *Taq*- oder *Phusion*-Polymerase. Der Ansatz wurde mit bidestillierten Wasser auf 25 µl aufgefüllt.

Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt: zum Starten der PCR wurde die DNA für 5 min bei 95 °C denaturiert. Es folgte die Anlagerung der Primer (30-45 sec) bei einer Primer-spezifischen Temperatur. Nach dem Anlagerungsschritt wurde die Temperatur auf 72 °C erhöht. Die Extensionszeit ergab sich aus der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Generell wurden für die *Taq*-Polymerase 60 sec und für die *Phusion*-Polymerase 30 sec pro 1000 bp verwendet. Im nächsten Schritt wurde

erneut für 10-45 sec bei 95 °C inkubiert, um DNA für die folgende Primeranlagerung in ihre Einzelstränge zu denaturieren. Insgesamt wurden je nach Anwendung 20-35 Zyklen durchgeführt. Zuletzt erfolgte eine fünfminütige Endextension bei 72 °C, um teilweise synthetisierter DNA-Stränge zu vervollständigen.

2.2.3.5 Real Time PCR Analyse

Zur Quantifizierung der Genexpression von APP auf Transkriptionsebene wurden *Real Time PCR* Analysen durchgeführt. Das Endvolumen der PCR betrug 25 µl und enthielt neben der zu untersuchenden cDNA 12,5 µl PCR Reagenzmischung (SYBR Green Supermix, Biorad, München) sowie 100 pmol der *sense* und *antisense* Primer. Die PCR-Reagenzmischung enthielt 2x PCR-Puffer, dNTPs sowie die *Taq*-Polymerase. Die PCR wurde im iCycler der Firma BioRad (München) durchgeführt. Die PCR Bedingungen waren hierbei vergleichbar mit denen der konventionellen PCR. Aus den Amplifikationskurven wurde derjenige Zyklus („Threshold Cycle“ Ct) ermittelt, nach dem die Amplifikation des PCR-Produkts in die exponentielle Phase überging. Unter Verwendung von GAPDH als Referenz wurde der Δ Ct-Wert ermittelt.

2.2.3.6 Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die polyanionische DNA lässt sich in Agarosegelen elektrophoretisch auftrennen und analysieren, beziehungsweise präparieren. Dabei wurden je nach Größe des erwarteten Fragments in Basenpaaren 1 bis 2%-ige Agarosegele verwendet.

Zur Herstellung der Agarosegele wurde die gewünschte Menge Agarose (w/v) mit 1x TAE Puffer versehen. Nach kurzem Aufkochen wurden 5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (1 mg/ml) hinzugegeben. Dieser DNA-interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoff ermöglicht die spätere Visualisierung der DNA nach Anregung mit UV-Licht. Die aufzutrennende DNA wurde vor dem Auftrag auf das Gel mit 1x Auftragspuffer versehen. Dadurch wird einerseits die Dichte der DNA-Lösung erhöht, um ein Absinken in die Geltaschen zu ermöglichen, und andererseits eine Visualisierung der Wanderung im Gel gewährleistet, da der Auftragspuffer Bromphenolblau enthält, das etwa auf Höhe eines 500 bp DNA-Fragments migriert. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen in bp wurden 10 µl eines Größenstandards mit aufgetragen. Die Gele wurden unter UV-Beleuchtung (254-366 nm) fotografiert.

1x TAE Puffer

Tris pH 7,5	44,5 mM
Borsäure	45,5 mM
EDTA	1 mM

6x Auftragspuffer

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
Ficoll	50% (v/v)
Bromphenolblau	0,006%

2.2.3.7 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die präparative Agarose-Gelelektrophorese wurde eingesetzt, um bestimmte DNA-Fragmente aus einem DNA-Gemisch zu isolieren, beziehungsweise zum Pufferwechsel oder Entfernen von Enzymen.

Die DNA wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht (312 nm) mit einer Rasierklinge herausgeschnitten. Schnelles Arbeiten ist dabei wichtig, da UV-Bestrahlung die DNA schädigt. Das isolierte Fragment wurde aus der Agarose mittels des „QIAquick“-Kits (Qiagen, Hilden) eluiert und dabei wie vom Hersteller vorgesehen verfahren.

2.2.3.8 Plasmid-Präparation

Plasmide wurden isoliert, um sie in Transformationen oder in eine PCR einsetzen zu können.

Ein Bakterienklon wurde über Nacht in 3 ml beziehungsweise 100 ml LB-Medium, supplementiert mit einem geeigneten Antibiotikum, angezogen. Durch Zentrifugation wurden die Bakterien pelletiert und die Plasmide unter Verwendung des *GenElute* Plasmid-Mini- beziehungsweise Midipräparation Kits (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) nach Vorgaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration und Reinheit der Präparation wurde photometrisch quantifiziert und das isolierte Plasmid bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.9 Restriktionsverdau der DNA mit Restriktionsendonucleasen

Die DNA wird mit Restriktionsendonucleasen geschnitten, um Plasmide zu linearisieren, Vektoren und Inserts zur Ligation vorzubereiten oder Klone zu selektieren.

Pro μg DNA oder weniger, wird eine Unit Restriktionsenzym eingesetzt und mit 1x geeignetem Reaktionspuffer versehen. Die Inkubation erfolgte bei einer für die Enzymaktivität optimalen Temperatur.

2.2.3.10 A-tailing von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die mit korrekturlesenden Polymerasen erzeugt wurden, weisen an den Enden keinen 3'-A-Überhang auf. Da das zur Klonierung verwendete TOPO-TA-Cloning Kit auf einen 3'-A-Überhang angewiesen ist, musste dieser nachträglich angefügt werden. Dieser Vorgang wird als *A-tailing* bezeichnet. Dazu werden die spezifischen PCR-Produkte mit einer präparativen Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt und vollständig in die nachfolgende Reaktion eingesetzt.

Zu dem PCR-Produkt wurden 5 Units *Taq*-Polymerase, 1x *Taq*-Polymerase-Reaktionspuffer mit 1 mM MgCl_2 und 0,2 mM dNTPs gegeben. Der Ansatz wurde für 15-30 min bei 70 °C inkubiert und im Anschluss direkt in die TOPO-TA-Ligation eingesetzt.

2.2.3.11 TOPO-TA-Ligation

Für die Ligation wurde aufgereinigtes PCR-Fragment mit 3'-A-Überhang verwendet. 4 μl dieser DNA-Lösung wurden mit 1 μl Salzlösung und 1 μl TOPO Vektor-Lösung aus dem *TOPO-TA-Cloning Kit* (Invitrogen, Karlsruhe) gemischt und 5 min bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss folgte eine Hitzeschock-Transformation von DH5 α Bakterien.

2.2.3.12 Klonierung mit dem Gateway System

In dieser Arbeit wurde das *Gateway System* (Invitrogen, Karlsruhe) zur Herstellung von Expressionsplasmiden verwendet. Dieses System nutzt die sequenzspezifische Rekombinationsreaktion des λ -Phagen zur Einführung von Genen in entsprechende Plasmide. Der Vorteil des *Gateway Systems* besteht darin, dass unter Beibehaltung der

Orientierung des *Inserts* eine direkte Klonierung von Genen aus einem *Entryvektor* in verschiedene Expressionsvektoren (Zielvektoren) ermöglicht wird.

Die Reaktionen wurden wie vom Hersteller vorgesehen durchgeführt, wobei als Zielvektor pRL1899 verwendet wurde. In einen Reaktionsansatz wurden 300 ng *Entryvektor* und 300 ng Zielvektor zusammen mit 1x LR-Reaktionspuffer und 2 µl LR Clonase Enzym Mix aus dem *Gateway Cloning LR Reaction Kit* gegeben. Der Ansatz wurde mit TE-Puffer (pH 8,0) auf 20 µl aufgefüllt und für 1 h bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Behandlung mit 2 µl Proteinase K-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) bei 37 °C für 10 min gestoppt und 2-4 µl des Reaktionsansatzes wurden anschließend in eine Hitzeschock-Transformation von DH5α Bakterien eingesetzt und auf LB/Amp-Platten ausgestrichen.

TE-Puffer

Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM
EDTA 10 mM

2.2.4 Mikrobiologische Methoden

2.2.4.1 Bakterienanzucht

Bakterien wurden in LB-Medium, das mit den benötigten Antibiotika supplementiert war, als Flüssig- beziehungsweise Plattenkultur über Nacht herangezogen. Plattenkulturen dienten zum Vereinzeln von Bakterienklonen, wie es zum Beispiel nach einer Transformation nötig war. Wenn Plasmide isoliert werden sollten, wurden Flüssigkulturen verwendet.

LB-Medium / LB-Platten:

Bacto-Trypton 1% (w/v)
Hefeextrakt 0,5% (w/v)
NaCl 1% (w/v)
pH 7,5 (eingestellt mit 5 M NaOH)
Die Lösung wurde nach der Herstellung autoklaviert.

Die benötigten Antibiotika werden unmittelbar vor Verwendung in folgenden Endkonzentrationen zu dem Medium gegeben:

Ampicillin:	100 µg/ml
Streptomycin:	100 µg/ml
Spectinomycin:	100 µg/ml

Für LB-Platten wurde zusätzlich 1,5% Agar hinzugegeben. Die hitzelabilen Antibiotika wurden erst zugefügt, nachdem das Medium auf etwa 50 °C abgekühlt war.

2.2.4.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Bakterien

Eine Übernachtskultur (5 µl) eines chemisch-kompetenten Bakterienstammes wurde in 5 ml LB-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert. Diese Vorkultur wurde in 50 ml LB-Medium übertragen und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45-0,55 vermehrt. Danach wurde die Kultur rasch durch eine fünfminütige Inkubation auf Eis abgekühlt und anschließend für 5 min bei 4 °C und 5.000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Tfb I-Lösung auf Eis resuspendiert und für 10 min inkubiert. Danach wurde die Suspension erneut für 5 min bei 5.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 2 ml Tfb II-Lösung resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde zu je 200 µl in vorgekühlte Eppendorfgläser aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

Tfb I

K ⁺ -Acetat (pH 5,8)	30 mM
MnCl ₂	50 mM
RbCl ₂	100 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerin	15% (v/v)

Tfb II

Na-MOPS (pH 7,4)	10 mM
CaCl ₂	75 mM
RbCl ₂	10 mM
Glycerin	15% (v/v)

2.2.4.3 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Pro Transformationsansatz wurden 100 µl chemisch-kompetenter *E. coli* Bakterien auf Eis aufgetaut. Zu jedem Aliquot wurden 50-300 ng Plasmid-DNA gegeben und der Ansatz durch leichtes Anstoßen vermischt. Es folgten eine 15-minütige Inkubation auf Eis und anschließend ein Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C. Nach der Hitzeschock-Behandlung wurden die Zellen erneut für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 500 µl vorgewärmten LB-Medium versetzt und 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden 25-75 µl dieses Transformationsansatzes auf antibiotikum-haltigen LB-Platten ausplattiert.

2.2.4.4 Herstellen von bakteriellen Dauerkulturen

Klone oder bakterielle Wirtsstämme können über einen längeren Zeitraum bei –80 °C gelagert werden. Dazu wurde ein Klon in 5 ml Flüssigkultur herangezogen und bei Erreichen des exponentiellen Wachstums ($OD_{600nm} = 0,6$) wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert. Ein Teil des Überstandes wurde verworfen und die Bakterien im verbleibenden Rest resuspendiert, um die Zelldichte zu erhöhen. Zu 200 µl Bakteriensuspension wurden 800 µl 80% Glycerin gegeben und der Ansatz bei –80 °C gelagert.

2.2.5 Methoden für *C. elegans*

2.2.5.1 Kultivierung

C. elegans wurde auf NGM (*nematode growth medium*)-Platten verschiedener Größe (35 mm und 60 mm) kultiviert, die mit einem Rasen von *E. coli* HB101 beimpft wurden. Die Würmer wurden bei 20 °C kultiviert und mit einem ausgeglühten Platin-Draht oder durch Ausschneiden kleiner Agar-Quadrate unter Verwendung eines ausgeglühten Skalpell von Platte zu Platte transferiert.

NGM-Platten

NaCl	0,3% (w/v)
Bacto-Pepton	0,25% (w/v)
Bacto-Agar	1.6% (w/v)

Die Lösung wurde nach dem Ansetzen autoklaviert.

Im Anschluss wurde die Lösung auf 65 °C abgekühlt und unter Rühren folgende Lösungen hinzugegeben:

PPB (pH 6,0)	25 mM
CaCl ₂	1 mM
MgSO ₄	1 mM
Uracil	200 µg/ml
Cholesterol	500 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Anschließend wurde die Lösung in folgenden Volumina in entsprechende Kulturschalen überführt:

4,5 ml pro 35 mm Kulturschale.

11,5 ml pro 60 mm Kulturschale.

Die NGM-Platten wurden mindestens einen Tag bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss mit der bakteriellen Starterkultur versehen.

1 M PPB (pH 6,0)

KH₂PO₄ 0,72 M

K₂HPO₄ 0,28 M

Der pH wurde mit 10 N KOH eingestellt.

2.2.5.1.1 Bakterielle Starterkulturen

C. elegans wurde unter monoxenischen Bedingungen kultiviert, wobei der *E. coli*-Stamm HB101 als Nahrungsquelle verwendet wurde. Dieser Stamm ist Uracil-auxotroph, was gewährleistet, dass sein Wachstum auf den verwendeten NGM-Platten limitiert wurde.

HB101 Bakterien wurden auf LB/Strep-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Eine einzelne Kolonie wurde gepickt und in 100 ml LB/Strep bei 37 °C herangezogen. Dabei wurde auf Schütteln verzichtet, um eine optimale Dichte der Bakterienkultur zu erreichen. Sowohl die ausgestrichene Platte als auch die Flüssigkultur wurden bei 4 °C gelagert und waren bis zu 4 Wochen verwendbar.

Beim Aussäen der Bakterien auf die NGM-Platten wurden folgende Volumina verwendet:

35 mm Platte: 200 µl

60 mm Platte: 350 µl

Die Platten wurden im Anschluss für mindestens einen Tag bei Raumtemperatur getrocknet, bevor sie für bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert wurden.

2.2.5.2 Langfristige Aufbewahrung von *C. elegans*

C. elegans lässt sich für unbegrenzte Zeit bei -80 °C beziehungsweise in flüssigem Stickstoff lagern. Zum Einfrieren wurden gehungerte L1 und L2 Larven von zwei 60 mm Kulturplatten mit 1x M9-Lösung heruntergespült und mit dem gleichen Volumen 2x Einfrierlösung versetzt. Die Würmer wurden in 1 ml Aliquots auf 2 ml Kryoröhrchen verteilt und zum gleichmäßigen Einfrieren für ein bis mehrere Tage horizontal bei -80 °C inkubiert, bevor sie für die langfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff transferiert wurden.

10x M9-Lösung

Na ₂ HPO ₄ , Anhydrat	60 g
KH ₂ PO ₄ , Anhydrat	30 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	10 g
dH ₂ O	ad 1000 ml

Die Lösung wurde nach dem Ansetzen autoklaviert.

2x Einfrierlösung

NaCl	100 mM
PPB (pH 6,0)	50 mM
Glycerin	30% (v/v)
MgSO ₄	0,3 mM

Die Lösung wurde nach dem Ansetzen Filter-sterilisiert.

2.2.5.3 Transformation durch Mikroinjektion von DNA

Die Transformation von *C. elegans* erfolgte mittels Mikroinjektion von DNA in die Gonaden der Hermaphroditen (Fire, 1986). Zunächst wurden jeweils 120 ng der Plasmid-DNA und des Koinjektionsmarker (pDP#MM016; „*unc-119 rescue*“) vereinigt und bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Dadurch wurden grobe Partikel, welche die Injektionsnadel verstopfen könnten, sedimentiert. Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen 2%-iger Agarose in dH₂O (w/v) aufgetropft, flachgedrückt und für 2-3 h bei 80 °C getrocknet. Zur Injektion wurde ein Tropfen Halocarbonöl auf ein Agarose-beschichtetes Objektglas gegeben und L4 Hermaphroditen oder junge Erwachsene darin auf der Agarose fixiert. Die Injektion der DNA-Lösung erfolgte in die Gonade der Würmer. Die Würmer wurden anschließend mit 1x M9-Lösung vom Deckglas gelöst und auf NGM-Platten überführt. In der F1-Generation wurden diejenigen Hermaphroditen isoliert, die den Koinjektionsmarker exprimierten und dadurch einen wildtypischen Phänotyp aufwiesen. In einigen dieser Nachkommen

bildet die injizierte DNA lange extrachromosomale DNA-Elemente, die in die F2-Generation weiter vererbt werden. Die Vererbung dieser DNA schwankt in den unabhängig etablierten Linien zwischen 10% und 90% (Mello and Fire, 1995).

2.2.5.4 Proteinpräparation

Zur Präparation von Gesamtwurmprotein wurden Hermaphroditen mit einem möglichst geringen Volumen 1x M9-Lösung von 12-15 NGM-Platten (60 mm) gespült und in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen vereinigt. Durch Zentrifugation (maximale Umdrehung, 1 min) wurden die Würmer pelletiert und zweimal mit dH₂O gewaschen. Im Anschluss wurde das Wurmpellet in 1 ml vorgekühltem N'N'-Dimethylformamid resuspendiert und über Nacht bei -20 °C gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit 100 mM Tris-HCl (pH 6,8) wurden die Würmer in einem möglichst geringem Volumen Nest-Puffer resuspendiert und harsch sonifiziert, um die Collagen-haltige Cuticula aufzubrechen. Zuletzt wurde das Lysat für 5 min bei 100 °C inkubiert und bei -80 °C gelagert.

Nest-Puffer

Tris-HCl (pH 6,8)	100 mM
SDS	5% (w/v)
EDTA	5 mM

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des zellulären Altersmodells

3.1.1 Alterung der Fibroblastenkultur

IMR-90 normale humane Fibroblasten wurden sequentiell passagiert. Mit fortschreitendem PDL nahm die Teilungsaktivität der Fibroblastenkultur ab, bis die Zellen bei PDL 46 einen vollständigen Wachstumsstopp aufwiesen (Abb. 3.1).

Zur Bestimmung des seneszenten Phänotyps wurde eine Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Färbung verwendet. Seneszente Zellen weisen bei pH 6 eine erhöhte enzymatische Aktivität der β -Galaktosidase auf und können somit über diese Färbung spezifisch nachgewiesen werden (Dimri *et al.*, 1995). Bei PDL 46 wurden nahezu 100% gefärbte Zellen identifiziert und somit die Alterung der Fibroblastenkultur bestätigt (Abb. 3.2).

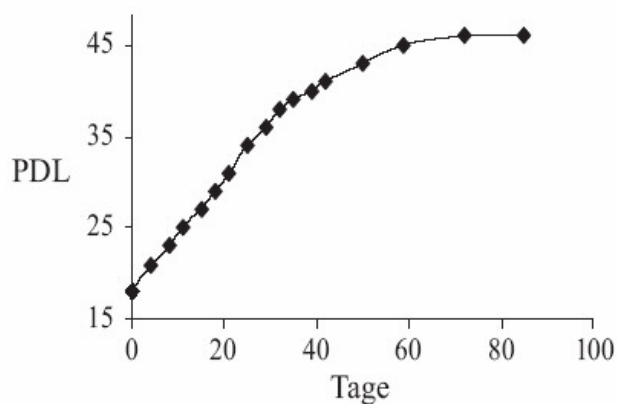


Abb. 3.1 Alterung der Fibroblastenkultur. Humane Fibroblasten wurden sequentiell passagiert. Nach anfänglich exponentiellem Wachstum nahm die Teilungsaktivität der Kultur graduell ab, bis die Zellen bei PDL 46 einen vollständigen Wachstumsarrest aufwiesen.

Zusätzlich waren seneszente Populationen durch eine hohe Diversität zellulärer Phänotypen charakterisiert. Sie wiesen aufgrund einer sensitiveren Zell-Zell-Kontaktinhibition eine geringere Zelldichte als junge Populationen auf, und die Fibroblasten waren durch einen stark vergrößerten Zellumfang gekennzeichnet.

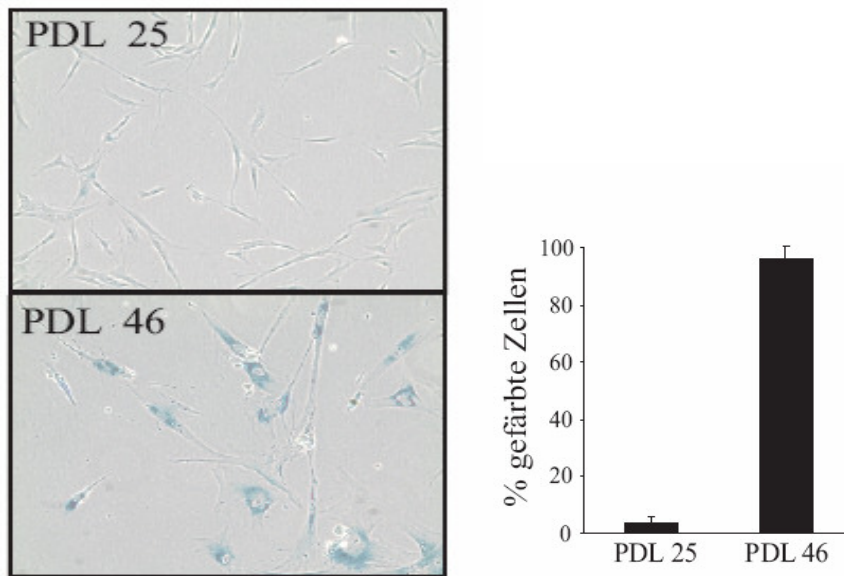


Abb. 3.2 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidaseaktivität. Die zelluläre Alterung wurde durch die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidaseaktivität ermittelt. Mindestens 400 Zellen pro Kulturschale wurden bezüglich einer Blaufärbung analysiert und prozentual gegen die Gesamtzahl der untersuchten Zellen aufgetragen.

3.1.2 Analyse typischer Altersmarker

Biochemisch wurde die Zellalterung durch die Untersuchung der Caveolin-1- und $p21^{Waf1/Cip1}$ -Proteinspiegel nachgewiesen. Caveolin-1 ist eine strukturelle Proteinkomponente von Lipid Rafts (Stan, 2005) und $p21^{Waf1/Cip1}$ ein Zellzyklus-Modulator, der durch p53 kontrolliert wird und für den Proliferationsstopp seneszenten Zellen mitverantwortlich ist (Atadja *et al.*, 1995). Für beide Proteine wurden altersabhängig erhöhte Spiegel detektiert (Abb. 3.3), wie sie in der Literatur beschrieben sind (Atadja *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2000).

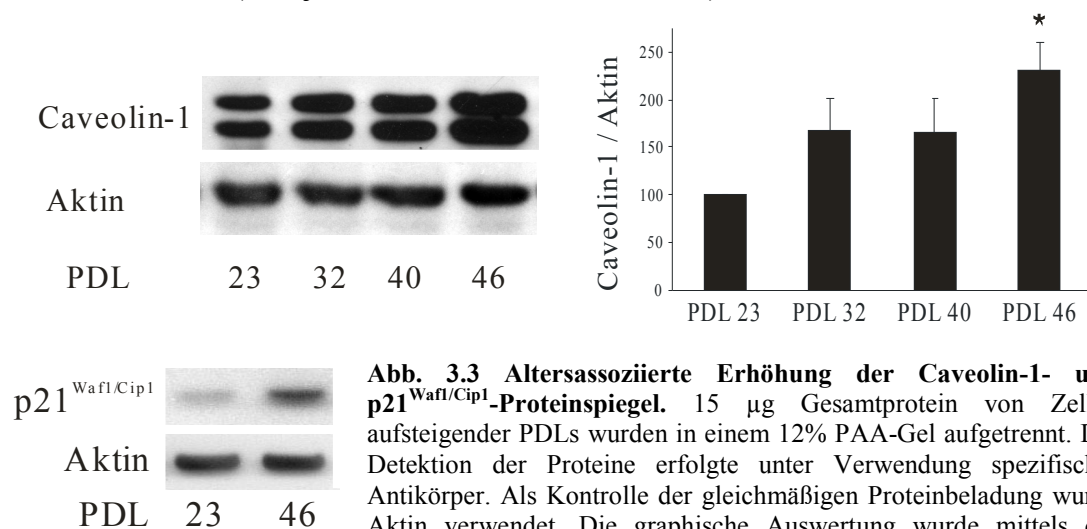


Abb. 3.3 Altersassoziierte Erhöhung der Caveolin-1- und $p21^{Waf1/Cip1}$ -Proteinspiegel. 15 μ g Gesamtprotein von Zellen aufsteigender PDLs wurden in einem 12% PAA-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper. Als Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde Aktin verwendet. Die graphische Auswertung wurde mittels der optischen Bandenintensitäten vollzogen und als prozentuale Veränderung zu PDL 23 dargestellt (* PDL23 zu PDL 46, $p < 0,05$, Tuckey Test, $n=3$).

3.1.3 Altersassoziierte Erhöhung der zellulären Cholesterolspiegel und Disintegration von Lipid Rafts

Die Zellalterung ist mit einem erhöhten intrazellulären Cholesterolspiegel und einer veränderten Konstitution von Lipid Rafts verbunden. Park *et al.* haben erhöhte Spiegel der Membransubdomänen im Zuge der Alterung von IMR-90 Fibroblasten beschrieben (Park *et al.*, 2000), wohingegen andere Autoren eine altersabhängige Abnahme beziehungsweise Disintegration der Lipid Rafts in Fibroblasten nachgewiesen haben (Nakamura *et al.*, 2003; Wheaton *et al.*, 2001).

Die Untersuchung der intrazellulären Cholesterolspiegel in jungen und seneszenten Fibroblastenkulturen demonstrierte eine altersassoziierte Zunahme von Cholesterol um 37% (Abb. 3.4). Somit wurden sowohl für Caveolin-1 als auch für Cholesterol, beides strukturelle Komponenten von Lipid Rafts, altersabhängig erhöhte Spiegel detektiert.

Um den Einfluss der zellulären Alterung auf die strukturelle Integrität von Lipid Rafts zu untersuchen, wurden diese Membrandomänen mittels Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation isoliert. Aufgrund ihrer geringen Dichte flotieren Lipid Rafts innerhalb des Saccharosegradienten in die Grenzregion zwischen 5% und 30% Saccharose (Fraktion 2).

Die Untersuchung der Verteilung von Cholesterol innerhalb der Fraktionen aus Lipid Raft Isolationen demonstrierte eine altersassoziierte Migration von Cholesterol in die Nicht-Raft Fraktion der Membran seneszenten Zellen (Abb. 3.5A). Dabei war Cholesterol in der Lipid Raft Fraktion junger Zellen angereichert, wohingegen die Assoziation mit Lipid Rafts in gealterten Zellen reduziert war und Cholesterol in der Nicht-Raft Fraktion akkumulierte. Diese altersabhängige Migration aus den Lipid Rafts in die Nicht-Raft Fraktionen wurde auch für Caveolin-1 beobachtet (Abb. 3.5B).

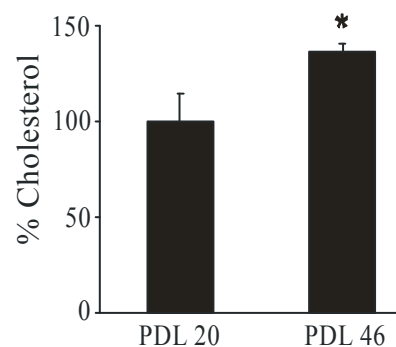


Abb. 3.4 Erhöhte Cholesterolspiegel in seneszenten Fibroblasten. Intrazelluläre Cholesterolspiegel wurden unter Verwendung des Amplex Red Cholesterol Assays in 15 µg zellulärem Gesamtlisat ermittelt.

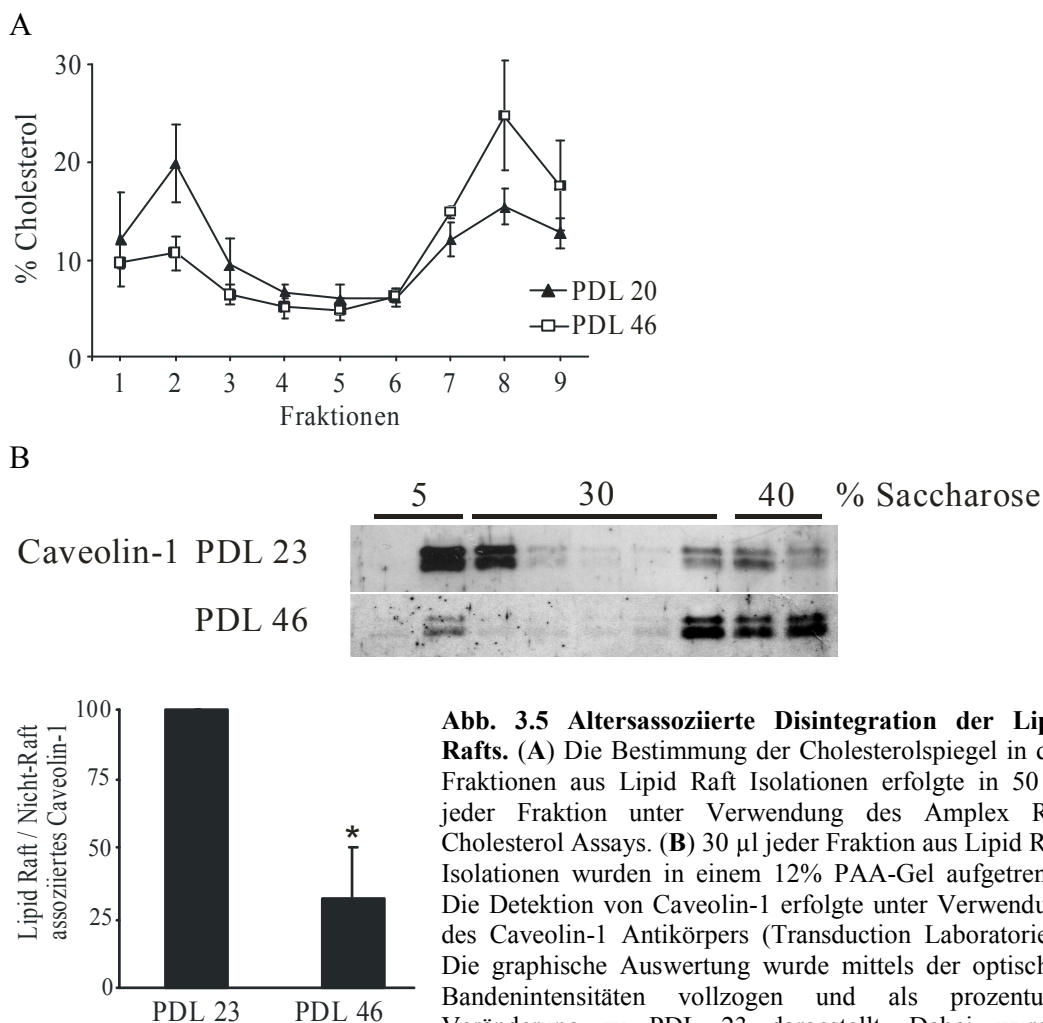


Abb. 3.5 Altersassoziierte Disintegration der Lipid Rafts. (A) Die Bestimmung der Cholesterolspiegel in den Fraktionen aus Lipid Raft Isolationen erfolgte in 50 μ l jeder Fraktion unter Verwendung des Amplex Red Cholesterol Assays. (B) 30 μ l jeder Fraktion aus Lipid Raft Isolationen wurden in einem 12% PAA-Gel aufgetrennt. Die Detektion von Caveolin-1 erfolgte unter Verwendung des Caveolin-1 Antikörpers (Transduction Laboratories). Die graphische Auswertung wurde mittels der optischen Bandenintensitäten vollzogen und als prozentuale Veränderung zu PDL 23 dargestellt. Dabei wurden Fraktionen 1-3 als Raft Fraktionen und 7-9 als Nicht-Raft Fraktionen zusammengefasst (* $p < 0.05$, Tuckey Test, $n = 4$).

