

**Untersuchungen zur Entstehung von A $\beta$ -Peptiden  
und deren molekulare Wechselwirkungen  
mit Lipiden der zellulären Plasmamembran**

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  
Veit Althoff  
aus Berlin

März 2013

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup
  2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Wahl
- Disputation am: 10.04.2013



---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1	Morbus Alzheimer.....	7
1.2	Molekulare Grundlagen der Alzheimer-Krankheit.....	8
1.2.1	APP: Charakterisierung und Funktion.....	8
1.2.2	Die Prozessierung von APP.....	10
1.2.3	Das A $\beta$ -Peptid in der Alzheimer-Krankheit.....	12
1.2.4	Der $\gamma$ -Sekretase-Komplex.....	13
1.2.4.1	Molekularer Aufbau und Substrate.....	13
1.2.4.2	Mechanismus der sequenziellen Prozessierung.....	15
1.2.5	Familiäre APP-Mutationen als Auslöser der Alzheimer-Krankheit.....	16
1.3	Lipide und die Alzheimer-Krankheit.....	17
1.3.1	Veränderungen der Lipidhomöostase in der Alzheimer-Krankheit.....	17
1.3.2	Lipide und A $\beta$ -Toxizität.....	18
1.4	Cerebrospinalflüssigkeits-Biomarker in der Alzheimer-Krankheit.....	20
1.4.1	Etablierte Cerebrospinalflüssigkeits-Biomarker in der AD-Diagnostik.....	20
1.4.2	Neue Ansätze zur Erforschung von CSF-Biomarkern.....	21
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	22
<b>2</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
2.1	Analyse der Prozessierung von APPwt und den FAD-Mutanten T714I, V717F und L723P.....	23
2.1.1	Bestimmung der Sekundärstruktur der aufgereinigten C100-Varianten.....	23
2.1.2	Gesamt-A $\beta$ - und -AICD-Produktion durch die Mutanten T714I, V717F und L723P.....	24
2.1.3	Analyse der Produktlinienpräferenz der APP FAD-Mutanten.....	26
2.1.4	Tripeptidanalyse der APP FAD-Mutationen mittels $\gamma$ -Sekretase <i>in vitro</i> -Test.....	29
2.2	Untersuchung der A $\beta$ -Lipid Interaktion.....	33
2.2.1	Liposomenstabilität und Liposomenintegrität.....	33
2.2.2	<i>In vitro</i> -Untersuchung der Bindungseigenschaften von A $\beta$ -Peptiden an neuronale Plasmamembranlipide.....	34
2.2.3	<i>In vitro</i> -Analyse der Bindungseigenschaften unterschiedlicher oligomerer Formen von A $\beta$ -Peptiden mit Sphingomyelin und Phosphatidylcholin.....	42
2.2.4	Bestimmung der Bindungsregion von A $\beta$ 42wt an Sphingomyelin.....	45
2.2.5	Analyse der Permeabilisierung von Lipidmembranen durch A $\beta$ -Peptide.....	46

---

2.3	Bindung von Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) an Lipidoberflächen als potentieller diagnostischer Marker.....	49
<b>3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>56</b>
3.1	Einfluss von APP FAD-Mutationen auf die $\gamma$ -Sekretase-Spaltung.....	56
3.1.1	Einfluss der APP FAD-Mutationen auf den $\epsilon$ -Schnitt.....	56
3.1.2	Einfluss der APP FAD-Mutationen auf die Produktion von Gesamt-A $\beta$ und AICD.....	58
3.2	Bindung von A $\beta$ an Lipide der Plasmamembran.....	59
3.3	Bindung humaner CSF-Proben an Lipide.....	64
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Summary.....</b>	<b>68</b>
4.1	Zusammenfassung.....	68
4.2	Summary.....	70
<b>5</b>	<b>Material.....</b>	<b>72</b>
5.1	Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	72
5.2	Allgemeine Laborchemikalien.....	72
5.3	Enzyme, Standards und „Kits“.....	72
5.4	Pufferlösungen.....	72
5.5	Bakterienstämme.....	72
5.6	Plasmid-Vektoren.....	73
5.7	Zelllinien und Nährmedien.....	73
5.8	Antikörper.....	73
5.9	Lipide.....	74
5.10	Geräte.....	74
5.11	Software.....	75
<b>6</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>76</b>
6.1	Molekularbiologische Methoden.....	76
6.1.1	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	76
6.1.2	DNA-Präparation.....	76
6.1.3	Spektrophotometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen.....	77
6.1.4	DNA-Sequenzierung.....	77
6.2	Zellbiologische Methoden.....	77
6.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	77
6.2.2	Herstellung stabiler eukaryotischer Zelllinien.....	78
6.3	Proteinbiochemische Methoden.....	78

---

6.3.1	Peptidsynthese und Lösen von A $\beta$ -Peptiden.....	78
6.3.2	Proteinaufreinigung aus bakteriellen Einschlusskörpern („inclusion bodies“)	78
6.3.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	79
6.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	80
6.3.5	Western Blot Analyse.....	80
6.3.6	Immunpräzipitation von Proteinen.....	81
6.3.7	<i>In vitro</i> $\gamma$ -Sekretase-Test.....	82
6.4	Bioanalytische Methoden.....	82
6.4.1	Zirkulardichroismus Spektroskopie (CD-Spektroskopie).....	82
6.4.2	Oberflächenplasmonresonanz Spektroskopie.....	83
6.4.3	Größenausschlusschromatographie.....	84
6.4.4	Calcein-Freisetzungs-Analyse.....	85
6.4.5	MALDI-Massenspektrometrie.....	86
6.4.6	LC-ESI-Massenspektrometrie.....	87
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>111</b>
9.1	Publikationen.....	111
9.2	Lebenslauf.....	114
9.3	Danksagung.....	115
9.4	Erklärung.....	116

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Morbus Alzheimer

Die Alzheimer-Krankheit („Alzheimer’s disease“, AD) gehört zu den neurodegenerativen Erkrankungen und ist die häufigste Ursache für altersbedingte Demenz. Weltweit sind ca. 15-24 Millionen Menschen (World Alzheimer Report 2012; Uzun et al., 2011) von der Krankheit betroffen. Allein in Deutschland gibt es mehr als 935.000 Erkrankte im Alter über 65 Jahren (Deutsche Alzheimer Gesellschaft, 2010). Infolge der demographischen Entwicklung und dem Fehlen einer effektiven Früherkennung sowie einer kausalen Therapie wird mit einem kontinuierlichen Anstieg dieser Erkrankung in den nächsten Jahrzehnten gerechnet. Mittlerweile wird die Anzahl der Neuerkrankungen bis zum Jahr 2030 weltweit auf ca. 66 Millionen Betroffene geschätzt und 2050 auf mehr als 115 Millionen (World Alzheimer Report 2012).

Die Erkrankung zeichnet sich durch ein fortschreitendes, irreversibles Absterben von Nervenzellen und Synapsen im Gehirn aus. Besonders in den Hirnarealen des zerebralen Cortex und des limbischen Systems führt der Zellverlust symptomatisch zu einer sukzessiven Abnahme der Gedächtnis- und Orientierungsleistung sowie zu Beeinträchtigungen des Denk- und Urteilsvermögens. Die stetige Verschlechterung der kognitiven Leistung bis hin zum Wahrnehmungsverlust führt zu Apathie und teilweise zum gänzlichen Verlust der Kontrolle über die eigenen Körperfunktionen (Galimberti et al., 2012; Casey, 2012). In späten Stadien kann es zur nahezu vollständigen Einbuße der kommunikativen und motorischen Fähigkeiten kommen.

Erstmals wurde die Krankheit im Jahr 1906 durch den Würzburger Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer wissenschaftlich beschrieben (Alzheimer, 1907). Er konnte zwei wesentliche neuropathologische Veränderungen in histologischen Gehirnschnitten seiner verstorbenen Patientin Auguste Deter feststellen. Er fand intrazelluläre neurofibrilläre Bündel („neurofibrillary tangles“) und extrazelluläre amyloide Plaques. Heute weiß man, dass die intrazellulären Ablagerungen aus hyperphosphorylierten Aggregaten des mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau bestehen (Goedert et al., 1992) und die extrazellulären Plaques aus dem Amyloid- $\beta$ -Peptid ( $A\beta$ ), einem schnell aggregierenden, proteolytischen Spaltprodukt des membranständigen Amyloid Vorläuferproteins („Amyloid Precursor Protein“, APP) (Masters et al., 1985; Kang et al., 1987). Sie stellen ein spezifisches pathologische Merkmal der Alzheimer-Demenz dar. Diese pathologischen Ablagerungen führten zu der Amyloid-Hypothese, die den vorhandenen  $A\beta$ -Überschuss im Gehirn als den eigentlichen Auslöser der Krankheit beschreibt (Selkoe, 1991; Hardy und Allsop, 1991; Hardy und Higgins, 1992), dem erst dann weitere neurodegenerative und neuroinflammatorische Prozesse folgen.

Bei der Alzheimer-Krankheit wird die sporadische von der familiären Form unterschieden. Ca. 98% der Fälle werden der altersbedingten, sporadischen Krankheitsform zugerechnet, die familiäre Form („familial Alzheimer’s disease“, FAD) ist mit ca. 1-2% deutlich seltener. Diese beruht ursächlich auf autosomal-dominant vererbten Mutationen in den Genen des APP und der beiden homologen Proteine Presenilin 1 (PS1) und Presenilin 2 (PS2) (Rogaeva, 2002; Citron et al., 1992; St George-Hyslop, 1992). Familiäre Fälle weisen einen sehr frühen Krankheitsbeginn, teilweise schon ab dem 30. Lebensjahr auf. Mittlerweile wurden 33 verschiedene Mutationen im APP, 185 im PS1 und 13 im PS2 entdeckt ([www.molgen.ua.ac.be /ADMutations](http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations), Stand 11/2012).

Neben den mutationsbedingten Faktoren gibt es weitere Risikofaktoren, die einen frühen Krankheitsbeginn fördern können. Dazu gehört das  $\epsilon$ 4-Allel des Apolipoproteins E (APOE  $\epsilon$ 4), welches eine zentrale Rolle im Cholesterinstoffwechsel besitzt und das Krankheitsrisiko im Durchschnitt um das vier- bis fünffache erhöht (Corder et al., 1993; Bertram et al., 2010). In Hochdurchsatz-Studien, sogenannten „Genome-wide association studies“ (GWA-Studien), konnten mittlerweile weitere Risikogene identifiziert werden. Beschrieben wurden Polymorphismen in den Genen Bridging integrator 1 (Bin1), Clusterin (Clu), ATP-binding cassette 7 (ABCA7), Complement component receptor 1 (CR1) und Phosphatidylinositol binding Clathrin assembly Protein (PICALM) (Bertram et al., 2007; [www.alzgene.org/ Top Results.asp](http://www.alzgene.org/TopResults.asp)., Stand 11/2012).

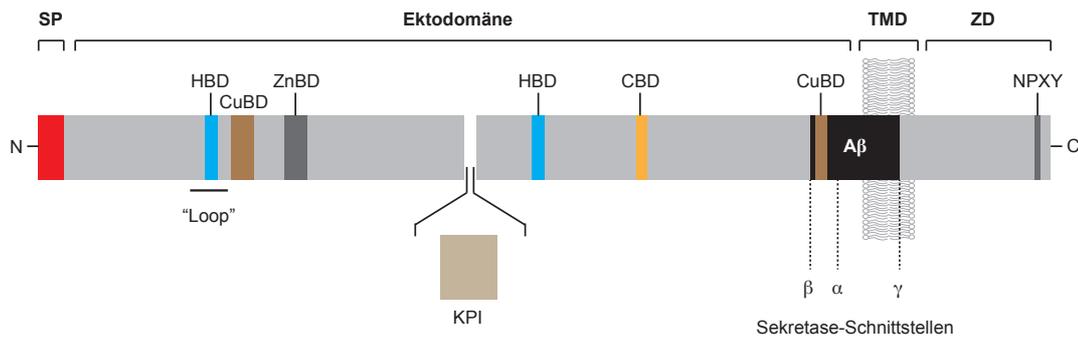
## 1.2 Molekulare Grundlagen der Alzheimer-Krankheit

### 1.2.1 APP: Charakterisierung und Funktion

Das humane APP-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 21 lokalisiert. Durch alternatives Splicing der Exons 2, 7, 8 und 15 können neun verschiedene APP-Isoformen gebildet werden (Zheng und Koo, 2006). Die drei Hauptisoformen sind APP695, APP751 und APP770. APP695 wird überwiegend im Gehirn exprimiert und ist dort die am häufigsten vertretene Isoform (Kang et al., 1987; König et al., 1989). APP751 und APP770 werden ubiquitär exprimiert, größtenteils jedoch in nicht neuronalen Zellen und peripheren Geweben (Selkoe et al., 1988). Im Unterschied zu APP695 enthalten die beiden längeren Formen eine Kunitz-Protease-Inhibitor Domäne (KPI) (Ponte et al., 1988).

APP ist ein 110-135 kDa großes Typ-1 Transmembranprotein und bildet mit den beiden APP-ähnlichen Proteinen („amyloid precursor-like-protein“, APLP), APLP1 und APLP2 eine Proteinfamilie.

APP besteht aus einer relativ großen N-terminalen extrazellulären Region (Ektodomäne), einer Transmembrandomäne (TMD) und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (Abb. 1).



**Abb. 1: Schema der strukturellen und funktionellen Domänen des APP.** APP besteht aus einer Ektodomäne, einer Transmembrandomäne (TMD) und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (ZD). Am N-Terminus befindet sich ein Signalpeptid (SP). Die Ektodomäne besitzt zwei Heparin-bindende Domänen (HBD), wobei sich erstere in der intramolekularen „Loop“-Region befindet. Es existieren Metallbindestellen für Kupfer (CuBD) und Zink (ZnBD), sowie ein Kollagen-bindender Bereich (CBD). APP751 und 770 besitzen zusätzlich eine Kunitz Protease Inhibitor-Domäne (KPI). Der C-terminale Bereich der Ektodomäne und ein Großteil der Transmembrandomäne (TMD) bilden die A $\beta$ -Region (Sekretase-Schnittstellen eingezeichnet). Am C-Terminus befindet sich ein NPXY-Motiv für die Clathrin-vermittelte Endozytose des APP.

Die Ektodomäne enthält das N-terminale Signalpeptid, zwei Heparin-bindende Domänen, zwei Metallbindungsstellen für Kupfer und eine für Zink, sowie einen Kollagen-bindenden Bereich (Small et al., 1994; Hesse et al., 1994; Bush et al., 1993; Rossjohn et al., 1999; Multhaup et al., 1994; Behr et al., 1996). Der C-terminale Teil der Ektodomäne und ein Großteil der TMD bildet die für die Alzheimer-Pathologie wichtige A $\beta$ -Domäne. Die konservierte NPXY-Konsensussequenz am C-Terminus der zytoplasmatischen Domäne bewirkt die Clathrin-vermittelte Endozytose des APP (Chen et al., 1990; Paccaud et al., 1993).

APP gelangt über den konstitutiv sekretorischen Weg an die Plasmamembran und wird über den endosomalen-lysosomalen Weg abgebaut oder durch endosomales Recycling zurück an die Zellmembran gebracht (Thinakaran und Koo, 2008; Zheng und Koo, 2006).

Die physiologische Funktion von APP mit seinen verschiedenen funktionellen Domänen ist bis heute nicht abschließend geklärt. Es wurden Funktionen beim Neuronen- und Axonwachstum sowie der Synaptogenese nachgewiesen (Hung et al., 1992). Während der Embryogenese wird APP für die Migration von neuronalen Vorläuferzellen in die kortikale Platte benötigt (Young-Pearse et al., 2007). Die Fähigkeit von APP mit Adhäsionsproteinen (Integrine) oder Proteinen der extrazellulären Matrix (Laminin und Kollagen) zu interagieren, weisen auf eine Funktion bei der Zell-Zell- bzw. der Zell-Matrix-Interaktion und der Zell-Adhäsion hin (Ghiso et al., 1992; Storey et al., 1996; Yamazaki et al., 1997). Speziell die Ausbildung von APP-Homo- bzw. Heterodimeren mit Mitgliedern der APP-Familie könnten bei der Ausbildung von Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle spielen (Soba et al., 2005; Kaden et al., 2009).

Mäuse, bei denen das APP-Gen inaktiviert wurde, sind überlebens- und fortpflanzungsfähig ohne auffälligen Phänotyp (Zheng et al., 1995). Werden zusätzlich APLP1 und APLP2 eliminiert, ist eine fehlerhafte embryonale Entwicklung des Gehirns die Folge und die Mäuse sterben kurz nach der Geburt (Herms et al., 2004). Dies belegt eine wichtige Funktion der drei

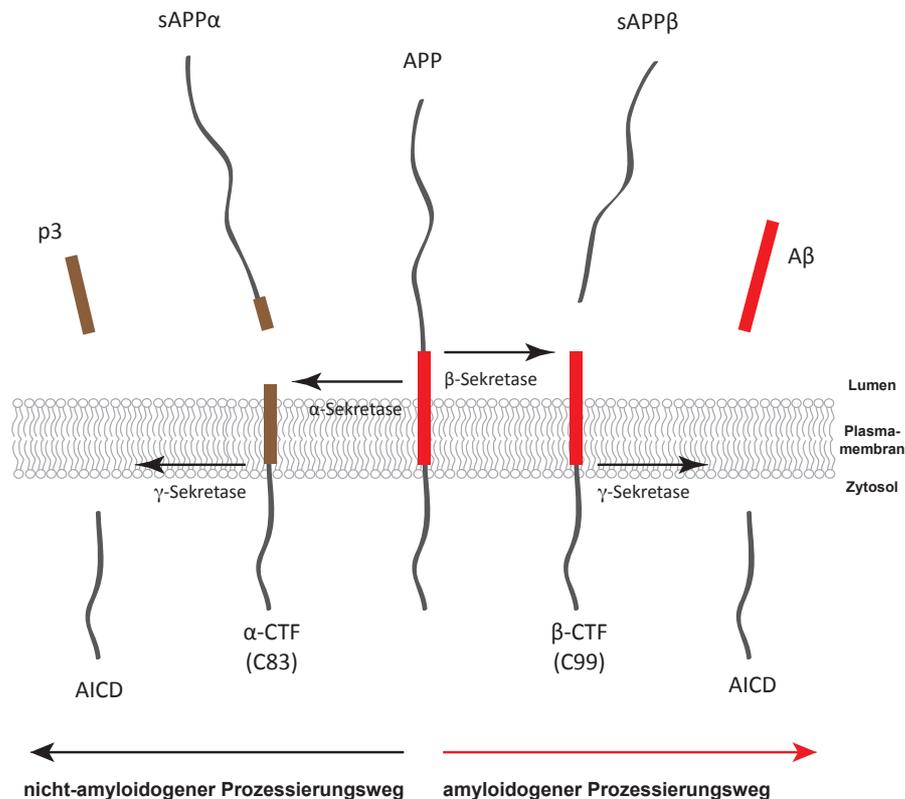
Mitglieder der APP-Familie bei der neuronalen Entwicklung und dem frühen postnatalen Überleben. APP besitzt die Eigenschaft, über mindestens drei bekannte Dimerisierungsstellen Homodimere zu bilden. Zwei Kontaktbereiche befinden sich in der Ektodomäne, die sogenannte „Loop“-Region und die kollagen-bindende Region, eine weitere ist in der Transmembrandomäne beschrieben und wird durch drei konsekutive GxxxG-Motive gebildet (Behr et al., 1996; Kaden et al., 2008; Scheuermann et al., 2001; Munter et al., 2007). Während der Dimerisierung über die Ektodomäne funktionell eine Rolle in der Zell-Adhäsion zugeschrieben wird, speziell über trans-Interaktionen von APP zwischen Zellen, so wirkt sich die Dimerisierung über die GxxxG-Motive verstärkt auf die Prozessierung von APP aus (Scheuermann et al., 2001; Munter et al., 2007).

### 1.2.2 Die Prozessierung von APP

Die Prozessierung von APP erfolgt zum überwiegenden Teil (ca. 90%) auf dem nicht-amyloidogenen Weg und zu etwa 10% auf dem amyloidogenen Weg (Abb. 2). Für die Pathologie der AD ist der amyloidogene Weg von entscheidender Bedeutung, da durch ihn das toxische A $\beta$ -Peptid entsteht und freigesetzt wird. Dabei schneidet die membranständige  $\beta$ -Sekretase („ $\beta$ -site APP cleaving enzyme“, BACE1) APP nahe der extrazellulären Membranseite zwischen den Aminosäureresten M596 und D597 (Isoform APP695) (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Es entsteht die lösliche Ektodomäne sAPP $\beta$  („soluble“ APP $\beta$ ). In der Membran verbleibt das C-terminale Fragment („ $\beta$ -C-terminal fragment“,  $\beta$ -CTF oder C99), das nach dem Abspalten der Ektodomäne, ein Prozess der auch als „ectodomain shedding“ bezeichnet wird, nun ein Substrat für die  $\gamma$ -Sekretase darstellt. Erst nach dem Entfernen der Ektodomäne kann die  $\gamma$ -Sekretase das Substrat  $\beta$ -CTF erkennen und innerhalb der Membran schrittweise prozessieren. Die Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase generiert das in der AD zentrale, neurotoxische A $\beta$ -Molekül, das in den Extrazellulärraum abgegeben wird (Haass et al., 1992). Hierbei entstehen A $\beta$ -Spezies unterschiedlicher Länge, hauptsächlich jedoch Peptide mit einer Länge von 40 bzw. 42 Aminosäuren (A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42). Der C-terminale Teil des  $\beta$ -CTF, die APP intrazelluläre Domäne („APP intracellular C-terminal domain“, AICD) kann im Zytosol einen Komplex mit dem Adapterprotein Fe65 und der Histon-Acetyltransferase Tip60 bilden und bewirkt nach Translokation in den Zellkern die Transkription von Zielgenen (Cao und Südhof, 2001; Cao und Südhof, 2004).

Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung von APP wird die A $\beta$ -Bildung durch den initialen Schnitt der  $\alpha$ -Sekretase verhindert. Die Schnittstelle der  $\alpha$ -Sekretase befindet sich innerhalb der A $\beta$ -Sequenz zwischen den Aminosäuren K612 und L613 (Isoform APP695). Es entsteht das lösliche sAPP $\alpha$  („soluble“ APP $\alpha$ ) und das membranständige  $\alpha$ -CTF („ $\alpha$ -C-terminal fragment“,  $\alpha$ -CTF oder C83), welches wiederum von der  $\gamma$ -Sekretase weiterprozessiert werden

kann. Die Spaltung resultiert in dem nicht-toxischen p3-Fragment, benannt nach seinem Molekulargewicht von 3 kDa und der AICD (Haass et al., 1993; Dulin et al., 2008).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der proteolytischen Prozessierung von APP.** Bei der amyloidogenen Prozessierung spaltet die  $\beta$ -Sekretase in der APP-Ektodomäne und erzeugt ein lösliches sAPP $\beta$  Fragment und ein membranständiges  $\beta$ -CTF. Das  $\beta$ -CTF wird durch die  $\gamma$ -Sekretase weiter geschnitten, wodurch A $\beta$  (rot) und die intrazelluläre Domäne (AICD) aus der Membran entlassen werden. Die nicht-amyloidogene Prozessierung beginnt mit dem Schnitt der  $\alpha$ -Sekretase innerhalb der A $\beta$ -Sequenz. Es entstehen sAPP $\alpha$  und das membranverankerte  $\alpha$ -CTF. Das  $\alpha$ -CTF wird ebenfalls von der  $\gamma$ -Sekretase prozessiert, wodurch das p3-Fragment (braun) und die AICD produziert werden. (sAPP: „soluble APP“; CTF: C-terminales Fragment; AICD: „APP intracellular C-terminal domain“)

$\alpha$ -Sekretasen sind Typ-1 Membranproteine und gehören zur Proteinfamilie der Disintegrin- und Metalloproteinasen („a disintegrin and metalloproteinase“, ADAM), die an der Plasmamembran lokalisiert sind (Vingtdeux und Marambaud, 2012). APP wird vermutlich durch drei Mitglieder der ADAM-Familie, ADAM 9, 10 und 17, prozessiert, wobei ADAM 10 in neuronalen Zellen die physiologisch relevante Sekretase ist (Kuhn et al., 2007). ADAMs spalten eine Vielzahl verschiedener Substrate, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Membranrezeptoren und nehmen dadurch eine zentrale Rolle in vielfältigen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen ein.

