

Substratdimerisierung und A β -Produktion im γ -Sekretase-Komplex

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anne Botev
geb. Siekhaus
aus Hagen

Juni 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerd Multhaup am Institut für Chemie und Biochemie des Fachbereichs Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup

2. Gutachter: Prof. Dr. Ferdinand Hucho

Disputation am 05.08.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Die Alzheimer-Krankheit	7
1.2. APP und seine Prozessierung	7
1.3. A β -Peptide: die Suche nach der toxischen Form	10
1.4. Der γ -Sekretase-Komplex	11
1.4.1. Presenilin	12
1.4.2. Nicastrin, Aph-1 und Pen-2	15
1.4.3. Assemblierung des γ -Sekretase-Komplexes	16
1.4.4. Stöchiometrie des γ -Sekretase-Komplexes	17
1.4.5. γ -Sekretase-modulierende Proteine	17
1.4.6. Schnittmechanismus der γ -Sekretase	18
1.5. Einfluss der APP-Dimerisierung auf die A β -Produktion	19
1.5.1. Einfluss der GxxxG-vermittelten Dimerisierung auf die A β -Produktion	20
1.5.2. Einfluss von γ -Sekretase-Modulatoren auf A β -Produktion und APP-Dimerisierung	21
1.6. Zielsetzung	23

2. Ergebnisse

2.1. Untersuchung des Oligomerisierungszustandes von rekombinantem C100	24
2.1.1. Aufreinigung von C100	24
2.1.2. MTSL-Markierung von C100 zur ESR-Analyse	26
2.1.3. Oligomerisierungszustand von C100	28
2.2. Bindung von γ -Sekretase-Modulatoren an C100	30
2.2.1. Konzentrationsabhängige Bindung von Sulindacsulfid an C100	31
2.2.2. Verstärkte Bindung von Sulindacsulfid an C100-Dimere	32
2.2.3. Modellierung der Sulindacsulfid-Bindungsstelle des C100	33
2.3. Einfluss der Substratdimerisierung auf die A β -Produktion durch PS1-FAD-Mutanten	34
2.3.1. Charakterisierung von PS1-FAD-Mutanten hinsichtlich der A β -Produktion	36
2.3.2. Einfluss von GxxxG-Mutanten auf die A β -Produktion durch PS1-FAD-Mutanten	41
2.3.2.1. Einfluss der GxxxG-Mutante G33A auf die A β -Produktion durch PS1-FAD-Mutanten mit frühem Erkrankungsalter	41
2.3.2.2. Einfluss der GxxxG-Mutante G33A auf die A β -Produktion durch PS1-FAD-Mutanten mit spätem Erkrankungsalter	43
2.3.2.3. Einfluss der GxxxG-Mutanten G29/33A und G33I auf die A β -Produktion durch PS1-FAD-Mutanten mit frühem Erkrankungsalter	44

3. Diskussion

3.1. Eignung von C100 in SDS-Micellen für <i>in vitro</i> -Tests	47
3.2. Interaktion von C100 und Sulindacsulfid	48
3.3. Einfluss der C100-Dimerisierung auf die Sulindacsulfid-Bindung	49
3.4. Pathogene Mechanismen der PS1-FAD-Mutanten	50
3.5. Einfluss von SPA4CT-GxxxG-Mutanten auf die A β -Prozessierung durch PS1-FAD-Mutanten	53
3.6. Vergleich der A β -Prozessierung bei APP-FAD- und PS1-FAD-Mutanten	55
3.7. Die Produktion toxischer A β -Spezies als Folge eines konformationell bedingten Funktionsverlustes der γ -Sekretase	56

4. Zusammenfassung

5. Material

5.1. Geräte	64
5.2. Chemikalien	65
5.3. Enzyme und Standards	65
5.4. Antikörper	65
5.5. Zellkultur-Medien	66
5.6. Zelllinien, <i>E. coli</i> -Stämme und Plasmide	66
5.7. Primer	66
5.7.1. Mutationsprimer	66
5.7.2. Sequenzierprimer	67
5.8. Verbrauchsmaterial	68
5.9. Puffer	68

6. Methoden

6.1. Molekularbiologie	69
6.1.1. Mutagenese	69
6.1.1.1. Klonierungsstrategien	69
6.1.1.2. PCR	69
6.1.1.3. Agarose-Gelelektrophorese	70
6.1.2. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	70
6.1.2.1. Elektrotransformation	70
6.1.2.2. Chemische Transformation	70
6.1.3. Induktion der Proteinexpression in <i>E. coli</i>	71

6.1.4. DNA-Präparation	71
6.1.5. Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen	71
6.1.6. DNA-Sequenzierung	71
6.2. Zellbiologie	72
6.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	72
6.2.2. Herstellung stabiler Zelllinien	72
6.2.3. Transiente Transfektionen	73
6.2.4. Zelllyse	73
6.3. Proteinbiochemie	73
6.3.1. Proteinaufreinigung aus bakteriellen Einschlusskörpern	73
6.3.1.1. Lösung und Rückfaltung der Proteine	73
6.3.1.2. Nickel-NTA-Säulenchromatographie	74
6.3.2. Bestimmung von Proteinkonzentrationen	74
6.3.2.1. BCA-Test	74
6.3.2.2. RC DC-Test	74
6.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	75
6.3.3.1. Probenvorbereitung	75
6.3.3.2. Glycin-SDS-PAGE	75
6.3.3.3. Tricin-SDS-PAGE	75
6.3.4. Western Blot-Analyse	76
6.3.4.1. Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen	76
6.3.4.2. Immunologischer Nachweis von Proteinen	76
6.3.5. Immunpräzipitation	76
6.3.6. ELISA	77
6.3.7. Kreuzvernetzung	77
6.3.8. Tryptischer Verdau im SDS-PA-Gel	77
6.4. Spektroskopische Methoden	78
6.4.1. Zirkularer Dichroismus	78
6.4.2. Elektronenspinresonanz	78
6.4.2.1. Spin-Markierung von Proteinen	78
6.4.2.2. „continuous wave“-ESR-Messung	79
6.4.3. Oberflächenplasmonresonanz	79
6.4.4. MALDI-Massenspektroskopie	80
6.5. Molekulares Modell	80
7. Literaturverzeichnis	81
8. Abkürzungsverzeichnis	108

9. Anhang

9.1. ELISA-Originalmesswerte	111
9.2. Publikationsliste	113
9.3. Danksagung	115
9.4. Erklärung	116

1. Einleitung

1.1. Die Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit ist die häufigste unter den neurodegenerativen Demenzerkrankungen. Solche Krankheiten betrafen im Jahr 2010 weltweit ca. 35,6 Millionen Menschen (<http://www.alz.co.uk/>, World Alzheimer Report 2010). Allein in Deutschland sind etwa 1,2 Millionen Menschen betroffen, davon leiden etwa zwei Drittel an Morbus Alzheimer (<http://www.deutsche-alzheimer.de/>, Die Epidemiologie der Demenz, Stand 08/2010). Typische Alzheimer-Symptome sind zunehmende Gedächtnis- und Orientierungsstörungen sowie ein beeinträchtigt Denk- und Urteilsvermögen. Der größte Risikofaktor ist ein hohes Alter, denn ca. 97% der Patienten erkranken mit frühestens 65 Jahren an der sogenannten sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit. Patienten, die früher erkranken, tragen Mutationen in einem der Gene, die für die Proteine APP (Amyloidvorläuferprotein, „amyloid precursor protein“), Presenilin 1 oder Presenilin 2 kodieren. Hier spricht man von erblichen oder familiären Formen der Alzheimer-Krankheit (FAD, „familial Alzheimer’s Disease“).

Im Jahr 1907 beschrieb Alois Alzheimer zum ersten Mal den Fall einer Patientin, in deren Hirn er eine cortikale Atrophie sowie zwei Formen von Ablagerungen fand: die extrazellulären amyloiden („stärkeähnlichen“) Plaques und die intrazellulären Neurofibrillen (Alzheimer 1907). Beide sind charakteristische Merkmale der Alzheimer-Pathologie. Die Neurofibrillen, die hauptsächlich aus hyperphosphorylierten Formen des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau bestehen, treten jedoch auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. der frontotemporalen Demenz auf (Goedert und Spillantini 2006). Sie scheiden deshalb als alleinige molekulare Ursache der Alzheimer-Krankheit aus. Der wichtigste Bestandteil der amyloiden Plaques sind die A β -Peptide, die nach der Amyloid-Hypothese zur Entstehung der Krankheit führen (Masters et al., 1985; Hardy und Allsop 1991). Ein weiterer Aspekt der Alzheimer-Pathologie ist eine chronische Neuroinflammation. Die amyloiden Plaques sind von aktivierten Mikroglia umgeben. Diese wirken wahrscheinlich einerseits neuroprotektiv, da sie A β phagozytieren, können aber andererseits die Neurodegeneration durch die chronische Entzündung noch fördern (McGeer et al., 1988; Venneti et al., 2006).

1.2. APP und seine Prozessierung

Der molekulare Vorläufer der A β -Peptide ist das Amyloidvorläuferprotein APP (Goldgaber et al., 1987; Kang et al., 1987; Tanzi et al., 1987). Dieses ist Teil einer Genfamilie, die integrale Membranproteine vom Typ I kodiert und zu der beim Menschen noch die APP-ähnlichen Proteine APLP1 und APLP2 („APP-like proteins“ 1 & 2) gehören. Orthologe des APP finden sich z.B. in Mäusen, Ratten, *D. melanogaster* und *C. elegans* (Paliga et al., 1997; Sprecher et al., 1993; Wasco et al., 1993; Coulson et al., 2000). Es existieren neun Isoformen des humanen APP, die durch alternatives Splicen entstehen. Das neu-

ronalen Splicen wird durch microRNAs reguliert (Smith et al., 2011). Im menschlichen Hirn werden die Isoformen APP695, APP770 und APP751 exprimiert (benannt nach der Anzahl ihrer Aminosäurereste), die Tyrosin-sulfatiert sowie N- und O-glycosyliert vorliegen (Tang et al., 2003; Tanaka et al., 1988; Weidemann et al., 1989). Die überwiegende neuronale Isoform ist APP695 (LeBlanc et al., 1991). APP ist hauptsächlich in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert, wird aber auch zur Plasmamembran transportiert und wiederum internalisiert (Kaden et al., 2009; Weidemann et al., 1989; Haass et al., 1992a).

APP kann über zwei verschiedene Wege prozessiert werden (Abb. 1.1): Der größte Teil der APP-Moleküle wird an der Zelloberfläche von den sogenannten α -Sekretasen geschnitten (in Neuronen primär von ADAM 10, „a disintegrin and metalloprotease“). Dabei wird die lösliche Ektodomäne sAPP α freigesetzt und ein 83 Aminosäuren langes C-terminales Fragment (α -CTF) verbleibt in der Membran (Esch et al., 1990; Sisodia 1992; Kuhn et al., 2010). Die Entfernung der Ektodomäne ist die Voraussetzung für die weitere Prozessierung des APP-CTF durch den γ -Sekretase-Komplex, bei der die APP intrazelluläre C-terminale Domäne AICD und das 3 kDa große nicht-amyloidogene p3-Peptid entstehen (Struhl und Adachi 2000; Haass et al., 1993).

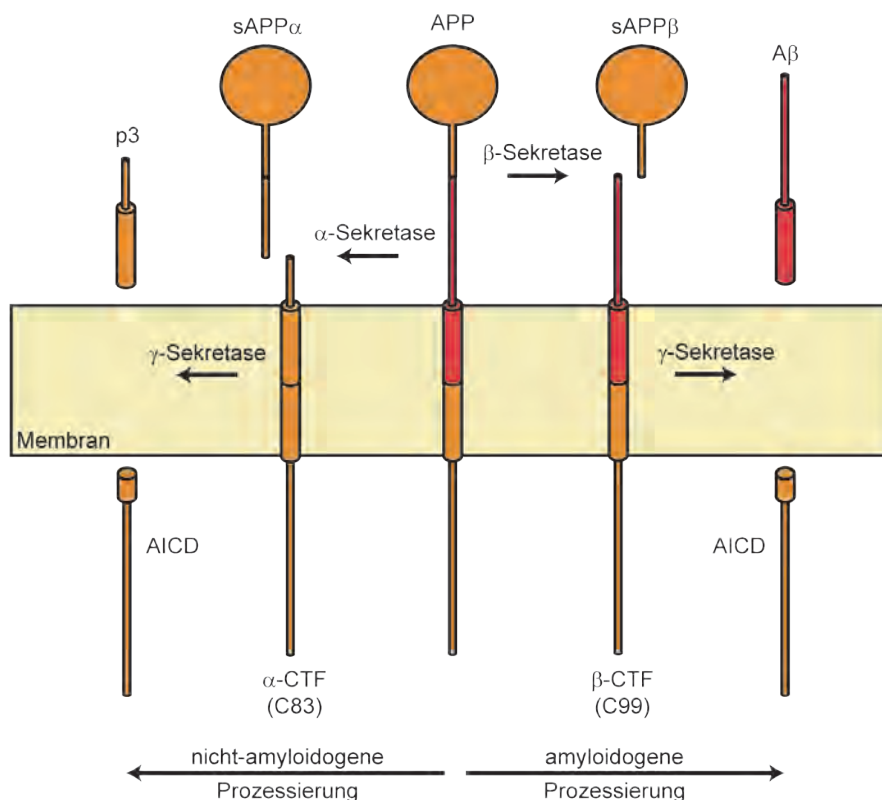


Abb. 1.1: Prozessierung von APP. Bei der amyloidogenen Prozessierung wird APP zunächst von der β -Sekretase geschnitten, wobei die lösliche Ektodomäne sAPP β freigesetzt wird. Das 99 Aminosäuren lange membranverankerte Fragment β -CTF wird von der γ -Sekretase weiter prozessiert, wobei das A β -Peptid sowie die APP intrazelluläre C-terminale Domäne (AICD) entstehen. Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung schneidet die α -Sekretase das APP innerhalb der β -Sequenz, wobei ein längeres lösliches APP-Fragment, sAPP α , freigesetzt wird und ein 83 Aminosäuren langes Fragment, α -CTF, in der Membran verbleibt. Dieses wird von der γ -Sekretase zur AICD und dem kurzen p3-Peptid umgesetzt.

Bei der amyloidogenen Prozessierung erfolgt der erste Schnitt weiter N-terminal als der α -Schnitt (Abb. 1.1). Das APP wird durch die β -Sekretase BACE („ β -site APP cleaving enzyme“) hauptsächlich in frühen Endosomen geschnitten, wobei ein verkürztes sAPP (sAPP β) und ein längeres APP-CTF (C99 bzw. β -CTF) entstehen (Vassar et al., 1999; Koo und Squazzo 1994; Kinoshita et al., 2003). Das APP-CTF wird wiederum von der γ -Sekretase weiter prozessiert, wobei die AICD und das 4 kDa große neurotoxische A β -Peptid entstehen (Haass et al., 1992b). Auf die verschiedenen A β -Spezies und ihre sequentielle Produktion wird weiter unter ausführlich eingegangen (s. 1.2.2. & 1.2.3.6.).

APP reguliert seine eigene Prozessierung unter anderem durch Beeinflussung der γ -Sekretase-Lokalisation sowie durch eine γ -Sekretase-Inhibitor-domäne (Liu et al., 2009; Tian et al., 2010). Da die α - und β -Sekretasen eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation aufweisen, kann auch durch eine Modulation der APP-Lokalisation (z.B. durch den Rezeptor SORL1 oder durch Kupfer) reguliert werden, welcher der beiden Wege bevorzugt eingeschlagen wird (Rogaeva et al., 2007; Acevedo et al., 2011). Etwa zwei Drittel des APP werden normalerweise über den nicht-amyloidogenen Weg abgebaut (Selkoe 2004). Seit kurzem ist noch ein dritter APP-Abbauweg bekannt, bei dem sowohl α - als auch β -Sekretase an der Prozessierung beteiligt sind, so dass sehr kurze A β -Fragmente von 14 bis 16 Aminosäuren Länge entstehen (Portelius et al., 2009).

Die durch die amyloidogene Prozessierung entstandenen A β -Peptide können durch eine Reihe von Proteasen wie die Matrix-Metalloproteasen 2 und 9, Neprilysin, das Insulin-abbauende Enzym IDE („insulin degrading enzyme“) und das Endothelin-konvertierende Enzym ECE („endothelin converting enzyme“), aber auch durch BACE selber weiter abgebaut werden (Roher et al., 1994; Backstrom et al., 1996; Yan et al., 2006; Iwata et al., 2001; Farris et al., 2003; Miller et al., 2003; Eckman et al., 2003; Fluhner et al., 2003; Bethge 2010). Die Expression von Neprilysin kann direkt durch die AICD induziert werden (Belyaev et al., 2009).

Die Funktion von APP ist bis heute nicht genau geklärt. Funktionelle Untersuchungen werden dadurch erschwert, dass APLP2 fähig ist, eine APP-Inaktivierung im Mausmodell zu großen Teilen zu kompensieren (Heber et al., 2000). Es scheint, dass APP bei der neuronalen und neuromuskulären Entwicklung und Reizweiterleitung sowie der Zelladhäsion und der Regulation der NMDA-Rezeptorströme eine Rolle spielt (Zheng et al., 1995; Wang et al., 2005; Young-Pearse et al., 2007; Multhaup 1994; Hoe et al., 2009; Weyer et al., 2011). Wichtige Funktionen von APP werden wahrscheinlich über seine Abbauprodukte sAPP und AICD vermittelt. Die lösliche extrazelluläre Domäne sAPP stimuliert das Zellwachstum und die neurale Stammzellendifferenzierung (Saitoh et al., 1989; Kwak et al., 2006). Die AICD ist ein Transkriptionsaktivator, der unter anderem die APP-Funktionen in der neuromuskulären Entwicklung vermittelt (Cao und Sudhof 2001; Cao und Sudhof 2004; Li et al., 2010). Die AICD-vermittelte Signaltransduktion erfordert interessanterweise die Abspaltung der Ektodomäne durch die β - und nicht die α -Sekretase (Goodger et al., 2009).

1.3. A β -Peptide: die Suche nach der toxischen Form

Basierend auf der Identifikation der A β -Peptide als Hauptbestandteil der amyloiden Plaques wurde die sogenannte Amyloid-Hypothese aufgestellt, die besagt, dass A β die Alzheimer-Krankheit auslöst (Hardy und Allsop 1991). Da jedoch die Lokalisation der amyloiden Plaques im Gehirn nicht gut mit dem kognitiven Verfall korreliert (Aizenstein et al., 2008), musste die ursprüngliche These, in der eine Toxizität der Plaques postuliert wurde, deutlich modifiziert werden. Der heutige Stand der Forschung besagt, dass lösliche A β -Oligomere die Toxizität vermitteln, wobei sowohl die Länge der Peptide als auch ihre Lokalisation, ihr Oligomerisierungszustand und die Struktur der Oligomere von Bedeutung sind (s. unten).

Es existieren unterschiedlich lange Formen des A β -Peptids, wovon A β 42 mit einer Länge von 42 Aminosäuren besonders stark zur Aggregation neigt und neurotoxisch wirkt (Xia et al., 1997; Younkin 1998). A β 42 macht etwa 5-10% der A β -Peptide im menschlichen Hirn aus, die häufigste Form, A β 40, etwa 90% (Dovey et al., 1993; Suzuki et al., 1994; Vigo-Pelfrey et al., 1993). Weiterhin existieren die kürzeren Spezies A β 37, A β 38 und A β 39 sowie A β 43 und einige A β -Modifikationen, z.B. pyroGlu-A β 3-42 und weitere N- oder C-terminal verkürzte Formen (Naslund et al., 1994; Wiltfang et al., 2001; Portelius et al., 2010). Auch A β 43, das verstärkt im Kern der amyloiden Plaques auftritt, kann neurotoxische Wirkung haben, die kürzeren Spezies A β 40, A β 38 und A β 34 jedoch nicht (Welander et al., 2009; Stephan et al., 2001; Harmeyer 2008).

Die naheliegende Erklärung besteht darin, dass die längeren A β -Peptide aufgrund ihrer höheren Hydrophobizität stärker zur Aggregation neigen und als Oligomere oder größere Aggregate toxisch wirken. Tatsächlich wurde gezeigt, dass A β 42-Peptide als Tetramere und in geringerem Maße als Di-, Hexa- und Dekamere toxisch für Neuronen sind, wohingegen größere Oligomere wie 16- oder 20-mere keine neurotoxische Wirkung mehr haben. Durch Mutationen induzierte Konformationsänderungen der A β -Oligomere können die Toxizität von der Oligomerisierung entkoppeln (Harmeyer et al., 2009). Lösliche Oligomere kommen verstärkt im Hirn von Alzheimer-Patienten vor (Kuo et al., 1996; Gong et al., 2003; Tomiyama et al., 2008; Mc Donald et al., 2010), und es ist *in vitro* und *in vivo* in einer Vielzahl von Studien gezeigt worden, dass diese Oligomere, und nicht die größeren Fibrillen, die Neurotoxizität vermitteln (Roher et al., 1996; Lambert et al., 1998; Walsh et al., 2002; Cleary et al., 2005; Klyubin et al., 2005; Shankar et al., 2008; Sandberg et al., 2010). Weiterhin kann die Inhibition der Oligomerisierung die A β 42-vermittelte Neurotoxizität deutlich reduzieren (Taylor et al., 2010). Für therapeutische Ansätze ergibt sich hieraus, dass es sinnvoll wäre, die Aggregation von A β -Monomeren zu inhibieren. Jedoch sollten nicht die Plaques aufgelöst werden, wie dies in einer Reihe von A β -Immunisierungsstudien versucht wird, da die Plaques wahrscheinlich dem Hirn die toxischen löslichen Oligomere entziehen.

Eine weitere toxische Form des A β sind intrazelluläre Aggregate. Intraneuronale A β -Ablagerungen entstehen noch vor den extrazellulären Plaques, und auch intrazelluläre A β -Oligomere sind neurotoxisch (Wertkin et al., 1993; Walsh et al., 2000). In Fliegen, Mäusen und Ratten wurde eine Korrelation der Neurodegeneration mit der Bildung intraneuronaler

A β -Aggregate gezeigt (Carmine-Simmen et al., 2009; Christensen et al., 2008; Rebeck et al., 2010). Unklar ist noch, in welchem Ausmaß das intrazelluläre A β aus dem Extrazellulärraum aufgenommen bzw. aus den Zellen sekretiert wird. Eine aktuelle Fragestellung ist auch, ob die Konformationsänderung von der α -helikalen zur β -Faltblatt-Struktur bei der intrazellulären A β -Synthese beschleunigt ist. Die Ausbildung der β -Faltblatt-Konformation ist zur Ausbildung amyloider Aggregate notwendig und bei einem pH von 6, wie er in Endosomen vorliegt, besonders begünstigt (Soto et al., 1995; Barrow und Zagorski 1991; Khandogin und Brooks 2007).

Noch ist nicht geklärt, wie die A β -Toxizität eigentlich vermittelt wird. Neben der direkten Interaktion der hydrophoben A β -Peptide mit der Zellmembran, die sie destabilisieren könnten, sind eine Reihe von potentiellen „Rezeptoren“ für extrazelluläres A β im Gespräch, darunter der p75-Neurotrophinrezeptor und das Prionprotein (McLaurin und Chakrabartty 1996; Michikawa et al., 2001; Demuro et al., 2005; Sotthibundhu et al., 2008; Lauren et al., 2009; Resenberger et al., 2011). Intrazelluläres A β induziert ER-Stress und destabilisiert Endosomen, Lysosomen und Mitochondrien (Umeda et al., 2011). Außerdem ist seit Kurzem bekannt, dass extrazelluläres A β 42 in den Zellkern transportiert wird und dort die Expression von APP und anderen Genen moduliert, was einen weiteren Mechanismus für die Vermittlung der Toxizität eröffnet (Barucker 2008).

1.4. Der γ -Sekretase-Komplex

Die γ -Sekretase ist eine von wenigen Proteasen, die fähig sind, Peptidbindungen in der hydrophoben Membrenumgebung zu hydrolysieren. Die γ -Sekretase ist eine Aspartatprotease, die Transmembranproteine vom Typ I abbaut. Sie besteht aus den vier Komponenten Presenilin, Nicastrin (Nct), Aph-1 („anterior pharynx defective phenotype“ 1) und Pen-2 („presenilin enhancer“ 2) (Abb. 1.2). Die Koexpression dieser vier Proteine ist notwendig und hinreichend, um eine γ -Sekretase-Aktivität in Hefen, Säugerzellen und in *D. melanogaster* zu rekonstituieren. Auch aus humanen Zellen aufgereinigte γ -Sekretase-Komplexe enthalten diese Komponenten (Edbauer et al., 2003; Kimberly et al., 2003; Takasugi et al., 2003; Fraering et al., 2004b).

Die γ -Sekretase ist in der Lage, sehr unterschiedliche Substrate zu prozessieren, weshalb sie manchmal auch als das „Proteasom der Membran“ bezeichnet wird. Bisher sind mehr als 70 γ -Sekretase-Substrate bekannt. Eine gemeinsame Erkennungssequenz gibt es nicht, statt dessen werden Substrate danach selektiert, ob die Abspaltung ihrer Ektodomäne stattgefunden hat (Wolfe et al., 1999; De Strooper et al., 1999; Kopan und Ilagan 2004; Lleo und Saura 2011; Struhl und Adachi 2000). In vielen Fällen, so z.B. bei der Proteolyse von Notch, LRP („low density lipoprotein receptor-related protein“), der Rezeptortyrosinkinase ErbB-4 und dem epithelialen Cadherin (E-Cadherin), entstehen intrazelluläre Domänen, die Funktionen in der Signaltransduktion erfüllen können (De Strooper et al., 1999; Struhl und Greenwald 1999; May et al., 2002; Ni et al., 2001; Marambaud et al., 2002).

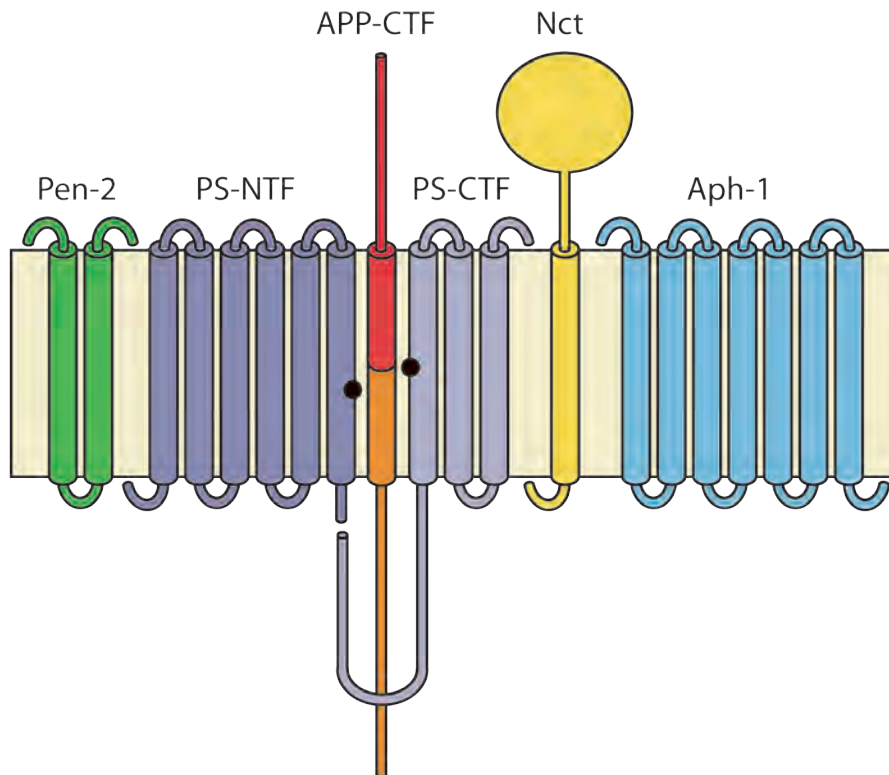


Abb. 1.2: Modell des γ -Sekretase-Komplexes mit gebundenem Substrat. Der γ -Sekretase-Komplex besteht aus Pen-2 („presenilin enhancer“ 2), den N- und C-terminalen Presenilinfragmenten PS-NTF und PS-CTF, Nicastrin (Nct) und Aph-1 („anterior pharynx defective phenotype“ 1). Die katalytisch aktiven Aspartatreste 257 und 385 des Presenilins sind durch schwarze Punkte dargestellt. Die A β -Sequenz des Substrats APP-CTF ist rot markiert.

Für die Proteolyse innerhalb der Membran müssen zwei Schwierigkeiten gelöst werden: zum einen muss das für die Hydrolyse benötigte Wasser in die Membrenumgebung gebracht werden, zum Zweiten muss das Peptidrückgrat des Substrats der Proteolyse zugänglich gemacht werden. Im Fall der γ -Sekretase zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen und Tests der Wasserzugänglichkeit von substituierten Cysteinen, dass sich im Inneren des Komplexes eine wassergefüllte Pore befindet, in der die Proteolyse stattfinden kann (Lazarov et al., 2006; Renzi et al., 2011; Sato et al., 2006; Tolia et al., 2006; Sato et al., 2008). Für APP wurde gezeigt, dass der initiale ε -Schnitt nicht stattfinden kann, wenn die Schnittstelle als α -Helix vorliegt, sondern dass diese in einer Schleifenstruktur liegen muss (Sato et al., 2009). Demnach werden die α -helikalen Transmembransequenzen (TMS) der Substrate für die Proteolyse entwunden.

1.4.1. Presenilin

Die Preseniline sind Transmembranproteine mit einer Länge von 467 (PS1) bzw. 448 (PS2) Aminosäuren. Sie werden durch die Gene *PSEN1* und *PSEN2* kodiert, deren mutierte Formen mit dem Auftreten familiärer Formen der Alzheimer-Krankheit (FAD) assoziiert sind (Sherrington et al., 1995; Levy-Lahad et al., 1995). Für *PSEN1*, das auf dem Chromosom 14 lokalisiert ist, sind mittlerweile 182 FAD-Mutationen bekannt, für

PSEN2, kodiert auf Chromosom 1, sind es 13 (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>, Stand 05/2011). γ -Sekretase-Komplexe enthalten jeweils nur eines der homologen Proteine (Yu et al., 1998; Steiner et al., 2002). Die Presenilinen haben zum Teil redundante Funktionen, PS1 ist jedoch essentiell und sein Verlust kann nur in geringem Maß durch PS2 kompensiert werden. Mäuse, denen das *PSEN1*-Gen fehlt, sterben kurz nach der Geburt, da die γ -Sekretase-Prozessierung des Transkriptionsfaktors Notch für die embryonale Entwicklung essentiell ist. Eine Inaktivierung der *PSEN*-Gene im adulten Tier führt zu Gedächtnisstörungen und Neurodegeneration (Shen et al., 1997; Herreman et al., 1999; Saura et al., 2004; Selkoe und Kopan 2003; Elder et al., 2010).

Presenilinen enthalten die beiden katalytischen Aspartatreste des γ -Sekretase-Komplexes (D257 und D385 bei PS1) und katalysieren neben der Spaltung der anderen γ -Sekretase-Substrate auch ihre eigene Endoproteolyse (Li et al., 2000; Wolfe et al., 1999). *In vitro* zeigt in Liposomen rekonstituiertes PS1 auch ohne die anderen Komponenten des Komplexes γ -Sekretase-Aktivität (Ahn et al., 2010). PS1 liegt im γ -Sekretase-Komplex nach seiner Spaltung zwischen T291 und A299 als Heterodimer des 27 kDa großen N-terminalen Fragments (PS1-NTF) und des 17 kDa großen C-terminalen Fragments (PS1-CTF) vor (Abb. 1.2). Das Heterodimer hat eine längere Halbwertszeit als das PS1-Holoprotein, und normalerweise ist die Endoproteolyse die Voraussetzung für die katalytische Aktivität. Es sind jedoch auch PS1-Mutanten beschrieben worden, die als Holoprotein γ -Sekretase-Aktivität zeigen (Podlisny et al., 1997; Thinakaran et al., 1996; Steiner et al., 1999).

Das PS1-NTF enthält den im Cytosol lokalisierten N-Terminus und 6 Transmembransequenzen (TMS 1-6). Das PS1-CTF besteht aus einer langen cytosolischen Schleife, drei weiteren TMS (TMS 7-9) und dem extrazellulären bzw. luminalen C-Terminus, der an der Membranoberfläche eine amphipathische α -Helix ausbildet (Laudon et al., 2005; Oh und Turner 2005; Spasic et al., 2006; Sobhanifar et al., 2010; Sato et al., 2008). Die TMS 6, 7 und 9, aber nicht TMS 8 haben Kontakt mit der wassergefüllten Pore des γ -Sekretase-Komplexes. Die katalytischen Aspartate ragen in diese hinein und befinden sich in räumlicher Nähe zueinander (Sato et al., 2006; Tolia et al., 2006; Sato et al., 2008). Die TMS 1 befindet sich in der Nähe der TMS 8, die TMS 2 und 6 in der Nähe der TMS 9, was eine Ringstruktur des Presenilins impliziert (Kornilova et al., 2006; Watanabe et al., 2010).

Kreuzvernetzungsexperimente, Tests der Wasserzugänglichkeit von substituierten Cysteinen sowie eine NMR-Studie zeigen, dass die TMS des PS1-CTF keine durchgängige α -helikale Struktur aufweisen. So ist die TMS 7 N-terminal von D385 möglicherweise linearisiert und kleidet die Pore aus (Abb. 1.3). Die TMS 8 ist wahrscheinlich geknickt. Die TMS 9 schließlich enthält in ihrem luminalen Abschnitt eine α -Helix, der cytosolische Teil bildet entweder eine zweite, deutlich abgelenkte Helix oder ist in linearisierter Form Teil der Porenoberfläche (Sato et al., 2006; Kornilova et al., 2006; Sato et al., 2008; Sobhanifar et al., 2010).

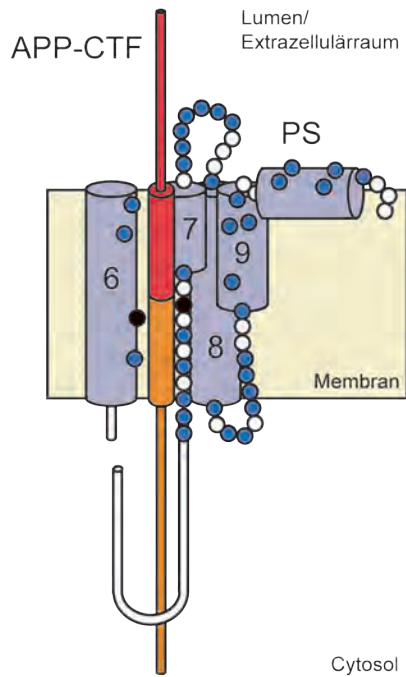


Abb. 1.3: Modell der katalytischen Pore der γ -Sekretase. Wasserzugänglichkeit der einzelnen Aminosäuren des PS1 (Sequenz von TMS 6 bis zum C-Terminus) im Komplex mit dem APP-CTF. Die α -helikalen Anteile der Aminosäuresequenz sind als Zylinder dargestellt und die TMS von 6 bis 9 nummeriert. Aminosäurepositionen, die durch ein wasserlösliches Reagenz Biotin-markiert werden konnten, sind als blaue Punkte eingezeichnet. Die katalytischen Aspartatreste sind als schwarze Punkte dargestellt. Weiß gekennzeichnete Positionen wurden nicht untersucht.
Abbildung nach (Sato et al., 2008).

Presenilin besitzt in der Nähe des aktiven Zentrums noch eine initiale Substratbindungsstelle, an der die luminale α -Helix der TMS 9 Anteil zu haben scheint (Esler et al., 2002; Das et al., 2003; Tian et al., 2003; Kornilova et al., 2005; Sato et al., 2008). Die gesamte TMS 1 ist essentiell für die γ -Sekretase-Aktivität des Presenilins, nur ihr luminaler Teil wird hingegen für die Presenilinase-Aktivität benötigt. Auch die TMS 2, 4, 6, 8 und 9, jedoch nicht TMS 3, sind für die γ -Sekretase-Aktivität des Presenilins notwendig. Die TMS 4 vermittelt die Bindung an Pen-2, die 12 C-terminalen Aminosäuren sind für die Bindung an den Aph-1-Nct-Subkomplex verantwortlich (Brunkan et al., 2005; Watanabe et al., 2005; Watanabe et al., 2010; Kim und Sisodia 2005a; Bergman et al., 2004; Kather et al., 2004).

Weitere besonders wichtige Motive sind die GxGD-Sequenz in der TMS 7 und das PAL-Motiv in der kurzen cytosolischen Schleife zwischen den TMS 8 und 9. Das GxGD-Motiv enthält das katalytische D385 und kommt auch bei anderen intramembranär schneidenden Aspartatproteasen vor. Die beiden Glycinreste des Motivs sind wahrscheinlich aus sterischen Gründen konserviert, da Substitutionen dieser Reste ohne Verlust der γ -Sekretase-Aktivität nur zu den ebenfalls kleinen Alaninresten möglich sind. L383 (das x des Motivs) ist für die Prozessierung von Notch, jedoch nicht von APP, notwendig (Steiner et al., 2000; Weihofen et al., 2002; Perez-Revuelta et al., 2010; Yamasaki et al., 2006). Das PAL-Motiv wird für die Ausbildung der richtigen Konformation des aktiven Zentrums benötigt. Mutationen in dieser Sequenz inhibieren die γ -Sekretase-Aktivität (Wang et al., 2004; Wang et al., 2006).

Mutationen in dieser Sequenz inhibieren die γ -Sekretase-Aktivität (Wang et al., 2004; Wang et al., 2006).

Unklar ist, über welchen Mechanismus Presenilin-Mutationen zur Entstehung der Alzheimer-Krankheit führen. Die meisten, jedoch nicht alle PS1-FAD-Mutanten erhöhen entweder die Produktion von A β 42 oder das Verhältnis von A β 42:A β 40, was auch zu einer verstärkten Oligomerbildung führt. Schon geringe Veränderungen des A β 42:A β 40-Verhältnisses können die Bildung toxischer Oligomere entscheidend beeinflussen (Borchelt et al., 1996; Duff et al., 1996; Citron et al., 1997; Jankowsky et al., 2004; Duering et al., 2005; Kumar-Singh et al., 2006; Shioi et al., 2007; Xia et al., 1997; Kuperstein et al., 2010). Im Hirn von Alzheimer-Patienten mit der PS1-FAD-Mutante E280A wurden auch noch längere A β -Spezies wie A β 45, A β 48 und A β 49 (die direkten Vorläufer von A β 42 und A β 40) sowie erhöhte Mengen des APP-CTFs gefunden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Toxizität über die Einschränk-

kung der enzymatischen Funktion („loss of function“) vermittelt wird (Van Vickle et al., 2008). *In vitro* wird die Hypothese eines „loss of function“ der PS-FAD-Mutanten untermauert durch

- i. eine Akkumulation der γ -Sekretase-Substrate,
- ii. eine reduzierte gesamt-A β -Produktion,
- iii. die verstärkte Produktion besonders langer A β -Spezies, und / oder
- iv. eine erniedrigte Produktion der AICD und NICD („Notch intracellular domain“).

Jedoch verhalten sich die einzelnen PS1-Mutanten in diesen Experimenten sehr unterschiedlich (Bentahir et al., 2006; Shimojo et al., 2007; Shimojo et al., 2008; Heilig et al., 2010).

Besonders interessant ist die Beobachtung, dass PS1-FAD-Mutanten die Konformation des Presenilins und des PS1-APP-CTF-Komplexes verändern können. Der N-Terminus von FAD-PS1-Mutanten liegt näher am C-Terminus und an der cytosolischen Schleife als bei PS1-wt, und die cytosolische Schleife ist näher beim C-Terminus des APP lokalisiert (Lleo et al., 2004; Berezovska et al., 2005; Uemura et al., 2009). Dies impliziert, dass FAD-PS1-Mutanten ihre Wirkung durch eine Konformationsänderung des Enzyms vermitteln, die die γ -Sekretase-Aktivität inhibiert. Das würde erklären, warum FAD-Mutanten unabhängig von ihrer Lokalisation im Protein FAD auslösen können. Unterschiedlich lokalisierte Mutanten können die PS1-Konformation aber mehr oder weniger stark beeinflussen (Berezovska et al., 2005). Dies könnte der Grund für ihre zum Teil sehr unterschiedliche Wirkung sein.

Es gibt jedoch noch einige andere Theorien zur Toxizität der FAD-PS-Mutanten, die darauf beruhen, dass Presenilin auch eine Reihe von Funktionen außerhalb des γ -Sekretase-Komplexes erfüllt. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass Presenilin direkt mit BACE interagiert und dessen Reifung unterstützt (Kuzuya et al., 2007). Weiterhin ist PS1 notwendig für die neuronale Makroautophagie. PS1-FAD-Mutanten verhindern diese und könnten auch dadurch zur Neurotoxizität beitragen (Lee et al., 2010). Es gibt auch Belege, dass Preseniline passive Kalziumkanäle bilden, die für das Ausströmen von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) notwendig sind und dass bei PS-FAD-Mutanten diese Funktion beeinträchtigt ist. Die Inhibition eines anderen ER-Kalziumkanals verstärkt die Alzheimer-Pathologie in einem murinen Modell. Hier wird die Toxizität der FAD-Mutanten vermutlich durch eine gestörte Neurotransmitter-Freisetzung aus der Präsynapse vermittelt, die die synaptische Plastizität beeinträchtigt (Stutzmann et al., 2004; Tu et al., 2006; Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2009). Diese Effekte, die wahrscheinlich die Alzheimer-Pathologie verstärken, könnten ebenfalls über eine Konformationsänderung des Presenilins vermittelt werden.

1.4.2. Nicastrin, Aph-1 und Pen-2

Nicastrin (Nct) ist ein Typ I-Transmembranprotein mit einer großen glycosylierten Ektodomäne (Abb. 1.2). Es stabilisiert den γ -Sekretase-Komplex und könnte als Substratrezeptor fungieren. Ob es für die Aktivität des Komplexes notwendig ist, ist noch

nicht eindeutig geklärt (Esler et al., 2002; Herreman et al., 2003; Shah et al., 2005; Shirotani et al., 2004a; Zhang et al., 2005; Chavez-Gutierrez et al., 2008; Dries et al., 2009). Der kürzlich geführte Nachweis eines aktiven trimeren γ -Sekretase-Komplexes aus PS1, Pen-2 und Aph-1a in Zellkultur stellt auch seine Funktion als Substratzeptor in Frage (Zhao et al., 2010). Nct bindet über seine TMS an aph-1 (Morais et al., 2003).

„Anterior pharynx defective phenotype“ 1 (Aph-1) ist ein Transmembranprotein mit 7 TMS, einem luminalen bzw. extrazellulären N- und einem cytosolischen C-Terminus (Abb. 1.2). Es bildet als „Gerüst“ für den Aufbau des γ -Sekretase-Komplexes zunächst mit Nct einen Subkomplex, an den sich dann PS und zuletzt Pen-2 anlagern (Goutte et al., 2002; Francis et al., 2002; Lee et al., 2002; LaVoie et al., 2003; Takasugi et al., 2003; Shirotani et al., 2004a; Fortna et al., 2004; Lee et al., 2004; Niimura et al., 2005; Kaether et al., 2006a). Ein doppeltes GxxxG-Motiv in der TMS 4 ist notwendig für die Interaktion mit den anderen γ -Sekretase-Komponenten und die korrekte Assemblierung des Komplexes (Lee et al., 2004; Niimura et al., 2005; Edbauer et al., 2004). Aph-1 kann auch an γ -Sekretase-Substrate binden (Chen et al., 2010).

Im Menschen existieren zwei Homologe, Aph-1a, und Aph-1b. Es gibt es zwei Spliceformen des Aph-1a, Aph-1aS und Aph-1aL (für „short“ und „long“). Die drei Formen treten in getrennten γ -Sekretase-Komplexen auf, die alle gleich viel gesamt-A β produzieren. Dabei bilden γ -Sekretase-Komplexe mit PS1 und Aph-1b weniger A β 42 als Komplexe mit PS1 und einer der Aph-1a-Formen (Francis et al., 2002; Lee et al., 2002; Shirotani et al., 2004b; Shirotani et al., 2007). Aph-1a ist im Gegensatz zu Aph-1b unverzichtbar für die γ -Sekretase-Aktivität. Interessanterweise schwächt aber die Inaktivierung von Aph-1b in einem Alzheimer-Mausmodell den pathologischen Phänotyp ab (Serneels et al., 2005; Serneels et al., 2009).

„Presenilin enhancer“ 2 (Pen-2) ist notwendig für die Aktivität des γ -Sekretase-Komplexes, da erst seine Bindung die PS-Endoproteolyse und die Reifung des Komplexes ermöglicht. Weiterhin stabilisiert es die entstehenden PS-Fragmente (Francis et al., 2002; Steiner et al., 2002; Takasugi et al., 2003; Prokop et al., 2004). Pen-2 enthält zwei TMS (Abb.1.2), wovon die erste sowie die zwischen ihnen liegende Schleife wahrscheinlich Teil der wassergefüllten γ -Sekretase-Pore sind. Die luminalen zwei Drittel der TMS 1 sind notwendig für die Endoproteolyse, die konservierten Reste Gly22 und Pro27 für die Komplexbildung und -stabilität. N- und C-Terminus sind luminal bzw. extrazellulär lokalisiert. Der C-Terminus ist notwendig für die Bindung an die anderen Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes und die Komplexstabilisierung. Wird der C-Terminus verlängert oder verkürzt, sind PS-Endoproteolyse und Nct-Maturierung beeinträchtigt. Eine Verlängerung des N-Terminus verändert die Struktur der hydrophilen Pore und führt zu einer verstärkten Produktion von A β 42 (Crystal et al., 2003; Bammens et al., 2011; Kim und Sisodia 2005b; Prokop et al., 2004; Hasegawa et al., 2004; Prokop et al., 2005; Isoo et al., 2007).

1.4.3. Assemblierung des γ -Sekretase-Komplexes

Die Assemblierung des γ -Sekretase-Komplexes findet in den frühen Kompartimenten des ERs statt. Es wird als erstes ein Subkomplex aus Aph-1 und Nct gebildet, an diesen bindet dann PS und schließlich Pen-2, das die Endoproteolyse induziert (Kim et al., 2004; Capell et al., 2005; LaVoie et al., 2003; Shirotani et al., 2004a; Kaether et al., 2006a). Erst danach wird der Komplex aus dem ER transportiert, wahrscheinlich weil die ER-Retentionssignale zwischen den PS-TMS 8 und 9 und in der Pen-2-TMS 1 in der maturierten γ -Sekretase maskiert sind (Kaether et al., 2004; Kaether et al., 2007). Die γ -Sekretase zeigt im ER, dem Golgi-Apparat, dem trans-Golgi-Netzwerk und den sekretorischen Vesikeln noch keine Aktivität. Erst an der Plasmamembran, wo sich auch die meisten ihrer Substrate befinden, wird sie aktiv. Dort erfolgt die Proteolyse von Notch und wahrscheinlich auch von C83, dem α -CTF des APP, das in der Plasmamembran von der α -Sekretase produziert wird. Die Produktion von A β aus C99 scheint dagegen primär in den frühen Endosomen abzulaufen, wo auch der β -Schnitt stattfindet (Kaether et al., 2006b; Sorensen und Conner 2010; Annaert et al., 1999; Perez et al., 1999; Rajendran et al., 2006). Innerhalb der Membranen scheint die γ -Sekretase in Detergenz-resistenten Mikrodomänen lokalisiert zu sein (Wahrle et al., 2002; Vetrivel et al., 2004; Hur et al., 2008).