Zusammenfassend wurde somit gezeigt, dass Lipid Rafts im Zuge der Zellalterung strukturell disintegrieren beziehungsweise in geringeren Gesamtmengen auftreten.

Interessanterweise wurden im Zuge der Zellalterung Caveolin-1 sowie Cholesterol in erhöhten Mengen nachgewiesen. Dennoch war ihre Assoziation mit Lipid Rafts signifikant reduziert. Mittels Immunocytochemie wurde die subzelluläre Lokalisation von Caveolin-1 und Cholesterol untersucht (Abb. 3.6). In jungen Fibroblasten (PDL 20) war Cholesterol gleichmäßig über die Zelle verteilt. Caveolin-1 wurde sowohl perinukleär als auch in einer punktuellen Verteilung nachgewiesen, die dem Plasmamembran-assoziierten Protein entspricht. In seneszenten Zellen (PDL 46) war diese Verteilung verändert und Cholesterol und Caveolin-1 akkumulierten in definierten Kompartimenten mit hoher Dichte, bei denen es sich höchstwahrscheinlich

um Lipidkörper handelte. Diese altersabhängige Anreicherung in speziellen subzellulären Kompartimenten unterstreicht einen veränderten Metabolismus oder eine modifizierte physiologische Funktion beider Moleküle in seneszenten Zellen.

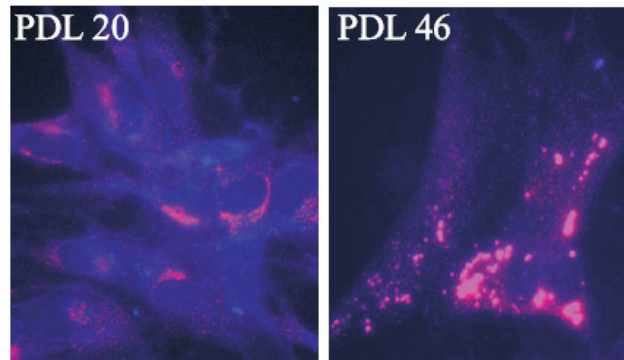


Abb. 3.6 Altersassoziierte Akkumulation von Cholesterol und Caveolin-1 in Lipidkörpern. Junge (PDL 20) und seneszente (PDL 46) IMR-90 Fibroblasten wurden fixiert und für 2 h mit DChol behandelt (blau). Im Anschluss wurde mit einem Caveolin-1 Antikörper inkubiert und nachfolgend mit einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper (rot). Die Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Die Färbungen zeigen die Zellen jeweils in 100facher Vergrößerung.

3.2 Untersuchungen zu altersassoziierten Veränderungen der Prozessierung von endogenem APP

Die Prozessierung von APP ist ein vermutlich zentraler Mechanismus der Alzheimer Krankheit, wobei altersassoziierte Veränderungen dieses komplexen biochemischen Prozesses auf zellulärer Ebene bisher nicht untersucht wurden. Zudem wurden die meisten Studien mit APP in überexprimierenden Systemen vollzogen. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit ermittelt werden, in welcher Weise die Prozessierung von endogenem APP durch die Zellalterung und die damit verbundenen zellulären Modifikationen beeinflusst wird.

3.2.1 Altersassoziierte Abnahme der Spiegel von reifem APP und der APP-Spaltfragmente

Unter Verwendung humaner IMR-90 Fibroblasten als zellulärem Altersmodell wurde die Reifung und die Prozessierung von endogenem APP mittels *Western Blot Analyse* untersucht. Dabei wurden Proteinlysate aufsteigender PDLs herangezogen, um den Einfluss der Zellalterung über die gesamte Lebensspanne der Zellen zu analysieren.

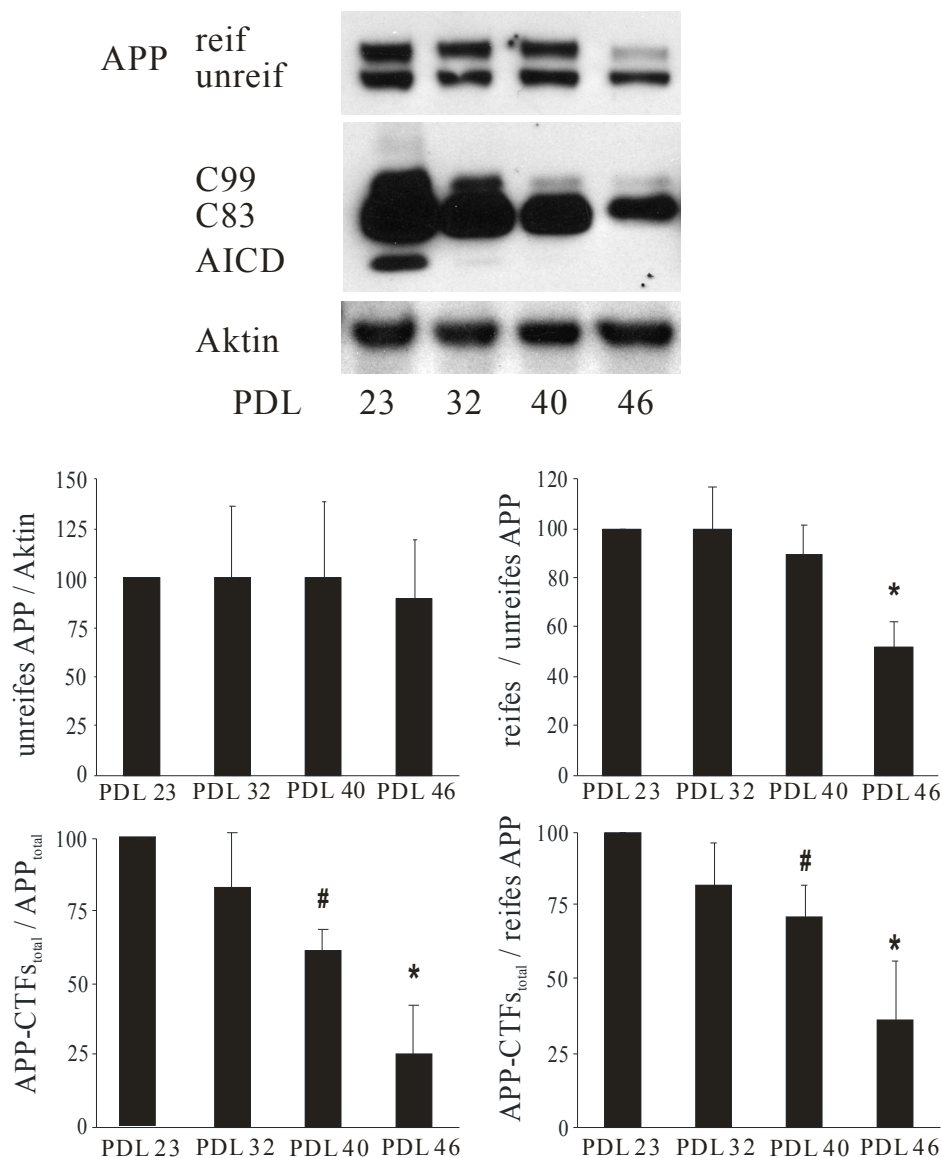


Abb. 3.7 Die Spiegel von reifem APP und intrazellulären APP-Spaltfragmenten nehmen im Zuge der Zellalterung ab. 15 µg Gesamtprotein von Zellen aufsteigender PDLs wurde auf einem 4-12% NuPAGE-Gradientengel aufgetrennt. APP wurde unter Verwendung des APP C-terminalen Antiköpers CT-15 detektiert. Das dargestellte Vorläuferprotein und die CTFs stammen von einer Membran, allerdings aus unterschiedlichen Expositionszeiten, um die Abbildung der CTFs zu ermöglichen. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet. Die graphische Darstellung erfolgte nach Auswertung der optischen Bandenintensitäten und ist dargestellt als prozentuale Veränderungen zu PDL 23. (#PDL 23 zu PDL 40, *PDL 23 zu PDL 46, $p < 0,05$, Tuckey Test, $n=4$)

Interessanterweise wurde eine signifikante Verringerung der Spiegel von reifem APP in seneszenten Zellen bei PDL 46 beobachtet (Abb. 3.7). Dies resultierte in einer Reduktion des Verhältnisses von reifem zu unreifem APP um annähernd 50%. Der Proteinspiegel von immatorem APP wies keine altersabhängige Regulation auf, und eine *Real Time PCR* Analyse der APP-Genexpression demonstrierte, dass die

Expression im Zuge der Zellalterung unverändert war (Abb. 3.8). Somit können die abnehmenden Spiegel von reifem APP in seneszenten Fibroblasten auf eine verminderte Reifungseffizienz des Proteins zurückgeführt werden.

Die Spiegel der intrazellulären APP-Spaltfragmente, C99 und C83, die einerseits aus der β - und andererseits aus der α -sekretorischen Spaltung des Vorläuferproteins hervorgehen, nahmen im Zuge der Zellalterung signifikant ab. Daraus resultierten progressiv verringerte Verhältnisse dieser APP-CTFs bezogen auf Gesamt-APP sowie ausschließlich reifem APP (Abb. 3.7). Dies weist auf eine graduelle Verringerung der Prozessierung von APP durch die α - und die β -Sekretase hin.

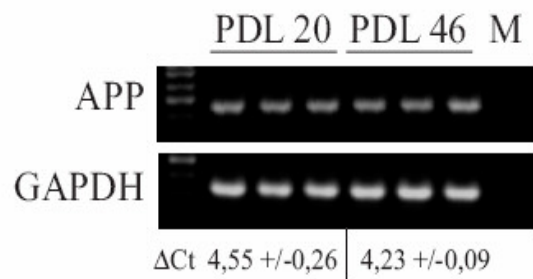


Abb. 3.8 Die APP-Genexpression ist unbeeinflusst von der Zellalterung. Die APP Genexpression wurde mittels *Real Time PCR* Analyse untersucht und die entsprechenden ΔCt -Werte bestimmt. Zur Visualisierung wurden die PCR-Ansätze auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. M bezeichnet die Negativkontrolle (Mock).

Die APP-CTFs werden nachfolgend durch den γ -Sekretasekomplex geschnitten, wobei das AICD gebildet wird. Dieses äußerste C-terminale Fragment von APP wird im Allgemeinen schnell proteolytisch abgebaut und wurde daher auf endogener Ebene bisher nicht nachgewiesen. Durch die *Western Blot Analyse* der APP-Spaltfragmente wurde ein Fragment unterhalb von C99 und C83 beobachtet, bei dem es sich möglicherweise um endogenes AICD handelte. Um die Identität dieses ungefähr 6 kDa großen Peptids zu klären, wurden junge Fibroblasten (PDL 25) mit dem γ -Sekretase Inhibitor H-5106 behandelt (Abb. 3.9). Durch die Inhibition der γ -Sekretase wurde eine Akkumulation von C99 und C83 beobachtet und die putative AICD-Bande war nicht detektierbar. Somit wurde das Peptid als endogenes AICD identifiziert, dessen Generierung durch die Inhibition der γ -Sekretase unterbunden werden konnte.

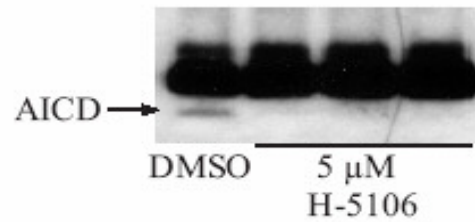


Abb. 3.9 Identifizierung von endogenem AICD. Junge Fibroblasten (PDL 25) wurden über Nacht mit 5 μ M H-5106 behandelt und im Anschluss lysiert. 15 μ g Gesamtlisat wurden auf einem 4-12% NuPAGE-Gradientengel aufgetrennt und die APP-CTFs mit dem CT-15 Antikörper detektiert.

Interessanterweise nahm der AICD-Spiegel im Zuge der Zellalterung stark ab und reflektierte dabei die Reduktion der C99- und C83-Spiegel (Abb. 3.7).

Die Untersuchung der intrazellulären APP-Spaltfragmente demonstrierte, dass die Prozessierung von APP im Zuge zellulärer Alterung progressiv abnimmt und als Folge die Spiegel der intrazellulären APP-Spaltfragmente deutlich reduziert wurden.

Um dies zu bestätigen, wurden die extrazellulären APP-Spaltfragmente analysiert. Dazu wurde das Kulturmedium von Fibroblasten unterschiedlicher PDLs nach 72-stündiger Inkubation gesammelt und die Spiegel von sAPP und sAPP α mittels *Western Blot Analyse* untersucht. sAPP entspricht der Gesamtmenge von sezerniertem löslichem APP, ohne zwischen sAPP α oder sAPP β zu unterscheiden. Während sowohl der sAPP- als auch sAPP α -Spiegel mit steigendem Zellalter progressiv abnahmen, konnte für das Verhältnis von sAPP α zu sAPP keine signifikante altersassoziierte Veränderung festgestellt werden (Abb. 3.10). Dies unterstreicht eine progressive Verringerung der Prozessierung von endogenem APP im Zuge der Zellalterung und weist daraufhin, dass dabei weder der amyloidogene noch der nicht-amyloidogene Weg der Prozessierung bevorzugt wurde.

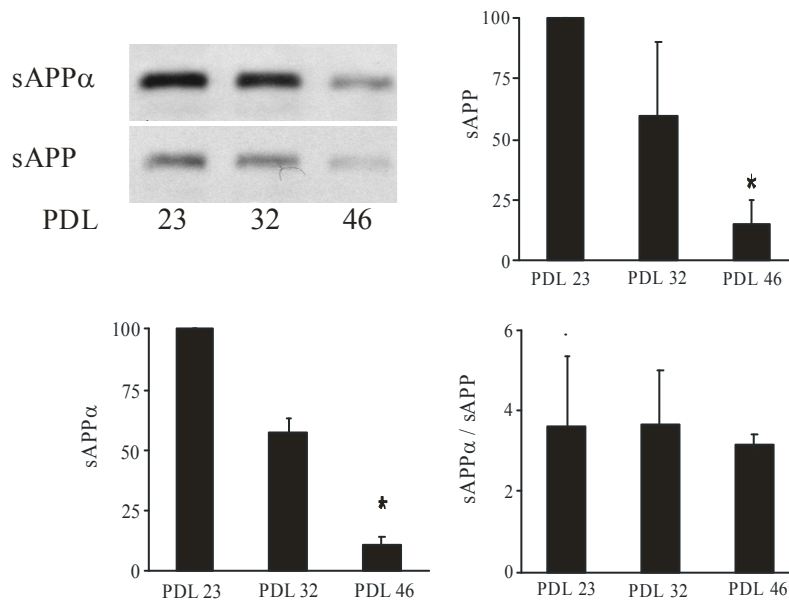


Abb. 3.10 Altersassoziierte Verringerung der Spiegel löslicher APP-Spaltfragmente. Kulturmedien von Fibroblasten unterschiedlicher PDLs wurden gesammelt und auf einem 8% PAA-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 6E10 (sAPP α), beziehungsweise des polyklonalen Antiserums 863 (sAPP). Die graphischen Darstellungen erfolgten durch Auswertung der optischen Bandenintensitäten und wurden als prozentuale Veränderung zu PDL 23 dargestellt. (*PDL 23 zu PDL 46, $p < 0,05$, Tuckey Test, $n=4$)

3.2.2 Altersassoziierte Reduktion der Reifung und Prozessierung von APP

Interessanterweise wurde eine altersabhängige Verringerung der Spiegel von reifem APP, sowie der APP-Spaltprodukte nachgewiesen. Um zu klären, ob diese altersabhängig reduzierten Spiegel tatsächlich auf eine geringere Reifung, beziehungsweise Prozessierung von endogenem APP zurückzuführen waren und nicht etwa auf einen verstärkten proteasomalen Abbau gebildeter Spaltfragmente, wurde der Metabolismus von APP mittels *Pulse-Chase Analyse* untersucht. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit der AG Prof. J. W. (Universität Bonn) durchgeführt.

Die Untersuchung des Zeitverlaufs der APP Reifung demonstrierte eine signifikante Verzögerung der Maturierung von APP in seneszenten Zellen im Vergleich zu jungen Zellen (Abb. 3.11A). Während die Reifung von 50% APP, bezogen auf den immaturren APP-Spiegel zum Zeitpunkt 0, in jungen Zellen ungefähr 15 min benötigte, dauerte dieser Prozess in alten Zellen annähernd 24 min. Wie schon zuvor durch *Western Blot Analyse* gezeigt, war dabei die Gesamtmenge von reifem APP in seneszenten Fibroblasten im Vergleich zu jungen signifikant reduziert.

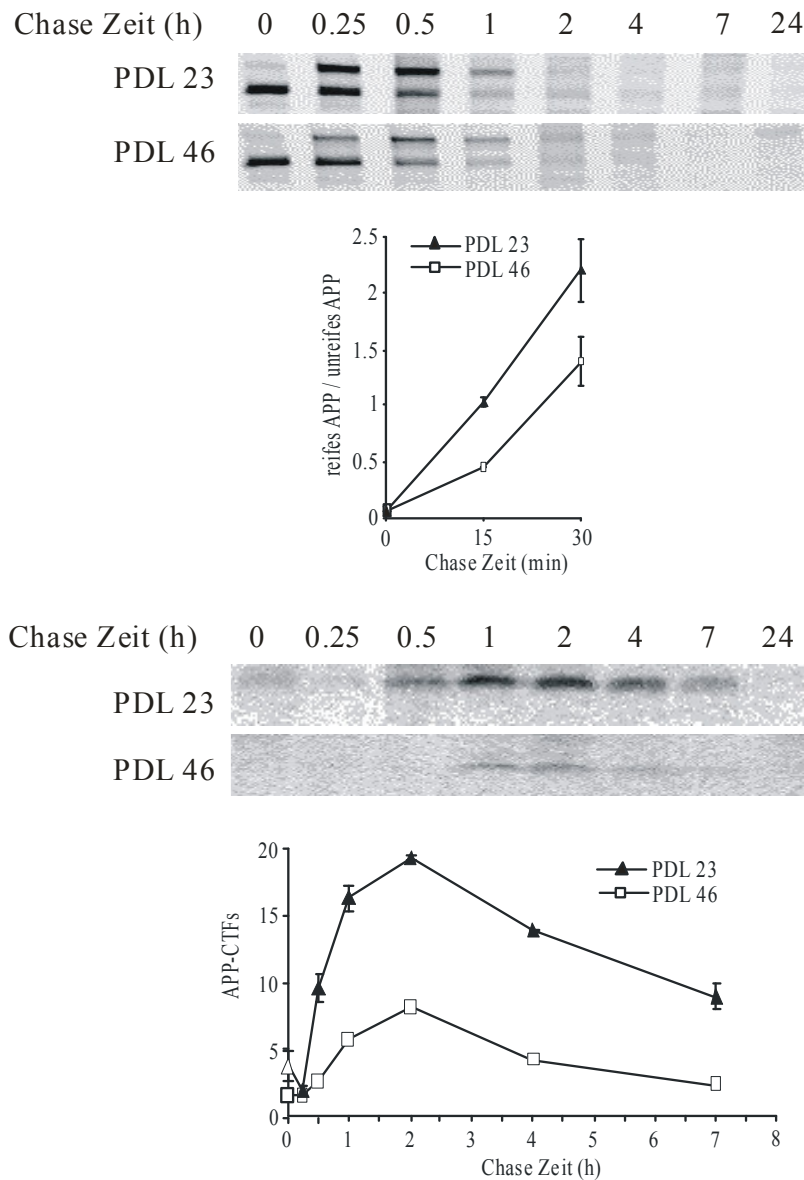


Abb. 3.11 Die Zellalterung verringert die Reifung und Prozessierung von APP, ohne die Degradation von APP oder den APP-CTFs zu beeinflussen. Die Effizienz der APP-Reifung sowie der Metabolismus von APP und den APP-CTFs wurde mittels *Pulse-Chase Analyse* untersucht. (A) Zellen bei PDL 23 und PDL 46 wurden mit [³⁵S]-Methionin für 15 min behandelt (*Pulse*). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert (*Chase*) und APP unter Verwendung des APP C-terminalen Antikörpers #140 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden auf einem 7% PAA-Gel aufgetrennt und reifes und unreifes APP durch *Phosphoimaging* nachgewiesen und quantifiziert. (B) Der Metabolismus der APP-CTFs wurde entsprechend untersucht.

Die Halbwertszeit sowohl von reifem als auch unreifem APP (~60 min) wies keine altersassoziierte Veränderung auf. Dies verdeutlichte, dass die Degradationsraten von APP im Zuge der Zellalterung unbeeinflusst waren und somit die beobachteten geringeren Spiegel von maturem APP in seneszenten Zellen auf einer geringeren Effizienz der Reifung von APP beruhten. Ein veränderter proteolytischer Abbau von

APP, zum Beispiel durch das Proteasom oder die Sekretasen, kann daher ausgeschlossen werden.

Die Untersuchung des Metabolismus der intrazellulären APP-Spaltfragmente demonstrierte, dass die CTFs in jungen Zellen schneller gebildet wurden und insgesamt deutlich höhere Spiegel erreichten als in seneszenten Zellen (Abb. 3.11B). Wie für das Volllängenprotein beobachtet, wiesen auch die CTFs im Vergleich junger und alter Fibroblasten keinen Unterschied in der Halbwertszeit auf.

Zusammengefasst wurde durch die *Pulse-Chase Analyse* gezeigt, dass die Reifung und die Prozessierung von APP im Zuge der Zellalterung signifikant reduziert wurden.

3.2.3 Altersabhängig erhöhte Cholesterolspiegel inhibieren die Reifung von APP

Aufgrund der Beobachtung, dass die Reifungseffizienz von APP im Zuge der Zellalterung abnimmt, wurden Faktoren gesucht, die diesen Prozess potentiell beeinflussen können. Für hohe zelluläre Cholesterolspiegel ist bekannt, dass sie die Maturierung von endogenem APP beeinträchtigen (Borroni *et al.*, 2003; Galbete *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob die erhöhten Cholesterolspiegel in seneszenten Zellen die Reifung von APP beeinflussen, wurde intrazelluläres Cholesterol mittels Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) depletiert (Abb. 3.12).

Interessanterweise wurde durch die Depletion von Cholesterol der Spiegel von reifem APP in seneszenten Zellen erhöht, ohne dass unreifes APP beeinflusst wurde. Durch diese selektive Zunahme von reifem APP stieg das Verhältnis von reifem zu unreifem APP an und entsprach nahezu dem Verhältnis beider Formen in jungen Zellen, die ihrerseits durch die M β CD-Behandlung unbeeinflusst waren. Somit wurde durch die Depletion des intrazellulären Cholesterolspegels seneszenter Zellen die Effizienz der APP Reifung regeneriert. Dies demonstrierte, dass die Reifung von APP direkt durch die altersabhängig erhöhten Spiegel von intrazellulärem Cholesterol gehemmt wurde (zur Übersicht siehe Abb. 3.13).

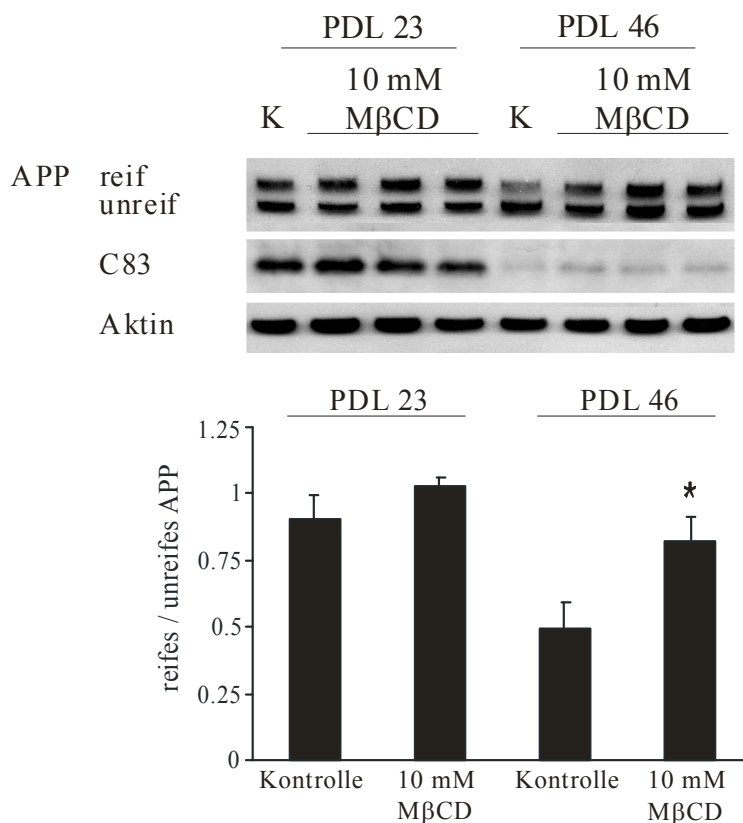


Abb. 3.12 Erhöhte Cholesterolspiegel inhibieren die Reifung von APP in seneszenten Zellen. Junge (PDL23) und seneszente (PDL 46) Fibroblasten wurden für 30 min mit 10 mM MβCD behandelt und im Anschluss dreimal mit 1x PBS gewaschen. Nach einer 4-stündigen Inkubation in Serum-freiem Medium, wurden die Zellen lysiert und 15 µg des Gesamtproteins auf einem 4-12% NuPAGE-Gradientengel aufgetrennt. Die Detektion der APP-Derivate erfolgte unter Verwendung des APP C-terminalen Antikörpers CT-15. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. K entspricht der unbehandelten Kontrolle. Die graphische Darstellung erfolgte nach Auswertung der optischen Bandenintensitäten (* $p < 0,05$, Tuckey Test, $n = 4-6$).

Durch die Regeneration der APP-Maturierung wurden die Spiegel der APP-Spaltfragmente nicht beeinflusst. Somit resultierte aus der gesteigerten Verfügbarkeit von reifem Substrat für die Sekretasen keine verstärkte Prozessierung von APP. Dies unterstreicht, dass die Reduktion der APP-Prozessierung im Zuge der Zellalterung nicht allein auf die Verfügbarkeit von reifem APP zurückgeführt werden kann. Unterstützt wurde dies durch die beobachtete progressive Verringerung der APP-Prozessierung, wohingegen eine signifikante Reduktion der Reifungseffizienz ausschließlich in Zellen bei PDL 46 nachgewiesen wurde.

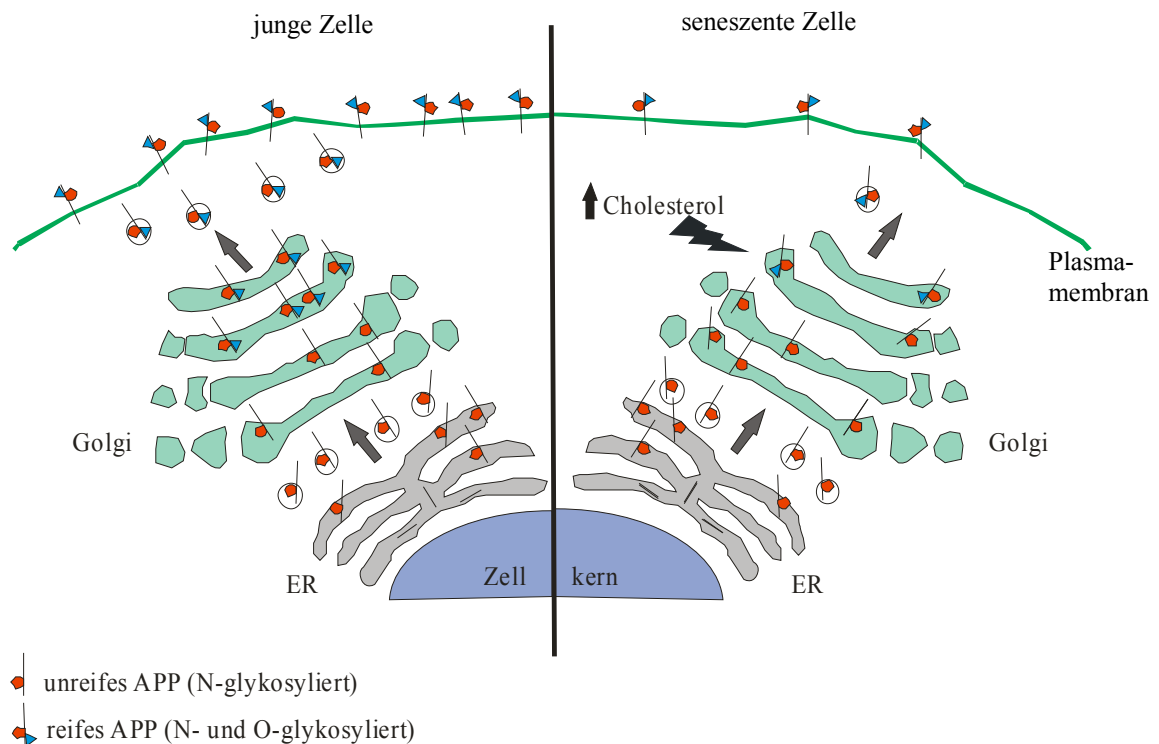


Abb. 3.13 Schematische Darstellung der Auswirkung erhöhter Cholesterolspiegel auf die Reifung von APP. Im Zuge des sekretorischen Pfads reift APP durch zahlreiche Glykosylierungen. N-Glykosylierungen erfolgen im Endoplasmatischen Retikulum (ER), während O-Glykosylierungen im Golgi-Apparat vollzogen werden. Erhöhte Cholesterolspiegel seneszenter Zellen führen zu einer Reduktion der O-Glykosylierung, wodurch die Spiegel von reifem APP signifikant verringert werden. Dies sollte eine reduzierte Anzahl Plasmamembran-assoziiierter Moleküle zur Folge haben. Schematisch ist hier die direkte Inhibition der O-Glykosylierung durch erhöhte Cholesterolspiegel dargestellt. Dies wird, wie unter Punkt 4.1.1 diskutiert, auf die Arbeit von Galbete *et al.* zurückgeführt (Galbete *et al.*, 2000). Durch Depletion der erhöhten Cholesterolspiegel in seneszenten Zellen wird die Reifung von APP nahezu auf das Niveau junger Zellen regeneriert.