Im amyloidogenen Weg wird APP vorwiegend durch BACE1 („ $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1“) prozessiert (Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Lin et al., 2000). BACE1 ist eine membrangebundene Aspartatprotease und kann Homodimere ausbilden (Schmechel et al., 2004; Westmeyer et al., 2004). Die proteolytische Spaltung erfolgt durch zwei katalytisch aktive Aspartatreste, D93 und D289, die in der Extrazellulärdomäne lokalisiert sind.

siert sind. BACE1 besitzt eine optimale Aktivität in saurer Umgebung und liegt vorwiegend in Zellkompartimenten wie dem Golgi-Apparat, Trans-Golgi-Netzwerk und in Endosomen vor, kann jedoch auch in der Plasmamembran in „Lipid rafts“ nachgewiesen werden (Vassar et al., 1999; Walter et al., 2001; Huse et al., 2000; Huse et al., 2002; Cordy et al., 2003; Eehalt et al., 2003).

### 1.2.3 Das A $\beta$ -Peptid in der Alzheimer-Krankheit

Das A $\beta$ -Peptid entsteht bei der amyloiden Prozessierung von APP und lagert sich nach der extrazellulären Freisetzung als Hauptbestandteil zu den für die AD typischen amyloiden Plaques ab. A $\beta$  wird sequenziell durch die  $\gamma$ -Sekretase produziert, wodurch A $\beta$ -Peptide variierender Länge entstehen. Die beiden vorwiegend gebildeten A $\beta$ -Formen sind A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42, wobei A $\beta$ 40 mit ca. 90% den weitaus größeren Anteil im Gehirn ausmacht und das für die AD relevante und neurotoxische A $\beta$ 42 nur ca. 10% (Roher et al., 1993, Younkin, 1998). Weiterhin existieren auch andere Spezies, wie A $\beta$ 43, A $\beta$ 39, A $\beta$ 38, A $\beta$ 37, A $\beta$ 34 und auch N-terminal verkürzte oder N-terminal modifizierte, z.B. pyroGlu-A $\beta$  (Wiltfang et al., 2001; Portelius et al., 2010).

Sobald die Peptide die lipophile Membranumgebung in den hydrophilen Extrazellulärraum verlassen, folgt eine Änderung der  $\alpha$ -helikalen Struktur in eine  $\beta$ -Faltblattstruktur (Xu et al., 2005; Simmons et al., 1994). Durch die beiden zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren von A $\beta$ 42, Isoleucin und Alanin, ergibt sich eine erhöhte Hydrophobizität im Vergleich zu A $\beta$ 40. Daher neigt dieses Peptid besonders stark zur Aggregation und führt zur schnellen Bildung löslicher Oligomere. A $\beta$ 42 bildet schließlich fibrilläre Strukturen, die sich letztlich zu den extrazellulären amyloiden Plaques im Gehirn ablagern. Im Gegensatz zu den Fibrillen konnte in den letzten Jahren nachgewiesen werden, dass die löslichen Oligomere von A $\beta$ 42, besonders die Tetramere und in geringerem Maße auch die Di-, Hexa- und Decamere ein hohes neurotoxisches Potential besitzen (Klein et al., 2001; Walsh et al., 2002; Cleary et al., 2005; Shankar et al., 2007; Shankar et al., 2008). Höhere Oligomere (16- oder 20-mere) sind nicht toxisch gegenüber Neuronen (Harmeier et al., 2009).

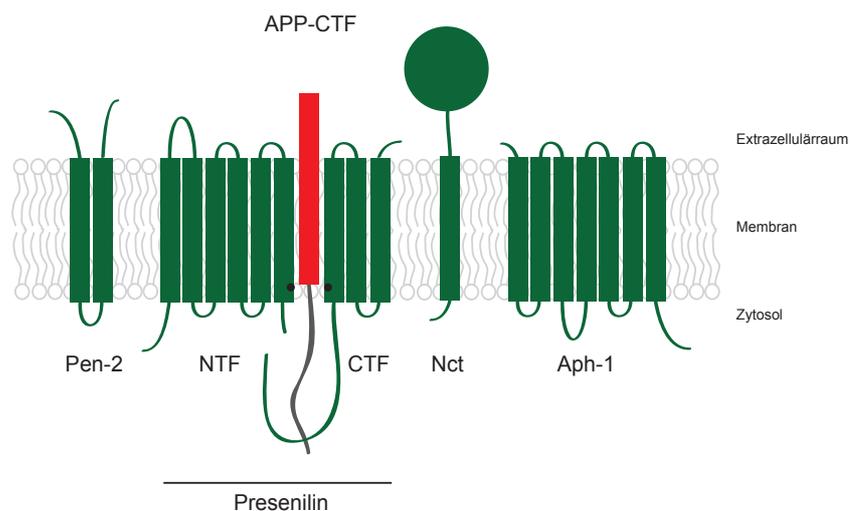
Der genaue Mechanismus, über den die Neurotoxizität von A $\beta$ 42 im Gehirn vermittelt wird, ist bis heute nicht im Detail geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass A $\beta$ 42 über die Interaktion mit postsynaptischen N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren (NMDAR) die Langzeitpotenzierung (LTP) inhibieren kann (De Felice et al., 2007, Harmeier et al., 2009). Ebenso wurde nachgewiesen, dass die Bindung von oligomerem A $\beta$ 42 an das Prionprotein eine Rolle bei der Toxizitätsvermittlung spielen könnte und z.B. über die Aktivierung der Fyn-Kinase zu einem Verlust von NMDA-Rezeptoren führt (Resenberger et al., 2011; Um et al., 2012). Weiterhin kann extrazelluläres A $\beta$ 42 über seine stark amphiphilen Eigenschaften die Plasmamembran schädigen oder spezifisch über Poren- bzw. Kanal-Bildung einen Einstrom von

Calciumionen verursachen, der intrazellulär apoptotische Prozesse auslöst (Demuro et al., 2005; Deshpande et al., 2006).

## 1.2.4 Der $\gamma$ -Sekretase-Komplex

### 1.2.4.1 Molekularer Aufbau und Substrate

Die  $\gamma$ -Sekretase gehört zu den Aspartatproteasen und prozessiert Transmembranproteine vom Typ-1. Die Besonderheit des Komplexes liegt in der Fähigkeit, Substrate innerhalb der hydrophoben Membrenumgebung hydrolytisch zu spalten. Der Proteinkomplex besteht aus insgesamt vier integralen Membranproteinen (Abb. 3): der katalytischen Untereinheit Presenilin 1 bzw. 2 (PS1, PS2), Nicastrin (Nct), Aph-1 („anterior pharynx defective phenotype“ 1) und Pen-2 („presenilin enhancer“ 2) (Lee et al., 2002; Steiner et al., 2002; Kimberley et al., 2003; Takasugi et al., 2003). Die Stöchiometrie dieser vier Komponenten im aktiven Komplex ist noch nicht zweifelsfrei geklärt. So konnte zwar gezeigt werden, dass es für die Assemblierung und die Proteaseaktivität notwendig und hinreichend ist, wenn jede Untereinheit einfach vorliegt, PS konnte jedoch auch als Dimer im Komplex nachgewiesen werden (Osenkowski et al., 2009; Sato et al., 2007; Edbauer et al., 2003; Schroeter et al., 2003). Die Assemblierung der  $\gamma$ -Sekretase beginnt mit der Dimerisierung des Subkomplexes aus Nct und Aph-1 im Endoplasmatischen Retikulum. Darauf folgt die Anlagerung von PS1 oder dem homologen Protein PS2 (Kimberley et al., 2003; Takasugi et al., 2003). Pen-2 komplettiert den unreifen Komplex und induziert die Autoproteolyse von Presenilin in ein C- und ein N-terminales Fragment (PS-CTF und PS-NTF). Der reife Komplex gelangt schließlich über den sekretorischen Weg an die Plasmamembran.



**Abb. 3: Schematischer Aufbau des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes.** Der reife  $\gamma$ -Sekretase-Komplex setzt sich zusammen aus Pen-2 (presenilin enhancer-2), Nct (Nicastrin), Aph-1 (anterior pharynx defective phenotype-1) und dem Presenilin-Heterodimer bestehend aus einem N-Terminalen Fragment (PS-NTF) und einem C-Terminalen Fragment (PS-CTF). Die katalytisch aktiven Aspartatreste (D257 in TMD 6 und D385 in TMD 7) sind durch schwarze Punkte dargestellt. Die  $\text{A}\beta$ -Sequenz des Substrats APP  $\beta$ -CTF ist rot hervorgehoben.

Presenilinen bestehen aus neun TMD mit einer zytosolischen N-terminalen Domäne und einem extrazellulären C-Terminus (Laudon et al., 2005). Der  $\gamma$ -Sekretase Komplex enthält entweder PS1 oder das homologe PS2 (Yu et al., 1998; Steiner et al., 2002), welche die beiden katalytischen Aspartatreste in TMD 6 (D257 bei PS1, D263 bei PS2) und in TMD 7 (D385 bei PS1, D366 bei PS2) tragen. Letzteres ist in einem konservierten GxGD-Motiv lokalisiert, das vermutlich die Substratbindung im aktiven Zentrum vermittelt (Wolfe et al., 1999; Steiner et al., 2000; Yamasaki et al., 2006). Zwischen den TMD 6 und 7 befindet sich eine große intrazelluläre Schleife, die autoproteolytisch gespalten wird. Nach der Spaltung liegt Presenilin als Heterodimer bestehend aus dem PS-NTF (TMD 1-6) und PS-CTF (TMD 7-9) vor. Dieser Spaltprozess zwischen den Aminosäureresten 289 und 299 folgt demselben schrittweisen Mechanismus, den die  $\gamma$ -Sekretase bei seinen Substraten analog durchführt (Fukumori et al., 2010).

In den für PS1 und PS2 kodierenden Genen PSEN1 und PSEN2, ist mit insgesamt 185 bzw. 13, die mit Abstand größte Anzahl familiärer Alzheimer-Mutationen lokalisiert. Dies bekräftigt die besondere Bedeutung dieser Untereinheit in der AD. Nct ist ein Typ-1 Transmembranprotein und besteht aus einer großen, stark glykosylierten Ektodomäne. Es steuert den intrazellulären Transport des unreifen  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes an die Zellmembran und fungiert dort als Substratrezeptor (Zhang et al., 2005; Shah et al., 2005). Im Komplex mit dem sieben-transmembran-Protein Aph-1 initiiert Nct die  $\gamma$ -Sekretase-Assemblierung. Die genaue Funktion von Aph-1 innerhalb des Komplexes ist bisher nicht klar. Es wird vermutet, dass Aph-1 bei der Reifung des Komplexes eine stabilisierende Funktion zukommt und im aktiven Komplex eine stützende Aufgabe ausübt (Lee et al., 2004; Hansson et al., 2005). Pen-2 enthält zwei TMD, wobei sich N- als auch C-Terminus im Extrazellulärraum befinden. Es bindet im Reifungsprozess als letzte Komponente und aktiviert den Komplex durch die Induktion der Endoproteolyse von Presenilin (Steiner et al., 2002, Fukumori et al., 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Pen-2 die entstehenden Fragmente PS-NTF und PS-CTF im Komplex stabilisiert und auch an der Ausbildung der katalytischen Pore beteiligt ist (Hasegawa et al., 2004; Prokop et al., 2005).

Als Substrate der  $\gamma$ -Sekretase sind inzwischen mehr als 60 Typ-1 Transmembranproteine mit unterschiedlichen zellulären Funktionen beschrieben (McCarthy et al., 2009; Wakabayashi et al., 2009). Die bekanntesten Vertreter sind neben APP, APLP1 und den Notch-Rezeptoren 1-4, LRP („low density lipoprotein receptor-related protein“), die Rezeptortyrosinkinase ErbB-4, das epitheliale Cadherin (E-Cadherin) und das Membranglykoprotein CD44 (Parks und Curtis, 2007; De Strooper und Annaert, 2010). Nahezu alle Substrate werden nach dem Prinzip der „regulated intramembrane proteolysis“ (RIP) durch vorherige Abspaltung der Ektodomäne prozessiert (Struhl und Adachi, 2000).

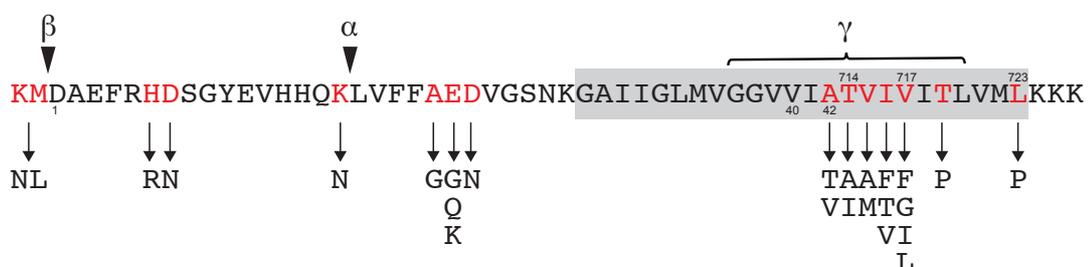


Die folgenden Schnitte werden als  $\gamma$ -Schnitte benannt und spalten die intermediären Produkte in Richtung N-Terminus zu A $\beta$ 40 (aus A $\beta$ 46 über A $\beta$ 43) und A $\beta$ 42 (aus A $\beta$ 45), die auch weiter zu kürzeren Formen, wie A $\beta$ 37 bzw. A $\beta$ 38 prozessiert werden können. Die Hauptproduktlinie, nach ihrem wesentlichen Endprodukt als A $\beta$ 40-Produktlinie benannt, umfasst daher folgende Spezies: AICD50-99, A $\beta$ 49-A $\beta$ 46-A $\beta$ 43-A $\beta$ 40-A $\beta$ 37. Die zweite, sogenannte A $\beta$ 42-Produktlinie, produziert AICD49-99, A $\beta$ 48-A $\beta$ 45-A $\beta$ 42-A $\beta$ 38.

Dass die A $\beta$ -Prozessierung tatsächlich sequenziell, anhand mehrerer aufeinanderfolgender Schnitte und in zwei Produktlinien erfolgt, wurde in mehreren Studien nachgewiesen (Zhao et al., 2004; Qi-Takahara et al., 2005; Zhao et al., 2005). Inzwischen wurde die Existenz dieser beiden Linien auch durch den Nachweis der bei der Prozessierung entstehenden Tri- und Tetrapeptide bestätigt (Takami et al., 2009). Dafür wurden die kurzen Peptide aus einem *in vitro*-Ansatz zuerst durch Flüssigkeitschromatographie getrennt und anschließend mittels Massenspektrometrie detektiert. Die Besonderheit dieser Methode besteht darin, dass der zeitabhängige Tri- bzw. Tetrapeptidnachweis, also ITL (A $\beta$ 47-49), VIV (A $\beta$ 44-46) und IAT (A $\beta$ 41-43) für die A $\beta$ 40-Produktlinie und VIT (A $\beta$ 46-48), TVI (A $\beta$ 43-45) und VVIA (A $\beta$ 39-42) für die A $\beta$ 42-Produktlinie einerseits ein Beleg für die schrittweise Prozessierung darstellt aber andererseits auch ein spezifischer Nachweis dafür ist, dass ein ganz bestimmter Schnitt durch die  $\gamma$ -Sekretase erfolgt ist (Abb.4). Neueste Untersuchungen ergaben jedoch, dass sich die beiden Produktlinien auch überschneiden können. So wurde erst kürzlich gezeigt, dass aus A $\beta$ 43 durch Abspaltung der fünf Aminosäuren VVIAT (A $\beta$ 39-43) auch A $\beta$ 38 entstehen kann (Okochi et al., 2013).

### 1.2.5 Familiäre APP-Mutationen als Auslöser der Alzheimer-Krankheit

Neben den familiären Alzheimer-Mutationen in den Genen PSEN1 bzw. PSEN2 - also der katalytischen Komponente, die für die A $\beta$ -Produktion verantwortlich ist - befindet sich ein wesentlicher Anteil jedoch auch im APP-Gen selbst. Die familiären APP-Mutationen sind besonders in den Regionen der drei Sekretaseschnittstellen lokalisiert, wobei sich der Großteil im Bereich der  $\gamma$ -Sekretasespaltregion befindet (Abb. 5).



**Abb. 5: Übersicht der bekannten familiären APP-Mutationen.** In der APP-Sequenz sind die Schnittpositionen der drei beteiligten Sekretasen gekennzeichnet (Pfeile/Klammer). Rot hervorgehoben sind die durch Mutationen betroffenen Aminosäurepositionen. Unterhalb der Sequenz befinden sich die bekannten Aminosäure-Substitutionen für die entsprechenden Positionen. Anfang und Ende der A $\beta$ -Sequenz sind durch eine 1 bzw. 40 oder 42 für die beiden Hauptprodukte nummeriert. Grau unterlegt ist die APP TMS. Die untersuchten FAD-Mutationen sind nach der substituierten Aminosäureposition nummeriert (Numerierung nach APP770).

Über welchen Mechanismus die Mutationen zu der frühen Entstehung der AD führen ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Als gemeinsames Merkmal der familiären Mutationen, wurde entweder eine Erhöhung der A $\beta$ 42-Produktion, oder des Verhältnis von A $\beta$ 42:A $\beta$ 40 nachgewiesen (Borchelt et al., 1996; Scheuner et al., 1996; Munter et al., 2010; Chavez-Gutierrez et al., 2012). Genauere Analysen verdeutlichten ferner, dass die Veränderung des A $\beta$ -Verhältnis nicht zwangsläufig durch eine Erhöhung von A $\beta$ 42 verursacht wird, sondern auch die Folge einer verringerten A $\beta$ 40-Menge sein kann (Shimojo et al., 2007; Heilig et al., 2010). Die Erhöhung des A $\beta$ 42:A $\beta$ 40-Verhältnis ist besonders bei der Bildung toxischer Oligomere von Bedeutung und schon geringe Veränderungen besitzen einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität dieser Oligomere unabhängig von der absoluten A $\beta$ -Menge (Kuperstein et al., 2010). Daraus wurde abgeleitet, dass dem A $\beta$ 42/40-Verhältnis möglicherweise eine wichtigere Bedeutung im Krankheitsprozess zukommt als die absolute A $\beta$ 42-Menge (Tanzi und Bertram, 2005). Es ist bisher jedoch wenig untersucht auf welche Weise APP-FAD-Mutationen die beiden Produktlinien der  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung beeinflussen und welcher Proteolyseschnitt des sequenziellen Mechanismus dadurch genau betroffen ist.

### 1.3 Lipide und die Alzheimer-Krankheit

#### 1.3.1 Veränderungen der Lipidhomöostase in der Alzheimer-Krankheit

Die Pathologie der AD ist mit vielfältigen biochemischen Veränderungen der Lipidzusammensetzung im Gehirn verbunden, die sich auf ganz unterschiedliche Art und Weise auf den Krankheitsprozess auswirken kann (Söderberg et al., 1992; Foley, 2010; Chan et al., 2012). Lipide können die Regulation des Transports sowie die proteolytische Aktivität der beteiligten Proteasen BACE und der  $\gamma$ -Sekretase beeinflussen (Hartmann et al., 2007; Di Paolo und Kim, 2011). Änderungen im Lipidmetabolismus wirken sich auch auf die Organisation und die physikalischen Eigenschaften der neuronalen Zellmembranen und auf die Aggregation der A $\beta$ -Peptide aus. Nicht zuletzt wird die besondere Bedeutung von Lipiden in der AD durch APOE als stärksten genetischen Risikofaktor und maßgeblichen Regulator des Cholesterin-Metabolismus herausgestellt sowie dadurch, dass alle an der Prozessierung beteiligten Proteine in der Plasmamembran lokalisiert sind.

Schon relativ früh wurde gezeigt, dass ein veränderter Cholesterin-Metabolismus ein Risikofaktor für die AD ist. Cholesterin führt dabei zu einer erhöhten A $\beta$ -Produktion über die direkte Wirkung auf die  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -Sekretase (Simons et al., 1998; Fassbender et al., 2001, Kalvodova et al., 2005). *In vivo* und *in vitro* Experimente mit selektiven Cholesterin-Senkern wie Statinen,  $\beta$ -Methyl-Cyclodextrin sowie Versuche mit Hypercholesterin-Diäten am Tiermodell unterstützen diese Annahme (Refolo et al., 2001; Shie et al., 2002; Fassbender et al., 2001). Im APP  $\beta$ -CTF konnte eine Bindungsstelle für Cholesterin nachgewiesen werden was auf eine mögliche Funktion bei der amyloidogenen Prozessierung hindeutet (Barrett et al., 2012).

Weiterhin führt eine Verringerung des Membrangehalts von Sphingolipiden und speziell Sphingomyelin (SM), zu einer erhöhten A $\beta$ 42-Produktion. A $\beta$ 40 ist jedoch nicht betroffen (Sawamura et al., 2004). A $\beta$ 42 selbst kann direkt die Synthese von SM über die Interaktion mit Sphingomyelinasen hemmen (Grimm et al., 2005).

Bei der relativen Quantifizierung von Lipiden in Gehirnen von AD-Patienten war das zentrale Abbauprodukt von SM, das proapoptotische Ceramid, im Vergleich zu Gesunden in etwa dreifach erhöht (Han et al., 2002; He et al., 2008). Für den SM-Gehalt wurden widersprüchliche Daten publiziert. So wurde im entorhinalen Cortex und in sehr frühen Stadien der AD in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) erhöhte Mengen nachgewiesen (Chan et al., 2012; Kosicek et al., 2012). In einer Studie von Han et al. wurden hingegen verringerte Mengen detektiert (Han et al., 2011).