1.4.4. Stöchiometrie des γ -Sekretase-Komplexes

Über die Stöchiometrie des γ -Sekretase-Komplexes herrscht noch kein Konsens. Die Tatsache, dass nur jeweils eines der Homologe des PS und des Aph-1 pro Komplex gefunden wird, kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass sie als Monomere vorliegen. Tatsächlich wurde die Stöchiometrie des aufgereinigten γ -Sekretase-Komplexes als 1:1:1:1 bestimmt (Sato et al., 2007). Diese Untersuchung wurde jedoch in Gegenwart des Detergenz Digitonin durchgeführt, in dem die γ -Sekretase inaktiv ist. Anders als bei Sato et al. konnte in Gegenwart des Detergenz CHAPSO, das die γ -Sekretase-Aktivität erhält, eine Koimmunpräzipitation von zwei unterschiedlich markierten Presenilinen gezeigt werden (Schroeter et al., 2003). Presenilin-Dimere wurden auch mittels Photoaffinitäts-Markierung und FLIM („fluorescence lifetime imaging microscopy“ (Lleo et al., 2004)) nachgewiesen. Außerdem rekonstituiert die Koexpression der einzeln inaktiven PS1-Mutanten D257A und D385A die γ -Sekretase-Aktivität, was auf die Ausbildung einer katalytischen Diade der Aspartate von zwei PS-Molekülen hinweist (Schroeter et al., 2003; Herl et al., 2006; Cervantes et al., 2004). Möglich wäre, dass PS-NTF und -CTF, Nct, Aph-1 und Pen-2 ein Heteropentamer bilden, das dann wiederum dimerisieren kann, eventuell induziert durch die Dimerisierung des Substrats. Dafür, dass die γ -Sekretase sowohl als Monomer als auch als Dimer vorliegen kann, spricht auch, dass bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen des aus eukaryotischen Zellen aufgereinigten Komplexes sowohl einzelne als auch zwei direkt nebeneinander liegende Komplexe zu sehen sind. Dies ist jedoch nicht in allen betrachteten Zelllinien der Fall (Cacquevel et al., 2008). Weiterhin wurden bei der Analyse von γ -Sekretase-Komplexen aus humanen Blut- und Epithelzellen Hinweise auf eine Abhängigkeit der Stöchiometrie vom Zelltyp gefunden (Placanica et al., 2010).

1.4.5. γ -Sekretase-modulierende Proteine

Es sind eine Reihe von Proteinen bekannt, die die Aktivität und Substratspezifität des γ -Sekretase-Komplexes beeinflussen können, darunter Glycogensynthasekinase 3 β (GSK3 β), Phospholipase D1 (PLD1), CD147, TMP21 und das γ -Sekretase-aktivierende Protein (GSAP). GSK3 β bindet an das PS1-NTF, phosphoryliert PS1-CTF und reguliert dessen Abbau (Takashima et al., 1998; Kirschenbaum et al., 2001a; Kirschenbaum et al., 2001b). PLD1, CD147 und TMP21 sind negative Regulatoren der A β -Produktion. PLD1 reguliert die Stabilität und den Membrantransport des γ -Sekretase-Komplexes (Cai et al., 2006a; Cai et al., 2006b; Liu et al., 2009). Die genaue Funktion von CD147 ist noch nicht geklärt: es assoziiert mit dem γ -Sekretase-Komplex, die A β -Reduktion scheint aber über die Stimulation des A β -Abbaus vermittelt zu werden (Zhou et al., 2005; Nahalkova et al., 2010; Vetrivel et al., 2008). TMP21 und das zu derselben Proteinfamilie gehörende p24 α_2 binden an die γ -Sekretase und reduzieren die Produktion von A β 40 und A β 42, jedoch nicht die der AICD. Die γ -Sekretase-Assoziation von TMP21 wird über seine TMS vermittelt (Chen et al., 2006; Hasegawa et al., 2010; Pardossi-Piquard et al., 2009). GSAP stimuliert die A β -Produktion durch Interaktion mit dem APP-CTF und der γ -Sekretase, interagiert aber nicht mit Notch und hat auch keinen Einfluss auf dessen Prozessierung (He et al., 2010). Einen weiteren wichtigen Einfluss auf die γ -Sekretase-Aktivität hat die Membrenumgebung, vor allem ihr Cholesteringehalt (Wahrle et al., 2002; Fraering et al., 2004a; Fraering et al., 2004b; Osawa et al., 2008; Osenkowski et al., 2008; Grimm et al., 2008). Eine Störung des Cholesterintransports kann auch die Lokalisation der γ -Sekretase beeinflussen (Burns et al., 2003).

1.4.6. Schnittmechanismus der γ -Sekretase

Die γ -Sekretase prozessiert das APP-CTF schrittweise (Abb. 1.4). Der erste Schnitt an der sogenannten ε -Schnittstelle kann entweder A β 49 und die 50 Aminosäuren lange AICD 50-99 oder A β 48 und die 51 Aminosäuren lange AICD 49-99 produzieren. Längere AICD konnten nie nachgewiesen werden, jedoch die verkürzte AICD 52-99 (Sastre et al., 2001; Gu et al., 2001; Sato et al., 2003; Fukumori et al., 2006). An der ε -Schnittstelle werden auch die anderen γ -Sekretase-Substrate wie z.B. Notch, CD44 und E-Cadherin geschnitten (Okochi et al., 2002; Lammich et al., 2002; Marambaud et al., 2002). Die langen A β -Spezies A β 49 und A β 48 verbleiben in der Membran und werden weiter prozessiert. Dabei werden immer 3 oder 4 Aminosäuren abgeschnitten, was in etwa einer Helixwindung der APP-TMS entspricht. Den ersten dieser sukzessiven Schnitte bezeichnet man als ζ -Schnitt, die darauf folgenden als γ -Schnitte. Da beim ε -Schnitt nur A β 49 und A β 48 entstehen, ergeben sich zwei Produktlinien: A β 49 wird zu A β 46 und dann weiter zu A β 43, A β 40 und A β 37 gespalten, A β 48 hingegen zu A β 45, A β 42 und A β 38 oder A β 39 (Abb. 1.4).

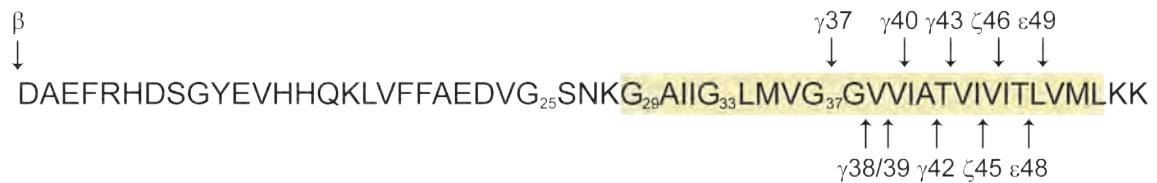


Abb. 1.4: Sequentielle Proteolyse von A β in zwei Produktlinien. Nach der Proteolyse von APP durch die β -Sekretase (Schnittstelle markiert mit β) wird das A β -Peptid durch progressive γ -Sekretase-Schnitte gebildet. Als erstes findet der ϵ -Schnitt statt, der A β -Peptide mit 48 oder 49 Aminosäuren Länge sowie die korrespondierenden AICD 49-99 oder AICD 50-99 produziert. Danach wird innerhalb der beiden Produktlinien im Abstand von 3 (oder 4) Aminosäuren weiter geschnitten: Aus A β 49 entsteht zunächst A β 46 (ζ -Schnitt), daraus dann A β 43, A β 40 und A β 37; A β 48 wird über A β 45 (ζ -Schnitt) zu A β 42 und weiter zu A β 38 oder A β 39 prozessiert. Dargestellt sind die Aminosäuren 1-54 der APP-CTF-Sequenz. Die Transmembransequenz ist mit einem gelben Kasten hinterlegt, die Glycine der 3 konsekutiven GxxxG-Motive sind nach der A β -Nummerierung beschriftet.

Dass die A β -Produktion tatsächlich sequentiell abläuft, ist durch eine Reihe von Studien belegt: Zum einen kann durch γ -Sekretase-Inhibitoren, die nicht direkt im aktiven Zentrum der γ -Sekretase binden („non-transition-state“-Inhibitoren), die Akkumulation von A β 49, A β 46 und A β 43 induziert werden. Ersetzt man den „non-transition-state“-Inhibitor durch einen „transition-state“-Inhibitor, der den ϵ -Schnitt verhindert, wird das vorher akkumulierte A β 46 zu A β 43 und A β 40 abgebaut. Ob auch A β 42 aus A β 46 entstehen kann, also ein Wechsel zwischen den Produktlinien möglich ist, ist noch umstritten (Zhao et al., 2004; Qi-Takahara et al., 2005; Zhao et al., 2005; Yagishita et al., 2006; Yagishita et al., 2008). Auch durch Mutationen in der A β -Sequenz kann der γ -Schnitt inhibiert werden, ohne dass der ϵ -Schnitt beeinflusst wird (Ren et al., 2007). Mittlerweile wurden auch die während der sequentiellen Proteolyse entstehenden Tripeptide A β 47-49, A β 44-46 und A β 41-43 aus der A β 40-Produktlinie und A β 46-48, A β 43-45 und A β 40-42 sowie das Tetrapeptid A β 39-42 aus der A β 42-Produktlinie mittels MALDI-MS direkt nachgewiesen (Takami et al., 2009). Die längeren A β -Peptide haben auch physiologische Bedeutung: A β 48, A β 46, A β 45 und A β 43 konnten im Hirn von APP-transgenen Mäusen nachgewiesen werden und A β 43 ist in den Plaques von Alzheimer-Patienten in größerer Menge vorhanden als A β 40 (Qi-Takahara et al., 2005; Welander et al., 2009). Dass die sequentielle Proteolyse hauptsächlich innerhalb der jeweiligen Produktlinie verläuft, wurde durch die Expression langer A β -Peptide in Zellkultur gezeigt: A β 48 und A β 51 werden primär zu A β 42 abgebaut, A β 49 und A β 52 hauptsächlich zu A β 40. Außerdem ist die Produktion der AICD 49-99 in Zellen, die A β 42-erhöhende PS1-FAD-Mutanten exprimieren, ebenfalls verstärkt (Funamoto et al., 2004; Munter et al., 2010; Sato et al., 2003).

Auch andere γ -Sekretase-Substrate werden sequentiell geschnitten. Bei der Prozessierung von Notch entstehen neben der NICD auch unterschiedlich lange N β -Peptide. Der γ -Schnitt ist auch hier vom ϵ -Schnitt abhängig (Okochi et al., 2002; Chandu et al., 2006). A β -ähnliche Peptide des APLP1 werden im humanen Cerebrospinalfluid in einer Länge von 25, 27 oder 28 Aminosäuren gefunden. Tragen die Patienten eine PS1-FAD-Mutation, die die A β 42-Produktion verstärkt, ist auch die Menge an APLP1 β 28 erhöht (Yanagida et al., 2009). Bei der Endoproteolyse von PS werden drei sequentielle Schnitte im Abstand von je drei Aminosäuren durchgeführt, hier gibt es ebenfalls zwei Produktlinien: PS1-CTF 292-467 wird zu PS1-CTF 295-467 und PS1-CTF 298-467, PS1-CTF 293-467 hingegen wird zu PS1-CTF 296-467 und PS1-CTF 299-467 abgebaut (Fukumori et al., 2010).

1.5. Einfluss der APP-Dimerisierung auf die A β -Produktion

APP bildet Homodimere aus, was über drei Kontaktregionen vermittelt wird. Zwei davon liegen in der APP-Ektodomäne: die Kollagen-bindende Region sowie die Heparin-bindende sogenannte „Loop“-Region. Die APP-Dimerisierung kann durch Zugabe des „Loop“-Peptids oder durch Koexpression von APLP1 oder APLP2, die mit APP Heterodimere ausbilden, kompetiert werden. Dies verringert die A β -Produktion (Behr et al., 1996; Scheuermann et al., 2001; Kaden et al., 2008; Kaden et al., 2009).

In der APP-TMS existiert eine weitere Interaktionsstelle, die durch die drei konsekutiven GxxxG-Motive (G₂₅xxxG₂₉xxxG₃₃xxxG₃₇ nach der A β -Nummerierung) des APP-CTFs gebildet wird. GxxxG-Motive, die zwischen den Glycinresten jede Aminosäure außer Prolin enthalten können, vermitteln die Dimerisierung von TMS, da sie durch die kleinen Glycinreste eine Seite der α -helikalen TMS abflachen. Das ermöglicht es zwei Helices, sich durch eine leichte rechtshändige Verkreuzung sehr eng aneinander anzunähern, so dass Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Interaktionen zwischen ihnen ausgebildet werden können (Senes et al., 2004). Mutationen der APP-GxxxG-Sequenz, bei denen die flache Helixoberfläche mittels Substitution der Glycine durch größere Aminosäuren unterbrochen wird, stören die Dimerisierung von APP-CTF, jedoch nicht von Vollängen-APP (Munter et al., 2007).

1.5.1. Einfluss der GxxxG-vermittelten Dimerisierung auf die A β -Produktion

Mutationen der Glycine G29 und G33 des zentralen APP-GxxxG-Motivs stören mit zunehmender Größe der substituierten Reste immer stärker die APP-CTF-Dimerisierung. Parallel dazu beeinflussen sie auch die sequentielle Proteolyse durch die γ -Sekretase: Je stärker die Dimerisierung gestört ist, desto weiter kann die Proteolyse voranschreiten. Bei den schwachen Mutanten G29A und G33A ist zunächst nur ein Einfluss auf die A β 42-Produktlinie zu erkennen: es wird weniger A β 42 hergestellt, die Synthese von A β 38 dagegen verstärkt. Die stärkeren Mutanten G29/33A und G33I verstärken diesen Effekt noch und reduzieren zusätzlich die Produktion von A β 40, dafür entstehen verstärkt kürzere A β -Spezies wie A β 37, A β 35 und A β 34. Die verstärkt Dimere bildende Mutante L17C dagegen zeigt einen entgegengesetzten Effekt auf die A β 42-Produktlinie: es entsteht mehr A β 42 (Munter et al., 2007). Mechanistisch ist dies so zu erklären, dass die Dimerisierung die Zugänglichkeit der späteren γ -Schnittstellen für die Proteolyse verringert, zum Beispiel indem es das Entwinden der APP-TMS-Helices oder deren Drehung innerhalb des γ -Sekretase-Komplexes verhindert.

Dass der γ -Sekretase-inhibierende Effekt der GxxxG-Motive über die APP-Dimerisierung vermittelt wird, wird auch noch durch andere Forschungsergebnisse gestützt. So kann durch eine Verstärkung der Dimerisierung schon der ϵ -Schnitt deutlich gehemmt werden. Dies kann hervorgerufen werden durch

-
- i. Behandlung des APP-CTFs mit Zink,
 - ii. die Mutante G29/33L, die eine verstärkte Dimerisierung über eine verschobene Bindungsoberfläche induziert, oder
 - iii. die Verlängerung der TMS- α -Helix durch die Insertion von drei Leucinresten zwischen L52 und K53 am intrazellulären Ende der TMS.

Die Inhibition des ϵ -Schnitts zeigt sich an der Akkumulation des APP-CTFs und einer geringeren AICD- bzw. gesamt-A β -Produktion (Hoke et al., 2005; Kienlen-Campard et al., 2008; Miyashita et al., 2009; Sato et al., 2009). Die Verlängerung des G_{xxx}G-Motivs durch die Verdopplung der Sequenz G₂₉xxx induziert die Produktion der ungewöhnlichen A β 41-Spezies, seine Verkürzung durch die Deletion von G₂₉xxx führt zu einer Reduktion der A β 40- und A β 42-Produktion zugunsten von A β 36, A β 37, A β 38 und A β 39 (Murphy et al., 2002). Auch eine Zerstörung des G₂₉xxxG₃₃-Motivs durch Insertion von zwei Aminosäuren führt zur verstärkten Synthese kürzerer A β -Spezies (primär A β 32 und A β 33) auf Kosten von A β 42 und A β 40. Eine Deletion der Aminosäuren A30 und I31 ruft dagegen eine erhöhte Produktion von A β 42 und A β 43 bei verringerter Bildung von A β 40 und kürzeren A β -Spezies hervor (Lichtenthaler et al., 2002).

1.5.2. Einfluss von γ -Sekretase-Modulatoren auf A β -Produktion und APP-Dimerisierung

Aus epidemiologischen Studien ist bekannt, dass die Einnahme bestimmter nicht-steroidaler antiinflammatorischer Medikamente (NSAIDs, „non-steroidal anti-inflammatory drugs“) das Risiko, an Alzheimer zu erkranken, deutlich senken kann (McGeer et al., 1996; Anthony et al., 2000). 2001 wurde gezeigt, dass dieser Effekt mit einer Modulation der A β -Produktion zusammenhängt: Die NSAID-Behandlung scheint die Effektivität der γ -Sekretase-Prozessierung zu erhöhen, da *in vitro* und *in vivo* weniger A β 42 und mehr A β 38 synthetisiert werden (Weggen et al., 2001; Eriksen et al., 2003). Mittlerweile sind noch eine Reihe anderer γ -Sekretase-Modulatoren (GSM) mit unterschiedlichen Strukturen bekannt, die das A β 42:A β 38-Verhältnis erniedrigen oder auch (die sogenannten inversen iGSM) erhöhen können (Kukar et al., 2005; Caldwell et al., 2010; Hall et al., 2010; Kounnas et al., 2010; Rivkin et al., 2010a; Rivkin et al., 2010b; Stanton et al., 2010). Diese Substanzen sind äußerst aussichtsreiche potentielle Alzheimer-Medikamente, da sie anders als γ -Sekretase-Inhibitoren keine Nebenwirkungen durch die Inhibition der Prozessierung anderer γ -Sekretase-Substrate wie z.B. Notch hervorrufen sollten.

Wie genau die Wirkung der GSM vermittelt wird, wird noch diskutiert. Für GSM-1, ein NSAID-Derivat mit verbesserter Potenz, ist vor kurzem eine direkte Bindung an die PS1-TMS 1 gezeigt worden. Dies ist besonders interessant angesichts der Wichtigkeit der TMS 1 für die γ -Sekretase-Aktivität (Page et al., 2008; Tomita et al., 2011; Ohki et al., 2011; Brunkan et al., 2005). Ein anderer GSM bindet an Pen-2 (Kounnas et al., 2010). Für einige NSAIDs wurde auch gezeigt, dass sie die Konformation von PS1 oder des APP-CTFs verändern können, wobei hier keine Aussage über den Bindungspartner getroffen werden

konnte. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass iGSM den gleichen Einfluss auf die APP-CTF-Konformation haben wie FAD-Mutanten des APP und PS, GSM dagegen einen den FAD-Mutanten entgegengesetzten Einfluss auf die Konformation von PS1 und APP-CTF zeigen (Lleo et al., 2004; Uemura et al., 2011). Für den GSM Ibuprofen und den iGSM Fenofibrat wurde gezeigt, dass sie die PS1-Konformationsänderung nur in Gegenwart des Substrats oder eines Inhibitors der initialen Substratbindungsstelle induzieren können. Dies wurde so interpretiert, dass eine durch die Substratbindung hervorgerufene Konformationsänderung des Presenilins die Voraussetzung einer PS-GSM-Interaktion darstellt (Uemura et al., 2010).

Es gibt aber auch überzeugende Belege für eine direkte Interaktion von GSM mit dem GxxxG-Motiv der APP-TMS. Kukar et al. zeigten 2008 eine direkte Bindung biotinylierter GSM-Photoproben an APP, das APP-CTF und A β in Abhängigkeit von den Aminosäuren 28-36 der A β -Sequenz (Kukar et al., 2008). Die Spezifität dieser Bindung wurde später in Frage gestellt (Beel et al., 2009), mittlerweile wurde jedoch mittels Kernspin- und Oberflächenplasmonresonanz gezeigt, dass GSM an A β binden können. Diese Interaktion wird durch die flache Oberfläche der α -Helix ermöglicht, die die GxxxG-Motive ausbilden. Die Bindung der GSM an die APP-TMS führt dazu, dass das γ -Sekretase-Substrat bevorzugt als Monomer vorliegt. Es ist also gut möglich, dass die Erniedrigung des A β 42:A β 38-Verhältnisses durch die GSM über die Inhibierung der APP-CTF-Dimerisierung vermittelt wird (Richter et al., 2010).

1.6. Zielsetzung

Die Produktion unterschiedlich langer A β -Spezies durch die γ -Sekretase hängt primär von zwei Faktoren ab: Zum einen von der Aktivität des Enzyms, die wahrscheinlich durch dessen Konformation bedingt ist und bei FAD-Mutanten des Presenilins verändert sein kann (Berezovska et al., 2005). Zum anderen können die späteren konsekutiven Schnitte auch durch die Dimerisierung des Substrats APP-CTF über GxxxG-Motive in der TMS verhindert werden (Munter et al., 2007). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wechselwirkung dieser beiden Effekte zu untersuchen.

Zunächst wird analysiert, in welchem Oligomerisierungszustand das APP-C-terminale Fragment C100 vorliegt, wenn man es bakteriell exprimiert und aufreinholt, da es in dieser Form verbreitet als Substrat für *in vitro* γ -Sekretase-Tests eingesetzt wird. Weiterhin wird getestet, ob der GSM Sulindacsulfid an das aufgereinigte C100 bindet und ob diese Bindung durch die GxxxG-vermittelte C100-Dimerisierung beeinflusst wird.

Eine Auswahl von PS1-FAD-Mutanten werden hinsichtlich ihrer A β -Produktion charakterisiert. Es wird untersucht, ob es möglich ist, der durch PS1-FAD-Mutanten induzierten verstärkten Produktion von A β 42 durch Mutationen im zentralen GxxxG-Motiv entgegenzuwirken.

2. Ergebnisse

2.1. Untersuchung des Oligomerisierungszustandes von rekombinantem C100

Zur Untersuchung der γ -Sekretase-Aktivität sind *in vitro*-Tests verbreitet, bei denen das rekombinant exprimierte APP-C-terminale Fragment C100 als Substrat verwendet wird. Über die Konformation des C100, das in Detergenzmicellen rekonstituiert wird, ist bislang wenig bekannt. Die Dimerisierung von C100 hat einen deutlichen Einfluss auf die Effizienz und Spezifität der γ -Sekretase-Prozessierung (Munter et al., 2007). Daher werden hier der Oligomerisierungszustand und die Sekundärstruktur von C100 nach Rekonstitution in SDS-Micellen untersucht.

2.1.1. Aufreinigung von C100

Zur Untersuchung des Oligomerisierungszustandes wurden Cystein-Mutanten des C100 benötigt (genauer erläutert unter 2.1.2.). Es wurden die C100-Mutanten L17C und F19C verwendet, um die Bedingungen für die Aufreinigung zu etablieren. C100, das humane C99 mit einem N-terminalen Methioninrest zur Expression in *E. coli*, lag nach dem Aufschluss der Bakterien mittels French Press in Einschlusskörpern vor. Das Protein wurde mit Harnstoffpuffer aus den Einschlusskörpern extrahiert und denaturiert. Um das Membranprotein in Lösung zu bringen und zu halten, enthielten der Harnstoffpuffer und alle weiteren verwendeten Puffer ein Detergenz, meist Natriumdodecylsulfat (SDS, „sodium dodecyl sulfate“). Nach Rückfaltung des Proteins durch Verdünnung der Proteinlösung wurde das C-terminal mit einem Hexa-Histidin-Marker versehene C100 über eine Nickel-NTA-Säule gereinigt.

Um die Ausbeute zu optimieren, wurden die Detergenzien SDS, „Nonidet P 40 substitute“ (NP-40) und Desoxycholat (DOC) auf ihre Fähigkeit hin untersucht, C100 nach der Elution von der Säule und bei der folgenden Aufkonzentration der Proben in Lösung zu halten. Wie für C100-L17C gezeigt, haben sowohl SDS als auch DOC die Fähigkeit, C100 im Eluat der Ni-NTA-Säule zu solubilisieren, wohingegen in den NP-40 enthaltenden Eluaten die Menge an gelöstem C100 deutlich niedriger ist (Abb. 2.1.A). Im SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PA-Gel) läuft die Cysteinmutante C100-L17C zum Teil als Monomer von ca. 17 kDa, zum Teil als SDS-stabiles Dimer. Geringe Mengen von C100-Dimeren sind auch im reduzierenden SDS-PA-Gel zu sehen (nicht gezeigt). Daher ist anzunehmen, dass die Dimere im nicht-reduzierenden SDS-PA-Gel nur zum Teil durch Disulfidbrücken verknüpft sind.

Nach Entfernung des präzipitierten C100 mittels Zentrifugation wurden Proteinkonzentrationen von 30 μ M in den NP-40 enthaltenden Eluaten detektiert, in Gegenwart von SDS oder DOC enthielten die Eluate 105 - 125 μ M C100 (Tab. 2.1). Eine weitere Konzentrationserhöhung bis auf 300 μ M C100 konnte durch Zentrifugation über einen Größenaus-

Detergenz (CMC)	SDS (0,20 - 0,29%)		NP-40 (0,004%)		DOC (0,08 - 0,25%)	
Konzentration (w/v)	0,1%	0,3%	0,05%	0,3%	0,1%	0,3%
$C_{\text{Eluat}}(\text{C100}) [\mu\text{M}]$	125	120	30	30	105	110
$C_{\text{Konzentrat}}(\text{C100}) [\mu\text{M}]$	~250	~300			~200	Aggregate

Tab. 2.1: Löslichkeit von C100 in unterschiedlichen Detergenzien. Konzentration von C100 im Eluat und nach Aufkonzentration der Proben in Gegenwart verschiedener Detergenzien. CMC: kritische Micellenkonzentration („critical micelle concentration“) des Detergenz in H_2O bei 20 - 25°C in Gewichtsprozent (http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/15402/Detergent_Selection_Table.pdf, Stand 05/2011).

schlussfilter in Gegenwart von 0,3% SDS erreicht werden. Bei 0,1% DOC war eine Konzentrationserhöhung nicht möglich, da das Protein ausfiel (Tab. 2.1). Daher wurden die weiteren Experimente in Gegenwart von 0,3% SDS durchgeführt.

Unter den Versuchsbedingungen liegt diese SDS-Konzentration über der kritischen Micellenkonzentration. Daher kann man davon ausgehen, dass sich das rekonstituierte C100 in SDS-Micellen befindet. Diese sind dann zu groß, um den Größenausschlussfilter zu passieren. Das erklärt, warum C100 während des Konzentrationsschrittes nicht ausfällt, obwohl es mit SDS-freiem Puffer gewaschen wird. Während des Konzentrationsschrittes wurde durch mehrfaches Waschen ein Wechsel zum jeweils benötigten Puffer vorgenommen.

Die Sekundärstruktur des gereinigten C100 wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht. Hierbei zeigte sich eine überwiegend α -helikale Struktur, erkennbar an den beiden Minima

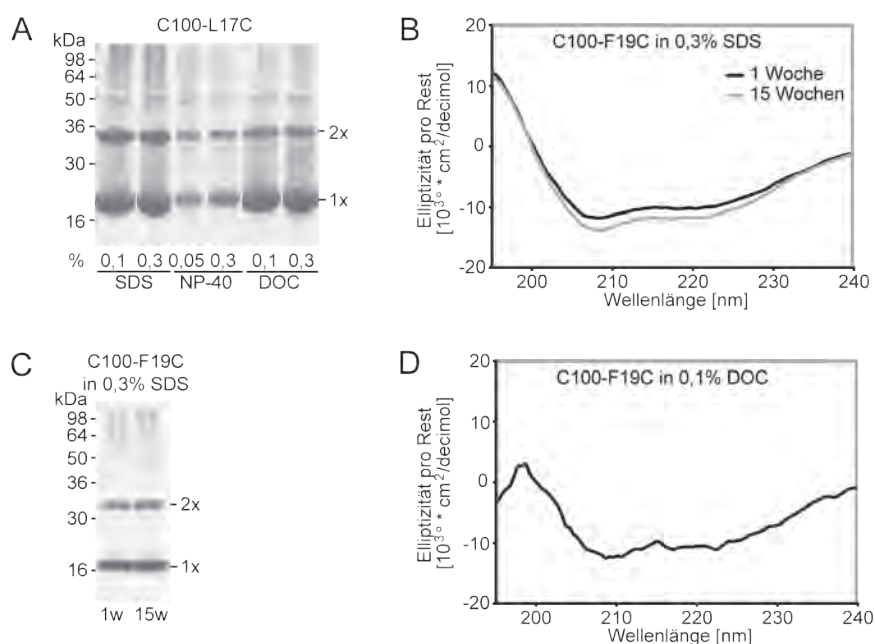


Abb. 2.1: Stabilität und Konformation von C100 in Gegenwart von SDS. C100-L17C (A) oder F19C (B-D) wurden in Harnstoffpuffer mit 1% SDS und 1% Triton x-100 (A-C) oder mit 2% DOC (D) aus den Einschlusskörpern gelöst und über eine Nickel-NTA-Säule in Gegenwart des jeweils angegebenen Detergenz aufgereinigt. C100-F19C wurde in Gegenwart von 0,02% TCEP mit einem 10-fachen molaren Überschuss an MTSL Spin-markiert (B-D). C100-F19C in SDS-Puffer wurde in Tris/ H_3PO_4 umgepuffert (B, C). Vor dem Gelauftrag bzw. der CD-Messung wurde präzipitiertes C100 durch Zentrifugation entfernt. (A, C) Gleiche Volumina (A) bzw. gleiche Mengen (C) an C100 wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen im SDS-PA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. C100-Monomere sind mit 1x bezeichnet, Dimere mit 2x. Die Inkubationsdauer ist in Wochen (w) angegeben (C). (B, D) CD-Spektren von C100-F19C in Gegenwart von SDS (B) oder DOC (D).

bei 208 und 222 nm (Abb. 2.1.B). Auch nach 15-wöchiger Lagerung bei 4°C bleibt diese erhalten, es findet keine spontane Bildung von β -Faltblatt-Strukturen statt. Das bedeutet, dass eine C100-Präzipitation durch SDS in Micellen-bildender Konzentration effektiv verhindert wird. Im SDS-PA-Gel läuft das C100 in diesen Proben primär als Monomer und Dimer, höhere Aggregate sind kaum zu sehen (Abb. 2.1.C). Auch das zeigt, dass C100 durch SDS sehr effektiv solubilisiert wird. Eine denaturierende Wirkung des SDS wird ausgeschlossen, da C100, das in Gegenwart von 0,1% DOC aufgereinigt wurde, ein sehr ähnliches CD-Spektrum zeigt (Abb. 2.1.D).

2.1.2. MTSL-Markierung von C100 zur ESR-Analyse

Mit Hilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) ist es möglich, die Beweglichkeit eines Nitroxid-Spinmarkers zu beobachten, der an einen Cysteinrest gebunden ist. Aus der Markerbeweglichkeit kann man Schlüsse über die Proteinumgebung des Markers ziehen. Hier soll diese Methode zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von C100 genutzt werden, das dafür zunächst möglichst quantitativ Spin-markiert werden muss. Um dies zu ermöglichen, mussten spontan gebildete Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten zunächst reduziert werden (Abb. 2.2.A). Hierzu wurde das Reduktionsmittel TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)-Phosphin) den Puffern zugesetzt, die zum Zellaufschluss, zur Proteinaufreinigung und zur Spin-Markierung mit dem Nitroxidreagenz MTSL (methanethio-sulfonate spin label) verwendet wurden. Die Markierung des C100 erfolgte auf der Ni-NTA-Säule, da dort überschüssiges MTSL leicht durch Waschen entfernt werden kann. Direkt nach der Spin-Markierung des C100 wurde auch das TCEP herausgewaschen, um eine Verdrängung des gebundenen MTS-Markers vom Protein zu verhindern. Nach der Elution von der Ni-NTA-Säule wurden die Proben 24 h bei 4°C gelagert, um eine Einstellung des Monomer-Dimer-Gleichgewichts sicherzustellen.

Zur ESR-Analyse wurden die C100-Mutanten L17C und F19C verwendet. Die eingefügten Cysteinreste befinden sich auf entgegengesetzten Seiten der α -Helix. Daher ist anzunehmen, dass die kovalent verknüpften Dimere, die beide Mutanten spontan bilden, unterschiedliche Kontaktflächen haben. Mögliche Auswirkungen der unterschiedlichen Dimerisierungsstellen auf die ESR-Messungen können so verglichen werden.

Die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) zeigt, dass die unmarkierten Cystein-Mutanten aufgrund der kovalenten Stabilisierung der C100-Dimere das Monomer:Dimer-Verhältnis gegenüber dem Wildtyp erniedrigen (Abb. 2.2.B, Spuren -MTSL). Nach erfolgter MTS-Markierung ist die Rekonstitution der Disulfidbrücken nicht möglich, da keine freien Sulfhydrylgruppen mehr vorhanden sind (Abb. 2.2.A). Unter der Annahme, dass die MTS-Modifikation die Tendenz des C100, SDS-stabile Dimere zu bilden, nicht beeinflusst, kann man daher das Monomer:Dimer-Verhältnis im SDS-PA-Gel als Indikator der MTS-Markierungseffizienz verwenden. Durch die Spin-Markierung wurde das Monomer:Dimer-Verhältnis von C100-F19C deutlich stärker erhöht als dasjenige von C100-L17C (Abb. 2.2.B). Es wird geschlossen, dass F19C mit hö-

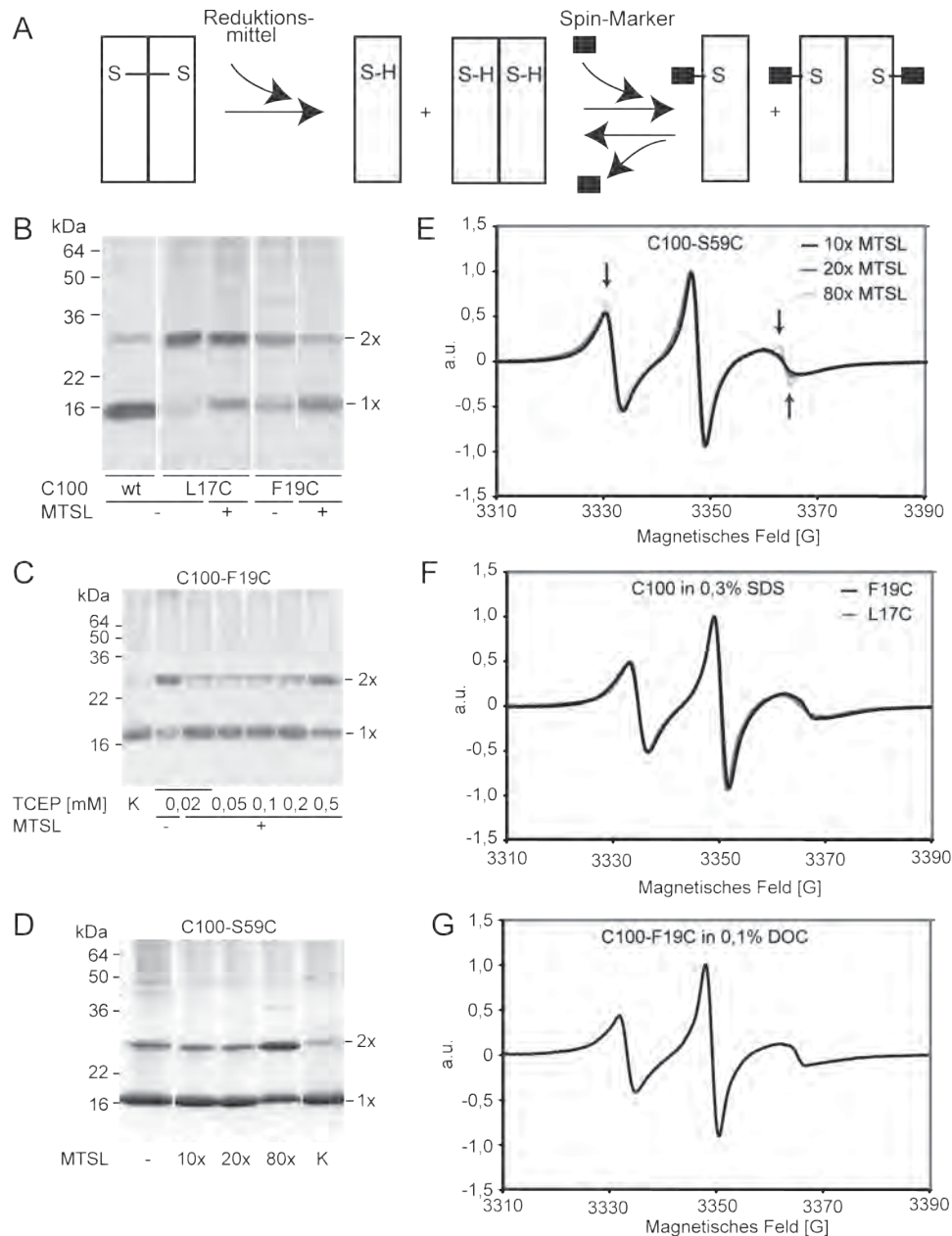


Abb. 2.2: Spin-Markierung von C100 für „continuous wave“ Elektronenspinresonanz (cw-ESR)-Messungen. (A) Schema der Spin-Markierungsreaktion unter reduzierenden Bedingungen. C100-Moleküle sind als weiße Rechtecke dargestellt, der MTS-Spin-Marker als kleiner schwarzer Kasten. Reduzierte Cysteine sind mit SH markiert, Disulfidbrücken mit S-S. (B-D) C100-wt und Cysteinmutanten nach Auftrennung im nicht-reduzierenden SDS-PA-Gel und Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. C100 wurde mit 10-fachem (B, C) oder 10- bis 80-fachem (D) MTSL-Überschuss Spin-markiert oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel inkubiert (B-D, Spuren MTSL -). Die Spin-Markierung erfolgte in Gegenwart von 0,2 (B), 0,02 bis 0,5 (C) bzw. 0,02 bis 0,05 (D) mM TCEP. Zur Unterscheidung von Disulfid-verbrückten und nicht-kovalenten SDS-resistenten Dimeren wurde eine Spin-markierte Probe mit 2 mM TCEP monomerisiert und als Kontrolle mitgeführt (C, D, Spuren K). (E-G) cw-ESR-Spektren der C100-Cysteinmutanten (ESR-Messung: Ringo Wenzel, a.u.: willkürliche Einheiten, „arbitrary units“). C100-S59C wurde mit 10- bis 20-fachem MTSL-Überschuss in Gegenwart von 0,02 mM TCEP oder mit 80-fachem MTSL-Überschuss in Gegenwart von 0,05 mM TCEP Spin-markiert (E), C100-L17C mit 10-fachem MTSL-Überschuss in Gegenwart von 0,2 mM TCEP (F) und C100-F19C mit 10-fachem MTSL-Überschuss in Gegenwart von 0,02 mM TCEP (F, G). Die eluierten Proben wurden auf einem 10 kDa-Größenausschlussfilter mit Puffer ohne Detergenz (E, F) oder mit 0,1% DOC (G) gewaschen, um ungebundenes MTSL zu entfernen. Signale des ungebundenen Spin-Markers sind in (E) mit Pfeilen gekennzeichnet.

herer Effizienz markiert wird. Für weitere Untersuchungen des Spin-markierten C100 wurde daher die Mutante F19C verwendet.

Um die Effizienz der Spin-Markierung zu optimieren, wurden die TCEP- und MTSL-Konzentrationen während der Markierungsreaktion variiert. Es zeigte sich, dass in Gegenwart von TCEP-Konzentrationen von 0,02 bis 0,2 mM die Markierungseffizienz gleichmäßig gut war (Abb. 2.2.C). Ein zehnfacher molarer Überschuss an MTSL gegenüber dem C100 ermöglichte bereits eine effiziente Markierung (Abb. 2.2.D, hier wurde die Mutante S59C aus dem cytosolischen Teil der C100-Sequenz eingesetzt). Gegen die Verwendung höherer MTSL-Konzentrationen spricht auch die Schwierigkeit, große Mengen an überschüssigem Spin-Marker wieder zu entfernen. Die ESR-Spektren zeigen nach der Markierung mit einem 20- oder 80-fachen molaren Überschuss an MTSL noch deutliche Signale für freie Spin-Marker, da das ungebundene MTSL nicht komplett gewaschen wurde (Abb. 2.2.E). Bei allen folgenden Spin-Markierungen wurde mit einem 10-fachen Überschuss an MTSL in Gegenwart von 0,02 mM TCEP gearbeitet.

2.1.3. Oligomerisierungszustand von C100

Zur Untersuchung des Oligomerisierungszustandes von C100 wurden „continuous wave“ (cw-)ESR-Messungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Robert Bittl (Institut für Experimentalphysik, Freie Universität Berlin) durch Ringo Wenzel durchgeführt. Man verwendet diese Methode, um Änderungen in der Mobilität markierter Aminosäurereste und ihrer Zugänglichkeit für wasser- oder lipidlösliche paramagnetische „Quencher“ zu untersuchen. Hier wird sie eingesetzt, um die Unterschiede zwischen C100-F19C-Proben zu messen, die Monomere, Dimere und kreuzvernetzte Oligomere in verschiedenen Verhältnissen enthalten. Die Oligomerisierung markierter Proteine kann die Beweglichkeit des Marker-Nitroxids sterisch behindern, was zu einer verminderten Beweglichkeit des MTS-Markers und Verschiebungen im cw-ESR Spektrum führt (Hubbell et al., 2000). Im Fall des α -helikalen C100-F19C wäre durch eine Kreuzvernetzung des Proteins zu erwarten, dass die sterisch eingeschränkte Beweglichkeit des MTSLs zu einer Linienverbreiterung im cw-ESR-Spektrum führt.

Um den möglichen Einfluss der unterschiedlichen Dimerisierungsoberflächen der C100-Mutanten L17C und F19C zu untersuchen, wurden die cw-ESR-Spektren verglichen (Abb. 2.2.F). Die Linienbreite ist bei beiden Mutanten niedrig, was auf eine geringe sterische Behinderung der MTSL-Bewegung durch das Protein hinweist. Die Spektren der beiden C100-Mutanten sind sehr ähnlich. Das bedeutet entweder, dass die Dimerisierungsoberfläche keinen größeren Einfluss auf die MTSL-Beweglichkeit hat, oder dass nach der Reduktion der Disulfidbrücken beide Mutanten dieselbe Konformation aufweisen, in der sie nur noch über die GxxxG-Motive der TMS interagieren.

Das cw-ESR-Spektrum von C100-F19C, das in Gegenwart von 0,1% DOC aufgereinigt und markiert wurde, zeigte keine großen Abweichungen von den Spektren der Proben in SDS-Puffer (Abb. 2.2.G). Daher wird angenommen, dass SDS die zur Untersuchung des Oligomerisierungszustandes gemessenen ESR-Spektren nicht verändert.

Um zu untersuchen, ob C100-F19C in SDS-Micellen in Form von höheren Oligomeren vorliegt, als sie im SDS-PA-Gel zu sehen sind, wurden die C100-Moleküle über den kleinen Amin-Kreuzvernetzer DFDNB (1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzen) verknüpft. Es ist zu erwarten, dass spezifisch miteinander interagierende Proteine sich relativ zügig und durch geringe DFDNB-Mengen vernetzen lassen. Nach der Kreuzvernetzung von C100 mit 5-fachem molarem DFDNB-Überschuss waren im SDS-PA-Gel fast ausschließlich Monomere und Dimere in einem Verhältnis von ca. 50:50 sowie eine sehr geringe Menge an Trimeren zu sehen (Abb. 2.3.A, Spur 5x DFDNB, 1d). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass spezifische Protein-Protein-Interaktionen des C100 sich fast komplett auf Dimere beschränken.

Durch die Verlängerung der Inkubationszeit auf 3 Tage in Gegenwart eines 5-fachen DFDNB-Überschusses sowie den Einsatz extrem hoher DFDNB-Konzentrationen konnten Proben mit höherem Vernetzungsgrad hergestellt werden (Abb. 2.3.A, 5x, 20x und 50x DFDNB). Die Oligomere in diesen Proben entstehen wahrscheinlich durch transiente Protein-Interaktionen erst während der langen Inkubationszeit. Die Kreuzvernetzungsreaktion scheint zu einer Erniedrigung des apparenten Molekulargewichts von C100 abhängig von der DFDNB-Konzentration zu führen (Abb. 2.3.A). Diese wurde nicht durch Fragmentierung des C100 hervorgerufen, wie mit Hilfe einer MALDI-MS-Analyse nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt). Wahrscheinlich verhindert die Kreuzvernetzung die komplette Entfaltung des Proteins im Probenpuffer, was zu einer kompakteren Konformation und schnellerem Laufverhalten im Gel führen würde.