Es ist bekannt, dass die Depletion von intrazellulärem Cholesterol die Prozessierung von APP beeinflusst und die α -sekretorische Spaltung verstärkt (Kojro *et al.*, 2001). Interessanterweise war die Behandlung der Zellen mit M β CD nicht mit einem signifikanten Einfluss auf die APP-Prozessierung verbunden. Möglicherweise lässt sich dieser Effekt auf endogener Ebene der Prozessierung nicht auflösen. Zum einen wurde der Zeitraum der M β CD-Behandlung sehr kurz gewählt, um das toxische Potential von M β CD zu unterdrücken, und zum anderen weisen die APP-CTFs eine sehr lange Halbwertszeit auf, so dass marginale Veränderungen der Prozessierung erst nach einem längeren Zeitraum deutlich werden. Hinsichtlich einer veränderten Prozessierung von APP wurden zusätzlich die sezernierten APP-Spaltprodukte (sAPP α /sAPP) untersucht und auch auf dieser Ebene unveränderte Spiegel nachgewiesen (ohne Abbildung).

3.2.4 Altersassoziierte Veränderungen der Proteinspiegel der Sekretasen

Aufgrund der Beobachtung, dass die Prozessierung von APP im Zuge der Zellalterung abnimmt, wurden die Proteinspiegel der beteiligten Sekretasen untersucht, um eine mögliche Altersregulation dieser Enzyme aufzuklären.

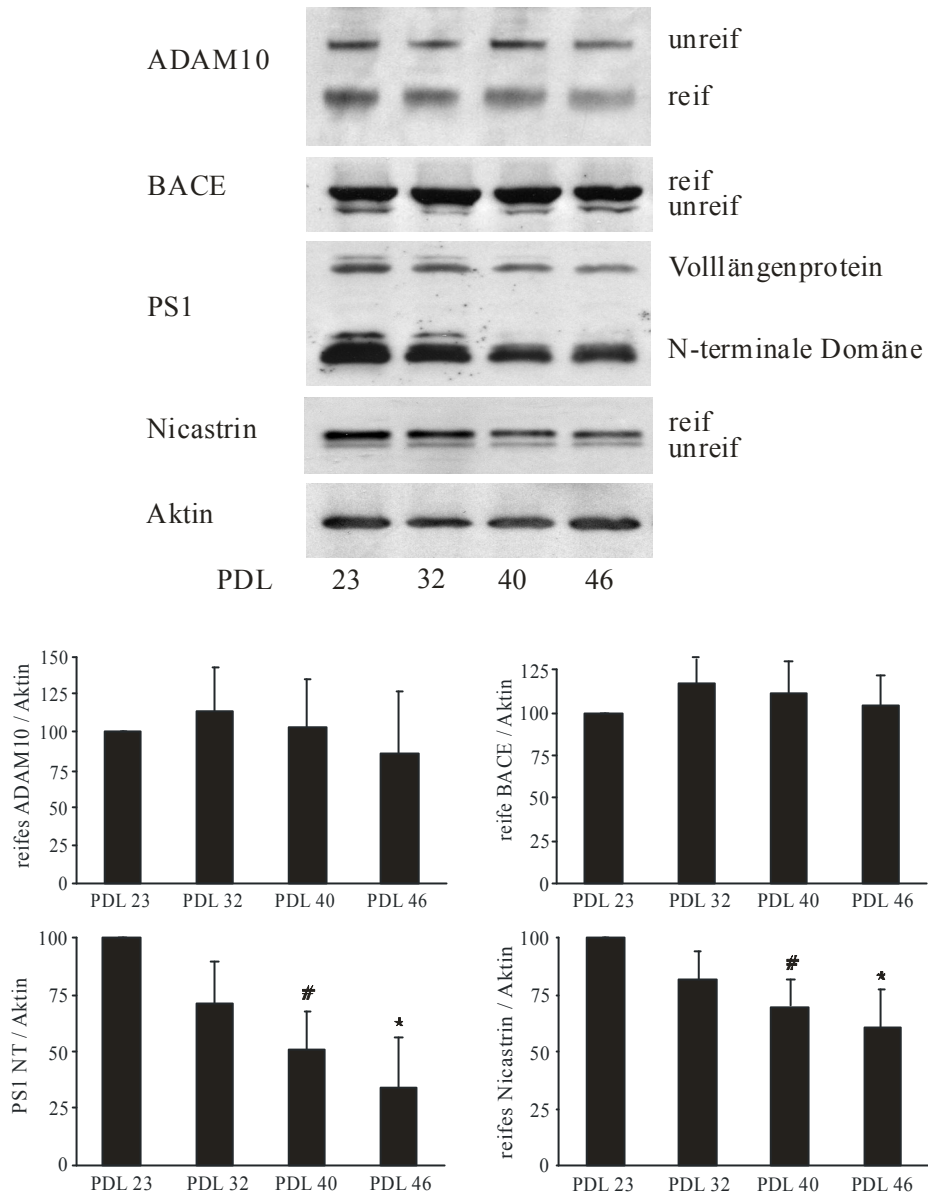


Abb. 3.14 Progressive Verringerung des γ -Sekretase-Proteinspiegels. 15 μ g Gesamtprotein von Zellen unterschiedlicher PDL wurden auf 12% PAA-Gelen aufgetrennt. Die Sekretasen wurden unter Verwendung spezifischer Antikörper detektiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Die graphischen Auswertungen wurden durch die optischen Bandenintensitäten ermittelt und als prozentuale Veränderung zu PDL 23 aufgetragen ([#]PDL 23 zu PDL 40; ^{*}PDL 23 zu PDL 46, $p < 0,05$, Tuckey Test, $n=3-4$)

Interessanterweise wurde dabei eine altersabhängige Reduktion der Proteinspiegel von PS1 und Nicastrin, beides Komponenten des γ -Sekretasekomplexes, ermittelt, wohingegen BACE- und ADAM10-Proteinspiegel keiner altersassoziierten Regulation unterworfen waren (Abb. 3.14).

Presenilin wird endoproteolytisch gespalten und liegt im aktiven γ -Sekretasekomplex als N- und C-terminale Untereinheit vor. Im Verlauf der zellulären Alterung nahmen sowohl die Proteinniveaus des PS1-Volllängenproteins als auch die der N-terminalen Untereinheit progressiv ab. Das Verhältnis von Volllängenprotein zu N-terminaler Untereinheit war keiner altersabhängigen Veränderung unterzogen (ohne Abbildung). Somit war die Reifung von PS1 unverändert. Zusätzlich wurde eine progressive Verringerung des Nicastrin-Proteinspiegels nachgewiesen. Daraus resultierte, dass der Gesamtspiegel der γ -Sekretase im Zuge der zellulären Alterung reduziert wurde.

Der ADAM10-Proteinspiegel wies keine altersassoziierte Regulation auf. Die inaktive Proform wird durch Proprotein-Konvertasen geschnitten, woraus die proteolytisch aktive, reife Form resultiert (Anders *et al.*, 2001). Dieser Maturierungsprozess war durch die zelluläre Alterung unbeeinflusst. Ebenso wurde für den Proteinspiegel von BACE sowie die Reifung dieses Enzyms, die durch Furin-ähnliche Konvertasen vermittelt wird (Bennett *et al.*, 2000), keine altersabhängige Veränderung beobachtet.

3.2.5 Der Einfluss der altersassoziierten Disintegration von Lipid Rafts auf die Komponenten der APP-Prozessierung

Die reifen Formen von BACE, APP sowie des γ -Sekretasekomplexes sind in Lipid Rafts lokalisiert (Cordy *et al.*, 2003; Eehalt *et al.*, 2003; Kalvodova *et al.*, 2005; Riddell *et al.*, 2001; Vetrivel *et al.*, 2004; Wada *et al.*, 2003). Aufgrund der Beobachtung, dass die Prozessierung von APP altersabhängig verringert wird, sollte untersucht werden, in welcher Weise die Disintegration der Lipid Rafts in seneszenten Zellen die Lokalisation von APP und den Sekretasen und somit möglicherweise die Prozessierung von APP beeinflusst (Abb. 3.15).

In jungen Zellen wurden signifikante Spiegel maturer BACE, der N-terminalen Untereinheit von PS1 und reifem APP innerhalb der Lipid Raft Fraktion nachgewiesen. Die entsprechenden unreifen Formen beziehungsweise

Volllängenformen wurden ausschließlich in der Nicht-Raft Fraktion der Membran beobachtet.

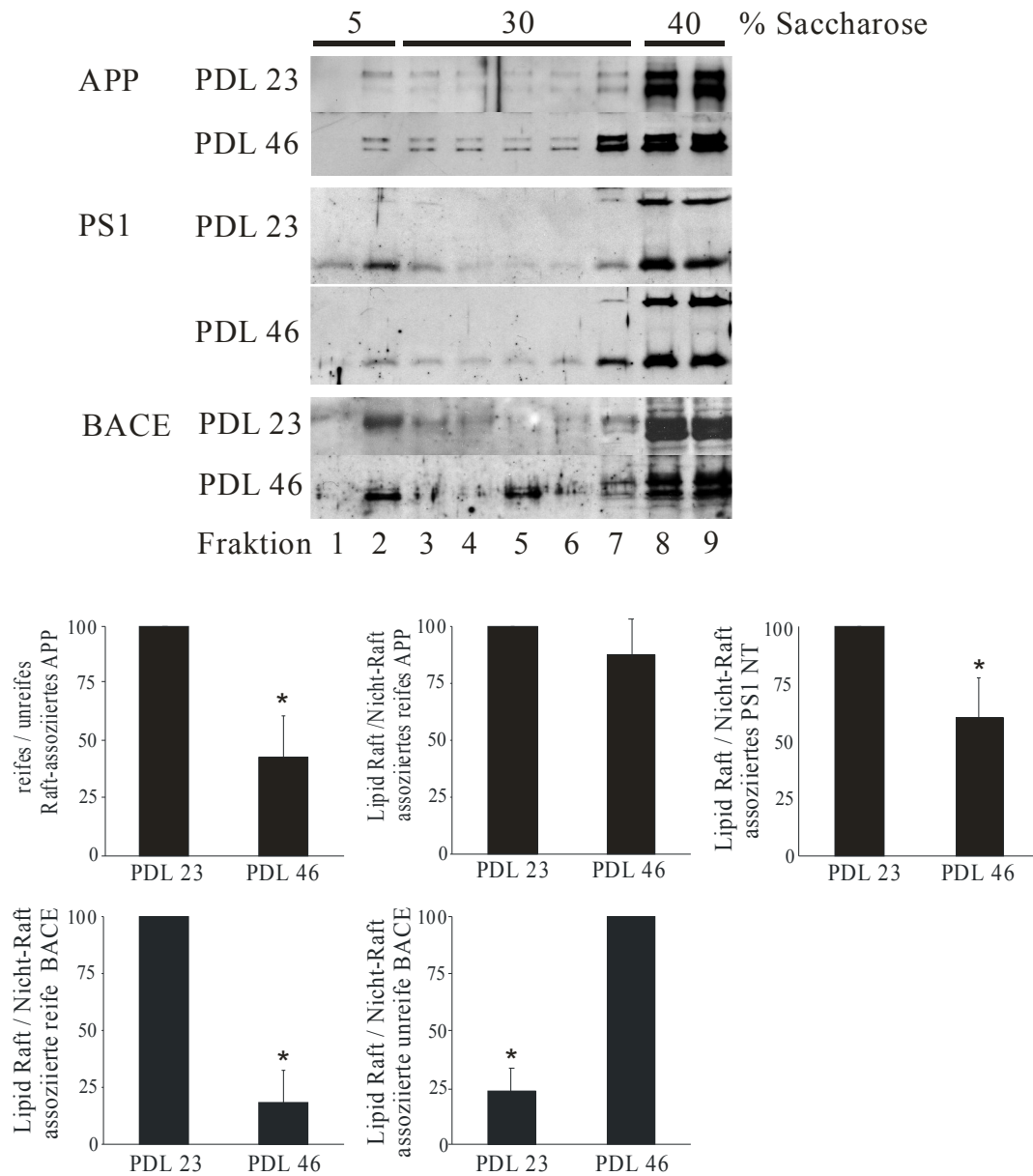


Abb. 3.15 Einfluss der altersrelevanten Disintegration von Lipid Rafts auf Komponenten der APP-Prozessierung. Lipid Rafts junger und seneszenter Fibroblasten wurden mittels Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation isoliert. Dabei akkumulierten sie in Fraktion 2. 30 μ l jeder Fraktion wurden auf 12% PAA-Gelen aufgetrennt. Die Proteine wurden unter Verwendung spezifischer Antikörper detektiert. Die graphische Auswertung erfolgte mittels der optischen Bandenintensitäten, wobei Fraktionen 1-3 als Lipid Raft Fraktionen und 7-9 als Nicht-Raft Fraktionen behandelt wurden (* $p < 0,05$, Tuckey Test, $n = 3-4$).

In seneszenten Zellen akkumulierte unreifes APP in der Lipid Raft Fraktion und die Assoziation der N-terminalen Untereinheit von PS1 mit den Lipid Rafts war signifikant reduziert. Somit spiegeln beide Proteine eine modifizierte strukturelle Integration der Lipid Rafts wider und zeigten eine veränderte oder verringerte

Lokalisation innerhalb der Membransubdomänen. Der Gesamtspiegel von Lipid Raft-assoziiierter BACE war durch die zelluläre Alterung nicht beeinflusst. Interessanterweise wurde aber in seneszenten Zellen das reife Enzym innerhalb der Lipid Raft Fraktion fast vollständig von der unreifen Form ersetzt. Daraus resultierten verringerte Spiegel von Lipid Raft-assoziiierter reifer β -Sekretase in seneszenten Zellen.

3.2.6 Altersassoziierte Erhöhung der enzymatischen β -Sekretaseaktivität und Reduktion der γ -Sekretaseaktivität

Aufgrund der beobachteten altersassoziierten Reduktion der APP-Prozessierung, die mit unveränderten β -Sekretase- und verringerten γ -Sekretasespiegeln verbunden war, wurden die enzymatischen Aktivitäten dieser Enzyme untersucht.

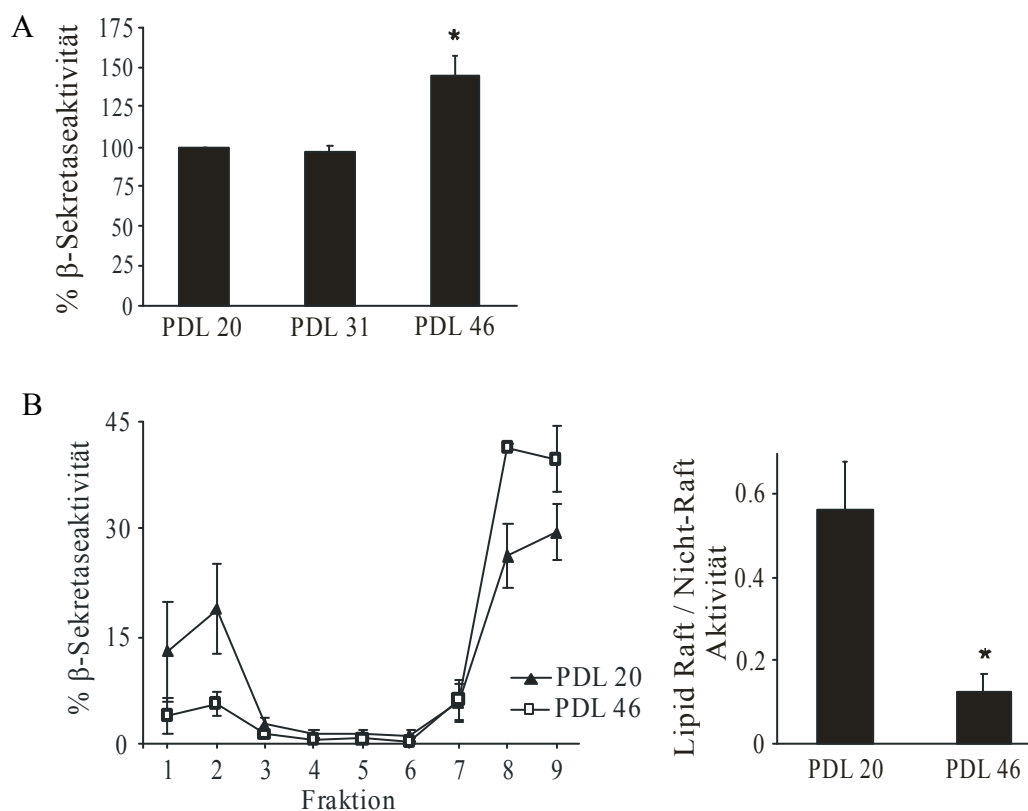


Abb. 3.16 Die enzymatische Aktivität der β -Sekretase ist in seneszenten Zellen erhöht und ist in der Nicht-Raft Fraktion lokalisiert. (A) Unter Verwendung des β -Sekretase-Aktivitätsassays wurde die enzymatische Aktivität der β -Sekretase in 25 μ g Zellysate ermittelt. (B) Für die Analyse der Lokalisation der β -Sekretaseaktivität innerhalb der Lipid Raft Isolationen wurden 50 μ l jeder Fraktion in den β -Sekretase-Aktivitätsassay eingesetzt. Für die graphische Auswertung wurden Fraktionen 1-3 als Lipid Raft Fraktionen und 7-9 als Nicht-Raft Fraktionen zusammengefasst (*, $p < 0,05$, Tuckey Test, $n = 3$)

Interessanterweise nahm die enzymatische Aktivität von BACE in gealterten Zellen im Vergleich zu jungen und mittelalten Kulturen um 44% zu (Abb. 3.16A). Weiterhin wurde durch die Untersuchung der enzymatischen Aktivität in den Fraktionen der Lipid Raft Isolationen gezeigt, dass sie im Zuge der Zellalterung aus den Lipid Raft Fraktionen in die Nicht-Raft Fraktionen migrierte (Abb. 3.16B). Somit konnte für die enzymatische Aktivität der β -Sekretase eine ständige Ko-Lokalisation mit der reifen Form des Enzyms nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der enzymatischen Aktivität des γ -Sekretasekomplexes demonstrierte eine progressive Verringerung der γ -Sekretaseaktivität (Abb. 3.17). Diese Reduktion entsprach der graduellen Abnahme der PS1- und Nicastrin-Proteinspiegel und reflektierte somit das insgesamt abnehmende Niveau der γ -Sekretase.

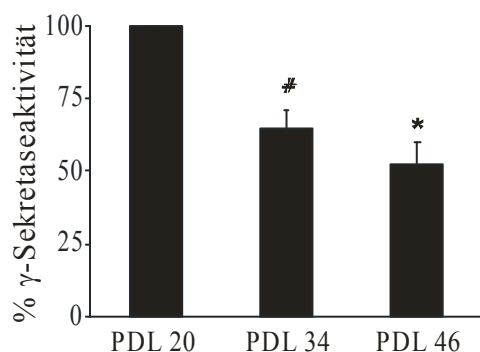


Abb. 3.17 Progressive Verringerung der γ -Sekretaseaktivität im Zuge der Zellalterung. Die enzymatische Aktivität der γ -Sekretase wurde in 25 μ g Gesamtzelllysate von Zellen unterschiedlicher PDL ermittelt. (#PDL 23 zu PDL 34; *PDL 20 zu PDL 46; $p < 0,05$, Tuckey Test, $n=3$)

Um zu untersuchen, ob die verringerte enzymatische Aktivität und die veränderte Assoziation der γ -Sekretase mit Lipid Rafts ausschließlich die Prozessierung von APP beeinträchtigt oder zusätzlich auch die Spaltung anderer Substrate, wurde die Prozessierung von Notch untersucht. Das C-terminale Notch-Fragment NEXT (*Notch Extracellular Truncation*) wird durch die γ -Sekretase gespalten, wobei intrazellulär das NICD-Fragment (*Notch Intracellular Domain*) entsteht (zur Übersicht siehe Abb. 3.18) (Selkoe und Kopan, 2003; Steiner und Haass, 2000).

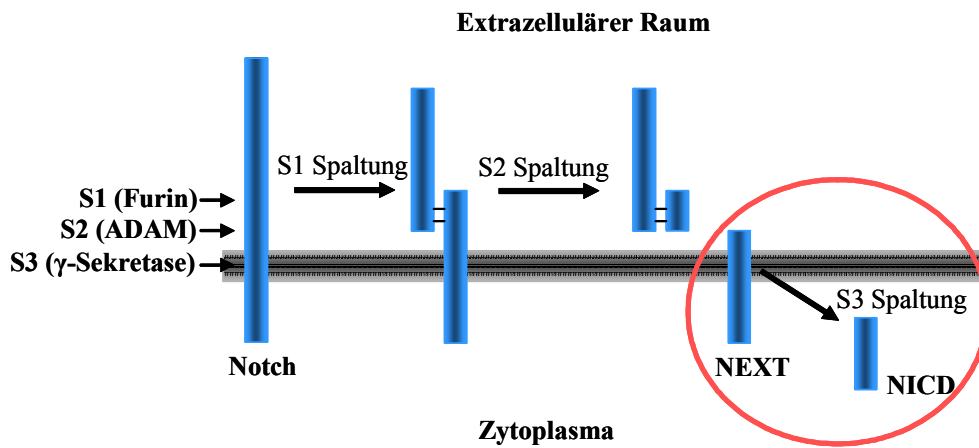


Abb. 3.18 Schematische Darstellung der Notch-Prozessierung. Notch wird durch drei unterschiedliche enzymatische Aktivitäten gespalten (S1-S3). Zunächst erfolgt eine Furin-Spaltung (S1 Spaltung), die im Zuge des sekretorischen Pfades zur Reifung des Proteins führt. An der Plasmamembran erfolgt die Spaltung von Notch durch eine α -Sekretase, woraus das Fragment NEXT resultiert (S2 Spaltung). Dieses wird daraufhin innerhalb der Membran durch den γ -Sekretasekomplex prozessiert, wobei das NICD gebildet wird (S3-Spaltung) Rotmarkiert: die Synthese von NICD aus NEXT, welche mittels *Western Blot Analyse* untersucht wurde, um die Aktivität der γ -Sekretase zu bestimmen. (verändert nach Steiner und Haass, 2000).

Die Generierung von NICD nahm im Zuge der Zellalterung progressiv ab, obwohl ebenso der NEXT-Proteinspiegel graduell reduziert wurde (Abb. 3.19). Dadurch wurde demonstriert, dass die reduzierte Aktivität der γ -Sekretase nicht Substratspezifisch ist, sondern mit APP und Notch zwei unabhängige Substrate betrifft.

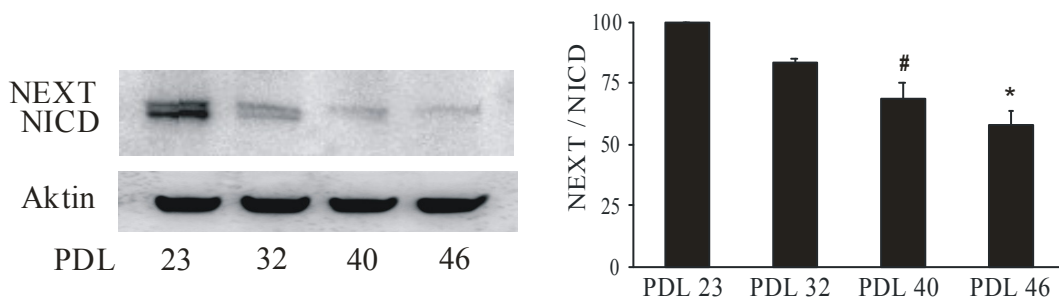


Abb. 3.19 Progressive Verringerung der Notch-Prozessierung im Zuge der Zellalterung. 15 μ g Gesamtprotein von Zellen unterschiedlicher PDL wurden auf einem 12% PAA-Gel aufgetrennt. Die Notch-Derivate wurden unter Verwendung eines Notch C-terminalen Antikörper detektiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Die graphische Auswertung wurde mittels der optischen Bandenintensitäten vollzogen und als prozentuale Veränderung zu PDL 23 dargestellt (#PDL 23 zu PDL 40; *PDL 23 zu PDL 46; $p < 0,05$, Tuckey Test, $n=3$)

3.3 C. elegans als Modellsystem der APP-Prozessierung

Im zellulären Altersmodell wurde eine progressive, altersassoziierte Abnahme der APP-Prozessierung beobachtet, die mit veränderten Enzymspiegeln und -aktivitäten einherging. Um diese Ergebnisse in einen Organismus zu übertragen, wurden transgene *C. elegans* Linien konstruiert, die humanes APP exprimieren.

C. elegans weist endogen mit APL-1 ein Ortholog zu APP auf (Daigle und Li, 1993). Dieses Protein zeigt strukturelle und funktionelle Parallelen zu APP, wobei APL-1 allerdings keine A β -Domäne besitzt. Mit SEL-12 und SUP-17 wurden Orthologe zu der γ - beziehungsweise der α -Sekretase im Wurm nachgewiesen (Levitan und Greenwald, 1995; Wen *et al.*, 1997). Ein Homolog zu BACE ist bisher nicht beschrieben. Die Expression von humanem APP in *C. elegans* wurde gewählt, da das Protein einerseits eine A β -Domäne aufweist und andererseits durch kommerzielle Antikörper die biochemische Analyse einer Prozessierung ermöglicht wird.

Die Experimente zu *C. elegans* wurden im Rahmen eines 6-monatigen Forschungsaufenthaltes an dem UTSW Medical Center, Dallas, USA in der *C. elegans* Arbeitsgruppe von Dr. R. L. durchgeführt (*Boehringer Ingelheim Exchange Program*). Mittelfristiges Ziel ist es, die an Zelllinien nachgewiesenen Befunde zur altersabhängigen APP-Prozessierung auf den *C. elegans*-Gesamtorganismus zu übertragen.

3.3.1 Konstruktion eines APP-exprimierenden Wurms

Die Strategie der Expression von APP in *C. elegans* sah vor, humane APP cDNA an den Promoter des *apl-1*-Gens zu fusionieren, wodurch die Expression des Transgens in Zellen gewährleistet werden sollte, in denen auch das endogene APL-1 vorliegt. Das Fusionsprodukt aus APP cDNA und dem *apl-1*-Promoter wurde anschließend in einen Vektor kloniert, der GFP und eine 3'UTR (3'-*untranslated region*) enthält. Die 3'UTR stammt von dem *unc-54*-Gen und wird häufig verwendet, da sich innerhalb dieser Region zahlreiche Expressions-regulierende Elemente befinden (Jan *et al.*, 1997).

Die genaue Lokalisation des *apl-1*-Promoters ist unbekannt, weshalb die gesamte Region 8 kb *upstream* des *apl-1*-Gens zur Klonierung gewählt wurde. Da mit gewisser Frequenz der Promoter auch in längeren Introns der 5'-Region des Gens vorkommen kann, wurde zusätzlich die Region bis zum 3'-Ende des zweiten *apl-1*-Introns an die humane APP cDNA angefügt (Abb. 3.20). In dem ersten Exon liegen intrazelluläre Transportsignale vor, wodurch zusätzlich der intrazelluläre Transport des humanen Proteins an die Plasmamembran ermöglicht werden sollte. Die putative Promoterregion wurde von genomischer DNA von *C. elegans* amplifiziert und die humane APP cDNA von einem Plasmid (zur Verfügung gestellt von S. J., AG Pietrzik, Uni Mainz). Mittels einer Fusions-PCR wurden beide Amplifikate miteinander ligiert und das Fusionsprodukt in den Vektor pRL1899 kloniert (Methode verändert nach Hobert, 2002).

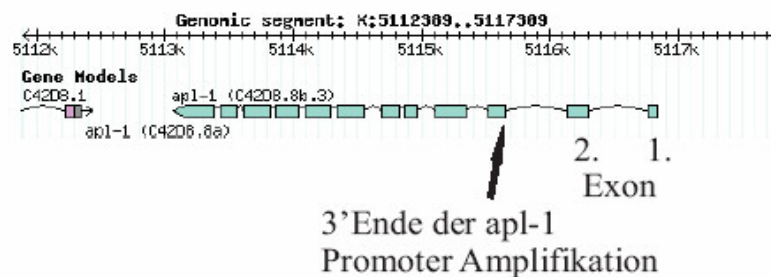


Abb. 3.20 Schematische Darstellung des *apl-1*-Gens. Gekennzeichnet sind die ersten beiden Exons, sowie das 3' Ende der *apl-1*-Promoter-Amplifikation. (verändert nach www.wormbase.org).

Die Transformation der Würmer erfolgte durch Koinjektion des $P_{apl-1}::hAPP::gfp$ -Plasmids (pRL1902) und des pDP#MM016-Plasmids (*unc-119 rescue*) in *unc-119* Würmer. Dies erlaubte die Selektion erfolgreich transformierter Würmer über den Phänotyp des Wildtyps.

3.3.2 Expressionsmuster von $P_{apl-1}::hAPP::gfp$

Die Analyse der hAPP::GFP-Expression erfolgte in vier transgenen Linien (Tx845; Tx846; Tx847; Tx848). Das beobachtete Expressionsmuster entsprach dabei der bekannten Expression von APL-1 (nach der Kollektion neuron-spezifischer Promotoren von Shawn Lockery; <http://chinook.uoregon.edu>): Die Expression war in allen Larvenstadien sowie im adulten Wurm zu beobachten. Die stärkste Expression

trat dabei in Neuronen der Kopf-, Vulva- und Schwanzregion, sowie den Motorneuronen der Chorda Ventralis auf (Abb. 3.21). Dies demonstriert, dass mit der gewählten Klonierungsstrategie der *apl-1*-Promoter komplett und erfolgreich transfiziert wurde.

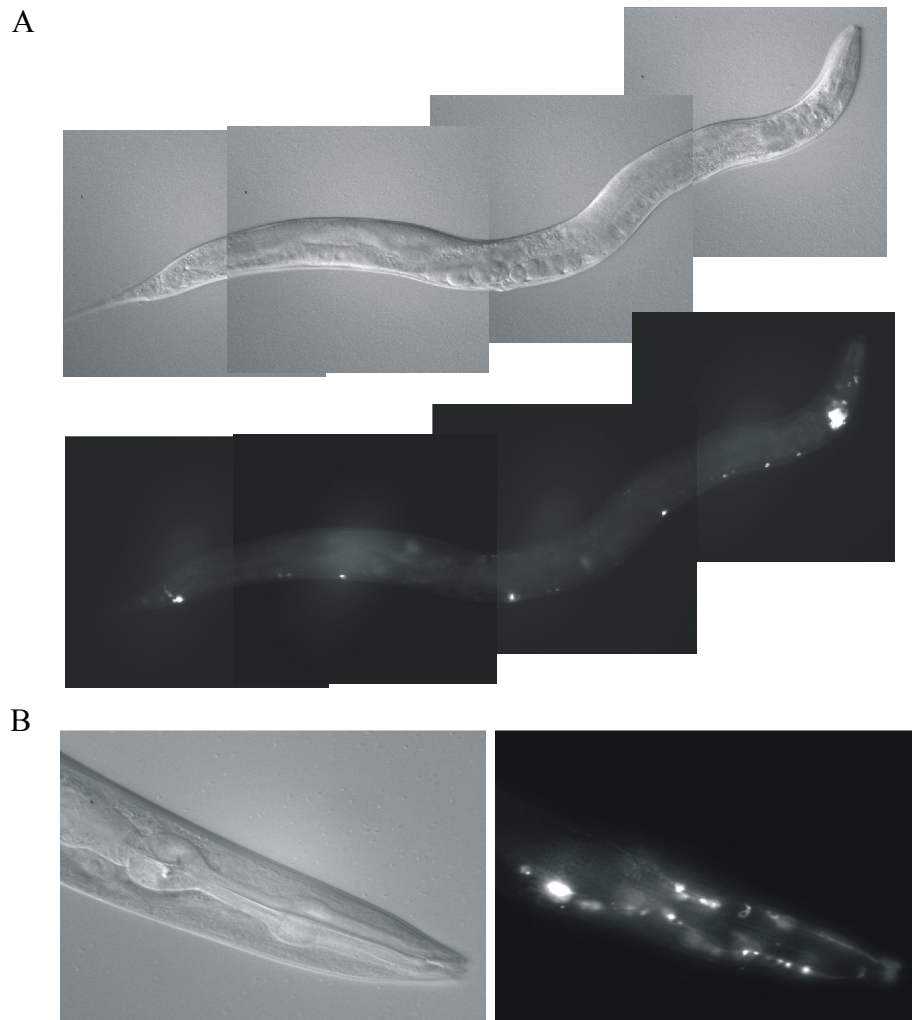


Abb. 3.21 Analyse der hAPP::GFP-Expression. (A) DIC- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines adulten transgenen Wurms. (B) DIC- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Kopfregion eines adulten transgenen Wurms.