Von besonderer Bedeutung für die AD sind Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Membranimkrodomänen (Hartmann et al., 2007). Die sogenannten „Lipid rafts“ sind heterogene Organisationsdomänen innerhalb der Plasmamembran, die als Plattform für die Proteinsortierung und Signaltransduktion dienen (Helms und Zurzolo, 2004). Es wurde belegt, dass BACE, der  $\gamma$ -Sekretase-Komplex sowie das Substrat APP sowohl innerhalb als auch ausserhalb von „Lipid raft“-Regionen vorliegen können, die Prozessierung innerhalb dieser Membrandomänen jedoch vorwiegend auf dem amyloidogenen Weg erfolgt (Cordy et al., 2003; Wahrle et al., 2002). Daher wird angenommen, dass sich Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der „Lipid rafts“ direkt auf die amyloidogene APP-Prozessierung auswirken können. Erst kürzlich wurde eine Verbindung zwischen der altersbedingten Akkumulation von Sphingolipiden in intrazellulären Kompartimenten und der Anhäufung von APP-CTFs und A $\beta$  nachgewiesen (Tamboli et al., 2011). Die Veränderungen der Lipidzusammensetzung im endosomalen/lysosomalen Abbauweg könnten daher eine zentrale Ursache für die charakteristische Akkumulation von APP-CTFs und A $\beta$  bei der sporadischen AD sein.

Auch Phosphoglyceride können die A $\beta$ -Bildung beeinflussen. So wurde nachgewiesen, dass die spezifische Verringerung der Synthese von Phosphatidylethanolamin in der Plasmamembran die A $\beta$ -Produktion über zwei Effekte erniedrigt: Eine Verstärkung der  $\alpha$ -Sekretase-Prozessierung und eine Reduktion der  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung (Nesic et al., 2012).

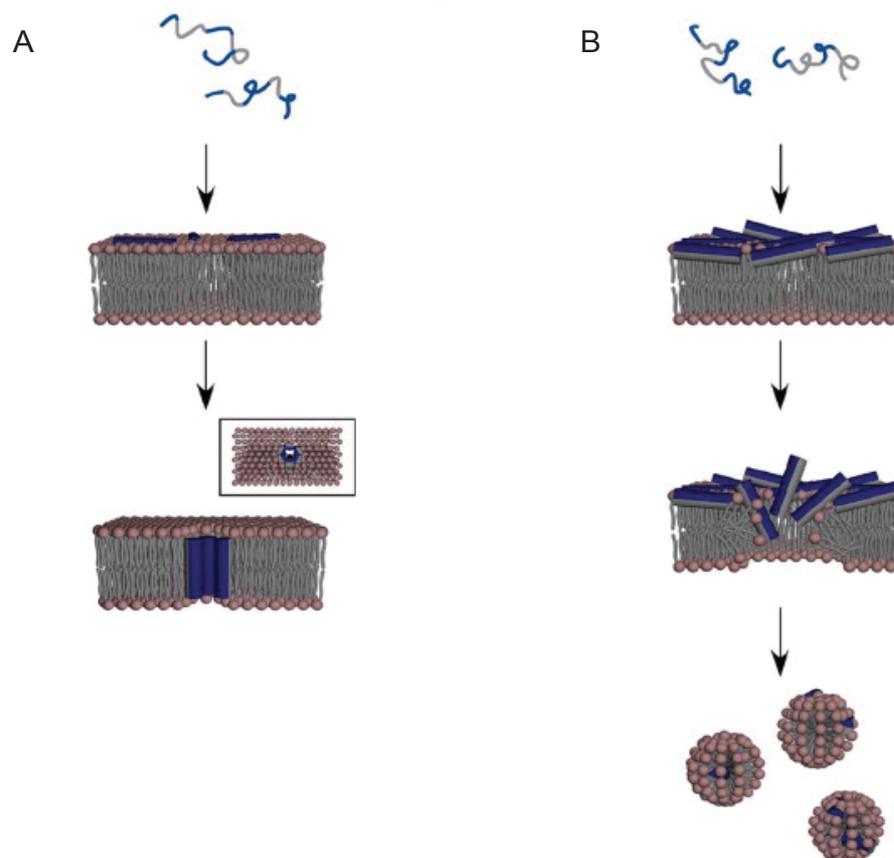
### **1.3.2 Lipide und A $\beta$ -Toxizität**

Durch die hydrophoben Eigenschaften des A $\beta$ -Peptids wird die Interaktion des Peptids mit Lipiden der Zellmembran prinzipiell begünstigt. Bisher weist eine Vielzahl an Untersuchungen auf eine direkte Interaktion zwischen Gangliosiden und A $\beta$  hin, wobei speziell GM1, das vorwiegend im Gehirn vorkommt, für diese Wechselwirkung verantwortlich ist (Yanagisawa et al., 1995; Hayashi et al., 2004; Ariga et al., 2008). Es wird angenommen, dass bei der Zelloberflächenbindung von A $\beta$  an GM1 eine Konformationsänderung hin zu einer  $\beta$ -Faltblatt-

reichen Struktur induziert wird. An diesen Aggregationskeim können sich schließlich weitere A $\beta$ -Moleküle anlagern und zu einer schnellen Bildung größerer Oligomere beitragen (Williams et al., 2011; Ikeda et al., 2011). Einige Untersuchungen ergaben, dass dieser Prozess durch eine Cholesterin- und SM-reiche Membrenumgebung verstärkt wird und A $\beta$ -Oligomere vermehrt mit „Lipid raft“-Regionen assoziiert sind (Yanagisawa et al., 2007; Okada et al., 2008; Matsuzaki et al., 2010).

Aktuell existieren mehrere Modelle für einen Mechanismus, über den A $\beta$ -Peptide mit der Zellmembran interagieren. Eine der ersten Annahmen war, dass A $\beta$  in der Membran Ionenkanäle bzw. Poren bildet und die Neurotoxizität eine Folge von Ca<sup>2+</sup>-Efflux, Membrandepolarisation und Störung der Ionenhomöostase ist (Pollard et al., 1993; Arispe et al., 1994; Lashuel et al., 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt verstärkt für A $\beta$ -Oligomere gilt, jedoch nicht für Monomere oder fibrilläre Strukturen (Kayed et al., 2004).

A $\beta$  besitzt ähnlich amphiphile Eigenschaften wie auch verschiedene antimikrobielle Peptide. Die toxischen Mechanismen dieser Peptide, die zur Membran-Permeabilität führen können, sind ausgiebig beschrieben worden und könnten auch bei der A $\beta$ -Zellmembraninteraktion eine wichtige Funktion einnehmen (Abb. 6).



**Abb. 6: Mechanismen der Membranpermeabilisierung durch antimikrobielle Peptide.** (A) „Barrel-stave“- und (B) „carpet“-Mechanismus. Die hydrophilen Regionen der Peptide sind in blau, die hydrophoben in grau gekennzeichnet. Verändert nach Ouellet und Auger, 2008.

Hierbei sind zwei Hauptmechanismen von zentraler Bedeutung. Eine lokal hohe Oligomerkonzentration an der Membranoberfläche kann durch gerichtete Einlagerung der Peptide in die Membran zur Porenbildung führen. Dabei richten sich die hydrophoben Peptid-Regionen zum Membrankern hin aus und können so den hydrophoben Kern gegenüber der gebildeten Pore abschirmen (Abb. 6A „barrel-stave“-Mechanismus). Alternativ zu diesem Modell können sich A $\beta$ -Oligomere auch ungeordnet in die Membran einlagern und diese durch einen Detergenz-ähnlichen Mechanismus lokal destabilisieren (Abb. 6B, „carpet“-Mechanismus) und auflösen. In beiden Fällen kommt es zu einer lokalen Störung der Zellmembran. Ob und welche Lipide der Zellmembran diese beschriebenen Prozesse bewirken oder spezifisch ermöglichen, ist bisher unbekannt.

## **1.4 Cerebrospinalflüssigkeits-Biomarker in der Alzheimer-Krankheit**

### **1.4.1 Etablierte Cerebrospinalflüssigkeits-Biomarker in der AD-Diagnostik**

Die Diagnose der Alzheimer-Demenz erfolgt klinisch vorwiegend durch neuropsychologische Tests und bildgebende Verfahren des Gehirns. Zusätzlich werden auch biochemische Marker in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) bestimmt. Dies sind meist Proteine bzw. Peptide deren Liquor-Konzentration spezifisch in der AD verändert ist. Im CSF spiegeln sich in der Regel die pathobiochemischen Veränderungen von Krankheitsprozessen im Gehirn wider, da sie im ständigen Kontakt mit cerebralem Gewebe steht (Reiber, 2001). Neben anderen potentiellen diagnostischen Markern werden derzeit die CSF-Konzentrationen von A $\beta$ 42, total-Tau (t-Tau) und phosphoryliertem Tau (p-Tau) für die Ermittlung der Alzheimer-Demenz verwendet (Andreasen et al., 2001, Blennow und Hampel, 2003). Bei betroffenen Personen sind im CSF typischerweise verringerte A $\beta$ 42-Konzentrationen und erhöhte t-Tau- als auch p-Tau-Werte festzustellen (Wiltfang et al., 2005). Diese drei Biomarker repräsentieren die zentralen pathophysiologischen Merkmale bzw. Veränderungen der AD und deren Bestimmung erlaubt eine gute diagnostische Genauigkeit (>85%), um normale Alterungsprozesse von krankhaften zu unterscheiden (Forlenza et al., 2010). Es gibt jedoch auch Einschränkungen der beschriebenen Biomarker, weswegen deren Konzentrationsbestimmung bisher keine Allgemeingültigkeit in der klinischen Praxis erlangt hat. Die Gründe hierfür liegen zu meist in der methodischen Standardisierung, denn die gemessenen Werte sind stark abhängig von einer Reihe von Faktoren: Durchführung der Lumbalpunktion, Behandlung und Lagerung der Proben, unterschiedliche Protokolle für die jeweiligen Nachweistests und nicht zuletzt die Festlegung der Grenzwerte zur Interpretation der gemessenen Ergebnisse (Mattsson et al., 2010). So gut sich die beschriebenen Biomarker für die Differentialdiagnose einer bestehenden AD eignen, desto geringer wird jedoch deren Aussagekraft, wenn es darum

geht frühe Stadien der Krankheit zu erkennen oder gar Voraussagen über die Entwicklung einer AD zu machen noch lange bevor klinische Symptome auftreten.

In einer Studie von Fukumoto et al. wurde kürzlich versucht, frühe Stadien besser von einer manifesten AD zu unterscheiden. Dafür wurde im CSF die Konzentration von löslichen A $\beta$ -Oligomeren mittels spezieller Oligomer-spezifischer Antikörper im ELISA-Assay bestimmt. Dieser Studie zufolge eignet sich dieser zusätzliche Marker dazu, um zwischen verschiedenen Schweregraden der Krankheit und gesunden Personen genauer zu unterscheiden (Fukumoto et al., 2010). In einer klinischen Phase II-Studie des  $\gamma$ -Sekretase Inhibitors Semagacestat konnte gezeigt werden, dass die A $\beta$ -Isoformen A $\beta$ 1-15 und A $\beta$ 1-16 einen sehr sensitiven CSF-Biomarker für die  $\gamma$ -Sekretase Inhibition darstellen. Unterschiede konnten schon bei Dosierungen festgestellt werden, die sich noch nicht auf A $\beta$ 1-40 bzw. A $\beta$ 1-42 auswirkten (Portelius et al., 2010, Nutu et al., 2012). Somit könnte die Detektion von A $\beta$ -Isoformen im CSF dazu dienen, den fortschreitenden kognitiven Verfall sowie neue AD-Therapeutika in klinischen Tests zu beurteilen.

#### **1.4.2 Neue Ansätze zur Erforschung von CSF-Biomarkern**

Neben den erwähnten Biomarkern, die direkte und spezifische krankheits-relevante Veränderungen darstellen, geht die Erforschung von Biomarkern immer mehr in Richtung komplexer proteomischer, metabolomischer und lipidomischer Analysen im CSF. Durch die Vielzahl der veränderten biochemischen Prozesse in der sporadischen AD ist es sehr wahrscheinlich, dass eine präzise AD-Diagnostik eher durch die Bestimmung mehrerer spezifischer Biomarker möglich sein wird. Mit Hilfe neuer Techniken, vor allem massenspektrometrischer Methoden wie MALDI-TOF („matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight“), SELDI-TOF („surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight“) oder LC-ESI („liquid chromatography-electrospray ionization“), können komplexe Analysen durchgeführt werden und beispielsweise vollständige CSF-Proteome größerer Patientengruppen mit angemessenem Zeitaufwand untersucht werden. Verschiedene Studien konnten dabei Unterschiede in den CSF-Konzentrationen folgender Proteine feststellen:  $\alpha_1$ -Antitrypsin,  $\beta_2$ -Mikroglobulin, APOA1, APOE, Prostaglandin-H<sub>2</sub>-D-Isomerase, Cystatin und Transthyretin (Hesse et al., 2001; Korolainen et al., 2007; Sihlbom et al., 2008; Zetterberg et al., 2008; Simonsen et al., 2008). In einer unabhängigen Doppelblind-Studie von insgesamt 58 Personen (30 AD-Patienten und 28 gesunden Personen) konnte durch die Kombination von einigen der aufgeführten Marker eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 97% erreicht werden (Simonsen et al., 2008).

Die parallele Bestimmung von verschiedenen Biomarkern mit diesen Analysemethoden, kann möglicherweise in Zukunft die klinische Diagnostik der AD schon in einem frühen Stadium erlauben.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Publikationen der letzten Jahre zeigen, dass für die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit besonders die hydrophoben A $\beta$ -Peptide mit einer Länge von 42 Aminosäuren verantwortlich sind. Diese neurotoxischen Peptide entstehen durch sequenzielle Prozessierung des Substrats APP  $\beta$ -CTF (C99) durch die  $\gamma$ -Sekretase und werden schließlich in den Extrazellularraum freigesetzt. Dabei gehen die beiden Hauptformen A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 aus zwei voneinander getrennten Produktlinien hervor. In den letzten Jahren konnte überzeugend nachgewiesen werden, dass lösliche, niedere A $\beta$ -Oligomere die Integrität von Synapsen schädigen können und für neuronalen Zelltod verantwortlich sind. Der molekulare Mechanismus über den A $\beta$ 42 neurotoxisch wirkt, konnte bisher jedoch nicht abschließend geklärt werden.

In dem vorliegenden Promotionsprojekt wurden zwei Teilprojekte verfolgt. Im ersten Teil wurde der Schnittmechanismus der  $\gamma$ -Sekretase intensiv analysiert. Anhand von ausgewählten APP FAD-Mutationen wurde die Bildung der verschiedenen A $\beta$ -Formen ausführlich untersucht, sowie der genaue Spaltmechanismus des Substrats ermittelt. Ein Ziel der Arbeit liegt in der Aufklärung der Frage, wodurch APP FAD-Mutationen die Produktion unterschiedlicher A $\beta$ -Spezies beeinflussen, und wie schließlich die charakteristische Erhöhung des A $\beta$ 42/40-Verhältnisses begründet werden kann.

Im zweiten Teil sollte ausführlich die Interaktion verschiedener A $\beta$ -Spezies mit ausgewählten Lipiden der Plasmamembran analysiert und charakterisiert werden. Hierbei sollte untersucht werden, ob die gering bzw. nicht toxisch wirkenden A $\beta$ -Formen A $\beta$ 40 und die GxxxG-Mutante A $\beta$ 42 G33I im Vergleich zum neurotoxischen A $\beta$ 42 unterschiedlich mit bestimmten Membranlipiden interagieren. Vor allem sollte die Analyse der Bindung von oligomeren Varianten der Peptide an Lipide Auskunft darüber geben, welche Auswirkungen der Oligomerisierungszustand auf diese Interaktion besitzt. Weiterhin wurde analysiert, über welche Region innerhalb der A $\beta$ -Sequenz die Interaktion speziell mit Sphingomyelin vermittelt wird.

## 2 ERGEBNISSE

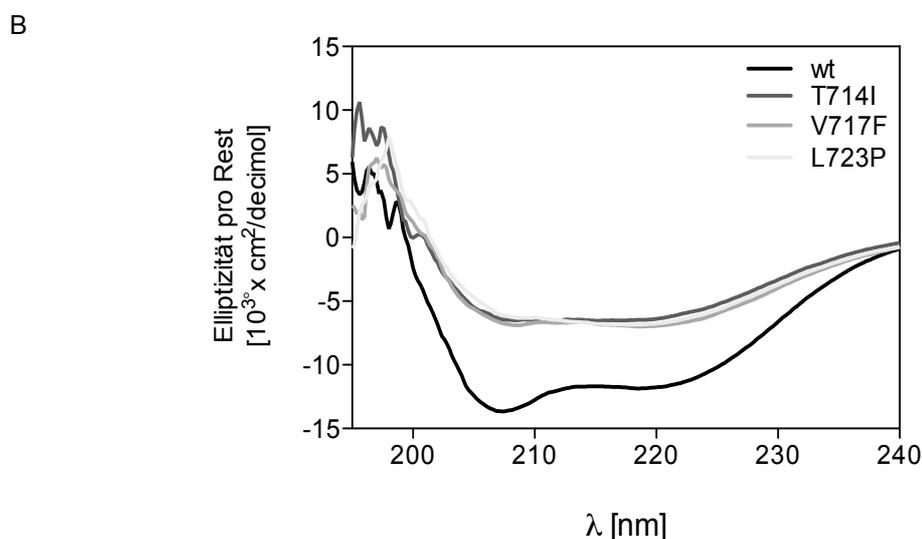
### 2.1 Analyse der Prozessierung von APPwt und den FAD-Mutanten T714I, V717F und L723P

Bisherige Forschungsergebnisse zeigten, dass familiäre APP Mutationen vorwiegend das Verhältnis von A $\beta$ 42 zu A $\beta$ 40 zugunsten des toxischen und schnell aggregierenden A $\beta$ 42 verschieben (Suzuki et al., 1994; Bergman et al., 2003; Hecimovic et al., 2004). Dieser Effekt kann auf zwei ursächliche Veränderungen während der  $\gamma$ -Sekretase Prozessierung von APP zurückgeführt werden. Entweder wird die A $\beta$ 42-Produktion quantitativ erhöht, oder es wird verhältnismäßig weniger A $\beta$ 40 hergestellt. In beiden Fällen kommt es zu einer Verschiebung des A $\beta$ 42/40-Verhältnisses in Richtung A $\beta$ 42. A $\beta$  wird durch einen komplexen Spaltmechanismus durch die  $\gamma$ -Sekretase generiert. Dabei wird das Substrat APP  $\beta$ -CTF in einem sukzessiven Mechanismus, durch C-terminale Abspaltung von Tri- und Tetrapeptiden prozessiert (Qi-Takahara et al., 2005; Takami et al., 2009). Die Besonderheit dieses Mechanismus ist, dass der erste Schnitt, der sogenannte  $\epsilon$ -Schnitt, an zwei verschiedenen Positionen stattfinden kann. An welcher Position sich dieser Schnitt genau ereignet, ist ausschlaggebend für die Produktion von entweder A $\beta$ 42 oder A $\beta$ 40. Diese als Produktlinienhypothese bekannte Theorie scheint durch APP FAD-Mutationen, die im Prozessierungsbereich der  $\gamma$ -Sekretase liegen, maßgeblich beeinflusst zu werden. Die genaue Auswirkung von APP FAD-Mutationen auf den Spaltungsprozess sind bisher unbekannt. Anhand von drei familiären Mutationen wurde untersucht an welcher Position der Wechsel der Produktlinie stattfindet.

#### 2.1.1 Bestimmung der Sekundärstruktur der aufgereinigten C100-Varianten

Der Prozessierungsmechanismus der  $\gamma$ -Sekretase wurde mittels *in vitro*-Tests untersucht, bei denen das rekombinant hergestellte APP C-terminale Fragment C100 als Substrat verwendet wurde. C100 besteht aus dem humanen C99 und einem N-terminalen Methioninrest zur Expression in *E.coli*. Es wurde aus bakteriellen Einschlusskörpern extrahiert, über den C-terminalen Hexa-Histidin-Marker aufgereinigt und in 0,3% SDS-haltigem Puffer renaturiert. Schließlich liegt das aufgereinigte C100 im nativen und stabilen Zustand vor (Botev et al., 2011). Um die Sekundärstruktur des aufgereinigten C100wt und der FAD C100-Varianten (T714I, V717F und L723P) genauer zu bestimmen, wurden diese mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie, „circular dichroism“) analysiert (Abb. 7). Für den Wildtyp zeigte sich eine vorwiegend  $\alpha$ -helikale Konformation, charakterisiert durch die beiden Minima bei 208 und 222 nm. Ein struktureller Unterschied war hingegen für die drei APP FAD Mutanten T714I, V717F und L723P erkennbar. Die gemessenen Spektren für die Mutanten deuten zwar ebenfalls auf einen hohen Anteil helikaler Strukturen hin, die Kurven weisen jedoch, speziell für die Mutante L723P, auch auf partielle  $\beta$ -Faltblattstrukturen hin.

A C100: MDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIVIVITL  
VMLKKKQYTSIHGGVVEVDAAVTPEERHLSKMQQNGYENPTYKFFEQMQN  
GSRSHHHHHH

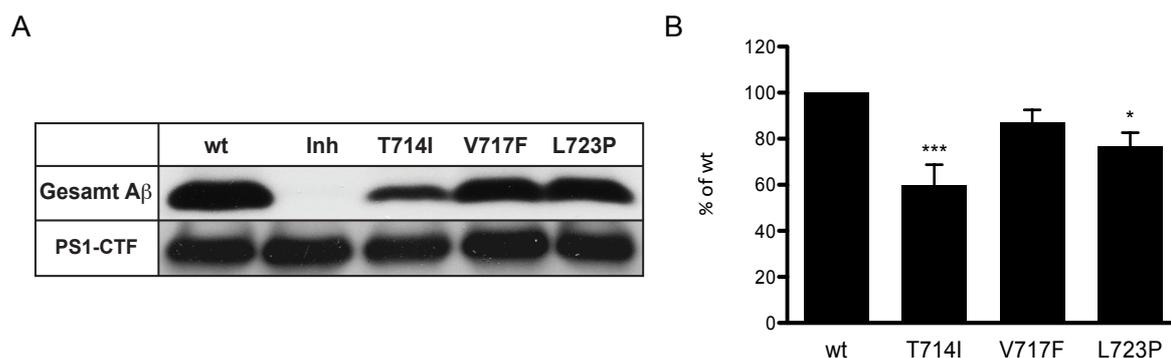


**Abb. 7: Bestimmung der Sekundärstruktur von C100wt, T714I, V717F und L723P mit CD-Spektroskopie.** (A) Sequenz des rekombinant hergestellten C100, unterstrichen ist die humane C99-Sequenz. (B) CD-Spektren des aufgereinigten C100wt und der Mutanten T714I, V717F und L723P. Die Proben wurden bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  im CD-Spektrometer vermessen. Spektren mit charakteristischen Minima bei 208 und 222 nm weisen auf eine überwiegend  $\alpha$ -helikalen Konformation des untersuchten Moleküls hin. Ein einzelnes Minimum bei etwa 218 nm deutet auf  $\beta$ -Faltblattstrukturen innerhalb des Moleküls hin. Sind beide Strukturen innerhalb eines Moleküls vertreten, so können Mischspektren entstehen.