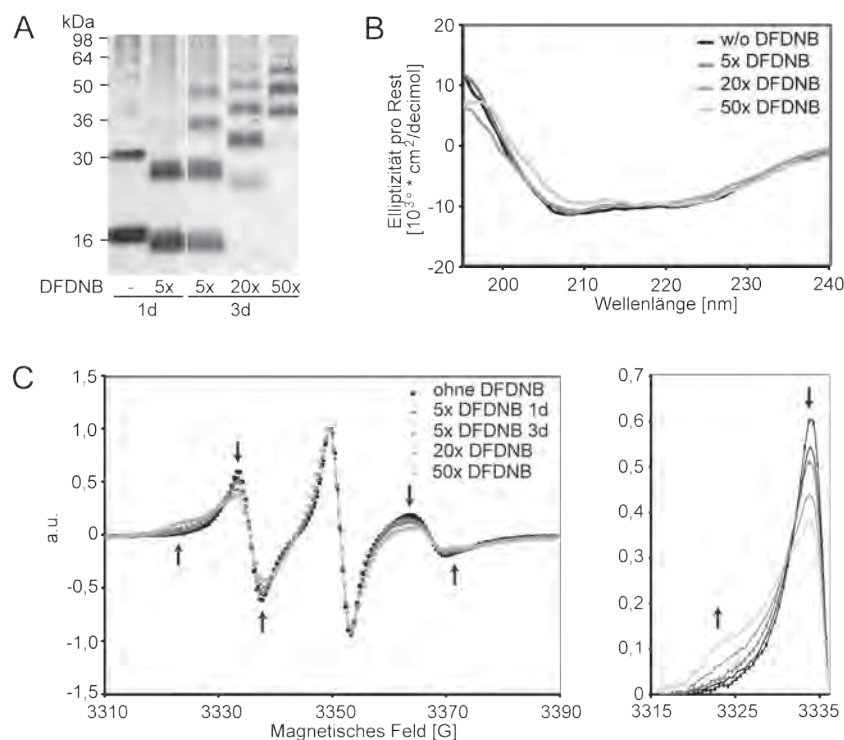


Abb. 2.3: CD- und cw-ESR-Messungen von kreuzvernetzten C100-Oligomeren. C100-F19C wurde mit 10-fachem MTSL-Überschuss in Gegenwart von 0,02 mM TCEP Spin-markiert. Nach einem Pufferwechsel zu 50 mM Natriumphosphat wurden die Proben mit einem 5- bis 50-fachen molaren Überschuss an DFDNB für 30 min bei Raumtemperatur kreuzvernetzt und 1 oder 3 Tage bei 4°C gelagert. Die Proben wurden im nicht-reduzierenden SDS-PA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (A), im CD-Spektrometer (B) und im cw-ESR-Spektrometer (C) vermessen. Der Bereich von 3315 bis 3336 G des ESR-Spektrums ist zusätzlich vergrößert gezeigt (C, rechtes Feld). Durch die Oligomerisierung induzierte Verschiebungen im ESR-Spektrum sind mit Pfeilen markiert. (ESR-Messung: Ringo Wenzel, a.u.: willkürliche Einheiten)

Die kreuzvernetzten C100-F19C-Oligomere (Abb. 2.3.A) wurden mittels CD-Spektroskopie analysiert, um zu untersuchen, ob die Oligomerisierung die native Proteinfaltung beeinträchtigt (Abb. 2.3.B). Interessanterweise wurde die α -helikale Proteinkonformation selbst durch die Kreuzvernetzung mit einem 50-fachen molaren Überschuss an DFDNB nicht verändert. Die geringen Unterschiede zwischen den Spektren mit und ohne Kreuzvernetzer sind wahrscheinlich durch die Oligomerisierung selbst hervorgerufen. Dies wird auch durch die Linienverbreiterung im cw-ESR-Spektrum der kreuzvernetzten Proben unterstützt, die eine verringerte Mobilität des Spin-Markers im Vergleich mit den unvernetzten Proben anzeigt (Abb. 2.3.C). Diese Verbreiterung korreliert mit der Anwesenheit und der Menge an Oligomeren und ist erkennbar an der Erniedrigung des Maximums bei ca. 3335 G und an der Schulter, die bei ca. 3324 G auftaucht (Abb. 2.3.C, rechtes Feld).

Erwähnenswert ist noch, dass das Maximum bei ca. 3335 G, das durch Spin-Marker-Moleküle mit besonders hoher Mobilität hervorgerufen wird, auch nach der Kreuzvernetzung noch den Hauptanteil des Signals ausmacht. Das liegt daran, dass die Kreuzvernetzung nicht nur an Aminogruppen in unmittelbarer Nähe des Spin-Markers stattfindet, sondern auch an weiter entfernten, deren Vernetzung die Spin-Beweglichkeit nicht einschränkt.

Ein Einfluss, den der Kreuzvernetzer jenseits der C100-Oligomerisierung auf die ESR-Spektren ausüben könnte, kann ausgeschlossen werden, da die Linienverbreiterung auch zu sehen war, wenn die DFDNB-Konzentration konstant blieb aber die Inkubationszeit verlängert wurde. Unter diesen Bedingungen wurden bei gleicher DFDNB-Konzentration mehr der höheren Oligomere erzeugt (Abb. 2.3.A, C, 5x DFDNB, 1d vs. 3d).

Wichtig ist besonders, dass die Linienverbreiterung bereits nach eintägiger Behandlung mit einem 5-fachen DFDNB-Überschuss zu sehen ist, was fast nur zur Vernetzung von Dimeren und kleinen Mengen von Trimeren führt. Dieser Effekt kann nur durch die Trimere und die Erniedrigung des Monomer:Dimer-Verhältnisses hervorgerufen werden. Daraus kann man schließen, dass das C100 vor der Kreuzvernetzung nur in Form von Monomeren und Dimeren, aber nicht höheren Oligomeren vorliegt. Die α -helikale Konformation scheint unabhängig vom Oligomerisierungszustand zu sein, was auf eine ungewöhnlich hohe konformationelle Stabilität von C100 in Gegenwart von SDS hinweist. Damit ist C100, das nach der hier beschriebenen Methode aufgereinigt wurde, sehr gut geeignet für *in vitro* γ -Sekretase-Tests.

2.2. Bindung von γ -Sekretase-Modulatoren an C100

γ -Sekretase-Modulatoren (GSM) modifizieren *in vivo* und *in vitro* die A β -Produktion, so dass mehr A β 38 und weniger A β 42 entsteht (Eriksen et al., 2003; Weggen et al., 2001). Von einigen GSM wurde gezeigt, dass sie an den Transmembran-Anteil der A β -Sequenz binden und das Monomer:Dimer-Verhältnis der APP-TMS erhöhen (Kukar et al., 2008; Richter et al., 2010). Anhand eines *in silico*-Modells wurde postuliert, dass die Interaktion von GSM

und APP-TMS primär konformationell, nämlich durch die α -helikale flache Oberfläche der GxxxG-Motive der APP-TMS, begründet ist (Richter et al., 2010).

Hier soll zunächst mittels Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR) verifiziert werden, dass der GSM Sulindacsulfid tatsächlich spezifisch mit der α -helikalen TMS des Vollängen- γ -Sekretase-Substrats C100 interagiert. So soll ausgeschlossen werden, dass die berichtete Bindung an A β z.B. über eine β -Faltblatt-Struktur des aggregierenden Peptides verläuft. Als nächstes wird die These, dass Sulindacsulfid an die flache Oberfläche des zentralen GxxxG-Motivs bindet, mit Hilfe der C100-Mutante G33I überprüft, die diese Oberfläche zerstört. Zuletzt wird mit Hilfe der disulfidverbrückten C100-Mutante L17C untersucht, ob es Unterschiede in der Sulindacsulfid-Bindung an monomeres und dimeres C100 gibt. Letzteres gibt Aufschluss darüber, wie die Erhöhung des Monomer:Dimer-Verhältnisses durch Sulindacsulfid mechanistisch abläuft.

2.2.1. Konzentrationsabhängige Bindung von Sulindacsulfid an C100

Die Untersuchung der A β -GSM-Interaktion mittels SPR durch Richter et al. zeigte, dass der GSM Sulindacsulfid konzentrationsabhängig an A β bindet. Sulindac und sein Sulfonderivat, die sich von Sulindacsulfid nur im Oxidationszustand des Schwefelatoms unterscheiden, binden dagegen nicht. Ein weiterer GSM, Indomethacin, zeigte eine ebenfalls konzentrationsabhängige, aber sehr schwache A β -Interaktion (Richter et al., 2010).

Hier wurde zunächst die Interaktion von C100-wt mit Sulindacsulfid untersucht. Dafür wurde C100 über seine C-terminale Hexa-His-Markierung an einen SPR-Sensorchip mit Nickel-NTA Oberfläche gekoppelt und Sulindacsulfid als Analyt über die Oberfläche gegeben. Die Sulindacsulfid-Injektion rief eine schnelle, konzentrationsabhängige Veränderung des Resonanzsignals hervor. Nach dem Ende der Injektion ging das Signal ebenso schnell auf den Ursprungswert zurück (Abb. 2.4.A). Dies lässt auf eine schnelle Assoziation und Dissoziation schließen, ähnlich wie bereits für die Interaktion mit A β gezeigt (Richter et al., 2010). Aufgrund der geringen Größe des GSMs waren die Assoziations- und Dissoziationsraten zu schnell für eine kinetische Analyse. Die Injektion von Sulindac, Sulindacsulfon oder Indomethacin rief keine signifikante SPR-Antwort hervor (Abb. 2.4.B, beispielhaft gezeigt für Sulindacsulfon). Sulindacsulfid interagiert also spezifisch und konzentrationsabhängig mit C100.

Als nächstes wurde die GSM-Bindung an die C100-Mutanten L17C und G33I untersucht. Im SDS-PA-Gel zeigte G33I ein zum Wildtyp identisches Monomer:Dimer-Verhältnis, wohingegen die Cysteinmutante L17C erwartungsgemäß mehr SDS-stabile Dimere bildete (Abb. 2.4.C). Sulindacsulfid zeigte eine konzentrationsabhängige Interaktion mit beiden Mutanten (Abb. 2.4.D, E, Signale für 50 μ M Sulindacsulfid jeweils auf 100% gesetzt). Dagegen fand keine Bindung von Sulindac, Sulindacsulfon oder Indomethacin statt (nicht gezeigt).

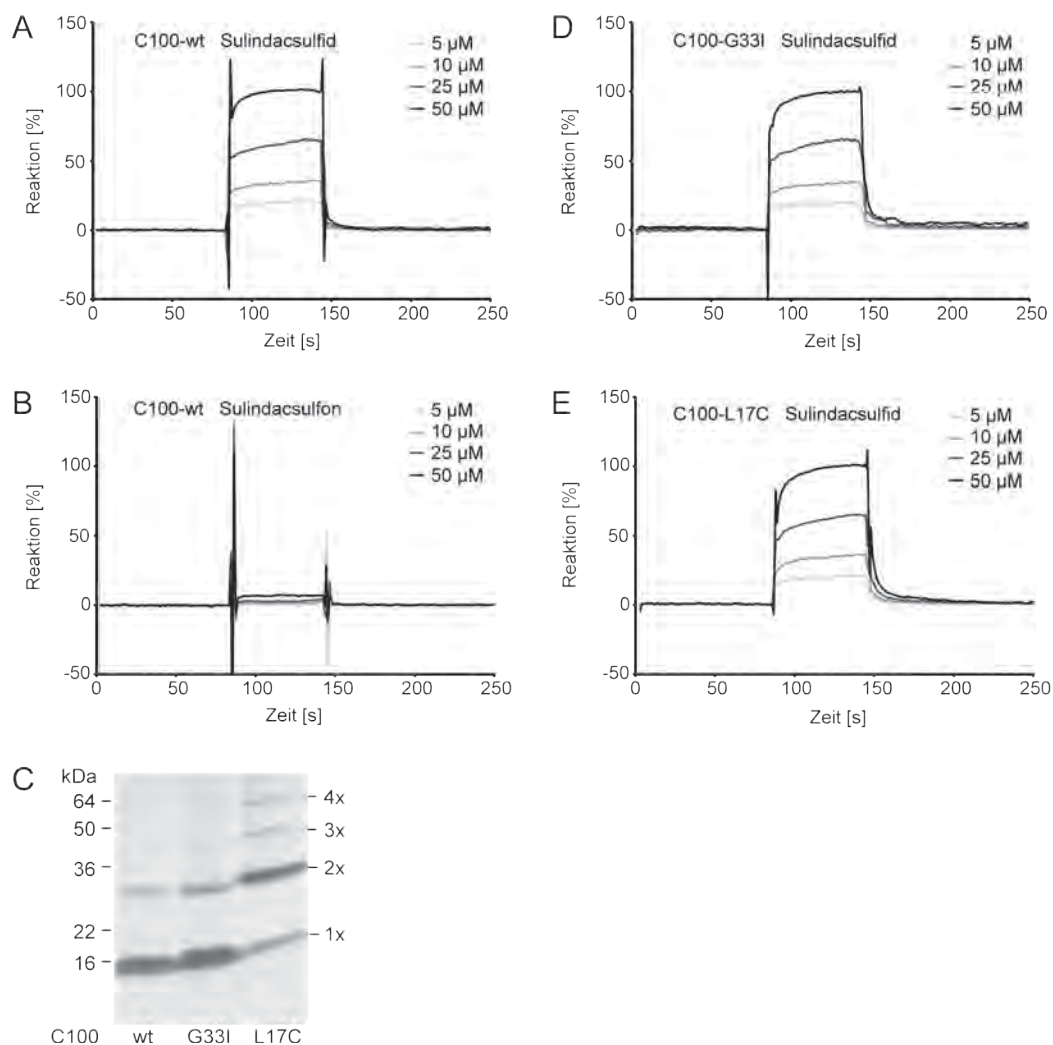


Abb. 2.4: SPR-Analyse der Bindung von Sulindacsulfid an C100. (A, B, D, E) SPR-Sensorgramme der Interaktion von Sulindacsulfid (A, D, E) oder Sulindacsulfon (B) mit C100-wt (A, B), C100-G33I (D) und C100-L17C (E) gekoppelt an einen Nickel-NTA-Sensorchip. Die Sulindacderivate wurden für 60 s bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Alle Bindungskurven wurden an das Molekulargewicht der Sulindacderivate angepasst und die Antwort der DMSO/ Puffer-Kontrolle und der leeren Flusszelle wurde abgezogen. Das Signal bei Injektion von 50 μM Sulindacsulfid wurde jeweils auf 100% gesetzt. Die Sensorgramme zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. (C) C100-wt, G33I und L17C nach Auftrennung im nicht-reduzierenden SDS-PA-Gel und Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. C100-Monomere sind mit 1x bezeichnet, Dimere mit 2x, Trimere mit 3x und Tetramere mit 4x.

2.2.2. Verstärkte Bindung von Sulindacsulfid an C100-Dimere

Zum Vergleich der mittels SPR gemessenen Interaktion von Sulindacsulfid mit verschiedenen C100-Mutanten wurde auf die Menge der an den Sensorchip gekoppelten C100-Moleküle normiert und die maximale Antwort bei der höchsten Sulindacsulfidkonzentration (50 μM) und C100-wt auf 100% gesetzt (Abb. 2.5.A). Dabei zeigte sich, dass bei Injektion von 50 μM Sulindacsulfid die Bindung an C100-L17C um 29% erhöht, die an C100-G33I dagegen um 25% erniedrigt war (Abb. 2.5.A, B). Die verstärkte Bindung an die stark dimerisierende Mutante L17C weist auf eine bevorzugte Sulindacsulfidbindung an C100-Dimere hin. Im Fall von C100-L17C scheinen Assoziations- und Dissoziationsrate des Sulindac-

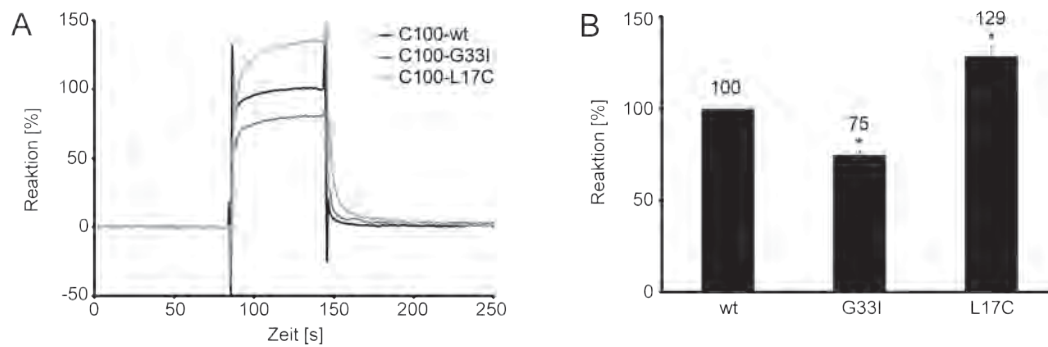


Abb. 2.5: Vergleich der Bindung von Sulindacsulfid an C100-wt, G33I und L17C. (A) SPR-Sensorgramm der Interaktion von Sulindacsulfid mit C100-wt, G33I und L17C. 50 μ M Sulindacsulfid wurden für 60 s bei einer Flussrate von 30 μ l/min injiziert. Von den Bindungskurven wurde die Antwort der DMSO/ Puffer-Kontrolle und der leeren Flusszelle abgezogen. Die Signale wurden auf die Menge an gekoppelten C100-Molekülen normiert und die maximale SPR-Antwort bei C100-wt auf 100% gesetzt. Das Sensorgramm zeigt die Mittelwerte aus vier unabhängigen Messungen. (B) Signifikanzberechnung der Bindung von Sulindacsulfid an C100-wt und Mutanten. Die Werte wurden aus den in (A) gemittelten Sensorgrammen errechnet. Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum Referenzwert von 100% an mit * $p < 0,05$ (t-Test nach Student).

sulfids etwas erniedrigt (Abb. 2.5.A), möglicherweise aufgrund der Disulfidbrücke, die die Beweglichkeit des C100 einschränkt. Dieser Effekt ist aber aufgrund der extrem schnellen Assoziation und Dissoziation nicht quantifizierbar.

2.2.3. Modellierung der Sulindacsulfid-Bindungsstelle des C100

Ein mittels molekularer Modellierung erstelltes Modell der β -Sulindacsulfid-Interaktion zeigte eine Bindung des GSM an die flache Oberfläche der drei GxxxG-Motive, bevorzugt zwischen den Glycinresten 29 und 33 (Richter et al., 2010). Das lässt vermuten, dass die bei der SPR-Messung gezeigte verminderte Bindung von Sulindacsulfid an C100-G33I direkt mit der veränderten Bindungsoberfläche zusammenhängt. Um dies zu untersuchen, wurde von Dr. Peter W. Hildebrand und Jochen Ismer (Charité Berlin) ein molekulares Modell für die Interaktion von Sulindacsulfid mit C100-G33I erstellt (Abb. 2.6, C100-wt vs. G33I). Dieses zeigt, dass ein Isoleucin in Position 33 die flache Bindungsoberfläche stört, so dass das Sulindacsulfid an anderer Stelle bindet als bei C100-wt. Der GSM bildet mit C100-wt

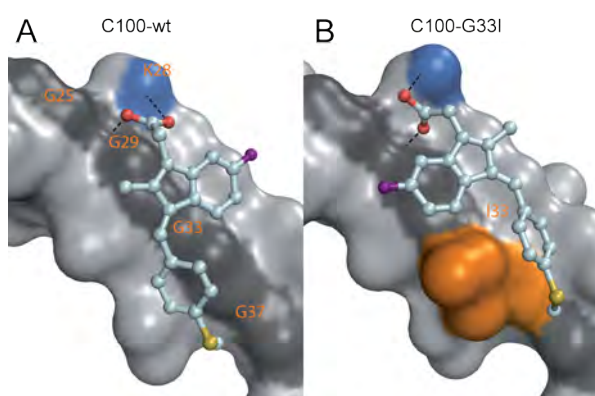


Abb. 2.6: Modell der Sulindacsulfidbindung an C100-wt (A) oder G33I (B). Sauerstoffatome sind rot dargestellt, Schwefelatome gelb und Fluoratome lila. Die Glycinreste der GxxxG-Motive, die die flache Bindungsoberfläche bilden, sind dunkelgrau gekennzeichnet, die Seitenketten K28 und I33 sind blau bzw. orange markiert. Mögliche Wasserstoffbrücken sind als schwarze gestrichelte Linien eingezeichnet.

und G33I dieselben Wasserstoffbrücken aus, ist aber bei der Bindung an G33I um 180° um seine Längsachse gedreht und in Bezug auf das C100 um ca. 5 Å verschoben. Sulindacsulfid würde bei C100-G33I also zwischen den großen Seitenketten der Aminosäurereste I32, I33 und L36 interkalieren und mit ihnen van-der-Waals-Kontakte ausbilden. Dies würde die Beweglichkeit der Seitenketten, vor allem die von I33, deutlich einschränken. Der resultierende Entropieverlust kann die Verringerung der SPR-Antwort bei Bindung von Sulindacsulfid an C100-G33I erklären.

2.3. Einfluss der Substratdimerisierung auf die A β -Produktion durch PS1-FAD-Mutanten

Es herrscht derzeit noch Uneinigkeit darüber, über welchen Mechanismus die Toxizität der PS1-FAD-Mutanten vermittelt wird und ob es überhaupt einen einheitlichen Mechanismus für alle Mutanten gibt. Die meisten PS1-Mutanten erhöhen entweder die absolute Menge an produziertem A β 42 oder das Verhältnis von A β 42:A β 40 (Borchelt et al., 1996; Citron et al., 1997; Duering et al., 2005; Duff et al., 1996; Jankowsky et al., 2004). Es gibt jedoch auch PS1-FAD-Mutanten (z.B. V82L und L250S), die von diesem Mechanismus abweichen. Diese führen allerdings auch erst relativ spät, im Alter von mindestens 50 Jahren, zum Ausbruch der Krankheit (Shioi et al., 2007).

Ein weiterer, bisher kaum erforschter Effekt ist die Produktion von intrazellulärem A β , das ebenfalls neurodegenerative Wirkung hat (D'Andrea et al., 2001; Christensen et al., 2008; Rebeck et al., 2010). Die PS1-FAD-Mutante V97L, die im Alter von etwa 50 Jahren zum Ausbruch der Alzheimer-Krankheit führt, erhöht neben dem extrazellulären auch das intrazelluläre A β 42-Level bei jeweils gleichen gesamt-A β -Mengen (Fang et al., 2006; Jia et al., 2005). Auch eine Reihe anderer PS1- und PS2-Mutanten erhöhen in Zellkultur das intrazelluläre A β 42:A β 40-Verhältnis (Qi et al., 2003).

Um zu klären, über welche Mechanismen jeweils die Toxizität vermittelt wird, wurden alle betrachteten PS1-Mutanten zunächst hinsichtlich ihres Einflusses auf die extra- und intrazelluläre A β -Produktion charakterisiert. Daraufhin wurde untersucht, ob die pathologischen Effekte der PS1-FAD-Mutanten durch Mutationen im APP-GxxxG-Motiv ausgeglichen werden können, die die Prozessierung zu kürzeren A β -Spezies ermöglichen. Sollten auch die PS1-Mutanten auf die APP-CTF-Monomerisierung durch die GxxxG-Mutanten reagieren, würde dies das therapeutische Potential von Substanzen unterstreichen, die die APP-CTF-Dimerisierung verringern.

Die hier untersuchten PS1-Mutanten lassen sich in zwei Gruppen einteilen (Abb. 2.7): Die erste bilden die zu einem sehr frühen Krankheitsausbruch (mit 32 - 45 Jahren) führenden „early onset“ (eo-)FAD-Mutanten M146L, L153V, G378V, L381V und G384A (Abb. 2.7, rote Punkte). M146L und L153V liegen in der Transmembransequenz (TMS) 2, die Anteil an der initialen Substratbindestelle und/ oder dem aktiven Zentrum haben könnte (Watanabe et al., 2010). G378V, L381V und G384A befinden sich in direkter Nähe zum katalytischen As-

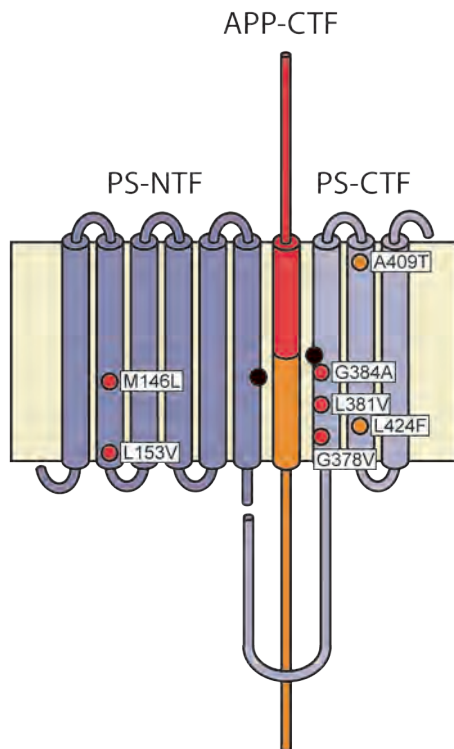


Abb. 2.7: Analytierte PS1-FAD-Mutanten.

Modell des Heterodimers aus PS1-NTF und PS1-CTF mit gebundenem Substrat APP-CTF. Die katalytisch aktiven Aspartatreste 257 und 385 sind durch schwarze Punkte dargestellt. Die ausgetauschten Aminosäuren sind durch rote (eo-FAD-Mutanten) bzw. orangefarbene (lo-FAD-Mutanten) Punkte markiert.

partatrest D385 in der TMS 7 und sind der wasser-gefüllten Pore im Inneren des γ -Sekretase-Komplexes zugewandt (Sato et al., 2006; Tolia et al., 2006). Dies könnte eine direkte Interaktion dieser Aminosäurereste mit dem Substrat ermöglichen. Die zweite Gruppe bilden die Mutanten A409T und L424F, die bei ihren Trägern erst mit etwa 58 Jahren zum Krankheitsausbruch führen (Abb. 2.7, orangefarbene Punkte). Diese beiden „late onset“ (lo-)FAD-Mutanten liegen in der TMS 8, die keinen Anteil an der hydrophilen Pore des γ -Sekretase-Komplexes hat (Sato et al., 2008).

Die A β -Produktion der in SH-SY5Y-Zellen stabil überexprimierten HA-markierten Presenilinmutanten wurde mittels ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) untersucht. Da A β 38 im Vergleich mit A β 42 und A β 40 nur in sehr geringen Mengen produziert wird, wurde statt APP das Flag-markierte Konstrukt SPA4CT koexprimiert, um messbare A β 38-Mengen produzieren zu können. SPA4CT besteht aus dem Start-Methionin, dem APP-Signalpeptid sowie dem 99 Aminosäuren langen APP-CTF (Dyrks et al., 1992). Durch den vorweggenommenen β -Sekretase-Schnitt ist die A β -Produktion aus SPA4CT im Vergleich

zu APP deutlich gesteigert. Die Messung der Sekretion verschiedener A β -Spezies durch APP oder SPA4CT exprimierende Zellen ergibt vergleichbare Ergebnisse für die Effekte der GxxxG-Mutanten (Munter et al., 2007).

G378V, L381V und G384A, die eo-PS1-Mutanten der TMS 7, wurden in stabil SPA4CT exprimierende SH-SY5Y-Zellen kotransfiziert, und die doppelt stabilen Zellen wurden mittels Western Blot auf eine gleichmäßige Expression von Vollängen-PS1, PS1-NTF und SPA4CT untersucht (Abb. 2.8.A, B). Hierbei kann beobachtet werden, dass das in SH-SY5Y-Zellen endogen vorhandene Wildtyp-PS1-NTF durch das HA-markierte exogene PS1-NTF ersetzt wird, das im SDS-PA-Gel etwas langsamer läuft. Dieser Effekt ist schon mehrfach beschrieben worden und stellt eine gute Kontrolle für die hinreichende Überexpression der Mutanten dar (Thinakaran et al., 1997; Uemura et al., 2003). Bei allen durchgeführten ELISAs wurden die Expressionslevel neu überprüft, um einen Expressionsverlust bei höheren Passagen auszuschließen.

Die SH-SY5Y-Zellen, die die PS1-Mutanten der TMS 2 (eo-FAD-Mutanten M146L und L153V) oder 8 (lo-FAD-Mutanten A409T und L424F) stabil exprimieren, wurden für jede ELISA- oder MALDI-Analyse transient mit SPA4CT transfiziert. Die Expressionsniveaus an Vollängen-PS1, PS1-NTF und SPA4CT wurden bei jedem Experiment neu überprüft und nur Ansätze mit vergleichbaren Expressionsniveaus für die Auswertung verwendet (Abb. 2.8.C, D).

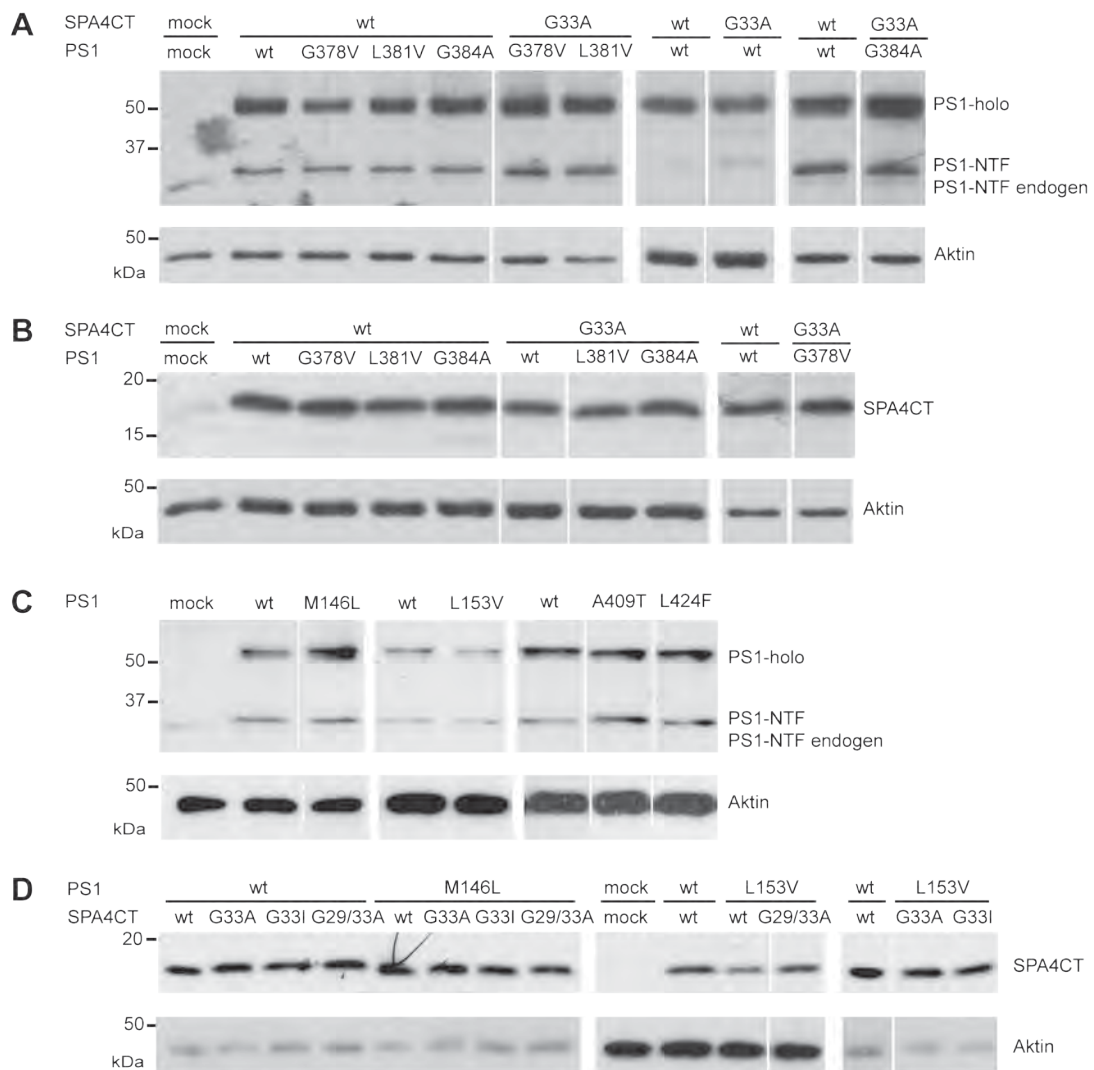


Abb. 2.8: Western Blot-Analyse der PS1- und SPA4CT-Expression von SH-SY5Y-Zellen. (A, C) Stabile PS1-Expression nachgewiesen durch Immundetektion mit dem Antikörper NT1 gegen den PS1-N-Terminus. Die Bildung des endogenen N-terminalen PS1-Fragments (PS1-NTF), das nur in der Vektorkontrolle (mock) zu sehen ist, wird bei PS1-Überexpression unterdrückt. Dort sind das Holoprotein (PS1-holo) sowie das exogene PS1-NTF zu erkennen, das aufgrund der HA-Markierung ein höheres Molekulargewicht hat als das endogene. (B, D) Stabile (B) oder transiente (D) SPA4CT-Expression nachgewiesen durch Immundetektion mit dem Antikörper W0-2 gegen die Aminosäuren 4-10 des C-terminalen Fragments von APP. (A-D) Die unteren Felder zeigen jeweils die Aktinexpression der Zellen als Ladekontrolle.

Alle untersuchten Zelllinien zeigten eine vergleichbare Effizienz der SPA4CT-Prozessierung unabhängig von den verwendeten PS1-FAD- und SPA4CT-GxxxG-Mutanten, wie die Quantifizierung des gesamt-A β -Spiegels mittels ELISA zeigt (Abb. 2.9.A-C).

2.3.1. Charakterisierung von PS1-FAD-Mutanten hinsichtlich der A β -Produktion

Die verwendeten Presenilinmutanten wurden zunächst daraufhin untersucht, ob und wie sie das Muster an extrazellulär und intrazellulär aus SPA4CT-wt produzierten A β -Spezies im Vergleich zu PS1-wt verschieben. Zum einen wurden A β 42 und A β 38 betrachtet, die

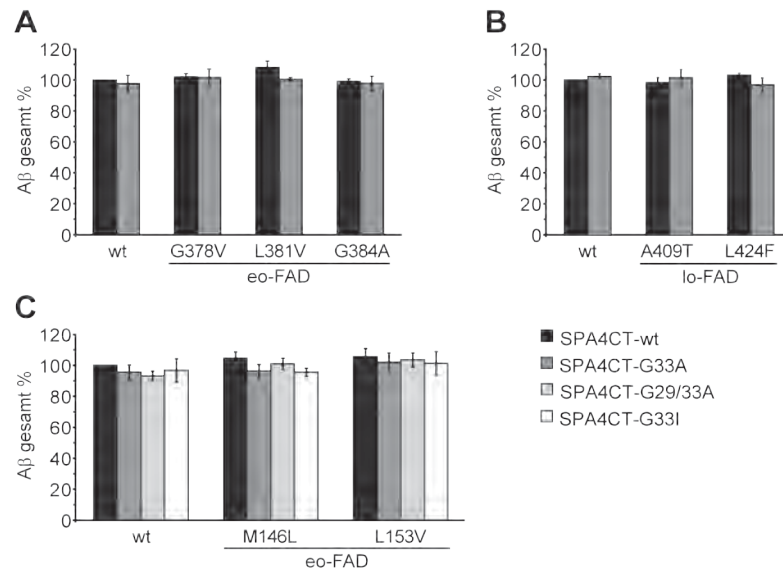


Abb. 2.9: ELISA-Quantifizierung der gesamt-A β -Sekretion. A β -Sekretion der SH-SY5Y-Zellen mit stabiler HA-PS1- und stabiler (A) bzw. transienter (B, C) SPA4CT-Überexpression. A β wurde aus dem Zellkulturmedium mittels ELISA mit den Antikörpern 4G8 (gegen A β 17-24) und Biotin-W0-2 (gegen A β 4-10) quantifiziert. Die jeweiligen PS1-Mutationen sind unter den Diagrammen angegeben (eo-FAD: frühes Erkrankungsalter, lo-FAD: spätes Erkrankungsalter). Die für PS1-wt gemessenen Werte wurden auf 100% gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen, n = 3-10 (A) / 3-5 (B) / 4-7 (C).

beide zu derselben Produktlinie gehören (s. Abb. 1.4). Da A β 42 der Vorläufer von A β 38 ist, lässt die Messung der Niveaus dieser beiden A β -Spezies Schlüsse auf die Effektivität der γ -Schnitte zu. Außerdem wurde die Produktion von A β 40 untersucht, das aus der anderen Produktlinie stammt (s. Abb. 1.4). So konnte überprüft werden, ob die untersuchten PS1-Mutanten zu einer Verschiebung zwischen den Produktlinien führen.

Extrazellulär erhöhen die eo-FAD-Mutanten mit Ausnahme von M146L die Produktion von A β 42 (Abb. 2.10.B, 2.11.B) und erniedrigen (signifikant nur für G378V, L381V und L424F) den Spiegel an A β 38 (Abb. 2.10.C, 2.11.C). Einen signifikanten Einfluss auf die A β 40-Sekretion hat nur die Mutante G384A. Wie bereits bekannt (Czirr et al., 2008) verringert sie die A β 40-Sekretion (Abb. 2.10.A, 2.11.A). Alle betrachteten eo-FAD-Mutanten scheinen also nach dem „klassischen“ Mechanismus das absolute A β 42-Niveau sowie die Verhältnisse A β 42:A β 40 und A β 42:A β 38 zu erhöhen. Die Erhöhung des A β 42:A β 38-Verhältnisses

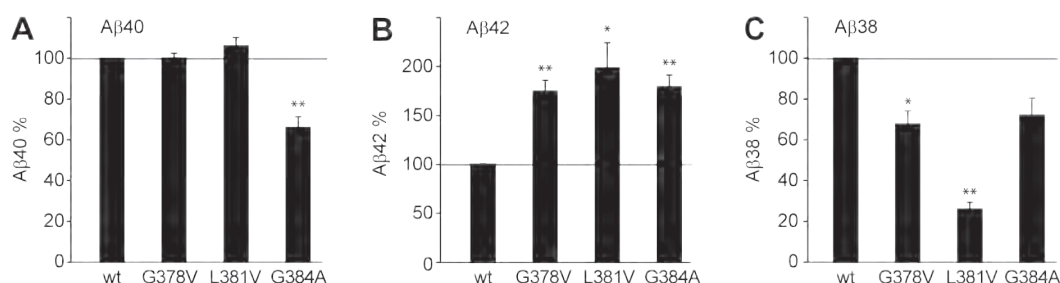


Abb. 2.10: Analyse der A β -Sekretion durch „early onset“-FAD-PS1-Mutanten der TMS7. ELISA-Analyse von A β 40, A β 42 und A β 38 aus Zellkultur-Überständen von SH-SY5Y-Zellen mit stabiler Überexpression von PS1 und SPA4CT-wt. Die bei PS1-wt detektierte Menge der jeweiligen A β -Spezies wurde auf 100% gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen, Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum Referenzwert von 100% an mit * p < 0,01, ** p < 0,0001 (t-Test nach Student). (A) A β 40-Sekretion detektiert mit dem Antikörper G2-10, n = 6-10. (B) A β 42-Sekretion detektiert mit dem Antikörper G2-13, n = 6-8. (C) A β 38-Sekretion detektiert mit dem Antikörper BA1-13, n = 4-9.

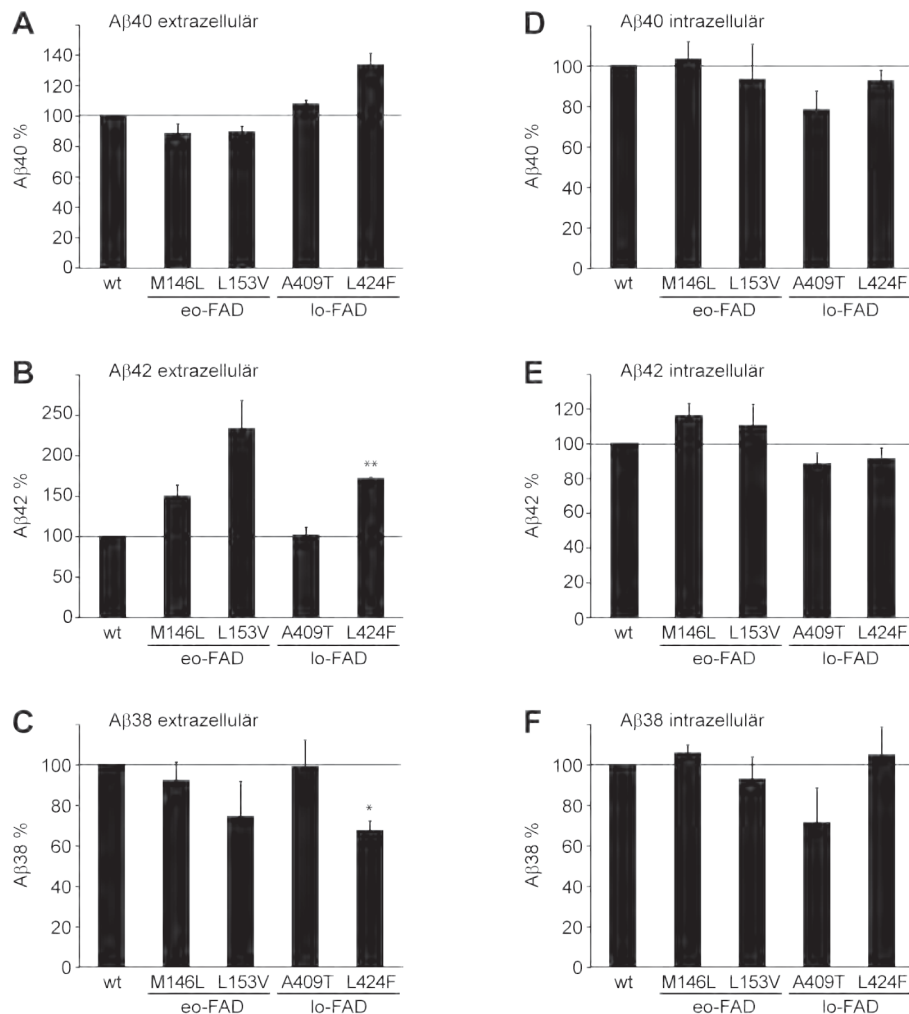


Abb. 2.11: Analyse der Aβ-Produktion durch „early onset“-PS1-Mutanten der TMS2 und „late onset“-PS1-Mutanten der TMS 8. ELISA-Analyse von Aβ40, Aβ42 und Aβ38 aus Zellkultur-Überständen (A-C) oder Lysaten (D-F) von SH-SY5Y-Zellen mit stabiler Überexpression von PS1 und transienter Überexpression von SPA4CT-wt. Die bei PS1-wt detektierte Menge der jeweiligen Aβ-Spezies wurde auf 100% gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen, Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum Referenzwert von 100% an mit * $p < 0,01$, ** $p < 0,0001$ (t-Test nach Student). (A, D) Aβ40-Produktion detektiert mit dem Antikörper G2-10, $n = 3-5$. (B, E) Aβ42-Produktion detektiert mit dem Antikörper G2-13, $n = 3-5$. (C, F) Aβ38-Produktion detektiert mit dem Antikörper BA1-13, $n = 3-7$ (C) / 3-5 (F).

weist auf einen „loss of function“ dieser Mutanten hin, da sie offenbar den späteren Aβ38-Schnitt weniger gut ausführen können. Bei G384A kommt noch eine Verschiebung von der sonst wesentlich häufigeren Aβ40-Produktlinie hin zur Aβ42-Produktlinie hinzu.

Bei den lo-FAD-Mutanten fällt auf, dass sich die beiden untersuchten Mutanten sehr unterschiedlich verhalten: L424F erhöht die Aβ42- und erniedrigt die Aβ38-Sekretion in ähnlichem Maß wie die eo-Mutanten und zeigt eine zusätzliche Tendenz zu verstärkter Sekretion von Aβ40. Dagegen entsprechen bei A409T die Niveaus der extrazellulären Aβ-Spezies denen des Wildtyps (Abb. 2.11.A-C). Dies wirft die Fragen auf, warum L424F erst vergleichsweise spät zum Ausbruch der Krankheit führt, und wie die (nach dem Zeitpunkt des Krankheitsausbruches zu schließen) vergleichbare Toxizität von A409T vermittelt wird. Intrazellulär beeinflussten weder die eo-FAD-Mutanten M146L und L153V noch die lo-FAD-Mutanten A409T und L424F die gemessenen Level an Aβ40, Aβ42 und Aβ38 signifikant im

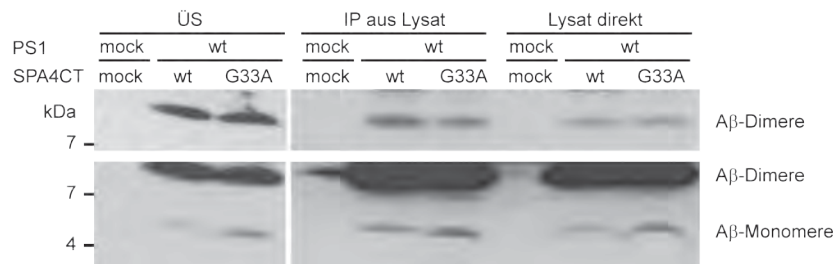


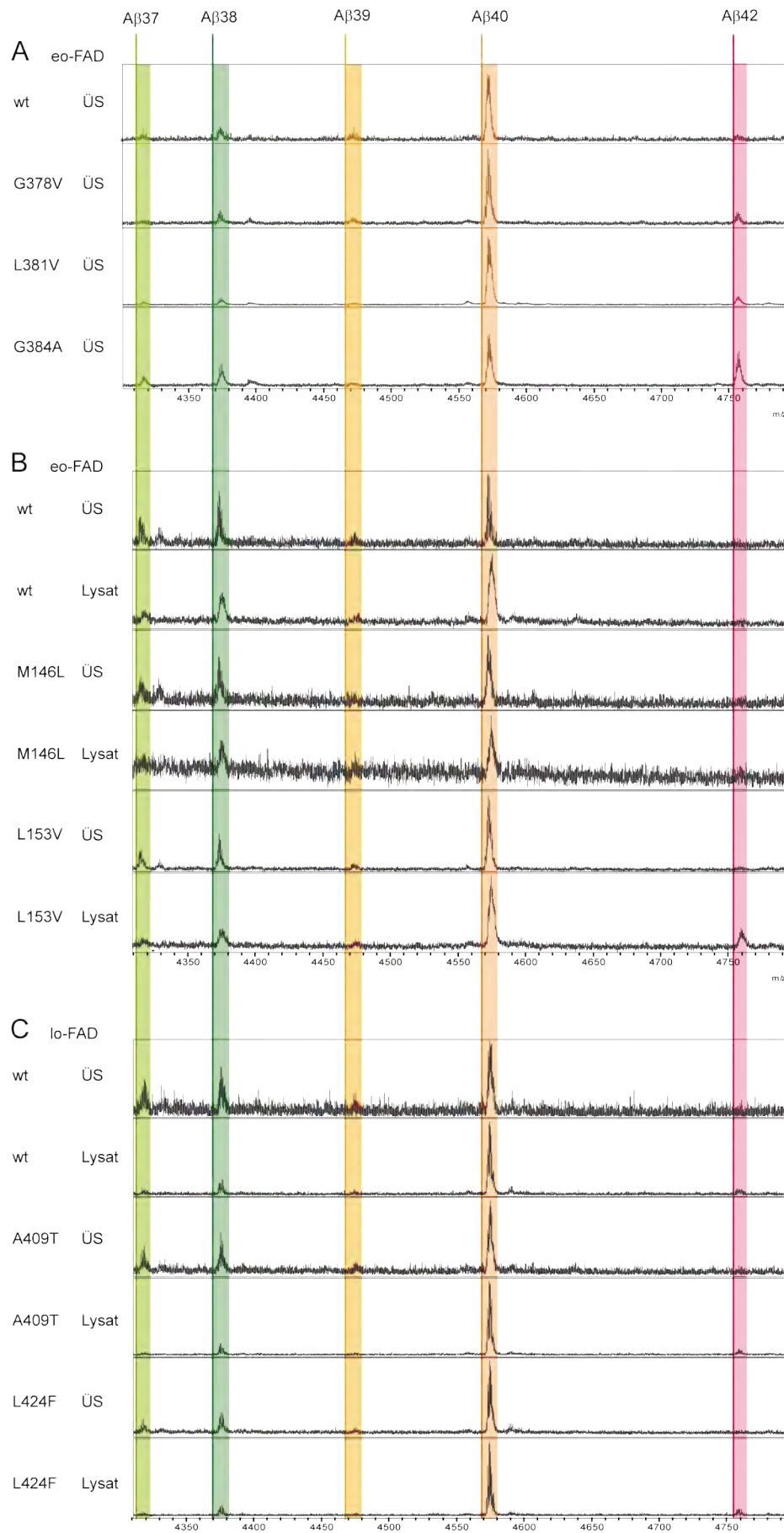
Abb. 2.12: Western Blot-Analyse der extrazellulären und intrazellulären gesamt-A β -Produktion. Zellkultur-Überstände (ÜS) von SH-SY5Y-Zellen mit stabiler PS1- und transientser SPA4CT-Expression wurden gemeinsam mit Lysaten derselben Zellen sowie Immunpräzipitaten der Lysate mit W0-2 über eine reduzierende SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western Blot mit W0-2 immundetektiert. Es wird ein kürzer (oben) und ein länger (unten) exponierter Film desselben Western Blots gezeigt. Die gesamt-A β -Level von SPA4CT-wt und G33A sind jeweils gleich. Sowohl im Überstand als auch im Lysat werden hauptsächlich A β -Dimere detektiert.