3.3.3 Phänotypische Charakterisierung der transgenen Würmer

Die Expression von humanem APP in *C. elegans* führte zu auffälligen Phänotypen. Diese umfassten Eilegedefekte, eine reduzierte Fertilität und eine Verzögerung der post-embryonalen Entwicklung. Diese Phänotypen werden im Folgenden charakterisiert.

3.3.3.1 Eilegedefekt und reduzierte Fertilität

Interessanterweise wiesen die transgenen Würmer (~80-90%) einen generellen Eilegedefekt auf, der durch die Akkumulation reifer Eier innerhalb der Hermaphroditen deutlich wurde (Abb. 3.22). Dies hatte zur Folge, dass zusätzlich, mit vergleichsweise niedriger Frequenz, der so genannte „*Bag of Worms*“-Phänotyp auftrat (~3-6% der adulten Hermaphroditen). Bei diesem letalen Phänotyp schlüpfen die Nachkommen als eine direkte Folge des Eilegedefekts innerhalb der Mutter. Des Weiteren war die Mobilität adulter transgener Würmer eingeschränkt, woraus eine träge Fortbewegung resultierte. Dies kann auf die Akkumulation der Eier innerhalb der Hermaphroditen zurückgeführt werden und könnte somit ebenfalls eine Folge des Eilegedefekts darstellen.



Abb. 3.22 Akkumulation von Eiern innerhalb der transgenen Würmer. Stereomikroskopische Aufnahme eines 10 Tage alten transgenen Wurms. Die Anreicherung von Eiern in den Gonaden wird deutlich.

Weiterhin wurde beobachtet, dass die transgenen Würmer eine geringere Gesamtzahl von Nachkommen aufwiesen (Abb. 3.23). Zur Untersuchung der Nachkommenzahl pro Hermaphrodit wurden 20-30 Würmer vereinzelt und täglich die Zahl der Nachkommen ermittelt. Dabei wurden etwa 270 Nachkommen pro Hermaphrodit für den N2 Wildtyp bestimmt (Literaturwert ~300 Nachkommen/Wurm nach Hodgkin, 1988) und circa 100 Nachkommen für die transgenen Würmer. Die Fertilität der transgenen Würmer war somit signifikant reduziert.

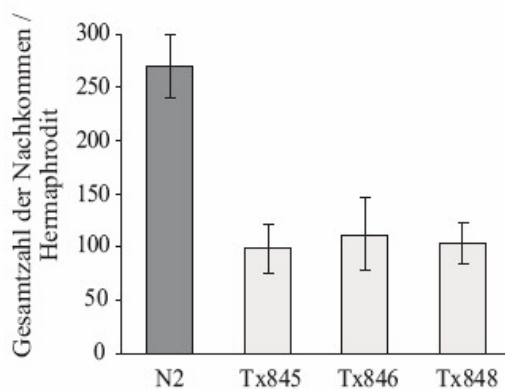


Abb. 3.23 Reduzierte Anzahl von Nachkommen in den transgenen Linien. Die Zahl der geschlüpften Nachkommen wurden über einen Zeitraum von 8 Tagen für 20-30 Hermaphroditen pro Linie bestimmt. Als Kontrolle diente der N2 Wildtyp.

3.3.3.2 Verzögerung der post-embryonalen Entwicklung transgener Würmer

Neben einer reduzierten Fertilität der transgenen Würmer wurden Einflüsse auf die post-embryonale Entwicklung beobachtet. Etwa 5-8% der transgenen Würmer wiesen einen Wachstumsarrest im L1-L3 Stadium der post-embryonalen Entwicklung auf. Für das Fortschreiten der Larvalentwicklung ist die Nahrungsaufnahme entscheidend. Nahrungs-depletierte Würmer verbleiben in frühen Larvenstadien (L1-L2) und bilden nach einer gewissen Zeit Dauerlarven aus. Die Dauerformation der hAPP::GFP-exprimierenden Würmer war durch die Expression des Transgens unbeeinflusst.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass die transgenen Würmer insgesamt einen längeren Zeitraum benötigten, um die post-embryonale Entwicklung abzuschließen (Abb. 3.24). Bei 20 °C benötigt der Wildtyp ~3 Tage für diesen Prozess, wohingegen für die transgenen Würmer ein Zeitraum von bis zu 7 Tagen beobachtet wurde.

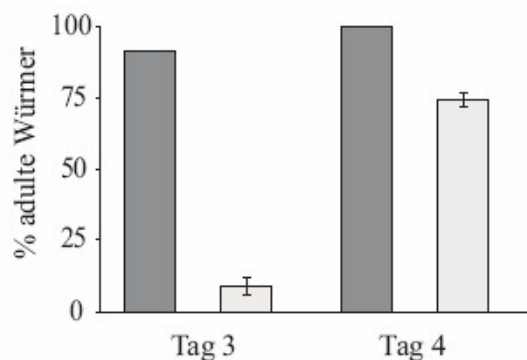


Abb. 3.24 Verzögerte post-embryonale Entwicklung der transgenen Würmer. Zur Untersuchung der post-embryonalen Entwicklung wurden 20-30 transgene Würmer und der N2 Wildtyp im L1 Larvenstadium vereinzelt und der benötigte Zeitraum bis zum adulten Stadium ermittelt. Dunkle Balken = N2 Wildtyp; Helle Balken = transgene Linien

3.3.4 Biochemische Untersuchung der Prozessierung von humanem APP in transgenen Wümmern

Nach erfolgreicher Transformation von *C. elegans* mit dem P_{ap1-1}::hAPP::gfp Konstrukt sollte nachgewiesen werden, ob humanes APP von den endogenen Sekretasen prozessiert wird. Dafür wurden Mischkulturen der verschiedenen Linien lysiert und mittels *Western Blot Analyse* unter Verwendung eines C-terminalen humanen APP-Antikörpers untersucht. Tabelle 1 fasst die Molekulargewichte der erwarteten Spaltfragmente zusammen.

	Molekulargewicht
hAPP::GFP	~140 kDa
C99::GFP	~ 41 kDa
C83::GFP	~ 38 kDa
AICD::GFP	~ 34 kDa

Tab. 1 Molekulargewichte potentieller hAPP::GFP-Spaltprodukte

Interessanterweise wurden dabei Banden bei den erwarteten Molekulargewichten nachgewiesen (Abb. 3.25). Somit wird humanes APP möglicherweise durch die endogenen Sekretasen des Wurms spezifisch geschnitten. Allerdings traten weitere Banden auf, die zusätzlich auf eine unspezifische Spaltung schließen lassen.

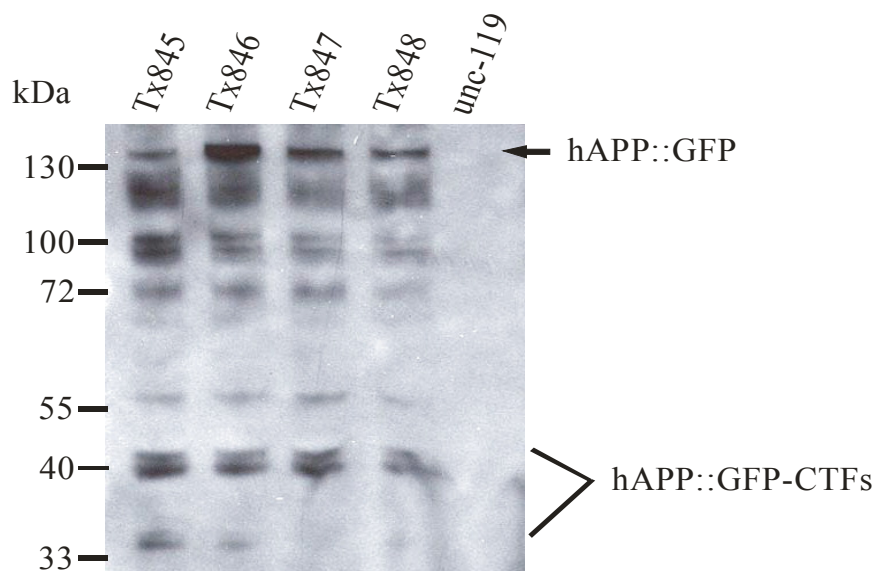


Abb. 3.25 Prozessierung von hAPP::GFP in *C. elegans*. 15 µg Gesamtprotein der transgenen Linien wurden auf einem 4-12% PAA-Gradientengel aufgetrennt. Die APP-Derivate wurden mit dem C-terminalen humanen APP-Antikörper CT-15 detektiert. Als Negativkontrolle wurde Gesamtprotein von untransformierten *unc-119* Würmern eingesetzt.

Ferner wurden *Western Blot Analyses* mit einem N-terminalen humanem APP- sowie einem GFP-Antikörper unternommen, die einen starken unspezifischen Hintergrund aufwiesen und keine Zuordnung spezifischer APP-Spaltprodukte zuließen. Somit sind die biochemischen Analysen bislang preliminär und müssen durch zukünftige Untersuchungen unterstützt werden.

4. Diskussion

Die Prozessierung von APP ist ein möglicherweise zentraler Prozess der altersabhängigen Alzheimer Krankheit, wobei der Einfluss der zellulären Alterung auf die Biochemie der Prozessierung bislang ungeklärt ist. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, in welcher Weise die Prozessierung von endogenem APP im Verlauf der replikativen Seneszenz modifiziert wird und welche zellulären Faktoren für diese Veränderung verantwortlich sind. Darüber hinaus können durch die Untersuchung altersrelevanter Veränderungen dieses komplexen biochemischen Vorganges eventuell zelluläre Modifikationen aufgeklärt werden, die neue Einblicke in zelluläre Altersmechanismen erlauben. Die Untersuchungen wurden mit humanen Fibroblasten als ein etabliertes, zelluläres Altersmodell durchgeführt und sollen in transgenen *C. elegans*, die humanes APP exprimieren, weitergeführt werden. In dem zellulären Alterungsmodell wurde eine altersabhängige Reduktion der APP-Reifungseffizienz sowie eine progressive Verringerung der APP-Prozessierung aufgeklärt. Diese altersassoziierte Regulation und die an diesen Veränderungen beteiligten Faktoren sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

4.1 Untersuchung der endogenen APP-Prozessierung in humanen Fibroblasten als zelluläres Altersmodell

Die Prozessierung von APP wurde aufgrund der vorgeschlagenen engen Verknüpfung mit der Alzheimer Krankheit intensiv erforscht. Dabei wurden neben den verantwortlichen Sekretasen zahlreiche regulative Mechanismen aufgeklärt, wobei zelluläre Faktoren, die diesen Prozess im Zuge der Zellalterung beeinflussen, bisher nicht untersucht wurden (zur Übersicht Selkoe, 2001).

Zur Untersuchung altersassoziiierter Veränderungen der APP Biochemie wurden in der vorliegenden Arbeit replikativ alternde humane Fibroblasten gewählt. Dieses Alterungsmodell stellt ein etabliertes Modellsystem der zellulären Altersforschung dar (Hayflick und Moorhead, 1961) (siehe 1.5). Die Kultivierung und serielle Passage der humanen Fibroblasten resultierte in seneszenten Zellen. Dieser Alterungsprozess war durch eine Verlangsamung und letztendlich durch einen Stopp der Proliferation und einen irreversiblen Eintritt der Zellen in die G₀-Phase gekennzeichnet. Neben der

veränderten zellulären Morphologie wiesen die gealterten, aber metabolisch aktiven Fibroblasten eine erhöhte β -Galaktosidaseaktivität bei pH 6 und erhöhte Proteinspiegel für Caveolin-1 und p21^{Waf1/Cip1} auf. Wie von Atamna *et al.* beschrieben, wird der seneszente Phänotyp durch Verwendung des Wachstumsfaktor-defizienten Mediums nicht beeinflusst, sondern die Alterung lediglich beschleunigt (Atamna *et al.*, 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Seneszenz beschleunigt induziert. Anstelle der üblichen ~58 PDLs (Coriell Institut for Medical Research, Camden, USA) unterliefen die IMR-90 Fibroblasten 46 PDLs, bis sie den seneszenten Phänotyp aufwiesen.

Die Prozessierung von APP ist ein konstitutiver Prozess, der außer in neuronalen Zellen in nahezu allen bisher untersuchten Zelltypen beobachtet wurde. Somit liegen APP sowie die APP-prozessierenden Sekretasen in Fibroblasten endogen vor. Die Analyse der APP-Prozessierung auf endogener Ebene hat gegenüber den häufig verwendeten klonalen, APP-überexprimierenden Systemen den Vorteil, dass regulative Mechanismen durch eine potentielle Übersättigung mit Substrat nicht verfälscht werden. Ein Nachteil ist allerdings, dass die Synthese von A β , aufgrund der niedrigen Spiegel des Peptids, nicht quantifiziert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche altersassoziierte Faktoren identifiziert, die Einfluss auf die Biochemie der APP-Prozessierung nehmen. Diese umfassten eine selektiv veränderte Proteinreifungseffizienz, wie für die APP-Maturierung gezeigt, einen veränderten Lipid-Stoffwechsel mit einer veränderten Membrankonstitution, wie für Cholesterol und Lipid Rafts nachgewiesen, und altersassoziierte Regulationen der Proteinspiegel und Aktivitäten der Sekretasen.

4.1.1 Die Auswirkung zellulärer Alterung auf die Reifung von APP

APP ist ein Typ-I-Transmembranprotein, das im sekretorischen Pfad an die Zellmembran gelangt und dabei durch zahlreiche post-translationale Modifikationen reift. Nach Translokation ins Endoplasmatische Retikulum (ER) wird APP N-glykosyliert und darauf im Golgi-Apparat O-glykosyliert, sulfatiert und phosphoryliert (Oltersdorf *et al.*, 1990; Pahlsson *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1997; Weidemann *et al.*, 1989). Immatures APP, das bereits N-glykosyliert ist, verbleibt innerhalb der Zelle vermutlich im ER/Golgi Kompartiment und gelangt nicht an die

Plasmamembran (Tamboli *et al.*, 2005; Tomita *et al.*, 1998). Die sekretorische Spaltung von APP erfolgt in post-Golgi und endozytotischen Kompartimenten, was zur Folge hat, dass unreifes APP nicht prozessiert wird (Tamboli *et al.*, 2005).

Interessanterweise wurde beobachtet, dass in seneszenten Zellen die Effizienz der APP-Reifung reduziert wird, woraus signifikant verringerte Spiegel des reifen APP resultierten. Dabei war die Genexpression von APP unverändert. Trotz der reduzierten Effizienz der APP-Maturierung bei gleichbleibender Expressionsrate wurden unveränderte Spiegel von unreifem APP beobachtet. Durch die Untersuchungen des APP-Metabolismus wurde ein beschleunigter Abbau von unreifem sowie reifem APP, beispielsweise durch das Proteasom, ausgeschlossen. Dies wurde weiterhin durch die Inhibition des Proteasoms mittels Laktacystin bestätigt, wodurch keine verstärkte Akkumulation von unreifem APP in seneszenten Zellen im Vergleich zu jungen Zellen beobachtet wurde (ohne Abbildung). Auf welcher Ebene der APP-Proteinspiegel, neben der sekretorischen Spaltung durch die Sekretasen und der proteasomalen Degradation, zusätzlich reguliert wird, ist unbekannt und soll in zukünftigen Studien untersucht werden.

Durch Depletion der altersassoziiert erhöhten intrazellulären Cholesterolspiegel wurde die Reifung von APP nahezu auf das Niveau junger Zellen regeneriert. Somit wurde gezeigt, dass Cholesterole direkt die Reifung von APP in seneszenten Zellen beeinflusst. Unter Verwendung primärer neuronaler und glialer Zellkulturen wurde durch Galbete *et al.* demonstriert, dass erhöhte Cholesterolspiegel die APP-Maturierung durch Inhibition der Glykosylierung im Golgi-Apparat stören (Galbete *et al.*, 2000). Daher wird vermutet, dass auch das erhöhte Cholesterolniveau in seneszenten Zellen auf Ebene der Glykosylierungsmechanismen die Reifung von APP im Golgi-Apparat behindert, und zu der beobachteten signifikanten Reduktion der Maturierungseffizienz führt.

Neben Cholesterole wurde ebenfalls für Glykosphingolipide gezeigt, dass sie die Reifung von APP inhibieren, indem sie den Transport von Proteinen auf dem sekretorischen Pfad beeinflussen (Tamboli *et al.*, 2005). Glykosphingolipide wirken dabei selektiv, da der Transport distinkter Proteine durch sie beeinflusst wird (Sprong *et al.*, 2001). Interessanterweise wurde eine altersassoziierte Beeinflussung der

Proteinreifung ausschließlich für APP beobachtet, wohingegen die Sekretasen nicht betroffen waren. Diese Selektivität unterstreicht einen möglichen zusätzlichen Einfluss der Glykosphingolipide auf die Reifung von APP in seneszenten Zellen. Daher scheint der veränderte Lipid-Metabolismus seneszenter Zellen insgesamt die APP-Maturierung zu beeinflussen, wohingegen allgemeine Mechanismen der Proteinreifung im Zuge der Zellalterung nicht reguliert sind. Interessantweise wurde ein Einfluss von Cholesterol oder Glykosphingolipiden auf die Reifung von APP bisher ausschließlich in Studien mit endogenem APP beobachtet (Borroni *et al.*, 2003; Galbete *et al.*, 2000; Tamboli *et al.*, 2005). Durch die Überexpression von APP scheinen diese regulativen Einflüsse gestört zu sein.

Mit der Reduktion der APP-Reifungseffizienz in seneszenten Zellen sind verringerte Substratspiegel verbunden, woraus eine reduzierte Prozessierung von APP resultiert. Interessanterweise wurde auch in Kulturen mittleren Alters (PDL 32 und PDL 40), im Vergleich zu jungen Fibroblasten, eine verringerte Prozessierung von APP nachgewiesen, ohne dass in diesen Kulturen die Reifungseffizienz beeinträchtigt war. Dies unterstreicht, dass die progressive Verringerung der Prozessierung von APP nicht allein durch reduzierte Spiegel von reifem Substrat bewirkt wird, sondern dass regulative Mechanismen der APP-Spaltung im Zuge der Zellalterung graduell verändert werden und die Prozessierung beeinflussen.

4.1.2 Die Auswirkung zellulärer Alterung auf die Proteinspiegel und Aktivitäten der Sekretasen

Die progressive Abnahme der APP-Prozessierung war mit einer altersabhängigen Verringerung der Proteinspiegel von Komponenten des γ -Sekretasekomplexes sowie einer reduzierten enzymatischen Aktivität der γ -Sekretase verbunden. Dagegen wiesen die Proteinniveaus von BACE und ADAM10 keine Regulation auf. Interessanterweise war aber die enzymatische Aktivität der β -Sekretase in seneszenten Zellen erhöht. Der Einfluss der zellulären Alterung auf die Sekretasen wird im Folgenden diskutiert.

4.1.2.1 α -Sekretase

Eine α -Sekretase, ADAM10, ist ein Typ-I-Transmembranprotein, das auf dem sekretorischen Weg und an der Plasmamembran aktiv ist (Chyung und Selkoe, 2003). In der enzymatisch inaktiven Form weist ADAM10 eine N-terminale Propeptidomäne auf, die durch eine sekretorische Proprotein-Konvertase entfernt wird (Anders *et al.*, 2001; Endres *et al.*, 2003). Sowohl die Gesamtproteinspiegel als auch die Maturierung von ADAM10 waren keiner signifikanten altersassoziierten Veränderung unterzogen. Im Verlauf der Zellalterung wurde eine progressiv abnehmende α -sekretorische Spaltung von APP beobachtet, die in geringeren C83-Spiegeln resultierte. Eine reduzierte Prozessierung von APP durch ADAM10 erfolgt normalerweise zu Gunsten der β -Sekretase-vermittelten Spaltung und verursacht somit eine verstärkte Bildung von C99 und A β (Postina *et al.*, 2004). Interessanterweise wurden hier altersabhängig reduzierte Spiegel von C83 und C99 nachgewiesen. Dies demonstriert, dass sowohl der α - als auch der β -sekretorische Weg der APP-Prozessierung im Zuge der Zellalterung progressiv reduziert werden.

Im Allgemeinen ist ADAM10 konstitutiv aktiv, wird aber durch unterschiedliche Kinasen, wie der Proteinkinase C oder der MAP (*mitogen activated protein*)-Kinase, zusätzlich stimuliert (Mills und Reiner, 1999). Worin die geringere α -sekretorische Spaltung von APP im Zuge der Zellalterung begründet ist, wurde nicht untersucht und soll in zukünftigen Studien verfolgt werden. Als mögliche Faktoren könnten eine veränderte Membranfluidität sowie Kinaseaktivität verantwortlich sein. Von beiden ist bekannt, dass sie die α -Sekretaseaktivität unmittelbar beeinflussen und altersassoziiert verändert sind (Cohen und Zubenko, 1985; Cristofalo *et al.*, 2004).

4.1.2.2 β -Sekretase

Die β -Sekretase ist eine Aspartyl-Protease und Ausgangspunkt der amyloidogenen Prozessierung von APP. Die Aktivität von BACE konnte in allen Zell- und Gewebetypen nachgewiesen werden (Haass *et al.*, 1992). Das Enzym wird somit ubiquitär exprimiert, mit einer besonders hohen Expression und Aktivität in neuronalen Zellen (Vassar *et al.*, 1999). Subzellulär wurde die β -Sekretaseaktivität in leicht sauren Kompartimenten wie dem Trans-Golgi-Netzwerk und den Endosomen nachgewiesen (Huse *et al.*, 2000; Vassar *et al.*, 1999). In diesen Kompartimenten erfolgt auch die amyloidogene Spaltung von APP. BACE ist mit Lipid Rafts assoziiert

und stellt als Typ-I-Transmembranprotein die erste beschriebene Aspartyl-Protease dar, die über eine Transmembranregion verfügt (Cordy *et al.*, 2003; Vassar *et al.*, 1999). Das Enzym wird als Vorläuferprotein mit einer N-terminalen Propeptidomäne synthetisiert und im Zuge seiner Reifung N-glykosyliert (Huse *et al.*, 2000; Vassar *et al.*, 1999).

Der Proteinspiegel und die Maturierung von BACE waren im Zuge der zellulären Alterung unverändert. Allerdings wurde eine veränderte Assoziation mit Lipid Rafts nachgewiesen. Im Zuge der altersassoziierten Disintegration der Lipid Rafts migrierte reife BACE aus den Lipid Rafts, wohingegen die unreife Form des Enzyms in den Lipid Rafts seneszenten Zellen akkumulierte. Diese veränderte Lipid Raft-Assoziation war mit einer Migration der enzymatischen Aktivität in die Nicht-Raft Fraktion der Membran gealterter Zellen verbunden. Somit ko-lokalisierte die enzymatische Aktivität ständig mit der reifen Form des Enzyms. Interessanterweise wurde in BACE-überexprimierenden Zellen gezeigt, dass schon die unreife Form enzymatisch aktiv ist (Benjannet *et al.*, 2001), was im Widerspruch zu anderen Aspartyl-Proteasen steht (Tang und Wong, 1987). Die ständige Ko-Lokalisation der enzymatischen Aktivität mit der reifen Form des Enzyms demonstriert, dass die vollständige Reifung des Enzyms auf endogener Ebene für die proteolytische Aktivität notwendig ist.

Interessanterweise war die enzymatische Aktivität von BACE in seneszenten Zellen im Vergleich zu jungen Kulturen sowie Kulturen mittleren Alters signifikant erhöht. Eine erhöhte enzymatische Aktivität bei unveränderter Expression wurde auch im Gehirn gealterter Menschen, Mäuse und Affen nachgewiesen (Fukumoto *et al.*, 2004). Die BACE-Aktivität ist bei leicht saurem pH optimal, weswegen die Lokalisation in sauren endosomalen und lysosomalen Kompartimenten die enzymatische Aktivität reguliert (Huse *et al.*, 2000). Durch den verwendeten Aktivitätsassay wird das Enzym aus den Zellen isoliert, weshalb Veränderungen der enzymatischen Aktivität nicht über eine subzelluläre Verteilung erklärt werden können. Die erhöhte enzymatische Aktivität in seneszenten Zellen muss daher auf direkten post-translationalen oder allosterischen Modifikationen des Enzyms beruhen. Kürzlich wurde eine Kupfer-Bindungsstelle in der C-terminalen Domäne von BACE nachgewiesen, die eine Kupfer-vermittelte Veränderung der enzymatischen Aktivität nahelegt (Angeletti *et al.*, 2005). Weiterhin wird BACE phosphoryliert, glykosyliert und palmitoyliert

(Capell *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 2001). Mögliche Auswirkungen dieser Modifikationen auf die enzymatische Aktivität sind bislang ungeklärt.

In seneszenten Zellen wurden trotz der erhöhten enzymatischen Aktivität von BACE deutlich reduzierte Spiegel von C99 nachgewiesen. Somit ist das Potential der β -Sekretase zur APP-Spaltung in seneszenten Zellen reduziert. Die Auswirkung der verstärkten enzymatischen Aktivität von BACE und der veränderten Assoziation mit Lipid Rafts auf die Prozessierung von APP wird unter Punkt 4.1.3 diskutiert.

4.1.2.3 γ -Sekretase

Die γ -Sekretase prozessiert die durch α - oder β -sekretorische Spaltung entstandenen APP-CTFs, wobei intrazellulär das AICD resultiert. Damit ist die Aktivität der γ -Sekretase nach der β -Sekretase der zweite notwendige Schritt für die Synthese von A β . Bei der proteolytisch aktiven γ -Sekretase handelt es sich um einen hochmolekularen Proteinkomplex, der neben der katalytisch aktiven Untereinheit, Presenilin-1 oder -2, drei weiteren Ko-Faktoren aufweist: Nicastrin, APH-1 und PEN-2 (Francis *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002b; Yu *et al.*, 2000). Für die Aktivität des Komplexes sind alle vier Komponenten notwendig, wobei Presenilin endoproteolytisch gespalten wird und im aktiven Komplex als C- und N-terminale Untereinheit vorliegt (Haass, 2004; Levitan *et al.*, 2001). Vor allem Nicastrin ist für die Stabilität des Komplexes und der PS1-Untereinheiten verantwortlich (Zhang *et al.*, 2005).

Interessanterweise wurde eine progressive Verringerung der Proteinniveaus für das PS1-Volllängenprotein, der N-terminalen PS1-Untereinheit sowie für Nicastrin nachgewiesen. Somit wurde der Gesamtspiegel der γ -Sekretase im Zuge der Zellalterung graduell reduziert. Möglicherweise wirken die progressiv reduzierten Nicastrinspiegel destabilisierend und verursachen eine beschleunigte proteasomale Degradation von PS1. Dieser potentielle Zusammenhang soll in zukünftigen Studien geklärt werden.

Die geringeren γ -Sekretasespiegel gingen mit einer graduellen Reduktion der enzymatischen Aktivität des Komplexes einher. Dies demonstriert, dass die tatsächliche enzymatische Aktivität des Komplexes vermutlich unverändert war und

die Abnahme lediglich auf der Verringerung des Gesamtproteinspiegels des Komplexes beruht.

Die Reduktion der enzymatischen Aktivität führt unmittelbar zu einer verringerten APP-Prozessierung durch die γ -Sekretase. Dies wurde durch die rasche Abnahme des AICD-Niveaus deutlich. Zusätzlich kann dadurch ausgeschlossen werden, dass die reduzierten Spiegel von C83 und C99 durch eine verstärkte Prozessierung mittels der γ -Sekretase bewirkt wurden. Die altersassoziierte Reduktion der APP-Prozessierung umfasst somit alle drei beteiligten Sekretasen.

Zusätzlich zu dem progressiv abnehmenden Gesamtspiegel der γ -Sekretase und der verringerten enzymatischen Aktivität, war die Assoziation des Komplexes mit Lipid Rafts in seneszenten Zellen signifikant verringert. Dies spiegelt die strukturelle Disintegration der Membransubdomänen in seneszenten Zellen wider. Die Lokalisation der γ -Sekretase innerhalb dieser Membrandomänen ist eine Voraussetzung für ihre APP-CTF-proteolytische Aktivität, wobei die Sensitivität des Komplexes gegenüber veränderten Cholesterolniveaus und der Lipid Raft Integrität nicht eindeutig ist (Vetrivel et al., 2004; Vetrivel und Thinakaran, 2005; Wada *et al.*, 2003). Die veränderte Assoziation der γ -Sekretase mit Lipid Rafts könnte somit, zusätzlich zu der verringerten enzymatischen Gesamtaktivität des Komplexes, zu einer reduzierten Prozessierung der α - und β -CTFs führen.

Der γ -Sekretasekomplex weist neben APP zahlreiche weitere Substrate auf, die alle Typ-I-Transmembranproteine darstellen (zur Übersicht Brunkan und Goate, 2005). Dazu gehören unter anderem die APP-Homologe APLP (Walsh *et al.*, 2003), die Notch-Rezeptoren (De Strooper *et al.*, 1999), der Rezeptor CD44 (Murakami *et al.*, 2003a), die Rezeptor-Tyrosin-Kinase ErbB4 (Lee *et al.*, 2002a), E- und N-Cadherin (Marambaud *et al.*, 2002; Marambaud *et al.*, 2003) und das *Low-density lipoprotein receptor related protein* (May *et al.*, 2002). Interessanterweise sind einige dieser Substrate nicht mit Lipid Rafts assoziiert und werden außerhalb der Lipid Rafts von der γ -Sekretase gespalten (Vetrivel *et al.*, 2005). Um einerseits auszuschließen, dass die reduzierte Prozessierung von APP substratspezifisch war und andererseits, dass durch die veränderte Lipid Raft-Assoziation der γ -Sekretase in seneszenten Zellen andere Substrate vermehrt prozessiert wurden, wurde die Spaltung von Notch

untersucht, die unabhängig von Lipid Rafts erfolgt (Vetrivel *et al.*, 2005). Aus dieser Spaltung geht das NICD hervor, dessen Bildung im Zuge der Zellalterung progressiv verringert wurde und dabei die Abnahme der AICD-Spiegel reflektierte. Dies demonstriert, dass die Reduktion der γ -Sekretaseaktivität mindestens zwei unabhängige Substrate umfasst, somit nicht Substrat-spezifisch ist, und die sekretorische Spaltung durch die γ -Sekretase im Zuge der zellulären Alterung generell abnimmt.