### 2.1.2 Gesamt-A $\beta$ - und -AICD-Produktion durch die Mutanten T714I, V717F und L723P

Um zu untersuchen, welche Unterschiede bei der  $\gamma$ -Sekretase-Prozessierung von familiären APP Mutanten auftreten, wurde mittels *in vitro*-Test rekombinant hergestelltes C100 analysiert. Dieses enthielt je eine der drei bekannten familiären Mutationen, Austrian- (T714I), Indiana- (V717F) oder Australian-Mutation (L723P), die im Vergleich zum Wildtyp analysiert wurden. Die Position der ersten beiden Mutationen befindet sich innerhalb des Spaltbereiches der  $\gamma$ -Sekretase, lokalisiert an Stelle 43 und 46. Die Mutation L723P ist hingegen an Position 52 C-terminal außerhalb des Prozessierungsbereiches lokalisiert (Positionen nach A $\beta$ -Nummerierung). Zuerst wurde Gesamt-A $\beta$ , also alle produzierten A $\beta$ -Spezies, über SDS-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse detektiert (Abb. 8).

Die Gesamt-A $\beta$  Produktion der Mutanten war im Vergleich zum Wildtyp sehr unterschiedlich (Abb. 8A). Die Mutante T714I produzierte nur geringe Mengen A $\beta$  und L723P weniger als V717F. Die Mutante V717F und der Wildtyp hingegen produzieren annähernd gleichviel Gesamt-A $\beta$ . Durch den Einsatz des Inhibitors L685, der im aktiven Zentrum bindet und den  $\epsilon$ -Schnitt verhindert, wurde die Reaktion vollständig unterbunden, was auf eine spezifische Reaktion der  $\gamma$ -Sekretase hinwies. Die gleichmäßige Beladung der Proben mit dem Enzymkomplex wurde mittels Detektion des PS1-CTF nachgewiesen.

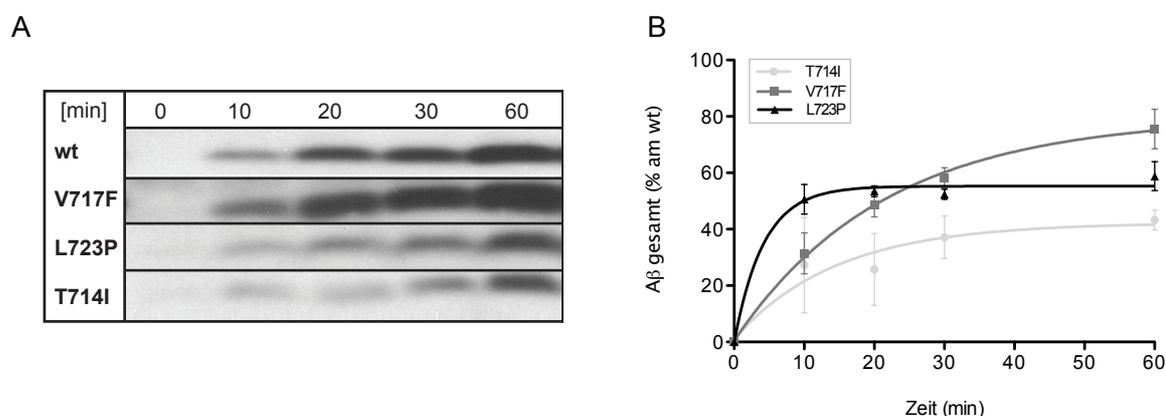


**Abb. 8: Prozessierung des rekombinanten Substrats C100 im  $\gamma$ -Sekretase *in vitro*-Test.** Der Enzymkomplex wurde durch Aufreinigung von Zellmembranen aus SH-SY5Y Zellen angereichert und für 60 min mit 250 nM C100 inkubiert. (A) Gesamt-A $\beta$  Produktion des Wildtyps und der Mutanten nach Auftrennung über SDS-PAGE und Detektion mit dem Antikörper W0-2 im Western Blot. Als Ladekontrolle wurde der Blot zusätzlich gegen PS1-CTF mit dem Antikörper APS-18 entwickelt. Durch Zugabe des  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors L685 (Inh) wurde die Spezifität der Reaktion bestätigt. (B) Densitometrische Auswertung der Gesamt-A $\beta$  Produktion. Die Werte für den Wildtyp wurden auf 100% gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler, n=5. Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp an mit \*  $p < 0,05$  und \*\*\*  $p < 0,001$ , Welch t-Test.

Die densitometrische Auswertung von fünf Western Blots ergab eine signifikant erniedrigte Gesamt-A $\beta$ -Produktion der Mutanten T714I und L723P gegenüber dem Wildtyp. Wildtyp und V717F unterschieden sich jedoch nicht (Abb. 8B).

Aus diesem Ergebnis resultierte die Frage, ob die beiden Mutanten tatsächlich zu einer quantitativ geringeren A $\beta$ -Produktion führten oder ob es auch Unterschiede in der Prozessierungsgeschwindigkeit gibt. Dafür wurde die A $\beta$ -Produktion über einen Zeitverlauf von 60 min mittels  $\gamma$ -Sekretase *in vitro*-Test untersucht (Abb. 9).

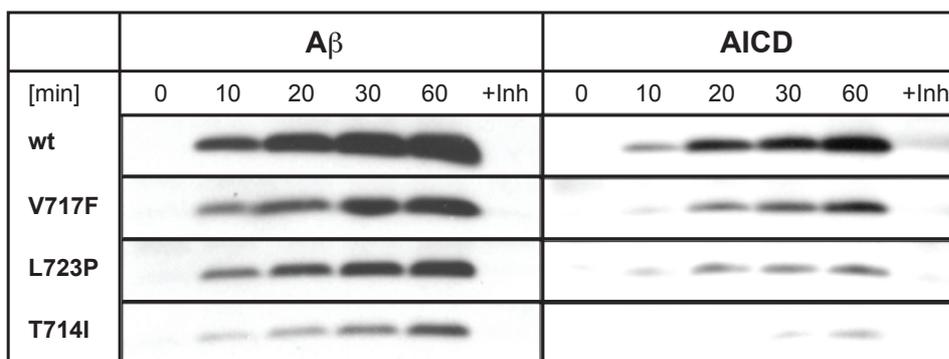
In diesem Experiment wurde beobachtet, dass die A $\beta$ -Produktion der Mutanten T714I und L723P zu jedem gewählten Zeitpunkt geringer war, als die von V717F und dem Wildtyp. Ein Vergleich der absolut produzierten A $\beta$ -Menge war nach 60 min hingegen nicht möglich, da bis zu diesem Zeitpunkt nicht durchgehend ein Gleichgewichtszustand eintrat. Der Versuch legte jedoch nahe, dass die APP FAD-Mutanten nicht nur die Spalteffizienz der  $\gamma$ -Sekretase erniedrigen, sondern auch insgesamt weniger A $\beta$  herstellen.



**Abb. 9: Zeitverlauf der A $\beta$ -Produktion über 60 min im  $\gamma$ -Sekretase *in vitro*-Test.** (A) Für jede Mutante und jeden Zeitpunkt wurde ein separater Ansatz durchgeführt. Das produzierte Gesamt-A $\beta$  wurde nach SDS-PAGE im Western Blot durch den Antikörper W0-2 nachgewiesen. (B) Densitometrische Auswertung der Gesamt-A $\beta$  Produktion. Die Werte für den Wildtyp wurden auf 100% gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler, n=4.

Bei der initialen Spaltung des C100 durch die  $\gamma$ -Sekretase entsteht neben den langen A $\beta$ -Formen A $\beta$ 48 und A $\beta$ 49 auch die APP Intrazelluläre Domäne (AICD) mit den Längen 49-99 und 50-99. Der Vergleich der Gesamt-AICD-Produktion kann einen weiteren Hinweis dafür liefern, inwiefern APP FAD-Mutationen diesen Schnitt beeinflussen können und ob die Spalt-effizienz des  $\epsilon$ -Schnitts verändert ist.

Dafür wurde die Produktion von Gesamt-A $\beta$  und dem Spaltprodukt AICD zu den Zeitpunkten 0, 10, 20 30 und 60 min miteinander verglichen. Das Experiment wurde analog dem vorangegangenen Versuch mit Hilfe des  $\gamma$ -Sekretase *in vitro*-Tests durchgeführt. Neben neben Gesamt-A $\beta$  wurde zusätzlich das produzierte AICD über Immunpräzipitation aus dem Reaktionsgemisch aufkonzentriert und über den C-terminalen Histidin-Marker im Western Blot nachgewiesen. Für die gewählten Zeitpunkte konnten deutliche Unterschiede des Gesamt-AICD Levels zwischen Wildtyp und den drei APP FAD Mutanten festgestellt werden (Abb. 10).



**Abb. 10: Vergleich von Gesamt-A $\beta$  und -AICD über einen Zeitverlauf von 60 min.** Mittels  $\gamma$ -Sekretase *in vitro*-Test wurde Gesamt-A $\beta$  und -AICD zu den beschriebenen Zeitpunkten untersucht. Die Reaktionen wurden durch Zugabe des spezifischen  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors L685 gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze über eine Wessel-Flügge Fällung präzipitiert und die Peptide mittels SDS-PAGE getrennt. Im Western Blot wurde A $\beta$  mit dem Antikörper W0-2 detektiert und AICD mit dem anti-His-Tag Antikörper gegen das C-Terminale His-Tag des Substrats C100, n=3.

Mit diesem experimentellen Ansatz konnte gezeigt werden, dass sich die untersuchten APP FAD Mutanten schon beim ersten Prozessierungsschritt, dem  $\epsilon$ -Schnitt, unterscheiden. Die Effizienz, mit der die jeweiligen Substrate von der  $\gamma$ -Sekretase geschnitten werden, wird durch die FAD-Mutationen scheinbar maßgeblich beeinflusst. Die erniedrigte AICD-Produktion der Mutanten korreliert dabei mit der jeweiligen Reduktion des Gesamt-A $\beta$  (Abb. 10). Dies kann als weiterer Beleg für eine generell verringerte Prozessierungseffizienz der untersuchten APP FAD-Mutationen durch die  $\gamma$ -Sekretase gewertet werden.

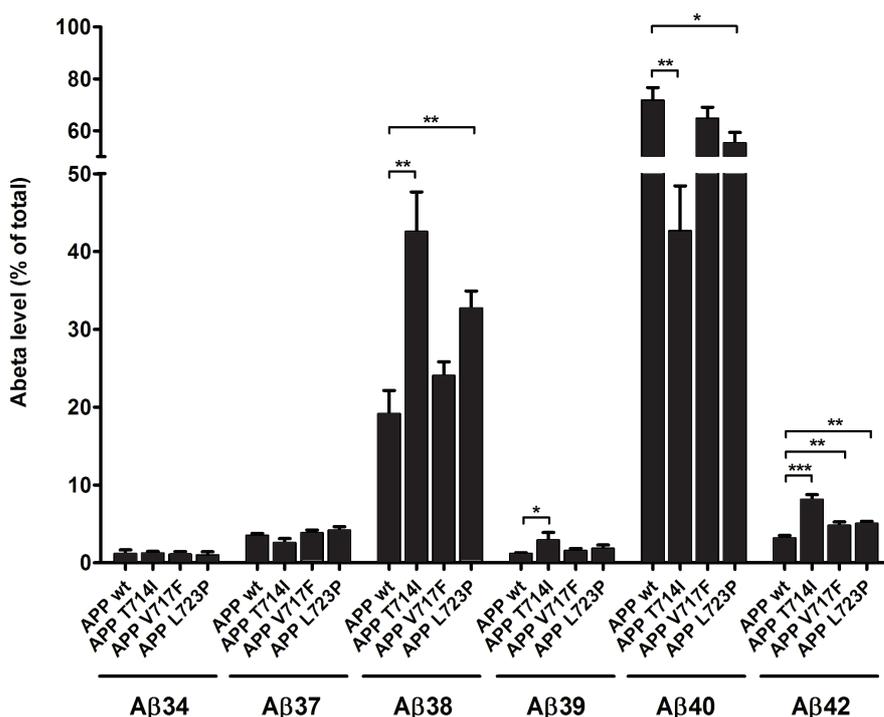
### 2.1.3 Analyse der Produktlinienpräferenz der APP FAD-Mutanten

Um die Produktlinienpräferenz der APP FAD-Mutanten für die A $\beta$ 42-Produktlinie zu untersuchen und die produzierten A $\beta$ -Spezies im Einzelnen zu untersuchen, wurden SH-SY5Y Zel-

len stabil mit volllängen APP bzw. den jeweiligen APP FAD-Mutanten transfiziert und im  $\gamma$ -Sekretase *in vitro*-Test verwendet. ELISA-Analysen wurden durch Fredrik Olsson aus der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Johan Lundkvist (Astrazeneca, Schweden) durchgeführt. Zusätzlich wurde C100 im  $\gamma$ -Sekretase *in vitro*-Test eingesetzt und entstandene A $\beta$ -Spezies mittels Immunpräzipitation aufkonzentriert und per MALDI-MS detektiert.

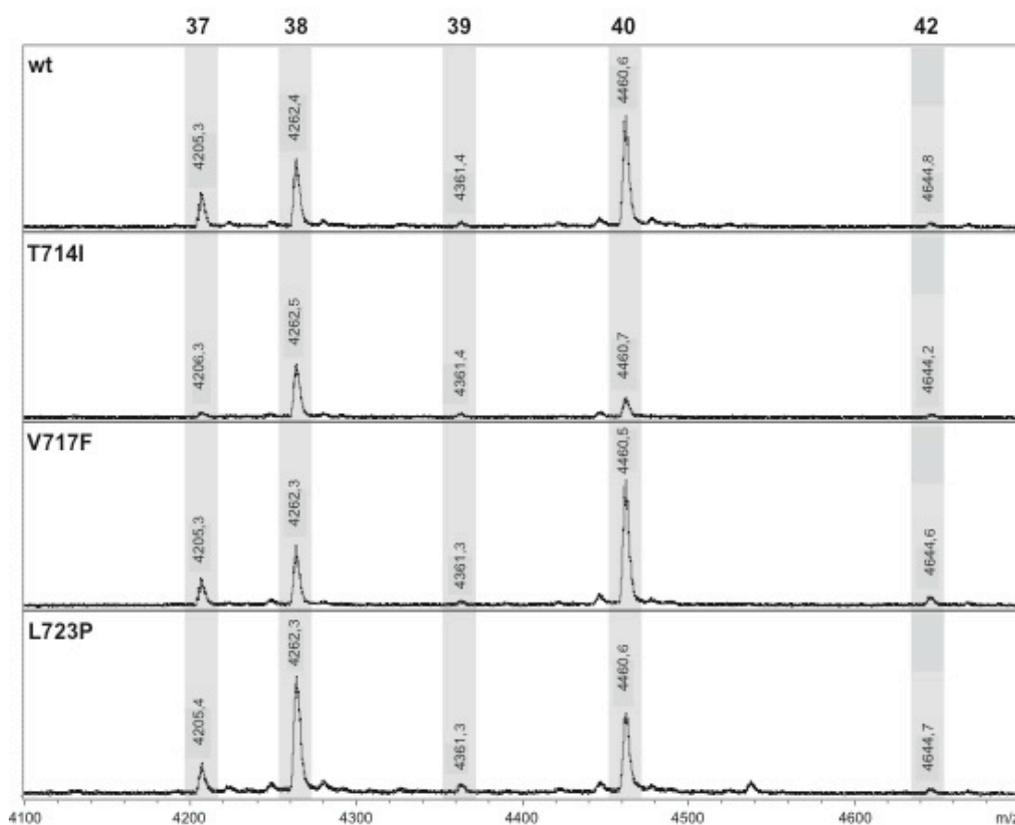
Durch die ELISA-Analyse konnte bestätigt werden, dass APP FAD-Mutationen eine Verlagerung in die A $\beta$ 42-Produktlinie bewirken (Abb. 11). Dies zeigte sich durch eine signifikante Erhöhung der relativen A $\beta$ 42-Menge bei allen drei Mutanten. Dabei enthielt die Mutante T714I mehr als den doppelten Anteil A $\beta$ 42 am Gesamt-A $\beta$  im Vergleich zum Wildtyp. Für die beiden Mutanten T714I und L723P war gleichzeitig auch die A $\beta$ 38 Menge stark erhöht und A $\beta$ 40 - als Produkt der A $\beta$ 40-Linie - vermindert. Die V717F-Mutante führte ebenfalls zu einem erhöhten A $\beta$ 42-Anteil. Gegenüber dem Wildtyp waren jedoch A $\beta$ 40 und A $\beta$ 38 nicht signifikant verändert.

Die Zunahme von A $\beta$ -Spezies der A $\beta$ 42-Produktlinie durch die untersuchten APP FAD-Mutationen scheint daher charakteristisch für familiäre Mutationen zu sein.



**Abb. 11: ELISA-Analyse der A $\beta$ -Produktion durch APP FAD-Mutationen aus isolierten Zellmembranen stabil transfizierter SH-SY5Y-Zellen.** A $\beta$  wurde aus dem Überstand des *in vitro*-Tests mit Spezies-spezifischen Antikörpern detektiert. Die analysierten A $\beta$ -Spezies sind jeweils als Prozentanteil der Gesamt-A $\beta$ -Menge der jeweiligen Mutante angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp an, mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$ , 1-way ANOVA. *In vitro*-Test und Messungen: Fredrik Olsson, Arbeitsgruppe Dr. Johan Lundkvist (Astrazeneca, Schweden)

Durch MALDI-MS-Messungen konnten die Ergebnisse der ELISA-Analyse bestätigt werden (Abb. 12). Um A $\beta$  aus dem  $\gamma$ -Sekretase *in vitro*-Test nachzuweisen, wurde es durch Immunpräzipitation mit dem Antikörper W0-2 aufkonzentriert und anschließend mittels MALDI-MS detektiert. Diese Methode liefert vorwiegend qualitative Ergebnisse und lässt Rückschlüsse auf die verhältnismäßige Verteilung der A $\beta$ -Spezies zueinander zu. Für die Mutanten T714I und L723P wurde eine im Verhältnis gesehen starke Erhöhung von A $\beta$ 38, bei gleichzeitiger Verringerung von A $\beta$ 40 festgestellt. Bei der Mutante V717F war A $\beta$ 40, wie auch die ELISA-Daten zeigten, kaum verändert. A $\beta$ 42 war jedoch leicht erhöht. Die Detektion von A $\beta$ 42 mittels MALDI-MS war vergleichsweise gering, was darauf zurückzuführen ist, dass stark hydrophobe Peptide massenspektrometrisch schwer zu analysieren sind. Sie sind schlechter ionisierbar und aggregieren binnen kurzem.



**Abb. 12: MALDI-MS-Analyse der A $\beta$ -Produktion durch APP FAD-Mutationen aus dem  $\gamma$ -Sekretase *in vitro*-Test.** Das Substrat C100 der drei APP FAD-Mutanten und des Wildtyps wurden im  $\gamma$ -Sekretase *in vitro*-Test 60 min inkubiert. A $\beta$  wurde durch Immunpräzipitation mit dem Antikörper W0-2 aufkonzentriert. Für die MALDI-MS-Analyse wurden die Proben mit Sinapinsäurematrix (SA) kokristallisiert und anschließend vermessen. Grau unterlegte, vertikale Balken heben die detektierten A $\beta$ -Spezies hervor. Die Massen entsprechen der jeweiligen Peptidmasse plus 131 Da für den N-terminal angehängte Methioninrest, welcher für die Expression von C100 in *E.coli* notwendig war. Dargestellt sind ausgewählte Einzelspektren, n=3-6.

Insgesamt zeigten die bisherigen Ergebnisse der drei untersuchten APP FAD-Mutationen im Vergleich zum Wildtyp zweierlei Charakteristika. Erstens beeinflussen sie die Prozessierungseffizienz der  $\gamma$ -Sekretase am initialen  $\epsilon$ -Schnitt. Dies resultierte in einer verminderten Menge von Gesamt-AICD und auch Gesamt-A $\beta$  (Abb. 9 und 10). Zweitens war bei allen drei

FAD-Mutanten - wie mittels ELISA und MALDI-MS ermittelt wurde - eine Erhöhung von A $\beta$ -Produkten der A $\beta$ 42-Produktlinie zu beobachten (Abb. 11 und 12).

Diese Ergebnisse deuten an, dass durch die drei APP FAD-Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp, die Prozessierung der  $\gamma$ -Sekretase verstärkt der A $\beta$ 42-Produktlinie folgt und der Wechsel der Produktlinie vermutlich schon am initialen  $\epsilon$ -Schnitt stattfindet.

In den bisherigen Experimenten wurden jeweils die Endprodukte des sukzessiven Spaltmechanismus der  $\gamma$ -Sekretase untersucht. Das heißt die erzielten Ergebnisse zeigten jeweils die entstandenen A $\beta$ -Spezies zu einem bestimmten Zeitpunkt. Vorläufer-Spaltprodukte, wie z.B. die längeren A $\beta$ s 49, 48, 46 oder 45, konnten nicht detektiert werden. Einerseits weil diese Spezies nur temporäre Übergangszustände sind und schnell zu kürzeren Fragmenten gespalten werden, andererseits erschwert die sehr starke Hydrophobizität eine exakte Analyse. Es ist daher schwierig anhand der verwendeten Methoden ein vollständiges Bild des komplexen Spaltprozesses zu bekommen und daraus die genaue Position zu bestimmen, an dem der Wechsel der Produktlinie durch die APP FAD-Mutationen vollzogen wird.

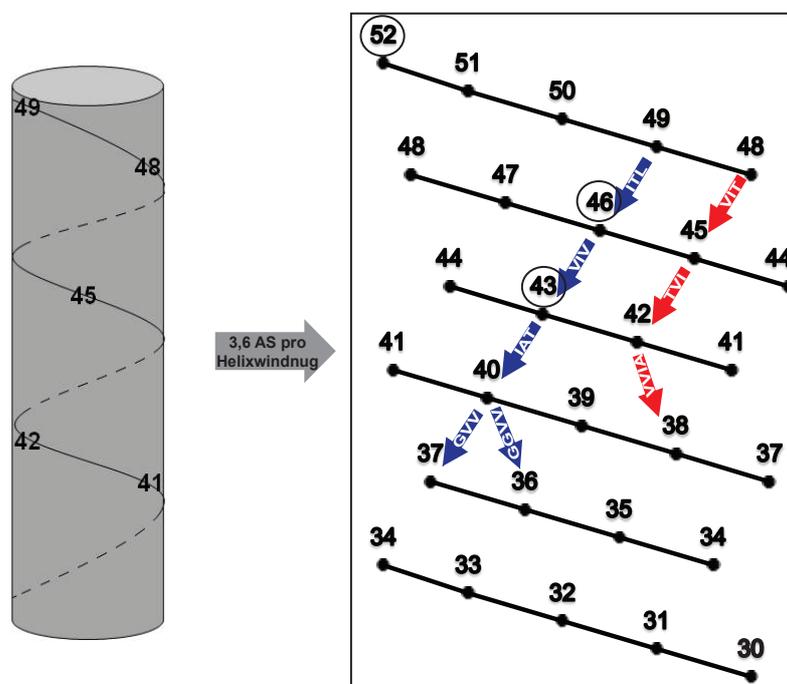
Infolgedessen wurde in Kooperation mit Herrn Dr. Johan Lundkvist (Astrazeneca, Schweden) eine Methode verwendet, die erstmals 2009 von Takami et al. publiziert wurde. Hier werden nicht die entstehenden A $\beta$ -Produkte nachgewiesen, sondern die bei jedem Proteolyseschritt freigesetzten Tri- bzw. Tetrapeptide. Der Vorteil des Nachweises der Tri- und Tetrapeptide besteht darin, dass diese Peptide keine Produkte im Übergangszustand sind sondern Endprodukte. Die Detektion dieser Peptide ist daher ein direkter Beleg dafür, dass ein konkreter Schnitt der  $\gamma$ -Sekretase tatsächlich erfolgt ist.