Vergleich zu PS1-wt (Abb. 2.11.D-F). A409T zeigte jedoch eine Tendenz zur Erniedrigung der intrazellulären Level aller drei A β -Spezies, wobei dieser Effekt bei A β 42 im Vergleich mit A β 40 und A β 38 deutlich schwächer war. Die resultierende Erhöhung der intrazellulären Verhältnisse A β 42:A β 40 und A β 42:A β 38 könnte eine Erklärung für die Toxizität dieser Mutante bieten.

Bei der Untersuchung der intrazellulären A β -Spezies stellte sich die Frage, ob auch intrazellulär vergleichbare Mengen an gesamt-A β produziert wurden. Beispielhaft für zwei Linien, die PS1-wt stabil und SPA4CT-wt bzw. G33A transient exprimierten, wird gezeigt, dass die gesamt-A β -Menge nicht nur im Überstand, sondern auch im Lysat (extrahiert mittels IP oder direkt mittels SDS-PAGE analysiert) vergleichbar ist (Abb. 2.12). Wie zu erwarten ist das Monomer:Dimer-Verhältnis von A β bei der GxxxG-Mutante G33A in allen Ansätzen leicht erhöht.

Da mit Hilfe der ELISAs nur die Produktion der A β -Spezies mit 40, 42 und 38 Aminosäuren Länge untersucht werden konnte, wurde eine MALDI-MS-Analyse sämtlicher A β -Spezies nach Immunpräzipitation aus dem Zellkulturüberstand bzw. Lysat durchgeführt. So wurde überprüft, ob die im ELISA untersuchten A β -Spezies tatsächlich die durch die PS1-Mutanten am meisten produzierten sind. Dies ist notwendig, da zum Beispiel für die PS1-Mutante M233V bekannt ist, dass sie selektiv die Produktion von A β 39 erhöht (Page et al., 2008). Alle untersuchten PS1-Mutanten zeigen ausschließlich Signale der A β -Spezies A β 37, A β 38, A β 39, A β 40 und A β 42 (Abb. 2.13.A-C). Letzteres ist nur bei besonders guten und rauscharmen Spektren zu sehen, da es aufgrund seiner hohen Hydrophobizität relativ schlecht detektiert werden kann. Keine der PS1-Mutanten zeigt ungewöhnlich starke Signale für A β 37 oder A β 39. Auffällig ist noch, dass das Verhältnis A β 38:A β 40 intrazellulär gegenüber den sekretierten A β -Spezies erniedrigt zu sein scheint (Abb. 2.13.B, C). Genaue Quantifizierungen sind mit MALDI-MS jedoch nicht möglich.

Abb. 2.13: MALDI-MS-Analyse der A β -Produktion durch PS1-FAD-Mutanten. A β wurde mit W0-2 aus konditioniertem Medium (ÜS) oder aus Lysaten von SH-SY5Y-Zellen immunpräzipitiert, die HA-PS1 stabil und SPA4CT-wt stabil (A) oder transient (B, C) exprimierten. (A: repräsentative Spektren (Messung: Dr. Christoph Weise), B,C: n = 1 (eigene Messungen).) Keine der PS1-Mutanten synthetisiert ungewöhnliche A β -Spezies oder erhöhte Mengen an A β 37 oder A β 39. (eo-FAD: frühes Erkrankungsalter, lo-FAD: spätes Erkrankungsalter, m/z: Massenzahl pro Ladung)



2.3.2. Einfluss von GxxxG-Mutanten auf die A β -Produktion durch PS1-FAD-Mutanten

Mutationen der Glycinreste in den drei konsekutiven GxxxG-Motiven der APP-TMS führen zu einer verringerten Dimerisierung des APP-CTFs, wodurch die späteren Schnitte der γ -Sekretase verstärkt stattfinden und kürzere A β -Spezies produziert werden. Die relativ milde Substitution G33A führt primär zu einer Senkung der A β 42- und einer Erhöhung der A β 38-Spiegel. Die stärkere Mutation G29/33A verstärkt diesen Effekt auf die A β 42-Produktlinie und führt zusätzlich zu einer Verringerung der A β 40-Produktion auf Kosten kürzerer A β -Spezies. SPA4CT mit der Mutante G33I schließlich wird kaum noch zu A β 40 und A β 42, sondern primär zu A β 37 und A β 38 abgebaut (Munter et al., 2007). Diese Effekte sind unabhängig davon, ob im Substrat weitere Mutationen vorhanden sind – ebenso wie bei APP-wt führt die G33A-Mutation in Gegenwart von APP-FAD-Mutanten durchgehend zu einer Reduktion von A β 42 um ca. 60% und zu einer Verdreifachung der A β 38-Produktion (Munter et al., 2010).

Hier sollte nun untersucht werden, ob auch die gesteigerte Produktion längerer A β -Spezies durch Presenilin-FAD-Mutanten durch Mutationen in den GxxxG-Motiven verringert werden kann.

2.3.2.1. Einfluss der GxxxG-Mutante G33A auf die A β -Produktion durch PS1-FAD-Mutanten mit frühem Erkrankungsalter

Zunächst wurde untersucht, ob die eo-FAD-Mutanten der TMS7 (G378V, L381V und G384A) den Effekt der relativ milden GxxxG-Mutante G33A beeinträchtigen. Per ELISA wurde die Produktion der verschiedenen A β -Spezies aus dem Zellkultur-Überstand von SH-SY5Y-Zellen quantifiziert, die sowohl PS1 als auch SPA4CT stabil exprimierten (Abb. 2.14).

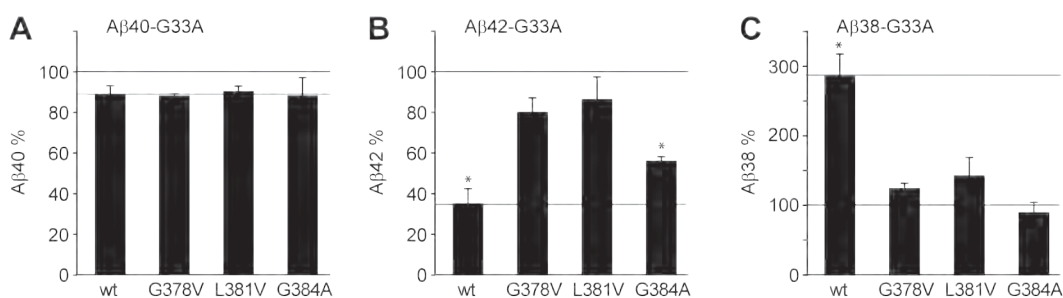


Abb. 2.14: Einfluss der GxxxG-Mutante G33A auf die A β -Sekretion durch „early onset“-FAD-PS1-Mutanten der TMS7. ELISA-Analyse von A β 40, A β 42 und A β 38 aus Zellkultur-Überständen von SH-SY5Y-Zellen mit stabiler Überexpression von PS1 und SPA4CT-G33A. Für jede PS1-Mutante wurde die bei SPA4CT-wt detektierte Menge der jeweiligen A β -Spezies auf 100% gesetzt (schwarze horizontale Linien, Originaldaten s. Abb. 9.1). Horizontale graue Linien zeigen den Einfluss von G33A auf PS1-wt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen, Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum jeweiligen Referenzwert von 100% an mit * $p < 0,01$ (t-Test nach Student). (A) A β 40-Sekretion detektiert mit dem Antikörper G2-10, $n = 3-10$. (B) A β 42-Sekretion detektiert mit dem Antikörper G2-13, $n = 3-8$. (C) A β 38-Sekretion detektiert mit dem Antikörper BA1-13, $n = 4-9$.

Der Einfluss der G33A-Mutation auf die durch PS1-wt produzierten A β -Spezies ist derselbe wie durch Munter et al. publiziert: kein signifikanter Effekt auf A β 40, eine Senkung der A β 42-Produktion um etwa 60% und eine annähernd verdreifachte A β 38-Sekretion. Auch bei den betrachteten PS1-Mutanten zeigt sich kein signifikanter Einfluss auf die Sekretion von A β 40 (Abb. 2.14.A). Die Effekte auf A β 42 und A β 38 werden durch die PS1-Mutanten jedoch deutlich abgeschwächt. G378V und L381V zeigen nur leichte Tendenzen zur Verringerung der A β 42- und Erhöhung der A β 38-Produktion. Bei G384A ist die Erniedrigung des A β 42-Niveaus zwar signifikant, aber gegenüber dem Wildtyp abgeschwächt, und der A β 38-Spiegel ist gar nicht erhöht (Abb. 2.14.B, C). Da G384 dem katalytischen D385 direkt benachbart ist, liegt die Vermutung nah, dass es direkt an der Substratinteraktion beteiligt ist und daher einem anderen Mechanismus folgt als die restlichen betrachteten Mutanten. Die MALDI-MS-Analyse zeigt, dass auch bei der Prozessierung von SPA4CT-G33A keine ungewöhnlichen A β -Spezies entstehen (Abb. 2.15).

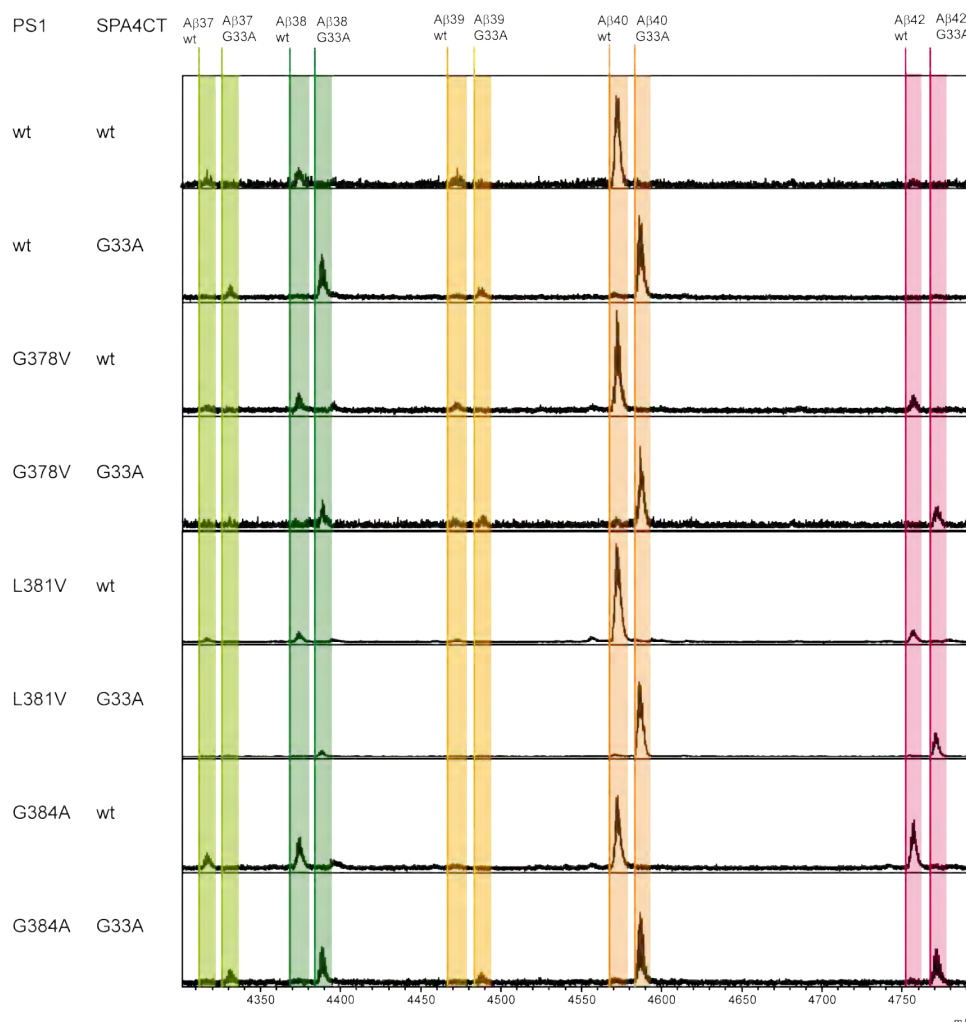


Abb. 2.15: MALDI-MS-Analyse der A β -wt- und A β -G33A-Produktion durch „early onset“-PS1-FAD-Mutanten der TMS7. A β wurde mit W0-2 aus konditioniertem Medium von SH-SY5Y-Zellen immunpräzipitiert, die HA-PS1 und SPA4CT stabil exprimierten. Es wird jeweils ein repräsentatives MALDI-MS-Spektrum gezeigt (Messung: Dr. Christoph Weise). Der Aminosäureaustausch von Glycin zu Alanin führt zur Verschiebung aller A β -G33A-Peaks um 14 kDa gegenüber A β -wt. Auch in Gegenwart von SPA4CT-G33A synthetisiert keine der PS1-Mutanten ungewöhnliche A β -Spezies oder erhöhte Mengen an A β 37 oder A β 39. (m/z: Massenzahl pro Ladung)

Es wird der Schluss gezogen, dass die Toxizität der eo-PS1-FAD-Mutanten nach einem anderen Mechanismus vermittelt wird als bei APP-FAD-Mutanten, da letztere auf GxxxG-Mutationen ebenso reagieren wie APP-wt.

2.3.2.2. Einfluss der GxxxG-Mutante G33A auf die A β -Produktion durch PS1-FAD-Mutanten mit spätem Erkrankungsalter

Da die eo-FAD-Mutanten in der PS1-TMS 7 die Effekte von G33A deutlich abschwächen (Abb. 2.14), stellte sich die Frage, ob dies ein allgemeiner Effekt der Presenilinmutanten ist oder nur bei Mutanten vorkommt, die einen besonders frühen Beginn der Krankheit induzieren. Um dies zu untersuchen, wurden stabil lo-FAD-PS1-Mutanten exprimierende SH-SY5Y-Zellen transient mit SPA4CT-wt oder G33A kotransfiziert und die Menge an produziertem A β 40, A β 42 und A β 38 aus dem Zellkulturüberstand mittels ELISA quantifiziert (Abb. 2.16).

SPA4CT-G33A führt weder bei PS1-wt noch bei den lo-FAD-Mutanten zu einer deutlich veränderten A β 40-Produktion (Abb. 2.16.A). Die A β 42-Sekretion ist in Gegenwart von SPA4CT-G33A bei beiden lo-Mutanten ähnlich wie bei PS1-wt um 50-60% erniedrigt (Abb. 2.16.B). Hier zeigt sich der größte Unterschied zu den eo-PS1-Mutanten, bei denen die A β 42-Produktion durch G33A nur wenig gesenkt werden konnte (Abb. 2.14.B). Die A β 38-Produktion wird durch die G33A-Mutante bei transientser SPA4CT-Expression auch bei PS1-wt nur relativ wenig erhöht. Die Verstärkung der A β 38-Sekretion ist bei L424F mindestens so ausgeprägt wie bei PS1-wt, bei A409T vermutlich abgeschwächt, was aber aufgrund des großen Fehlers nicht genau zu sagen ist (Abb. 2.16.C).

Allgemein kann die Aussage getroffen werden, dass bei schwächeren PS1-FAD-Mutanten, die erst recht spät zum Krankheitsausbruch führen, bereits die leichte Verringerung der APP-TMS-Dimerisierung durch die G33A-Mutante ausreicht, um die A β 42-Sekretion effektiv zu verringern und verstärkt die Prozessierung zu A β 38 zu erlauben.

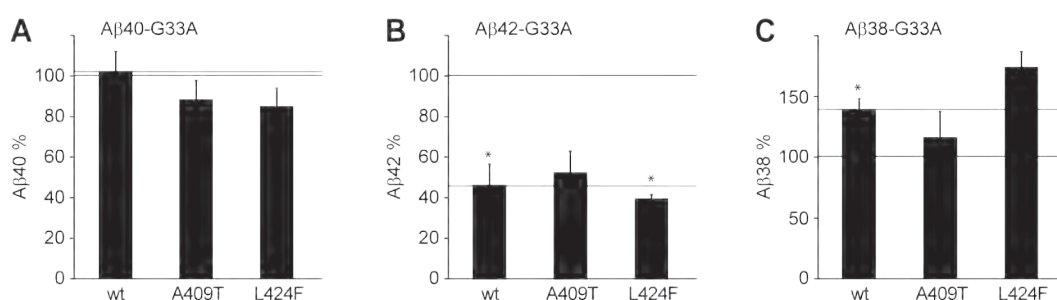


Abb. 2.16: Einfluss der GxxxG-Mutante G33A auf die A β -Produktion durch „late onset“-FAD-PS1-Mutanten der TMS8. ELISA-Analyse von A β 40, A β 42 und A β 38 aus Zellkultur-Überständen von SH-SY5Y-Zellen mit stabiler Überexpression von PS1 und transienter Überexpression von SPA4CT-G33A. Für jede PS1-Mutante wurde die bei SPA4CT-wt detektierte Menge der jeweiligen A β -Spezies auf 100% gesetzt (schwarze horizontale Linien, Originaldaten s. Abb. 9.2). Horizontale graue Linien zeigen den Einfluss von G33A auf PS1-wt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen, Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum jeweiligen Referenzwert von 100% an mit * $p < 0,01$, ** $p < 0,0001$ (t-Test nach Student). (A) A β 40-Sekretion detektiert mit dem Antikörper G2-10, $n = 3-5$. (B) A β 42-Sekretion detektiert mit dem Antikörper G2-13, $n = 3-5$. (C) A β 38-Sekretion detektiert mit dem Antikörper BA1-13, $n = 3-5$ (C).

2.3.2.3. Einfluss der GxxxG-Mutanten G29/33A und G33I auf die A β -Produktion durch PS1-FAD-Mutanten mit frühem Erkrankungsalter

Da der Einfluss von G33A auf die lo-PS1-Mutanten gegenüber PS1-wt nicht beeinträchtigt ist (Abb. 2.16), ist es offensichtlich möglich, auch bei PS1-Mutanten durch Stören der Substratdimerisierung die Synthese kürzerer A β -Spezies effektiv zu unterstützen und die Herstellung der toxischen A β 42-Peptide zu verringern. Daraus ergab sich als nächstes die Fragestellung, ob auch stärkere PS1-FAD-Mutanten, die einen frühen Krankheitsbeginn induzieren, durch hinreichend starke Mutationen im GxxxG-Motiv so beeinflusst werden können, dass ihre A β -Produktion wieder der des PS1-Wildtyps entspricht. Um dies zu untersuchen, wurden stabil PS1-wt oder die eo-PS1-Mutanten M146L oder L153V exprimierende SH-SY5Y-Zellen transient mit SPA4CT-wt, G33A, G29/33A oder G33I kotransfiziert und die Menge an produziertem A β 40, A β 42 und A β 38 aus den Zellkulturüberständen mittels ELISA quantifiziert (Abb. 2.17). Für SH-SY5Y-Zellen, die SPA4CT stabil überexprimieren, ist publiziert, dass die A β 40-Sekretion durch G29/33A um etwa 20% und durch G33I um etwa 70% gesenkt wird. Beide SPA4CT-Mutanten verringern die A β 42-Sekretion um etwa 90% und erhöhen die A β 38-Sekretion in etwa auf das Fünffache (Munter et al., 2007).

Interessanterweise ist der Effekt auf die A β 40-Sekretion durch PS1-wt bei der transienten SPA4CT-Expression ausgeprägter als für die stabile Expression publiziert (G29/33A verringert A β 40 um etwa 45%, G33I um etwa 85%, Abb. 2.17.A). Eine mögliche Erklärung ist, dass die GxxxG-Mutanten aufgrund der geringeren Substratmenge im transienten System einen stärkeren Einfluss auf die A β 40-Produktion ausüben. Die Effekte der beiden stärkeren GxxxG-Mutanten auf die A β 42-Sekretion durch PS1-wt sind vergleichbar mit denen bei stabiler Expression (Reduktion um ca. 90-95%, Abb. 2.17.B). Der Einfluss aller GxxxG-Mutanten auf die extrazellulären A β 38-Level ist jedoch bei transienter SPA4CT-Expression deutlich abgeschwächt. Es ist allerdings zu erkennen, dass G33A die A β 38-Sekretion durch PS1-wt tendenziell erhöht, und dass dieser Effekt bei G29/33A oder G33I (etwa im gleichen Maß) noch leicht verstärkt wird (Abb. 2.17.C).

Betrachtet man nun den Einfluss der GxxxG-Mutante G33A auf die A β -Sekretion der eo-FAD-Mutanten M146L und L153V der TMS 2, so zeigt sich der gleiche Effekt wie bei den vorher betrachteten eo-FAD-Mutanten G378V und L381V der TMS 7 (Abb. 2.14.B): die Senkung des A β 42-Niveaus fällt deutlich schwächer aus als bei PS1-wt (Abb. 2.17.B). Die leichte Erniedrigung der durch PS1-wt sekretierten A β 40-Menge durch G33A erscheint bei diesen eo-FAD-Mutanten ebenfalls etwas abgeschwächt (Abb. 2.17.A).

Überraschend ist, dass bei M146L und L153V, anders als bei den bisher untersuchten PS1-Mutanten (vgl. Abb. 2.14.C, 2.16.C), die A β 38-G33A-Sekretion nicht nur nicht erhöht, sondern sogar (im Fall von M146L signifikant) erniedrigt ist (Abb. 2.17.C). Dies wirft die Frage auf, ob die G33A-Mutante bei den in der TMS 2 gelegenen eo-PS1-Mutanten nach einem anderen Mechanismus wirkt als bei denen in der TMS 7. Eventuell führt G33A bei den TMS 2-Mutanten insgesamt zu einer stärkeren Verschiebung weg von der A β 42-Produktlinie,

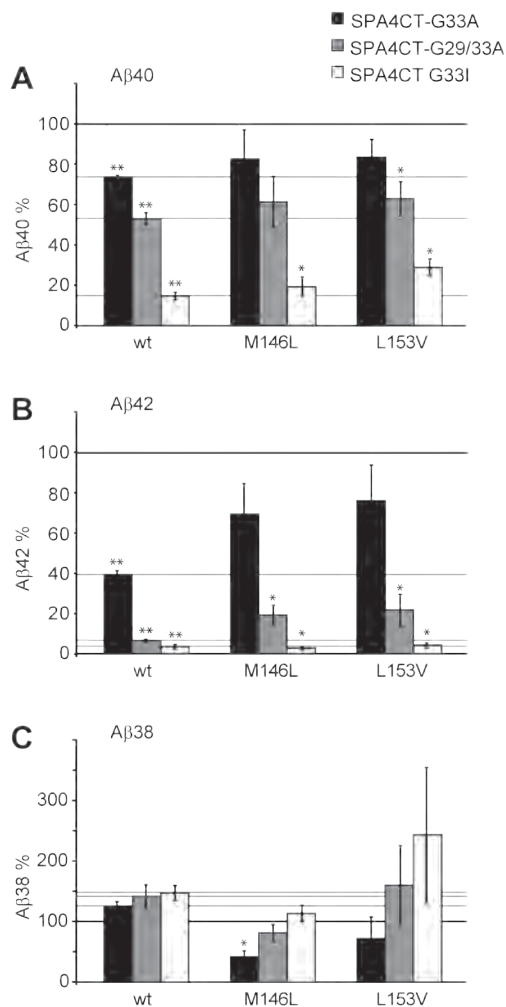


Abb. 2.17: Einfluss der GxxxG-Mutanten G33A, G29/33A und G33I auf die Aβ-Produktion durch „early onset“-FAD-PS1-Mutanten der TMS2. ELISA-Analyse von Aβ40, Aβ42 und Aβ38 aus Zellkultur-Überständen von SH-SY5Y-Zellen mit stabiler Überexpression von PS1 und transienter Überexpression von SPA4CT-G33A (schwarze Balken), G29/33A (graue Balken) oder G33I (weiße Balken). Für jede PS1-Mutante wurde die bei SPA4CT-wt detektierte Menge der jeweiligen Aβ-Spezies auf 100% gesetzt (schwarze horizontale Linien, Originaldaten s. Abb. 9.3). Horizontale graue Linien zeigen den Einfluss von G33A, G29/33A und G33I auf PS1-wt. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen, Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum jeweiligen Referenzwert von 100% an mit * $p < 0,01$, ** $p < 0,0001$ (t-Test nach Student). (A) Aβ40-Sekretion detektiert mit dem Antikörper G2-10, $n = 3-6$. (B) Aβ42-Sekretion detektiert mit dem Antikörper G2-13, $n = 3-6$. (C) Aβ38-Sekretion detektiert mit dem Antikörper BA1-13, $n = 3-7$.

oder es werden statt Aβ38-G33A verstärkt andere Aβ-Spezies (z.B. mehr Aβ39-G33A) produziert (dies wäre durch MALDI-MS-Analyse zu überprüfen). Übereinstimmend mit den Daten der PS1-TMS 7-Mutanten kann die Aussage getroffen werden, dass die eo-FAD-Mutanten den Effekt der G33A-Mutante abschwächen.

Bei den stärkeren GxxxG-Mutanten G29/33A und G33I zeigt sich jedoch, dass diese Mutanten auch die Aβ-Sekretion der eo-PS1-Mutanten effektiv regulieren können. Besonders deutlich wird das beim Blick auf die Aβ42-Sekretion (Abb. 2.17.B): der Effekt von G29/33A ist bei den PS1-Mutanten noch leicht abgeschwächt (die Aβ42-Produktion wird hier nur um ca. 80% erniedrigt, bei PS1-wt dagegen um ca. 90%). Die G33I-Mutante ist jedoch in der Lage, die Aβ42-Sekretion durch alle Presenilinmutanten um ca. 95% zu vermindern. Bei der Aβ40-Sekretion ergibt sich ein ähnliches Bild (Abb. 2.17.A): bei den eo-FAD-Mutanten sind die Aβ40-Spiegel durch G29/33A und G33I in ähnlichem Maß gesenkt wie bei PS1-wt. Bei Aβ38 fällt ein direkter Vergleich der Mutanten mit PS1-wt aufgrund der überraschenden Senkung des Aβ38-Niveaus durch G33A schwer (Abb. 2.17.C), es ist aber deutlich zu sehen, dass die stärkeren GxxxG-Mutanten die Aβ38-Sekretion gegenüber G33A wieder erhöhen. Bei L153V ist die Verstärkung der Aβ38-Produktion durch SPA4CT-G29/33A oder G33I gegenüber SPA4CT-wt mit der bei PS1-wt vergleichbar.

2.3.3. Zusammenfassung: Effekte von PS1-FAD-Mutanten und SPA4CT-GxxxG-Mutanten auf die A β -Sekretion

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der ELISA-Messungen hier noch einmal tabellarisch zusammengefasst (Tab. 2.2).

Bei Koexpression von SPA4CT-wt erhöhten alle PS1-Mutanten bis auf die lo-FAD-Mutante A409T die extrazellulären Verhältnisse von A β 42:A β 40 und A β 42:A β 38. Die eo-Mutante G384A zeigte als Einzige einen deutlichen Einfluss auf die Sekretion von A β 40. Die Unterschiede zwischen den PS1-Mutanten zeigen, dass es verschiedene Mechanismen geben muss, nach denen die Toxizität vermittelt wird.

Die Reaktion von PS1-Mutanten auf eine Störung der Substratdimerisierung durch GxxxG-Mutanten ist jeweils im Vergleich zu den A β -Mengen bei Koexpression von SPA4CT-wt mit der jeweiligen PS1-Mutante angegeben (Tab. 2.2). Hier ist ein deutlicher Unterschied zwischen eo-FAD- und lo-FAD-Mutanten zu erkennen: Während die A β -Sekretion durch lo-FAD-PS1-Mutanten schon durch G33A deutlich verändert wird, sind hierzu bei eo-FAD-PS1-Mutanten stärkere GxxxG-Mutanten nötig. Es besteht also ein Zusammenhang zwischen der Toxizität der PS1-Mutanten, die sich im Erkrankungsalter widerspiegelt, und ihrer Fähigkeit, auf Veränderungen des Substrats zu reagieren.

SPA4CT-		wt	G33A	G29/33A	G33I
PS1-	a.o.o.				
wt			40(↓) 42 ↓ 38 ↑	40 ↓ 42 ↓↓ 38 ↑	40 ↓↓ 42 ↓↓↓ 38 ↑
M146L	40 J.	40 = 42(↑) 38 =	40(↓) 42(↓) 38 ↓	40 ↓ 42 ↓ 38 =	40 ↓↓ 42 ↓↓↓ 38(↑)
L153V	35 J.	40 = 42 ↑ 38(↓)	40(↓) 42(↓) 38(↓)	40 ↓ 42 ↓ 38 ↑	40 ↓↓ 42 ↓↓↓ 38 ↑
G378V	45 J.	40 = 42 ↑ 38 ↓	40(↓) 42(↓) 38 =		
L381V	31 J.	40 = 42 ↑ 38 ↓	40(↓) 42(↓) 38 =		
G384A	35 J.	40 ↓ 42 ↑ 38(↓)	40(↓) 42 ↓ 38 =		
A409T	58 J.	40 = 42 = 38 =	40(↓) 42 ↓ 38(↑)		
L424F	58 J.	40(↑) 42 ↑ 38 ↓	40(↓) 42 ↓ 38 ↑		

Tab. 2.2: Zusammenfassung der ELISA-Daten. Extrazelluläre A β 40-, A β 42- und A β 38-Produktion in Abhängigkeit von den verwendeten PS1-FAD- oder SPA4CT-GxxxG-Mutanten. Die Effekte bei Koexpression von PS1-Mutanten und SPA4CT-wt sind im Vergleich mit PS1-wt dargestellt. Bei der Darstellung der Effekte der SPA4CT-GxxxG-Mutanten wurden jeweils die Messwerte bei Expression von SPA4CT-wt und der jeweiligen PS1-Mutante als Vergleichswerte verwendet. „early-onset“-FAD-PS1-Mutanten und starke Veränderungen der A β -Produktion gegenüber PS1-wt sind rot unterlegt, „late-onset“-FAD-PS1-Mutanten und geringere Veränderungen der A β -Produktion gegenüber PS1-wt orange. (a.o.o.: durchschnittliches Erkrankungsalter („age of onset“) in Jahren (J.)).

3. Diskussion

3.1. Eignung von C100 in SDS-Micellen für *in vitro*-Tests

Rekombinantes C100 ist ein häufig verwendetes Substrat für *in vitro* γ -Sekretase-Tests. In dieser Arbeit wurden erstmals die Konformation und der Oligomerisierungszustand nach Rekonstitution in SDS-Micellen bestimmt, um seine Eignung als γ -Sekretase-Substrat sicherzustellen.

Cysteinverbrückte A β -Dimere nehmen spontan β -Faltblatt-Struktur an und bilden Fibrillen aus (Schmechel et al., 2003). Auch C100 kann dies unter denaturierenden Bedingungen tun (Tjernberg et al., 1997). Mit der Behauptung, das verwendete C100 sei aggregiert gewesen, wurde eine wichtige Studie zur GSM-Interaktion mit der APP-TMS in Frage gestellt (Kukar et al., 2008; Beel et al., 2009). Es ist zu erwarten, dass γ -Sekretase-Studien mit aggregiertem Substrat verfälschte Ergebnisse liefern würden. Daher ist es ausgesprochen wichtig, die Konformation des zu verwendenden C100 zu überprüfen.

In dieser Arbeit konnte eine α -helikale Konformation des C100 in SDS-Micellen nachgewiesen werden, die auch erhalten blieb, wenn mittels eines Kreuzvernetzers die Ausbildung höherer Oligomere induziert wurde. Auch höhere Oligomere liegen demnach unter unseren Versuchsbedingungen nicht als Aggregate vor. Das bedeutet, dass anders als bei A β keine spontane Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen mit der Oligomerisierung von C100 einher geht.

Bewahrt man C100 in Gegenwart von SDS mehrere Monate lang auf, geht ein geringer Teil des Proteins durch Präzipitation verloren. Der lösliche C100-Anteil behält aber die α -helikale Konformation bei. SDS ist demnach zur Stabilisierung hoch konzentrierter C100-Lösungen während ihrer Aufreinigung und Lagerung sehr gut geeignet. Für *in vitro* γ -Sekretase-Tests kann das C100 dann in einem Puffer mit einem Detergenz wie CHAPSO (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-2-hydroxy-1-Propansulfonat) verdünnt werden, in dem die γ -Sekretase aktiv ist.

Insgesamt ist C100, das nach der hier etablierten Methode aus *E. coli* aufgereinigt wird, aufgrund seiner Stabilität, der α -helikalen Konformation und des niedrigen Oligomerisierungsgrades sehr gut geeignet als Substrat für *in vitro* γ -Sekretase-Studien sowie für andere biochemische Untersuchungen wie z.B. Oberflächenplasmonresonanz. Es wurden bereits erfolgreich *in vitro* γ -Sekretase-Tests mit diesem C100 durchgeführt (persönliche Mitteilung V. Althoff und G. Multhaup)

Bei der Spin-Markierung der C100-Cysteinmutanten fiel auf, dass die Markierungseffizienz bei der Mutante F19C deutlich höher war als bei L17C. Dies lässt sich mit der Dimerisierung des C100 über die GxxxG-Motive erklären: L17, das zwei Helixwindungen vom ersten Glycin (G25) der GxxxG-Motive entfernt liegt, ragt bei Annahme einer über die TMS fortgesetzten α -Helix in die Dimerisierungsoberfläche hinein. F19 dagegen wäre in diesem Modell auf der Außenseite des Dimers lokalisiert. Daher ist anzunehmen, dass nach der MTS-Markierung C100-L17C sehr schnell neue Disulfidbrücken ausbildet, solange das Reduktionsmittel TCEP noch nicht komplett entfernt ist.

Die höhere Markierungseffizienz bei C100-F19C kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass der α -helikale Anteil des C100 mindestens bis zum L17 reicht, und dass die Dimerisierung auch in SDS-Micellen über die GxxxG-Motive vermittelt wird.

Die C100-Charakterisierung erlaubt auch Rückschlüsse auf das *in vivo*-Substrat APP-CTF. Dieses kann z.B. als SPA4CT (C99 mit APP-Signalpeptid (Dyrks et al., 1992)) in eukaryotischen Zellen oder in transgenen Tieren überexprimiert werden, akkumuliert dort und wird zu A β umgesetzt (Lichtenthaler et al., 1999; Rutten et al., 2003). Die hohe Stabilität und α -helikale Struktur des C100 implizieren eine ähnliche strukturelle Stabilität des SPA4CT. Dies könnte erklären, warum dieses Fragment auch bei Überexpression nicht aggregiert (Dyrks et al., 1992). Damit wird SPA4CT als valides Proteinfragment für die Untersuchung der Prozessierung durch die γ -Sekretase in den hier vorgestellten Zellkulturexperimenten bestätigt.

3.2. Interaktion von C100 und Sulindacsulfid

Die GxxxG-Dimerisierungsmotive der C100-TMS sind auch als Bindungsstellen von γ -Sekretase-Modulatoren (GSM) wie Tarenflurbil, Sulindacsulfid und einigen seiner Derivate und der (inversen) iGSM Celecoxib, Fenofibrat, und FT-1 identifiziert worden (Kukar et al., 2008; Richter et al., 2010). Mit Hilfe eines *in silico*-Modells wurde die These aufgestellt, dass nicht die exakte Aminosäuresequenz für die GSM-Bindung entscheidend ist, sondern die durch die GxxxG-Motive gebildete flache Oberfläche der C100-TMS (Richter et al., 2010). Nachdem die Spezifität der Interaktion zunächst in Frage gestellt worden war (Beel et al., 2009), konnte sie für die Bindung von Sulindacsulfid an A β 42 mittels NMR und SPR nachgewiesen werden (Richter et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde nun auch die spezifische, konzentrationsabhängige Sulindacsulfid-Bindung an das Volllängen- γ -Sekretase-Substrat C100 mittels SPR nachgewiesen.

Die hier gezeigten Daten stützen die These, dass Sulindacsulfid (und wahrscheinlich auch die anderen APP-TMS-bindenden GSM) an die durch die GxxxG-Motive gebildete flache Oberfläche der TMS binden. Die C100-Mutante G33I, die das zentrale G₂₉xxxG₃₃-Motiv zerstört und die Dimerisierung der APP-TMS stark beeinträchtigt, vermindert die Sulindacsulfidbindung im SPR-Experiment, hebt sie aber nicht auf. Dies ist zu erklären, wenn man unterschiedliche mögliche Bindungsstellen an der flachen TMS-Oberfläche annimmt, wie sie mittels des hier gezeigten *in silico*-Modells postuliert werden können. Dieses zeigt eine Bindung des um 180° gedrehten und lateral verschobenen Sulindacsulfids an die Helixoberfläche von C100-G33I. Dabei können die gleichen Wasserstoffbrücken ausgebildet werden wie mit der Oberfläche von C100-wt. Die Bindung wird noch durch die van der Waals-Wechselwirkungen verstärkt, die die aromatischen Ringe des Sulindacsulfids mit dem G33I ausbilden können. Dass die Bindung von Sulindacsulfid an C100-G33I trotzdem verringert ist, erklärt sich daraus, dass die Vibrations- und Translations-Freiheitsgrade des I33 bei dieser Interaktion stark eingeschränkt werden.

Auch wenn verschiedene Bindungsstellen an der flachen GxxxG-Oberfläche möglich sind, liegt die für Sulindacsulfid günstigste nach dem *in silico*-Modell von Richter et al. zwischen G25 und G37 direkt über G33. Im Gegensatz zu der einzelnen G33I-Mutante führt der Austausch der gesamten $G_{29}xxxG_{33}$ -Sequenz gegen die entsprechenden Aminosäuren aus der Notch-TMS wahrscheinlich dazu, dass ihre Interaktion mit der APP-TMS komplett aufgehoben wird, da in diesem Fall die γ -Sekretase-modulierenden Effekte des GSM X-34 und des iGSM FT-1 wegfallen (Kukar et al., 2008). Auch dieser Befund stützt unsere These, dass ein hinreichender Teil der flachen Helixoberfläche vorhanden sein muss, um die GSM-Bindung zu ermöglichen (Richter et al., 2010; Botev et al., 2011).

3.3. Einfluss der C100-Dimerisierung auf die Sulindacsulfid-Bindung

GSM, die an die APP-TMS binden, scheinen ihre γ -Sekretase-modulierende Wirkung über die Erhöhung des Monomer:Dimer-Verhältnisses des APP-CTF zu vermitteln (Richter et al., 2010). Um zu untersuchen, über welchen Mechanismus das Monomer:Dimer-Verhältnis erhöht wird, wurde die Interaktion von Sulindacsulfid mit C100-wt oder den Mutanten L17C und G33I mittels SPR verglichen. C100-L17C bildet verstärkt disulfidverbrückte Dimere aus, wohingegen C100-G33I in Abwesenheit von SDS ein höheres Monomer:Dimer-Verhältnis aufweist als der Wildtyp (Munter et al., 2007). Es zeigte sich, dass Sulindacsulfid besser an C100-Dimere bindet, jedoch auch mit der monomerisierten Mutante noch eingeschränkt interagieren kann.

Hieraus kann man ein Modell ableiten, nach dem die APP-TMS-bindenden GSM das $A\beta_{42}:A\beta_{38}$ -Verhältnis senken würden, indem sie in Zellmembranen an APP-CTF-Dimere binden und diese monomerisieren. Außerdem würden sie (eventuell in geringerem Maße) an APP-CTF-Monomere binden und deren Dimerisierung verhindern, da sie die Dimerisierungsoberfläche abschirmen (Abb. 3.1). Aufgrund des erhöhten Monomer:Dimer-Verhältnisses kann dann die konsekutive γ -Sekretase-Prozessierung weiter fortschreiten, so dass mehr $A\beta_{38}$ und weniger $A\beta_{42}$ gebildet werden.

Interessanterweise schienen Assoziations- und Dissoziationsraten von Sulindacsulfid bei C100-L17C gegenüber C100-wt erniedrigt. Dies könnte dadurch hervorgerufen werden, dass die beiden Sulindacsulfid-Bindungsflä-

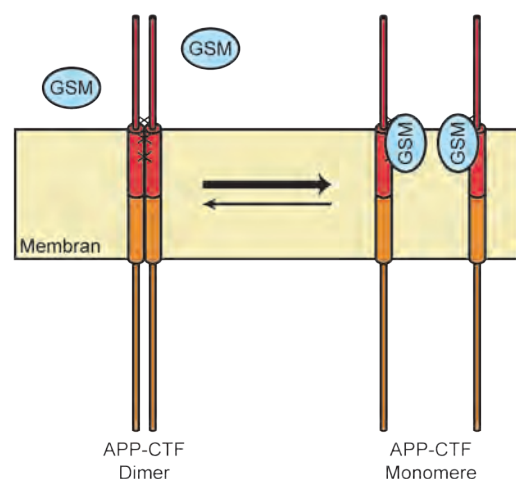


Abb. 3.1: Modell der Interaktion des APP-CTFs mit GSM. Die GSM sind als blaue Ovale dargestellt, die AICD-Sequenz ist orange und die $A\beta$ -Sequenz rot markiert. Die Dimerisierungsoberfläche der drei GxxxG-Motive ist mit Kreuzen gekennzeichnet. GSM können das Monomer:Dimer-Verhältnis des APP-CTFs erhöhen, indem sie die Dimerisierungsoberfläche abschirmen.

chen des C100-L17C-Dimers einander zugewandt sind. Dadurch kann die Assoziation erschwert sein, da der GSM zwischen die C100-Moleküle insertieren muss. Die Dissoziationsrate könnte dadurch erniedrigt werden, dass sich eine zweite Bindungsfläche in direkter Nähe jedes dissoziierenden Sulindacsulfidmoleküls befindet, was eine Reassoziierung begünstigt.

Weitere Untersuchungen zur Bindung von GSM an C100-Dimere sollten mit Proben durchgeführt werden, aus denen die Cystein-enthaltenden Monomere über eine Thiopropylsapharose-Säule entfernt wurden (Brandt et al., 1977). Solche Proben würden noch klarere Aussagen über die Effekte der C100-Dimerisierung ermöglichen.

3.4. Pathogene Mechanismen der PS1-FAD-Mutanten

Es sind viele Versuche unternommen worden, einen gemeinsamen Mechanismus zu finden, nach dem die Presenilin-FAD-Mutanten ihre pathogene Wirkung entfalten. Anders als lange angenommen erhöhen nicht alle FAD-Mutanten die A β 42-Sekretion oder das A β 42:A β 40-Verhältnis, auch wenn dies sehr häufig vorkommt (Bentahir et al., 2006; Shioi et al., 2007). Andere vorgeschlagene allgemein gültige Wirkungsmechanismen der PS-FAD-Mutanten wie die Beeinträchtigung des neuronalen Kalziumhaushalts und der Makroautophagie sind γ -Sekretase-unabhängig (Tu et al., 2006; Lee et al., 2010).

In dieser Arbeit werden die PS1-FAD-Mutanten L153V, G378V, A409T und L424F zum ersten Mal hinsichtlich ihrer A β -Sekretion charakterisiert, für die Mutante L381V wird erstmals die A β -wt-Sekretion betrachtet (eine frühere Studie wurde mit der „schwedischen“ APP-FAD-Mutante APP-sw durchgeführt) (Ikeuchi et al., 2008). Die Mutanten L153V, A409T und L424F werden zum ersten Mal auf die intrazelluläre A β -Produktion hin untersucht. Die bereits in anderen Studien untersuchten PS1-Mutanten M146L und G384A dienen als Kontrollen.

Im Wesentlichen stimmen die Daten dieser Arbeit für PS1-M146L und G384A mit den veröffentlichten Werten überein. M146L hat keinen Einfluss auf die extrazelluläre A β 40- und A β 38- oder die intrazelluläre A β 40-Produktion, erhöht jedoch die extra- und intrazellulären A β 42-Mengen (Qi et al., 2003; Shioi et al., 2007). G384A erhöht die A β 42- und erniedrigt die A β 40-Sekretion. Für A β 38 existieren keine absoluten Vergleichswerte (Kumar-Singh et al., 2006; Shioi et al., 2007; Page et al., 2008). Es ist anzunehmen, dass die prozentualen Abweichungen von den veröffentlichten Daten daraus resultieren, dass dort andere Zellsysteme (HEK293- („human embryonic kidney“) oder CHO-Zellen („chinese hamster ovary“)) verwendet wurden, zum Teil auch APP751 oder APP695-sw statt wie in dieser Arbeit das von APP695-wt abgeleitete SPA4CT in SH-SY5Y-Zellen.

In Bezug auf die intrazellulären A β -Messungen gilt, dass diese Ergebnisse mit anderen Methoden überprüft werden sollten, da die vergleichsweise hohen Proteinkonzentrationen der Zelllysate möglicherweise die Ergebnisse der ELISA Messungen beeinträchtigen könnten.