Von den drei Sekretasen sind die Substrate des γ -Sekretasekomplexes am besten charakterisiert. ADAM10 ist neben der APP-Spaltung unter anderem an der Prozessierung von Notch (Hartmann *et al.*, 2002), Delta (LaVoie and Selkoe, 2003) und E-Cadherin (Maretzky *et al.*, 2005) beteiligt. Für BACE sind bisher wenige Substrate bekannt. Außer APP wurde eine Spaltung für die Sialyltransferase-1 (Kitazume *et al.*, 2001) und den *P-selectin glycoprotein ligand-1* (Lichtenthaler *et al.*, 2003) nachgewiesen. Eine veränderte Aktivität der Sekretasen im Verlauf der Zellalterung weist somit weitgehende Folgen auf. Als Beispiel sei die Notch-vermittelte Signaltransduktion erwähnt, an der sowohl die α - als auch die γ -Sekretase beteiligt sind und die bei der Differenzierung von T-Lymphozyten bis ins hohe Alter hinein eine entscheidende Rolle spielt (Maillard *et al.*, 2005). Die Auswirkung der veränderten Sekretaseaktivitäten auf unterschiedliche Substrate und ihre physiologische Bedeutung soll in weitergehenden Studien geklärt werden.

Neben einer proteolytischen Aktivität ist für Presenilin auch eine Funktion für den intrazellulären Transport einer größer werdenden Zahl an Proteinen nachgewiesen. Dazu gehören APP, Trk Rezeptor (Naruse *et al.*, 1998), Nicastrin (Herreman *et al.*, 2003), PEN-2 (Wang *et al.*, 2004) und Tyrosinase (Wang *et al.*, 2006). Interessanterweise wird ebenfalls der intrazelluläre Transport von Caveolin-1 im sekretorischen Pfad durch Presenilin reguliert, weswegen eine Presenilin-Defizienz zu einer signifikanten Reduktion der Caveolae-Spiegel führt (Wood *et al.*, 2004). Möglicherweise besteht somit eine Verbindung zwischen dem altersabhängig reduzierten PS1-Proteinniveau und der verringerten Assoziation von Caveolin-1 mit Lipid Rafts, woraus die Disintegration der Membransubdomänen resultieren könnte. Weitergehende Studien sollen diesen möglichen Zusammenhang aufklären.

4.1.3 Der Einfluss der altersassoziierten Disintegration von Lipid Rafts auf die Prozessierung von APP

Die biochemische Analyse der Lipid Rafts junger und seneszenten Fibroblasten demonstrierte, dass diese Membransubdomänen im Zuge der Zellalterung strukturell disintegrieren beziehungsweise in geringeren Mengen auftreten. APP wird im sekretorischen Pfad an die Plasmamembran geleitet. Die α -sekretorische Spaltung findet auf dem Weg dorthin oder an der Plasmamembran selbst statt. Die Prozessierung durch die β - und γ -Sekretase findet in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten statt, woran endozytotische Mechanismen unter Beteiligung von Lipid Rafts entscheidend sind (Eehalt *et al.*, 2003; Simons *et al.*, 2001). Sowohl BACE als auch der γ -Sekretasekomplex sind in Lipid Rafts lokalisiert (Cordy *et al.*, 2003; Eehalt *et al.*, 2003; Marlow *et al.*, 2003; Riddell *et al.*, 2001; Wada *et al.*, 2003). Insbesondere für BACE ist gezeigt, dass durch die Modulation des intrazellulären Cholesterolspiegels und somit der Lipid Raft-Integrität das Potential zur Spaltung von APP beeinflusst wird (Abad-Rodriguez *et al.*, 2004; Refolo *et al.*, 2000; Simons *et al.*, 2001). Die Behandlung von Zellen mit Statinen, Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, dem Schrittmacherezym der Cholesterolsynthese, führt zu einer verstärkten nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung (Fassbender *et al.*, 2001; Kojro *et al.*, 2001; Parvathy *et al.*, 2004). Dieser Effekt wurde, neben einer fluideren Membran, welche die Aktivität der α -Sekretase fördert, auf reduzierte Lipid Raft-Spiegel zurückgeführt, was in einer verminderten Endozytose resultiert. Umgekehrt lässt sich die Synthese von A β durch externe Cholesterobeladung erhöhen, wodurch die Spiegel nicht-amyloidogener Spaltprodukte nachhaltig reduziert werden (Bodovitz und Klein, 1996; Racchi *et al.*, 1997). Konsequenterweise sollte folglich die altersassoziierte Disintegration der Lipid Rafts, mit der daraus resultierenden Lokalisation maturer BACE und der enzymatischen Aktivität in der Nicht-Raft Fraktion der Membran, eine reduzierte β -sekretorische Prozessierung von APP bewirken.

Kürzlich wurde allerdings ein andersartiger Mechanismus beschrieben, bei dem eine reduzierte Integrität der Lipid Rafts erhöhte A β -Spiegel bewirkt. Dabei wurde gezeigt, dass APP endogen nicht in Lipid Rafts lokalisiert ist und somit die Lipid Raft-assoziierte β -Sekretase erst nach der Disintegration der Membransubdomänen

verstärkt mit APP interagieren kann (Abad-Rodriguez *et al.*, 2004; Cramer *et al.*, 2006).

Auf endogener APP-Ebene kann A β nicht quantifiziert werden, weil das Peptid nur in geringen Konzentrationen vorliegt. Über den tatsächlichen Einfluss der Lipid Raft-Disintegration auf das Potential der β -sekretorischen Spaltung kann somit keine endgültige Aussage getroffen werden. Allerdings wurde in dieser Arbeit demonstriert, dass signifikante Spiegel von endogenem APP in Lipid Rafts lokalisiert sind. Dies steht mit den Lipid Rafts als Ort der Amyloidogenese im Einklang. Aus der verringerten Assoziation reifer BACE mit den Lipid Rafts kann somit gefolgert werden, dass das Enzym in seneszenten Zellen, trotz seiner erhöhten enzymatischen Aktivität, ein reduziertes Potential zur Prozessierung von APP aufweist. Dies könnte möglicherweise die altersassoziierte Verringerung der C99-Spiegel bewirken.

4.2 Relevanz der Ergebnisse für ein besseres Verständnis der Pathomechanismen

Die Prävention und Behandlung der Alzheimer Krankheit ist aufgrund der hohen Frequenz dieser neurodegenerativen Erkrankung und des langsamen Krankheitsverlaufs ein herausragendes Ziel der neurobiologischen Forschung (Pietrzik und Behl, 2005). Bisherige Therapiemöglichkeiten beschränken sich auf die zeitweilige Verminderung von Symptomen, ohne eine langfristige Wirkung auf den Verlauf der Krankheit zu erzielen (Holscher, 2005). Um eine Nachhaltigkeit der Therapie oder Prävention zu erreichen, müssen die Entstehungsmechanismen der Alzheimer Krankheit besser verstanden werden. Eine mögliche Schlüsselrolle in der Entstehung der Alzheimer Pathologie kommt der Prozessierung von APP zu, die in der Bildung von A β resultiert (Haass, 2004). Die Reduktion von A β -Spiegeln im Gehirn transgener APP-Mäuse führt zu einer Verbesserung der kognitiven Leistung dieser Tiere (Dodart *et al.*, 2002; Postina *et al.*, 2004). Umgekehrt führen erhöhte APP-Gendosen, wie sie in Down Syndrom Patienten auftreten, zu einer Entwicklung der Alzheimer Demenz in frühen Lebensjahren (Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006). Aus diesem Grund sehen zukünftige präventive oder therapeutische Ansätze vor, die APP-Prozessierung zu manipulieren, mit dem Ziel, die A β -Bildung zu reduzieren (Weggen *et al.*, 2001, Postina *et al.*, 2004). Trotz einer klaren Altersassoziation der

sporadischen Formen der Alzheimer Krankheit, sind allerdings Veränderungen beziehungsweise Einflüsse der Alterung auf die Prozessierung von APP weitestgehend ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass altersassoziierte zelluläre Veränderungen die Prozessierung von APP beeinflussen und regulative Mechanismen, wie die Konstitution von Lipid Rafts, signifikant verändert werden. Interessanterweise wurden zelluläre Modifikationen, wie sie für replikativ gealterte Fibroblasten gezeigt wurden, auch in Gehirnen gealterter nicht-dementer Menschen sowie Alzheimer Patienten beschrieben. Dazu gehören erhöhte Caveolin-1-Proteinspiegel (Gaudreault *et al.*, 2004), erhöhte Cholesterolspiegel (Mulas *et al.*, 2005), eine veränderte Konstitution von Lipid Rafts (Igbavboa *et al.*, 2005) sowie eine erhöhte β -Sekretaseaktivität bei unverändertem Expressionsniveau (Fukumoto *et al.*, 2004).

In dem zellulären Altersmodell wurde eine altersassoziierte Verringerung der APP-Prozessierung nachgewiesen. Somit lassen sich die erhöhten A β -Konzentrationen im Gehirn gealterter Menschen oder Mäuse (Dewachter *et al.*, 2000; Games *et al.*, 1995; Iwatsubo *et al.*, 1994; Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997) möglicherweise nicht auf eine generelle Zunahme der APP-Prozessierung im Zuge der Alterung zurückführen. Eventuell führen zelluläre Deregulationen oder Ungleichgewichte, die sich von der normalen Alterung unterscheiden und die altersabhängigen Regulationen der APP-Prozessierung umgehen, zu einer erhöhten Synthese von A β . Beispielsweise wird die Prozessierung von APP durch oxidativen Stress gesteigert (Mazur-Kolecka *et al.*, 2003; Paola *et al.*, 2000). Ebenso resultieren apoptotische Mechanismen in einer erhöhten APP-Prozessierung und Synthese von A β 42 (Abrahamson *et al.*, 2006; Sodhi *et al.*, 2004). Neben der Generierung von A β ist auch die Degradation des Peptids durch extrazelluläre Proteasen ein entscheidender Faktor, der die Gesamtmenge im Gehirn beeinflusst. Als A β -degradierende Proteasen sind Neprilysin (Iwata *et al.*, 2001) und *Angiotensin Converting Enzyme* (Hemming und Selkoe, 2005) beschrieben. In Gehirnen von Alzheimer Patienten sowie gealterter nicht-dementer Menschen wurden verringerte Proteinspiegel für Neprilysin nachgewiesen, woraus erhöhte A β -Spiegel resultieren (Russo *et al.*, 2005).

Die Aufklärung altersassoziierter Veränderungen in der Biochemie der APP-Prozessierung ermöglicht somit neue Einblicke in die Entstehung der Alzheimer Krankheit und bietet Ansätze für neuartige Möglichkeiten potentieller Therapien oder Präventionen dieser neurodegenerativen Erkrankung.

4.3 Der Einfluss zellulärer Alterung auf die Spiegel und subzelluläre Lokalisation von Cholesterol und Caveolin-1

Seneszente Zellen sind durch erhöhte Cholesterol- und Caveolin-1-Spiegel charakterisiert. Durch die biochemische Untersuchung der Lipid Rafts junger und seneszenten Zellen wurde gezeigt, dass beide Lipid Raft Komponenten im Zuge der Zellalterung aus den Lipid Rafts migrierten und in der Nicht-Raft Fraktion der Membran akkumulierten. Somit sind die Lipid Rafts seneszenten Zellen strukturell disintegriert beziehungsweise in ihrer Gesamtmenge verringert.

Lipid Rafts sind distinkte Membranregionen mit erhöhtem Cholesterol- und Sphingolipidgehalt. Zusätzlich zu den Lipiden treten Proteine als strukturelle Komponenten auf. Caveolin ist Bestandteil so genannter Caveolae, die eine spezielle Form der Lipid Rafts darstellen (zur Übersicht Simons und Ikonen, 1997; Stan, 2005). Sowohl die Lokalisation als auch der Expressionsspiegel von Caveolin-1 ist von dem zellulären Cholesterolspiegel abhängig (Smart *et al.*, 1996). Bei hoher Cholesterolkonzentration in der Zelle wird die Expression von Caveolin-1 erhöht (Fielding und Fielding, 1997). Funktionell dient Caveolin als Gerüstprotein für zahlreiche Signalproteine, die sich an der zytoplasmatischen Seite von Caveolin anreichern (Smart *et al.*, 1999). Somit bilden Lipid Rafts/Caveolae Plattformen für den Stofftransport und die Signaltransduktion. Bezüglich der Signaltransduktion wurde gezeigt, dass Caveolin-1 eine inhibitorische Wirkung auf viele Signalproteine aufweist. Die einzige bisher bekannte Ausnahme wird durch die Insulin-Rezeptor-Familie repräsentiert (Karlsson *et al.*, 2004).

Cholesterol stellt für die Fluidität der Plasmamembran einen unentbehrlichen Regulator dar. Das erhöhte Niveau von Cholesterol in seneszenten Zellen verursacht eine verringerte Membranfluidität, wodurch zelluläre Funktionen beeinträchtigt werden (Alvarez *et al.*, 1993; Cohen und Zubenko, 1985). Der zelluläre

Cholesterolspiegel wird durch die Endozytose des Steroids, den Efflux und die Biosynthese reguliert (Fielding und Fielding, 2001). Lipid Rafts partizipieren an dieser Regulation der intrazellulären Cholesterol-Homöostase, wobei umgekehrt die Gesamtmenge an Lipid Raft-assoziiertem Cholesterol sensitiv auf die Veränderungen des Cholesterol-Metabolismus reagiert (Simons und Eehalt, 2002). Der Alterungsprozess, die Cholesterol-Homöostase und der Caveolin-Spiegel sind somit über die Funktion von Lipid Rafts eng verknüpft.

Der Einfluss erhöhter Cholesterol- und Caveolin-1-Spiegel auf Lipid Rafts in replikativ seneszenten Fibroblasten wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen untersucht. Durch Park *et al.* wurde gezeigt, dass der Anstieg mit einer Zunahme der Lipid Raft-Spiegel verbunden ist (Park *et al.*, 2000). Dies soll die reduzierte Antwort seneszenter Zellen auf externe Stimuli bewirken und stellt somit einen entscheidenden Faktor für den altersassoziierten zellulären Wachstumsstopp dar. Interessanterweise wurde ebenfalls gezeigt, dass die Verringerung der Caveolin-1-Expressionsspiegel durch siRNA in gealterten Zellen zu einer Wiederaufnahme der Zellteilungsaktivität führt (Cho *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu wurde von anderen Gruppen nachgewiesen, dass die Lipid Raft-Spiegel im Zuge der Zellalterung abnehmen und diese Disintegration und das Fehlen der wohlgeordneten Plattformen zu einer reduzierten Signalweiterleitung an der Plasmamembran führt (Nakamura *et al.*, 2003; Wheaton *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit erzielte biochemische Analyse von Lipid Rafts bestätigt die Disintegration der Membrandomänen im Verlauf der Zellalterung. Durch die Untersuchung von Komponenten der APP-Prozessierung wurde darüber hinaus eine funktionelle Beeinflussung der APP Biochemie durch die modifizierte Integrität der Lipid Rafts gezeigt. Insbesondere die veränderte Lokalisation reifer β -Sekretase verdeutlicht, dass durch die Disintegration der Lipid Rafts die APP-Spaltung nachhaltig beeinflusst wird. Weiterhin wurde gezeigt, dass durch die altersassoziierte Erhöhung intrazellulärer Cholesterolspiegel die Proteinreifung von APP selektiv inhibiert wird. Der veränderte Cholesterol-Metabolismus seneszenter Zellen beeinflusst somit Mechanismen, die über die Konstitution der Plasmamembran und Funktion von Lipid Rafts hinausgehen.

In seneszenten Fibroblasten wurden Cholesterol und Caveolin-1 subzellulär in speziellen Kompartimenten nachgewiesen, die aufgrund der Ko-Lokalisation beider

Moleküle vermutlich Lipidkörpern (auch *lipid droplets*) entsprechen. Diese Organellen stellen hoch-dynamische Kompartimente dar, die mit zahlreichen anderen Organellen interagieren und funktionell für die Erhaltung der Zellmembran wichtig sind (zur Übersicht Martin und Parton, 2005). Caveolin assoziiert in einem regulierten Prozess transient mit den Lipidkörpern und stellt dabei einen wichtigen Faktor für die Erhaltung der Lipid-Homöostase dar (Liu *et al.*, 2004). Das Auftreten dieser Organellen in seneszenten Fibroblasten unterstreicht eine altersassoziierte Deregulation der Lipid-Homöostase, in deren Zusammenhang die Cholesteroll- und Caveolin-1-Spiegel erhöht werden und gleichzeitig die Struktur oder die Menge an Lipid Rafts verringert wird.

4.4 C. elegans als Modell der APP-Prozessierung

C. elegans wird häufig für die Untersuchung neurodegenerativer Mechanismen herangezogen. Im Hinblick auf Alzheimer-relevante Prozesse wurden transgene Tau- (Kraemer *et al.*, 2003; Miyasaka *et al.*, 2005) und A β -Würmer beschrieben (Boyd-Kimball *et al.*, 2005; Drake *et al.*, 2003; Gutierrez-Zepeda *et al.*, 2005). Der A β -vermittelte Phänotyp (Paralyse) konnte auf eine Aggregation des Peptids zurückgeführt werden, die einen erhöhten oxidativen Stress auslöst. Diese transgenen A β -Würmer geben allerdings keine Auskunft über mögliche Regulationen der an der APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen.

Die Orthologen der α - als auch der γ -Sekretase von Vertebraten wurden in *C. elegans* identifiziert und mit der Prozessierung von Notch wurden identische Substrate zu Säugerzellen nachgewiesen (Levitan und Greenwald, 1995; Wen *et al.*, 1997). Weiterhin wurde gezeigt, dass SEL-12, das Presenilin-Ortholog des Wurms, nach Expression in humanen Zellen APP prozessiert (Okochi *et al.*, 2000) und gleichfalls, dass durch die Expression von humanem PS1 in *C. elegans* endogenes Notch gespalten wird (Steiner *et al.*, 2001; Baumeister *et al.*, 1999). Dies unterstreicht eine evolutive Konservierung der Substrate und somit der Funktion des γ -Sekretasekomplexes. Ein BACE-Ortholog ist bisher unbekannt. Dabei ist zu beachten, dass APL-1, das APP-Ortholog, keine A β -Domäne aufweist, ansonsten aber hohe Sequenzhomologien und vergleichbare strukturelle Eigenschaften zu humanem APP besitzt (Daigle und Li, 1993). Vor allem die Ähnlichkeiten der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne sind auffällig hoch, was auf eine evolutive Konservierung

schließen lässt. Interessanterweise wurden für APL-1 funktionelle Parallelen zu humanem APP beschrieben: ebenso wie für humanes APP wurde für APL-1 eine Interaktion mit dem Protein FEH-1, dem Ortholog zu Fe65, demonstriert, die in *C. elegans* den pharyngealen Pumpmechanismus reguliert (Zambrano *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde gezeigt, dass bestimmte Domänen von APL-1 den durch *apl-1* RNAi verursachten Phänotyp retten (Hornsten und Li, 2000, unveröffentlicht). Dies deutet daraufhin, dass APL-1 womöglich in ähnlicher Weise wie humanes APP gespalten wird und seine unterschiedlichen Domänen spezifische Funktionen ausüben.

Durch die Konstruktion von transgenen *C. elegans* Linien, die humanes APP exprimieren, soll eine mögliche Prozessierung durch die endogenen Sekretasen untersucht werden und die im zellulären Altersmodell beobachteten Regulationen der APP-Prozessierung und der Sekretasen auf die Ebene eines Organismus übertragen werden. Im nächsten Schritt soll dieser Prozess altersassoziiert (junge gegen alte Würmer) untersucht werden. Die vorgestellten Ergebnisse sind im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes in der Arbeitsgruppe von Dr. R. L. (UTSW Medical Center, Dallas, USA) angefertigt worden. Sie konnten im Zuge der Dissertation nicht fertig gestellt werden und sind daher preliminär.

4.4.1 hAPP::*GFP*-vermittelte Phänotypen

Humanes APP, das C-terminal an GFP fusioniert war, wurde unter Kontrolle des *apl-1*-Promoters in *C. elegans* exprimiert. Anhand der GFP-Fluoreszenz wurde eine Expression in Neuronen nachgewiesen, in denen der *apl-1*-Promoter aktiv ist. Die Expression trat in allen Larvenstadien, sowie im adulten Wurm auf, konnte aber in den Eiern nicht nachgewiesen werden. Dies entspricht der Expression von APL-1 und bestätigt, dass der Promoter komplett kloniert wurde und dabei die transkriptionelle Regulation erhalten war. Subzellulär wurde das Signal sowohl in den Somata als auch in den Axonen nachgewiesen. Die gleichmäßige Verteilung innerhalb der Zellen könnte auf eine Lokalisation von hAPP::*GFP* an der Plasmamembran hinweisen. Die Einschleusung des Transgens in den sekretorischen Weg sollte durch die Klonierung der ersten beiden Exons von *apl-1* an das 5'-Ende der humanen APP cDNA gewährleistet werden, wodurch das endogene Signalpeptid an APP fusioniert wurde.

Die neuronale Expression von hAPP::GFP resultierte in einer verzögerten post-embryonalen Entwicklung, die in geringer Frequenz auch vollständig unterbunden wurde. Weiterhin traten Fertilitäts-, Eilege- und Mobilitätsdefekte auf. Die genauen Ursachen der Phänotypen wurden im Zuge der Dissertation nicht untersucht und sind bislang unbekannt. Interessanterweise wurden diese Phänotypen unter anderem als Folge neurodegenerativer Mechanismen beschrieben (Aronoff *et al.*, 2004; Sym *et al.*, 2000). Somit können die beobachteten Defekte möglicherweise auf eine Neurodegeneration zurückgeführt werden, die durch die Expression und Prozessierung von hAPP::GFP vermittelt wird. Die Prozessierung des Transgens ist bislang nicht endgültig geklärt. Allerdings wurden durch erste Untersuchungen hAPP::GFP-Spaltfragmente nachgewiesen, die einer α -, β - und γ -sekretorischen Spaltung entsprechen könnten. Inwieweit diese Fragmente die Phänotypen der transgenen Würmer vermitteln, soll in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Ein weiterer möglicher Faktor, der die Ausprägung der transgenen Phänotypen bedingt, könnte die Konkurrenz des endogenen Promotors von *apl-1* mit dem transgenen Promoter darstellen. Dadurch wird die Funktion von APL-1 gestört und die beobachteten Phänotypen wären somit sekundärer Natur. Beispielsweise könnte im Zuge einer verringerten APL-1-Expression die reduzierte Interaktion mit FEH-1 in einem defekten pharyngealen Pumpmechanismus resultieren (Zambrano *et al.*, 2002). Dies würde gleichzeitig bedeuten, dass humanes APP endogenes APL-1 funktionell nicht ersetzen kann.

Dass die beobachteten Phänotypen auf die *unc-119* Mutation oder den Koinjektionsmarker (*unc-119 rescue*) zurückzuführen sind, kann ausgeschlossen werden, da transgene Würmer, die ausschließlich den Marker aufwiesen, phänotypisch unauffällig waren und vollständig dem Wildtyp entsprachen.

4.4.2 Weiterführende Experimente mit den transgenen Wümmern

Die bisher erzielten Ergebnisse mit den transgenen Wümmern sollen in zukünftigen Studien weitergeführt werden, mit dem Ziel, die im zellulären Altersmodell gewonnenen Beobachtungen auf die Ebene eines Gesamtorganismus zu transferieren. Zunächst soll die Prozessierung von humanem APP durch die endogenen Sekretasen bestätigt werden. Dazu soll die Synthese von APP-Spaltfragmenten zusätzlich nach pharmakologischer Manipulation der Sekretasen untersucht werden, um die Spezifität

der Fragmente zu bestimmen. Besonders interessant dürfte dabei das Auftreten einer möglichen β -Sekretaseaktivität sein, die bisher für *C. elegans* nicht beschrieben ist. Nach erfolgreicher Etablierung einer APP-Prozessierung soll eine altersabhängige Veränderung der Spaltung analysiert werden, die Schlussfolgerungen über eine altersassoziierte Regulation der Sekretaseaktivitäten zulässt. Dafür wird die Bildung der hAPP::GFP-Fragmente in jungen Würmern (4-5 Tage alt) mit der aus gealterten Würmern (13-15 Tage alt) verglichen.

Zur weitergehenden Charakterisierung der beobachteten Phänotypen sollen unterschiedliche APP-Domänen sowie ausschließlich GFP unter der Kontrolle des *apl-1*-Promoters exprimiert werden, um mögliche Regionen, durch die diese Phänotypen verursacht werden, zu bestimmen.

4.5 Ausblick

Die Erforschung der Prävention und Therapie der altersabhängigen Alzheimer Krankheit ist eine der zentralen Herausforderungen der neurobiologischen Forschung. Ein besseres Verständnis der Altersassoziation der Erkrankung wird möglicherweise durch die Untersuchung altersabhängiger biochemischer Veränderungen zentraler Mechanismen der Pathogenese gewonnen. Zahlreiche therapeutische Ansätze zielen auf eine Manipulation der APP-Prozessierung und versuchen eine Reduktion der A β 42-Synthese zu erreichen, mit dem Ziel die Entwicklung oder das Fortschreiten der Demenz zu verhindern. Die nachgewiesenen Modifikationen der APP Biochemie im Zuge der Zellalterung von humanen Fibroblasten müssen in zukünftigen Studien in neuronale Systeme transferiert werden, um die Bedeutung der APP-Prozessierung für die Pathogenese der Alzheimer Krankheit weiter aufzuklären, die Wirksamkeit potentieller Therapien zu bestimmen sowie die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zu unterstützen. Dafür ist die mögliche Übertragung der beobachteten Zusammenhänge in dem sehr gut beschriebenen Modellorganismus *C. elegans* ein weiterführender Schritt. Aufgrund der neuronalen Expression des Transgens wird eine altersabhängige Analyse der Prozessierung von humanem APP und seiner regulativen Mechanismen in neuronalen Zellen ermöglicht.

5. Zusammenfassung

Die Alterung stellt den größten Risikofaktor für die Entwicklung der Alzheimer Krankheit dar, wobei die biochemische Basis dieser Korrelation bisher nicht bekannt ist. Ein möglicherweise zentraler Mechanismus der Alzheimer Pathologie wird durch die Prozessierung von APP repräsentiert, die in der Synthese von A β resultiert. Der Einfluss zellulärer Alterung auf die Biochemie der APP-Prozessierung ist bislang weitestgehend ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Prozessierung von endogenem APP im Verlauf der Zellalterung humaner Fibroblasten progressiv verringert wird. Die Bildung der intrazellulären APP-Spaltfragmente (C99, C83 und AICD) nahm mit zunehmender Lebensspanne ab und war gleichfalls mit einer reduzierten Synthese von extrazellulären APP-Fragmenten (sAPP, sAPP α) verbunden. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Reifung von APP in seneszenten Zellen selektiv reduziert war, und dass dies durch altersabhängig erhöhte zelluläre Cholesterolspiegel vermittelt wurde. Von den APP-prozessierenden Sekretasen waren die Proteinspiegel von Presenilin-1 und Nicastrin, beides Komponenten der γ -Sekretase, im Verlauf der Zellalterung graduell verringert. Dies hatte einen progressiven Rückgang der enzymatischen Aktivität der γ -Sekretase zur Folge, wodurch die Prozessierung von APP unmittelbar reduziert wurde. Die Proteinspiegel von ADAM10, einer α -Sekretase, sowie der β -Sekretase, BACE, wiesen keine Altersregulation auf, aber interessanterweise wurde eine erhöhte enzymatische Aktivität der β -Sekretase in seneszenten Zellen nachgewiesen. Die γ -Sekretase sowie BACE sind in Lipid Rafts lokalisiert, geordneten Membransubdomänen, die hohe Cholesterol- und Caveolin-1-Spiegel aufweisen. Obwohl das Gesamtniveau dieser strukturellen Komponenten von Lipid Rafts in seneszenten Zellen erhöht war, war die Assoziation beider Moleküle mit Lipid Rafts reduziert und sie akkumulierten in speziellen Organellen, die höchstwahrscheinlich Lipidkörper darstellen. Somit wurde gezeigt, dass Lipid Rafts im Zuge der Zellalterung disintegrieren beziehungsweise in ihrem Gesamtspiegel reduziert waren. Diese altersabhängige Membranmodifikation war mit einer veränderten Verteilung von Presenilin-1 und BACE zwischen der Lipid Raft und der Nicht Raft Fraktion der Membran verbunden, die möglicherweise das Potential dieser Enzyme zur Prozessierung von APP reduzierte.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurden transgene *C. elegans* konstruiert, die humanes APP exprimieren, das C-terminal an GFP gekoppelt war. Diese Würmer wiesen eine reduzierte Fertilität, Eilegedefekte und eine verzögerte post-embryonale Entwicklung auf, die möglicherweise auf eine Transgen-vermittelte Neurodegeneration zurückgeführt werden können. Durch erste Untersuchungen der Prozessierung des Transgens konnten Spaltfragmente nachgewiesen werden, die potentiell auf eine spezifische Spaltung von APP durch die endogenen Sekretasen schließen lassen.

Somit werden die Prozessierung sowie die Reifung von APP durch die altersabhängige Modifikationen zellulärer Biochemie nachhaltig beeinflusst. Zukünftige Studien sollen zeigen, ob sich diese zellulären Zusammenhänge in den Gesamtorganismus *C. elegans* übertragen lassen. Des Weiteren sollen die altersabhängigen zellulären Veränderungen, insbesondere des Cholesterolem Metabolismus und der Sekretaseaktivitäten, weitergehend analysiert werden, um zusätzliche Erkenntnisse über altersassoziierte Regulationen möglicher therapeutischer Ziele der Alzheimer Erkrankung zu gewinnen.

Summary

Aging is the most prevailing risk factor for the development of Alzheimer disease, even though the biochemical basis of this correlation is unknown. Processing of APP represents a possible central mechanism of the Alzheimer pathology, which results in the synthesis of A β . However, the influence of cellular aging on the biochemistry of APP processing has not been studied in molecular detail so far.