#### **2.1.4 Tripeptidanalyse der APP FAD-Mutationen mittels $\gamma$ -Sekretase *in vitro*-Test**

Der Tripeptidnachweis wurde in stabil mit APPwt und den jeweiligen APP FAD-Mutationen transfizierten SH-SY5Y Zellen durchgeführt. Dabei wurde vor der Membranpräparation eine Substratanreicherung von  $\beta$ -CTFs durch die Behandlung der Zellen mit dem  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor Semagacestat (Firma Eli Lilly) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellmembranen, die sowohl das Substrat als auch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex enthielten, aufgereinigt. Nach der Inkubation der solubilisierten Membranen wurden die Tripeptide aus dem Reaktionsüberstand mittels Flüssigkeitschromatographie (LC) aufgetrennt und massenspektrometrisch nachgewiesen.

Durch die Messung entsprechender synthetischer Standardpeptide konnten die entstandenen Tri- und Tetrapeptide quantifiziert werden. So war es möglich die Effizienz der einzelnen Spaltereignisse der  $\gamma$ -Sekretase Prozessierung zu beurteilen. Die Ergebnisse wurden übersichtlich durch eine spezielle Art der Darstellung wiedergegeben (Abb. 13). Die helikale Form des membranständigen  $\beta$ -CTF-Substrats wurde dafür auf eine zweidimensionale Fläche projiziert. Eingetragen sind die jeweiligen A $\beta$ -Spezies, die während der Proteolyse entstehen

können. Die Aminosäuresequenz bzw. die gemessene Konzentration (in nM) der einzelnen Tri- bzw. Tetrapeptide die durch einen bestimmten Schnitt entstehen, sind zwischen den entsprechenden A $\beta$ -Spezies eingetragen. Die Experimente zur Detektion der Tri- bzw. Tetrapeptide des Wildtyps und der drei APP FAD-Mutationen wurden von Staffan Schmidt (Astrazeneca, Schweden) mittel LC-ESI-Massenspektrometrie durchgeführt.

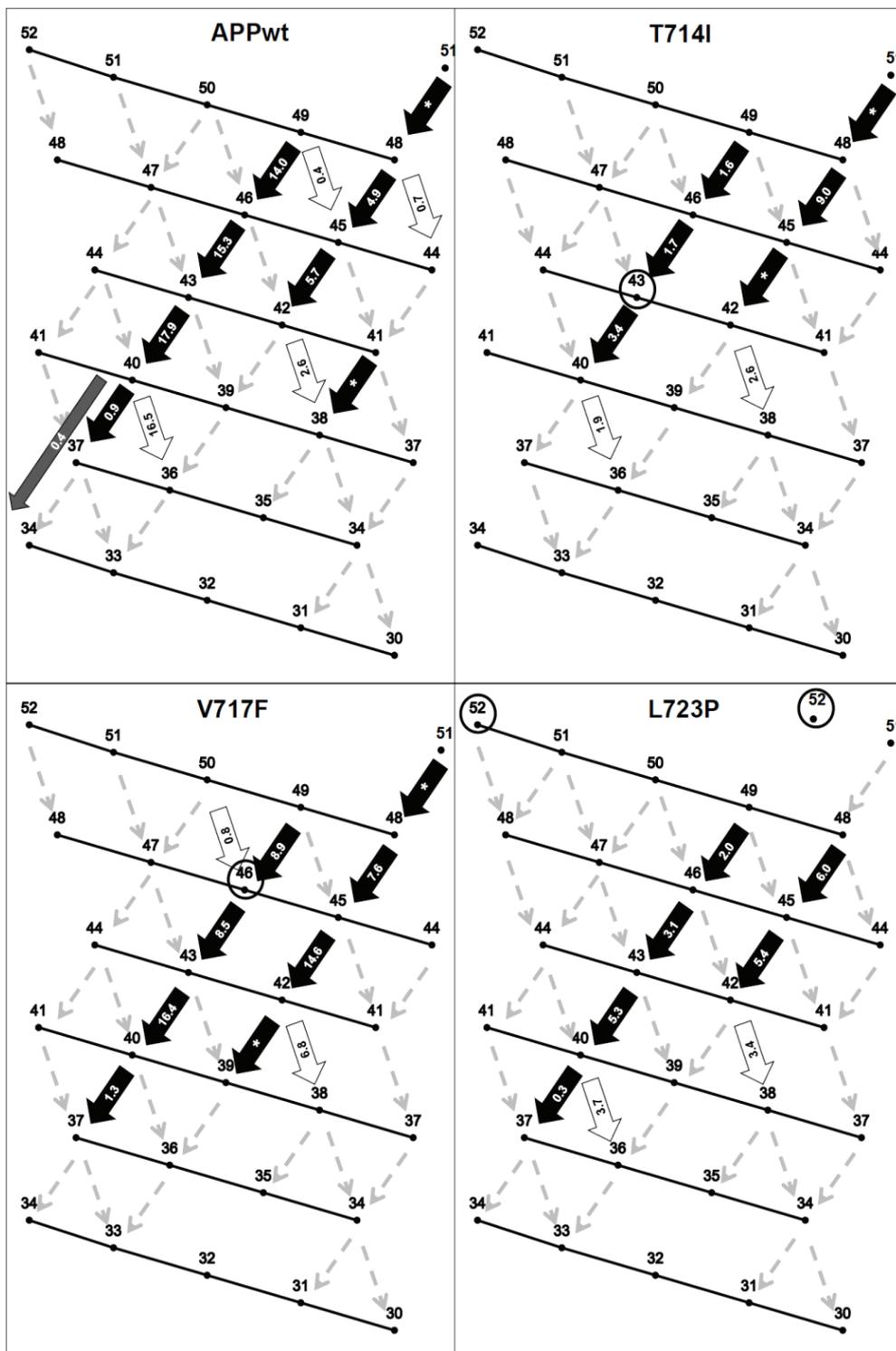


**Abb. 13: Darstellung der Ergebnisse der Tripeptidanalyse.** Das  $\alpha$ -helikale Substrat APP  $\beta$ -CTF wurde auf eine planare Ebene übertragen. Mögliche A $\beta$ -Produkte sind in der Matrix angegeben. Die Produktlinien sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Blau entspricht der A $\beta$ 40- und rot der A $\beta$ 42-Produktlinie. Eingezeichnet ist die Aminosäuresequenz für das Tripeptid des jeweiligen Schnitts (Bsp.: Proteolyse von A $\beta$ 48 zu A $\beta$ 45 setzt das Peptid VIT frei). Die Positionen der drei untersuchten APP FAD-Mutationen sind mit schwarzen Kreisen gekennzeichnet (Schema verändert nach einem Modell von Johan Lundkvist).

Die LC-MS Analyse der Tripeptide, die bei der  $\gamma$ -Sekretase Prozessierung des Substrats  $\beta$ -CTF entstanden sind, ergab ein vollständiges Bild der einzelnen Spaltereignisse (Abb. 14). Vergleicht man die einzelnen Tripeptidkonzentrationen zwischen den Produktlinien, so waren deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp und den drei APP FAD-Mutationen festzustellen. Bei der Analyse des Wildtyp-Substrates war für den  $\epsilon$ -Schnitt der  $\gamma$ -Sekretase Proteolyse das Tripeptid ITL, welches in der A $\beta$ 40-Produktlinie aus der Spaltung von A $\beta$ 49 zu A $\beta$ 46 resultiert, mit einer Konzentration von 14 nM zu detektieren. Das korrespondierende Tripeptid VIT aus der A $\beta$ 42-Produktlinie, das den vollzogenen Schnitt von A $\beta$ 48 zu A $\beta$ 45 darstellt, ergab eine Konzentration von 4,9 nM. Bei diesem Prozessierungsschritt beträgt das Verhältnis zwischen A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Produktlinie für den Wildtyp demnach 1:0,35. Das Wildtyp-Substrat wird daher hauptsächlich über die A $\beta$ 40-Produktlinie abgebaut.

Im Gegensatz dazu zeigten die drei APP FAD-Mutanten ein inverses Bild. T714I und L723P verursachten eine auffällig starke Verschiebung in die A $\beta$ 42-Produktlinie mit Tripeptidverhältnissen für den  $\epsilon$ -Schnitt von 1:5,6 bzw. 1:3. Die Mutation V717F führte auch zu einem Wechsel in die A $\beta$ 42-Produktlinie, deren Stärke aber nicht vergleichbar war mit den beiden anderen Mutationen. Hier kam es vielmehr zu einer Angleichung, ohne Präferenz einer Produktlinie, mit einem Verhältnis von 1:0,85. Diese Ergebnisse belegten eindeutig, dass die

untersuchten APP FAD-Mutationen schon ab der  $\epsilon$ -Schnittstelle zu einem Produktlinienwechsel in die A $\beta$ 42-Linie führen.



**Abb. 14:** Tri- und Tetrapeptidanalyse von APPwt, APPT714I, APPV717F und APPL723P mittels LC-MS. Plasmamembranen aus stabil mit APP transfizierten SH-SY5Y Zellen wurden isoliert und für 1-2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Tri- bzw. Tetrapeptide mittel LC-MS detektiert. Pfeile zwischen den jeweiligen A $\beta$ -Spezies stehen für dieses spezielle Tri- bzw. Tetrapeptid (schwarz: Tripeptid, weiß: Tetrapeptid, grau: Hexapeptid; Sequenz siehe Abb. 13). Die Konzentration des jeweiligen Peptids ist in nM angegeben. \* bedeutet, dass das Peptid detektiert wurde, die Konzentration jedoch nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Die Positionen der untersuchten APP FAD-Mutationen sind mit schwarzen Kreisen umrandet. In vitro-Test und Messungen: Staffan Schmidt, Arbeitsgruppe Dr. Johan Lundkvist (Astrazeneca, Schweden)

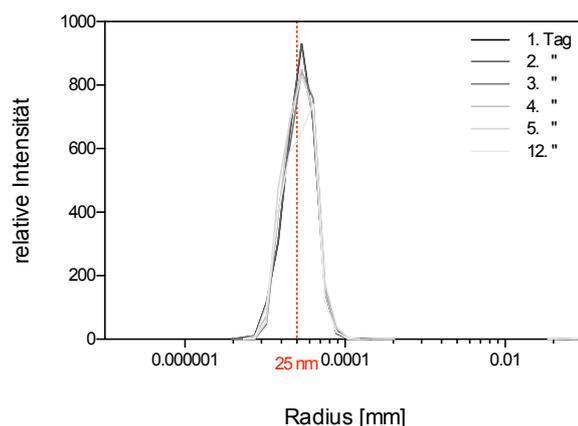
Mithilfe der in Zusammenarbeit mit Johan Lundkvist durchgeführten Tripeptid-Untersuchungen konnte nun eindeutig nachgewiesen werden, dass die Erhöhung der Produkte aus der A $\beta$ 42-Produktlinie ein Spezifikum der untersuchten familiären APP-Mutationen ist. Es konnte gezeigt werden, dass dies eine direkte Folge aus einem veränderten Spaltmuster der  $\gamma$ -Sekretase ist, die schon vom  $\epsilon$ -Schnitt ausgehend zu einem Produktlinienwechsel führt. Die vermehrte Produktion toxischer A $\beta$ 42-Spezies durch die untersuchten APP FAD-Mutationen, könnte daher die Ursache für die besonders frühe Entwicklung der familiären Alzheimer-Krankheit darstellen.

## 2.2 Untersuchung der A $\beta$ -Lipid Interaktion

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die primär toxischen Spezies des A $\beta$ 42-Peptids die löslichen Oligomere sind (Klein et al., 2001; Walsh et al., 2002; Harmeyer et al., 2009). Der molekulare Mechanismus, über den die Toxizität vermittelt wird, ist jedoch bisher unbekannt. Eine Verbindung zwischen Lipiden der Plasmamembran und der Alzheimer Erkrankung sind mehrfach beschrieben worden (Williams et al., 2010, 2011; Kaye et al., 2004). In dieser Arbeit wurden daher die hauptsächlich in der äußeren Plasmamembranschicht präsenten Lipide, als eine mögliche Zielstruktur für die A $\beta$ -vermittelte Neurotoxizität experimentell untersucht.

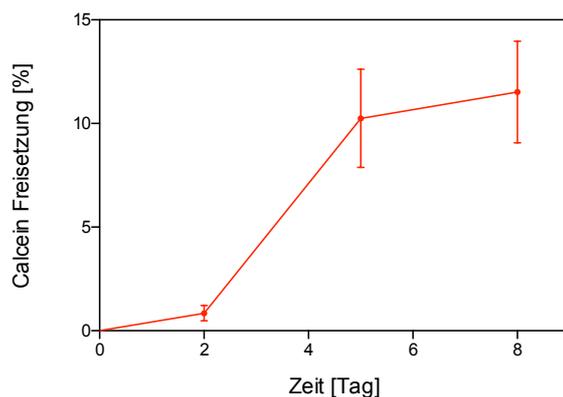
### 2.2.1 Liposomenstabilität und Liposomenintegrität

Für die folgenden Experimente wurden aus den entsprechenden Lipiden ausschließlich Liposomen mit einem Radius von 25 nm hergestellt, sogenannte „small unilamellar vesicles“ (SUVs). Für die Herstellung der Liposomen wurde bei der Extrusion des jeweiligen Lipidgemisches eine Polycarbonat-Membran mit einer Porengröße von 0,05  $\mu$ m benutzt. Um die Größenverteilung der produzierten Liposomen zu kontrollieren und die Stabilität über einen experimentellen Zeitraum von mindestens einer Woche beurteilen zu können, wurden mit frisch hergestellten PC-Liposomen über 12 Tage exemplarische Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung durchgeführt. Die Analyse zeigte eine einheitliche Größenverteilung mit einem durchschnittlichen Radius von 25 nm, der sich in dem Zeitraum von 12 Tagen nicht maßgeblich veränderte (Abb. 15).



**Abb. 15: Messung der Größenverteilung einer Phosphatidylcholin-Liposomenpräparation mittels dynamischer Lichtstreuung.** Die Einzelmessungen ergaben, dass die Größenverteilung der Liposomen mit einem Radius von 25 nm (Sollradius in rot eingezeichnet) über einen Zeitraum von 12 Tagen stabil war. Dieser Kontrollversuch zeigte somit, dass die Liposomen in einem Zeitraum von 7-10 Tagen für Experimente verwendet werden können und in dieser Zeit eine konstant stabile Form vorliegt.

Neben der Stabilität und Größe der verwendeten Liposomenpräparationen wurde mittels Calcein-gefüllter Liposomen deren Dichtigkeit bzw. Integrität bestimmt. Hierfür wurde die freigesetzte Fluoreszenz Calcein-gefüllter Liposomen über einen Zeitraum von acht Tagen gemessen. Die einzelnen Messwerte sind in Prozent der Gesamtfluoreszenz nach Auflösung der Liposomen mit 0,1% Triton-X am achten Tag angegeben (Abb. 16). Der gemessene Fluoreszenzwert der ersten Messung wurde als Nullwert definiert.

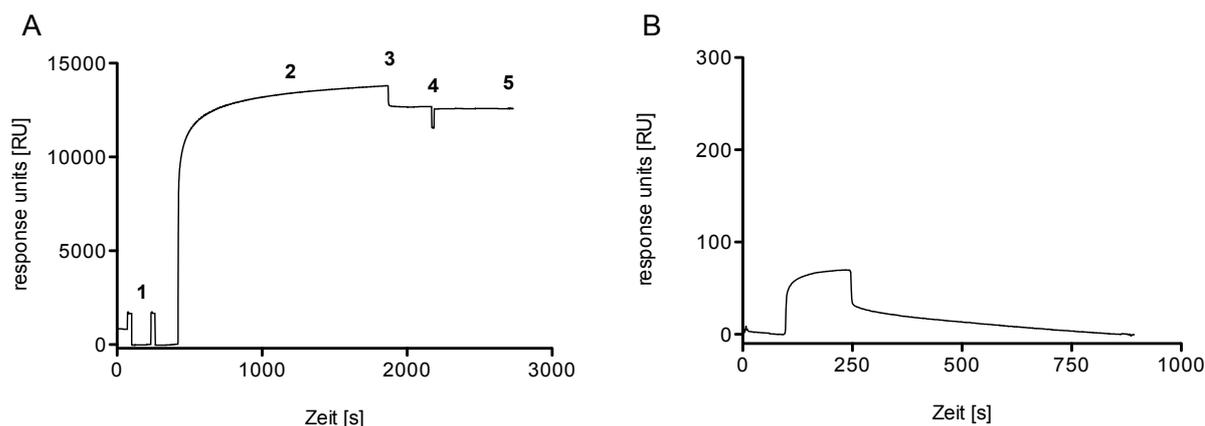


**Abb. 16: Messung der Liposomenintegrität mittels Calcein-gefüllter Phosphatidylcholin-Liposomen.** Die Messung zeigte eine maximale Calcein-Freisetzung von ca. 10% gegenüber der Gesamtfluoreszenz nach Auflösung der Liposomen mit 0,1% Triton-X nach einem Zeitraum von insgesamt acht Tagen. (n=3)

Durch diese beiden Kontrollmessungen konnte schließlich festgestellt werden, dass die verwendeten Liposomenpräparationen, über einen Zeitraum von mindestens einer Woche in Größe und Integrität stabil sind und in dieser Zeit mit gleichbleibender Qualität für verschiedene Experimente verwendet werden können.

### 2.2.2 *In vitro*-Untersuchung der Bindungseigenschaften von A $\beta$ -Peptiden an neuronale Plasmamembranlipide

Um die Interaktion von Lipiden der eukaryotischen Plasmamembran mit verschiedenen A $\beta$  Peptiden in Echtzeit zu untersuchen, wurden Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie-Analysen („surface plasmon resonance“, SPR) durchgeführt. Für die Messungen wurden ansteigende Konzentrationen frisch gelöster, synthetischer A $\beta$ -Peptide über die mit entsprechenden Liposomen beschichtete Sensorchipoberfläche gegeben. Dabei wurde für jede Peptidkonzentration eine einzelne Flusszelle verwendet und die Oberfläche für jede weitere Messung neu mit Lipiden gekoppelt. Hierdurch sollten mögliche Fehler ausgeschlossen werden, die durch eine unvollständige Regeneration der injizierten Peptide bei Verwendung einer einzelnen Lipidoberfläche entstehen können. Die Liposomen wurden nach dem beschriebenen Protokoll (siehe Methodenteil) auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert mit ca. 10.000-12.000 RU abhängig vom verwendeten Lipidgemisch (Abb. 17A). Um unspezifische Wechselwirkungen von A $\beta$ -Peptiden mit der unbeschichteten Chipoberfläche auszuschließen, wurde auf die mit Liposomen beladene Oberfläche kurzzeitig eine Lösung aus 0,1 mg/ml Rinder Serum Albumin (BSA) zur Kontrolle injiziert (Abb. 17B). BSA bindet typischerweise mit ca. 1000 RU auf einer unvollständig mit Liposomen beschichteten Oberfläche. Ein Wert unter 100 RU hingegen bedeutet, dass die Oberfläche mit Liposomen abgesättigt wurde und unspezifische Bindungsereignisse weitestgehend ausgeschlossen werden können (siehe „Biacore Sensor Surface Handbook“).



**Abb. 17: Liposomen-Immobilisierung und Oberflächentest mit BSA.** (A) Repräsentatives Sensogramm der Immobilisierung von Phosphatidylcholin Liposomen. Zuerst wurde die Oberfläche mit zwei kurzen Injektionen 40mM Octylglycosid gereinigt (1). Anschließend wurde die Liposomenlösung mit einer Flussrate von 2  $\mu$ l/min über die Chipoberfläche gegeben (2) und nach 1500 sec beendet (3). Um die Oberfläche von lose assoziierten Liposomen zu säubern wurde kurz 100 mM NaOH bei einer Flussrate von 100  $\mu$ l/min eingespritzt (4). Anschließend entstand eine stabile Basislinie (5). (B) Repräsentativer Oberflächentest mit einer 0,1 mg/ml BSA-Lösung. Eine unvollständig beschichtete Oberfläche bindet typischerweise ca. 1000 RU BSA, eine entsprechend vollständig beladenen unter 100 RU.

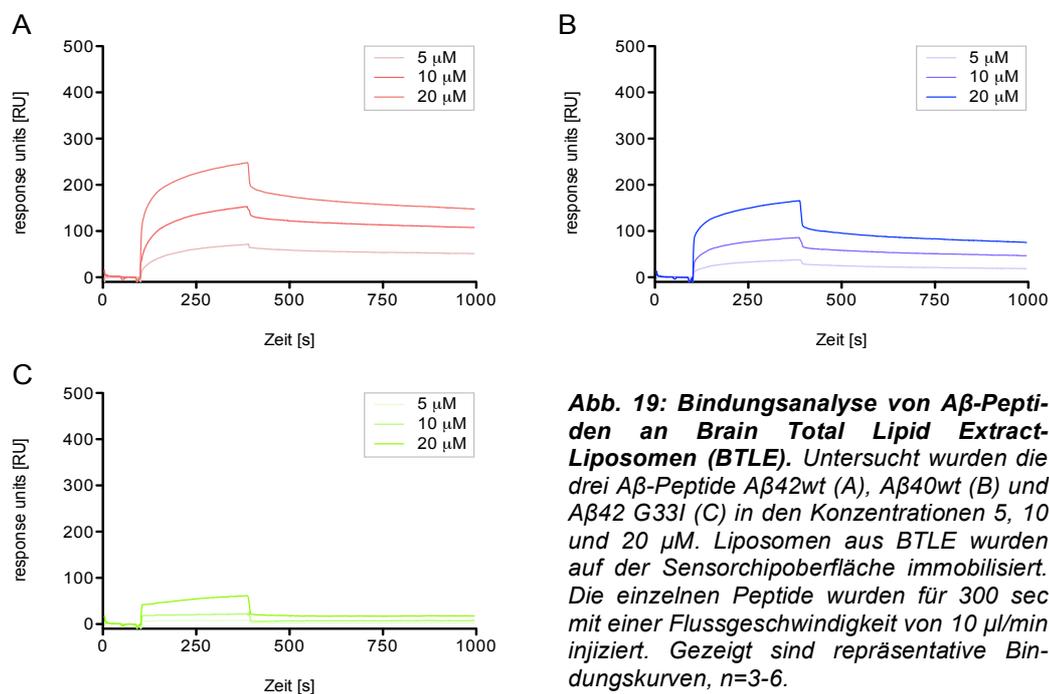
Im Folgenden wurde die Interaktion der zwei Hauptprodukte der amyloidogenen Prozessierung, A $\beta$ 42wt und A $\beta$ 40wt sowie die GxxxG-Mutante A $\beta$ 42 G33I an verschiedene Lipide untersucht. Diese Peptide unterscheiden sich einerseits stark in ihren Oligomerisierungseigenschaften und in ihrer Toxizität. Andererseits besitzen die Peptide auch eine sehr unterschiedliche Hydrophobizität, die speziell für die Bindung an Lipide von Bedeutung sein könnte. Daher wurde aus der jeweiligen Aminosäuresequenz, die Hydrophobizität nach dem GRAVY-Index („Grand average of hydrophobicity“) berechnet (Abb. 18).