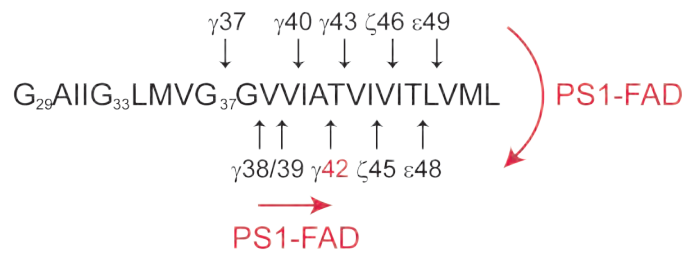


Abb. 3.2: Einfluss von PS-FAD-Mutanten auf die sequentielle Proteolyse von Aβ. APP-TMS mit eingezeichneten Schnittstellen der Aβ40- (oben) und Aβ42-Produktlinie (unten). Die Glycine der GxxxG-Motive sind nach der Aβ-Nummerierung beschriftet. Die meisten PS-FAD-Mutanten inhibieren die späteren γ-Schnitte, vor allem den Prozessierungsschritt von Aβ42 zu Aβ38. Einige können jedoch auch den ε-Schnitt so beeinflussen, dass der Abbau verstärkt über die Aβ42-Produktlinie abläuft.

Zur Interpretation der Auswirkungen der PS1-Mutanten auf die Aβ-Produktion wird die Theorie der sequenziellen γ-Sekretase-Prozessierung in zwei Produktlinien zu Grunde gelegt. Diese besagt, dass Aβ49 durch konsekutive Schnitte zu Aβ46, Aβ43, Aβ40 und Aβ37 umgesetzt wird, Aβ48 dagegen zu Aβ45, Aβ42 und zuletzt zu Aβ38 (oder seltener Aβ39) (Abb. 3.2). Nimmt man an, dass kein Wechsel zwischen den Produktlinien stattfindet, gibt es zwei Möglichkeiten, wie PS1-FAD-Mutanten die Aβ42-Produktion erhöhen können (Abb. 3.2):

- i. Es kann der ε-Schnitt beeinflusst sein, so dass das APP-CTF häufiger entlang der Aβ42-Produktlinie und seltener über die Aβ40-Produktlinie abgebaut wird, oder
- ii. die γ-Schnitte sind beeinträchtigt, so dass die Prozessierung von Aβ42 zu Aβ38 seltener stattfinden kann.

Von den hier untersuchten PS1-FAD-Mutanten mit frühem Erkrankungsalter („early onset“, eo-FAD) scheinen alle ihre Wirkung mindestens zum Teil auf die γ-Schnitte auszuüben. Sie erhöhen die Aβ42- und erniedrigen (bis auf M146L) die Aβ38-Sekretion. Bei G384A ist zusätzlich der Aβ40-Spiegel deutlich gesenkt, was auf eine Verschiebung von der Aβ40- zur Aβ42-Produktlinie hindeutet. G384A scheint also sowohl den ε-Schnitt als auch die γ-Schnitte beeinflussen zu können, G378V, L381V, M146L und L153V hingegen nur die γ-Schnitte. Ein Einfluss auf den ε-Schnitt kommt noch bei einigen anderen PS-FAD-Mutanten vor, für die eine Senkung des Aβ40-Spiegels in Kombination mit erhöhter (M139V, I143T), unveränderter (A79V, A231V, C263F) oder leicht gesenkter (C263R) Aβ42-Sekretion beschrieben ist (Kumar-Singh et al., 2006; Shioi et al., 2007).

Interessanterweise zeigen die „late onset“ (lo-)FAD-Mutanten A409T und L424F, die beide mit ungefähr 58 Jahren zum Ausbruch der Alzheimer-Krankheit führen, ein völlig unterschiedliches Verhalten bezüglich ihrer Aβ-Produktion. Während L424F ebenso wie die eo-FAD-Mutanten den γ-Sekretase-Schnitt beeinträchtigt, bei dem Aβ42 zu Aβ38 prozessiert wird, zeigt A409T keinen Einfluss auf die Aβ-Sekretion. Dies unterstützt die These, dass die pathogene Wirkung der verschiedenen PS1-FAD-Mutanten über unterschiedliche Mechanismen vermittelt wird. Im Fall von A409T könnte dies z. B. über die leichte Verschiebung der intrazellulären Aβ-Produktion geschehen. Es muss jedoch noch angemerkt werden, dass das genaue Erkrankungsalter bei den betrachteten lo-Mutanten nicht gesichert ist. Wie die meisten lo-FAD-PS1-Mutanten (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>, Stand 05/2011)

sind A409T und L424F nur aus einer einzigen Familie bekannt, nur ein (A409T) bzw. zwei (L424F) erkrankte Patienten wurden bisher untersucht (Aldudo et al., 1999; Mehrabian et al., 2006). Es ist daher möglich, dass weitere genetische oder Umweltfaktoren das Erkrankungsalter verfälschen. Der *ApoE*-Genotyp kann zum Beispiel den Erkrankungszeitpunkt bei (APP-) FAD-Mutanten stark verschieben (St George-Hyslop et al., 1994).

Die meisten der sonstigen bisher untersuchten lo-PS1-FAD-Mutanten (A79V, L250S, L262F, L262R und C263F) verringern die A β 40-Sekretion, ohne einen Einfluss auf die A β 42-Level auszuüben (Kumar-Singh et al., 2006; Shioi et al., 2007). Hier scheint also der ϵ -Schnitt beeinflusst zu sein. Für die lo-PS1-FAD-Mutante C92S ist publiziert, dass sie die A β 42-Sekretion erhöht ohne die A β 40-Produktion zu beeinflussen (Assini et al., 2003). Hier könnten wiederum die γ -Schnitte beeinträchtigt sein. Ebenso wie in dieser Arbeit gezeigt sind die publizierten Effekte der lo-PS1-Mutanten auf die A β 42- und die A β 40-Produktion zum Teil vergleichbar mit denen der eo-PS1-Mutanten (Kumar-Singh et al., 2006; Shioi et al., 2007). Dies weist auf weitere pathogene Effekte bestimmter Mutanten jenseits der Erhöhung des A β 42:A β 40-Verhältnisses hin. Offensichtlich kann auch für die lo-PS1-Mutanten kein einheitlicher Mechanismus angenommen werden. Es können wie bei den eo-Mutanten der ϵ -Schnitt und/ oder die γ -Schnitte beeinflusst sein.

Ein weiterer Faktor der Toxizität von FAD-Mutanten könnte die Produktion des ebenfalls neurotoxischen intrazellulären A β sein (Walsh et al., 2000). Eine Reihe von PS-FAD-Mutanten erhöht neben dem extrazellulären auch das intrazelluläre A β 42:A β 40-Verhältnis, was zu ihrer Toxizität beitragen könnte (Qi et al., 2003; Fang et al., 2006). Für die meisten PS1-FAD-Mutanten ist die intrazelluläre A β -Produktion noch nicht charakterisiert worden.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten PS1-FAD-Mutanten scheinen die extrazelluläre und die intrazelluläre A β -Produktion nicht parallel reguliert zu werden. Viele Einflüsse (zum Beispiel erhöhte A β 42-Level), die extrazellulär sehr deutlich hervortraten, waren intrazellulär nicht erkennbar. Bei der lo-FAD-Mutante A409T waren dagegen nur intrazellulär auch nur tendenzielle Effekte auf die A β -Produktion zu sehen.

Bislang sind in der Literatur nur PS1-FAD-Mutanten beschrieben, die die extra- und intrazellulären A β 42:A β 40-Verhältnisse parallel erhöhen (Qi et al., 2003). Eine Entkopplung der extra- und intrazellulären Effekte auf die A β -Produktion ist dagegen für FAD-Mutanten des APP und für durch Caspase-Prozessierung konformationell verändertes Presenilin gezeigt worden (Grimm et al., 2003; Hedskog et al., 2010). Es liegt nahe, wiederum unterschiedliche Mechanismen verschiedener PS1-FAD-Mutanten zu vermuten. Einige von ihnen könnten die extra- und intrazellulären A β -Level parallel regulieren, andere die beiden Effekte entkoppeln.

Für die unterschiedlichen Effekte der untersuchten PS1-FAD-Mutanten auf extra- und intrazelluläres A β gibt es eine Reihe möglicher Erklärungen. So könnte es sein, dass die γ -Sekretase, die das intrazelluläre A β produziert, anders lokalisiert ist als bei der Produktion von extrazellulärem A β . Es ist noch nicht abschließend geklärt, wo die A β -Produktion abläuft. Der β -Schnitt findet hauptsächlich in den frühen Endosomen statt, die γ -Sekretase ist in den Endosomen und der Plasmamembran aktiv (Small und Gandy 2006; Kaether et al., 2006; Frykman et al.,

2010). Es wäre möglich, dass intrazelluläres A β hauptsächlich in den Endosomen produziert wird, extrazelluläres dagegen in der Plasmamembran (nach Rücktransport des β -prozessierten APP-CTF von den Endosomen zur Plasmamembran). In Übereinstimmung mit diesem Modell verändert eine Behandlung mit dem GSM Sulindacsulfid nur die Spiegel der extrazellulären, aber nicht der intrazellulären A β -Spezies (Czirr et al., 2008). In Endosomen synthetisiertes A β kann allerdings auch sekretiert werden, und extrazelluläres A β wird wiederum in die Zelle aufgenommen (Rajendran et al., 2006; Saavedra et al., 2007). Wie stark diese Effekte die intra- und extrazellulären A β -Spiegel beeinflussen, ist jedoch noch ungeklärt. Es scheint plausibel, dass die Sekretion oder intrazelluläre Ablagerung des A β mindestens zum Teil von seiner Produktionsstätte abhängt. Je nachdem, wo diese liegt, befindet sich die γ -Sekretase in unterschiedlichen Membranumgebungen, was wiederum die Verhältnisse der A β -Spezies zueinander verändern kann (Fraering et al., 2004; Amtul et al., 2010; Amtul et al., 2011).

Es ist auch wahrscheinlich, dass es Unterschiede in der extra- und intrazellulären Stabilisierung und im Abbau von A β gibt. A β kann sich an die Plasmamembran anlagern, wird aber auch im Cytosol und im Zellkern gefunden (Yanagisawa et al., 1995; Barucker 2008). Seine Lokalisation könnte seinen Abbau regulieren, was bei unterschiedlich effizientem Abbau der verschiedenen A β -Spezies deren Verhältnisse zueinander ändern würde.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der hier durchgeführten Charakterisierung verschiedener PS1-FAD-Mutanten, dass jede Mutante separat betrachtet werden muss, um Aussagen über die Mechanismen ihrer Toxizität treffen zu können. Idealerweise sollten sowohl die extrazellulären als auch die intrazellulären Effekte untersucht werden, um eine PS1-FAD-Mutante gut zu charakterisieren.

3.5. Einfluss von SPA4CT-GxxxG-Mutanten auf die A β -Prozessierung durch PS1-FAD-Mutanten

Mutanten des G₂₉xxxG₃₃-Motivs der APP-TMS schwächen die Dimerisierung des APP-CTFs. Es wird angenommen, dass sie dadurch einen besseren Abbau im γ -Sekretase-Komplex ermöglichen, so dass statt des toxischen A β 42 verstärkt kürzere A β -Spezies entstehen. Daher ist die Monomerisierung von APP-CTF, zum Beispiel durch bestimmte GSM, ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Behandlung und/ oder Prävention der Alzheimer-Krankheit (Munter et al., 2007; Richter et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Effekt von GxxxG-Mutanten auf PS1-FAD-Mutanten von ihrer jeweiligen „Stärke“ abhängt. „Milde“ lo-PS1-FAD-Mutanten reagieren ebenso wie PS1-wt bereits auf die „milde“ GxxxG-Mutante G33A, die „stärkeren“ eo-PS1-FAD-Mutanten dagegen schwächen den Effekt der G33A-Mutante deutlich ab. Auch die eo-PS1-FAD-Mutanten lassen sich jedoch durch „stärkere“ GxxxG-Mutanten effektiv beeinflussen. Die Erniedrigung der A β 42- und A β 40-Niveaus und die Erhöhung des A β 38-Niveaus durch die „stärkste“ GxxxG-Mutante, G33I, sind bei eo-PS1-FAD Mutanten genauso deutlich wie bei PS1-wt.

SPA4CT-GxxxG-Mutanten und PS1-FAD-Mutanten konkurrieren also um den Einfluss auf die A β -Produktion. Der entscheidende Faktor ist letztendlich die Monomerisierung des APP-CTF, da „starke“ GxxxG-Mutanten in der Lage sind, die Effekte aller PS1-FAD-Mutanten aufzuheben.

γ -Sekretase-Modulatoren (GSM) unterstützen ähnlich wie GxxxG-Mutanten den Abbau des APP-CTFs, so dass kürzere A β -Spezies entstehen (Weggen et al., 2001; Eriksen et al., 2003). Ebenso wie GxxxG-Mutanten können auch bestimmte GSM die Dimerisierung des APP-CTF abschwächen. Es ist daher eine plausible Annahme, dass diese GSM ihren Einfluss auf die A β -Produktion nach demselben Mechanismus vermitteln wie die GxxxG-Mutanten (Richter et al., 2010). Es ist darum interessant, zu vergleichen, ob GSM und GxxxG-Mutanten auch die A β -Produktion durch PS1-FAD-Mutanten auf ähnliche Weise beeinflussen.

Eine auffällige Parallele besteht zunächst darin, dass eine Reihe von PS1-FAD-Mutanten die GSM-induzierten Effekte ebenso wie die der GxxxG-Mutanten abschwächen können (Weggen et al., 2003; Czirr et al., 2007; Page et al., 2008; Hahn et al., 2011). Einige der verbesserten GSM der zweiten Generation können auch die A β -Produktion durch starke PS1-FAD-Mutanten effektiv modulieren, die auf den relativ schwachen GSM Sulindacsulfid noch nicht reagieren. Es gibt allerdings auch eine PS1-FAD-Mutante (L166P), die durch keinen bisher untersuchten GSM beeinflusst werden konnte (Kretner et al., 2011; Hussain et al., 2011).

Interessant ist, dass bei PS1-FAD-Mutanten keine starke Korrelation zwischen dem Erkrankungsalter und der Reaktion auf GSM zu erkennen ist. Dies unterstreicht wiederum die Unterschiedlichkeit der PS1-Mutanten und weist darauf hin, dass Mechanismen jenseits der A β -Produktion eine Rolle für das Erkrankungsalter spielen können. Eine auffällige Ausnahme bildet zum Beispiel die eo-FAD-Mutante M146L, die den Effekt des GSM Sulindacsulfid gegenüber PS1-wt sogar verstärkt (Weggen et al., 2003; Kretner et al., 2011). Im Gegensatz dazu schwächt diese Mutante in unseren Experimenten ebenso wie die anderen eo-PS1-Mutanten den Effekt der GxxxG-Mutante G33A ab. Auch ist bei uns klar zu sehen, dass lo-FAD-Mutanten ebenso wie PS1-wt auf G33A reagieren und alle untersuchten eo-FAD-Mutanten den Effekt von G33A verringern, also eine Korrelation mit dem Erkrankungsalter vorhanden ist. Allerdings ist auch bei den Studien zur Reaktion von PS1-FAD-Mutanten auf GSM die Tendenz erkennbar, dass „mildere“ PS-FAD-Mutanten, die erst relativ spät zum Krankheitsausbruch führen, besser auf GSM reagieren als eo-FAD-Mutanten. Eine Reihe von Mutanten weicht von dieser Regel ab, jedoch wurden auch nur Mutanten mit einem Erkrankungsalter bis maximal 50 Jahren betrachtet (Kretner et al., 2011).

Abgesehen von einzelnen Ausnahmen gilt, dass PS1-FAD-Mutanten auf GSM und auf GxxxG-Mutanten ähnlich reagieren. Dies ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass einige GSM das Monomer:Dimer-Verhältnis von APP-CTF erhöhen (Richter et al., 2010). In der hier vorgelegten Studie wurde gezeigt, dass ein sehr hohes Monomer:Dimer-Verhältnis (wie bei der Mutante G33I) in der Lage ist, sogar bei sehr starken PS1-FAD-Mu-

tanten die A β -Prozessierung komplett zu normalisieren. Dies unterstreicht noch einmal die Bedeutung von APP-CTF monomerisierenden Substanzen als mögliche Therapeutika, die sogar gegen äußerst aggressive familiäre Formen der Alzheimer-Krankheit wirksam sein können.

3.6. Vergleich der A β -Prozessierung bei APP-FAD- und PS1-FAD-Mutanten

2010 veröffentlichten Munter et al. die erste umfassende Studie zum Einfluss von APP-FAD-Mutanten auf die Produktion verschiedener A β -Spezies. Sie zeigten, dass APP-FAD-Mutanten ihre pathogene Wirkung auf den ϵ -Schnitt auszuüben scheinen, da sie zusätzlich zum A β 42:A β 40-Verhältnis auch das A β 38:A β 40-Verhältnis erhöhen. Die einzige Ausnahme bildet die Mutante APP-sw, die das A β 38:A β 40-Verhältnis nicht deutlich verändert. Anders als bei PS1-FAD-Mutanten scheinen die γ -Schnitte nicht beeinflusst zu sein (Munter et al., 2010) (Abb. 3.3).

In der genannten Studie wurde außerdem untersucht, wie APP-FAD-Mutanten auf die Monomerisierung des APP-CTFs durch die „milde“ GxxxG-Mutante G33A reagieren. Anders als bei PS1-FAD-Mutanten mit frühem Erkrankungsalter kann G33A bei allen APP-FAD-Mutanten unabhängig von deren Stärke die Sekretion von A β 42 zugunsten von A β 38 senken (Munter et al., 2010).

Auch bei der Betrachtung der APP-FAD-Mutanten zeigt der Vergleich mit GSM, dass diese einen ähnlichen Einfluss ausüben wie GxxxG-Mutanten. Im Unterschied zu PS1-FAD-Mutanten reagieren APP-FAD-Mutanten ebenso gut wie APP-wt auf alle untersuchten GSM (Weggen et al., 2003; Page et al., 2010; Hahn et al., 2011). Auch dies unterstützt die These, dass mindestens einige GSM ihren Einfluss auf die A β -Prozessierung durch eine Schwächung der APP-CTF-Dimerisierung vermitteln.

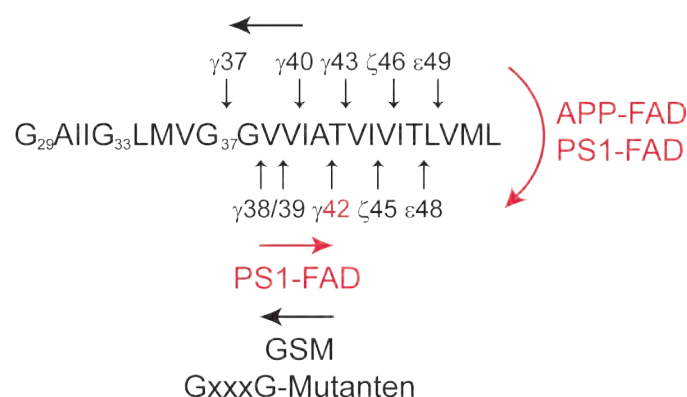


Abb. 3.3: Einfluss von APP- und PS-FAD-Mutanten auf die sequentielle Proteolyse von A β . APP-TMS mit eingezeichneten Schnittstellen der A β 40- (oben) und A β 42-Produktlinie (unten). Die Glycine der GxxxG-Motive sind nach der A β -Nummerierung beschriftet. Sowohl APP- als auch PS-FAD-Mutanten können den ϵ -Schnitt beeinflussen, so dass der Abbau verstärkt über die A β 42-Produktlinie abläuft. Die meisten PS-FAD-Mutanten inhibieren jedoch die späteren γ -Schnitte, vor allem den Prozessierungsschritt von A β 42 zu A β 38. Die späten γ -Schnitte beider Produktlinien können durch GSM oder GxxxG-Mutanten unterstützt werden.

3.7. Die Produktion toxischer A β -Spezies als Folge eines konformationell bedingten Funktionsverlustes der γ -Sekretase

Es verstärken sich die Hinweise, dass die Toxizität von PS-FAD-Mutanten auf einem Funktionsverlust beruht, der den normalen Abbau des APP-CTF zu kurzen nicht-toxischen A β -Spezies verhindert. Dafür sprechen zum einen die Akkumulation der Vorläufer dieser kurzen Peptide wie APP-CTF und längere A β -Spezies in Zellkultur und im Alzheimer-Hirn sowie zum anderen eine geringere Produktion von gesamt-A β und der APP intrazellulären Domäne AICD bei vielen FAD-PS-Mutanten (Bentahir et al., 2006; Shimojo et al., 2007; Shimojo et al., 2008; Van Vickle et al., 2008; Heilig et al., 2010).

Vermittelt wird der Funktionsverlust wahrscheinlich über eine Konformationsänderung des Presenilins. In den letzten Jahren wurde dies ausführlich mit Hilfe der FLIM-Technik („fluorescence lifetime imaging“, einer Variante der Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-transfers FRET), untersucht (Lleo et al., 2004; Berezovska et al., 2005). Dabei wurden zwei Positionen im PS oder jeweils eine im PS und im APP-CTF mit Antikörpern markiert, die mit einem Donor- oder Akzeptor-Fluorophor verknüpft waren. Bei geringen Abständen der Fluorophore nimmt die Lebensdauer des Donor-Fluorophors mit der Distanz ab. Anhand der unterschiedlich langen Lebensdauer bei der Markierung der gleichen Aminosäuren von PS1-wt und FAD-Mutanten konnten verschiedene PS-Konformationen nachgewiesen werden.

Nach den Ergebnissen der FLIM-Messungen nimmt PS-wt normalerweise eine „offene“ Konformation ein, in der APP-CTF hauptsächlich zu kürzeren, nicht-toxischen A β -Spezies abgebaut wird. In der alternativen „geschlossenen“ PS-Konformation liegt der PS-N-Terminus näher sowohl bei der cytosolischen Schleife als auch beim C-Terminus, und es wird verstärkt A β 42 gebildet. PS-FAD-Mutanten liegen in der „geschlossenen“ Konformation vor, wobei N- und C-Terminus des PS desto näher zusammen liegen, je früher die entsprechende Mutante zum Krankheitsausbruch führt (Lleo et al., 2004; Berezovska et al., 2005). Eine „geschlossene“ PS-Konformation kann aber auch bei PS-wt durch APP-FAD-Mutanten, durch Verlängerung des N-Terminus von Pen-2 und durch iGSM induziert werden. GSM können dagegen auch PS-FAD-Mutanten teilweise „öffnen“ (Berezovska et al., 2005; Isoo et al., 2007; Herl et al., 2009; Uemura et al., 2009). Auch das Substrat APP-CTF kann seine Konformation ändern. So wird durch PS- und APP-FAD-Mutationen der Abstand zwischen dem APP-C-Terminus und der Membran verringert (Uemura et al., 2011). In der „offenen“ PS-Konformation ist auch der Abstand zwischen dem APP-C-Terminus und der cytosolischen Schleife des Presenilins größer (Lleo et al., 2004; Berezovska et al., 2005).

Insgesamt ergibt sich ein Bild, in dem die Konformation des Enzym-Substrat-Komplexes mit der A β 42-Produktion korreliert. Es liegt nahe, einen Mechanismus zu vermuten, in dem die Beweglichkeit von Enzym und Substrat zueinander eingeschränkt ist (Abb. 3.4). Für die konsekutiven γ -Schnitte müssen sich Enzym und Substrat jedes Mal neu zueinander ausrichten, damit die neue Schnittstelle in das aktive Zentrum gelangt. Wenn eines der beiden Proteine diese Neuausrichtung nicht mehr durchführen kann, werden die späteren Schnitte verhindert.

So kann eine mit früherem Erkrankungsalter zunehmende Unbeweglichkeit der PS1-FAD-Mutanten postuliert werden: In Abb. 3.4.A sind PS1-wt, lo-Mutanten und eo-Mutanten als drei verschiedene PS1-Klassen mit abnehmender konformationeller Flexibilität dargestellt. Für den A β 42 senkenden Effekt der Substratmonomerisierung sind zwei mögliche Modelle vorstellbar. Nimmt man an, dass die Monomerisierung von APP-CTF keinen Einfluss auf die Konformation von PS hat, wäre die verbesserte Prozessierung von Monomeren ausschließlich auf die erhöhte Flexibilität des APP-CTF zurückzuführen (Abb. 3.4.B). Ohne die sterische Behinderung durch ein zweites APP-CTF-Molekül könnte sich das Substrat gegenüber dem Enzym so einfach verschieben, dass auch durch eine starre, „geschlossene“ PS-FAD-Mutante noch eine Prozessierung zu kürzeren A β -Spezies möglich wäre. In einem alternativen Modell (hier nicht gezeigt) könnte das monomerisierte Substrat auch die PS-Konformation „öffnen“. Eine Kombination beider Effekte wäre ebenfalls denkbar.

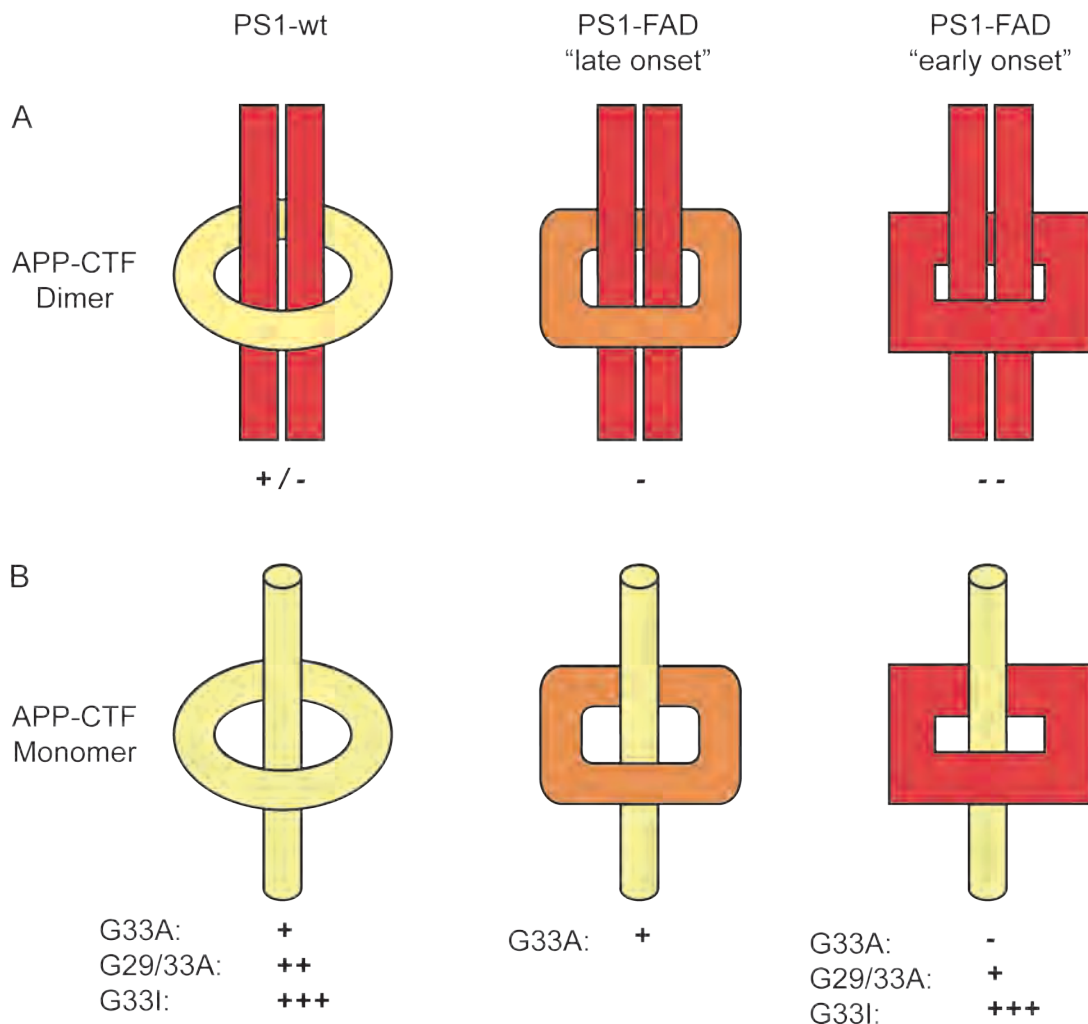


Abb. 3.4: Modell der verschiedenen Konformationen des APP-CTF-PS1-Komplexes. Enzym-Substrat-Komplex aus PS1 (dargestellt als unterschiedlich flexibler Ring: ○ PS1-wt, ◻ „late onset“-PS1-FAD, ◻ „early onset“-PS1-FAD) und APP-CTF in dimerer (A) oder monomerer (B) Form. Flexible Proteine sind gelb gekennzeichnet, unbewegliche rot. Wie effektiv die Prozessierung von A β 42 zu A β 38 jeweils ablaufen kann, ist durch + und - gekennzeichnet (-: mehr A β 42, weniger A β 38, +: mehr A β 38, weniger A β 42). Je weniger beweglich Enzym oder Substrat sind, desto mehr A β 42 wird gebildet. Die Monomerisierung des Substrats hat einen stärkeren Einfluss als die PS-Konformation und kann die A β -Produktion normalisieren.

PS1-FAD-Mutanten und Modulatoren der APP-CTF-Oligomerisierung konkurrieren um den Einfluss auf die A β -Produktion und wahrscheinlich auf die Flexibilität des Enzym-Substrat-Komplexes (Abb. 3.4.B). Für I α -PS1-FAD-Mutanten reicht bereits eine leichte Erhöhung des Monomer:Dimer-Verhältnisses des APP-CTF aus, um die A β -Produktion zu normalisieren. Bei e α -PS1-FAD-Mutanten muss dagegen ein wesentlich größerer Anteil des APP-CTF als Monomer vorliegen, damit die Prozessierung wieder normal stattfinden kann.

Auch andere γ -Sekretase-Komponenten können die Konformation des APP-CTF-PS-Komplexes beeinflussen, da zum Beispiel die Verlängerung des Pen-2-N-Terminus die PS-Konformation verändert (Isoo et al., 2007). Nimmt man an, dass die A β -Produktion über jeden Effekt beeinflusst werden kann, der die Konformation des γ -Sekretase-Komplexes oder des Substrats APP-CTF beeinflusst, ermöglicht dies eine Erklärung für den langsamen Verlauf der Alzheimer-Krankheit. Es scheint plausibel, dass durch die vielen verschiedenen Effektoren des Enzym-Substrat-Komplexes die A β -Produktion nicht immer im gleichen Maß dysreguliert ist. Die A β -Produktion könnte während des Krankheitsverlaufes zwischenzeitlich wieder normalisiert sein. Dies könnte zum Beispiel durch die Regulation der γ -Sekretase-Lokalisation durch APP oder Phospholipase D1 (Liu et al., 2009) vermittelt werden, die die Membranumgebung des Komplexes verändert.

Die vielfältigen Einflussmöglichkeiten auf die Konformation des Enzym-Substrat-Komplexes bieten zudem einen Erklärungsansatz für das Auftreten sporadischer Formen der Alzheimer-Krankheit. Im Alter verändert sich die Transkription von Genen, die neben vielen anderen Funktionen für Lipidstoffwechsel, Metallionenhomöostase und Vesikeltransport entscheidend sind (Lu et al., 2004). Es wäre vorstellbar, dass diese Veränderungen ebenfalls die Konformation des Enzym-Substrat Komplexes subtil beeinflussen und somit langfristig einen pathologischen Einfluss auf die A β -Produktion haben.

Nimmt man an, dass die Konformation des γ -Sekretase-Komplexes über vielfältige Effektoren verändert werden kann, bietet dies auch eine Lösung für die derzeit geführte Diskussion darüber, wo GSM binden. Für GSM-1 ist eine Bindung an PS1-NTF (Tomita et al., 2011; Ohki et al., 2011), für „Compound 6“ an Pen-2 (Kounnas et al., 2010), und für Sulindacsulfid an das APP-CTF gezeigt worden (Kukar et al., 2005; Richter et al., 2010). Diese Ergebnisse stellen keinen Widerspruch dar: es könnte verschiedene GSM-Klassen geben, von denen einige an das Substrat und andere an unterschiedliche Komponenten des Enzyms binden. Alle könnten eine Konformationsänderung des Substrats und/ oder des Enzyms induzieren. Die veränderte Konformation würde zu einer verbesserten Beweglichkeit von einer oder mehreren Komponenten des Enzym-Substrat-Komplexes und damit zu einem effektiveren A β -Abbau führen. Dieses Modell wird durch Studien gestützt, die zeigen, dass unterschiedliche Einflüsse auf die A β -Produktion im γ -Sekretase-Komplex kumulativ wirken können. So erhöhen mehrere FAD-Mutationen des APP und/ oder PS die A β 42-Synthese stärker als eine einzelne Mutation (Citron et al., 1998). Auch GxxxG-Mutationen und GSM können additiv wirken, um die A β -Prozessierung zu verbessern (Page et al., 2010).

Hieraus ergeben sich auch therapeutische Implikationen. Ein möglicher Ansatz wäre, Kombinationspräparate aus mehreren GSM zu entwickeln, von denen bekannt ist, dass sie an unterschiedliche Komponenten des Enzym-Substrat-Komplexes binden. Auch hier wäre eine kumulative Wirkung zu erwarten, so dass insgesamt die A β 42-Produktion deutlich effektiver erniedrigt werden könnte als durch ein einzelnes Präparat.

4. Zusammenfassung

Das toxische A β 42-Peptid gilt als kausatives Agens der Alzheimer-Krankheit. Es wird von der γ -Sekretase durch sukzessive Schnitte aus dem Vorläufermolekül APP-CTF (C-terminales Fragment des Amyloidvorläuferproteins) produziert. Die Dimerisierung des APP-CTFs über die GxxxG-Motive in seiner Transmembransequenz (TMS) ist einer der entscheidenden Faktoren für die Länge der produzierten A β -Peptide. Ein hoher Dimerisierungsgrad des Substrats behindert die sequentielle Proteolyse, so dass verstärkt längere, toxische A β -Peptide gebildet werden.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung des Oligomerisierungszustandes und der Konformation des rekombinant hergestellten APP-CTFs C100. C100 wird häufig für *in vitro* γ -Sekretase-Tests verwendet, wurde bislang aber nicht näher charakterisiert. Hier konnte mittels CD-Spektroskopie und „continuous wave“-ESR-Messungen gezeigt werden, dass in SDS-Micellen rekonstituiertes C100 eine langlebige α -helikale Konformation annimmt und hauptsächlich in Form von Monomeren und Dimeren vorliegt. Damit ist es sehr gut geeignet für *in vitro*-Tests.

Einige γ -Sekretase-Modulatoren (GSM) hemmen die Produktion von A β 42, indem sie an die Oberfläche der APP-TMS binden und die Dimerisierung von APP-CTF inhibieren. Anhand eines molekularen Modells wurde postuliert, dass diese Bindung der GSM an APP-CTF über die flache Helixoberfläche vermittelt wird, die die GxxxG-Motive ausbilden. In dieser Arbeit konnte mittels Oberflächenplasmonresonanz gezeigt werden, dass der GSM Sulindacsulfid spezifisch an C100 bindet. Diese Bindung ist bei der C100-GxxxG-Mutante G33I verringert, was die These einer Interaktion über die GxxxG-Oberfläche stützt. Zudem bindet Sulindacsulfid verstärkt an C100-Dimere. Dies impliziert, dass dieser GSM seine A β 42-senkende Wirkung unter anderem durch die Monomerisierung des APP-CTF ausübt.

Die meisten Presenilinmutanten verstärken die Produktion des toxischen A β 42-Peptids. GxxxG-Mutanten des APP-CTF führen dagegen zu einer erhöhten Produktion verkürzter, nicht-toxischer A β -Peptide wie A β 38, da sie das APP-CTF monomerisieren und so die sequentielle Proteolyse unterstützen. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Effekten betrachtet.

Es wurden 7 Mutanten des Presenilin 1 (PS1) hinsichtlich ihrer A β -Produktion mittels ELISA charakterisiert. Davon führen 5 Mutanten schon früh, zwischen 32 und 45 Jahren, zum Ausbruch der Alzheimer-Krankheit („early-onset“, eo-FAD-Mutanten). Die anderen beiden Mutanten haben einen Krankheitsbeginn von etwa 58 Jahren („late onset“, lo-FAD-Mutanten). Die meisten der analysierten Mutanten hemmen die sequentielle Proteolyse, so dass weniger A β 38 und mehr A β 42 entsteht.

Kombiniert man PS1-FAD-Mutanten und GxxxG-Mutanten des APP-CTF, so heben sich ihre Effekte auf die A β -Produktion teilweise auf. Die schwache GxxxG-Mutation G33A kann die sequentielle γ -Sekretase-Prozessierung bei PS1-Wildtyp und lo-FAD-Mutanten erhöhen, was zu einer verstärkten A β 38- und einer verringerten A β 42-Produktion führt. Auf eo-FAD-

Mutanten hat diese Mutation jedoch nur einen schwachen Effekt. Stärkere GxxxG-Mutationen wie G33I können aber auch bei diesen Mutanten die γ -Sekretase-Prozessierung beeinflussen wie bei PS1-wt. Damit ist die GxxxG-vermittelte Dimerisierung des APP-CTFs der entscheidende Faktor für die A β -Produktion.

Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass Substanzen, die das Monomer:Dimer-Verhältnis des APP-CTFs erhöhen, erhebliches therapeutisches Potential als Alzheimer-Medikamente haben.

Nach dem hier entwickelten Modell ist zur Produktion kurzer A β -Spezies eine relativ große Flexibilität des Enzym-Substrat-Komplexes aus Presenilin und APP-CTF notwendig. Die Beweglichkeit der Proteine kann unter anderem durch PS-FAD-Mutanten oder durch die Substratdimerisierung eingeschränkt werden. Damit trägt diese Arbeit zum besseren Verständnis des Mechanismus der A β -Synthese bei. Viele verschiedene Faktoren können Veränderungen in der Konformation des Enzym-Substrat-Komplexes induzieren und so die A β -Prozessierung beeinflussen. Dies könnte erklären, warum sich der Krankheitsverlauf bei Alzheimer-Patienten über mehrere Jahrzehnte hinziehen kann.

4. Summary

The toxic A β 42 peptide is held to be the causative agent of Alzheimer's Disease (AD). It is produced from its precursor APP-CTF (amyloid precursor protein C-terminal fragment) by γ -secretase through stepwise cleavage. The dimerization of the APP-CTF via the GxxxG motifs in its transmembrane sequence (TMS) is one of the determining factors for the length of the produced A β peptides. A high level of substrate dimerization impedes its sequential proteolysis, leading to the increased production of longer, toxic A β peptides.

One focus of this thesis was to investigate the oligomeric state and conformation of the recombinantly expressed APP-CTF C100. C100 is frequently used in *in vitro* γ -secretase assays but has not been well characterized so far. Here, using CD spectroscopy and continuous wave ESR measurements, it is shown that C100 reconstituted in SDS micelles adopts a long-lived α -helical conformation and is present mostly in the form of monomers and dimers. Thus, it is very suitable for *in vitro* assays.

A number of γ -secretase modulators (GSMs) lower the production of A β 42 by binding to the APP-TMS surface and inhibiting APP-CTF dimerization. On the basis of a molecular model it was postulated that the interaction of these GSMs with the APP-CTF requires the flat helix surface formed by the GxxxG motifs. Using surface plasmon resonance, it is shown here that the GSM sulindac sulfide binds specifically to C100. This interaction is lowered for the C100 GxxxG mutant G33I, which supports the theory of GSM binding via the GxxxG surface. Furthermore, sulindac sulfide binds preferentially to C100 dimers. This implies that this GSM achieves A β 42 lowering partially by the monomerization of APP-CTF.

Most presenilin mutants increase the production of the toxic A β 42 peptide. GxxxG mutants of the APP-CTF, on the other hand, increase the production of shorter, non-toxic A β peptides such as A β 38 by monomerizing the APP-CTF, thereby facilitating its sequential proteolysis. This study analyzes for the first time the interplay between these two effects.

7 mutants of presenilin 1 (PS1) were characterized as to their A β production using ELISA. 5 of these mutants cause early-onset familial AD (eo-FAD mutants, age of onset 32 to 45 years). The other two mutants have an age of onset of approximately 58 years, making them late-onset (lo-)FAD mutants. Most analyzed mutants inhibit sequential proteolysis, leading to an enhanced A β 42 production at the expense of A β 38.

When PS1-FAD mutants and APP-CTF GxxxG mutants are combined, their effects on A β production partially neutralize each other. The mild GxxxG mutation G33A enhances the sequential proteolysis by PS1-wt or lo-FAD mutants, increasing A β 38 and decreasing A β 42 production. On eo-FAD mutants, G33A exhibits only weak effects. Stronger GxxxG mutations such as G33I, however, can also influence γ -secretase processing by these mutants. Thus, the GxxxG-mediated APP-CTF dimerization is the decisive factor for A β production.

These results support the hypothesis that substances which increase the monomer:dimer ratio of APP-CTF have considerable therapeutic potential as drugs against AD.

According to the model presented here, a relatively high flexibility of the enzyme-substrate complex of presenilin and APP-CTF is necessary for the production of short A β species. Protein mobility can be constrained e.g. by presenilin FAD mutants or by substrate dimerization. Thus this work contributes to a better understanding of the mechanism of A β synthesis. Many different factors can modulate A β processing by changing the conformation of the enzyme-substrate complex. This may explain the slow course of AD.

5. Material

5.1. Geräte

- Autoklav: Varioklav 135S (H+P, Oberschleißheim)
- Begasungsbrutschrank für eukaryotische Zellkultur: HERA cell 240 (Heraeus, USA)
- Blotapparatur: Tankblot-Cell (Bio-Rad, München)
- Brutschrank für bakterielle Zellkultur: Modell 600 (Mettler, Schwabach)
- CASY® Model DT Cell Counter (Roche, Schweiz)
- Einfrierdose: Nalgene Cryo 1C Freezing Container (Nalge Nunc, USA)
- Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR (Cawo, Schrobenhausen)
- Feinwaage MC1 AC120S (Sartorius, Göttingen)
- Geldokumentation Alphamager 2200 (Biozym, Hamburg)
- GenePulser für Elektroporation (Bio-Rad, München)
- Grobwaage L2200P (Sartorius, Göttingen)
- Heizblock UBD2 (Grant, UK)
- Lichtmikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Jena)
- Millipore water purification systems, Q Gard 1 (Millipore, USA)
- Netzgeräte:
 - für Agarosegelelektrophorese: Power Supply 2000/200 (Bio-Rad, München)
 - für SDS-PAGE: Electrophoresis Power Supply EPS 301 (Amersham, USA)
- PCR-Maschinen Mastercycler oder Mastercycler gradient (Eppendorff, Hamburg)
- Pipettierhilfen: Pipetman P2, P20, P200 & P1000 (Gilson, USA), Pipetboy acu (Integra Biosciences, Schweiz)
- Photometer
 - Küvettenphotometer SmartSpec 3000 (Bio-Rad, München)
 - Plattenphotometer Anthos HT2 (Anthos, Krefeld)
 - Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA)
- SDS-Gelapparaturen:
 - für Glycin-SDS-PAGE: Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, München)
 - für Tricin-SDS-PAGE: Vertikal-Elektrophorese-System für Minigele (Hofer, USA)
- Schütteltische für Bakterienkulturen: HR225, HR250 (Infors-HR, Bottmingen)
- Sterilwerkbank Herasafe (Heraeus, USA)
- Thermomixer Comfort (Eppendorff, Hamburg)
- Überkopfschüttler Reax 2 (Heidolph, Schwabach)
- Vakuumpumpe CVC2 vacuubrand (ABM, Marktredwitz)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA)
- Wasserbad U3 (Julabo, Seelbach)
- Zentrifugen & Rotoren:
 - Minizentrifuge Spectrafuge (Labnet, USA)
 - Tischzentrifuge Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg)
 - Zellzentrifuge Megafuge 1.0 (Heraeus, USA)

- Ultrazentrifuge J2-MC (Beckman, München)
 - für ≤ 10.000 rpm: JA-10 Festwinkelrotor (Beckman, München)
 - für > 10.000 rpm: F13B-14x50cy mL Festwinkelrotor (FiberLite, USA)

5.2. Chemikalien

Gesondert angegeben werden nur Chemikalien, die nicht von Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Fluka (Schweiz) oder Bio-Rad (München) stammen. Alle Chemikalien haben PA-Grad.

- Agarose (Invitrogen, Karlsruhe)
- BCA Protein Assay (Pierce, USA)
- GelCode Blue Safe Protein Stain (Thermo Scientific, USA)
- NucleoBond PC 500-Kit oder Xtra Midi-Kit zur Präparation von Plasmid-DNA (Macherey-Nagel, Düren)
- Proteaseinhibitor Complete (Roche, Schweiz)
- Protein G Sepharose (Amersham, GB)
- RC DC Protein Assay (Bio-Rad, München)

5.3. Enzyme und Standards

- 1kb Plus DNA Ladder, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Invitrogen, Karlsruhe)
- BSA, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (NEB, USA)
- dNTPs, 10 mM (Bioline, GB)
- Dual Color Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad, München)
- Pfu DNA Polymerase (3000 U/ml) & Pfu-Puffer (Promega, Heidelberg) bzw. Pfu-Polymerase Ultra Fusion II & Pfu-Puffer (Stratagene, USA)

5.4. Antikörper

W0-2:	monoklonaler Maus-Antikörper gegen gesamt-A β (Epitop A β 4-10, von TGC, Schweiz)
4G8:	monoklonaler Maus-Antikörper gegen gesamt-A β (Epitop A β 17-24, von Covance, USA)
G2-10:	monoklonaler Maus-Antikörper gegen A β 40 (Epitop A β 33-40, von TGC, Schweiz)
G2-13:	monoklonaler Maus-Antikörper gegen A β 42 (Epitop A β 35-42, von TGC, Schweiz)
BA1-13:	monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen A β 38 (Epitop A β 38 C-Terminus, von Covance, USA)

NT1:	monoklonaler Maus-Antikörper gegen PS1-NTF (Epitop PS1 41-49, von AG Mathews, NYU, USA)
APS18:	monoklonaler Maus-Antikörper gegen PS1-CTF (Epitop PS2 313-334, von Alexis, Schweiz)
APS 21:	monoklonaler Maus-Antikörper gegen PS2-NTF (Epitop PS1 31-45, von abcam, GB)
α -Flag:	monoklonaler Maus-Antikörper gegen den Flag-Marker (Epitop DYKDDDDK, von Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
α -Aktin:	monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes β -Aktin (Epitop β -Aktin 1-16, von Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
α -Maus-HRP:	mit Meerrettichperoxidase gekoppelter Zweitantikörper gegen Erstantikörper aus Maus (Promega, USA)

5.5. Zellkultur-Medien

Alle Zutaten für die Medien der bakterielle Zellkultur wurden bezogen von BD (USA). Alle Medien und Medienzusätze sowie PBS und Trypsin/ EDTA für die eukaryotische Zellkultur wurden bezogen von Biochrom (Berlin) oder PAA (Österreich). Die Antibiotika stammten von Roth (Karlsruhe) (Ampicillin) und Invitrogen (Karlsruhe) (Zeocin und Hygromycin).