In this study, it was shown that processing of endogenous APP is down-regulated during cellular aging of human fibroblasts. Generation of the intracellular APP cleavage products (C99, C83 and AICD) was reduced with increasing life span and was associated by a decreased secretion of soluble extracellular APP fragments (sAPP, sAPP α). Further, the maturation of APP was shown to be reduced in senescent cells, which was directly mediated by age-associated increased levels of cellular cholesterol. Of the APP processing secretases, protein levels of presenilin-1 and nicastrin, constituents of the γ -secretase complex, were gradually reduced during aging. This was associated by a progressive reduction in γ -secretase enzymatic activity, which directly results in a decreased processing of APP. Protein levels of ADAM10, an α -secretase, as well as the β -secretase, BACE, were not regulated during aging, but, interestingly, the β -secretase enzymatic activity was up-regulated in senescent cells. The γ - and β -secretase are located in lipid rafts, well-ordered membrane subdomains exhibiting high levels of cholesterol und caveolin-1. Although total levels of both structural components of lipid rafts were increased in aged cells, their particular lipid raft association was decreased and they accumulated in specialized organelles, which very likely resemble lipid bodies. Thus, lipid rafts were structurally disintegrated or decreased in total levels during cellular aging. This age-dependent membrane modification was associated by an altered distribution of presenilin-1 and BACE between the lipid raft and non-raft fraction of the membrane, which very likely affects their APP processing potential.

In a second part of this study, transgenic *C. elegans* were constructed, which express human APP coupled to GFP. These worms exhibited a reduced fertility, an egg laying defect as well as a delayed post-embryonic development, which potentially can be ascribed to a transgene-mediated neurodegeneration. First studies of the processing of

the transgene revealed potentially specific fragments, concluding that human APP is possibly specifically cleaved by the endogenous secretases.

Thus, processing and maturation of APP are significantly influenced by age-dependent alterations in cellular biochemistry. Future studies should aim to transfer the results of the cellular aging model into the organism *C. elegans*. Furthermore, the analysis of age-associated cellular alterations, in particular of the cholesterol metabolism and secretase activity, should provide further insight about age-associated regulations of these possible Alzheimer disease therapeutical targets.

6. Literaturverzeichnis

Abad-Rodriguez, J., Ledesma, M. D., Craessaerts, K., Perga, S., Medina, M., Delacourte, A., Dingwall, C., De Strooper, B. und Dotti, C. G. (2004). Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *J Cell Biol* **167**, 953-60.

Abrahamson, E. E., Ikonovic, M. D., Ciallella, J. R., Hope, C. E., Paljug, W. R., Isanski, B. A., Flood, D. G., Clark, R. S. B. und DeKosky, S. T. (2006). Caspase inhibition therapy abolishes brain trauma-induced increases in A[beta] peptide: Implications for clinical outcome. *Experimental Neurology* **197**, 437-450.

Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W. und Harley, C. B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10114-8.

Alvarez, E., Ruiz-Gutierrez, V., Santa Maria, C. und Machado, A. (1993). Age-dependent modification of lipid composition and lipid structural order parameter of rat peritoneal macrophage membranes. *Mech Ageing Dev* **71**, 1-12.

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtl. Medizin* **64**, 146-148

Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R. und Fahrenholz, F. (2001). Regulation of the {alpha}-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.* **15**, 1837-1839.

Angeletti, B., Waldron, K. J., Freeman, K. B., Bawagan, H., Hussain, I., Miller, C. C. J., Lau, K.-F., Tennant, M. E., Dennison, C., Robinson, N. J. et al. (2005). BACE1 cytoplasmic domain interacts with the copper chaperone for superoxide dismutase-1 and binds copper. *J. Biol. Chem.*, **280**, 17930-7

Ankri, J. und Poupard, M. (2003). [Prevalence and incidence of dementia among the very old. Review of the literature]. *Rev Epidemiol Sante Publique* **51**, 349-60.

Aronoff, R., Mellem, J. E., Maricq, A. V., Sprengel, R. und Seeburg, P. H. (2004). Neuronal Toxicity in *Caenorhabditis elegans* from an Editing Site Mutant in Glutamate Receptor Channels. *J. Neurosci.* **24**, 8135-8140.

Atadja, P., Wong, H., Garkavtsev, I., Veillette, C. und Riabowol, K. (1995). Increased Activity of p53 in Senescing Fibroblasts. *PNAS* **92**, 8348-8352.

Atamna, H., Robinson, C., Ingersoll, R., Elliott, H. und Ames, B. N. (2001). N-t-Butyl hydroxylamine is an antioxidant that reverses age-related changes in mitochondria in vivo and in vitro. *Faseb J* **15**, 2196-204.

Auer, I. A., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Curry, B., Suzuki, K., Shin, R. W., Pentchev, P. G., Carstea, E. D. und Trojanowski, J. Q. (1995). Paired helical filament tau (PHFtau) in Niemann-Pick type C disease is similar to PHFtau in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* **90**, 547-51.

Baumeister, R., Leimer, U., Zweckbronner, I., Jakubek, C., Grunberg, J. und Haass, C. (1999). Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate C. elegans Notch signalling independently of proteolytic processing. *Genes Funct.* **1**, 149-59

- Behl, C.** (2004). Molekulare Grundlagen des Alterns - eine Einführung. In: Ganten/Rückpaul. Molekularmedizinische Grundlagen von altersspezifischen Erkrankungen. pp 67-86. Springer Verlag, Berlin.
- Benjannet, S., Elagoz, A., Wickham, L., Mamarbachi, M., Munzer, J. S., Basak, A., Lazure, C., Cromlish, J. A., Sisodia, S., Checler, F. et al.** (2001). Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J Biol Chem* **276**, 10879-87.
- Bennett, B. D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D. B., Kahn, S., Louis, J. C., Citron, M. und Vassar, R.** (2000). A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J Biol Chem* **275**, 37712-7.
- Benvenuti, S., Cramer, R., Bruce, J., Waterfield, M. D. und Jat, P. S.** (2002a). Identification of novel candidates for replicative senescence by functional proteomics. *Oncogene* **21**, 4403-13.
- Benvenuti, S., Cramer, R., Quinn, C. C., Bruce, J., Zvelebil, M., Corless, S., Bond, J., Yang, A., Hockfield, S., Burlingame, A. L. et al.** (2002b). Differential proteome analysis of replicative senescence in rat embryo fibroblasts. *Mol Cell Proteomics* **1**, 280-92.
- Bodovitz, S. und Klein, W. L.** (1996). Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **271**, 4436-40.
- Borroni, B., Colciaghi, F., Lenzi, G. L., Caimi, L., Cattabeni, F., Di Luca, M. und Padovani, A.** (2003). High cholesterol affects platelet APP processing in controls and in AD patients. *Neurobiol Aging* **24**, 631-6.
- Boyd-Kimball, D., Poon, H. F., Lynn, B. C., Cai, J., Pierce Jr., W. M., Klein, J. B., Ferguson, J., Link, C. D. und Butterfield, D. A.** (2005). Proteomic identification of proteins specifically oxidized in *Caenorhabditis elegans* expressing human A[beta](1-42): Implications for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **In Press, Corrected Proof**.
- Braak, H. und Braak, E.** (1997). Frequency of Stages of Alzheimer-Related Lesions in Different Age Categories. *Neurobiology of Aging* **18**, 351-357.
- Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., de Vos, R. A., Jansen, E. N. und Bohl, J.** (1996). Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm* **103**, 455-90.
- Brown, D. A. und London, E.** (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **275**, 17221-4.
- Brunkan, A. L. und Goate, A. M.** (2005). Presenilin function and β -secretase activity. *Journal of Neurochemistry* **93**, 769-792.
- Bush, A. I., Multhaup, G., Moir, R. D., Williamson, T. G., Small, D. H., Rumble, B., Pollwein, P., Beyreuther, K. und Masters, C. L.** (1993). A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **268**, 16109-12.
- Bush, A. I., Pettingell, W. H., Jr., de Paradis, M., Tanzi, R. E. und Wasco, W.** (1994). The amyloid beta-protein precursor and its mammalian homologues. Evidence for a zinc-modulated heparin-binding superfamily. *J Biol Chem* **269**, 26618-21.

- Campisi, J.** (2003). Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol* **38**, 5-11.
- Campisi, J., Dimri, G. P., Nehlin, J. O., Testori, A. und Yoshimoto, K.** (1996). Coming of age in culture. *Exp Gerontol* **31**, 7-12.
- Cao, X. und Sudhof, T. C.** (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* **293**, 115-20.
- Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G. und Haass, C.** (2000). Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J Biol Chem* **275**, 30849-54.
- Casas, C., Sergeant, N., Itier, J.-M., Blanchard, V., Wirths, O., van der Kolk, N., Vingtdoux, V., van de Steeg, E., Ret, G., Canton, T. et al.** (2004). Massive CA1/2 Neuronal Loss with Intraneuronal and N-Terminal Truncated A β 42 Accumulation in a Novel Alzheimer Transgenic Model. *Am J Pathol* **165**, 1289-1300.
- Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J., Yan, L. und Ames, B.** (1995). Oxidative DNA Damage and Senescence of Human Diploid Fibroblast Cells. *PNAS* **92**, 4337-4341.
- Cho, K. A., Ryu, S. J., Park, J. S., Jang, I. S., Ahn, J. S., Kim, K. T. und Park, S. C.** (2003). Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status. *J Biol Chem* **278**, 27789-95.
- Chung, J. H. und Selkoe, D. J.** (2003). Inhibition of receptor-mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid beta-protein at the cell surface. *J Biol Chem* **278**, 51035-43.
- Citron, M.** (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **5**, 677-85.
- Clark, L. N., Poorkaj, P., Wszolek, Z., Geschwind, D. H., Nasreddine, Z. S., Miller, B., Li, D., Payami, H., Awert, F., Markopoulou, K. et al.** (1998). Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13103-7.
- Cohen, B. M. und Zubenko, G. S.** (1985). Aging and the biophysical properties of cell membranes. *Life Sci* **37**, 1403-9.
- Cordy, J. M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N. M. und Turner, A. J.** (2003). Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11735-40.
- Crameri, A., Biondi, E., Kuehnle, K., Lutjohann, D., Thelen, K. M., Perga, S., Dotti, C. G., Nitsch, R. M., Ledesma, M. D. und Mohajeri, M. H.** (2006). The role of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and A β generation in vivo. *Embo J* **25**, 432-43.
- Cristofalo, V. J.** (1988). Cellular biomarkers of aging. *Exp Gerontol* **23**, 297-307.
- Cristofalo, V. J., Lorenzini, A., Allen, R. G., Torres, C. und Tresini, M.** (2004). Replicative senescence: a critical review. *Mechanisms of Ageing and Development* **125**, 827-848.

- Daigle, I. und Li, C.** (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**, 12045-9.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J. et al.** (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**, 518-22.
- Dewachter, I., Van Dorpe, J., Smeijers, L., Gilis, M., Kuiperi, C., Laenen, I., Caluwaerts, N., Moechars, D., Checler, F., Vanderstichele, H. et al.** (2000). Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP/V717I transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilin1. *J Neurosci* **20**, 6452-8.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. et al.** (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-7.
- Dodart, J. C., Bales, K. R., Gannon, K. S., Greene, S. J., DeMattos, R. B., Mathis, C., DeLong, C. A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D. M. et al.** (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* **5**, 452-7.
- Drake, J., Link, C. D. und Butterfield, D. A.** (2003). Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid [beta]-peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiology of Aging* **24**, 415-420.
- Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. und Simons, K.** (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* **160**, 113-23.
- Endres, K., Anders, A., Kojro, E., Gilbert, S., Fahrenholz, F. und Postina, R.** (2003). Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem* **270**, 2386-93.
- Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K. et al.** (2001). Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5856-61.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H. und Huang, Y.** (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet* **366**, 2112-2117.
- Fielding, C. J. und Fielding, P. E.** (1997). Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* **38**, 1503-21.
- Fielding, C. J. und Fielding, P. E.** (2001). Cellular cholesterol efflux. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1533**, 175-189.
- Fire, A.** (1986). Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* **5**, 2673-2680.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. und Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.

- Flanary, B. und Streit, W.** (2004). Progressive telomere shortening occurs in cultured rat microglia, but not astrocytes. *Glia* **45**, 75-88.
- Foster, N. L., Wilhelmsen, K., Sima, A. A., Jones, M. Z., D'Amato, C. J. und Gilman, S.** (1997). Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants. *Ann Neurol* **41**, 706-15.
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M. C. et al.** (2002). aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* **3**, 85-97.
- Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E.** (2000). Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim Biophys Acta* **1502**, 122-32.
- Fukumoto, H., Rosene, D. L., Moss, M. B., Raju, S., Hyman, B. T. und Irizarry, M. C.** (2004). Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *Am J Pathol* **164**, 719-25.
- Galbete, J. L., Martin, T. R., Peressini, E., Modena, P., Bianchi, R. und Forloni, G.** (2000). Cholesterol decreases secretion of the secreted form of amyloid precursor protein by interfering with glycosylation in the protein secretory pathway. *Biochem J* **348 Pt 2**, 307-13.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F. et al.** (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* **373**, 523-7.
- Gaudreault, S. B., Dea, D. und Poirier, J.** (2004). Increased caveolin-1 expression in Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Aging* **25**, 753-759.
- Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M. G., Hasegawa, M., Smith, M. J. und Crowther, R. A.** (1996). Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* **383**, 550-3.
- Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V. A. und Priess, J. R.** (2002). APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 775-9.
- Grimm, M. O., Grimm, H. S., Patzold, A. J., Zinser, E. G., Halonen, R., Duering, M., Tschape, J. A., De Strooper, B., Muller, U., Shen, J. et al.** (2005). Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol* **7**, 1118-23.
- Grune, T., Merker, K., Jung, T., Sitte, N. und Davies, K. J. A.** (2005). Protein oxidation and degradation during postmitotic senescence. *Free Radical Biology and Medicine* **39**, 1208-1215.
- Gutierrez-Zepeda, A., Santell, R., Wu, Z., Brown, M., Wu, Y., Khan, I., Link, C., Zhao, B. und Luo, Y.** (2005). Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *BMC Neuroscience* **6**, 54.
- Haass, C.** (2004). Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *Embo J* **23**, 483-8.

Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B. et al. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**, 322-5.

Hampel, B., Wagner, M., Teis, D., Zwerschke, W., Huber, L. A. und Jansen-Durr, P. (2005). Apoptosis resistance of senescent human fibroblasts is correlated with the absence of nuclear IGFBP-3. *Aging Cell* **4**, 325-330.

Haniu, M., Denis, P., Young, Y., Mendiaz, E. A., Fuller, J., Hui, J. O., Bennett, B. D., Kahn, S., Ross, S., Burgess, T. et al. (2000). Characterization of Alzheimer's beta -Secretase Protein BACE. A PEPSIN FAMILY MEMBER WITH UNUSUAL PROPERTIES 10.1074/jbc.M002095200. *J. Biol. Chem.* **275**, 21099-21106.

Hardy, J. (2006). Has the Amyloid Cascade Hypothesis for Alzheimer's Disease been Proved? *Curr Alzheimer Res* **3**, 71-3.

Hardy, J. und Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-6.

Harley, C. B. (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* **256**, 271-82.

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300.

Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K. et al. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for {alpha}-secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2615-2624.

Hayflick, L. (1985). The cell biology of aging. *Clin Geriatr Med* **1**, 15-27.

Hayflick, L. und Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621.

Head, E. und Lott, I. T. (2004). Down syndrome and beta-amyloid deposition. *Curr Opin Neurol* **17**, 95-100.

Hemming, M. L. und Selkoe, D. J. (2005). Amyloid {beta}-Protein Is Degraded by Cellular Angiotensin-converting Enzyme (ACE) and Elevated by an ACE Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **280**, 37644-37650.

Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretzschmar, H., Sisodia, S. und Muller, U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *Embo J* **23**, 4106-15.

Herreman, A., Van Gassen, G., Bentahir, M., Nyabi, O., Craessaerts, K., Mueller, U., Annaert, W. und De Strooper, B. (2003). gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation. *J Cell Sci* **116**, 1127-36.

Hesse, L., Behr, D., Masters, C. L. und Multhaup, G. (1994). The [beta]A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Letters* **349**, 109-116.

- Hobert, O.** (2002). PCR fusion-based approach to create reporter gene constructs for expression analysis in transgenic *C. elegans*. *Biotechniques* **32**, 728-30
- Hodgkin, J.** (1988). Sexual Dimorphism and Sex Determination. In: Wood, W.B. The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Holscher, C.** (2005). Development of beta-amyloid-induced neurodegeneration in Alzheimer's disease and novel neuroprotective strategies. *Rev Neurosci* **16**, 181-212.
- Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M. und Doms, R. W.** (2000). Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem* **275**, 33729-37.
- Igbavboa, U., Eckert, G. P., Malo, T. M., Studniski, A. E., Johnson, L. N. A., Yamamoto, N., Kobayashi, M., Fujita, S. C., Appel, T. R. und Muller, W. E.** (2005). Murine synaptosomal lipid raft protein and lipid composition are altered by expression of human apoE 3 and 4 and by increasing age. *Journal of the Neurological Sciences* **229-230**, 225-232.
- Iqbal, K., del C. Alonso, A., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C.-X., Khatoon, S., Li, B., Liu, F. und Rahman, A.** (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1739**, 198-210.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H. J. und Saido, T. C.** (2001). Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* **292**, 1550-2.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N. und Ihara, Y.** (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* **13**, 45-53.
- Jan, E., Yoon, J. W., Walterhouse, D., Iannaccone, P. und Goodwin, E. B.** (1997). Conservation of the *C.elegans* tra-2 3'UTR translational control. *Embo J* **16**, 6301-13.
- Jazwinski, S. M., Chen, J. B. und Sun, J.** (1993). A single gene change can extend yeast life span: the role of Ras in cellular senescence. *Adv Exp Med Biol* **330**, 45-53.
- Jin, L., Ninomiya, H., Roch, J., Schubert, D., Masliah, E., Otero, D. und Saitoh, T.** (1994). Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *J. Neurosci.* **14**, 5461-5470.
- Johnson, T. E. und Lithgow, G. J.** (1992). The search for the genetic basis of aging: the identification of gerontogenes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Am Geriatr Soc* **40**, 936-45.
- Kalvodova, L., Kahya, N., Schwille, P., Ehehalt, R., Verkade, P., Drechsel, D. und Simons, K.** (2005). Lipids as Modulators of Proteolytic Activity of BACE: INVOLVEMENT OF CHOLESTEROL, GLYCOPHINGOLIPIDS, AND ANIONIC PHOSPHOLIPIDS IN VITRO. *J. Biol. Chem.* **280**, 36815-36823.
- Karlsson, M., Thorn, H., Danielsson, A., Stenkula, K. G., Ost, A., Gustavsson, J., Nystrom, F. H. und Stralfors, P.** (2004). Colocalization of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 to caveolae in primary human adipocytes. Cholesterol depletion blocks insulin signalling for metabolic and mitogenic control. *European Journal of Biochemistry* **271**, 2471-2479.

- Kenyon, C.** (2005). The Plasticity of Aging: Insights from Long-Lived Mutants. *Cell* **120**, 449-460.
- Kil, I. S., Huh, T. L., Lee, Y. S., Lee, Y. M. und Park, J.-W.** (2006). Regulation of replicative senescence by NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Free Radical Biology and Medicine* **40**, 110-119.
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S. und Ito, H.** (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* **331**, 530-2.
- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T. C. und Hashimoto, Y.** (2001). Alzheimer's beta -secretase, beta -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *PNAS* **98**, 13554-13559.
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W. und Fahrenholz, F.** (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5815-20.
- Kraemer, B. C., Zhang, B., Leverenz, J. B., Thomas, J. H., Trojanowski, J. Q. und Schellenberg, G. D.** (2003). From the Cover: Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *PNAS* **100**, 9980-9985.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. und Fahrenholz, F.** (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3922-7.
- LaVoie, M. J. und Selkoe, D. J.** (2003). The Notch Ligands, Jagged and Delta, Are Sequentially Processed by {alpha}-Secretase and Presenilin/{gamma}-Secretase and Release Signaling Fragments. *J. Biol. Chem.* **278**, 34427-34437.
- Lee, H. J., Jung, K. M., Huang, Y. Z., Bennett, L. B., Lee, J. S., Mei, L. und Kim, T. W.** (2002a). Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. *J Biol Chem* **277**, 6318-23.
- Lee, S. F., Shah, S., Li, H., Yu, C., Han, W. und Yu, G.** (2002b). Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch. *J Biol Chem* **277**, 45013-9.
- Levitan, D. und Greenwald, I.** (1995). Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* **377**, 351-4.
- Levitan, D., Lee, J., Song, L., Manning, R., Wong, G., Parker, E. und Zhang, L.** (2001). PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling. *PNAS* **98**, 12186-12190.
- Lichtenthaler, S. F., Dominguez, D.-i., Westmeyer, G. G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B. und Seed, B.** (2003). The Cell Adhesion Protein P-selectin Glycoprotein Ligand-1 Is a Substrate for the Aspartyl Protease BACE1. *J. Biol. Chem.* **278**, 48713-48719.

- Liu, P., Ying, Y., Zhao, Y., Mundy, D. I., Zhu, M. und Anderson, R. G.** (2004). Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem* **279**, 3787-92.
- Lynch, M. D.** (2005). Replicative Aging in *E. coli*. *Rejuvenation Research* **8**, 79-81.
- Maillard, I., Fang, T. und Pear, W. S.** (2005). REGULATION OF LYMPHOID DEVELOPMENT, DIFFERENTIATION, AND FUNCTION BY THE NOTCH PATHWAY. *Annual Review of Immunology* **23**, 945-974.
- Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E.** (1998). Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* **8**, 425-7.
- Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarnier, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z. et al.** (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *Embo J* **21**, 1948-56.
- Marambaud, P., Wen, P. H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R. und Robakis, N. K.** (2003). A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* **114**, 635-45.
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D. und Saftig, P.** (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and {beta}-catenin translocation 10.1073/pnas.0500918102. *PNAS* **102**, 9182-9187.
- Marlow, L., Cain, M., Pappolla, M. A. und Sambamurti, K.** (2003). Beta-secretase processing of the Alzheimer's amyloid protein precursor (APP). *J Mol Neurosci* **20**, 233-9.
- Martin, S. und Parton, R. G.** (2005). Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 163-74.
- Mattson, M. P.** (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* **77**, 1081-132.
- Maurer, K., Volk, S. und Gerbaldo, H.** (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* **349**, 1546-9.
- May, P., Reddy, Y. K. und Herz, J.** (2002). Proteolytic Processing of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Mediates Regulated Release of Its Intracellular Domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 18736-18743.
- Maynard, C. J., Cappai, R., Volitakis, I., Cherny, R. A., White, A. R., Beyreuther, K., Masters, C. L., Bush, A. I. und Li, Q.-X.** (2002). Overexpression of Alzheimer's Disease Amyloid-beta Opposes the Age-dependent Elevations of Brain Copper and Iron. *J. Biol. Chem.* **277**, 44670-44676.
- Mazur-Kolecka, B., Kowal, D., Sukontasup, T., Dickson, D. und Frackowiak, J.** (2003). The effect of oxidative stress on accumulation of apolipoprotein E3 and E4 in a cell culture model of [beta]-amyloid angiopathy (CAA). *Brain Research* **983**, 48-57.
- Mello, C. und Fire, A.** (1995). DNA transformation. *Methods Cell Biol* **48**, 451-82.

Meyer-Luehmann, M., Stalder, M., Herzig, M. C., Kaeser, S. A., Kohler, E., Pfeifer, M., Boncristiano, S., Mathews, P. M., Mercken, M., Abramowski, D. et al. (2003). Extracellular amyloid formation and associated pathology in neural grafts. *Nat Neurosci* **6**, 370-7.

Mills, J. und Reiner, P. B. (1999). Mitogen-activated protein kinase is involved in N-methyl-D-aspartate receptor regulation of amyloid precursor protein cleavage. *Neuroscience* **94**, 1333-8.

Miyasaka, T., Ding, Z., Gengyo-Ando, K., Oue, M., Yamaguchi, H., Mitani, S. und Ihara, Y. (2005). Progressive neurodegeneration in *C. elegans* model of tauopathy. *Neurobiology of Disease* **20**, 372-383.

Mueller, S. N., Rosen, E. M. und Levine, E. M. (1980). Cellular senescence in a cloned strain of bovine fetal aortic endothelial cells. *Science* **207**, 889-91.

Mulas, M. F., Demuro, G., Mulas, C., Putzolu, M., Cavallini, G., Donati, A., Bergamini, E. and Dessi, S. (2005). Dietary restriction counteracts age-related changes in cholesterol metabolism in the rat. *Mechanisms of Ageing and Development* **126**, 648-654.

Murakami, D., Okamoto, I., Nagano, O., Kawano, Y., Tomita, T., Iwatsubo, T., De Strooper, B., Yumoto, E. und Saya, H. (2003a). Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembranous cleavage of CD44. *Oncogene* **22**, 1511-6.

Murakami, K., Irie, K., Morimoto, A., Ohigashi, H., Shindo, M., Nagao, M., Shimizu, T. und Shirasawa, T. (2003b). Neurotoxicity and Physicochemical Properties of A{beta} Mutant Peptides from Cerebral Amyloid Angiopathy: IMPLICATION FOR THE PATHOGENESIS OF CEREBRAL AMYLOID ANGIOPATHY AND ALZHEIMER'S DISEASE. *J. Biol. Chem.* **278**, 46179-46187.

Nakamura, M., Kondo, H., Shimada, Y., Waheed, A. A. und Ohno-Iwashita, Y. (2003). Cellular aging-dependent decrease in cholesterol in membrane microdomains of human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res* **290**, 381-90.

Naruse, S., Thinakaran, G., Luo, J. J., Kusiak, J. W., Tomita, T., Iwatsubo, T., Qian, X., Ginty, D. D., Price, D. L., Borchelt, D. R. et al. (1998). Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* **21**, 1213-21.

Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G. und Taraboulos, A. (1997). Characterization of Detergent-insoluble Complexes Containing the Cellular Prion Protein and Its Scrapie Isoform. *J. Biol. Chem.* **272**, 6324-6331.

Nichols, W. W., Murphy, D. G., Cristofalo, V. J., Toji, L. H., Greene, A. E. und Dwight, S. A. (1977). Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* **196**, 60-3.

Ninomiya, H., Roch, J., Sundsmo, M., Otero, D. und Saitoh, T. (1993). Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid beta/A4 protein precursor that promotes fibroblast growth. *J. Cell Biol.* **121**, 879-886.

Okochi, M., Eimer, S., Bottcher, A., Baumeister, R., Romig, H., Walter, J., Capell, A., Steiner, H. und Haass, C. (2000). A loss of function mutant of the presenilin homologue SEL-12 undergoes aberrant endoproteolysis in *Caenorhabditis elegans* and increases abeta 42 generation in human cells. *J Biol Chem* **275**, 40925-32.

Oltersdorf, T., Ward, P., Henriksson, T., Beattie, E., Neve, R., Lieberburg, I. und Fritz, L. (1990). The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J. Biol. Chem.* **265**, 4492-4497.

Pahlsson, P., Shakin-Eshleman, S. H. und Spitalnik, S. L. (1992). N-linked glycosylation of beta-amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* **189**, 1667-73.

Paola, D., Domenicotti, C., Nitti, M., Vitali, A., Borghi, R., Cottalasso, D., Zaccheo, D., Odetti, P., Strocchi, P. und Marinari, U. M. (2000). Oxidative Stress Induces Increase in Intracellular Amyloid [beta]-Protein Production and Selective Activation of [beta]I and [beta]II PKCs in NT2 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **268**, 642-646.

Park, W.-Y., Park, J.-S., Cho, K.-A., Kim, D.-I., Ko, Y.-G., Seo, J.-S. und Park, S. C. (2000). Up-regulation of Caveolin Attenuates Epidermal Growth Factor Signaling in Senescent Cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 20847-20852.

Parton, R. G. (2001). Cell biology. Life without caveolae. *Science* **293**, 2404-5.

Parvathy, S., Ehrlich, M., Pedrini, S., Diaz, N., Refolo, L., Buxbaum, J. D., Bogush, A., Petanceska, S. und Gandy, S. (2004). Atorvastatin-induced activation of Alzheimer's alpha secretase is resistant to standard inhibitors of protein phosphorylation-regulated ectodomain shedding. *J Neurochem* **90**, 1005-10.

Pietrzik, C. und Behl, C. (2005). Concepts for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanisms and clinical application. *International Journal of Experimental Pathology* **86**, 173-185.

Pike, C. J., Cummings, B. J., Monzavi, R. und Cotman, C. W. (1994). Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **63**, 517-31.

Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M. et al. (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* **113**, 1456-64.

Racchi, M., Baetta, R., Salvietti, N., Ianna, P., Franceschini, G., Paoletti, R., Fumagalli, R., Govoni, S., Trabucchi, M. und Soma, M. (1997). Secretory processing of amyloid precursor protein is inhibited by increase in cellular cholesterol content. *Biochem J* **322** (Pt 3), 893-8.

Refolo, L. M., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G. S., Sambamurti, K., Duff, K. und Pappolla, M. A. (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* **7**, 321-31.

Reinhard, C., Hebert, S. S. und De Strooper, B. (2005). The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *Embo J* **24**, 3996-4006.

Rheinwald, J. G. und Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331-43.

Riddel, D. L. (1988). The Dauer Larva. In: Wood, W.B. The nematode *Caenorhabditis elegans*. pp 393-412. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

- Riddell, D. R., Christie, G., Hussain, I. und Dingwall, C.** (2001). Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr Biol* **11**, 1288-93.
- Riedel-Heller, S. G., Busse, A., Aurich, C., Matschinger, H. und Angermeyer, M. C.** (2001). Prevalence of dementia according to DSM-III-R and ICD-10: results of the Leipzig Longitudinal Study of the Aged (LEILA75+) Part 1. *Br J Psychiatry* **179**, 250-4.
- Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerriere, A., Vital, A., Dumanchin, C., Feuillet, S., Brice, A., Vercelletto, M. et al.** (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* **38**, 24-6.
- Russo, R., Borghi, R., Markesbery, W., Tabaton, M. und Piccini, A.** (2005). Nephrylisin decreases uniformly in Alzheimer's disease and in normal aging. *FEBS Letters* **579**, 6027-6030.
- Selkoe, D. und Kopan, R.** (2003). NOTCH AND PRESENILIN: Regulated Intramembrane Proteolysis Links Development and Degeneration. *Annual Review of Neuroscience* **26**, 565-597.
- Selkoe, D. J.** (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**, A23-31.
- Selkoe, D. J.** (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**, 741-66.
- Selkoe, D. J.** (2004). Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med* **140**, 627-38.
- Simons, K. und Eehalt, R.** (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* **110**, 597-603.
- Simons, K. und Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-72.
- Simons, K. und Vaz, W. L.** (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**, 269-95.
- Simons, M., Keller, P., Dichgans, J. und Schulz, J. B.** (2001). Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link? *Neurology* **57**, 1089-93.
- Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., A. Davies, K. J. und Grune, T.** (2000). Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II--aging of nondividing cells. *FASEB J.* **14**, 2503-2510.
- Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T. und Lisanti, M. P.** (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* **19**, 7289-304.
- Smart, E. J., Ying, Y., Donzell, W. C. und Anderson, R. G.** (1996). A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* **271**, 29427-35.

Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R. et al. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *Embo J* **24**, 3624-34.

Sodhi, C. P., Rampalli, S., Perez, R. G., Koo, E. H., Quinn, B. und Gottardi-Littell, N. R. (2004). The endocytotic pathway is required for increased A[beta]42 secretion during apoptosis. *Molecular Brain Research* **128**, 201-211.

Spires, T. L. und Hyman, B. T. (2005). Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx* **2**, 423-37.