A $\beta$ 40wt:	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVV
GRAVY:	0.0575
A $\beta$ 42wt:	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
GRAVY:	0.20476
A $\beta$ 42 G33I:	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIILMVGGVVIA
GRAVY:	0.32143

**Abb.18: Berechnung der Hydrophobizität von A $\beta$ 40wt, A $\beta$ 42wt und A $\beta$ 42 G33I.** Die Kalkulation des GRAVY-Wertes wird aus der Summe der Hydrophobizitätswerte der einzelnen Aminosäuren (nach Kyte und Doolittle, 1982) geteilt durch die Anzahl der Aminosäuren des Peptids berechnet. Ein positiver Wert entspricht besonders hydrophoben, ein negativer hydrophilen Eigenschaften.

Aus der Berechnung des GRAVY-Wertes ergab sich mit 0,056 die geringste Hydrophobizität für A $\beta$ 40wt und mit 0,205 ein ca. vierfach erhöhter Wert für A $\beta$ 42wt. Die Substitution von Glycin zu Isoleucin erhöht den GRAVY-Wert auf 0,32.

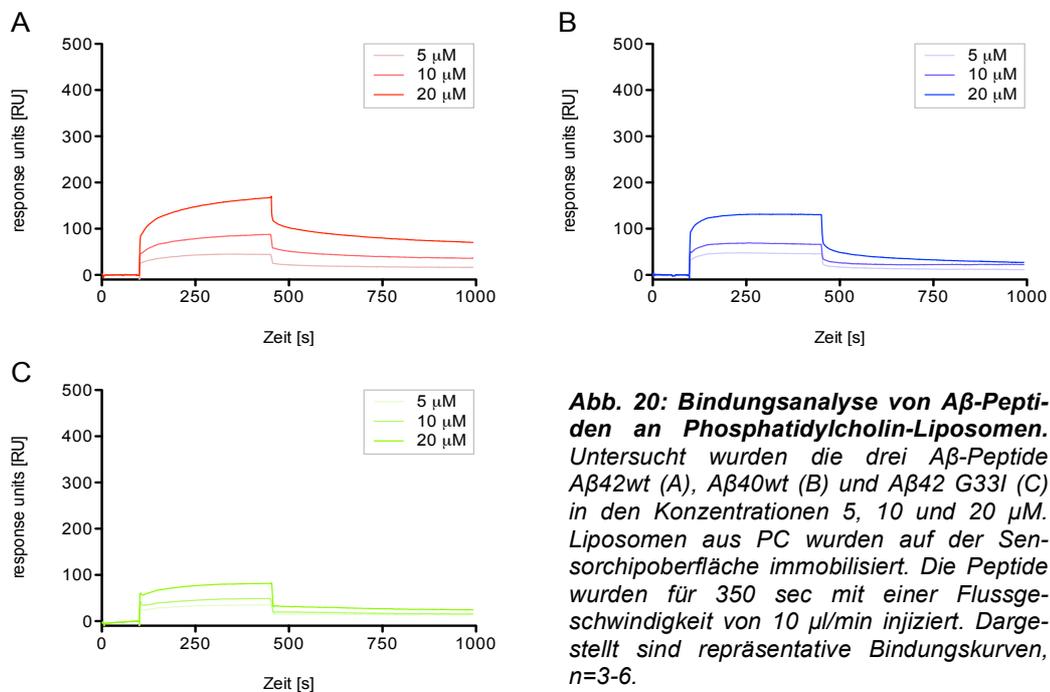
Zunächst wurde die Bindung des neurotoxischen Peptids A $\beta$ 42wt und die gering bzw. nicht toxischen Peptide A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I (Harmeier et al., 2009; Munter et al., 2007) auf Liposomen eines Gesamt-Lipidextraktes aus Schweinehirn („Brain Total Lipid Extract“, BTLE) analysiert. A $\beta$ 42wt bindet spezifisch und mit einer hohen, konzentrationsabhängigen Assoziationsrate an die BTLE-Lipidoberfläche (Abb. 19A). A $\beta$ 40wt hingegen assoziiert schwächer und A $\beta$ 42 G33I bindet kaum an BTLE (Abb. 19B und 19C). Vergleicht man die RU-Werte am Ende der Dissoziation die gebundenes, nicht vollständig dissoziiertes Peptid darstellen, so ergibt sich ein ähnliches Bild. A $\beta$ 42wt verbleibt überwiegend auf der Lipidoberfläche und dissoziiert sehr langsam. A $\beta$ 40wt dissoziiert schneller und A $\beta$ 42 G33I fast vollständig von der BTLE-Oberfläche.



**Abb. 19: Bindungsanalyse von A $\beta$ -Peptiden an Brain Total Lipid Extract-Liposomen (BTLE).** Untersucht wurden die drei A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 42wt (A), A $\beta$ 40wt (B) und A $\beta$ 42 G33I (C) in den Konzentrationen 5, 10 und 20  $\mu$ M. Liposomen aus BTLE wurden auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert. Die einzelnen Peptide wurden für 300 sec mit einer Flussgeschwindigkeit von 10  $\mu$ l/min injiziert. Gezeigt sind repräsentative Bindungskurven, n=3-6.

Aus den Ergebnissen der Bindungsanalyse der drei Peptide mit der BTLE-Oberfläche ließ sich ein generell hohes Interaktionsverhalten des A $\beta$ 42wt-Peptids mit dem Gemisch von Lipiden der neuronalen Plasmamembran ableiten. Demgegenüber ergaben die Bindungskurven der beiden anderen Peptide eine auffällig geringere Interaktion mit dieser Lipidoberfläche. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, welche Lipide aus der extrazellulären Membranschicht für diese hohe Interaktion verantwortlich sein könnten. Dazu wurde die Interaktion dieser drei A $\beta$ -Peptide mit den primär in neuronalen Zellmembranen vorkommenden Lipiden mittels SPR analysiert. Folgende Lipide der extrazellulären Plasmamembranschicht wurden untersucht: Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Sphingomyelin (SM), Gangliosid GM1 und ein Gemisch aus 80% Sphingomyelin und 20% Cholesterin (Chol). Die Lipide PE und GM1 bildeten von sich aus keine stabilen, unilamillaren Liposomen. Daher wurden diese Lipide 1:1 mit Phosphatidylcholin gemischt. Diese Gemische bildeten schließlich stabile und für die Untersuchungen geeignete Liposomen.

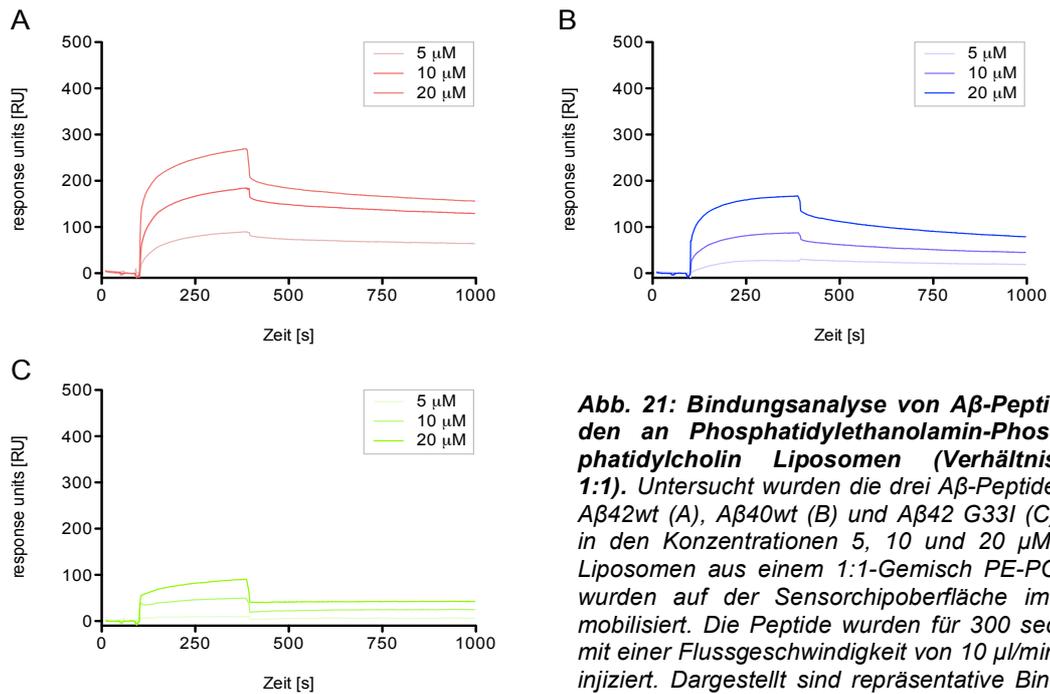
Die SPR-Bindungsanalyse der drei Peptide A $\beta$ 42wt, A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I auf einer mit PC-Liposomen beschichteten Oberfläche, einem Lipid das prozentual stark in der Plasmamembran vertreten ist, ergab eine generell geringe Interaktion der Peptide mit dieser Lipidoberfläche (Abb. 20).



**Abb. 20: Bindungsanalyse von A $\beta$ -Peptiden an Phosphatidylcholin-Liposomen.** Untersucht wurden die drei A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 42wt (A), A $\beta$ 40wt (B) und A $\beta$ 42 G33I (C) in den Konzentrationen 5, 10 und 20  $\mu$ M. Liposomen aus PC wurden auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert. Die Peptide wurden für 350 sec mit einer Flussgeschwindigkeit von 10  $\mu$ l/min injiziert. Dargestellt sind repräsentative Bindungskurven, n=3-6.

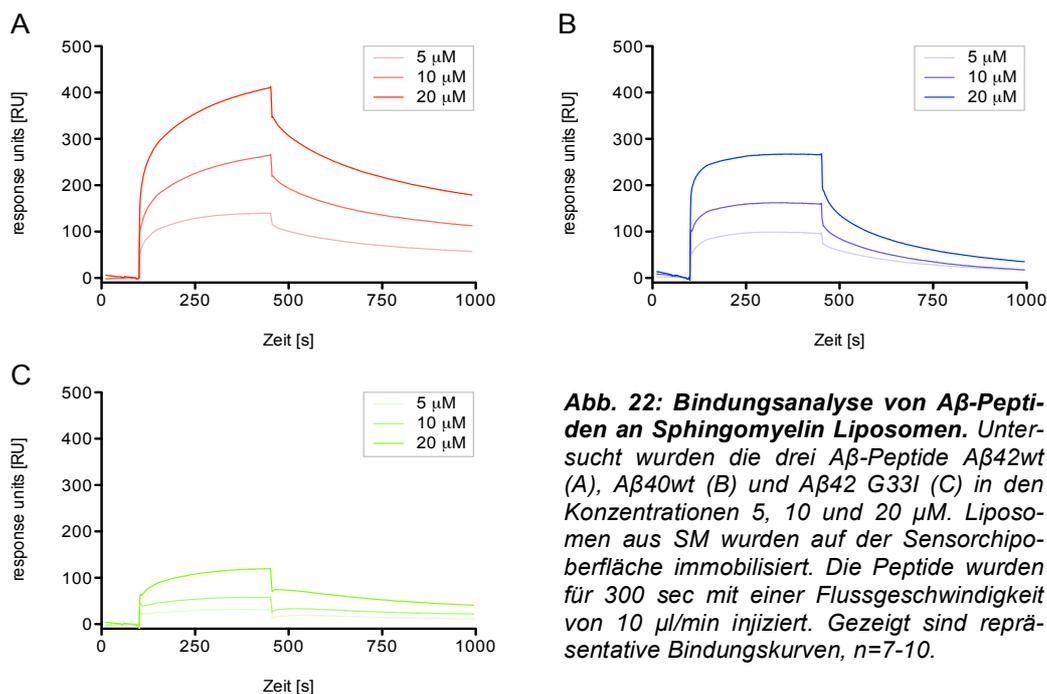
Die Bindungstendenzen waren jedoch vergleichbar mit der Bindung an BTLE-Liposomen. A $\beta$ 42wt assoziierte geringfügig langsamer als A $\beta$ 40wt mit einer anschließend verzögerten Dissoziation, und erreichte während der Assoziation einen höheren RU-Wert (Abb. 20A und 20B). Die Assoziation von A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I war hingegen geringer und beide Peptide dissoziieren schneller bis annähernd vollständig von der Lipidoberfläche (Abb. 20B und 20C). Die Unterschiede bei der Interaktion mit der PC-Oberfläche, waren zwischen den Peptiden nicht besonders ausgeprägt.

Die Bindung der drei untersuchten Peptide an eine Lipidoberfläche bestehend aus 1:1 PE-PC-Liposomen, einem Lipid welches ca. 15% (Alberts et al., 2012) der neuronalen Membranlipide ausmacht, ergab eine hohe Affinität aller drei Peptide mit einer, relativ langsamen Dissoziationsgeschwindigkeit, besonders für A $\beta$ 42wt (Abb. 21). A $\beta$ 42wt interagiert besonders stark mit diesem Lipidgemisch und erreichte am Ende der Assoziation einen nahezu doppelt so hohen RU-Wert im Vergleich zu A $\beta$ 40wt (Abb. 21A und 21B). A $\beta$ 42 G33I zeigte zwar wiederum eine nur sehr geringe Interaktion, die jedoch höher war als auf der mit PC Liposomen beschichteten Oberfläche.



**Abb. 21: Bindungsanalyse von Aβ-Peptiden an Phosphatidylethanolamin-Phosphatidylcholin Liposomen (Verhältnis 1:1).** Untersucht wurden die drei Aβ-Peptide Aβ42wt (A), Aβ40wt (B) und Aβ42 G33I (C) in den Konzentrationen 5, 10 und 20 μM. Liposomen aus einem 1:1-Gemisch PE-PC wurden auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert. Die Peptide wurden für 300 sec mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 μl/min injiziert. Dargestellt sind repräsentative Bindungskurven, n=3-5.

Die Analyse der Bindung an eine mit SM-Liposomen beschichtete Oberfläche (Abb. 22) ergab im Vergleich zu den vorher gemessenen Lipidinteraktionen sehr hohe Bindungswerte für jedes der drei Peptide. Auffallend war, dass Aβ42wt nach der Injektionszeit von 300 sec nur für die 5 μM Konzentration eine Sättigung erreichte (Abb. 22A). Aβ40wt und Aβ42 G33I erreichten hingegen sehr schnell in allen drei gemessenen Konzentrationen ein Gleichgewichtszustand (Abb. 22B und 22C).

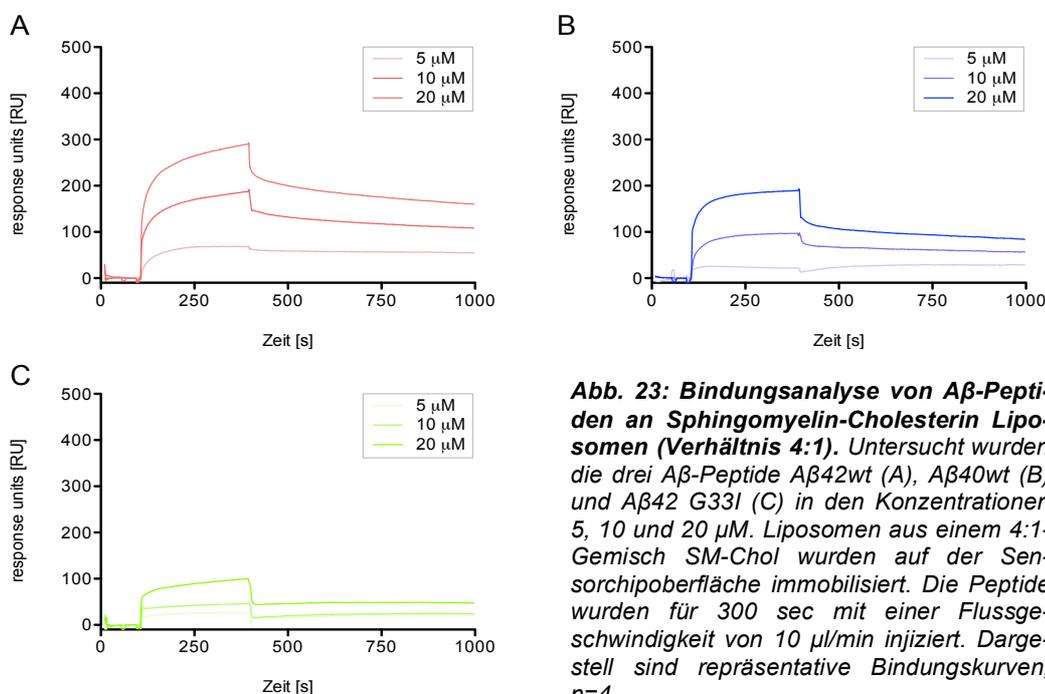


**Abb. 22: Bindungsanalyse von Aβ-Peptiden an Sphingomyelin Liposomen.** Untersucht wurden die drei Aβ-Peptide Aβ42wt (A), Aβ40wt (B) und Aβ42 G33I (C) in den Konzentrationen 5, 10 und 20 μM. Liposomen aus SM wurden auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert. Die Peptide wurden für 300 sec mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 μl/min injiziert. Gezeigt sind repräsentative Bindungskurven, n=7-10.

Besonders hervorzuheben ist hier auch die schnelle und annähernd vollständige Dissoziation, die für A $\beta$ 40wt bei allen drei Konzentrationen beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu war die Dissoziation des A $\beta$ 42wt-Peptids erheblich verzögert.

Mit den bisher durchgeführten Experimenten und anhand der gemessenen Daten für die Interaktion mit SM-Liposomen (Abb. 22) konnte eine sehr hohe Affinität des A $\beta$ 42wt-Peptids speziell für SM festgestellt werden. A $\beta$ 40wt zeigte auch eine vergleichsweise starke Bindung, aber eine deutlich schnellere Dissoziation von dieser Lipidoberfläche. A $\beta$ 42 G33I interagierte hingegen wiederum nur sehr schwach, dissoziierte schnell und annähernd vollständig von der Oberfläche, verglichen mit den beiden anderen Peptiden.

SM ist in der neuronalen Plasmamembran besonders stark vertreten und vor allem in sogenannten Cholesterin- und Sphingolipid-reichen Mikrodomänen („Lipid rafts“) lokalisiert (Korade und Kenworthy, 2008; Pike, 2009). Im Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit sind „Lipid rafts“ in der Literatur einerseits beschrieben als Ort einer erhöhten amyloidogenen APP-Prozessierung (Eehalt et al., 2003; Cheng et al., 2007), andererseits aber auch als Bereich, in dem sich verstärkt A $\beta$ -Oligomere bilden und anreichern können (Williamson et al., 2008). Durch die Beimischung von Cholesterin in einem den angesprochenen Mikrodomänen vergleichbaren Anteil, sollte untersucht werden, ob dies einen Effekt auf die Bindung von A $\beta$  an SM-Liposomen besitzt. Dazu wurde in einem weiteren Experiment ein Gemisch aus 80% SM und 20% Chol analysiert (Abb. 23).

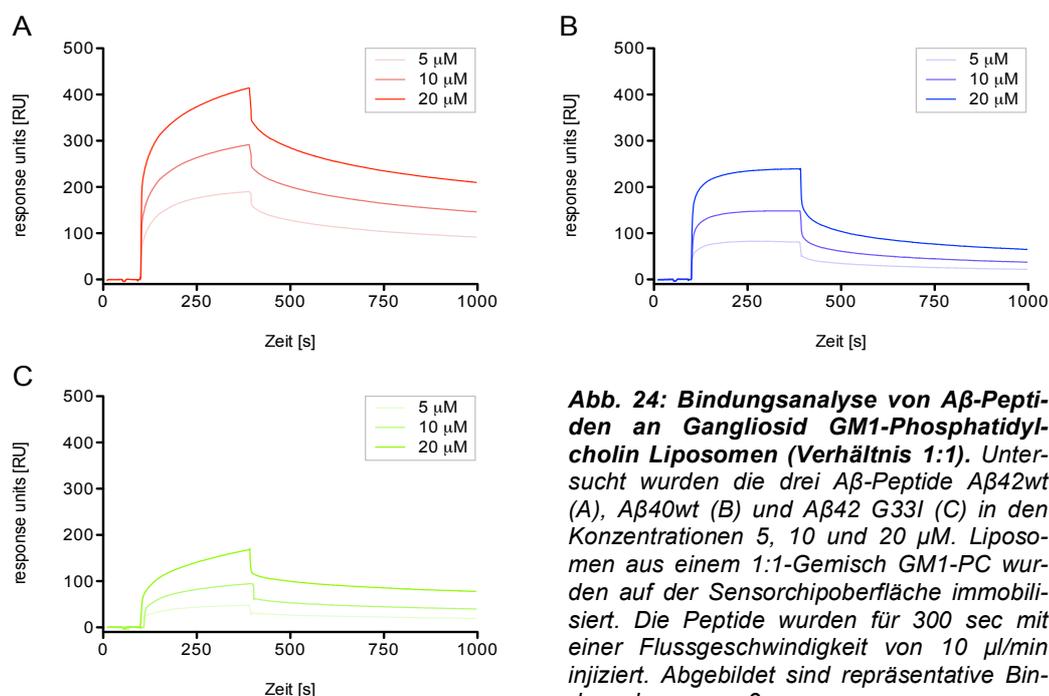


**Abb. 23: Bindungsanalyse von A $\beta$ -Peptiden an Sphingomyelin-Cholesterin Liposomen (Verhältnis 4:1).** Untersucht wurden die drei A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 42wt (A), A $\beta$ 40wt (B) und A $\beta$ 42 G33I (C) in den Konzentrationen 5, 10 und 20  $\mu$ M. Liposomen aus einem 4:1-Gemisch SM-Chol wurden auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert. Die Peptide wurden für 300 sec mit einer Flussgeschwindigkeit von 10  $\mu$ l/min injiziert. Dargestellt sind repräsentative Bindungskurven, n=4.

Die Ergebnisse der SPR-Analyse cholesterinhaltiger SM-Liposomen zeigten im Vergleich zu reinen SM-Liposomen eine etwas verringerte Bindung für alle drei untersuchten Peptide (Abb. 23). Auffällig war die etwas verzögerte Dissoziation der Peptide von der Oberfläche.

So war besonders die Dissoziation von A $\beta$ 40wt durch die Beimischung von Cholesterin deutlich verlangsamt (Abb. 23B). Cholesterin- und SM-reiche Membrankompartimente scheinen diesen Experimenten zur Folge eine hohe Affinität für A $\beta$ -Peptide zu besitzen und durch die Zugabe von Cholesterin kann die Dissoziation der Peptide von der Oberfläche noch verlängert werden.

Bekannt ist, dass A $\beta$ 42 sehr stark mit dem Gangliosid GM1, einem vorwiegend im Nervensystem vorkommenden Sphingolipid, interagiert. Dies konnte auch in dieser Arbeit mittels SPR nachgewiesen werden (Abb. 24). Die gemessenen Bindungskurven ergaben eine besonders starke Interaktion für alle drei untersuchten Peptide, die in etwa mit der Interaktion auf der SM-Oberfläche vergleichbar war. A $\beta$ 42wt assoziierte mit einer hohen Affinität an die GM1-haltige Oberfläche (Abb. 24 A). A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I zeigten hingegen eine deutlich schwächere Assoziation und erreichten schnell ein Gleichgewicht (Abb. 24B und 24C). Die Dissoziation dieser beiden Peptide war wesentlich schneller als die von A $\beta$ 42wt.