5.6. Zelllinien, *E. coli*-Stämme und Plasmide

- humane Zellen: SH-SY5Y, humane Neuroblastoma (DSMZ, Braunschweig)
- chemisch kompetente *E. coli*-Zellen: CH3 Blue (Bioline, GB)
- elektrokompetente *E. coli*-Zellen:
 - Top10, hergestellt aus E-shotTM DH10BTM T1R ElectrocompTM Cells (Invitrogen, Karlsruhe)
 - XL1blue (Invitrogen, Karlsruhe)

PS1 wurde in pcDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen, Karlsruhe) vermehrt. In *E. coli* wurde über die Ampicillin-Resistenz selektiert, in eukaryotischen Zellen über die Zeocin-Resistenz. Das Konstrukt stammte von Prof. Christian Haass (LMU, München).

SPA4CT wurde in pCEP4 (Invitrogen, Karlsruhe) vermehrt. In *E. coli* wurde über die Ampicillin-Resistenz selektiert, in eukaryotischen Zellen über die Hygromycin-Resistenz.

C100 wurde im Vektor pQE60 (Qiagen, Hilden) vermehrt und in *E. coli* wurde über die Ampicillin-Resistenz selektiert. Das Konstrukt stammte von Prof. Christian Haass (LMU, München).

5.7. Primer

5.7.1. Mutationsprimer

Alle Primer wurden HPLC-gereinigt von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

Primer zur Einführung des HA-Markers in pcDNA3.1-PS1:

1. PCR	fw	5' CAGTTGCTCCAATGTATCCGTATGATGTTCCACAGAGTTACCTGC 3'
	rev	5' GCAGGTA ACTCTGTGGAACATCATAACGGATACATTGGAGCAACTG 3'
2. PCR	fw	5' CCGTATGATGTTCTGATTATGCTAGCCTCACAGAGTTACCTGC 3'
	rev	5' GCAGGTA ACTCTGTGAGGCTAGCATAATCAGGAACATCATAACGG 3'

Primer zur Einführung von Punktmutationen in pcDNA3.1-HA-PS1:

M146L	fw	5' GTGTCATTGTTGTCCTGACTATCCTCCTG 3'
	rev	5' CAGGAGGATAGTCAGGACAACAATGACAC 3'
L153V	fw	5' CCTCCTGGTGGTTGTGTATAAATACAGGTG 3'
	rev	5' CACCTGTATTTATACACAACCACCAGGAGG 3'
G378V	fw	5' CCAGAGGAAAGGGTAGTAAAACCTTGGATTGGG 3'
	rev	5' CCCAATCCAAGTTTTACTACCCTTTCCTCTGG 3'
L381V	fw	5' GGAGTAAAAGTTGGATTGGGAGATTTTC 3'
	rev	5' GAAATCTCCCAATCCAACCTTTACTCC 3'
G384A	fw	5' GGAGTAAAACCTTGGATTGGCAGATTTTCATTTTCTAC 3'
	rev	5' GTAGAAAATGAAATCTGCCAATCCAAGTTTTACTCC 3'
A409T	fw	5'GGAACACAACCATAACCTGTTTCGTAGC 3'
	rev	5' GCTACGAAACAGGTTATGGTTGTGTTCC 3'
L424F	fw	5' GCCTTACATTATTATTCCTTGCCATTTTC 3'
	rev	5' GAAAATGGCAAGGAATAATAATGTAAGGC 3'

Primer zur Einführung von Punktmutationen in pQE60-C100:

L17C	fw	5'CATCATCAAAAATGCGTGTTCTTTGCAG 3'
	rev	5' CTGCAAAGAACACGCATTTTTGATGATG 3'
F19C	fw	5' CAAAATGGTGTGCTTTGCAGAAGATG 3'
	rev	5' CATCTTCTGCAAAGCACACCAATTTTTG 3'
S59C	fw	5' CAGTACACATGCATTCATCATGGTGTGGT 3'
	rev	5' ACCACACCATGATGAATGCATGTGTACTG 3'

Alle Punktmutationen in pCEP4-SPA4CT wurden von Lisa Münter erzeugt.

5.7.2. Sequenzierprimer

Die Sequenzierprimer wurden von GATC Biotech (Konstanz) synthetisiert.

BGH	rev	5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'
EBV	rev	5' GTGGTTTGTCCAAACTCATC 3'
pcDNA3.1	fw	5' GTGGGAGGTCTATATAAGCA 3'
pcDNA3.1	rev	5' CAAACAACAGATGGCTGGC 3'
pQE-30	fw	5' CGGATAACAATTCACACAG 3'
PS1 471-489	fw	5' GCTGCCATCATGATCAGTG 3'
PS1 724-743	fw	5' GACTCCAGCAGGCATATCTC 3'
PS1 1107-1126	fw	5' CTAGGGCCTCATCGCTCTAC 3'

5.8. Verbrauchsmaterial

- Elektroporationsküvetten 0,2 cm GenePulser Cuvettes (Bio-Rad, München)
- ELISA-Platten: C96 Maxisorp Nunc Immuno-Plates (Nunc, Dänemark)
- Filterpapier Whatman 3MM (Whatman Int. Ltd., GB)
- Kryo-Röhrchen: CryoTube Vials (Nunc, Wiesbaden)
- Mikrotiterplatten (Greiner, Österreich)
- Nitrocellulosemembran porablot NCP (Macherey-Nagel, Düren)
- Petri-Schalen (Greiner, Österreich)
- Pipettenspitzen (Steinbrenner, Wiesenbach)
- Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht)
- Röntgenfilme Hyperfilm ECL (Amersham, GB)
- Schraubdeckelröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht & BD, USA)
- Zellkulturtestplatten (TPP, Schweiz)
- Zellkulturschalen (TPP, Schweiz)

5.9. Puffer

Alle nicht im Methodenteil angegebenen Puffer wurden nach Sambrook und Russell (Sambrook und Russell 2000) angesetzt.

6. Methoden

6.1. Molekularbiologie

6.1.1. Mutagenese

6.1.1.1. Klonierungsstrategien

Zum Einführen der Punktmutationen in pcDNA3.1-HA-PS1 und pQE60-6xHis-C100 wurden komplementäre Primerpaare entworfen, die ca. 30 Basenpaare lang sind und etwa in der Mitte die Punktmutation enthalten (Primersequenzen s. 5.7.1.). Das vollständige Plasmid wurde mittels PCR amplifiziert (s. 6.1.1.2.) und die unmutierte „template“-DNA durch DpnI-Verdau entfernt. Die DNA wurde in chemisch kompetente *E. coli* transformiert (s. 6.1.2.2.), Einzelklone im Mini-Präparations-Maßstab aufgereinigt (s. 6.1.4.) und sequenziert (s. 6.1.6.). Die SPA4CT-Mutanten stammen von Lisa Münter – danke Lisa!

Zum Einführen eines Hämagglutinin-Markers (HA-„tag“) am N-Terminus des PS1 wurden zwei Primerpaare entworfen (Sequenzen s. 5.7.1.). Das erste Primerpaar enthielt 15 Basenpaare (bp) der Sequenz von pcDNA3.1/Zeo(+) direkt vor der PS1-Sequenz sowie der Sequenz von Methionin, dann die Sequenz der ersten Hälfte des HA-Markers und zuletzt 15 bp der PS1-Sequenz ab Aminosäure 2. Nach dem Einfügen der ersten Hälfte des Markers mittels PCR (s. 6.1.1.2) wurde die DNA gereinigt, amplifiziert und sequenziert wie oben beschrieben. Danach wurde eine zweite PCR mit einem Primerpaar durchgeführt, das aus 15 bp der bereits eingefügten Marker-Sequenz, der noch fehlenden Marker-Sequenz sowie 15 bp der PS1-Sequenz ab Aminosäure 2 bestand. Wiederum wurde die DNA wie beschrieben gereinigt, amplifiziert und sequenziert.

6.1.1.2. PCR

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“) wurden 80 - 100 ng C100- oder PS1-wt-DNA mit je 10 pmol der beiden Primer, 47,5 µl Mastermix (5 µl Pfu-Puffer (10x), 1 µl DMSO und 15 nmol dNTPs (bei Verwendung von Promega Pfu-Polymerase) oder 50 nmol (bei Stratagene Pfu Ultra Fusion II) dNTPs (Bioline, GB), H₂O Milli-Q ad 47,5 µl pro Ansatz) und 0,5 µl Pfu DNA-Polymerase (Promega,USA) bzw. 0,25 µl Pfu-Polymerase Ultra Fusion II (Stratagene, USA) auf Eis vermischt. Die Amplifikation erfolgte mittels „hot start“-PCR ((PCR-Programm: 1. 95°C für 30 sec, 2. 55°C für 1 min, 3. 68°C für je 1 min pro 1 kb Plasmidgröße, 20 Zyklen, abschließend 68°C für 10 min, Lagerung bei 4°C). Der Erfolg der Amplifikation wurde im Agarosegel überprüft.

6.1.1.3. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Proben nach ihrer Molekülgröße wurden die Proben mit mindestens einem Sechstel ihres Volumens an 6x DNA-Probenpuffer (60% (w/v) Saccharose, 0,05% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und auf ein 0,8%iges Agarosegel (mit 0,005% (v/v) Ethidiumbromid in TBE-Puffer (90 mM Tris Base, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3)) aufgetragen. Die DNA-Auftrennung erfolgte bei 150 mA für ein Gel oder 250 mA für zwei Gele. Die Ethidiumbromid-markierte DNA wurde auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht.

6.1.2. Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

6.1.2.1. Elektrotransformation

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurden diese in elektrokompetente *E. coli* Top10- oder XL1blue-Zellen retransformiert. Zur Elektrotransformation wurde 0,5 µl Plasmid-DNA auf Eis vorgelegt, 40 µl der Zellen zugegeben und beides in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Bio-Rad, München) überführt. Die Transformation wurde bei 200 Ohm, 25 µF und 1,8 kV mit einem GenePulser II (Bio-Rad, München) durchgeführt; die Zeitkonstante lag bei ca. 5,2. Die transformierten Zellen wurden 30 min mit 1 ml LB-Medium (1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl) ohne Antibiotikum bei 37°C und 900 rpm im Thermomixer inkubiert, dann wurde eine 100 ml-Kultur (LB mit 0,1 mg/ml Ampicillin) angeimpft und bei 160 rpm und 37°C über Nacht inkubiert.

6.1.2.2. Chemische Transformation

Die Vervielfältigung von Plasmiden, die durch Mutations-PCR erzeugt wurden, erfolgte in chemisch kompetenten CH3 Blue *E. coli*-Zellen von Bioline (GB). Es wurden je 2 µl der DpnI-verdauten Plasmide vorgelegt, 50 µl der aufgetauten Zellen zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch einen Hitzeschock (45 s bei 42°C im Wasserbad) permeabilisiert, 2 min auf Eis gekühlt und 30 min mit 500 µl FHK-Medium (1,6% (w/v) Bacto-Trypton, 1% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl) bei 37°C und 900 rpm im Thermomixer inkubiert. Die transformierten Zellen wurden für 1 min bei 9000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert, in ca. 100 µl des Überstandes resuspendiert, auf LB-Platten mit 0,1 mg/ml Ampicillin ausplattiert und diese über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Einzelne Klone wurden in LB-Flüssigmedium vermehrt.

6.1.3. Induktion der Proteinexpression in *E. coli*

Zur Expression von C100 wurde eine Übernachtskultur von mit pQE60-C100 transformierten *E. coli* XL1blue-Zellen (s. 6.1.2.1.) 1:20 in frischem LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin verdünnt. Die Zellen wurden bei 37°C und 160 rpm inkubiert, bis bei 600 nm eine optische Dichte (OD_{600}) von ca. 0,5 gemessen wurde. Dann wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Zellen wurden nach weiteren 4 h Inkubation geerntet. Hierzu wurden sie zunächst 10 min auf 4°C gekühlt und dann im JA-10-Rotor in der Ultrazentrifuge für 12 min bei 4500 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden bis zur Proteinaufreinigung (s. 6.3.1.) bei -20°C aufbewahrt.

6.1.4. DNA-Präparation

Die Präparation der Plasmid-DNA aus 100 ml-Übernachtskulturen (Midi-Präparation) wurde mit dem endotoxinfreien NucleoBond Xtra Midi EF-Kit (Macherey-Nagel, Düren) für DNAs für stabile Kotransfektionen oder mit dem NucleoBond Xtra Midi-Kit für alle sonstigen DNAs nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Plasmidpräparation aus 3 ml-Übernachtskulturen (Mini-Präparation) wurden Zelllyse, Proteinfällung, DNA-Fällung und -Rekonstitution mit den Lösungen und nach den Angaben des NucleoBond PC 500-Kits durchgeführt, die gefällten Proteine wurden jedoch bei 13.000 rpm und 4°C 20 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert.

6.1.5. Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch Messung der optischen Dichte einer verdünnten Lösung bei 260 nm in einer Quarzküvette im Photometer (SmartSpec 3000, Bio-Rad, München) oder im NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, USA) bestimmt. Referenzwellenlänge war 320 nm; durch Messung bei 280 nm wurde überprüft, ob die DNA mit Proteinen verunreinigt war.

6.1.6. DNA-Sequenzierung

DNA aus Mini-Präparationen wurde ansequenziert, um die Anwesenheit der gewünschten Mutante zu überprüfen. DNA aus Midi-Präparationen wurde gegebenenfalls mit mehreren Primern sequenziert, bis die gesamte Proteinsequenz gesichert war. Die verwendeten Sequenzierprimer sind unter 5.7.2. aufgeführt. Alle DNA-Sequenzierungen wurden durch die Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels Clone Manager 5.2 (Sci-Ed, USA) oder CLC Sequence Viewer (CLC bio, Dänemark) mit der Originalsequenz verglichen und Mutationsstellen mit Chromas Lite 2.01 (Technelysium, Australien) analysiert, um Mischklone auszuschließen.

6.2. Zellbiologie

Alle zellbiologischen Experimente wurden an der Sterilwerkbank durchgeführt. Alle verwendeten Reagenzien und Materialien waren entweder steril verpackte Einmalartikel oder wurden vor der Benutzung durch Autoklavieren bei 120°C mit Wasserdampf oder trocken bei 165°C sterilisiert.

6.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

SH-SY5Y-Zellen wurden im Brutschrank unter Zusatz von 5% CO₂ bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Es wurde SH-SY5Y-Wildtypmedium (DMEM/ F12-Medium, 10% (v/v) FCS, 1,2% (v/v) L-Glutamin, 1,2% (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren, 0,5% (v/v) Natriumpyruvat) verwendet oder bei stabil transfizierten Linien zusätzlich Zeocin ad 0,2 mg/ml (bei Verwendung des Vektors pcDNA3.1(+)) und/ oder Hygromycin ad 0,3 mg/ml (bei Verwendung von pCEP4) zugegeben.

Zum Auftauen von Säugetierzellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in ein Falconröhrchen mit 6 ml Wildtypmedium überführt. Die Zellen wurden 4 min bei 400 rpm und RT in der Zellzentrifuge abzentrifugiert, in 4 ml Wildtypmedium resuspendiert und in eine 10 cm Zellkulturschale mit vorgelegten 6 ml Medium überführt.

Zum Einfrieren wurden 70 bis 100% konfluente Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen mit 4 ml PBS gewaschen, mit 800 µl Trypsin/ EDTA abgelöst, in 4 ml Wildtypmedium in ein Falconröhrchen überführt und 4 min bei 500 rpm und RT in der Zellzentrifuge abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 3 ml kaltem Einfriermedium (Wildtypmedium, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert, auf zwei Kryoröhrchen verteilt und sofort in einer Einfrierdose mit Isopropanol auf -80°C gekühlt. Nach einer Nacht im -80°C-Kühlschrank wurden die Zellen in den Stickstofftank gebracht.

Zum Aussähen definierter Zellzahlen wurde die Konzentration der trypsinierten Zellen mit Hilfe eines CASY® Cell Counter Systems (Modell DT, Schärfe System, Reutlingen) bestimmt.

6.2.2. Herstellung stabiler Zelllinien

Die Transfektionen wurden mit dem TransFectin™ Lipid Reagenz von Bio-Rad (München) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als serumfreies Transfektionsmedium wurde Opti-MEM von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. 80% konfluente Zellen auf 6-„well“-Platten wurden jeweils mit 3 µg (pCEP4-SPA4CT-Flag) oder 2,5 µg (pcDNA3.1/Zeo(+)-HA-PS1) DNA und 5 µl TransFectin (Bio-Rad, München) pro Ansatz nach Herstellerangaben transfiziert. Zur Kotransfektion von SH-SY5Y-Zellen, die bereits SPA4CT stabil exprimierten, wurden diese auf 10 cm-Schalen bei 50-60% Konfluenz mit 4 µg pcDNA3.1/Zeo(+)-HA-PS1 und LipofectAMINE Plus (Invitrogen) transfiziert wie bei Schmechel et al. beschrieben

(Schmechel et al., 2004). Alle Zellen wurden mit den Komplexen aus DNA und Transfektionsreagenz über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zellen auf 6-„well“-Platten wurden auf 6 cm-Zellkulturschalen umgesetzt, bei Zellen auf 10 cm-Schalen wurde nur das Medium gewechselt. Einen Tag später wurde mit der Selektion der Zellen mittels Hygromycin (0,3 mg/ml) oder Zeocin (0,2 mg/ml) begonnen.

6.2.3. Transiente Transfektionen

Die transienten Transfektionen wurden ebenfalls mit TransFectin und OptiMEM als Transfektionsmedium nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Transfektion der SH-SY5Y-Zellen mit stabiler Expression von PS1 wurden 1,5 µg SPA4CT-DNA (pCEP4-SPA4CT-Flag) und 1,5 µl TransFectin pro Ansatz (60-90% konfluente Zellen auf 24-„well“-Platten) eingesetzt. Die Zellen wurden mit den DNA-TransFectin-Komplexen über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium ausgetauscht. 24 h konditionierte Zellkulturüberstände wurden für die ELISA- und MALDI-MS-Messungen sowie direkt oder nach Immunpräzipitation zur Detektion von A β nach Tris-Tricin-SDS-PAGE und Western Blot verwendet.

6.2.4. Zellyse

Um die Expression von PS1 und SPA4CT zu quantifizieren, wurden die Zellen nach Diehlmann et al. lysiert (Diehlmann et al., 1999). Die Zellen wurden mit 300 µl sterilem PBS pro „well“ einer 24-„well“-Platte gewaschen und mit 100 µl Diehlmann-Lysepuffer (50 mM Tris/ HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% (v/v) Triton x-100, 0,2% (v/v) NP40, 1x Complete Protease Inhibitor, pH 7,5) mindestens 15 min bei 4°C auf einem Inkubationsschütteltisch inkubiert. Die Proben wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und 15 min bei 13.000 rpm und 4°C in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Lysate wurden in neue Reaktionsgefäße überführt, auf Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

6.3. Proteinbiochemie

6.3.1. Proteinaufreinigung aus bakteriellen Einschlusskörpern

6.3.1.1. Lösung und Rückfaltung der Proteine

Die *E. coli*-Zellpellets (s. 6.1.3.) wurden in TE-Puffer (20 mM Tris/ HCl, 1mM EDTA, pH 7,5) resuspendiert und mit drei Passagen in der „french press“ aufgeschlossen. Die Einschlusskörper, die das C100 enthielten, wurden bei 25.000 g und 12°C für 10 min pelletiert. Die Pellets wurden mit Harnstoffpuffer ((20 mM Tris/ HCl, pH 8,5, 100 mM

NaCl, 1 mM EDTA, 6 M Harnstoff, 2% Detergenz (2% DOC oder 1% Triton x-100 und 1% SDS), 1 mM CaCl₂, 1x Complete Proteaseinhibitor (Roche)) versetzt und die Proteine durch Ultraschallbehandlung gelöst. Die Proteinlösung wurde erneut abzentrifugiert und der Überstand sofort 1:4 mit Tris/ NaCl-Puffer (20 mM Tris/ HCl, 50 mM NaCl, pH 7,5) verdünnt. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurden die Proben mit TCEP ad 2,5 mM versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden 1:5 mit Tris/ NaCl-Puffer verdünnt und bei 4°C aufbewahrt.

6.3.1.2. Nickel-NTA-Säulenchromatographie

Zur Bindung an das Säulenmaterial wurden die C100-Lösungen über Nacht bei 4°C mit Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose, „nitrilotriacetic acid“) inkubiert. Das Säulenmaterial wurde bei Raumtemperatur (RT) mit 40 Säulenvolumina (SV) Waschpuffer (50 mM Tris/ HCl, 300 mM NaCl, Detergenz (meist 0,3% SDS), pH 8,0) mit 0,02 bis 0,2 mM Tris-(2-carboxyethyl)-Phosphin (TCEP) gewaschen. Danach erfolgte gegebenenfalls eine Spin-Markierung (s. 6.4.2.1.) und das Protein wurde mit weiteren 120 SV Waschpuffer (ohne TCEP) gewaschen. Es wurde zwei Mal mit je 4 SV Elutionspuffer (Waschpuffer, 50 mM EDTA, 0,02% NaN₃, 1x Complete Proteaseinhibitor) nach 10 min Inkubation bei RT und 800 rpm eluiert. Die Proben wurden bei 4°C gelagert.

Zur Konzentration der Proben wurden diese mit 5 ml Waschpuffer ohne Detergenz (für Proben in SDS-Puffer) oder mit 0,1% DOC pro 0,5 mg C100 auf einem 10 kDa-Größenausschlussfilter („Ultrafree 0.5 centrifugal filter device“, Millipore, USA) gewaschen und eingengt. Bei diesem Schritt wurde gegebenenfalls auch der Puffer gewechselt.

6.3.2. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

6.3.2.1. BCA-Test

Die Proteinkonzentrationen von Zelllysaten wurden mit nach der BCA-Methode (Pierce, USA) nach Herstellerangaben bestimmt. Es wurden je 20 µl Probe mit 200 µl BCA-Lösung auf einer Mikrotiterplatte ca. 15 min bei 50-60°C inkubiert und die Absorption bei 562 nm mit dem Plattenphotometer gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer BSA-Standardreihe berechnet.

6.3.2.2. RC DC-Test

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen von C100-Lösungen wurde der RC DC-Test von Bio-Rad (München) verwendet, um störende Effekte der Detergenzien auszuschließen.

Der Test wurde nach Herstellerangaben nach dem „microfuge tube assay“-Protokoll in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt und die Absorption bei 750 nm im Küvettenphotometer (Schichtdicke 10 mm) vermessen. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer BSA-Standardreihe berechnet, die in dem gleichen Puffer angesetzt wurde wie die jeweiligen Proben.

6.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

6.3.3.1. Probenvorbereitung

Lysate von SH-SY5Y-Zellen wurden mit einem Drittel ihres Volumens an 4x SDS-Probenpuffer (250 mM Tris/ HCl, 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerin, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) mit 8% β -Mercaptoethanol (MCE) und 8 M Harnstoff versetzt und 20 min bei 42°C denaturiert. Zellkulturüberstände wurden mit einem Drittel ihres Volumens an 4x SDS-Probenpuffer mit 8% MCE versetzt. Immunpräzipitiertes A β wurde durch 5 min Kochen bei 95°C mit 15 μ l 2x SDS-Probenpuffer mit 8% MCE eluiert. Alle sonstigen Proteinlösungen wurden mit einem Drittel ihres Volumens an 4x SDS-Probenpuffer ohne MCE versetzt.

6.3.3.2. Glycin-SDS-PAGE

Die Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970). Es wurden 15%ige SDS-PA-Gele verwendet. Die Elektrophorese wurde mit 35 mA pro Gel und 200 V in SDS-Glycin-Laufpuffer (25 mM Tris/ HCl, 192 mM Glycin, 1% (w/v) SDS, pH 8,3) durchgeführt.

Die Proteine wurden geblottet und immundetektiert (s. 6.4.) oder mittels Coomassie Brilliant Blue-Färbung („GelCode Blue Safe Protein Stain“, Pierce, USA) nach Herstellerangaben im Gel sichtbar gemacht.

6.3.3.3. Tricin-SDS-PAGE

Zur elektrophoretischen Auftrennung von A β wurde die kontinuierliche Tricin-SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow eingesetzt (Schagger und von Jagow 1987). Die PAGE wurde mit 10-20% Tris-Tricin-SDS-Fertiggelen von anamed (Darmstadt) in SDS-Tricin-Laufpuffer (100 mM Tris/ HCl, 100 mM Tricin, 0,1% (w/v) SDS) bei 100 mA und 125 V durchgeführt.

6.3.4. Western Blot-Analyse

6.3.4.1. Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen

Durch Übertragen auf eine Nitrocellulosemembran wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine für weitere Untersuchungen zugänglich gemacht. Der Proteintransfer erfolgte im Nassblotverfahren in einer Tankblotapparatur bei 4°C für 3 h bei 380 mA oder über Nacht bei 180 mA (Blotpuffer: 25 mM Tris/ HCl, 0,2 M Glycin, 10% (v/v) Methanol oder Ethanol). Zur Überprüfung des gleichmäßigen Proteintransfers wurden die Membranen in Ponceau S-Lösung (0,2% (w/v) Ponceau S, 1% (v/v) Essigsäure) gefärbt und überschüssige Färbelösung durch Waschen mit deionisiertem Wasser entfernt. Nach der Dokumentation wurden die Membranen durch Waschen mit PBS wieder entfärbt. Über Tris-Tricin-Gele aufgetrenntes A β wurde nach der Ponceau S-Färbung durch 5 min Kochen in PBS in der Mikrowelle denaturiert.

6.3.4.2. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach dem Transfer auf Nitrocellulose können die Proteine mittels Immundetektion sichtbar gemacht werden. Die Membranen wurden als erstes für 1 h bei RT in 10% (w/v) Magermilch in PBS blockiert, drei Mal mit PBS gewaschen und dann 1 - 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper inkubiert. Die Antikörper sind unter 5.4. aufgeführt. Nun wurden die Membranen drei Mal 10 min mit PBS gewaschen, ca. 45 min mit dem Zweitantikörper-HRP-Konjugat (anti-Maus-HRP 1:10.000 in 5% (w/v) Magermilch/ PBS) inkubiert und erneut drei Mal 10 min mit PBS gewaschen. Die Membranen wurden 1 min mit frisch angesetzter ECL-Entwicklerlösung (1 ml ECL-Lösung A (0,25 mg/ml Luminol in 0,1 M Tris/ HCl, pH 8,6), 100 μ l ECL-Lösung B (1,1 mg/ml p-Hydroxycoumarinsäure in DMSO), 0,3 μ l H₂O₂ (30% v/v)) inkubiert, dann erfolgte die Chemolumineszenz-Belichtung und Entwicklung der Röntgenfilme in einer Filmkassette im Dunkelraum.

6.3.5. Immunpräzipitation

A β wurde aus 24 h konditionierten Zellkulturüberständen oder aus Lysaten der SH-SY5Y-Zellen durch Immunpräzipitation aufkonzentriert. Hierzu wurde der Überstand eines „wells“ einer 24-„well“-Platte (bei stabiler SPA4CT-Expression) oder der Überstand bzw. das Lysat (1:5 mit PBS verdünnt) einer 10 cm-Zellkulturschale (bei transienter SPA4CT-Expression) mit 30 μ l Protein G-Sepharose, 5 μ g des Antikörpers W0-2 und 1x Complete Proteaseinhibitor über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose wurde bei 2000 rpm für 3 min in der Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand verworfen. Bei Proben, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden sollten, wurde zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und zwischendurch wie beschrieben abzentrifugiert. Die Sepharose wurde mit

einer Kanüle ganz vom Puffer befreit und die gebundenen Proteine durch Kochen mit Probenpuffer eluiert (s. 6.3.3.1.). Bei Proben, die mittels MALDI-MS analysiert werden sollten, wurde nach den Waschschriften mit PBS noch zweimal mit 1 ml 100 mM Ammoniumacetat gewaschen und abzentrifugiert wie beschrieben. Die Elution erfolgte zwei Mal mit je 500 μ l 50%iger Essigsäure für 10 min bei 40°C. Die beiden Eluate wurden vereinigt und in der Vakuumzentrifuge zur Trockne eingedampft.

6.3.6. ELISA

Der ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) wurde von The Genetics Company (TGC, Schweiz) bezogen und nach Angaben des Herstellers mit 24 h konditionierten Zellkulturüberständen (300 μ l OptiMEM für A β 38, 2 ml SH-SY5Y-Widtypmedium für gesamt-A β , A β 40 und A β 42) oder Zelllysaten in Dreifachbestimmung durchgeführt. A β 40 wurde mit dem Erstantikörper G2-10 (5 μ g/ml, von TGC), A β 42 mit G2-13 (8 μ g/ml, von TGC), A β 38 mit BA1-13 (4 μ g/ml, von Covance, USA) und gesamt-A β mit 4G8 (1 μ g/ml, von Covance) auf den Platten fixiert. Es wurden jeweils 50 μ l der Überstände oder 10 μ l Lysat und 40 μ l steriles PBS für den ELISA eingesetzt. Für gesamt-A β und extrazelluläres A β 40 wurde Mono-Streptavidin-HRP (Thermo Fisher Scientific, USA) zur Vervielfältigung des Signals genutzt, für alle anderen ELISAs Poly-Streptavidin-HRP (Thermo Fisher Scientific, USA).

6.3.7. Kreuzvernetzung

Zur Kreuzvernetzung von C100 wurden die Eluate der Ni-NTA-Säule (s. 6.3.1.2.) in 50 mM Natriumphosphat (pH 8,0) umgepuffert. 50 μ M C100 wurden mit einem 5- bis 50-fachen molaren Überschuss an DFDNB (1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzen, Thermo Fisher, USA) gelöst in Aceton oder nur mit Aceton für 30 min bei RT inkubiert. Nach 1 bis 3 Tagen Lagerung bei 4°C wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Coomassie Brilliant Blue-Färbung (s. 6.3.3.2.), CD (s. 6.4.1.) und cw-ESR (s. 6.4.2.2.) analysiert.

6.3.8. Tryptischer Verdau im SDS-PA-Gel

Vor der massenspektroskopischen Analyse (s. 6.4.4.) von C100-Proben mussten diese zunächst mit Trypsin in kleinere Peptidfragmente aufgespalten werden. Hierzu wurden die entsprechenden Banden aus Coomassie Brilliant Blue-gefärbten SDS-PA-Gelen (s. 6.3.3.2.) mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ca. 1 mm kleine Stücke geschnitten. Diese wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 20 μ l Acetonitril/ 100 mM NH₄HCO₃ (1:1) 15 min bei RT inkubiert. Der Überstand (ÜS) wurde verworfen und durch 20 μ l Acetonitril ersetzt und die Inkubation fortgesetzt, bis die Gelstücke milchig weiß waren (ca. 5 min). Der ÜS wurde verworfen und die Gelstücke in der SpeedVac für 10 min lyophilisiert. Zur Reduktion

von Disulfidbrücken wurde als Nächstes mit 100 mM Dithiothreitol in 100 mM NH_4HCO_3 bei 56°C für 30 min inkubiert. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert, das Volumen des ÜS ($V(\text{ÜS})$) bestimmt (Kapazität der Gelstückchen = 20 μl – $V(\text{ÜS})$) und dieser verworfen. Die Gelstücke wurden erneut mit 20 μl Acetonitril geschrumpft, bis sie weiß waren (5 - 10 min) und dann zur Carbamidomethylierung der Cysteinreste mit 55 mM Iodacetamid in 100 mM NH_4HCO_3 für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert, der ÜS verworfen, die Gelstücke mit 100 mM NH_4HCO_3 15 min bei RT gewaschen, erneut abzentrifugiert, der ÜS verworfen und die Gelstücke wiederum mit Acetonitril geschrumpft. Nach erneutem Lyophilisieren (10 min) wurden die Proben mit Trypsin (12,5 ng/ μl in 25 mM NH_4HCO_3) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde ein Trypsinvolumen von 3 μl plus der Kapazität der Gelstückchen eingesetzt. Die Proben wurden über Nacht bei 37°C verdaut, am nächsten Morgen kurz abzentrifugiert und noch einmal 30 min bei 37°C inkubiert. Der ÜS wurde zur MALDI-MS-Analyse eingesetzt.

6.4. Spektroskopische Methoden

6.4.1. Zirkularer Dichroismus

Für die CD-Messungen („circular dichroism“) der C100-Proben wurden die Eluate der Ni-NTA-Säule (s. 6.3.1.2.) in 10 mM Tris/ H_3PO_4 und 50 mM Natriumphosphat (pH 8,0) umgepuffert. 50 μM Proben wurden mit einem J-810 Spektropolarimeter (Jasco, USA) bei 20°C, einer Schichtdicke von 0,2 mm, 100 nm/min Scangeschwindigkeit und 1 s „response time“ je dreifach vermessen. Von allen Spektren wurde eine entsprechende Pufferkontrolle abgezogen.

6.4.2. Elektronenspinresonanz

6.4.2.1. Spin-Markierung von Proteinen

Die Spin-Markierung von C100 erfolgte während der Aufreinigung über die Ni-NTA-Säule (s. 6.3.1.2.). Zur Berechnung der einzusetzenden MTSL-Menge („methanethiosulfonate spin label“, Toronto Research Chemicals, Kanada) wurde zunächst eine Testaufreinigung ohne Spin-Markierung durchgeführt und die C100-Konzentration des Eluats mittels RC DC-Test bestimmt (s. 6.3.2.2.). Es wurde mit einem 10- bis 80-fachen molaren Überschuss an MTSL (gelöst in 50% DMSO) für 2 h bei RT und 800 rpm in 4 Säulenvolumen Waschpuffer mit 0,02-0,2 mM TCEP inkubiert. Nach der Entfernung von TCEP und ungebundenen MTSL-Molekülen, Elution und Aufkonzentration der Proben (s. 6.3.1.2.) wurde die Markierungseffizienz mittels SDS-PAGE und Coomassie Brilliant Blue-Färbung (s. 6.3.3.2.) überprüft.

6.4.2.2. „continuous wave“-ESR-Messung

cw-ESR-Messungen („continuous wave“-Elektronenspinresonanz) wurden von Ringo Wenzel in der Arbeitsgruppe von Prof. Robert Bittl (Institut für Experimentalphysik, Freie Universität Berlin) durchgeführt. Es wurde ein selbst gebautes cw-Spektrometer verwendet, bestehend aus einer ER 046 XK-T Mikrowellenbrücke (Bruker, Rheinstetten) und einer Bruker ER 048 X Kontrolleinheit. Der Magnet stammte aus einem AEG 20 XT Spektrometersystem und wurde über ein Bruker ER 081S-Netzteil mit B-H15 Feldkontrolle mit Strom versorgt. Die Signale wurden mit einem SR 810 DSP Trägerfrequenzverstärker (Stanford Research, USA) bei 100 kHz Modulationsfrequenz, 2,7 G Modulationsamplitude und einer „lock-in“-Zeitkonstante von 100 ms detektiert. Alle Messungen wurden mit einem Bruker SHQ-Resonator bei Raumtemperatur und einer Mikrowellenstärke von 2 mW (Frequenz 9,38 GHz) durchgeführt. Die C100-Konzentration der gemessenen Proben lag bei 50 – 300 μM .

6.4.3. Oberflächenplasmonresonanz

Die Oberflächenplasmonresonanz (SPR, „surface plasmon resonance“)-Messungen wurden mit einem BIAcore 3000-Gerät (GE Healthcare, USA) durchgeführt. Ein NTA-Sensorchip (GE Healthcare) wurde mit 20 μl einer 500 μM NiCl_2 -Lösung in Biacore-Laufpuffer (0,01 M HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), 0,15 M NaCl, 1 μM EDTA, 0,005% Tween 20, pH 7,4) beladen. Als Dispenser-Puffer wurde Laufpuffer mit 3 mM EDTA verwendet. Die Eluate der Ni-NTA-Säule (s. 6.3.1.2.) wurden in Laufpuffer umgepuffert und die Proben auf 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ für C100-wt, 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ für C100-G33I und 0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ für C100-L17C verdünnt. Die Signalstärke bei Injektion von je 10 μl dieser Lösungen bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ war vergleichbar. Als Negativkontrolle wurde C100-wt über eine nicht mit Nickel beladene Flusszelle gegeben, wobei keine Signaländerung gemessen wurde. 5, 10, 25 und 50 mM Stammösungen von Sulindacsulfid, Sulindacsulfon, Sulindac und Indomethacin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in DMSO wurden 1:1000 in Laufpuffer verdünnt und es wurden je 30 μl bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Nach einer Dissoziationsphase von 200 s erfolgte direkt die nächste Injektion, da aufgrund der schnellen Dissoziation der GSM keine Regeneration notwendig war.

Zur Regeneration des NTA-Chips wurde zwei Mal 1 min mit 30 μl Regenerationslösung (Laufpuffer mit 0,35 M EDTA) gewaschen. Auf dem Chip präzipitiertes C100 wurde entfernt, indem nacheinander mit je 30 μl 100 mM NaOH, 8 M Harnstoff und 0,5% SDS und danach über Nacht mit Laufpuffer gewaschen wurde. Die Regeneration wurde durch Injektion von 30 μl des Antikörpers W0-2 (3,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Laufpuffer, TGC, Schweiz) überprüft.

6.4.4. MALDI-Massenspektroskopie

In der SpeedVac getrocknete A β -Proben wurden in 10 μ l TA-Puffer (20% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure in H₂O) aufgenommen und für 10 min im Ultraschallbad gelöst. Eine gesättigte Lösung der Matrix Sinapinsäure in TA-Puffer wurde ebenfalls im Ultraschallbad behandelt, dann abzentrifugiert und 1 μ l des Überstandes mit 1 μ l Probe vermischt. Die Überstände des tryptischen in-Gel-Verdau von C100 (s. 6.3.8.) wurden 1:1 mit der Matrix CCA (4-Hydroxy- α -cyano-Zimtsäure) in TA-Puffer vermischt. 1 μ l der jeweiligen Mischung wurde auf einen Probenhalter aus Stahl aufgetragen, bei RT getrocknet („dried droplet“-Methode) und in einem Ultraflex II-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) im Reflektor-Modus mit dem Programm RP_PepMix gemessen. Die Messungen wurden selbst oder durch Dr. Christoph Weise durchgeführt.

6.5. Molekulares Modell

Das Modell der TMS von APP-wt bzw. G33A und der Interaktion mit Sulindacsulfid wurde von Dr. Peter W. Hildebrand und Jochen Ismer (Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Charité Berlin) erstellt. Das APP-TMS-Modell basierend auf der Struktur von Glycophorin A wurde aus einer früheren Analyse übernommen (Munter et al., 2007). Die G33I-Mutante wurde mit Hilfe des PyMOL „Molecular Graphics“-Systems (<http://www.pymol.org>) erzeugt und mit GROMACS (<http://www.gromacs.org/>) energetisch minimiert. Die Interaktion mit Sulindacsulfid wurde modelliert wie bei Richter et al. beschrieben (Richter et al., 2010).

7. Literaturverzeichnis

- Acevedo K. M., Hung Y. H., Dalziel A. H., Li Q. X., Laughton K., Wikke K., Rembach A., Roberts B., Masters C. L., Bush A. I. und Camakaris J. (2011). „Copper promotes the trafficking of the amyloid precursor protein.“ *J Biol Chem* 286: 8252-8262.
- Ahn K., Shelton C. C., Tian Y., Zhang X., Gilchrist M. L., Sisodia S. S. und Li Y. M. (2010). „Activation and intrinsic gamma-secretase activity of presenilin 1.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 21435-21440.
- Aizenstein H. J., Nebes R. D., Saxton J. A., Price J. C., Mathis C. A., Tsopelas N. D., Ziolkowski S. K., James J. A., Snitz B. E., Houck P. R., Bi W., Cohen A. D., Lopresti B. J., DeKosky S. T., Halligan E. M. und Klunk W. E. (2008). „Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly.“ *Arch Neurol* 65: 1509-1517.
- Aldudo J., Bullido M. J. und Valdivieso F. (1999). „DGGE method for the mutational analysis of the coding and proximal promoter regions of the Alzheimer's disease presenilin-1 gene: two novel mutations.“ *Hum Mutat* 14: 433-439.
- Alzheimer A. (1907). „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde.“ *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin* 64: 146-148.
- Amtul Z., Uhrig M., Rozmahel R. F. und Beyreuther K. (2011). „Structural insight into the differential effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on the production of Abeta peptides and amyloid plaques.“ *J Biol Chem* 286: 6100-6107.
- Amtul Z., Uhrig M., Supino R. und Beyreuther K. (2010). „Phospholipids and a phospholipid-rich diet alter the *in vitro* amyloid-beta peptide levels and amyloid-beta 42/40 ratios.“ *Neurosci Lett* 481: 73-77.
- Annaert W. G., Levesque L., Craessaerts K., Dierinck I., Snellings G., Westaway D., George-Hyslop P. S., Cordell B., Fraser P. und De Strooper B. (1999). „Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons.“ *J Cell Biol* 147: 277-294.
- Anthony J. C., Breitner J. C., Zandi P. P., Meyer M. R., Jurasova I., Norton M. C. und Stone S. V. (2000). „Reduced prevalence of AD in users of NSAIDs and H2 receptor antagonists: the Cache County study.“ *Neurology* 54: 2066-2071.
- Assini A., Terreni L., Borghi R., Giliberto L., Piccini A., Loqui D., Fogliarino S., Forloni G. und Tabaton M. (2003). „Pure spastic paraparesis associated with a novel presenilin 1 R278K mutation.“ *Neurology* 60: 150.
- Backstrom J. R., Lim G. P., Cullen M. J. und Tokes Z. A. (1996). „Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40).“ *J Neurosci* 16: 7910-7919.
- Bammens L., Chavez-Gutierrez L., Tolia A., Zwijsen A. und De Strooper B. (2011). „Functional and Topological Analysis of Pen-2, the Fourth Subunit of the {gamma}-Secretase Complex.“ *J Biol Chem* 286: 12271-12282.
- Barrow C. J. und Zagorski M. G. (1991). „Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition.“ *Science* 253: 179-182.
-

-
- Barucker C. (2008). „Physiologische und pathophysiologische Funktion von Amyloid beta (Ab) in neuronalen Zellen“. Diplomarbeit bei Prof. Dr. Gerd Multhaup, Freie Universität Berlin.
- Beel A. J., Barrett P., Schnier P. D., Hitchcock S. A., Bagal D., Sanders C. R. und Jordan J. B. (2009). „Nonspecificity of binding of gamma-secretase modulators to the amyloid precursor protein.“ *Biochemistry* 48: 11837-11839.
- Behr D., Hesse L., Masters C. L. und Multhaup G. (1996). „Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I.“ *J Biol Chem* 271: 1613-1620.
- Belyaev N. D., Nalivaeva N. N., Makova N. Z. und Turner A. J. (2009). „Nepriylsin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease.“ *EMBO Rep* 10: 94-100.
- Bentahir M., Nyabi O., Verhamme J., Tolia A., Horre K., Wiltfang J., Esselmann H. und De Strooper B. (2006). „Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms.“ *J Neurochem* 96: 732-742.
- Berezovska O., Lleo A., Herl L. D., Frosch M. P., Stern E. A., Bacskai B. J. und Hyman B. T. (2005). „Familial Alzheimer’s disease presenilin 1 mutations cause alterations in the conformation of presenilin and interactions with amyloid precursor protein.“ *J Neurosci* 25: 3009-3017.
- Bergman A., Laudon H., Winblad B., Lundkvist J. und Naslund J. (2004). „The extreme C terminus of presenilin 1 is essential for gamma-secretase complex assembly and activity.“ *J Biol Chem* 279: 45564-45572.
- Bethge T. (2010). „Oligomerisierung, Metallbindungseigenschaften und Funktion der β -Sekretase BACE1“. Doktorarbeit bei Prof. Dr. Gerd Multhaup, Freie Universität Berlin.
- Borchelt D. R., Thinakaran G., Eckman C. B., Lee M. K., Davenport F., Ratovitsky T., Prada C. M., Kim G., Seekins S., Yager D., Slunt H. H., Wang R., Seeger M., Levey A. I., Gandy S. E., Copeland N. G., Jenkins N. A., Price D. L., Younkin S. G. und Sisodia S. S. (1996). „Familial Alzheimer’s disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio *in vitro* and *in vivo*.“ *Neuron* 17: 1005-1013.
- Botev A., Munter L. M., Wenzel R., Richter L., Althoff V., Ismer J., Gerling U., Weise C., Kokschi B., Hildebrand P. W., Bittl R. und Multhaup G. (2011). „The amyloid precursor protein C-terminal fragment C100 occurs in monomeric and dimeric stable conformations and binds gamma-secretase modulators.“ *Biochemistry* 50: 828-835.
- Brandt J., Svenson A., Carlsson J. und Drevin H. (1977). „Covalent coupling of unsaturated compounds to thiol agarose using g-radiation. A new method for preparation of adsorbents for affinity chromatography. .“ *J. Solid-Phase Biochem.* 2: 105-109.
- Brunkan A. L., Martinez M., Wang J., Walker E. S., Behr D., Shearman M. S. und Goate A. M. (2005). „Two domains within the first putative transmembrane domain of presenilin 1 differentially influence presenilinase and gamma-secretase activity.“ *J Neurochem* 94: 1315-1328.
- Burns M., Gaynor K., Olm V., Mercken M., LaFrancois J., Wang L., Mathews P. M., Noble W., Matsuoka Y. und Duff K. (2003). „Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances beta-amyloid production *in vivo*.“ *J Neurosci* 23: 5645-5649.
-