Sprong, H., Degroote, S., Claessens, T., van Drunen, J., Oorschot, V., Westerink, B. H. C., Hirabayashi, Y., Klumperman, J., van der Sluijs, P. und van Meer, G. (2001). Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **155**, 369-380.

Stan, R. V. (2005). Structure of caveolae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1746**, 334-348.

Steiner, H. und Haass, C. (2000). Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 217-24.

Steiner, H., Revesz, T., Neumann, M., Romig, H., Grim, M. G., Pesold, B., Kretschmar, H. A., Hardy, J., Holton, J. L., Baumeister, R. et al. (2001). A Pathogenic Presenilin-1 Deletion Causes Aberrant Abeta 42 Production in the Absence of Congoophilic Amyloid Plaques. *J. Biol. Chem.* **276**, 7233-7239.

Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K. H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Burki, K., Frey, P., Paganetti, P. A. et al. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13287-92.

Sulston, J. E. und Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **56**, 110-56.

Sym, M., Basson, M. und Johnson, C. (2000). A model for niemann-pick type C disease in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **10**, 527-30.

Tamboli, I. Y., Prager, K., Barth, E., Heneka, M., Sandhoff, K. und Walter, J. (2005). Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis reduces secretion of the beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide. *J Biol Chem* **280**, 28110-7.

Tang, J. und Wong, R. N. (1987). Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J Cell Biochem* **33**, 53-63.

Tanzi, R. E., McClatchey, A. I., Lamperti, E. D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J. F. und Neve, R. L. (1988). Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* **331**, 528-30.

Thal, D. R., Schultz, C., Botez, G., Del Tredici, K., Mrak, R. E., Griffin, W. S. T., Wiestler, O. D., Braak, H. und Ghebremedhin, E. (2005). The impact of argyrophilic grain disease on the development of dementia and its relationship to concurrent Alzheimer's disease-related pathology. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **31**, 270-279.

The *C. elegans* Sequencing Consortium. (1998). Genome Sequence of the Nematode *C.elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* **282**, 2012-2018.

Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M. et al. (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* **17**, 181-90.

Tomita, S., Kirino, Y. und Suzuki, T. (1998). Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism. *J Biol Chem* **273**, 6277-84.

Trougakos, I. P., Saridaki, A., Panayotou, G. und Gonos, E. S. (2006). Identification of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development* **127**, 88-92.

Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R. et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735-41.

Vetrivel, K. S., Cheng, H., Kim, S. H., Chen, Y., Barnes, N. Y., Parent, A. T., Sisodia, S. S. und Thinakaran, G. (2005). Spatial segregation of gamma-secretase and substrates in distinct membrane domains. *J Biol Chem* **280**, 25892-900.

Vetrivel, K. S., Cheng, H., Lin, W., Sakurai, T., Li, T., Nukina, N., Wong, P. C., Xu, H. und Thinakaran, G. (2004). Association of gamma -secretase with lipid rafts in post-golgi and endosome membranes. *J Biol Chem.* **279**, 44945-54

Vetrivel, K. S. und Thinakaran, G. (2005). Amyloidogenic processing of {beta}-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology.* **24**, 69-73

Von Rotz, R. C., Kohli, B. M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R. M. und Konietzko, U. (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci* **117**, 4435-48.

Wada, S., Morishima-Kawashima, M., Qi, Y., Misono, H., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y. und Ihara, Y. (2003). Gamma-secretase activity is present in rafts but is not cholesterol-dependent. *Biochemistry* **42**, 13977-86.

Walsh, D. M., Fadeeva, J. V., LaVoie, M. J., Paliga, K., Eggert, S., Kimberly, W. T., Wasco, W. und Selkoe, D. J. (2003). gamma-Secretase cleavage and binding to FE65 regulate the nuclear translocation of the intracellular C-terminal domain (ICD) of the APP family of proteins. *Biochemistry* **42**, 6664-73.

Walter, J., Capell, A., Hung, A. Y., Langen, H., Schnolzer, M., Thinakaran, G., Sisodia, S. S., Selkoe, D. J. und Haass, C. (1997). Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J Biol Chem* **272**, 1896-903.

Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G. und Haass, C. (2001). Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem* **276**, 14634-41.

- Wang, H., Luo, W. J., Zhang, Y. W., Li, Y. M., Thinakaran, G., Greengard, P. und Xu, H.** (2004). Presenilins and gamma-secretase inhibitors affect intracellular trafficking and cell surface localization of the gamma-secretase complex components. *J Biol Chem* **279**, 40560-6.
- Wang, J.-K., Kiyokawa, E., Verdin, E. und Trono, D.** (2000). The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *PNAS* **97**, 394-399.
- Wang, R., Tang, P., Wang, P., Boissy, R. E. und Zheng, H.** (2006). Regulation of tyrosinase trafficking and processing by presenilins: Partial loss of function by familial Alzheimer's disease mutation. *PNAS* **103**, 353-358.
- Wang, Y. und Ha, Y.** (2004). The X-Ray Structure of an Antiparallel Dimer of the Human Amyloid Precursor Protein E2 Domain. *Molecular Cell* **15**, 343-353.
- Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L. und Beyreuther, K.** (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* **57**, 115-26.
- Wen, C., Metzstein, M. M. und Greenwald, I.** (1997). SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling. *Development* **124**, 4759-67.
- Wertkin, A. M., Turner, R. S., Pleasure, S. J., Golde, T. E., Younkin, S. G., Trojanowski, J. Q. und Lee, V. M.** (1993). Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9513-7.
- Wheaton, K., Sampsel, K., Boisvert, F. M., Davy, A., Robbins, S. und Riabowol, K.** (2001). Loss of functional caveolae during senescence of human fibroblasts. *J Cell Physiol* **187**, 226-35.
- Wiegand, V., Chang, T. Y., Strauss, J. F., 3rd, Fahrenholz, F. und Gimpl, G.** (2003). Transport of plasma membrane-derived cholesterol and the function of Niemann-Pick C1 Protein. *Faseb J* **17**, 782-4.
- Wolf, F. I., Torsello, A., Covacci, V., Fasanella, S., Montanari, M., Boninsegna, A. und Cittadini, A.** (2002). Oxidative DNA damage as a marker of aging in WI-38 human fibroblasts. *Experimental Gerontology* **37**, 647-656.
- Wood, D. R., Nye, J. S., Lamb, N. J., Fernandez, A. und Kitzmann, M.** (2004). Intracellular retention of Caveolin 1 in presenilin-deficient cells. *J. Biol. Chem.*, M410332200.
- Yamaguchi, H., Nakazato, Y., Hirai, S., Shoji, M. und Harigaya, Y.** (1989). Electron micrograph of diffuse plaques. Initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain. *Am J Pathol* **135**, 593-7.
- Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogueva, E., Chen, F., Kawarai, T. et al.** (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* **407**, 48-54.
- Zambrano, N., Bimonte, M., Arbucci, S., Gianni, D., Russo, T. und Bazzicalupo, P.** (2002). *feh-1* and *apl-1*, the *Caenorhabditis elegans* orthologues of mammalian Fe65 and {beta}-amyloid precursor protein genes, are involved in the same pathway that controls nematode pharyngeal pumping. *J Cell Sci* **115**, 1411-1422.

Zhang, Y.-w., Luo, W.-j., Wang, H., Lin, P., Vetrivel, K. S., Liao, F., Li, F., Wong, P. C., Farquhar, M. G., Thinakaran, G. et al. (2005). Nicastrin Is Critical for Stability and Trafficking but Not Association of Other Presenilin/ γ -Secretase Components. *J. Biol. Chem.* **280**, 17020-17026.

Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Sirinathsinghji, D. J. S., Hopkins, R., Smith, D. W., Heavens, R. P., Dawson, G. R., Boyce, S. und Conner, M. W. (1995). [beta]-amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* **81**, 525-531.

7. Anhang

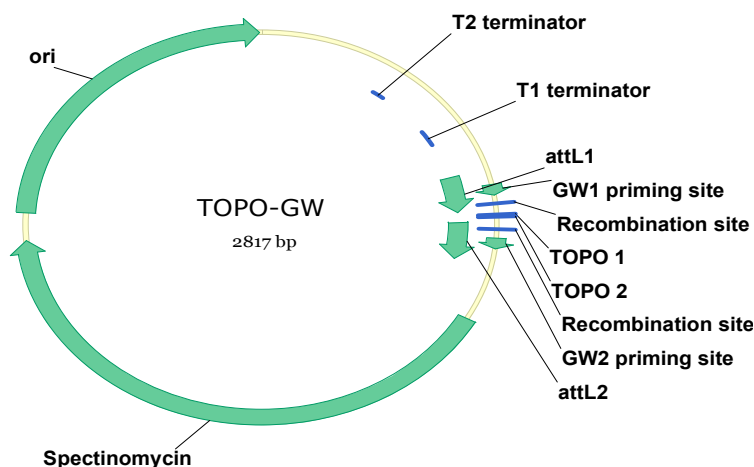
7.1 Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid β -Peptid
A β 40; A β 42	Spezifizierung von A β bezüglich seiner Gesamtzahl von Aminosäuren
APL-1	<i>APP-like protein-1</i> (APP Ortholog aus <i>C. elegans</i>)
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (<i>Amyloid Precursor Protein</i>)
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
AICD	APP intrazelluläre Domäne (<i>APP intracellular domain</i>)
APH-1	<i>Anterior pharynx-defective-1</i>
APLP-1/-2	<i>APP-like protein-1 /-2</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	<i>β-site APP cleaving enzyme</i>
bp	Basenpaar
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins oder Peptids
CTF	C-terminales Fragment eines Proteins oder Peptids
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DChol	6-Dansyl-Cholestanol
DIC	Differential-Interferenzkontrast (<i>differential interference contrast</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagles's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
g	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
h	Stunde (<i>hour</i>)
hAPP	humanes APP
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium

M β CD	Methyl- β -Cyclodextrin
min	Minute
NEXT	Notch extrazelluläre Domäne (<i>Notch extracellular domain</i>)
NICD	Notch intrazelluläre Domäne (<i>Notch intracellular domain</i>)
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins oder Peptids
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDL	Populationsverdopplungsniveau (<i>Population doubling level</i>)
PEN-2	<i>Presenilin enhancer-2</i>
PS-1 /-2	Presenilin-1 /-2
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-vermittelte Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
sAPP	lösliches APP (<i>soluble APP</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)
sec	Sekunde
SEL-12	<i>Suppressor/Enhancer of Lin-12</i> (PS1 Ortholog aus <i>C. elegans</i>)
SUP-17	<i>Suppressor-17</i> (ADAM10 Ortholog aus <i>C. elegans</i>)
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N ² ,N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)

7.2 Plasmidkarten und Sequenzen

7.2.1 TOPO-GW Vektor



```

1      CTTTCCTGCG TTATCCCCTG ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG
AGTGAGCTGA TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCA
101    GTGAGCGAGG AAGCGGAAGA GCGCCCAATA CGCAAACCGC CTCTCCCCGC
GCGTTGGCCG ATTCATTAAT GCAGCTGGCA CGACAGGTTT CCCGACTGGA
201    AAGCGGGCAG TGAGCGCAAC GCAATTAATA CGCGTACCGC TAGCCAGGAA
GAGTTTGTAG AAACGCAAAA AGGCCATCCG TCAGGATGGC CTTCTGCTTA
301    GTTTGATGCC TGGCAGTTTA TGGCGGGCGT CCTGCCCGCC ACCCTCCGGG
CCGTGTGCTT ACAACGTTC AATCCGCTCC CGGCGGATTT GTCCTACTCA
401    GGAGACGTT CACCGACAAA CAACAGATAA AACGAAAGGC CCAGTCTTCC
GACTGAGCCT TTCGTTTTAT TTGATGCCTG GCAGTTCCCT ACTCTCGCGT
501    TAACGCTAGC ATGGATGTTT TCCCAGTCAC GACGTTGTAA AACGACGGCC
AGTCTTAAGC TCGGGCCCCA AATAATGATT TTATTTTGAC TGATAGTGAC
601    CTGTTCGTTG CAACAAATTG ATGAGCAATG CTTTTTTATA ATGCCAACTT
TGTACAAAAA AGCAGGCTCC GAATTCGCCC TTAAGGGCGA ATTCGACCCA
701    GCTTTCTTGT ACAAAGTTGG CATTATAAAA AATAATTGCT CATCAATTTG
TTGCAACGAA CAGGTCAC TAAGTCAAAA TAAAATCATT ATTTGCCATC
801    CAGCTGATAT CCCCTATAGT GAGTCGTATT ACATGGTCAT AGCTGTTTCC
TGGCAGCTCT GGCCCGTGTC TCAAAATCTC TGATGTTACA TTGCACAAGA
901    TAAAAATATA TCATCATGCC TCCTCTAGAC CAGCCAGGAC AGAAATGCCT
CGACTTCGCT GCTGCCCAAG GTTGCCGGGT GACGCACACC GTGGAAACGG
1001   ATGAAGGCAC GAACCCAGTG GACATAAGCC TGTTCGGTTC GTAAGCTGTA
ATGCAAGTAG CGTATGCGCT CAGCCAACTG GTCCAGAACC TTGACCGAAC
1101   GCAGCCGTGG TAACGGCGCA GTGGCGGTTT TCATGGCTTG TTATGACTGT
TTTTTTGGGG TACAGTCTAT GCCTCGGGCA TCCAAGCAGC AAGCGCGTTA
1201   CGCCGTGGGT CGATGTTTGA TGTTATGGAG CAGCAACGAT GTTACGCAGC
AGGGCAGTCG CCCTAAAACA AAGTTAAACA TCATGAGGGA AGCGGTGATC
1301   GCCGAAGTAT CGACTCAACT ATCAGAGGTA GTTGGCGTCA TCGAGCGCCA
TCTCGAACCC ACGTTGCTGG CCGTACATTT GTACGGCTCC GCAGTGGATG
1401   GCGGCCTGAA GCCACACAGT GATATTGATT TGCTGGTTAC GGTGACCGTA
AGGCTTGATG AAACAACGCG GCGAGCTTTG ATCAACGACC TTTTGAAAC
1501   TTCGGCTTCC CCTGGAGAGA GCGAGATTCT CCGCGCTGTA GAAGTCACCA
TTGTTGTGCA CGACGACATC ATTCCGTGGC GTTATCCAGC TAAGCGCGAA
1601   CTGCAATTTG GAGAATGGCA GCGCAATGAC ATTCTTGACG GTATCTTCGA
GCCAGCCACG ATCGACATTG ATCTGGCTAT CTTGCTGACA AAAGCAAGAG
1701   AACATAGCCT TGCCTTGGTA GGTCCAGCGG CGGAGGAACT CTTTGATCCG
GTTCTGAAAC AGGATCTATT TGAGGCGCTA AATGAAACCT TAACGCTATG
1801   GAACTCGCCG CCCGACTGGG CTGGCGATGA GCGAAATGTA GTGCTTACGT
TGTCCCGCAT TTGGTACAGC GCAGTAACCG GCAAAATCGC GCCGAAGGAT
1901   GTCGCTGCCG ACTGGGCAAT GGAGCGCCTG CCGGCCAGT ATCAGCCCGT
CATACTTGAA GCTAGACAGG CTTATCTTGG ACAAGAAGAA GATCGCTTGG
2001   CCTCGCGCGC AGATCAGTTG GAAGAATTTG TCCACTACGT GAAAGGCGAG
ATCACCAAGG TAGTCGGCAA ATAACCCTCG AGCCACCCAT GACCAAATC
2101   CCTTAACGTG AGTTACGCGT CGTTCCACTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA

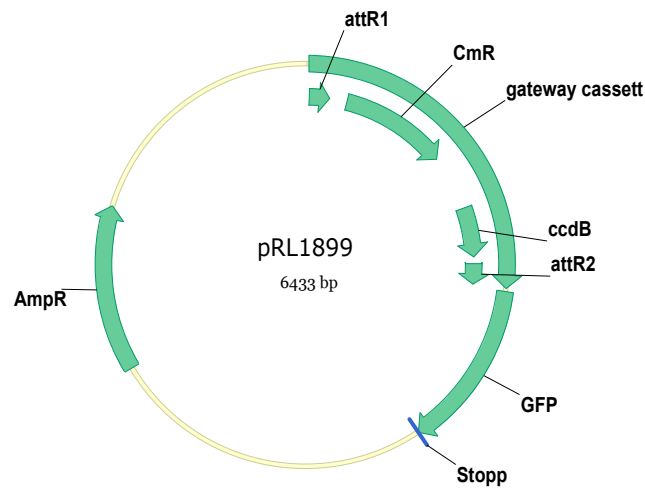
```

```

2201  AGATCAAAGG ATCTTCTTGA GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC
      TTGCAAACAA AAAAACACC GCTACCAGCG GTGGTTTGTG TGCCGGATCA
      AGAGCTACCA ACTCTTTTTT CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC AGAGCGCAGA
2301  TACCAAATAC TGTCCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG
      AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAGT
2401  GGCTGCTGCC AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGGTTG GACTCAAGAC
      GATAGTTACC GGATAAGGCG CAGCGGTCGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC
2501  ACACAGCCCA GCTTGGAGCG AACGACCTAC ACCGAAC TGA GATACCTACA
      GCGTGAGCAT TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA AAGGCGGACA
2601  GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT
      CCAGGGGAA ACGCCCTGGT TCTTTATAGT CCTGTCCGGT TTCGCCACCT
2701  CTGACTTGAG CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT
      GGAAAAACGC CAGCAACGCG GCCTTTTTTAC GGTTCCTGGC CTTTTGCTGG
2801  CCTTTTGCTC ACATGTT

```

7.2.2 pRL1899 („Gateway“ Zielvektor)



```

1      CCTGCAGGAT CAACAAGTTT GTACAAAAA GCTGAACGAG AAACGTAAAA
      TGATATAAAT ATCAATATAT TAAATTAGAT TTTGCATAAA AAACAGACTA
101    CATAATACTG TAAAACACAA CATATCCAGT CACTATGGCG GCCGCATTAG
      GCACCCAGG CTTTACACTT TATGCTTCCG GCTCGTATAA TGTGTGGATT
201    TTGAGTTAGG ATCCGGCGAG ATTTTCAGGA GCTAAGGAAG CTA AAAATGGA
      GAAAAAATC ACTGGATATA CCACCGTTGA TATATCCCAA TGGCATCGTA
301    AAGAACATTT TGAGGCATTT CAGTCAGTTG CTCAATGTAC CTATAACCAG
      ACCGTTCAGC TGGATATTAC GGCCTTTTTA AAGACCGTAA AGAAAAATAA
401    GCACAAGTTT TATCCGGCCT TTATTACAT TCTTGCCCGC CTGATGAATG
      CTCATCCGGA ATTCGGTATG GCAATGAAAG ACGGTGAGCT GGTGATATGG
501    GATAGTGTTC ACCCTTGTTA CACCGTTTTC CATGAGCAA CTGAAACGTT
      TTCATCGCTC TGGAGTGAAT ACCACGACGA TTTCCGGCAG TTTCTACACA
601    TATATTCGCA AGATGTGGCG TGTTACGGTG AAAACCTGGC CTATTTCCCT
      AAAGGGTTTA TTGAGAATAT GTTTTTCGTC TCAGCCAATC CCTGGGTGAG
701    TTTACCAGT TTTGATTTAA ACGTGGCAA TATGGACAAC TTCTTCGCCC
      CCGTTTTTAC CATGGGCAA TATTATACGC AAGGCGACAA GGTGCTGATG
801    CCGCTGGCGA TTCAGTTTCA TCATGCCGTC TGTGATGGCT TCCATGTCGG
      CAGAATGCTT AATGAATTAC AACAGTACTG CGATGAGTGG CAGGGCGGGG
901    CGTAAAGATC TGGATCCGGC TTAATAAAAG CCAGATAACA GTATGCGTAT
      TTGCGCGCTG ATTTTTGCGG TATAAGAATA TATACTGATA TGTATAACCG
1001   AAGTATGTCA AAAAGAGGTG TGCTATGAAG CAGCGTATTA CAGTGACAGT
      TGACAGCGAC AGCTATCAGT TGCTCAAGGC ATATATGATG TCAATATCTC
1101   CGGTCTGGTA AGCACAACCA TGCAGAATGA AGCCCGTCGT CTGCGTGCCG
      AACCTTGAA AGCGGAAAAT CAGGAAGGGA TGGCTGAGGT CGCCCGGTTT
1201   ATTGAAATGA ACGGCTCTTT TGCTGACGAG AACAGGGACT GGTGAAATGC
      AGTTTAAGGT TTACACCTAT AAAAGAGAGA GCCGTTATCG TCTGTTTGTG
1301   GATGTACAGA GTGATATTAT TGACACGCC GGGCGACGGA TGGTGATCCC
      CCTGGCCAGT GCACGTCTGC TGTCAGATAA AGTCTCCCGT GAACTTTACC

```

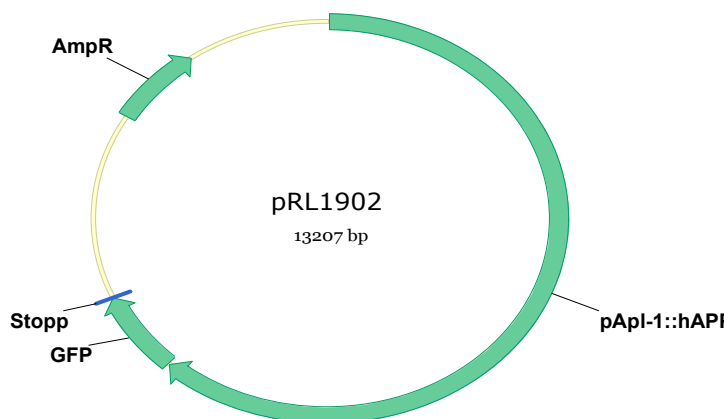
1401 CGGTGGTGCA TATCGGGGAT GAAAGCTGGC GCATGATGAC CACCGATATG
GCCAGTGTGC CGGTCTCCGT TATCGGGGAA GAAGTGGCTG ATCTCAGCCA
1501 CCGCGAAAAAT GACATCAAAA ACGCCATTAA CCTGATGTTC TGGGGAATAT
AAATGTCAGG CTCCCTTATA CACAGCCAGT CTGCAGGTC ACCATAGTGA
1601 CTGGATATGT TGTGTTTTAC AGTATTATGT AGTCTGTTTT TTATGCAAAA
TCTAATTTAA TATATTGATA TTTATATCAT TTTACGTTTC TCGTTCAGCT
1701 TTCTTGATACA AAGTGGTTGA TGTACCGGTA GAAAAAATGA GTAAAGGAGA
AGAACTTTTC ACTGGAGTTG TCCCAATTCT TGTTGAATTA GATGGTGATG
1801 TTAATGGGCA CAAATTTTCT GTCAGTGGAG AGGGTGAAGG TGATGCAACA
TACGGAAAAAC TTACCCTTAA ATTTATTTGC ACTACTGGAA AACTACCTGT
1901 TCCATGGGTA AGTTTTAAACA TATATATACT AACTAACCTT GATTATTTAA
ATTTTCAGCC AACACTTGTC ACTACTTTCT GTTATGGTGT TCAATGCTTC
2001 TCGAGATACC CAGATCATAT GAAACGGCAT GACTTTTTCA AGAGTGCCAT
GCCCCAAGGT TATGTACAGG AAAGAACTAT ATTTTTCAAA GATGACGGGA
2101 ACTACAAGAC ACGTAAGTTT AAACAGTTCG GTACTAACTA ACCATACATA
TTTAAATTTT CAGGTGCTGA AGTCAAGTTT GAAGGTGATA CCCTTGTTAA
2201 TAGAATCGAG TTAAAAGGTA TTGATTTTAA AGAAGATGGA AACATTCTTG
GACACAAATT GGAATACAAC TATAACTCAC ACAATGTATA CATCATGGCA
2301 GACAAACAAA AGAATGGAAT CAAAGTTGTA AGTTTTAAACA TGATTTTACT
AACTAACTAA TCTGATTTAA ATTTTCAGAA CTTCAAAATT AGACACAACA
2401 TTGAAGATGG AAGCGTCAA CTAGCAGACC ATTATCAACA AAATACITCA
ATTGGCGATG GCCCTGTCTT TTTACCAGAC AACCATTACC TGTCCACACA
2501 ATCTGCCCTT TCGAAAGATC CCAACGAAAA GAGAGACCAC ATGGTCCTTC
TTGAGTTTGT AACAGTGTCT GGGATTACAC ATGGCATGGA TGAACATAC
2601 AAATAGCTAA GGAGCTGTGT CTGAGGGAAC CAAGGCCGTC ACCAAGTACA
CTTCCAGCAA GTAAACTAGT GGATCCTAAT TTTGCCGTAT TTTCCATATT
2701 TTGTTTTGTA TATTTATCCA CTCACCCCTT CTCTTTGTCC TGTGAATGAA
CTTGTGCCAA AAAAGCCAAA AATAATTTAC TTTTTTTAAA GACATATTA
2801 AACTTGAAAA CTTGGAACAA TACGGTGC GAAGCGAAAACA GAGACAGAAA
AATGAACAAA GAGATCCGTG AAAAGTGAAC GATGATTTAG GCTTCTTGTT
2901 GGGCGGCGTG GATGAGAGTG ATGTTGTCTC CTTTGAGAAG AATTCCAAC
GAGCGCCGGT CGCTACCATT ACCAACTTGT CTGGTGTCAA AAATAATAGG
3001 GGCCGCTGTC ATCAGAGTAA GTTTAAACTG AGTTCTACTA ACTAACGAGT
AATATTTAAA TTTTCAGCAT CTCGCGCCG TGCCCTGAC TTCTAAGTCC
3101 AATTACTCTT CAACATCCCT ACATGCTCTT TCTCCCTGTG CTCCCACCCC
CTATTTTTGT TATTATCAAAA AAAACTTCTT CTTAATTTCT TTGTTTTTTA
3201 GCTTCTTTTA AGTCACCTCT AACAATGAAA TTGTGTAGAT TCAAAAATAG
AATTAATTCG TAATAAAAAG TCGAAAAAAA TTGTGCTCCC TCCCCCATT
3301 AATAATAATT CTATCCAAA ATCTACACAA TGTTCTGTGT ACACCTCTTA
TGTTTTTTTT ACTTCTGATA AATTTTTTTT GAAACATCAT AGAAAAAACC
3401 GCACACAAA TACCTTATCA TATGTTACGT TTCAGTTTAT GACCGCAATT
TTTATTTCTT CGCACGCTG GGCCTCTCAT GACGTCAAAT CATGCTCATC
3501 GTGAAAAAGT TTTGGAGTAT TTTTGGAAAT TTTCAATCAA GTGAAAGTTT
ATGAAATTA TTTTCCCTGCT TTTGCTTTTT GGGGGTTTCC CCTATTGTTT
3601 GTCAAGAGTT TCGAGGACGG CGTTTTTCTT GCTAAAATCA CAAGTATTGA
TGAGCACGAT GCAAGAAAGA TCGGAAGAAG GTTTGGGTTT GAGGCTCAGT
3701 GGAAGGTGAG TAGAAGTTGA TAATTTGAAA GTGGAGTAGT GTCTATGGGG
TTTTTGCCCT AAATGACAGA ATACATTTCC AATATACCAA ACATAACTGT
3801 TTCCTACTAG TCGGCCGTAC GGGCCCTTTC GTCTCGCGCG TTTCCGGTGAT
GACGGTGAAA ACCTCTGACA CATGCAGCTC CCGGAGACGG TCACAGCTTG
3901 TCTGTAAGCG GATGCCGGGA GCAGACAAGC CCGTCAGGGC GCGTCAGCGG
GTGTTGGCGG GTGTGCGGGC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT
4001 GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG
GAGAAAAATC CGCATCAGGC GGCTTAAAG GCCTCGTGAT ACGCCTATTT
4101 TTATAGGTTA ATGTATGAT AATAATGGTT TCTTAGACGT CAGGTGGCAC
TTTTCGGGGA AATGTGCGCG GAACCCCTAT TTGTTTATTT TTCTAAATAC
4201 ATTTCAAATAT GTATCCGCTC ATGAGACAAT AACCTGATA AATGCTTCAA
TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT CAACATTTCC GTGTGCGCCT
4301 TATTCCCTTT TTTGCGGCAT TTTGCCCTCC TGTTTTTGCT CACCCAGAAA
CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT
4401 TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG ATCCTTGAGA GTTTTCGCCC
CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT TAAAGTTCTG CTATGTGGCG
4501 CCGTATTATC CCGTATTGAC GCCGGGCAAG AGCAACTCGG TCGCCGCATA
CACTATTCTC AGAATGACTT GGTGAGTAC TCACCAGTCA CAGAAAAGCA
4601 TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT ATGCAGTGCT GCCATAACCA
TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC TGACAACGAT CGGAGGACCG
4701 AAGGAGCTAA CCGCTTTTTT GCACAACATG GGGGATCATG TAACTCGCTT
TGATCGTTGG GAACCGGAGC TGAATGAAGC CATACCAAAC GACGAGCGTG

```

4801  ACACCACGAT GCCTGTAGCA ATGGCAACAA CGTTGCGCAA ACTATTAACT
      GGCGAACTAC TTACTCTAGC TTCCCAGCAA CAATTAATAG ACTGGATGGA
4901  GGCGGATAAA GTTGCAGGAC CACTTCTGCG CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT
      GGTTTATTGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG AGCGTGGGTC TCGCGGTATC
5001  ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC TCCCGTATCG TAGTTATCTA
      CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA ACGAAATAGA CAGATCGCTG
5101  AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGGT AACTGTCAGA CCAAGTTTAC
      TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAAACCT CATTTTTAAT TTAAAAGGAT
5201  CTAGGTGAAG ATCCTTTTGT ATAATCTCAT GACCAAAATC CCTTAAACGTG
      AGTTTTTCGT CCACTGAGCG TCAGACCCCG TAGAAAAGAT CAAAGGATCT
5301  TCTTGAGATC CTTTTTTTCT GCGCGTAATC TGCTGCTTGC AAACAAAAAA
      ACCACCGCTA CCAGCGGTGG TTTGTTTGCC GGATCAAGAG CTACCAACTC
5401  TTTTCCGAA GGTAACTGGC TTCAGCAGAG CGCAGATACC AAATACTGTC
      CTTCTAGTGT AGCCGTAGTT AGGCCACCAC TTCAAGAACT CTGTAGCACC
5501  GCCTACATAC CTCGCTCTGC TAATCCTGTT ACCAGTGGCT GCTGCCAGTG
      GCGATAAGTC GTGTCTTACC GGGTTGGACT CAAGACGATA GTTACCGGAT
5601  AAGGCGCAGC GGTCCGGCTG AACGGGGGGT TCGTGACAC AGCCAGCTT
      GGAGCGAACC ACCTACACCG AACTGAGATA CCTACAGCGT GAGCATTGAG
5701  AAAGCGCCAC GCTTCCCGAA GGGAGAAAGG CGGACAGGTA TCCGGTAAAG
      GGCAGGGTCG GAACAGGAGA GCGCACGAGG GAGCTTCCAG GGGGAAACGC
5801  CTGGTATCTT TATAGTCCTG TCGGGTTTCG CCACCTCTGA CTTGAGCGTC
      GATTTTTGTG ATGCTCGTCA GGGGGGCGGA GCCTATGGAA AAACGCCAGC
5901  AACGCGCCCT TTTTACGGTT CCTGGCCTTT TGCTGGCCTT TTGCTCACAT
      GTTCTTTCCT GCGTTATCCC CTGATTCTGT GGATAACCGT ATTACCGCCT
6001  TTGAGTGAGC TGATACCGCT CGCCGCAGCC GAACGACCGA GCGCAGCGAG
      TCAGTGAGCG AGGAAGCGGA AGAGCGCCCA ATACGCAAAC CGCCTCTCCC
6101  CGCGCGTTGG CCGATTCATT AATGCAGCTG GCACGACAGG TTTCCCGACT
      GGAAAGCGGG CAGTGAGCGC AACGCAATTA ATGTGAGTTA GCTCACTCAT
6201  TAGGCACCCC AGGCTTTACA CTTTATGCTT CCGGCTCGTA TGTTGTGTGG
      AATTGTGAGC GGATAACAAT TTCACACAGG AAACAGCTAT GACCATGATT
6301  ACGCCAAGCT GTAAGTTTAA ACATGATCTT ACTAACTAAC TATTCTCATT
      TAAATTTTCA GAGCTTAAAA ATGGCTGAAA TCACTCACAA CGATGGATAC
6401  GCTAACAACT TGGAAATGAA ATAAGCTTGC ATG