**Abb. 24: Bindungsanalyse von A $\beta$ -Peptiden an Gangliosid GM1-Phosphatidylcholin Liposomen (Verhältnis 1:1).** Untersucht wurden die drei A $\beta$ -Peptide A $\beta$ 42wt (A), A $\beta$ 40wt (B) und A $\beta$ 42 G33I (C) in den Konzentrationen 5, 10 und 20  $\mu$ M. Liposomen aus einem 1:1-Gemisch GM1-PC wurden auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert. Die Peptide wurden für 300 sec mit einer Flussgeschwindigkeit von 10  $\mu$ l/min injiziert. Abgebildet sind repräsentative Bindungskurven, n=3.

Zusammengenommen konnte mit den durchgeführten Bindungsstudien gezeigt werden, dass die drei untersuchten Peptide sehr unterschiedliche Eigenschaften bei der Interaktion mit Lipidoberflächen besitzen. Einerseits wurden zwischen den drei Peptiden, abhängig von der Lipidoberfläche, sehr große Differenzen in der Stärke der Bindung festgestellt. Die Analysen ergaben andererseits aber auch beachtliche Unterschiede bei den Assoziations- bzw. Dissoziationsraten der Peptide, die sehr von den jeweiligen Lipiden beeinflusst wurden. So war für A $\beta$ 42wt überwiegend eine etwas langsamere aber stärkere Assoziation mit einer zum Teil deutlich verzögerten Dissoziation im Vergleich zu A $\beta$ 40wt zu beobachten. Vergleicht

man die Interaktionen mit den unterschiedlichen Lipidgemischen, so scheint A $\beta$ 42wt eine sehr hohe Präferenz für die Bindung an Lipide der zellulären Plasmamembran zu besitzen. Diese Eigenschaft ist für A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I deutlich geringer ausgeprägt. Hervorzuheben ist die sehr hohe Bindung der Peptide, speziell von A $\beta$ 42wt, gegenüber SM und GM1:PC. Eine wesentlich geringere Interaktion war dagegen für SM:Chol, PE und BTLE zu messen. Interessanterweise wurde eine nur schwache Wechselwirkung zwischen den analysierten A $\beta$ -Peptiden und dem in der Plasmamembran stark vertretenem Lipid PC beobachtet.

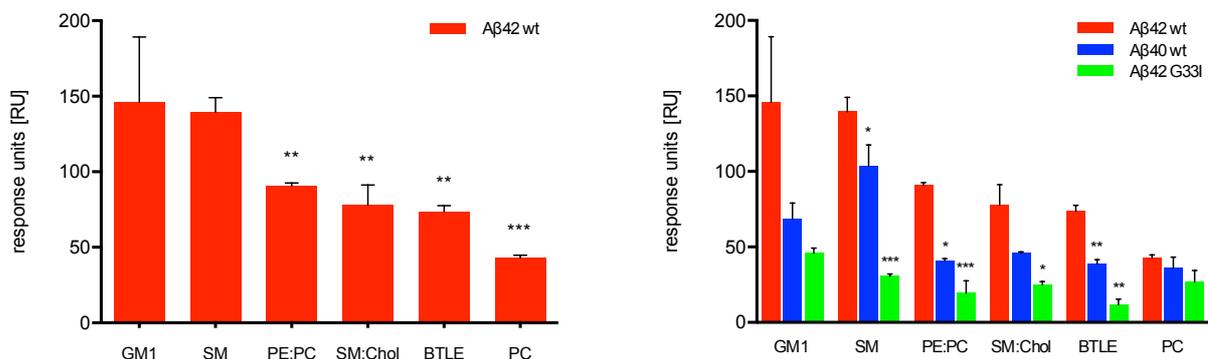
Die Berechnung kinetischer Parameter war anhand der ermittelten Bindungskurven nicht möglich, da unbekannt war wieviel Bindungsstellen an der Interaktion zwischen Lipidoberfläche und A $\beta$ -Peptiden beteiligt sind. Die ermittelten Sensogramme enthielten Kurven, die anhand eines regulären 1:1 Bindungsmodell (1:1 Langmuir-Bindung) nicht zufriedenstellend auszuwerten waren. Es ist daher vielmehr wahrscheinlich, dass die Interaktion zwischen Lipidoberfläche und Peptiden durch mehrere Kontaktstellen vermittelt wird.

Ferner bildet frisch gelöstes A $\beta$ -Peptid umgehend ein Gemisch aus verschiedenen Oligomeren. Diese Eigenschaft ist zwischen den drei Peptiden sehr unterschiedlich stark ausgeprägt und erschwert die Beschreibung durch ein reguläres Bindungsmodell zusätzlich.

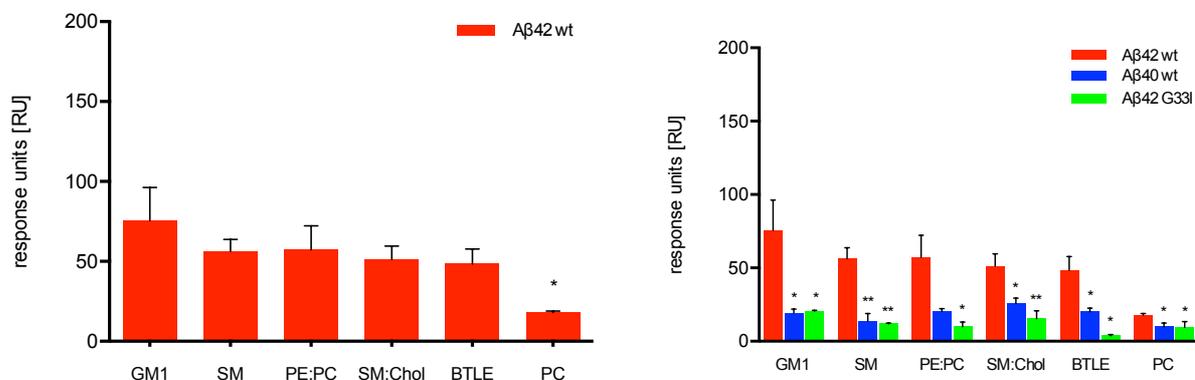
Um die gemessenen Bindungskurven dennoch auswerten zu können, wurde jeweils die Signalthöhe zum Zeitpunkt der maximalen Assoziation und minimalen Dissoziation als Vergleichswert verwendet. Der Wert der Assoziation ergab sich aus der Kurvenhöhe bei 380 sec und der Wert der Dissoziation wurde den Bindungskurven bei 900 sec entnommen. Die Werte wurden in „response units“ (RU) angegeben und auf das jeweilige Molekulargewicht der Peptide normiert (Abb. 25).

Die statistische Auswertung ergab, dass A $\beta$ 42wt auf SM gegenüber den anderen Lipiden bzw. Lipidgemischen PE:PC, SM:Chol, BTLE und PC eine signifikant höhere Assoziation besitzt. Werden die Werte von A $\beta$ 42wt mit denen der beiden Peptide A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I auf den jeweiligen Lipidoberflächen verglichen, so ist mit Ausnahme der PC-beschichteten Oberfläche, eine durchgehend geringere Bindung festzustellen. Besonders deutlich waren die Unterschiede zwischen A $\beta$ 42wt und A $\beta$ 40wt auf SM-, PE:PC- und BTLE-Oberflächen. A $\beta$ 42 G33I zeigte die mit Abstand geringste Interaktion mit allen untersuchten Lipiden, was sich in den Sensogrammen durch eine sehr geringe Kurvenhöhe bei 380sec widerspiegelte. Unterschiede konnten jedoch nicht nur für die Peptidanlagerung gemessen werden, auch die Dissoziation von den Lipidoberflächen war zwischen den drei Peptiden sehr verschieden. Die Bindung von A $\beta$ 42wt war für alle Lipide signifikant langsamer gegenüber A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I. Letztere zeichneten sich durch eine schnelle und in den meisten Fällen vollständige Dissoziation von den untersuchten Oberflächen aus, wohingegen A $\beta$ 42wt nur sehr langsam abdissoziierte.

### Assoziation



### Dissoziation



**Abb. 25: Auswertung der Assoziation (oben) und Dissoziation (unten) aus den SPR-Messungen von Aβ42wt, Aβ40wt und Aβ42 G33I an Lipidoberflächen bestehend aus GM1:PC, SM, PE:PC, SM:Chol, BTLE und PC. Verglichen wurde jeweils die Kurvenhöhe bei 380 sec (Assoziation) und 900 sec (Dissoziation), die bei einer Peptidkonzentration von 5 μM gemessen wurde (Werte in „response units“, RU). Die statistische Auswertung erfolgte einerseits für die Bindung von Aβ42wt an die verschiedenen Lipide (links). Signifikanzen wurden anhand der SM-Bindung berechnet. Andererseits wurde die Interaktion von Aβ40wt und Aβ42 G33I mit den Werten von Aβ42wt für jedes untersuchte Lipid verglichen (rechts). Alle ermittelten Werte wurden auf das jeweilige Molekulargewicht der Peptide normiert. Gezeigt sind Mittelwerte ±Standardfehler. Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied an mit \* p<0,05, \*\* p<0,01 und \*\*\* p<0,001, Welch t-Test.**

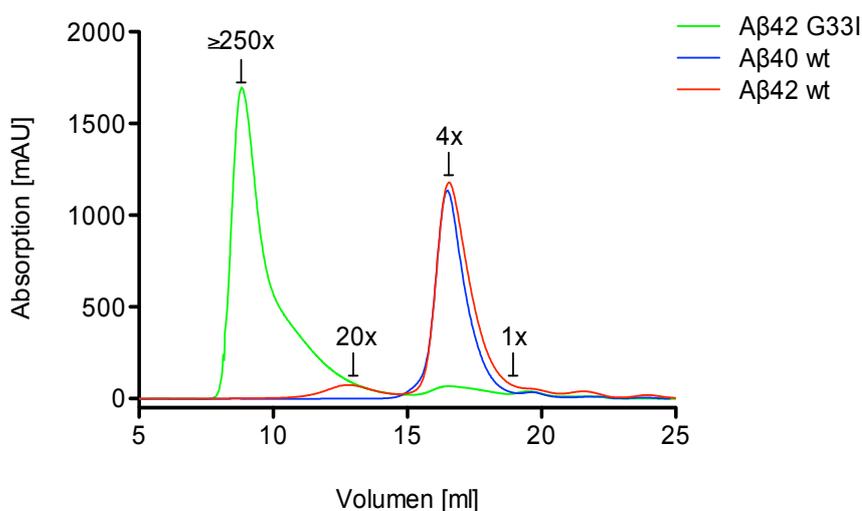
### 2.2.3 In vitro-Analyse der Bindungseigenschaften unterschiedlicher oligomerer Formen von Aβ-Peptiden mit Sphingomyelin und Phosphatidylcholin

Frisch gelöstes synthetisches Aβ bildet unter neutralen Pufferbedingungen augenblicklich ein Gemisch verschiedener oligomerer Formen (Harmeier et al., 2009). Der jeweilige Oligomerisierungszustand ist dabei abhängig von der Länge der Peptide, aber auch spezifische Aminosäuresubstitutionen, wie z.B. im GxxxG-Motiv, besitzen einen starken Effekt auf die Aggregation. Aβ42wt bildet frisch gelöst vorwiegend Tetramere und kleinere Mengen höherer Aggregate, wie z.B. 10mere und 20mere. Nur ein geringer Teil des Peptids liegt als Monomer oder Dimer vor. Das etwas kürzere Aβ40wt-Peptid bildet hingegen ausschließlich niedere Oligomere, hauptsächlich Tetra- aber auch Mono- und Dimere. Ganz anders verhält sich

im Vergleich das A $\beta$ 42-Peptid mit der Substitution G33I. Frisch gelöst bildet es sofort große Mengen hoher Aggregate bis zu 250meren und größer. Es ist kaum als niederes Oligomer vorhanden (Harmeier et al., 2009). In diesem Kapitel soll die Interaktion dieser verschiedenen Oligomerformen der drei Peptide und deren Interaktion auf SM- und PC-Oberflächen untersucht werden.

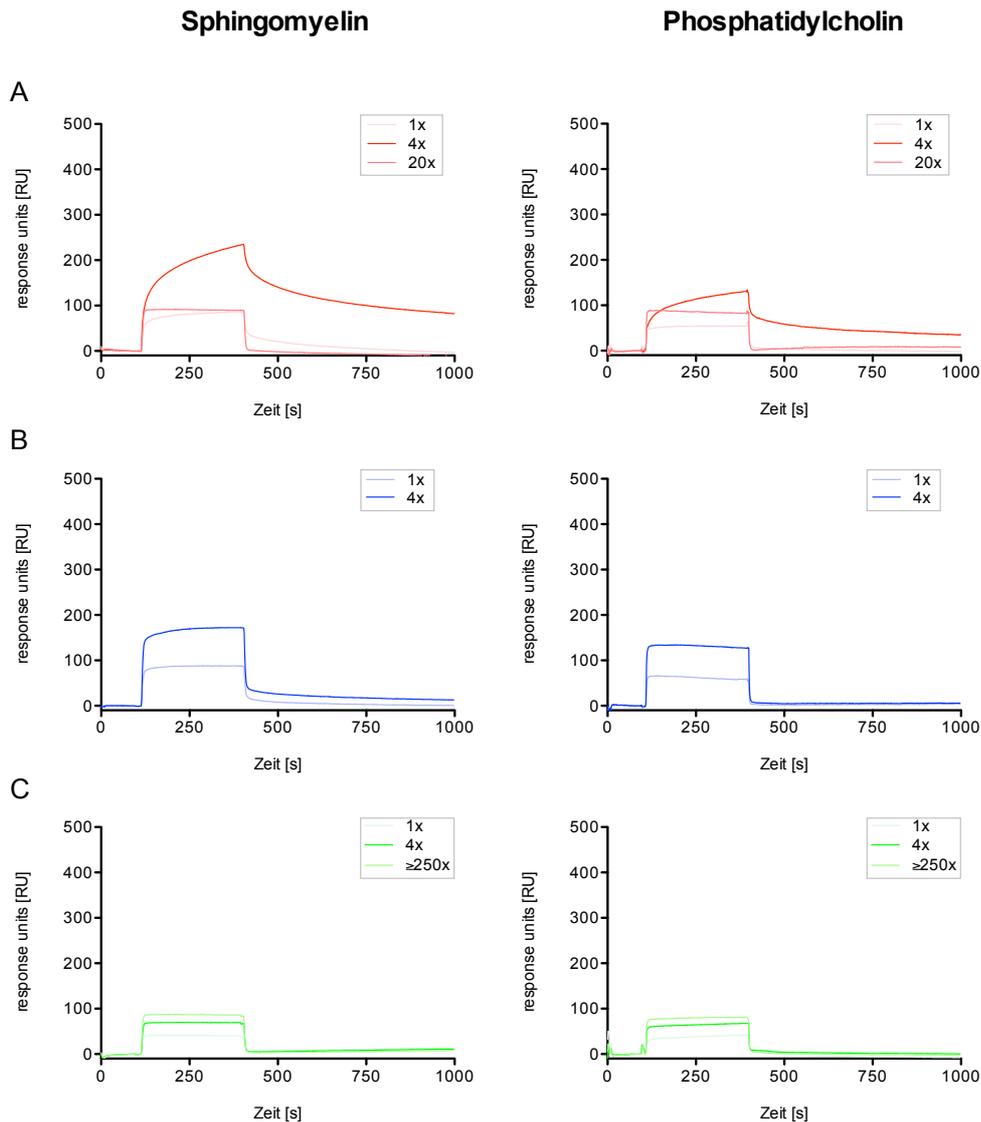
Mittels Größenausschlusschromatographie konnten die verschieden großen Oligomere der frisch gelösten A $\beta$ -Peptide voneinander getrennt und in einzelnen Fraktionen aufgefangen werden. Die Fraktionen wurden anschließend auf einen mit SM bzw. PC beschichteten SPR-Sensorchip injiziert und die verschiedenen Oligomere der drei Peptide auf deren Bindung an die Lipidoberflächen untersucht.

In Abbildung 27 sind die Chromatogramme der Peptide A $\beta$ 42wt, A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I dargestellt. Gekennzeichnet sind die für die SPR-Analyse verwendeten Fraktionen mit dem jeweils x-fachen des Monomierzustandes, die in den jeweiligen Fraktionen enthalten waren (z.B. 2x = Dimer). Um die Interaktionen zwischen den quantitativ sehr unterschiedlichen Oligomerspezies vergleichbar zu messen, wurde die Proteinkonzentration der jeweiligen Fraktionen mittels BCA-Test bestimmt und auf 2,5  $\mu$ M eingestellt.



**Abb. 27: Größenausschlusschromatographie der frisch gelösten Peptide A $\beta$ 42wt, A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I.** Die für die SPR-Analyse verwendeten Oligomerfraktionen sind mit dem jeweilig x-fachen des Monomierzustandes gekennzeichnet. Für A $\beta$ 42wt wurde die Bindung der Hauptfraktionen 1x, 4x und 20x untersucht, für A $\beta$ 40wt 1x und 4x und für A $\beta$ 42 G33I die Aggregate 1x, 4x und  $\geq$ 250x. Abgebildet sind exemplarische Kurven, n=5.

Die Sensogramme der untersuchten Oligomerformen von A $\beta$ 42wt, A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I sind in Abbildung 28 dargestellt. Die entsprechenden Oligomerfraktionen wurden jeweils auf einer einzelnen Flusszelle auf ihre Bindung an SM bzw. PC analysiert. Somit wurde eine Vermischung der Oligomere durch eine Mehrfachmessung auf der gleichen Oberfläche verhindert.



**Abb. 28: Bindungsanalyse von A $\beta$  Oligomerformen an SpHINGOMYELIN und PHOSPHATIDYLCHOLIN nach vorheriger Trennung über SEC.** Dargestellt sind repräsentative Bindungskurven der 1x, 4x, 20x und  $\geq 250x$  Oligomere der jeweiligen Peptide A $\beta$ 42wt (A), A $\beta$ 40wt (B) und A $\beta$ 42 G33I (C) bei einer Proteinkonzentration von 2,5  $\mu$ M an SM und PC. (n=3-4)

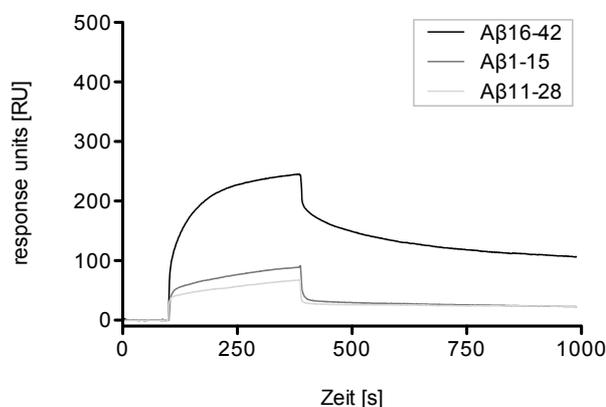
Die Interaktionsanalyse ergab ein sehr unterschiedliches Bindungsverhalten der Oligomerformen von A $\beta$ 42wt, A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I für die untersuchten Lipidoberflächen (Abb. 28). Es zeigte sich, das Tetramere des A $\beta$ 42wt-Peptids eine sehr hohe Affinität besaßen, wohingegen die Monomere sehr viel schwächer sowohl an SM als auch an PC banden. Die höheren Oligomere schienen nicht mit der Lipidoberfläche zu interagieren, da für diese nur ein unspezifisches Bindungssignal gemessen werden konnte (Abb. 28A). Die Mono- und Tetramere von A $\beta$ 40wt assoziierten schnell an die SM-Oberfläche, jedoch mit geringerer Affinität und einer deutlich schnelleren und vollständigeren Dissoziation, als die Mono- bzw. Tetramere des A $\beta$ 42wt-Peptids. Die Bindung der beiden A $\beta$ 40wt-Oligomerfraktionen an PC zeigte nur unspezifische Bindungssignale (Abb. 28B). Auch die untersuchten Oligomerformen von A $\beta$ 42 G33I ergaben für alle drei analysierten Formen (1x, 4x und  $\geq 250x$ ) nur unspezifische

Bindungskurven. Dieses Bindungsverhalten war auf SM aber auch auf PC gleichermaßen zu beobachten (Abb. 28C).

Diese Untersuchungen ergaben, dass speziell die tetramere Form des A $\beta$ 42wt-Peptids, welche eine besonders hohe Toxizität gegenüber neuronalen Zellen besitzt, eine verstärkte Affinität gegenüber den beiden Lipidoberflächen SM und PC aufweist. Zwischen SM und PC bestand jedoch ein deutlicher Unterschied. So wurde für die Interaktion der A $\beta$ 42wt-Tetramere auf SM eine in etwa 60% höhere Assoziation im Vergleich zu PC gemessen. Höhere Aggregate des A $\beta$ 42wt-Peptids, wie z.B. 10 oder 20mere ergaben kein spezifisches Bindungssignal. Die verminderte Bindung dieser Oligomere spiegelte auch hier deren geringe toxische Eigenschaften wider (Harmeier et al., 2009).

#### 2.2.4 Bestimmung der Bindungsregion von A $\beta$ 42wt an Sphingomyelin

Um die Region innerhalb der A $\beta$ 42wt-Sequenz einzugrenzen, die für diese besonders starke Interaktion auf SM-Oberflächen verantwortlich war, wurden SPR-Analysen mit drei unterschiedlichen Fragmenten des Peptids durchgeführt. Dazu wurden die Peptide A $\beta$ 1-15, 11-28 und 16-42 (Numerierung entsprechend der A $\beta$ -Sequenz) verwendet. Die jeweilige Bindung wurde bei einer Peptidkonzentration von 10  $\mu$ M für jedes der drei Peptide auf einer mit SM beschichteten Oberfläche gemessen (Abb. 26).



**Abb. 26: Bindungsanalyse von Teilschnitten der A $\beta$ 42wt-Sequenz an eine mit Sphingomyelin beschichtete Sensorchip-Oberfläche.** Es wurden drei verschiedene Fragmente aus der A $\beta$ 42wt-Sequenz gemessen, die sich teilweise überlappten und die vollständige Sequenz von A $\beta$ 42wt abdeckten. Konzentrationen von 10  $\mu$ M A $\beta$ 16-42, A $\beta$ 1-15 und A $\beta$ 11-28 wurden für 300 sec mit einer Flussgeschwindigkeit von 10  $\mu$ l/min injiziert. (n=3)

Die Analyse der drei untersuchten Fragmente aus der A $\beta$ 42wt-Sequenz ergab eine sehr starke Interaktion des A $\beta$ -Peptids mit den Aminosäureresten 16-42. Die beiden anderen Peptide, A $\beta$ 1-15 und A $\beta$ 11-28 hingegen zeigten nur eine sehr geringe Bindung an die Lipidoberfläche. Der große Unterschied zwischen der Bindung der beiden Peptide A $\beta$ 16-42 und A $\beta$ 11-28 weist darauf hin, dass die Peptid-Lipid Interaktion maßgeblich über den C-terminalen Bereich, also die Reste 28-42, vermittelt wird. Dieses Ergebnis erklärt sehr gut die unterschiedlichen Bindungskurven, die im Kapitel 2.2.2 für die drei untersuchten A $\beta$ -Peptide gemessen wurden, da diese sich ausschließlich an ihrem hydrophoben C-Terminus unterscheiden.