-
- Cacquevel M., Aeschbach L., Osenkowski P., Li D., Ye W., Wolfe M. S., Li H., Selkoe D. J. und Fraering P. C. (2008). „Rapid purification of active gamma-secretase, an intramembrane protease implicated in Alzheimer’s disease.“ *J Neurochem* 104: 210-220.
- Cai D., Netzer W. J., Zhong M., Lin Y., Du G., Frohman M., Foster D. A., Sisodia S. S., Xu H., Gorelick F. S. und Greengard P. (2006a). „Presenilin-1 uses phospholipase D1 as a negative regulator of beta-amyloid formation.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1941-1946.
- Cai D., Zhong M., Wang R., Netzer W. J., Shields D., Zheng H., Sisodia S. S., Foster D. A., Gorelick F. S., Xu H. und Greengard P. (2006b). „Phospholipase D1 corrects impaired betaAPP trafficking and neurite outgrowth in familial Alzheimer’s disease-linked presenilin-1 mutant neurons.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1936-1940.
- Caldwell J. P., Bennett C. E., McCracken T. M., Mazzola R. D., Bara T., Buevich A., Burnett D. A., Chu I., Cohen-Williams M., Josein H., Hyde L., Lee J., McKittrick B., Song L., Terracina G., Voigt J., Zhang L. und Zhu Z. (2010). „Iminoheterocycles as gamma-secretase modulators.“ *Bioorg Med Chem Lett* 20: 5380-5384.
- Cao X. und Sudhof T. C. (2001). „A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60.“ *Science* 293: 115-120.
- Cao X. und Sudhof T. C. (2004). „Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation.“ *J Biol Chem* 279: 24601-24611.
- Capell A., Behr D., Prokop S., Steiner H., Kaether C., Shearman M. S. und Haass C. (2005). „Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway.“ *J Biol Chem* 280: 6471-6478.
- Carmine-Simmen K., Proctor T., Tschape J., Poeck B., Triphan T., Strauss R. und Kretzschmar D. (2009). „Neurotoxic effects induced by the Drosophila amyloid-beta peptide suggest a conserved toxic function.“ *Neurobiol Dis* 33: 274-281.
- Cervantes S., Saura C. A., Pomares E., Gonzalez-Duarte R. und Marfany G. (2004). „Functional implications of the presenilin dimerization: reconstitution of gamma-secretase activity by assembly of a catalytic site at the dimer interface of two catalytically inactive presenilins.“ *J Biol Chem* 279: 36519-36529.
- Chandu D., Huppert S. S. und Kopan R. (2006). „Analysis of transmembrane domain mutants is consistent with sequential cleavage of Notch by gamma-secretase.“ *J Neurochem* 96: 228-235.
- Chavez-Gutierrez L., Tolia A., Maes E., Li T., Wong P. C. und de Strooper B. (2008). „Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for gamma-secretase complex maturation but not for its activity.“ *J Biol Chem* 283: 20096-20105.
- Chen A. C., Guo L. Y., Ostaszewski B. L., Selkoe D. J. und LaVoie M. J. (2010). „Aph-1 associates directly with full-length and C-terminal fragments of gamma-secretase substrates.“ *J Biol Chem* 285: 11378-11391.
- Chen F., Hasegawa H., Schmitt-Ulms G., Kawarai T., Bohm C., Katayama T., Gu Y., Sanjo N., Glista M., Rogueva E., Wakutani Y., Pardossi-Piquard R., Ruan X., Tandon A., Checler F., Marambaud P., Hansen K., Westaway D., St George-Hyslop P. und Fraser P. (2006). „TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity.“ *Nature* 440: 1208-1212.
-

-
- Christensen D. Z., Kraus S. L., Flohr A., Cotel M. C., Wirths O. und Bayer T. A. (2008). „Transient intraneuronal A beta rather than extracellular plaque pathology correlates with neuron loss in the frontal cortex of APP/PS1KI mice.“ *Acta Neuropathol* 116: 647-655.
- Citron M., Eckman C. B., Diehl T. S., Corcoran C., Ostaszewski B. L., Xia W., Levesque G., St George Hyslop P., Younkin S. G. und Selkoe D. J. (1998). „Additive effects of PS1 and APP mutations on secretion of the 42-residue amyloid beta-protein.“ *Neurobiol Dis* 5: 107-116.
- Citron M., Westaway D., Xia W., Carlson G., Diehl T., Levesque G., Johnson-Wood K., Lee M., Seubert P., Davis A., Kholodenko D., Motter R., Sherrington R., Perry B., Yao H., Strome R., Lieberburg I., Rommens J., Kim S., Schenk D., Fraser P., St George Hyslop P. und Selkoe D. J. (1997). „Mutant presenilins of Alzheimer’s disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice.“ *Nat Med* 3: 67-72.
- Cleary J. P., Walsh D. M., Hofmeister J. J., Shankar G. M., Kuskowski M. A., Selkoe D. J. und Ashe K. H. (2005). „Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function.“ *Nat Neurosci* 8: 79-84.
- Coulson E. J., Paliga K., Beyreuther K. und Masters C. L. (2000). „What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function.“ *Neurochem Int* 36: 175-184.
- Crystal A. S., Morais V. A., Pierson T. C., Pijak D. S., Carlin D., Lee V. M. und Doms R. W. (2003). „Membrane topology of gamma-secretase component PEN-2.“ *J Biol Chem* 278: 20117-20123.
- Czirr E., Cottrell B. A., Leuchtenberger S., Kukar T., Ladd T. B., Esselmann H., Paul S., Schubel R., Torpey J. W., Pietrzik C. U., Golde T. E., Wiltfang J., Baumann K., Koo E. H. und Weggen S. (2008). „Independent generation of Abeta42 and Abeta38 peptide species by gamma-secretase.“ *J Biol Chem* 283: 17049-17054.
- Czirr E., Leuchtenberger S., Dorner-Ciossek C., Schneider A., Jucker M., Koo E. H., Pietrzik C. U., Baumann K. und Weggen S. (2007). „Insensitivity to Abeta42-lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gamma-secretase inhibitors is common among aggressive presenilin-1 mutations.“ *J Biol Chem* 282: 24504-24513.
- D’Andrea M. R., Nagele R. G., Wang H. Y., Peterson P. A. und Lee D. H. (2001). „Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer’s disease.“ *Histopathology* 38: 120-134.
- Das C., Berezovska O., Diehl T. S., Genet C., Buldyrev I., Tsai J. Y., Hyman B. T. und Wolfe M. S. (2003). „Designed helical peptides inhibit an intramembrane protease.“ *J Am Chem Soc* 125: 11794-11795.
- 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., Goate A. und Kopan R. (1999). „A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain.“ *Nature* 398: 518-522.
- Demuro A., Mina E., Kaye R., Milton S. C., Parker I. und Glabe C. G. (2005). „Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers.“ *J Biol Chem* 280: 17294-17300.
-

-
- Diehlmann A., Ida N., Weggen S., Grunberg J., Haass C., Masters C. L., Bayer T. A. und Beyreuther K. (1999). „Analysis of presenilin 1 and presenilin 2 expression and processing by newly developed monoclonal antibodies.“ *J Neurosci Res* 56: 405-419.
- Dovey H. F., Suomensaaari-Chrysler S., Lieberburg I., Sinha S. und Keim P. S. (1993). „Cells with a familial Alzheimer's disease mutation produce authentic beta-peptide.“ *Neuroreport* 4: 1039-1042.
- Dries D. R., Shah S., Han Y. H., Yu C., Yu S., Shearman M. S. und Yu G. (2009). „Glu-333 of nicastrin directly participates in gamma-secretase activity.“ *J Biol Chem* 284: 29714-29724.
- Duering M., Grimm M. O., Grimm H. S., Schroder J. und Hartmann T. (2005). „Mean age of onset in familial Alzheimer's disease is determined by amyloid beta 42.“ *Neurobiol Aging* 26: 785-788.
- Duff K., Eckman C., Zehr C., Yu X., Prada C. M., Perez-tur J., Hutton M., Buee L., Harigaya Y., Yager D., Morgan D., Gordon M. N., Holcomb L., Refolo L., Zenk B., Hardy J. und Younkin S. (1996). „Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1.“ *Nature* 383: 710-713.
- Dyrks T., Dyrks E., Masters C. und Beyreuther K. (1992). „Membrane inserted APP fragments containing the beta A4 sequence of Alzheimer's disease do not aggregate.“ *FEBS Lett* 309: 20-24.
- Eckman E. A., Watson M., Marlow L., Sambamurti K. und Eckman C. B. (2003). „Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme.“ *J Biol Chem* 278: 2081-2084.
- Edbauer D., Kaether C., Steiner H. und Haass C. (2004). „Co-expression of nicastrin and presenilin rescues a loss of function mutant of APH-1.“ *J Biol Chem* 279: 37311-37315.
- Edbauer D., Winkler E., Regula J. T., Pesold B., Steiner H. und Haass C. (2003). „Reconstitution of gamma-secretase activity.“ *Nat Cell Biol* 5: 486-488.
- Elder G. A., Gama Sosa M. A., De Gasperi R., Dickstein D. L. und Hof P. R. (2010). „Presenilin transgenic mice as models of Alzheimer's disease.“ *Brain Struct Funct* 214: 127-143.
- Eriksen J. L., Sagi S. A., Smith T. E., Weggen S., Das P., McLendon D. C., Ozols V. V., Jessing K. W., Zavitz K. H., Koo E. H. und Golde T. E. (2003). „NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 *in vivo*.“ *J Clin Invest* 112: 440-449.
- Esch F. S., Keim P. S., Beattie E. C., Blacher R. W., Culwell A. R., Oltersdorf T., McClure D. und Ward P. J. (1990). „Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor.“ *Science* 248: 1122-1124.
- Esler W. P., Kimberly W. T., Ostaszewski B. L., Ye W., Diehl T. S., Selkoe D. J. und Wolfe M. S. (2002). „Activity-dependent isolation of the presenilin- gamma -secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2720-2725.
- Fang B., Jia L. und Jia J. (2006). „Chinese Presenilin-1 V97L mutation enhanced Abeta42 levels in SH-SY5Y neuroblastoma cells.“ *Neurosci Lett* 406: 33-37.
- Farris W., Mansourian S., Chang Y., Lindsley L., Eckman E. A., Frosch M. P., Eckman C. B., Tanzi R. E., Selkoe D. J. und Guenette S. (2003). „Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain *in vivo*.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4162-4167.
-

-
- Fluhrer R., Multhaup G., Schlicksupp A., Okochi M., Takeda M., Lammich S., Willem M., Westmeyer G., Bode W., Walter J. und Haass C. (2003). „Identification of a beta-secretase activity, which truncates amyloid beta-peptide after its presenilin-dependent generation.“ *J Biol Chem* 278: 5531-5538.
- Fortna R. R., Crystal A. S., Morais V. A., Pijak D. S., Lee V. M. und Doms R. W. (2004). „Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of APH-1, a component of the gamma-secretase complex.“ *J Biol Chem* 279: 3685-3693.
- Fraering P. C., LaVoie M. J., Ye W., Ostaszewski B. L., Kimberly W. T., Selkoe D. J. und Wolfe M. S. (2004a). „Detergent-dependent dissociation of active gamma-secretase reveals an interaction between Pen-2 and PS1-NTF and offers a model for subunit organization within the complex.“ *Biochemistry* 43: 323-333.
- Fraering P. C., Ye W., Strub J. M., Dolios G., LaVoie M. J., Ostaszewski B. L., van Dorselaer A., Wang R., Selkoe D. J. und Wolfe M. S. (2004b). „Purification and characterization of the human gamma-secretase complex.“ *Biochemistry* 43: 9774-9789.
- Francis R., McGrath G., Zhang J., Ruddy D. A., Sym M., Apfeld J., Nicoll M., Maxwell M., Hai B., Ellis M. C., Parks A. L., Xu W., Li J., Gurney M., Myers R. L., Himes C. S., Hiebsch R., Ruble C., Nye J. S. und Curtis D. (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.
- Frykman S., Hur J. Y., Franberg J., Aoki M., Winblad B., Nahalkova J., Behbahani H. und Tjernberg L. O. (2010). „Synaptic and endosomal localization of active gamma-secretase in rat brain.“ *PLoS One* 5: e8948.
- Fukumori A., Fluhrer R., Steiner H. und Haass C. (2010). „Three-amino acid spacing of presenilin endoproteolysis suggests a general stepwise cleavage of gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis.“ *J Neurosci* 30: 7853-7862.
- Fukumori A., Okochi M., Tagami S., Jiang J., Itoh N., Nakayama T., Yanagida K., Ishizuka-Katsura Y., Morihara T., Kamino K., Tanaka T., Kudo T., Tanii H., Ikuta A., Haass C. und Takeda M. (2006). „Presenilin-dependent gamma-secretase on plasma membrane and endosomes is functionally distinct.“ *Biochemistry* 45: 4907-4914.
- Funamoto S., Morishima-Kawashima M., Tanimura Y., Hirotsu N., Saido T. C. und Ihara Y. (2004). „Truncated carboxyl-terminal fragments of beta-amyloid precursor protein are processed to amyloid beta-proteins 40 and 42.“ *Biochemistry* 43: 13532-13540.
- Goedert M. und Spillantini M. G. (2006). „A century of Alzheimer’s disease.“ *Science* 314: 777-781.
- Goldgaber D., Lerman M. I., McBride O. W., Saffiotti U. und Gajdusek D. C. (1987). „Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer’s disease.“ *Science* 235: 877-880.
- Gong Y., Chang L., Viola K. L., Lacor P. N., Lambert M. P., Finch C. E., Krafft G. A. und Klein W. L. (2003). „Alzheimer’s disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10417-10422.
-

-
- Goodger Z. V., Rajendran L., Trutzel A., Kohli B. M., Nitsch R. M. und Konietzko U. (2009). „Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway.“ *J Cell Sci* 122: 3703-3714.
- 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: 775-779.
- Grimm H. S., Beher D., Lichtenthaler S. F., Shearman M. S., Beyreuther K. und Hartmann T. (2003). „gamma-Secretase cleavage site specificity differs for intracellular and secretory amyloid beta.“ *J Biol Chem* 278: 13077-13085.
- Grimm M. O., Grimm H. S., Tomic I., Beyreuther K., Hartmann T. und Bergmann C. (2008). „Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels.“ *J Biol Chem* 283: 11302-11311.
- Gu Y., Misonou H., Sato T., Dohmae N., Takio K. und Ihara Y. (2001). „Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch.“ *J Biol Chem* 276: 35235-35238.
- Haass C., Hung A. Y., Schlossmacher M. G., Teplow D. B. und Selkoe D. J. (1993). „beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms.“ *J Biol Chem* 268: 3021-3024.
- Haass C., Koo E. H., Mellon A., Hung A. Y. und Selkoe D. J. (1992a). „Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments.“ *Nature* 357: 500-503.
- 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. und et al. (1992b). „Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism.“ *Nature* 359: 322-325.
- Hahn S., Bruning T., Ness J., Czirr E., Baches S., Gijzen H., Korth C., Pietrzik C. U., Bulic B. und Weggen S. (2011). „Presenilin-1 but not amyloid precursor protein mutations present in mouse models of Alzheimer's disease attenuate the response of cultured cells to gamma-secretase modulators regardless of their potency and structure.“ *J Neurochem* 116: 385-395.
- Hall A., Elliott R. L., Giblin G. M., Hussain I., Musgrave J., Naylor A., Sasse R. und Smith B. (2010). „Piperidine-derived gamma-secretase modulators.“ *Bioorg Med Chem Lett* 20: 1306-1311.
- Hardy J. und Allsop D. (1991). „Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease.“ *Trends Pharmacol Sci* 12: 383-388.
- Harmeier A. (2008). „Aggregation, Struktur und pathologische Wirkung des Amyloid- β Peptides: die Rolle des GxxxG-Motivs“. Doktorarbeit bei Prof. Dr. Gerd Multhaup, Freie Universität Berlin.
- Harmeier A., Wozny C., Rost B. R., Munter L. M., Hua H., Georgiev O., Beyermann M., Hildebrand P. W., Weise C., Schaffner W., Schmitz D. und Multhaup G. (2009). „Role of amyloid-beta glycine 33 in oligomerization, toxicity, and neuronal plasticity.“ *J Neurosci* 29: 7582-7590.
-

-
- Hasegawa H., Liu L. und Nishimura M. (2010). „Dilysine retrieval signal-containing p24 proteins collaborate in inhibiting gamma-cleavage of amyloid precursor protein.“ *J Neurochem* 115: 771-781.
- Hasegawa H., Sanjo N., Chen F., Gu Y. J., Shier C., Petit A., Kawarai T., Katayama T., Schmidt S. D., Mathews P. M., Schmitt-Ulms G., Fraser P. E. und St George-Hyslop P. (2004). „Both the sequence and length of the C terminus of PEN-2 are critical for intermolecular interactions and function of presenilin complexes.“ *J Biol Chem* 279: 46455-46463.
- He G., Luo W., Li P., Remmers C., Netzer W. J., Hendrick J., Bettayeb K., Flajolet M., Gorelick F., Wennogle L. P. und Greengard P. (2010). „Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease.“ *Nature* 467: 95-98.
- Heber S., Herms J., Gajic V., Hainfellner J., Aguzzi A., Rulicke T., von Kretschmar H., von Koch C., Sisodia S., Tremml P., Lipp H. P., Wolfer D. P. und Muller U. (2000). „Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members.“ *J Neurosci* 20: 7951-7963.
- Hedskog L., Petersen C. A., Svensson A. I., Welander H., Tjernberg L. O., Karlstrom H. und Ankarcrona M. (2010). „Gamma-secretase Complexes Containing Caspase-cleaved Presenilin-1 Increase Intracellular Abeta42/Abeta40 Ratio.“ *J Cell Mol Med*.
- Heilig E. A., Xia W., Shen J. und Kelleher R. J., 3rd (2010). „A presenilin-1 mutation identified in familial Alzheimer disease with cotton wool plaques causes a nearly complete loss of gamma-secretase activity.“ *J Biol Chem* 285: 22350-22359.
- Herl L., Lleo A., Thomas A. V., Nyborg A. C., Jansen K., Golde T. E., Hyman B. T. und Berezovska O. (2006). „Detection of presenilin-1 homodimer formation in intact cells using fluorescent lifetime imaging microscopy.“ *Biochem Biophys Res Commun* 340: 668-674.
- Herl L., Thomas A. V., Lill C. M., Banks M., Deng A., Jones P. B., Spoelgen R., Hyman B. T. und Berezovska O. (2009). „Mutations in amyloid precursor protein affect its interactions with presenilin/gamma-secretase.“ *Mol Cell Neurosci* 41: 166-174.
- Herreman A., Hartmann D., Annaert W., Saftig P., Craessaerts K., Serneels L., Umans L., Schrijvers V., Checler F., Vanderstichele H., Baekelandt V., Dressel R., Cupers P., Huylebroeck D., Zwijsen A., Van Leuven F. und De Strooper B. (1999). „Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11872-11877.
- 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: 1127-1136.
- Hoe H. S., Fu Z., Makarova A., Lee J. Y., Lu C., Feng L., Pajoohesh-Ganji A., Matsuoka Y., Hyman B. T., Ehlers M. D., Vicini S., Pak D. T. und Rebeck G. W. (2009). „The effects of amyloid precursor protein on postsynaptic composition and activity.“ *J Biol Chem* 284: 8495-8506.
-

-
- Hoke D. E., Tan J. L., Ilaya N. T., Culvenor J. G., Smith S. J., White A. R., Masters C. L. und Evin G. M. (2005). „*In vitro* gamma-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein correlates to a subset of presenilin complexes and is inhibited by zinc.“ *Febs J* 272: 5544-5557.
- Hubbell W. L., Cafiso D. S. und Altenbach C. (2000). „Identifying conformational changes with site-directed spin labeling.“ *Nat Struct Biol* 7: 735-739.
- Hur J. Y., Welander H., Behbahani H., Aoki M., Franberg J., Winblad B., Frykman S. und Tjernberg L. O. (2008). „Active gamma-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain.“ *Febs J* 275: 1174-1187.
- Hussain I., Harrison D. C., Hawkins J., Chapman T., Marshall I., Facci L., Ahmed S., Brackenborough K., Skaper S. D., Mead T. L., Smith B. B., GIBLIN G. M., Hall A., Gonzalez M. I. und Richardson J. C. (2011). „TASTPM mice expressing amyloid precursor protein and presenilin-1 mutant transgenes are sensitive to gamma-secretase modulation and amyloid-beta lowering by GSM-10h.“ *Neurodegener Dis* 8: 15-24.
- Ikeuchi T., Kaneko H., Miyashita A., Nozaki H., Kasuga K., Tsukie T., Tsuchiya M., Imamura T., Ishizu H., Aoki K., Ishikawa A., Onodera O., Kuwano R. und Nishizawa M. (2008). „Mutational analysis in early-onset familial dementia in the Japanese population. The role of PSEN1 and MAPT R406W mutations.“ *Dement Geriatr Cogn Disord* 26: 43-49.
- Isoo N., Sato C., Miyashita H., Shinohara M., Takasugi N., Morohashi Y., Tsuji S., Tomita T. und Iwatsubo T. (2007). „Abeta42 overproduction associated with structural changes in the catalytic pore of gamma-secretase: common effects of Pen-2 N-terminal elongation and fenofibrate.“ *J Biol Chem* 282: 12388-12396.
- 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: 1550-1552.
- Jankowsky J. L., Fadale D. J., Anderson J., Xu G. M., Gonzales V., Jenkins N. A., Copeland N. G., Lee M. K., Younkin L. H., Wagner S. L., Younkin S. G. und Borchelt D. R. (2004). „Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide *in vivo*: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase.“ *Hum Mol Genet* 13: 159-170.
- Jia J., Xu E., Shao Y., Sun Y. und Li D. (2005). „One novel presenilin-1 gene mutation in a Chinese pedigree of familial Alzheimer's disease.“ *J Alzheimers Dis* 7: 119-124; discussion 173-180.
- Kaden D., Munter L. M., Joshi M., Treiber C., Weise C., Bethge T., Voigt P., Schaefer M., Beyermann M., Reif B. und Multhaup G. (2008). „Homophilic interactions of the amyloid precursor protein (APP) ectodomain are regulated by the loop region and affect beta-secretase cleavage of APP.“ *J Biol Chem* 283: 7271-7279.
- Kaden D., Voigt P., Munter L. M., Bobowski K. D., Schaefer M. und Multhaup G. (2009). „Subcellular localization and dimerization of APLP1 are strikingly different from APP and APLP2.“ *J Cell Sci* 122: 368-377.
- Kaether C., Capell A., Edbauer D., Winkler E., Novak B., Steiner H. und Haass C. (2004). „The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and gamma-secretase activity.“ *Embo J* 23: 4738-4748.
-

-
- Kaether C., Haass C. und Steiner H. (2006a). „Assembly, trafficking and function of gamma-secretase.“ *Neurodegener Dis* 3: 275-283.
- Kaether C., Scheuermann J., Fassler M., Zilow S., Shirotani K., Valkova C., Novak B., Kacmar S., Steiner H. und Haass C. (2007). „Endoplasmic reticulum retention of the gamma-secretase complex component Pen2 by Rer1.“ *EMBO Rep* 8: 743-748.
- Kaether C., Schmitt S., Willem M. und Haass C. (2006b). „Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated after transport of their precursors to the cell surface.“ *Traffic* 7: 408-415.
- Kang J., Lemaire H. G., Unterbeck A., Salbaum J. M., Masters C. L., Grzeschik K. H., Multhaup G., Beyreuther K. und Muller-Hill B. (1987). „The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor.“ *Nature* 325: 733-736.
- Khandogin J. und Brooks C. L., 3rd (2007). „Linking folding with aggregation in Alzheimer's beta-amyloid peptides.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16880-16885.
- Kienlen-Campard P., Tasiaux B., Van Hees J., Li M., Huysseune S., Sato T., Fei J. Z., Aimoto S., Courtoy P. J., Smith S. O., Constantinescu S. N. und Octave J. N. (2008). „Amyloidogenic processing but not amyloid precursor protein (APP) intracellular C-terminal domain production requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GXXXG motifs.“ *J Biol Chem* 283: 7733-7744.
- Kim S. H. und Sisodia S. S. (2005a). „Evidence that the „NF“ motif in transmembrane domain 4 of presenilin 1 is critical for binding with PEN-2.“ *J Biol Chem* 280: 41953-41966.
- Kim S. H. und Sisodia S. S. (2005b). „A sequence within the first transmembrane domain of PEN-2 is critical for PEN-2-mediated endoproteolysis of presenilin 1.“ *J Biol Chem* 280: 1992-2001.
- Kim S. H., Yin Y. I., Li Y. M. und Sisodia S. S. (2004). „Evidence that assembly of an active gamma-secretase complex occurs in the early compartments of the secretory pathway.“ *J Biol Chem* 279: 48615-48619.
- Kimberly W. T., LaVoie M. J., Ostaszewski B. L., Ye W., Wolfe M. S. und Selkoe D. J. (2003). „Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6382-6387.
- Kinoshita A., Fukumoto H., Shah T., Whelan C. M., Irizarry M. C. und Hyman B. T. (2003). „Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes.“ *J Cell Sci* 116: 3339-3346.
- Kirschenbaum F., Hsu S. C., Cordell B. und McCarthy J. V. (2001a). „Glycogen synthase kinase-3beta regulates presenilin 1 C-terminal fragment levels.“ *J Biol Chem* 276: 30701-30707.
- Kirschenbaum F., Hsu S. C., Cordell B. und McCarthy J. V. (2001b). „Substitution of a glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation site in presenilin 1 separates presenilin function from beta-catenin signaling.“ *J Biol Chem* 276: 7366-7375.
- Klyubin I., Walsh D. M., Lemere C. A., Cullen W. K., Shankar G. M., Betts V., Spooner E. T., Jiang L., Anwyl R., Selkoe D. J. und Rowan M. J. (2005). „Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity *in vivo*.“ *Nat Med* 11: 556-561.
-

-
- Koo E. H. und Squazzo S. L. (1994). „Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway.“ *J Biol Chem* 269: 17386-17389.
- Kopan R. und Ilagan M. X. (2004). „Gamma-secretase: proteasome of the membrane?“ *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 499-504.
- Kornilova A. Y., Bihel F., Das C. und Wolfe M. S. (2005). „The initial substrate-binding site of gamma-secretase is located on presenilin near the active site.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3230-3235.
- Kornilova A. Y., Kim J., Laudon H. und Wolfe M. S. (2006). „Deducing the transmembrane domain organization of presenilin-1 in gamma-secretase by cysteine disulfide cross-linking.“ *Biochemistry* 45: 7598-7604.
- Kounnas M. Z., Danks A. M., Cheng S., Tyree C., Ackerman E., Zhang X., Ahn K., Nguyen P., Comer D., Mao L., Yu C., Pleyne D., Digregorio P. J., Velicelebi G., Stauderman K. A., Comer W. T., Mobley W. C., Li Y. M., Sisodia S. S., Tanzi R. E. und Wagner S. L. (2010). „Modulation of gamma-secretase reduces beta-amyloid deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.“ *Neuron* 67: 769-780.
- Kretner B., Fukumori A., Gutsmedl A., Page R. M., Luebbers T., Galley G., Baumann K., Haass C. und Steiner H. (2011). „Attenuated A{beta}42 Responses to Low Potency {gamma}-Secretase Modulators Can Be Overcome for Many Pathogenic Presenilin Mutants by Second-generation Compounds.“ *J Biol Chem* 286: 15240-15251.
- Kuhn P. H., Wang H., Dislich B., Colombo A., Zeitschel U., Ellwart J. W., Kremmer E., Rossner S. und Lichtenthaler S. F. (2010). „ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons.“ *Embo J* 29: 3020-3032.
- Kukar T., Murphy M. P., Eriksen J. L., Sagi S. A., Weggen S., Smith T. E., Ladd T., Khan M. A., Kache R., Beard J., Dodson M., Merit S., Ozols V. V., Anastasiadis P. Z., Das P., Fauq A., Koo E. H. und Golde T. E. (2005). „Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting Abeta42 production.“ *Nat Med* 11: 545-550.
- Kukar T. L., Ladd T. B., Bann M. A., Fraering P. C., Narlawar R., Maharvi G. M., Healy B., Chapman R., Welzel A. T., Price R. W., Moore B., Rangachari V., Cusack B., Eriksen J., Jansen-West K., Verbeeck C., Yager D., Eckman C., Ye W., Sagi S., Cottrell B. A., Torpey J., Rosenberry T. L., Fauq A., Wolfe M. S., Schmidt B., Walsh D. M., Koo E. H. und Golde T. E. (2008). „Substrate-targeting gamma-secretase modulators.“ *Nature* 453: 925-929.
- Kumar-Singh S., Theuns J., Van Broeck B., Pirici D., Vennekens K., Corsmit E., Cruts M., Dermaut B., Wang R. und Van Broeckhoven C. (2006). „Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40.“ *Hum Mutat* 27: 686-695.
- Kuo Y. M., Emmerling M. R., Vigo-Pelfrey C., Kasunic T. C., Kirkpatrick J. B., Murdoch G. H., Ball M. J. und Roher A. E. (1996). „Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains.“ *J Biol Chem* 271: 4077-4081.
-

-
- Kuperstein I., Broersen K., Benilova I., Rozenski J., Jonckheere W., Debulpaep M., Vandersteen A., Segers-Nolten I., Van Der Werf K., Subramaniam V., Braeken D., Callewaert G., Bartic C., D'Hooge R., Martins I. C., Rousseau F., Schymkowitz J. und De Strooper B. (2010). „Neurotoxicity of Alzheimer's disease Abeta peptides is induced by small changes in the Abeta42 to Abeta40 ratio.“ *Embo J* 29: 3408-3420.
- Kuzuya A., Uemura K., Kitagawa N., Aoyagi N., Kihara T., Ninomiya H., Ishiura S., Takahashi R. und Shimohama S. (2007). „Presenilin 1 is involved in the maturation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1).“ *J Neurosci Res* 85: 153-165.
- Kwak Y. D., Brannen C. L., Qu T., Kim H. M., Dong X., Soba P., Majumdar A., Kaplan A., Beyreuther K. und Sugaya K. (2006). „Amyloid precursor protein regulates differentiation of human neural stem cells.“ *Stem Cells Dev* 15: 381-389.
- Laemmli U. K. (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ *Nature* 227: 680-685.
- Lambert M. P., Barlow A. K., Chromy B. A., Edwards C., Freed R., Liosatos M., Morgan T. E., Rozovsky I., Trommer B., Viola K. L., Wals P., Zhang C., Finch C. E., Krafft G. A. und Klein W. L. (1998). „Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6448-6453.
- Lammich S., Okochi M., Takeda M., Kaether C., Capell A., Zimmer A. K., Edbauer D., Walter J., Steiner H. und Haass C. (2002). „Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide.“ *J Biol Chem* 277: 44754-44759.
- Laudon H., Hansson E. M., Melen K., Bergman A., Farmery M. R., Winblad B., Lendahl U., von Heijne G. und Naslund J. (2005). „A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1.“ *J Biol Chem* 280: 35352-35360.
- Lauren J., Gimbel D. A., Nygaard H. B., Gilbert J. W. und Strittmatter S. M. (2009). „Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers.“ *Nature* 457: 1128-1132.
- LaVoie M. J., Fraering P. C., Ostaszewski B. L., Ye W., Kimberly W. T., Wolfe M. S. und Selkoe D. J. (2003). „Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin.“ *J Biol Chem* 278: 37213-37222.
- Lazarov V. K., Fraering P. C., Ye W., Wolfe M. S., Selkoe D. J. und Li H. (2006). „Electron microscopic structure of purified, active gamma-secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6889-6894.
- LeBlanc A. C., Chen H. Y., Autilio-Gambetti L. und Gambetti P. (1991). „Differential APP gene expression in rat cerebral cortex, meninges, and primary astroglial, microglial and neuronal cultures.“ *FEBS Lett* 292: 171-178.
- Lee J. H., Yu W. H., Kumar A., Lee S., Mohan P. S., Peterhoff C. M., Wolfe D. M., Martinez-Vicente M., Massey A. C., Sovak G., Uchiyama Y., Westaway D., Cuervo A. M. und Nixon R. A. (2010). „Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations.“ *Cell* 141: 1146-1158.
-

-
- Lee S. F., Shah S., Li H., Yu C., Han W. und Yu G. (2002). „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: 45013-45019.
- Lee S. F., Shah S., Yu C., Wigley W. C., Li H., Lim M., Pedersen K., Han W., Thomas P., Lundkvist J., Hao Y. H. und Yu G. (2004). „A conserved GXXXG motif in APH-1 is critical for assembly and activity of the gamma-secretase complex.“ *J Biol Chem* 279: 4144-4152.
- Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D. M., Oshima J., Pettingell W. H., Yu C. E., Jondro P. D., Schmidt S. D., Wang K. und et al. (1995). „Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus.“ *Science* 269: 973-977.
- Li H., Wang Z., Wang B., Guo Q., Dolios G., Tabuchi K., Hammer R. E., Sudhof T. C., Wang R. und Zheng H. (2010). „Genetic dissection of the amyloid precursor protein in developmental function and amyloid pathogenesis.“ *J Biol Chem* 285: 30598-30605.
- Li Y. M., Lai M. T., Xu M., Huang Q., DiMuzio-Mower J., Sardana M. K., Shi X. P., Yin K. C., Shafer J. A. und Gardell S. J. (2000). „Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6138-6143.
- Lichtenthaler S. F., Behr D., Grimm H. S., Wang R., Shearman M. S., Masters C. L. und Beyreuther K. (2002). „The intramembrane cleavage site of the amyloid precursor protein depends on the length of its transmembrane domain.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1365-1370.
- Lichtenthaler S. F., Multhaup G., Masters C. L. und Beyreuther K. (1999). „A novel substrate for analyzing Alzheimer's disease gamma-secretase.“ *FEBS Lett* 453: 288-292.
- Liu Y., Zhang Y. W., Wang X., Zhang H., You X., Liao F. F. und Xu H. (2009). „Intracellular trafficking of presenilin 1 is regulated by beta-amyloid precursor protein and phospholipase D1.“ *J Biol Chem* 284: 12145-12152.
- Lleo A., Berezovska O., Herl L., Raju S., Deng A., Bacskai B. J., Frosch M. P., Irizarry M. und Hyman B. T. (2004). „Nonsteroidal anti-inflammatory drugs lower Abeta42 and change presenilin 1 conformation.“ *Nat Med* 10: 1065-1066.
- Lleo A. und Saura C. A. (2011). „gamma-Secretase Substrates and their Implications for Drug Development in Alzheimer's Disease.“ *Curr Top Med Chem*.
- Lu T., Pan Y., Kao S. Y., Li C., Kohane I., Chan J. und Yankner B. A. (2004). „Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain.“ *Nature* 429: 883-891.
- Marambaud P., Shioi J., Serban G., Georgakopoulos A., Sarner S., Nagy V., Baki L., Wen P., Efthimiopoulos S., Shao Z., Wisniewski T. und Robakis N. K. (2002). „A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions.“ *Embo J* 21: 1948-1956.
- Masters C. L., Simms G., Weinman N. A., Multhaup G., McDonald B. L. und Beyreuther K. (1985). „Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4245-4249.
- 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.
-

-
- Mc Donald J. M., Savva G. M., Brayne C., Welzel A. T., Forster G., Shankar G. M., Selkoe D. J., Ince P. G. und Walsh D. M. (2010). „The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia.“ *Brain* 133: 1328-1341.
- McGeer P. L., Itagaki S., Tago H. und McGeer E. G. (1988). „Occurrence of HLA-DR reactive microglia in Alzheimer’s disease.“ *Ann N Y Acad Sci* 540: 319-323.
- McGeer P. L., Schulzer M. und McGeer E. G. (1996). „Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer’s disease: a review of 17 epidemiologic studies.“ *Neurology* 47: 425-432.
- McLaurin J. und Chakrabartty A. (1996). „Membrane disruption by Alzheimer beta-amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides. Implications for neurotoxicity.“ *J Biol Chem* 271: 26482-26489.
- Mehrabian S., Traykov L. T., Jordanova A., Rademakers R., Cruts M., Raycheva M. R., Van den Broeck M., Kremensky I. und Van Broeckhoven C. (2006). „Novel PSEN1 gene mutation in a large Bulgarian pedigree with Alzheimer’s disease and atypical phenotype.“ *European Journal of Neurology* 13: 41.
- Michikawa M., Gong J. S., Fan Q. W., Sawamura N. und Yanagisawa K. (2001). „A novel action of alzheimer’s amyloid beta-protein (Abeta): oligomeric Abeta promotes lipid release.“ *J Neurosci* 21: 7226-7235.
- Miller B. C., Eckman E. A., Sambamurti K., Dobbs N., Chow K. M., Eckman C. B., Hersh L. B. und Thiele D. L. (2003). „Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulysin activity levels *in vivo*.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6221-6226.
- Miyashita N., Straub J. E., Thirumalai D. und Sugita Y. (2009). „Transmembrane structures of amyloid precursor protein dimer predicted by replica-exchange molecular dynamics simulations.“ *J Am Chem Soc* 131: 3438-3439.
- Morais V. A., Crystal A. S., Pijak D. S., Carlin D., Costa J., Lee V. M. und Doms R. W. (2003). „The transmembrane domain region of nicastrin mediates direct interactions with A β 1 and the gamma-secretase complex.“ *J Biol Chem* 278: 43284-43291.
- Multhaup G. (1994). „Identification and regulation of the high affinity binding site of the Alzheimer’s disease amyloid protein precursor (APP) to glycosaminoglycans.“ *Biochimie* 76: 304-311.
- Munter L. M., Botev A., Richter L., Hildebrand P. W., Althoff V., Weise C., Kaden D. und Multhaup G. (2010). „Aberrant amyloid precursor protein (APP) processing in hereditary forms of Alzheimer disease caused by APP familial Alzheimer disease mutations can be rescued by mutations in the APP GxxxG motif.“ *J Biol Chem* 285: 21636-21643.
- Munter L. M., Voigt P., Harmeier A., Kaden D., Gottschalk K. E., Weise C., Pipkorn R., Schaefer M., Langosch D. und Multhaup G. (2007). „GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of A β 42.“ *Embo J* 26: 1702-1712.
- Murphy M. P., Uljon S. N., Golde T. E. und Wang R. (2002). „FAD-linked mutations in pre-senilin 1 alter the length of Abeta peptides derived from betaAPP transmembrane domain mutants.“ *Biochim Biophys Acta* 1586: 199-209.
-

-
- Nahalkova J., Volkman I., Aoki M., Winblad B., Bogdanovic N., Tjernberg L. O. und Behbahani H. (2010). „CD147, a gamma-secretase associated protein is upregulated in Alzheimer's disease brain and its cellular trafficking is affected by presenilin-2.“ *Neurochem Int* 56: 67-76.
- Naslund J., Schierhorn A., Hellman U., Lannfelt L., Roses A. D., Tjernberg L. O., Silberring J., Gandy S. E., Winblad B., Greengard P. und et al. (1994). „Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8378-8382.
- Ni C. Y., Murphy M. P., Golde T. E. und Carpenter G. (2001). „gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase.“ *Science* 294: 2179-2181.
- Niimura M., Isoo N., Takasugi N., Tsuruoka M., Ui-Tei K., Saigo K., Morohashi Y., Tomita T. und Iwatsubo T. (2005). „Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions.“ *J Biol Chem* 280: 12967-12975.
- Oh Y. S. und Turner R. J. (2005). „Topology of the C-terminal fragment of human presenilin 1.“ *Biochemistry* 44: 11821-11828.
- Ohki Y., Yokoshima S., Higo T., Shimada N., Koizumi H., Osawa S., Fukuyama T., Tomita T. und Iwatsubo T. (2011). „Presenilin 1 is a molecular target of phenylpiperidine-type gamma-secretase modulators.“ *International conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Barcelona*
- Okochi M., Steiner H., Fukumori A., Tanii H., Tomita T., Tanaka T., Iwatsubo T., Kudo T., Takeda M. und Haass C. (2002). „Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1.“ *Embo J* 21: 5408-5416.
- Osawa S., Funamoto S., Nobuhara M., Wada-Kakuda S., Shimojo M., Yagishita S. und Ihara Y. (2008). „Phosphoinositides suppress gamma-secretase in both the detergent-soluble and -insoluble states.“ *J Biol Chem* 283: 19283-19292.
- Osenkowski P., Ye W., Wang R., Wolfe M. S. und Selkoe D. J. (2008). „Direct and potent regulation of gamma-secretase by its lipid microenvironment.“ *J Biol Chem* 283: 22529-22540.
- Page R. M., Baumann K., Tomioka M., Perez-Revuelta B. I., Fukumori A., Jacobsen H., Flohr A., Luebbbers T., Ozmen L., Steiner H. und Haass C. (2008). „Generation of Abeta38 and Abeta42 is independently and differentially affected by familial Alzheimer disease-associated presenilin mutations and gamma-secretase modulation.“ *J Biol Chem* 283: 677-683.
- Page R. M., Gutsmedl A., Fukumori A., Winkler E., Haass C. und Steiner H. (2010). „Beta-amyloid precursor protein mutants respond to gamma-secretase modulators.“ *J Biol Chem* 285: 17798-17810.
- Paliga K., Peraus G., Kreger S., Durrwang U., Hesse L., Multhaup G., Masters C. L., Beyreuther K. und Weidemann A. (1997). „Human amyloid precursor-like protein 1-cDNA cloning, ectopic expression in COS-7 cells and identification of soluble forms in the cerebrospinal fluid.“ *Eur J Biochem* 250: 354-363.
-

-
- Pardossi-Piquard R., Bohm C., Chen F., Kanemoto S., Checler F., Schmitt-Ulms G., St George-Hyslop P. und Fraser P. E. (2009). „TMP21 transmembrane domain regulates gamma-secretase cleavage.“ *J Biol Chem* 284: 28634-28641.
- Perez-Revuelta B. I., Fukumori A., Lammich S., Yamasaki A., Haass C. und Steiner H. (2010). „Requirement for small side chain residues within the GxGD-motif of presenilin for gamma-secretase substrate cleavage.“ *J Neurochem* 112: 940-950.
- Perez R. G., Soriano S., Hayes J. D., Ostaszewski B., Xia W., Selkoe D. J., Chen X., Stokin G. B. und Koo E. H. (1999). „Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42.“ *J Biol Chem* 274: 18851-18856.
- Placanica L., Chien J. W. und Li Y. M. (2010). „Characterization of an atypical gamma-secretase complex from hematopoietic origin.“ *Biochemistry* 49: 2796-2804.
- Podlisny M. B., Citron M., Amarante P., Sherrington R., Xia W., Zhang J., Diehl T., Levesque G., Fraser P., Haass C., Koo E. H., Seubert P., St George-Hyslop P., Teplow D. B. und Selkoe D. J. (1997). „Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue.“ *Neurobiol Dis* 3: 325-337.
- Portelius E., Bogdanovic N., Gustavsson M. K., Volkman I., Brinkmalm G., Zetterberg H., Winblad B. und Blennow K. (2010). „Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease.“ *Acta Neuropathol* 120: 185-193.
- Portelius E., Price E., Brinkmalm G., Stiteler M., Olsson M., Persson R., Westman-Brinkmalm A., Zetterberg H., Simon A. J. und Blennow K. (2009). „A novel pathway for amyloid precursor protein processing.“ *Neurobiol Aging*.
- Prokop S., Haass C. und Steiner H. (2005). „Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain determines its function in the stabilization of presenilin fragments.“ *J Neurochem* 94: 57-62.
- Prokop S., Shirotani K., Edbauer D., Haass C. und Steiner H. (2004). „Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex.“ *J Biol Chem* 279: 23255-23261.
- Qi-Takahara Y., Morishima-Kawashima M., Tanimura Y., Dolios G., Hirokoshi Y., Horikoshi Y., Kametani F., Maeda M., Saido T. C., Wang R. und Ihara Y. (2005). „Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase.“ *J Neurosci* 25: 436-445.
- Qi Y., Morishima-Kawashima M., Sato T., Mitsumori R. und Ihara Y. (2003). „Distinct mechanisms by mutant presenilin 1 and 2 leading to increased intracellular levels of amyloid beta-protein 42 in Chinese hamster ovary cells.“ *Biochemistry* 42: 1042-1052.
- Rajendran L., Honsho M., Zahn T. R., Keller P., Geiger K. D., Verkade P. und Simons K. (2006). „Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11172-11177.
-

-
- Rebeck G. W., Hoe H. S. und Moussa C. E. (2010). „Beta-amyloid1-42 gene transfer model exhibits intraneuronal amyloid, gliosis, tau phosphorylation, and neuronal loss.“ *J Biol Chem* 285: 7440-7446.
- Ren Z., Schenk D., Basi G. S. und Shapiro I. P. (2007). „Amyloid beta-protein precursor juxtamembrane domain regulates specificity of gamma-secretase-dependent cleavages.“ *J Biol Chem* 282: 35350-35360.
- Renzi F., Zhang X., Rice W. J., Torres-Arancivia C., Gomez-Llorente Y., Diaz R., Ahn K., Li Y., Sisodia S. S. und Ubarretxena-Belandia I. (2011). „Structure of {gamma}-secretase and its trimeric pre-activation intermediate by single-particle electron microscopy.“ *J Biol Chem*.
- Resenberger U. K., Harmeier A., Woerner A. C., Goodman J. L., Muller V., Krishnan R., Vavulas R. M., Kretzschmar H. A., Lindquist S., Hartl F. U., Multhaup G., Winklhofer K. F. und Tatzelt J. (2011). „The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of beta-sheet-rich conformers independent of prion replication.“ *Embo J*.
- Richter L., Munter L. M., Ness J., Hildebrand P. W., Dasari M., Unterreitmeier S., Bulic B., Beyermann M., Gust R., Reif B., Weggen S., Langosch D. und Multhaup G. (2010). „Amyloid beta 42 peptide (Abeta42)-lowering compounds directly bind to Abeta and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14597-14602.
- Rivkin A., Ahearn S. P., Chichetti S. M., Hamblett C. L., Garcia Y., Martinez M., Hubbs J. L., Reutershan M. H., Daniels M. H., Siliphaivanh P., Otte K. M., Li C., Rosenau A., Surdi L. M., Jung J., Hughes B. L., Crispino J. L., Nikov G. N., Middleton R. E., Moxham C. M., Szewczak A. A., Shah S., Moy L. Y., Kenific C. M., Tanga F., Cruz J. C., Andrade P., Angagaw M. H., Shomer N. H., Miller T., Munoz B. und Shearman M. S. (2010a). „Purine derivatives as potent gamma-secretase modulators.“ *Bioorg Med Chem Lett* 20: 2279-2282.
- Rivkin A., Ahearn S. P., Chichetti S. M., Kim Y. R., Li C., Rosenau A., Kattar S. D., Jung J., Shah S., Hughes B. L., Crispino J. L., Middleton R. E., Szewczak A. A., Munoz B. und Shearman M. S. (2010b). „Piperazinyl pyrimidine derivatives as potent gamma-secretase modulators.“ *Bioorg Med Chem Lett* 20: 1269-1271.
- Rogaeva E., Meng Y., Lee J. H., Gu Y., Kawarai T., Zou F., Katayama T., Baldwin C. T., Cheng R., Hasegawa H., Chen F., Shibata N., Lunetta K. L., Pardossi-Piquard R., Bohm C., Wakutani Y., Cupples L. A., Cuenco K. T., Green R. C., Pinessi L., Rainero I., Sorbi S., Brunni A., Duara R., Friedland R. P., Inzelberg R., Hampe W., Bujo H., Song Y. Q., Andersen O. M., Willnow T. E., Graff-Radford N., Petersen R. C., Dickson D., Der S. D., Fraser P. E., Schmitt-Ulms G., Younkin S., Mayeux R., Farrer L. A. und St George-Hyslop P. (2007). „The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease.“ *Nat Genet* 39: 168-177.
- Roher A. E., Chaney M. O., Kuo Y. M., Webster S. D., Stine W. B., Haverkamp L. J., Woods A. S., Cotter R. J., Tuohy J. M., Krafft G. A., Bonnell B. S. und Emmerling M. R. (1996). „Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease.“ *J Biol Chem* 271: 20631-20635.
-