```

7.2.3 pRL1902



```

1      CCTGCAGGGT ACAAAAAAGC AGGCTCCGAA TTCGCCCTTG TGGATCCTGT
      GGGATATGAT TAAAACTTTT TTTTTATGTT GGAAAATTAT TTTGTACATA
101    ATTTTAAAAA TAATTGAAAA AAATTGAAGG AAAAAAATGT TTTTGTATCA
      CCGTTTTTCGA AAAATTGGAC TCATAATAAA AGCTTTCAAA CTATTTTTGA
201    GAAAATTTAT TATGATACTT GTCATTCTA GCACCATATG AATAATTTTC
      GATTTTTTTT TTCACAGGCC GTATCCTGAT TTTCTAAAAA ATTTGGCTTT
301    ACATGTTGTA CTCTTGCTAT GGGGAACACT GTGTTTGTGT TTCTTTCGAA
      AGTTGATACC CAGAGGAATT TAGATAATAA CTCCGTTTAC TATTGGCTCA
401    GAGAAAATAG TTGAGGGGTG TCATCTTCGA AAAATAATAT TTGATATGCC
      GAGTGCGAAA AATGAGTCTG AACGCCCTCC AACGTTCTCA TCTTTCAATT
501    CCAGTGTTTA TCATTTTGTA ACTGAATCTT CAATATTAAT TGTTTCGCAC

```

601 GGAAAATCAC ATGCCACACT GACTTCACAA CCGTTACGTA TAAGTTGATC
 CAAATCCCAA TTAAGAAACC TCGCAATAAT TCAAGTGTTC CACTTTTCGA
 ATTTCCGTTT GCTTACGTAA TCGTTCACAT ACCAGTTCGC TCCTTTTGCC
 701 GAAAGTGAG GCACACTGTTT GTATGTGAGG GAAGGAAGGT TGAGTCACTG
 TAATACGTAT TCACTGTGCA ACAGAACAAT TTCGTAACGT TACGTTTGAA
 801 TTGCAAAATA CCATATGTCC TCATTTTTTCT CAGAAGAACG AACACATTTT
 TTGTTCTTTT TTTTCGTTCC AAAATGTTTC TGAAAATGTA GAGTTATACA
 901 CATTATGAG GTGGTCTATG CATTTTTTTGT GTTAAAAGGG TAACATTTGT
 GCTTTGAAAT GGGGCCAAAA GTGCACCTTT TCGTATTTCC TGGTTCCTTC
 1001 CTCCTAGATT TCTTTATTTCC AAGAATGATT TTTCCCTGGA GAATTGCTTT
 TTCGCTTTT CTTTCTACAT ATCTAGCTCG AATTTATAT CAATCATTT
 1101 AAAAAGCAAC ATACTTGCTT CCTCGTACGA ATGGCAGCTT ATCCCTTTAA
 ATCCTGTAGA ATAATTTGTG ATTTTTGAGG GTTTTTTTTAC ATTTTTTTTT
 1201 AATTTTCGAT GGTCAATCAA CCCCACCAA AATGCGATAG GATAATTTAG
 TCGTGTTCCT AATCCGCAC TTAGCTCAAG TTCAATCAA TTATATGGGA
 1301 AGGGGGTACC TGCAGCGTGA AGTGCGGAAA GGTGTCGCAT TTGTTCCGAG
 GCTCATATTT CCCACCGCTT GAATAAGCTC GAGCTTGTT CTACATGTGA
 1401 TACGGCAACA TTTCAAATGT CATGTTACAT TCTAGTTGTT GTACTCTAGG
 TTTTCATCTAA CAAAAAATA AATTTTTGAA ATTATATCAC ATTATCTAT
 1501 AATAGTTGCT AACATTTTCT GTCAAGTTGA AAGAAAGTAC CAATTTTCTC
 CACCTGGTAT TGAAATAGTA CATTATTTTT GTTCTAACGG TGAAGTACGA
 1601 CATGTGAGGA AATAATTTAA AACCTTTTTT TATCATGCTA AATTAACCGA
 ATGTCAAAAA CATTTTTTTAT TTCGAGTCAA ATATTGGTGA AAATCGAGTT
 1701 TGCTTTTTTA GAAACGTAAA CTGATTTTGC ATGTTCTATC CTCTACAATA
 TTGTAATATC AACACTTTAG ACATAACTAA AGCATAGAAC TGGATGAAAA
 1801 AAATTTGTTT CATCGACAAT TTAATAAAAA TTGGACTACA GAGTTTCCAC
 TGTTTTTTGA CTCAAAATA CAAAATTTT CACTATTAGG AAATATCATA
 1901 GGAAAGATCT TTTTATCATT TCCTCACAGA CCGTAGTTCA CATTAAATCT
 TCTAATCTAC TTCACAATAC AATTTTTGAT CTTCAGTATC AACCTAGACC
 2001 GAATAGTTAA AACATTCATA ATTTGAAGCC CTCACAACAG GAGGTAAGG
 TTCCCGTACG TATACATTTG AGAAGACACT CATAGAAGTT TGTGTGAAAG
 2101 AGGAGGGCAT CACCATAGTG TTGTCCAACC AACCAGCAGAA CCGGTTAGGA
 CCCTTGCCGC CGCCACCACT CTCCGACCGC AGAGAGACCG ATCCATCCAT
 2201 GCACCTCTTT CTCTAATAAT CTCTGCTTCT CTGGTGAATC TCTTCAAATT
 TAGTACTGTA TTTTAGGCGG TAGGGGGCGT CACCACCACC TTTTGTCTC
 2301 CCATACCTCT CTGCTTTTCT CACACTTCAT GCAGTTCTCA TCAACTACCG
 TCCGATCATG GTTTTTTTT ATTGATTTCT TTGTCGTTG TGTCGCGTGG
 2401 TGCATTGTTT TTCTGATTGA AAATTTTATA GATCCCAGTG AAACCGACTT
 GTGATTGATG GTCATAAAAA GTCGGTCACT AATTTATCAT TACTTCCTTT
 2501 TATATCCAAA ATATGTATTT CAAAAACGA AAATTTTCTT ATTATAGTTT
 CTTTTTATTT CTTCTTTAAT CGAGTACGTG AGAGCTGTTA GTTATGATAC
 2601 ATATTCATGA TGTTGGATGT TGGTCTGAAT TTAGAATATA GATGTTTGAA
 TCCGCAAGTT GTCTCCGGGG GCCCCTTCTG CAAATGTACG CATGGAATGT
 2701 ATCTTCATAA AATAAAAAAG CTCAGAAAGC ATCAGAAACG AAGGCAAGTA
 AAAGTTTCTG GAAACAAGTT GCCAAAATTA TTAGTGATTT TTTATATCAA
 2801 ATTTTGATTA TAAGGATGAC CTTTCTACAT TCCAACGTTT GATTGTTTTG
 TCCTATGATT AAAAAAAC CCCCACAC AGAAAAAAT CAACCGTTT
 2901 AGCATTCCAA TCAGTCATGC AGAAAAAAT CCCTACAAA GTCATCCGTT
 TTCTTCATCT TAAAGTTTAT CAAATTAGAG CTCAACGCAA ACATCAGCAC
 3001 CAAAATCTCA TAAAGACAAA TCTGGCATT AATGCTCGGA AGTGTGCAAT
 TTTACAACCT TCAAGTTGCG GTTTTGAAAT GTTTTCAAAA CTGGTTTGAA
 3101 AATCTTCGAC TAACTTAGTT ATTAATAAAC CCACGTAGTG AGATGAAGTT
 ACAAAGTGCT CAGCGAGTAT CTTACAGAGT TCAAACCAG AAAATGTAAA
 3201 TGTCAGCGG AAAAAGGTCA TATTGCTTCC TGCTACTTT TGCTCTTGA
 ACATCCGTTT GAAAAACATT CAGACAGTGG AGCGGATTT CATAGATTTT
 3301 GATATTTCTT GTTTTTTTTT TGAAAATGGG TTTTCAATTT TGATGTCAGG
 TGCATCACAT GAGCATTAGC AATATCTATG GTTTCCAAA ACGGTGCTTC
 3401 TGCGTCTCTT TTCCAAATTT CCCGTTCTC TTCTTAGAGA CGATCTATCG
 GATGTTATTA TTATTTCTAT TTAATTTAT ATCCTTTATC CTTTGATAAA
 3501 CCTCATGCAG TTTGGCAAAC TGGTCAAGAA CGCCCATT TCTGCTTAGC
 TCCGCCAGC TTCCCTTATT CTGCCCAG CTTACTTTT AATGTTCTCA
 3601 CCTTATCAAC GCCACCCAGA GTGTGTGAG AGGCAAAGTT AAACCAACTG
 CGGAAGGCAT TCGTTTTCCG ACATCAATA TATTTAAAA ATCAAAATC
 3701 TTCTCCCAAT GTTGACACTG CGTTTTTGG TAATCTTCTC CGATGTTTCC
 CGATCCACAT TTTTTTCTC CATCCTTGAA TCAAAAACAG ATAGAGTGAA
 3801 TAGAATTTG ATAAAAATCT AAATCAATA GGAGAAAAA AAGTTTCCAA
 GTACAGTATC CATTCTTCTA CAAGTCTCTA AGTCTCTCTT CTTCTCTCT
 3901 AATCTTGTTC AGGAAGAGCT AACCTTGTTC AGTTTTTTGT GCTGCTCCTG

4001 TTGCTGATGC TCTTTTTTCAT TTGTACATCC TCCTTTTTCTC TTCTTCTTTG
 TGTCTGCTTG CAACAACCAT CTCGGCATCT TCGGAGCATC GACATTGAAC
 4101 GATAATTGGG TTTTAGGTGC CTGAATTCG ACGGAGGGAG GCCTCAGGGT
 TTCATTGAC ATGGCACAAC GAGATAAAGA AAAAACCACA AAATCGACGA
 ATCAACATTG AAAAGTTGAC AAAAAATTAA ACATTCTTCC TTGTTCTTTT
 4201 TTGGTTCCGT TTCCTTCTTG TGTGTGAGCT CTTTGGTTCC TTATATCTGT
 CTATCAATCT TCAAAAAGTTC AGAATTCTTG TGCTTGTTC CATACCCATT
 4301 TTTGGCAGTA TGATGTGTAC ATACTTCACT TCAAAAAGTTT TGTGGAGAG
 AACTACTTGT ATGTTTGCCT TTGTGAGAGC GATGTCTGTT TTCATTTCGT
 4401 CATACTCCAT CTCTTCATCG TGTTTCTATC AATCTTCTTT TGTAATTTAT
 CGATTGTACC CTCTACCCAC GTTCACTTTT ATCATTACCG TGATTTGTCTG
 4501 TCGGCGCTGC TTTCCCGAGT GTGTGTGATG CTACACAGCC ATTTCCCCCC
 ATTTCTTCAA TTTACTAATT CCTTCATTCC AATTTTGGAT GCGGCTGATC
 4601 TGATCCGAAA CGTCATGTCA TGCAACCCAA ATGTTCTCAG TTCTTGGTTG
 AAACGGGGAG GGTCATAAAA GTCGCTCCAC TATACGATAT CACTTCAACT
 4701 TTACGCACAA TACTCATCAT CATTACATCC TTGCACTCTT CCACAATGTT
 TTTTTTTTCA ATTCTAAAA CATTTCCTC TTTTCTTTT AACAGATTGA
 4801 CCTATATTTT TTTCTAATTC AGACATTTT TCAGCCATGA CGGTGGGTAA
 ACTAATGATT GGCTTACTTA TACCGATTCT TGTCGCCACA GTTTACGCAG
 4901 AGGTATGTTT GTTTAATTGC AAAGGGGTTT GCGCGGGTGC ATTCCCACTG
 ACTCGTAACA CCAAATTGAT TGAAACCACC CGACCAGTCA TACGACTGGC
 5001 ATTTAGAAAA CCAAAGTTAT TTTTGTAAA GAACTCAATA TTTTGTCAA
 AGATGCTTAT TGTGTAATCA CTTTAATCAG AACTAATCTA AGATTATATA
 5101 TGACTAGAAC TCTCGACTAG ATGTTCTATT TCCTAGCAAC GAAAACGAAC
 AAAATTGAAT AATGCAAGTG CACTTTATTA GACTTTCTGG TCTCTGGGG
 5201 TAAAAGGGCA ATGTTGAGAG AATGGATTAC ATATTTTGCA TACTGTTGGA
 AGTCTTACAT GAACATATTA TAATAGCCTA ACTTGTGCAA AAGCAATCAA
 5301 GACTCAATCT CACAGCTCTC AAGCACCCCC ACTCAAGTGC CAATTGCAAA
 ATATTTTTCG AGGGTTCCTC AGCAGGCAGC AAGCGACATG AGAAGTTCAT
 5401 TCCAATGGTC GCATTTTCAT GTGGATACCG CAACCAGTAT ATGACCGAAG
 AGGGATCATG GAAGACTGAT GATGAACGAT ATGCCACCTG CTTCTCTGGC
 5501 AAACCTGACA TCCTCAAGTA CTGCCGCAAG GTATTGTTTT GTATGGTTTT
 GGGTTGAACA CAATCAAGCA ATTTTCAATA AAAGTTTACG CCTTTTTTGC
 5601 AAACATTTAA TTTGGCGTTT TCATGCTCTA AGTCTTGCTC CGTGTAGTCA
 CAAATGTCAC AAATACAATT GAAATAGGGA TAGGACCAAC ATTGCAAGGA
 5701 AGACAATTA ACTTTAAACA ACCATGGTTC TCTGGCTTTC ACAAACCTTC
 CAATCCTTCA GGGATTTTTT GCTGCTTCTC ATAGATTGTT CCGGAAACAA
 5801 AACAGACATA GAGCAAAGAT ATACACATTC CCCGCGTCT TCTTTTTTCTC
 TCCAACAAG GCGTAAATTT GAGTAAGGAC CTCCCCTCGG TTAGTCCCAT
 5901 GGGGAGGTGA AGTTGAACAC GCGACTCGAT TGCACACATG AGTTTCTCAA
 GTTGGTAGTT GTACACATTT CTAAGAAATG GGGACACAAG AAATGTAACG
 6001 AATCAAATCT CGTTTCAGGC TTATCCATCC ATGCTGCCCG GTTTGGCACT
 GCTCCTGCTG CCCGCTGGA CGGCTCGGGC GCTGGAGGTA CCCACTGATG
 6101 GTAATGCTGG CCTGCTGGCT GAACCCAGA TTGCCATGTT CTGTGGCAGA
 CTGAACATGC ACATGAATGT CCAGAAATGGG AAGTGGGATT CAGATCCATC
 6201 AGGGACCAAA ACCTGCATTT ATACCAAGGA AGGCATCCTG CAGTATTGCC
 AAGAAGTCTA CCCTGAACTG CAGATCACC AATGTGGTGA AGCCAACCAA
 6301 CCAGTGACCA TCCAGAACTG GTGCAAGCGG GGCCGCAAGC AGTGCAAGAC
 CCATCCCCAC TTTGTGATTC CCTACCCTG CTTAGTTGGT GAGTTTGTAA
 6401 GTGATGCCCT TCTCGTTTCT GACAAGTGA AATCTTACA CCAGGAGAGG
 ATGGATGTTT GCGAAACTCA TCTTCACTGG CACACCGTCC CCAAAGAGAC
 6501 ATGCAGTGAG AAGAGTACCA ACTTGATGTA CTACGGCATG TTGCTGCCCT
 GCGGAATTGA CAAGTTCCGA GGGGTAGAGT TTGTGTGTTG CCCACTGGCT
 6601 GAAGAAAGTG ACAATGTGGA TTCTGCTGAT GCGGAGGAGG ATGACTCGGA
 TGTCTGGTGG GGCGGAGCAG ACACAGACTA TGCAGATGGG AGTGAAGACA
 6701 AAGTAGTAGA AGTAGCAGAG GAGGAAGAAG TGGCTGAGGT GGAAGAAGAA
 GAAGCCGATG ATGACGAGGA CGATGAGGAT GGTGATGAGG TAGAGGAAGA
 6801 GGCTGAGGAA CCCTACGAAG AAGCCACAGA GAGAACCACC AGCATTGCCA
 CCACCACCAC CACCACCACA GAGTCTGTGG AAGAGGTGGT TCGAGTTCTT
 6901 ACAACAGCAG CCAGTACCCC TGATGCCGTT GACAAGTATC TCGAGACACC
 TGGGGATGAG AATGAACATG CCCATTTCCA GAAAGCCAAA GAGAGGCTTG
 7001 AGGCCAAGCA CCGAGAGAGA ATGTCCCAGG TCATGAGAGA ATGGGAAGAG
 CCAGAACGTC AAGCAAAGAA CTTGCCATAA GCTGATAAGA AGGCAGTTAT
 7101 CCAGCATTTT CAGGAGAAAG TGGAATCTTT GGAACAGGAA GCAGCCAACG
 AGAGACAGCA GCTGGTGGAG ACACACATGG CCAGAGTGGA AGCCATGCTC
 7201 AATGACCGCC GCGCCTGGC CCTGGAGAAC TACATCACCG CTCTGCAGGC
 TGTTCTTCTT CGGCCTCGTC ACGTGTCAA TATGCTAAAG AAGTATGTCC
 7301 GCGCAGAACA GAAGGACAGA CAGCACACCC TAAAGCATTT CGAGCATGTG

CGCATGGTGG ATCCCAAGAA AGCCGCTCAG ATCCGGTCCC AGGTTATGAC
 7401 ACACCTCCGT GTGATTTATG AGCGCATGAA TCAGTCTCTC TCCCTGCTCT
 CCAACGTGCC TGCAGTGGCC GAGGAGATTC AGGATGAAGT TGATGAGCTG
 7501 CTTCAGAAAAG AGCAAAACTA TTCAGATGAC GTCTTGCCCA ACATGATTAG
 TGAACCAAGG ATCAGTTACG GAAACGATGC TCTCATGCCA TCTTTGACCG
 7601 AAACGAAAAC CACCGTGGAG CTCCTTCCCG TGAATGGAGA GTTCAGCCTG
 GACGATCTCC AGCCGTGGCA TTCTTTTGGG GCTGACTCTG TGCCAGCCAA
 7701 CACAGAAAAC GAAGTTGAGC CTGTTGATGC CCGCCCTGCT GCCGACCAGG
 GACTGACCAC TCGACCAGGT TCTGGGTTGA CAAATATCAA GACGGAGGAG
 7801 ATCTCTGAAG TGAAGATGGA TGCAGAATTC CGACATGACT CAGGATATGA
 AGTTTCATCAT CAAAAATTGG TGTTCTTTGC AGAAGATGTG GGTTCAAAACA
 7901 AAGGTGCAAT CATTGGACTC ATGGTGGGCG GTGTTTTCAT AGCGACAGTG
 ATCGTCATCA CCTTGGTGAT GCTGAAGAAG AAACAGTACA CATCCATTCA
 8001 TCATGGTGTG GTGGAGGTG ACGCCGCTGT CACCCAGAG GAGCGCCACC
 TGTCCAAGAT GCAGCAGAAC GGCTACGAAA ATCCAACCTA CAAGTCTTTT
 8101 GAGCAGATGC AGAACAAGGG CGAATTCGAC CCAGCTTCTT TGTACGTACC
 GGTAGAAAAA ATGAGTAAAG GAGAAGAACT TTTACTGGA GTTGTCCCAA
 8201 TTCTTGTGTA ATTAGATGGT GATGTTAATG GGCACAAATT TTCTGTGAGT
 GGAGAGGGTG AAGGTGATGC AACATACGGA AAACCTACCC TTAAATTTAT
 8301 TTGCACTACT GGAAAACTAC CTGTTCCATG GGTAAGTTTA AACATATATA
 TACTAACTAA CCCTGATTAT TTAAATTTTC AGCCAACACT TGTCACTACT
 8401 TTCTGTTATG GTGTTCAATG CTTCTCGAGA TACCCAGATC ATATGAAAACG
 GCATGACTTT TTCAAGAGTG CCATGCCCGA AGGTTATGTA CAGGAAAGAA
 8501 CTATATTTTT CAAAGATGAC GGGAACTACA AGACACGTA GTTTAAACAG
 TTCGGTACTA ACTAACCTA CATATTTAAA TTTTCAGGTG CTGAAGTCAA
 8601 GTTTGAAGGT GATACCCTTG TTAATAGAAT CGAGTTAAAA GGTATTGATT
 TTAAAGAAGA TGGAAACATT CTTGGACACA AATTGGAATA CAACTATAAC
 8701 TCACACAATG TATACATCAT GGCAGACAAA CAAAAGAAATG GAATCAAAGT
 TGTAAGTTTA AACATGATTT TACTAACTAA CTAATCTGAT TTAAATTTTC
 8801 AGAACTTCAA AATTAGACAC AACATTGAAG ATGGAAGCGT TCAACTAGCA
 GACCATTATC AACAAAAATAC TCCAATTGGC GATGGCCCTG TCCTTTTACC
 8901 AGACAACCAT TACCTGTCCA CACAATCTGC CCTTTCGAAA GATCCCAACG
 AAAAGAGAGA CCACATGGTC CTTCTTGAGT TTGTAACAGC TGCTGGGATT
 9001 ACACATGGCA TGGATGAACT ATACAAATAG CTAAGGAGCT CCACCGTGG
 CGGCCGTCT AGAACTAGTC CACCAAAGCC ATCTGCCAAG GGAGCCAAGA
 9101 AGGCCGCCAA GACCGTCGTT GCCAAGCCAA AGGACGGAAA GAAGAGACGT
 CATGCCCGCA AGGAATCGTA CTCCGTCTAC ATCTACCGTG TTCTCAAGCA
 9201 AGTTCCACCA GACACCGGAG TCTCCTCAA GGCCATGTCT ATCATGAACT
 CCTTCGTCOA CGATGTATTC GAACGCATCG CTTGGAAGC TTCCCGTCTT
 9301 GCTCATTACA ACAAACGCTC AACGATCTCA TCCCGCGAAA TTCAAACCGC
 TGTCCGTTTG ATTCTCCAG GAGAACTTGC CAAGCACGCC GTGTCTGAGG
 9401 GAACCAAGGC CGTCACCAAG TACTTCCA GCAAGTAAAC TAGTGGATCC
 TAATTTTGCC GTATTTTCCA TATTTTGTGTT TGTATATTTA TCCACTCACC
 9501 CCCTCTCTTT GTCCGTGTA TGAACCTGTG CCAAAAAAGC CAAAAATAAT
 TTACTTTTTTT TAAAGACATA TTA AAAACTTG AAAACTTGGA ACAATACGGT
 9601 GCGAAAGCGA AACAGAGACA GAAAAATGAA CAAAGAGATC CGTGAAAAGT
 GAACGATGAT TTAGGCTTCT TGTTGGGCGG CGTGGATGAG AGTGATGTTG
 9701 TCTCCTTTGA GAAGAATTCC AACTGAGCGC CGGTGCGTAC CATTACCAAC
 TTGTCTGGTG TCAAAAATAA TAGGGGCCG TGTCATCAGA GTAAGTTTAA
 9801 ACTGAGTTCT ACTAACTAAC GAGTAATATT TAAATTTTCA GCATCTCGCG
 CCCGTGCCTC TGACTTCTAA GTCCAATTAC TCTTCAACAT CCCTACATGC
 9901 TCTTCTCTCC TGTGCTCCCA CCCCCTATTT TTGTTATTAT CAAAAAACT
 TCTTCTTAAT TTCTTTGTTT TTTAGCTTCT TTTAAGTCAC CTCTAACAAT
 10001 GAAATTGTGT AGATTCAAAA ATAGAATTA TTCGTAATAA AAAGTCGAAA
 AAAATTGTGC TCCCTCCCC CATTAATAAT AATTCTATCC CAAAATCTAC
 10101 ACAATGTTCT GTGTACTACT CTTATGTTTT TTTTACTTCT GATAAATTTT
 TTTTGAACA TCATAGAAAA AACCGCACAC AAAATACCTT ATCATATGTT
 10201 ACGTTTCAGT TTATGACCGC AATTTTTATT TCTTCGCACG TCTGGGCCCTC
 TCATGACGTC AAATCATGCT CATCGTGAAG AAGTTTTGGA GTATTTTTGG
 10301 AATTTTTCAA TCAAGTGAAG GTTTATGAAA TTAATTTTCC TGCTTTTGCT
 TTTTGGGGGT TTCCCTATT GTTTGTCAAG AGTTTCGAGG ACGGCGTTTT
 10401 TCTTGCTAAA ATCACAAGTA TTGATGAGCA CGATGCAAGA AAGATCGGAA
 GAAGGTTTGG GTTTGAGGCT CAGTGAAGG TGAGTAGAAG TTGATAATTT
 10501 GAAAGTGGAG TAGTGTCTAT GGGGTTTTTG CCTTAAATGA CAGAATACAT
 TCCCAATATA CCAAACATA CTGTTTCCCTA CTAGTCGGCC GTACGGGCC
 10601 TTTGCTCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA
 GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC
 10701 AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG GCGGGTGTG GGGCTGGCTT

10801 AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG AGAGTGCACC ATATGCGGTG
TGAAATACCG CACAGATGCG TAAGGAGAAA ATACCGCATC AGGCGGCCTT
AAGGGCCTCG TGATACGCCT ATTTTTATAG GTTAATGTCA TGATAATAAT
10901 GGTTTCTTAG ACGTCAGGTG GCACTTTTCG GGGAAATGTG CGCGGAACCC
CTATTTGTTT ATTTTTCTAA ATACATCAA ATATGTATCC GCTCATGAGA
11001 CAATAACCCT GATAAATGCT TCAATAATAT TGAAAAAGGA AGAGTATGAG
TATTCAACAT TTCCGTGTCG CCCTTATTC CTTTTTTGCG GCATTTTGCC
11101 TTCTTGTGTT TGCTCACCCA GAAACGCTGG TGAAAGTAAA AGATGCTGAA
GATCAGTTGG GTGCACGAGT GGGTTACATC GAACTGGATC TCAACAGCGG
11201 TAAGATCCTT GAGAGTTTTC GCCCCGAAGA ACGTTTTCCA ATGATGAGCA
CTTTTAAAGT TCTGCTATGT GGCGCGGTAT TATCCCGTAT TGACGCGGGG
11301 CAAGAGCAAC TCGGTGCGCG CATACTACTAT TCTCAGAAATG ACTTGTTGA
GTACTCACCA GTCACAGAAA AGCATCTTAC GGATGGCATG ACAGTAAGAG
11401 AATTATGCAG TGCTGCCATA ACCATGAGTG ATAACACTGC GGCCAACTTA
CTTCTGACAA CGATCGGAGG ACCGAAGGAG CTAACCCTT TTTTGACAAA
11501 CATGGGGGAT CATGTAATC GCCTTGATCG TTGGGAACCG GAGCTGAATG
AAGCCATAC AAACGACGAG CGTGACACCA CGATGCCTGT AGCAATGGCA
11601 ACAACGTTGC GCAAACTATT AACTGGCGAA CTACTTACTC TAGCTTCCCG
GCAACAATTA ATAGACTGGA TGGAGGCGGA TAAAGTTGCA GGACCACTTC
11701 TGCGCTCGGC CTTTCCGGCT GGCTGGTTTA TTGCTGATAA ATCTGGAGCC
GGTGAGCGTG GGCTCGCGG TATCATTGCA GCAC TGGGGC CAGATGGTAA
11801 GCCCTCCCGT ATCGTAGTTA TCTACACGAC GGGGAGTCAG GCAACTATGG
ATGAACGAAA TAGACAGATC GCTGAGATAG GTGCCCTACT GATTAAGCAT
11901 TGGTAACTGT CAGACCAAGT TTAATCATAT ATACTTTAGA TTGATTTAAA
ACTTCATTTT TAATTTAAAA GGATCTAGGT GAAGATCCTT TTTGATAATC
12001 TCATGACCAA AATCCCTTAA CGTGAGTTTT CGTTCCACTG AGCGTCAGAC
CCCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA GATCCTTTTT TTCTGCGCGT
12101 AATCTGCTGC TTGCAAACAA AAAAACACC GCTACCAGCG GTGGTTTGTT
TGCCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTC CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC
12201 AGAGCGCAGA TACCAAATAC TGTCCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA
CCACTTCAAG AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC
12301 TGTTACCAGT GGCTGCTGCC AGTGCGGATA AGTCGTGTCT TACCGGGTTG
GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG CAGCGGTCCG GCTGAACGGG
12401 GGGTTCGTGC ACACAGCCA GCTTGGAGCG AACGACCTAC ACCGAACTGA
GATACCTACA GCGTGAGCAT TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA
12501 AAGCGGACA GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC
GAGGGAGCTT CCAGGGGAA ACGCCTGGTA TCTTTATAGT CCTGTGGGT
12601 TTCGCCACT CTGACTTGAG CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG
CGGAGCCTAT GGAAAAACGC CAGCAACGCG GCCTTTTTTAC GGTTCCTGGC
12701 CTTTTGCTGG CTTTTGCTC ACATGTTCTT TCCTGCGTTA TCCCCTGATT
CTGTGGATAA CCGTATTACC GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC
12801 AGCCGAACGA CCGAGCGCAG CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG CGGAAGAGCG
CCCAATACGC AAACCGCCTC TCCC CGCGG TTGGCCGATT CATTAAATGCA
12901 GCTGGCACGA CAGGTTTCCC GACTGAAAAG CGGGCAGTGA GCGCAACGCA
ATTAATGTGA GTTAGCTCAC TCATTAGGCA CCCCAGGCTT TACACTTTAT
13001 GCTTCCGGCT CGTATGTTGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTTACA
CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGCCA AGCTGTAAGT TTAAACATGA
13101 TCTTACTAAC TAACATATCT CATTAAATTT TTCAGAGCTT AAAAATGGCT
GAAATCACTC ACAACGATGG ATACGCTAAC AACTTGGAAA TGAAATAAGC
13201 TTGCATG