-
- Roher A. E., Kasunic T. C., Woods A. S., Cotter R. J., Ball M. J. und Fridman R. (1994). „Proteolysis of A beta peptide from Alzheimer disease brain by gelatinase A.“ *Biochem Biophys Res Commun* 205: 1755-1761.
- Rutten B. P., Wirths O., Van de Berg W. D., Lichtenthaler S. F., Vehoff J., Steinbusch H. W., Korr H., Beyreuther K., Multhaup G., Bayer T. A. und Schmitz C. (2003). „No alterations of hippocampal neuronal number and synaptic bouton number in a transgenic mouse model expressing the beta-cleaved C-terminal APP fragment.“ *Neurobiol Dis* 12: 110-120.
- Saavedra L., Mohamed A., Ma V., Kar S. und de Chaves E. P. (2007). „Internalization of beta-amyloid peptide by primary neurons in the absence of apolipoprotein E.“ *J Biol Chem* 282: 35722-35732.
- Saitoh T., Sundsmo M., Roch J. M., Kimura N., Cole G., Schubert D., Oltersdorf T. und Schenk D. B. (1989). „Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts.“ *Cell* 58: 615-622.
- Sambrook J. und Russell, D. (2000). „Molecular cloning: a laboratory manual.“ New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, dritte Auflage.
- Sandberg A., Luheshi L. M., Sollvander S., Pereira de Barros T., Macao B., Knowles T. P., Biverstal H., Lendel C., Ekholm-Petterson F., Dubnovitsky A., Lannfelt L., Dobson C. M. und Hard T. (2010). „Stabilization of neurotoxic Alzheimer amyloid-beta oligomers by protein engineering.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15595-15600.
- Sastre M., Steiner H., Fuchs K., Capell A., Multhaup G., Condron M. M., Teplow D. B. und Haass C. (2001). „Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch.“ *EMBO Rep* 2: 835-841.
- Sato C., Morohashi Y., Tomita T. und Iwatsubo T. (2006). „Structure of the catalytic pore of gamma-secretase probed by the accessibility of substituted cysteines.“ *J Neurosci* 26: 12081-12088.
- Sato C., Takagi S., Tomita T. und Iwatsubo T. (2008). „The C-terminal PAL motif and transmembrane domain 9 of presenilin 1 are involved in the formation of the catalytic pore of the gamma-secretase.“ *J Neurosci* 28: 6264-6271.
- Sato T., Diehl T. S., Narayanan S., Funamoto S., Ihara Y., De Strooper B., Steiner H., Haass C. und Wolfe M. S. (2007). „Active gamma-secretase complexes contain only one of each component.“ *J Biol Chem* 282: 33985-33993.
- Sato T., Dohmae N., Qi Y., Kakuda N., Misonou H., Mitsumori R., Maruyama H., Koo E. H., Haass C., Takio K., Morishima-Kawashima M., Ishiura S. und Ihara Y. (2003). „Potential link between amyloid beta-protein 42 and C-terminal fragment gamma 49-99 of beta-amyloid precursor protein.“ *J Biol Chem* 278: 24294-24301.
- Sato T., Tang T. C., Reubins G., Fei J. Z., Fujimoto T., Kienlen-Campard P., Constantinescu S. N., Octave J. N., Aimoto S. und Smith S. O. (2009). „A helix-to-coil transition at the epsilon-cut site in the transmembrane dimer of the amyloid precursor protein is required for proteolysis.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1421-1426.
-

-
- Saura C. A., Choi S. Y., Beglopoulos V., Malkani S., Zhang D., Shankaranarayana Rao B. S., Chattarji S., Kelleher R. J., 3rd, Kandel E. R., Duff K., Kirkwood A. und Shen J. (2004). „Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration.“ *Neuron* 42: 23-36.
- Schagger H. und von Jagow G. (1987). „Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.“ *Anal Biochem* 166: 368-379.
- Scheuermann S., Hamsch B., Hesse L., Stumm J., Schmidt C., Beher D., Bayer T. A., Beyreuther K. und Multhaup G. (2001). „Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease.“ *J Biol Chem* 276: 33923-33929.
- Schmechel A., Strauss M., Schlicksupp A., Pipkorn R., Haass C., Bayer T. A. und Multhaup G. (2004). „Human BACE forms dimers and colocalizes with APP.“ *J Biol Chem* 279: 39710-39717.
- Schmechel A., Zentgraf H., Scheuermann S., Fritz G., Pipkorn R., Reed J., Beyreuther K., Bayer T. A. und Multhaup G. (2003). „Alzheimer beta-amyloid homodimers facilitate A beta fibrillization and the generation of conformational antibodies.“ *J Biol Chem* 278: 35317-35324.
- Schroeter E. H., Ilagan M. X., Brunkan A. L., Hecimovic S., Li Y. M., Xu M., Lewis H. D., Saxena M. T., De Strooper B., Coonrod A., Tomita T., Iwatsubo T., Moore C. L., Goate A., Wolfe M. S., Shearman M. und Kopan R. (2003). „A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13075-13080.
- Selkoe D. und Kopan R. (2003). „Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration.“ *Annu Rev Neurosci* 26: 565-597.
- Selkoe D. J. (2004). „Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies.“ *Ann Intern Med* 140: 627-638.
- Senes A., Engel D. E. und DeGrado W. F. (2004). „Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs.“ *Curr Opin Struct Biol* 14: 465-479.
- Serneels L., Dejaegere T., Craessaerts K., Horre K., Jorissen E., Tousseyn T., Hebert S., Coolen M., Martens G., Zwijsen A., Annaert W., Hartmann D. und De Strooper B. (2005). „Differential contribution of the three Aph1 genes to gamma-secretase activity *in vivo*.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1719-1724.
- Serneels L., Van Biervliet J., Craessaerts K., Dejaegere T., Horre K., Van Houtvin T., Esselmann H., Paul S., Schafer M. K., Berezovska O., Hyman B. T., Sprangers B., Sciot R., Moons L., Jucker M., Yang Z., May P. C., Karran E., Wiltfang J., D'Hooge R. und De Strooper B. (2009). „gamma-Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease.“ *Science* 324: 639-642.
- Shah S., Lee S. F., Tabuchi K., Hao Y. H., Yu C., LaPlant Q., Ball H., Dann C. E., 3rd, Sudhof T. und Yu G. (2005). „Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor.“ *Cell* 122: 435-447.
-

-
- Shankar G. M., Li S., Mehta T. H., Garcia-Munoz A., Shepardson N. E., Smith I., Brett F. M., Farrell M. A., Rowan M. J., Lemere C. A., Regan C. M., Walsh D. M., Sabatini B. L. und Selkoe D. J. (2008). „Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer’s brains impair synaptic plasticity and memory.“ *Nat Med* 14: 837-842.
- Shen J., Bronson R. T., Chen D. F., Xia W., Selkoe D. J. und Tonegawa S. (1997). „Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice.“ *Cell* 89: 629-639.
- Sherrington R., Rogaev E. I., Liang Y., Rogaeva E. A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K., Tsuda T., Mar L., Foncin J. F., Bruni A. C., Montesi M. P., Sorbi S., Rainero I., Pinessi L., Nee L., Chumakov I., Pollen D., Brookes A., Sanseau P., Polinsky R. J., Wasco W., Da Silva H. A., Haines J. L., Pericak-Vance M. A., Tanzi R. E., Roses A. D., Fraser P. E., Rommens J. M. und St George-Hyslop P. H. (1995). „Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer’s disease.“ *Nature* 375: 754-760.
- Shimojo M., Sahara N., Mizoroki T., Funamoto S., Morishima-Kawashima M., Kudo T., Takeda M., Ihara Y., Ichinose H. und Takashima A. (2008). „Enzymatic characteristics of I213T mutant presenilin-1/gamma-secretase in cell models and knock-in mouse brains: familial Alzheimer disease-linked mutation impairs gamma-site cleavage of amyloid precursor protein C-terminal fragment beta.“ *J Biol Chem* 283: 16488-16496.
- Shimojo M., Sahara N., Murayama M., Ichinose H. und Takashima A. (2007). „Decreased A β secretion by cells expressing familial Alzheimer’s disease-linked mutant presenilin 1.“ *Neurosci Res* 57: 446-453.
- Shioi J., Georgakopoulos A., Mehta P., Kouchi Z., Litterst C. M., Baki L. und Robakis N. K. (2007). „FAD mutants unable to increase neurotoxic A β 42 suggest that mutation effects on neurodegeneration may be independent of effects on A β .“ *J Neurochem* 101: 674-681.
- Shirovani K., Edbauer D., Kostka M., Steiner H. und Haass C. (2004a). „Immature nicastrin stabilizes APH-1 independent of PEN-2 and presenilin: identification of nicastrin mutants that selectively interact with APH-1.“ *J Neurochem* 89: 1520-1527.
- Shirovani K., Edbauer D., Prokop S., Haass C. und Steiner H. (2004b). „Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APH-1 variants.“ *J Biol Chem* 279: 41340-41345.
- Shirovani K., Tomioka M., Kremmer E., Haass C. und Steiner H. (2007). „Pathological activity of familial Alzheimer’s disease-associated mutant presenilin can be executed by six different gamma-secretase complexes.“ *Neurobiol Dis* 27: 102-107.
- Sisodia S. S. (1992). „Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6075-6079.
- Small S. A. und Gandy S. (2006). „Sorting through the cell biology of Alzheimer’s disease: intracellular pathways to pathogenesis.“ *Neuron* 52: 15-31.
- Smith P., Al Hashimi A., Girard J., Delay C. und Hebert S. S. (2011). „*In vivo* regulation of amyloid precursor protein neuronal splicing by microRNAs.“ *J Neurochem* 116: 240-247.
- Sobhanifar S., Schneider B., Lohr F., Gottstein D., Ikeya T., Mlynarczyk K., Pulawski W., Ghoshdastider U., Kolinski M., Filipek S., Guntert P., Bernhard F. und Dotsch V. (2010). „Structural investigation of the C-terminal catalytic fragment of presenilin 1.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 9644-9649.
-

-
- Sorensen E. B. und Conner S. D. (2010). „gamma-secretase-dependent cleavage initiates notch signaling from the plasma membrane.“ *Traffic* 11: 1234-1245.
- Soto C., Castano E. M., Frangione B. und Inestrosa N. C. (1995). „The alpha-helical to beta-strand transition in the amino-terminal fragment of the amyloid beta-peptide modulates amyloid formation.“ *J Biol Chem* 270: 3063-3067.
- Sothibundhu A., Sykes A. M., Fox B., Underwood C. K., Thangnipon W. und Coulson E. J. (2008). „Beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor.“ *J Neurosci* 28: 3941-3946.
- Spasic D., Tolia A., Dillen K., Baert V., De Strooper B., Vrijens S. und Annaert W. (2006). „Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway.“ *J Biol Chem* 281: 26569-26577.
- Sprecher C. A., Grant F. J., Grimm G., O'Hara P. J., Norris F., Norris K. und Foster D. C. (1993). „Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family.“ *Biochemistry* 32: 4481-4486.
- St George-Hyslop P., McLachlan D. C., Tsuda T., Rogaev E., Karlinsky H., Lippa C. F. und Pollen D. (1994). „Alzheimer's disease and possible gene interaction.“ *Science* 263: 537.
- Stanton M. G., Hubbs J., Sloman D., Hamblett C., Andrade P., Angagaw M., Bi G., Black R. M., Crispino J., Cruz J. C., Fan E., Farris G., Hughes B. L., Kenific C. M., Middleton R. E., Nikov G., Sajonz P., Shah S., Shomer N., Szewczak A. A., Tanga F., Tudge M. T., Shearman M. und Munoz B. (2010). „Fluorinated piperidine acetic acids as gamma-secretase modulators.“ *Bioorg Med Chem Lett* 20: 755-758.
- Steiner H., Kostka M., Romig H., Basset G., Pesold B., Hardy J., Capell A., Meyn L., Grim M. L., Baumeister R., Fechteler K. und Haass C. (2000). „Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases.“ *Nat Cell Biol* 2: 848-851.
- Steiner H., Romig H., Pesold B., Philipp U., Baader M., Citron M., Loetscher H., Jacobsen H. und Haass C. (1999). „Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis.“ *Biochemistry* 38: 14600-14605.
- Steiner H., Winkler E., Edbauer D., Prokop S., Basset G., Yamasaki A., Kostka M. und Haass C. (2002). „PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin.“ *J Biol Chem* 277: 39062-39065.
- Stephan A., Laroche S. und Davis S. (2001). „Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits.“ *J Neurosci* 21: 5703-5714.
- Struhl G. und Adachi A. (2000). „Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins.“ *Mol Cell* 6: 625-636.
- Struhl G. und Greenwald I. (1999). „Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in Drosophila.“ *Nature* 398: 522-525.
- Stutzmann G. E., Caccamo A., LaFerla F. M. und Parker I. (2004). „Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated Ca²⁺ signals and altered membrane excitability.“ *J Neurosci* 24: 508-513.
-

-
- Suzuki N., Cheung T. T., Cai X. D., Odaka A., Otvos L., Jr., Eckman C., Golde T. E. und Younkin S. G. (1994). „An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants.“ *Science* 264: 1336-1340.
- Takami M., Nagashima Y., Sano Y., Ishihara S., Morishima-Kawashima M., Funamoto S. und Ihara Y. (2009). „gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment.“ *J Neurosci* 29: 13042-13052.
- Takashima A., Murayama M., Murayama O., Kohno T., Honda T., Yasutake K., Nihonmatsu N., Mercken M., Yamaguchi H., Sugihara S. und Wolozin B. (1998). „Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9637-9641.
- Takasugi N., Tomita T., Hayashi I., Tsuruoka M., Niimura M., Takahashi Y., Thinakaran G. und Iwatsubo T. (2003). „The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex.“ *Nature* 422: 438-441.
- Tanaka S., Nakamura S., Ueda K., Kameyama M., Shiojiri S., Takahashi Y., Kitaguchi N. und Ito H. (1988). „Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease.“ *Biochem Biophys Res Commun* 157: 472-479.
- Tang K., Wang C., Shen C., Sheng S., Ravid R. und Jing N. (2003). „Identification of a novel alternative splicing isoform of human amyloid precursor protein gene, APP639.“ *Eur J Neurosci* 18: 102-108.
- Tanzi R. E., Gusella J. F., Watkins P. C., Bruns G. A., St George-Hyslop P., Van Keuren M. L., Patterson D., Pagan S., Kurnit D. M. und Neve R. L. (1987). „Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus.“ *Science* 235: 880-884.
- Taylor M., Moore S., Mayes J., Parkin E., Beeg M., Canovi M., Gobbi M., Mann D. M. und Allsop D. (2010). „Development of a proteolytically stable retro-inverso peptide inhibitor of beta-amyloid oligomerization as a potential novel treatment for Alzheimer's disease.“ *Biochemistry* 49: 3261-3272.
- Thinakaran G., Borchelt D. R., Lee M. K., Slunt H. H., Spitzer L., Kim G., Ratovitsky T., Davenport F., Nordstedt C., Seeger M., Hardy J., Levey A. I., Gandy S. E., Jenkins N. A., Copeland N. G., Price D. L. und Sisodia S. S. (1996). „Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives *in vivo*.“ *Neuron* 17: 181-190.
- Thinakaran G., Harris C. L., Ratovitski T., Davenport F., Slunt H. H., Price D. L., Borchelt D. R. und Sisodia S. S. (1997). „Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors.“ *J Biol Chem* 272: 28415-28422.
- Tian G., Ghanekar S. V., Aharony D., Shenvi A. B., Jacobs R. T., Liu X. und Greenberg B. D. (2003). „The mechanism of gamma-secretase: multiple inhibitor binding sites for transition state analogs and small molecule inhibitors.“ *J Biol Chem* 278: 28968-28975.
-

-
- Tian Y., Bassit B., Chau D. und Li Y. M. (2010). „An APP inhibitory domain containing the Flemish mutation residue modulates gamma-secretase activity for Abeta production.“ *Nat Struct Mol Biol* 17: 151-158.
- Tjernberg L. O., Naslund J., Thyberg J., Gandy S. E., Terenius L. und Nordstedt C. (1997). „Generation of Alzheimer amyloid beta peptide through nonspecific proteolysis.“ *J Biol Chem* 272: 1870-1875.
- Tolia A., Chavez-Gutierrez L. und De Strooper B. (2006). „Contribution of presenilin transmembrane domains 6 and 7 to a water-containing cavity in the gamma-secretase complex.“ *J Biol Chem* 281: 27633-27642.
- Tomita T., Ohki Y., Yokoshima S., Higo T., Shimada N., Koizumi H., Osawa S., Fukuyama T. und Iwatsubo T. (2011). „g-secretase modulator GSM-1 directly targets the N-terminal fragment of presenilin 1.“ International conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Barcelona
- Tomiya T., Nagata T., Shimada H., Teraoka R., Fukushima A., Kanemitsu H., Takuma H., Kuwano R., Imagawa M., Ataka S., Wada Y., Yoshioka E., Nishizaki T., Watanabe Y. und Mori H. (2008). „A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia.“ *Ann Neurol* 63: 377-387.
- Tu H., Nelson O., Bezprozvanny A., Wang Z., Lee S. F., Hao Y. H., Serneels L., De Strooper B., Yu G. und Bezprozvanny I. (2006). „Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations.“ *Cell* 126: 981-993.
- Uemura K., Farner K. C., Hashimoto T., Nasser-Ghodsi N., Wolfe M. S., Koo E. H., Hyman B. T. und Berezovska O. (2010). „Substrate docking to gamma-secretase allows access of gamma-secretase modulators to an allosteric site.“ *Nat Commun* 1: 130.
- Uemura K., Farner K. C., Nasser-Ghodsi N., Jones P. und Berezovska O. (2011). „Reciprocal relationship between APP positioning relative to the membrane and PS1 conformation.“ *Mol Neurodegener* 6: 15.
- Uemura K., Kitagawa N., Kohno R., Kuzuya A., Kageyama T., Shibasaki H. und Shimohama S. (2003). „Presenilin 1 mediates retinoic acid-induced differentiation of SH-SY5Y cells through facilitation of Wnt signaling.“ *J Neurosci Res* 73: 166-175.
- Uemura K., Lill C. M., Li X., Peters J. A., Ivanov A., Fan Z., DeStrooper B., Bacskai B. J., Hyman B. T. und Berezovska O. (2009). „Allosteric modulation of PS1/gamma-secretase conformation correlates with amyloid beta(42/40) ratio.“ *PLoS One* 4: e7893.
- Umeda T., Tomiyama T., Sakama N., Tanaka S., Lambert M. P., Klein W. L. und Mori H. (2011). „Intraneuronal amyloid beta oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction *in vivo*.“ *J Neurosci Res* 89: 1031-1042.
- Van Vickle G. D., Esh C. L., Kokjohn T. A., Patton R. L., Kalback W. M., Luehrs D. C., Beach T. G., Newel A. J., Lopera F., Ghetti B., Vidal R., Castano E. M. und Roher A. E. (2008). „Presenilin-1 280Glu-->Ala mutation alters C-terminal APP processing yielding longer abeta peptides: implications for Alzheimer's disease.“ *Mol Med* 14: 184-194.
-

-
- Vassar R., Bennett B. D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E. A., Denis P., Teplow D. B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jarosinski M. A., Biere A. L., Curran E., Burgess T., Louis J. C., Collins F., Treanor J., Rogers G. und Citron M. (1999). „Beta-secretase cleavage of Alzheimer’s amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE.“ *Science* 286: 735-741.
- Venneti S., Lopresti B. J. und Wiley C. A. (2006). „The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: from pathology to imaging.“ *Prog Neurobiol* 80: 308-322.
- 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: 44945-44954.
- Vetrivel K. S., Zhang X., Meckler X., Cheng H., Lee S., Gong P., Lopes K. O., Chen Y., Iwata N., Yin K. J., Lee J. M., Parent A. T., Saido T. C., Li Y. M., Sisodia S. S. und Thinakaran G. (2008). „Evidence that CD147 modulation of beta-amyloid (A β) levels is mediated by extracellular degradation of secreted A β .“ *J Biol Chem* 283: 19489-19498.
- Vigo-Pelfrey C., Lee D., Keim P., Lieberburg I. und Schenk D. B. (1993). „Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid.“ *J Neurochem* 61: 1965-1968.
- Wahrle S., Das P., Nyborg A. C., McLendon C., Shoji M., Kawarabayashi T., Younkin L. H., Younkin S. G. und Golde T. E. (2002). „Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains.“ *Neurobiol Dis* 9: 11-23.
- Walsh D. M., Klyubin I., Fadeeva J. V., Cullen W. K., Anwyl R., Wolfe M. S., Rowan M. J. und Selkoe D. J. (2002). „Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*.“ *Nature* 416: 535-539.
- Walsh D. M., Tseng B. P., Rydel R. E., Podlisny M. B. und Selkoe D. J. (2000). „The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain.“ *Biochemistry* 39: 10831-10839.
- Wang J., Behr D., Nyborg A. C., Shearman M. S., Golde T. E. und Goate A. (2006). „C-terminal PAL motif of presenilin and presenilin homologues required for normal active site conformation.“ *J Neurochem* 96: 218-227.
- Wang J., Brunkan A. L., Hecimovic S., Walker E. und Goate A. (2004). „Conserved „PAL“ sequence in presenilins is essential for gamma-secretase activity, but not required for formation or stabilization of gamma-secretase complexes.“ *Neurobiol Dis* 15: 654-666.
- Wang P., Yang G., Mosier D. R., Chang P., Zaidi T., Gong Y. D., Zhao N. M., Dominguez B., Lee K. F., Gan W. B. und Zheng H. (2005). „Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2.“ *J Neurosci* 25: 1219-1225.
- Wasco W., Gurubhagavatula S., Paradis M. D., Romano D. M., Sisodia S. S., Hyman B. T., Neve R. L. und Tanzi R. E. (1993). „Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer’s associated amyloid beta protein precursor.“ *Nat Genet* 5: 95-100.
-

-
- Watanabe N., Image I., II, Takagi S., Tominaga A., Image Image I., Tomita T. und Iwatsubo T. (2010). „Functional analysis of the transmembrane domains of presenilin 1: participation of transmembrane domains 2 and 6 in the formation of initial substrate-binding site of gamma-secretase.“ *J Biol Chem* 285: 19738-19746.
- Watanabe N., Tomita T., Sato C., Kitamura T., Morohashi Y. und Iwatsubo T. (2005). „Pen-2 is incorporated into the gamma-secretase complex through binding to transmembrane domain 4 of presenilin 1.“ *J Biol Chem* 280: 41967-41975.
- Weggen S., Eriksen J. L., Das P., Sagi S. A., Wang R., Pietrzik C. U., Findlay K. A., Smith T. E., Murphy M. P., Bulter T., Kang D. E., Marquez-Sterling N., Golde T. E. und Koo E. H. (2001). „A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity.“ *Nature* 414: 212-216.
- Weggen S., Eriksen J. L., Sagi S. A., Pietrzik C. U., Ozols V., Fauq A., Golde T. E. und Koo E. H. (2003). „Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid beta 42 production by direct modulation of gamma-secretase activity.“ *J Biol Chem* 278: 31831-31837.
- 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: 115-126.
- Weihofen A., Binns K., Lemberg M. K., Ashman K. und Martoglio B. (2002). „Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease.“ *Science* 296: 2215-2218.
- Welander H., Franberg J., Graff C., Sundstrom E., Winblad B. und Tjernberg L. O. (2009). „Abeta43 is more frequent than Abeta40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains.“ *J Neurochem* 110: 697-706.
- 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: 9513-9517.
- Weyer S. W., Klevanski M., Delekate A., Voikar V., Aydin D., Hick M., Filippov M., Drost N., Schaller K. L., Saar M., Vogt M. A., Gass P., Samanta A., Jaschke A., Korte M., Wolfer D. P., Caldwell J. H. und Muller U. C. (2011). „APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP.“ *Embo J*.
- Wiltfang J., Esselmann H., Cupers P., Neumann M., Kretzschmar H., Beyermann M., Schleuder D., Jahn H., Ruther E., Kornhuber J., Annaert W., De Strooper B. und Saftig P. (2001). „Elevation of beta-amyloid peptide 2-42 in sporadic and familial Alzheimer's disease and its generation in PS1 knockout cells.“ *J Biol Chem* 276: 42645-42657.
- Wolfe M. S., Xia W., Ostaszewski B. L., Diehl T. S., Kimberly W. T. und Selkoe D. J. (1999). „Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity.“ *Nature* 398: 513-517.
- Xia W., Zhang J., Kholodenko D., Citron M., Podlisny M. B., Teplow D. B., Haass C., Seubert P., Koo E. H. und Selkoe D. J. (1997). „Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins.“ *J Biol Chem* 272: 7977-7982.
-

-
- Yagishita S., Morishima-Kawashima M., Ishiura S. und Ihara Y. (2008). „Abeta46 is processed to Abeta40 and Abeta43, but not to Abeta42, in the low density membrane domains.“ *J Biol Chem* 283: 733-738.
- Yagishita S., Morishima-Kawashima M., Tanimura Y., Ishiura S. und Ihara Y. (2006). „DAPT-induced intracellular accumulations of longer amyloid beta-proteins: further implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase.“ *Biochemistry* 45: 3952-3960.
- Yamasaki A., Eimer S., Okochi M., Smialowska A., Kaether C., Baumeister R., Haass C. und Steiner H. (2006). „The GxGD motif of presenilin contributes to catalytic function and substrate identification of gamma-secretase.“ *J Neurosci* 26: 3821-3828.
- Yan P., Hu X., Song H., Yin K., Bateman R. J., Cirrito J. R., Xiao Q., Hsu F. F., Turk J. W., Xu J., Hsu C. Y., Holtzman D. M. und Lee J. M. (2006). „Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils *in vitro* and compact plaques *in situ*.“ *J Biol Chem* 281: 24566-24574.
- Yanagida K., Okochi M., Tagami S., Nakayama T., Kodama T. S., Nishitomi K., Jiang J., Mori K., Tatsumi S., Arai T., Ikeuchi T., Kasuga K., Tokuda T., Kondo M., Ikeda M., Deguchi K., Kazui H., Tanaka T., Morihara T., Hashimoto R., Kudo T., Steiner H., Haass C., Tsuchiya K., Akiyama H., Kuwano R. und Takeda M. (2009). „The 28-amino acid form of an APLP1-derived Abeta-like peptide is a surrogate marker for Abeta42 production in the central nervous system.“ *EMBO Mol Med* 1: 223-235.
- Yanagisawa K., Odaka A., Suzuki N. und Ihara Y. (1995). „GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A beta): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease.“ *Nat Med* 1: 1062-1066.
- Young-Pearse T. L., Bai J., Chang R., Zheng J. B., LoTurco J. J. und Selkoe D. J. (2007). „A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by *in utero* RNA interference.“ *J Neurosci* 27: 14459-14469.
- Younkin S. G. (1998). „The role of A beta 42 in Alzheimer's disease.“ *J Physiol Paris* 92: 289-292.
- Yu G., Chen F., Levesque G., Nishimura M., Zhang D. M., Levesque L., Rogueva E., Xu D., Liang Y., Duthie M., St George-Hyslop P. H. und Fraser P. E. (1998). „The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains beta-catenin.“ *J Biol Chem* 273: 16470-16475.
- Zhang C., Wu B., Beglopoulos V., Wines-Samuelson M., Zhang D., Dragatsis I., Sudhof T. C. und Shen J. (2009). „Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release.“ *Nature* 460: 632-636.
- Zhang H., Sun S., Herreman A., De Strooper B. und Bezprozvanny I. (2010). „Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis.“ *J Neurosci* 30: 8566-8580.
- 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. und Xu H. (2005). „Nicastrin is critical for stability and trafficking but not association of other presenilin/gamma-secretase components.“ *J Biol Chem* 280: 17020-17026.
- Zhao G., Cui M. Z., Mao G., Dong Y., Tan J., Sun L. und Xu X. (2005). „gamma-cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain.“ *J Biol Chem* 280: 37689-37697.
-

- Zhao G., Liu Z., Ilagan M. X. und Kopan R. (2010). „Gamma-secretase composed of PS1/ Pen2/Aph1a can cleave notch and amyloid precursor protein in the absence of nicastrin.“ *J Neurosci* 30: 1648-1656.
- Zhao G., Mao G., Tan J., Dong Y., Cui M. Z., Kim S. H. und Xu X. (2004). „Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein.“ *J Biol Chem* 279: 50647-50650.
- Zheng H., Jiang M., Trumbauer M. E., Sirinathsinghji D. J., Hopkins R., Smith D. W., Heavens R. P., Dawson G. R., Boyce S., Conner M. W., Stevens K. A., Slunt H. H., Sisoda S. S., Chen H. Y. und Van der Ploeg L. H. (1995). „beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity.“ *Cell* 81: 525-531.
- Zhou S., Zhou H., Walian P. J. und Jap B. K. (2005). „CD147 is a regulatory subunit of the gamma-secretase complex in Alzheimer’s disease amyloid beta-peptide production.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7499-7504.

8. Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid β -Peptid
α -CTF	C83; membranständiges APP-Fragment nach α -Sekretase-Spaltung
AD	Alzheimer-Krankheit („Alzheimer’s Disease“)
ADAM	„a disintegrin and metalloprotease“
AICD	APP intrazelluläre C-terminale Domäne („APP intracellular carboxy-terminal domain“)
Aph-1	„anterior pharynx defective phenotype“ 1
APLP1/ APLP2	Amyloidvorläufer-ähnliches Protein 1/ 2 („amyloid precursor-like protein“ 1/ 2)
APP	Amyloidvorläuferprotein („amyloid precursor protein“)
APP-CTF	carboxyterminales Fragment von APP nach α - oder β -Sekretase-Spaltung
BACE	„ β -site APP-cleaving enzyme“
β -CTF	C99; membranständiges APP-Fragment nach β -Sekretase-Spaltung
°C	Grad Celsius
C100	humanes β -CTF mit einem N-terminalen Methioninrest zur rekombinanten Expression
CD	zirkularer Dichroismus („circular dichroism“)
CTF	carboxyterminales Fragment
cw-ESR	„continuous wave“-Elektronenspinresonanz
DFDNB	1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Desoxycholat
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
eo-FAD	familiäre Alzheimer-Krankheit mit frühem Erkrankungsalter („early onset familial Alzheimer’s Disease“)
ESR	Elektronenspinresonanz
FAD	familiäre Alzheimer-Erkrankung („familial Alzheimer’s Disease“)
FCS	fetales Kälberserum („fetal calf serum“)
GSM	γ -Sekretase-Modulator(en)
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HRP	Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“)
iGSM	inverse(r) γ -Sekretase-Modulator(en)
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton

lo-FAD	familiäre Alzheimer-Krankheit mit spätem Erkrankungsalter („late onset familial Alzheimer’s Disease“)
M	molar (Mol/l)
mA	Milliampere
MALDI-MS	„matrix-assisted laser-desorption ionisation“-Massenspektrometrie
MCE	β-Mercaptoethanol
min	Minute(n)
MTSL	Methanthiosulfonat-Spin-Marker („methanethiosulfonate spin label“)
Nct	Nicastrin
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz („nuclear magnetic resonance“)
NTA	Nitrilotriessigsäure („nitrilotriacetic acid“)
NTF	aminoterminales Fragment
NP-40	„Nonidet P 40 substitute“
NSAID	nicht-steroidales antiinflammatorisches Medikament („non-steroidal anti-inflammatory drug“)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate-buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
Pen-2	„presenilin enhancer“ 2
PS (PS1/ PS2)	Presenilin (Presenilin 1/ 2)
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
sAPP α /sAPP β	lösliche APP-Ektodomäne („soluble APP“) nach α - bzw. β -Sekretase-Schnitt
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SDS-PA-Gel	SDS-Polyacrylamid-Gel
SPA4CT	Protein bestehend aus dem APP-Signalpeptid (SP) und β -CTF (A4CT)
SPR	Oberflächenplasmonresonanz („surface plasmon resonance“)
SV	Säulenvolumen
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-Phosphin
TMS	Transmembransequenz(en)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜS	Überstand
V	Volt
v/v	Volumenprozent („volume/ volume“)
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent („weight/ volume“)

Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
x	alle Aminosäuren außer Prolin	

9. Anhang

9.1. ELISA-Originalmesswerte

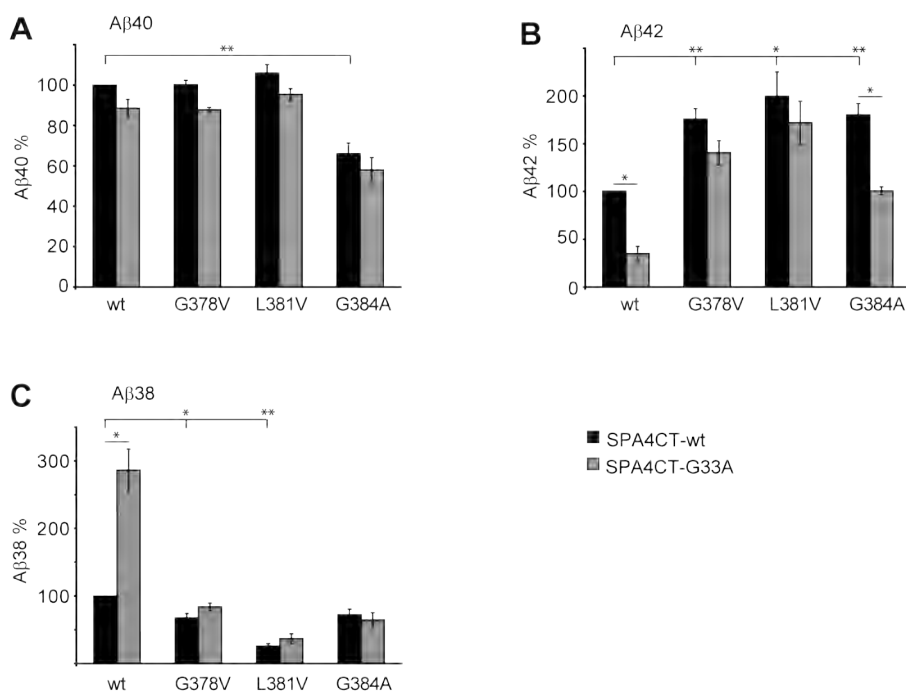


Abb. 9.1: Einfluss der GxxxG-Mutante G33A und der „early onset“-FAD-PS1-Mutanten der TMS7 auf die Aβ-Produktion im Vergleich mit SPA4CT-wt und PS1-wt (Originaldaten zu Abb. 2.14). ELISA-Analyse von Aβ40, Aβ42 und Aβ38 aus Zellkultur-Überständen von SH-SY5Y-Zellen mit stabiler Überexpression von PS1 und SPA4CT-wt (schwarze Balken) versus SPA4CT-G33A (graue Balken). Die bei SPA4CT-wt und PS1-wt detektierte Menge der jeweiligen Aβ-Spezies wurde auf 100% gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen, Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum jeweiligen Referenzwert von 100% an mit * $p < 0,01$, ** $p < 0,0001$ (t-Test nach Student). (A) Aβ40-Sekretion detektiert mit dem Antikörper G2-10, $n = 3-10$. (B) Aβ42-Sekretion detektiert mit dem Antikörper G2-13, $n = 3-8$. (C) Aβ38-Sekretion detektiert mit dem Antikörper BA1-13, $n = 4-9$.

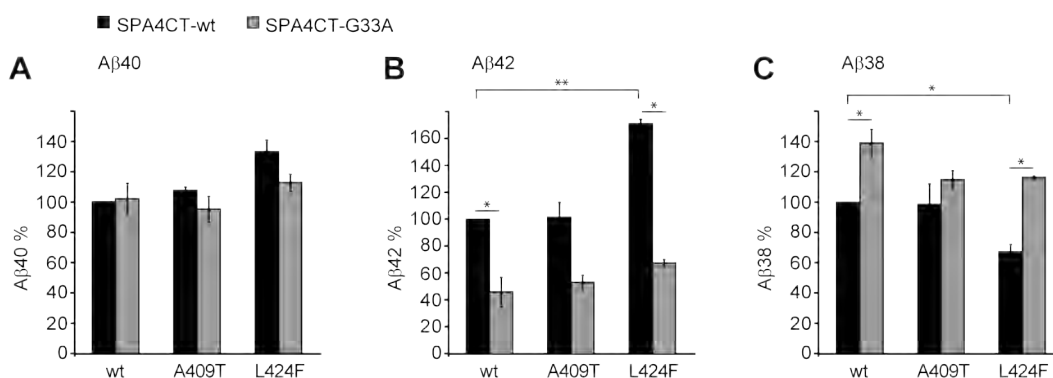


Abb. 9.2: Einfluss der GxxxG-Mutante G33A und der „late onset“-FAD-PS1-Mutanten der TMS8 auf die Aβ-Produktion im Vergleich mit SPA4CT-wt und PS1-wt (Originaldaten zu Abb. 2.16). ELISA-Analyse von Aβ40, Aβ42 und Aβ38 aus Zellkultur-Überständen von SH-SY5Y-Zellen mit stabiler Überexpression von PS1 und transients Überexpression von SPA4CT-wt (schwarze Balken) versus SPA4CT-G33A (graue Balken). Die bei SPA4CT-wt und PS1-wt detektierte Menge der jeweiligen Aβ-Spezies wurde auf 100% gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen, Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum jeweiligen Referenzwert von 100% an mit * $p < 0,01$, ** $p < 0,0001$ (t-Test nach Student). (A) Aβ40-Sekretion detektiert mit dem Antikörper G2-10, $n = 3-5$. (B) Aβ42-Sekretion detektiert mit dem Antikörper G2-13, $n = 3-5$. (C) Aβ38-Sekretion detektiert mit dem Antikörper BA1-13, $n = 3-5$ (C).

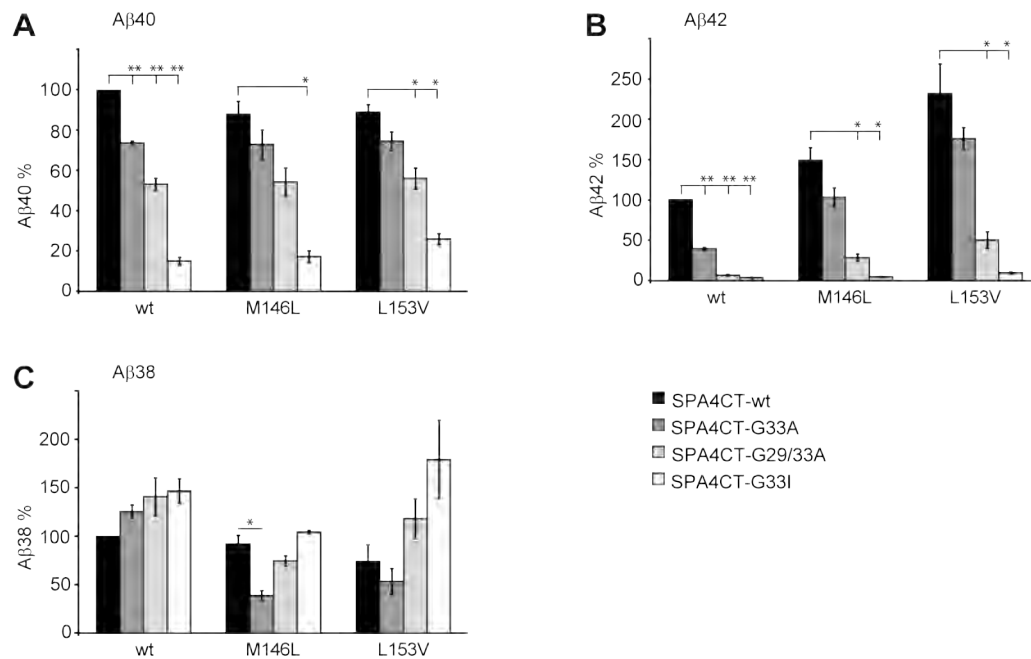


Abb. 9.3: Einfluss der GxxxG-Mutanten G33A, G29/33A und G33I und der „early onset“-FAD-PS1-Mutanten der TMS2 auf die Aβ-Produktion im Vergleich mit SPA4CT-wt und PS1-wt (Originaldaten zu Abb. 2.17).

ELISA-Analyse von Aβ40, Aβ42 und Aβ38 aus Zellkultur-Überständen von SH-SY5Y-Zellen mit stabiler Überexpression von PS1 und transierter Überexpression von SPA4CT-wt (schwarze Balken) oder GxxxG-Mutanten (hellere Balken). Die bei SPA4CT-wt und PS1-wt detektierte Menge der jeweiligen Aβ-Spezies wurde auf 100% gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen, Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum jeweiligen Referenzwert von 100% an mit * $p < 0,01$, ** $p < 0,0001$ (t-Test nach Student). (A) Aβ40-Sekretion detektiert mit dem Antikörper G2-10, $n = 3-6$. (B) Aβ42-Sekretion detektiert mit dem Antikörper G2-13, $n = 3-6$. (C) Aβ38-Sekretion detektiert mit dem Antikörper BA1-13, $n = 3-7$.

9.2. Publikationsliste

Artikel:

Botev A., Munter L. M., Wenzel R., Richter L., Althoff V., Ismer J., Gerling U., Weise C., Kokschi B., Hildebrand P. W., Bittl R. und Multhaup G. (2011).

„The amyloid precursor protein C-terminal fragment C100 occurs in monomeric and dimeric stable conformations and binds gamma-secretase modulators.“

Biochemistry 50: 828-835.

Munter L. M., **Botev A.**, Richter L., Hildebrand P. W., Althoff V., Weise C., Kaden D. und Multhaup G. (2010).

„Aberrant amyloid precursor protein (APP) processing in hereditary forms of Alzheimer disease caused by APP familial Alzheimer disease mutations can be rescued by mutations in the APP GxxxG motif.“

J Biol Chem 285: 21636-21643.

Tagungsbeiträge:

Botev A., Munter L. M., Wenzel R., Richter L., Althoff V., Ismer J., Gerling U., Weise C., Kokschi B., Hildebrand P. W., Bittl R. und Multhaup G. (2011).

„Recombinant forms of the APP C-terminal fragment occur in stable conformations and bind gamma-secretase modulators.“

10th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (AD/PD 2011) in Barcelona, Spanien, 9.-13. März 2011; Poster

Althoff V., **Botev A.**, Richter L., Munter L. M. und Multhaup, G. (2010).

„Purification and characterization of APP C100 wild-type, FAD mutants and engineered cysteine dimers.“

10th Eibsee Meeting on Cellular Mechanisms of Neurodegeneration in Grainau, 27.-30. Okt. 2010; Poster

Botev A., Wenzel R., Munter L. M., Bittl R. und Multhaup G. (2010).

„Purification, spin-labelling and ESR measurement of the APP C-terminal fragment.“

4th NEURAD Meeting in Amsterdam, Niederlande, 15.-16. März 2010; Poster

Botev A., Munter L. M., Althoff V., Weise C. und Multhaup G. (2009).

„Impact of Presenilin-1 mutations on APP processing.“

6th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology in Berlin, 24.-26. Sept. 2009; Poster

Botev A., Munter L. M., Althoff V., Weise C. und Multhaup G. (2009).
„Impact of Presenilin-1 mutations on APP processing.“
3rd NEURAD Summer School in Lille, Frankreich, 18.-21. Sept. 2009; Vortrag

Munter L. M., **Botev A.**, Richter L., Weise C., Langosch D. und Multhaup G. (2009).
„Reassessment of APP familial Alzheimer Disease (FAD) mutations.“
International Conference on Alzheimer’s Disease (ICAD 2011) in Wien, Österreich, 11.-16.
Juli 2009; Vortrag

Botev A., Munter L. M., Weise C., Wenzel R., Bittl R. und Multhaup G. (2008).
„Characterization of enzyme-substrate interaction in the γ -secretase complex“
2nd NEURAD Summer School in Leuven, Belgien, 17.-20. Sept. 2008; Poster

9.' . Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Gerd Multhaupt bedanken - für die wissenschaftliche Unterstützung, die hilfreichen Diskussionen und ganz besonders dafür, dass ich an diesem spannenden Thema forschen durfte.

Prof. Dr. Ferdinand Hucho danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinen Arbeitskollegen (auch den ehemaligen) Nadja Agua, Lydia Alnajjar, Veit Althoff, Christian Barucker, Hermann Bayer, Dr. Tobias Bethge, Karolina Bobowski, Gerhard Buchlow, Paul Dembny, Dr. Vivienne Engelschalt, Susanne Fehse, Boas Felmy, Sarah Hampe, Dr. Anja Harmeier, Dr. Daniela Kaden, Dr. Matthias Kaup, Filip Liebsch, Dr. Kerstin May-Witt, Magnus Mayer, Dr. Lisa Münter, Dr. Henning Otto, Luise Richter, Clara Schäfer, Andrea Senge, Holger Sieg, Dr. Carina Treiber, Dr. Christoph Weise und Thomas Wons danke ich für die freundschaftliche und angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein größter Dank gebührt dabei Lisa Münter, die jederzeit für ein Gespräch zu Verfügung stand - sei es mit guten Tips zu Experimenten, Vorträgen und Veröffentlichungen, sei es mit persönlichem Rat. Ihr und Daniela Kaden danke ich auch ganz besonders für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ein weiteres großes Dankeschön geht an Andrea Senge - für viele Puffer, ausgezählte Zellen und Western Blots. Chris Weise danke ich fürs Vermessen und die Entschlüsselung vieler MALDI-MS-Spektren und Gerd Buchlow für das Bändigen zickiger Geräte. Auch bei meinen Mitabeitsstudent(inn)en Christian Courault, Vincent Dombrowski, Natalie Kaempf, Anke Wagner und Miriam Exner möchte ich mich für ihre Hilfe bedanken.

Besonderer Dank geht an meine Kooperationspartner, die mich in viele spannende Techniken eingeführt haben. Als erstes ist hier Ringo Wenzel zu nennen, der so viele ESR-Messungen durchgeführt hat. Ihm und Prof. Dr. Robert Bittl danke ich für eine sehr spannende und angenehme Zusammenarbeit. Vielen Dank auch an Ulla Gerling aus der AG Kokschi, die mir das CD-Messen beigebracht hat, an Dr. Martha Sommer aus der AG Hofmann (Charité Berlin) für Fluoreszenzmarker und die nette Einführung ins FRET-Messen und an Dr. Jens-Peter Fürste und Jiang Gao für den Einblick ins DLS.

Prof. Dr. Thomas Bayer danke ich für die freundliche Aufnahme ins NEURAD-Graduiertenkolleg. Meinen Mit-Doktoranden des NEURAD-Kollegs sowie des SFB740 vielen Dank für spannende Diskussionen und tolle Feiern.

Abschließend möchte ich meinen Eltern für ihre unermüdliche Unterstützung danken! Außerdem meinen ganz besonderen Dank an Martin und Niko, für die schöne Zeit.

9.(. Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst habe.

Diese Arbeit wurde bisher noch an keiner anderen Universität vorgelegt.

Berlin, 14.06.2011

Anne Botev