### 2.2.5 Analyse der Permeabilisierung von Lipidmembranen durch A $\beta$ -Peptide

In den vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass verschiedene A $\beta$ -Spezies sehr unterschiedlich an spezifische Lipide der neuronalen Plasmamembran binden. Besonders die Messungen der Bindung des A $\beta$ 42wt-Peptids an Membranlipide ergaben eine insgesamt hohe Lipidaffinität dieses Peptids, im Gegensatz zu den geringeren Bindungswerten der beiden nicht toxischen Peptide A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I. Um jedoch neben der alleinigen Bindung an Lipide auch das Potenzial der drei A $\beta$ -Peptide zu untersuchen, Lipidmembranen zu permeabilisieren oder sogar zu lysieren, wurden sogenannte Calcein-Freisetzungsanalysen durchgeführt.

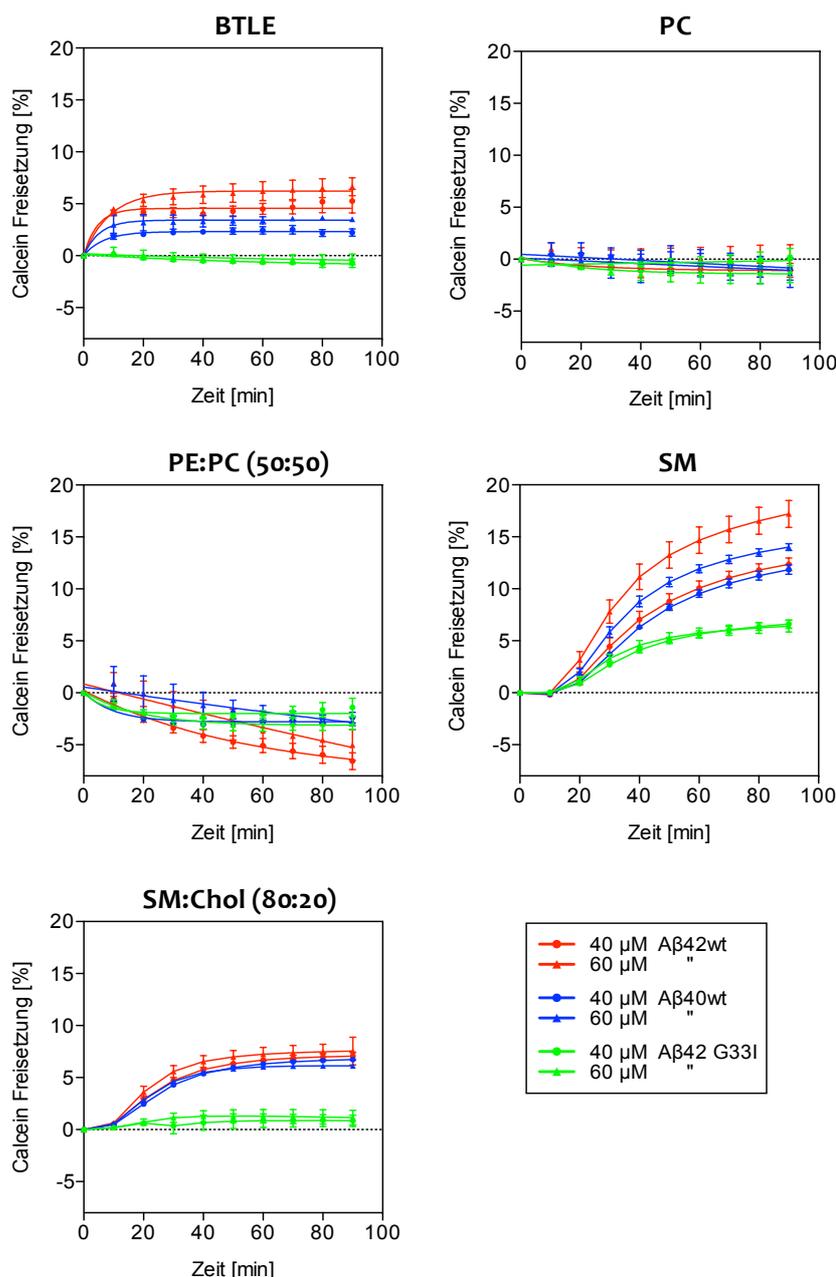
Dazu wurden Liposomen spezifischer Lipidzusammensetzung präpariert, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein gefüllt waren. Eine besondere Eigenschaft dieses Farbstoffs ist die Fluoreszenzlöschung bei hohen Konzentrationen (50-100 mM). Bei der Calcein-Freisetzungsanalyse macht man sich diese Eigenschaft zunutze indem beladene Liposomen mit dem zu untersuchenden Molekül vermischt werden. Kommt es zu einer Membranpermeabilisierung wird Calcein in das umgebene Medium abgegeben und dort verdünnt. Dadurch steigt die Calcein-Fluoreszenz an, die sich proportional zur freigesetzten Menge des Farbstoffes verhält und ein direktes Maß für die Stärke der Membranschädigung durch das hinzugefügte Molekül darstellt.

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der Calcein-Freisetzungsanalysen gezeigt, nachdem präparierte Liposomengemische mit den Peptiden A $\beta$ 42wt, A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I inkubiert wurden. Für die Versuchsansätze wurde frisch gelöstes A $\beta$  in Konzentrationen von 40 und 60  $\mu$ M verwendet. Die Freisetzungsreaktion wurde für 90 min verfolgt, wobei jede 10 min die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm und einer Emission von 515 nm gemessen wurde. Die ermittelte Fluoreszenz wurde dann prozentual an den mit 0,1% Triton-X aufgelösten Liposomen berechnet. Die zum Zeitpunkt 0 gemessene Grundfluoreszenz wurde als Nullwert definiert (Abb. 29).

Die ermittelten Daten belegen, dass die Inkubation von BTLE-Liposomen bei Konzentrationen von 40 bzw. 60  $\mu$ M A $\beta$ 42wt schnell eine maximale Fluoreszenzfreisetzung von 4,5 bzw. 6,1% erreichten. Einen geringeren Effekt bewirkte A $\beta$ 40wt mit 2,3 bzw. 3,3%. A $\beta$ 42 G33I führte zu keiner Fluoreszenzfreisetzung auf BTLE-Liposomen.

Präparierte SUVs aus PC zeigten für alle drei A $\beta$ -Peptide, unabhängig von der Konzentration eine nur sehr schwache Fluoreszenzfreisetzung. Eine membranstörende Wirkung der A $\beta$ -Peptide konnte auf PC-Liposomen daher nicht beobachtet werden. Die Auswertung der PE:PC Ergebnisse deutete, nach Zugabe der Peptide, einen Rückgang bzw. eine Abschirmung der Fluoreszenz gegenüber dem Ausgangsniveau an. Funktionell kann hieraus schwerlich auf die Wirkung der A $\beta$ -Peptide geschlossen werden. Möglicherweise kommt es durch die Zugabe der Peptide zu einer Fluoreszenzlöschung. Im Gegensatz dazu verursach-

te die Inkubation von SM-Liposomen mit A $\beta$ 42wt den intensivsten Fluoreszenzanstieg. Die verwendeten Konzentrationen 40 und 60  $\mu$ M bewirkten eine Zunahme von 12,2 bzw. 17,1%. Die Zugabe von A $\beta$ 40wt resultierte in einer Steigerung auf 11,9 und 14%. Sowohl für A $\beta$ 42wt als auch für A $\beta$ 40wt wurde in dem untersuchten Zeitraum von 90 min kein Gleichgewichtszustand erreicht. Eine noch stärkere Membranperforation ist daher über einen noch längeren Zeitraum anzunehmen. Für A $\beta$ 42 G33I kam es zu einem Fluoreszenzanstieg von knapp 6% für beide Konzentrationen.



**Abb. 29: Ergebnisse der Calcein-Freisetzung-Analysen zur Untersuchung der Membranpermeabilisierung durch A $\beta$ 42wt, A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I abhängig von der Lipidzusammensetzung.** Calcein-gefüllte SUVs bestehend aus den Lipiden BTLE, PC, PE:PC, SM und SM:Chol wurden für 90 min mit den genannten Peptiden inkubiert. Jedes Peptid wurde in den Konzentrationen 40 und 60  $\mu$ M gemessen. Parallel wurden die Liposomen mit 0,1% Triton-X behandelt. Der Effekt der Peptide wurde prozentual daran berechnet. Die anfängliche Grundfluoreszenz wurde als Nullwert definiert. Das Anregungsmaximum (Exzitation) für Calcein liegt bei 495 nm und das Abstrahlungsmaximum (Emission) bei 515 nm (n=4-6). Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler.

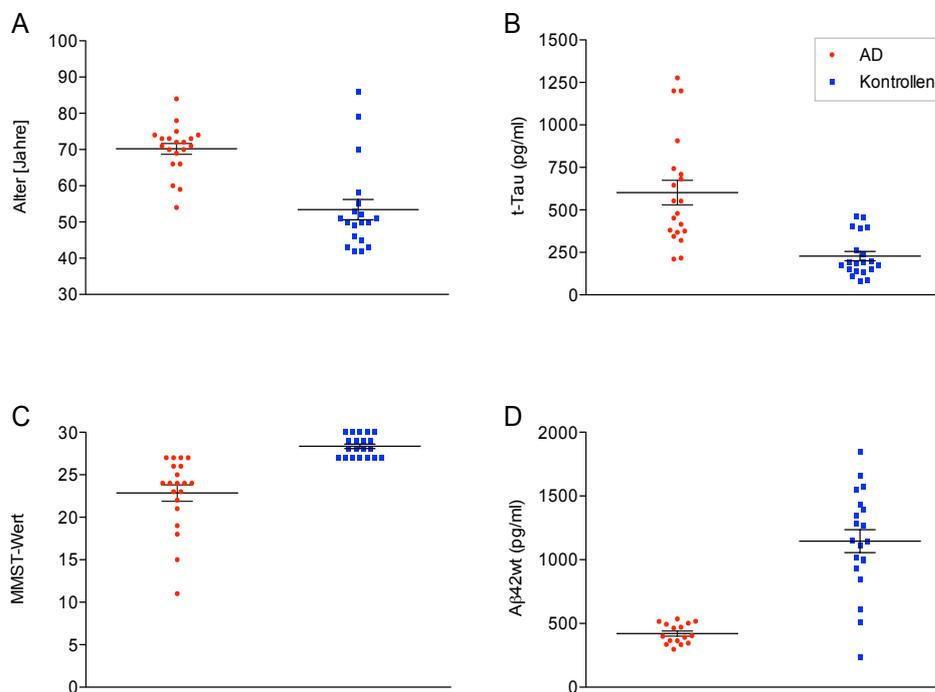
Die Mischung von SM und Cholesterin (80%:20%) zeigte im Vergleich zu SM alleine einen Rückgang der Fluoreszenzfreisetzung. A $\beta$ 42wt erreichte für 40 und 60  $\mu$ M demnach 7-7,5%. A $\beta$ 40wt wirkte mit 6,1-6,8% ähnliche Werte. Bei A $\beta$ 42 G33I kam es zur geringsten Membranperforation mit 0,9-1,1%.

Vergleicht man die Bindungsdaten der drei Peptide aus den SPR-Messungen mit den Ergebnissen aus den Calcein-Freisetzungs-Analysen, so ergibt sich zwar ein sehr ähnliches Bild. Die Effekte sind jedoch erst bei deutlich höheren Peptidkonzentrationen messbar. A $\beta$ 42wt schien einen besonders stark permeabilisierende Eigenschaft auf SM-haltigen Liposomen zu besitzen. Das Peptid führte jedoch auch bei BTLE-Liposomen zu einer fast doppelt so starken Fluoreszenzfreisetzung im Vergleich zu A $\beta$ 40wt. A $\beta$ 42 G33I führte bei BTLE, PC und PE:PC Liposomen zu keiner Membranpermeabilisierung. Auf SM- und SM:Chol-Liposomen konnte nur ein geringe Fluoreszenz im Vergleich zu den anderen Peptiden beobachtet werden.

Die Unterschiede zwischen A $\beta$ 42wt und A $\beta$ 40wt waren in der Calcein-Freisetzungs-Analyse nicht so ausgeprägt messbar wie bei den SPR-Messungen. Auf SM-Liposomen konnte eine Differenz zwischen den beiden Peptiden sogar erst bei einer Peptidkonzentration von 60  $\mu$ M detektiert werden, auf SM:Chol Liposomen hingegen war sie sehr gering. Dieser Unterschied zwischen den beiden Methoden ist eventuell auf eine geringere Sensitivität der Calcein-Freisetzungs-Analyse zurückzuführen.

## 2.3 Bindung von Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) an Lipidoberflächen als potentieller diagnostischer Marker

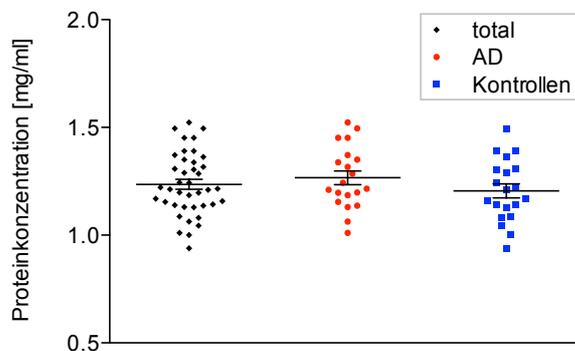
Die Daten der Experimente aus Kapitel 2.2 ergaben, dass die amyloiden Peptide A $\beta$ 42wt, A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I teilweise sehr stark mit Lipidoberflächen interagieren. Insbesondere die niederen Oligomere von A $\beta$ 42wt zeigten dabei eine hohe Bindung. Es lag daher nahe eine Analyse durchzuführen, um die Interaktion von humanen CSF-Proben an verschiedene Lipidoberflächen mittels SPR zu untersuchen. Durch die starke Assoziation toxischer Oligomere vor allem an SM-Oberflächen sollte es möglich sein, durch die Messung von CSF-Proben, zwischen Alzheimer-Patienten und nicht Erkrankten zu unterscheiden. Herr Dr. Oliver Peters von der Charité Berlin stellte für diese Experimente insgesamt 40 CSF-Proben zur Verfügung. 20 Proben waren von Patienten mit klinisch diagnostizierter Alzheimer-Krankheit und 20 Proben von Kontroll-Patienten mit z.T. kognitiven Defiziten. Eine Alzheimer-Erkrankung wurde bei diesen Patienten jedoch ausgeschlossen. Für diagnostische Zwecke werden in der Abteilung von Herrn Dr. Peters routinemäßig CSF-Parameter bestimmt. Dazu gehörte die Analyse der A $\beta$ 42wt- und Gesamt-Tau (t-Tau)-Konzentration im CSF sowie die Ermittlung kognitiver Defizite mit dem Mini-Mental-Status-Test (MMST). Die jeweiligen Werte der verwendeten Patienten-Proben sind in Abbildung 30 dargestellt.



**Abb. 30: Patientenalter, MMST-Wert, A $\beta$ 42wt und Gesamt-Tau Konzentration der verwendeten CSF-Proben.** (A) Alter der Patienten, (B) t-Tau-Konzentration im CSF, (C) MMST-Werte der Patienten, (D) A $\beta$ 42wt-Konzentration im CSF. Mit roten Kreisen sind die Werte der 20 Alzheimer-Patienten und in blauen Vierecken die 20 Kontroll-Patienten gekennzeichnet. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler.

Das Ziel der Untersuchung war die Analyse der Interaktion von Patienten-CSF auf drei unterschiedlichen Lipidoberflächen mittels SPR. Dafür wurden BTLE-, SM- und PC-beschichtete Oberflächen präpariert und darauf die jeweiligen CSF-Proben für 300 sec injiziert. Jede Probe wurde dabei auf einer frisch, mit Liposomen beschichteten Oberfläche vermessen. AD- und Kontroll-Proben wurden immer abwechselnd gemessen. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Oberfläche vollständig regeneriert und mit 40 mM Octylglycosid gewaschen. Dadurch sollte eine akkurate Messung jeder einzelnen CSF-Probe gewährleistet werden.

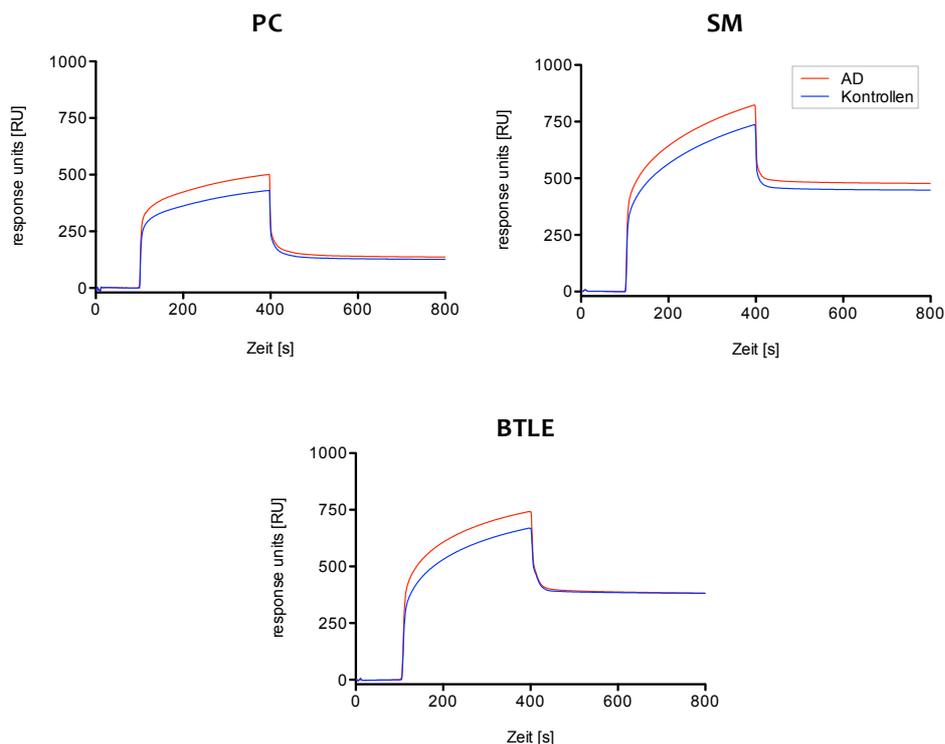
Um eine Korrelation der erhaltenen Interaktionswerte mit der Proteinkonzentration der CSF-Proben auszuschließen, wurde diese mittels Bicinchoninsäure-Test (BCA) bestimmt. Für die zwei untersuchten Patientengruppen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Gesamt-Proteinkonzentration festgestellt werden (Abb. 31).



**Abb. 31: Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration der einzelnen CSF-Proben.** Mittels BCA-Test wurde die Proteinkonzentration der CSF-Proben bestimmt. Dargestellt sind die Einzelwerte der AD-Patienten (roter Kreis), der Kontrollen (blaues Viereck) und der Gesamtheit der Patienten (schwarzes Viereck). Die Proteinkonzentration der untersuchten CSF-Proben zeigte keine Differenz zwischen den beiden Gruppen. Mittelwert  $\pm$ Standardfehler in der jeweiligen Patientengruppe sind angegeben.

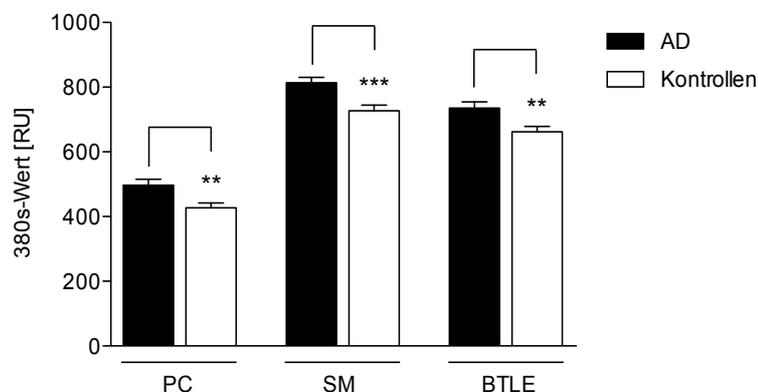
Bei der Interaktionsmessung der 40 CSF-Proben auf den Lipidoberflächen konnte für alle drei Lipide eine Differenz in der Assoziationsstärke zwischen AD-Patienten und den untersuchten Kontrollen gemessen werden (Abb. 32). In den gemittelten Kurven zeigte sich, dass die CSF-Proben der Alzheimer-Patienten während der Assoziation höhere Werte erreichten als die Proben der Kontrollen. Nach dem Ende der CSF-Injektion fielen die Kurven jedoch augenblicklich auf ein niedrigeres Niveau, welches für beide Patientengruppen annähernd gleich war. Die Kurven erreichen jedoch nicht mehr den Ursprungswert. Dies deutet darauf hin, dass auf der Lipidoberfläche mögliche Interaktionspartner gebunden waren.

In Abbildung 32 sind jeweils die gemittelten Interaktionskurven aus je 20 Einzelmessungen der beiden untersuchten Patienten-Gruppen für die drei Lipidoberflächen einander gegenübergestellt. Die Bindungskurven der CSF-Proben ergaben für die Interaktion mit der PC-Oberfläche eine relativ geringe Assoziation. Für die Bindung der CSF-Proben auf der BTLE- und der SM-Oberfläche war hingegen eine deutlich stärkere Assoziation zu messen. Der größte Unterschied in der Oberflächenbindung zwischen den AD-Patienten und den Kontrollen konnte jedoch auf der SM-Oberfläche festgestellt werden.



**Abb. 32: SPR-Interaktionsmessung von CSF-Proben auf Lipidoberflächen.** Mittelwertkurven der CSF-Messungen von AD-Patienten und Kontrollen. Die Mittelwertkurven wurden aus den Ergebnissen von 20 einzelnen CSF-Proben je Gruppe berechnet. Für alle drei untersuchten Oberflächen, PC, BTLE und SM, zeigten die CSF-Proben der AD-Patienten (rot) eine höhere Bindung als die Kontrollen (blau). Die höchsten Werte wurden bei der Assoziation auf der SM-Oberfläche gemessen. Hier konnte auch der größte Unterschied zwischen beiden Gruppen ermittelt werden.

Um die Bindungsaffinität der untersuchten CSF-Proben miteinander zu vergleichen, wurde der Assoziationswert bei 380 sec (380s-Wert) als Vergleichswert definiert. Dieser befindet sich kurz vor dem Ende der Injektion am höchsten Punkt der Assoziationskurve und ist daher ein geeigneter Maßstab für die maximale Interaktionsstärke innerhalb des Injektionszeitraumes. Die statistische Auswertung der 40 Einzelmessungen ist in Abbildung 33 dargestellt.



**Abb. 33: Auswertung der CSF-Lipid Interaktion.** Gegenübergestellt sind die Assoziationswerte der Alzheimer-Patienten und der Kontrollen bei 380 sec (n=20 pro Gruppe). Die jeweiligen Werte wurden aus den gemessenen SPR-Sensogrammen (siehe Abb. 32) abgelesen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied an mit \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$ , Welch t-Test.

Für jede CSF-Probe der 20 AD-Patienten und 20 Kontrollen wurde der 380s-Wert auf der jeweiligen Lipid-Oberfläche ermittelt und zwischen den beiden Gruppen verglichen.

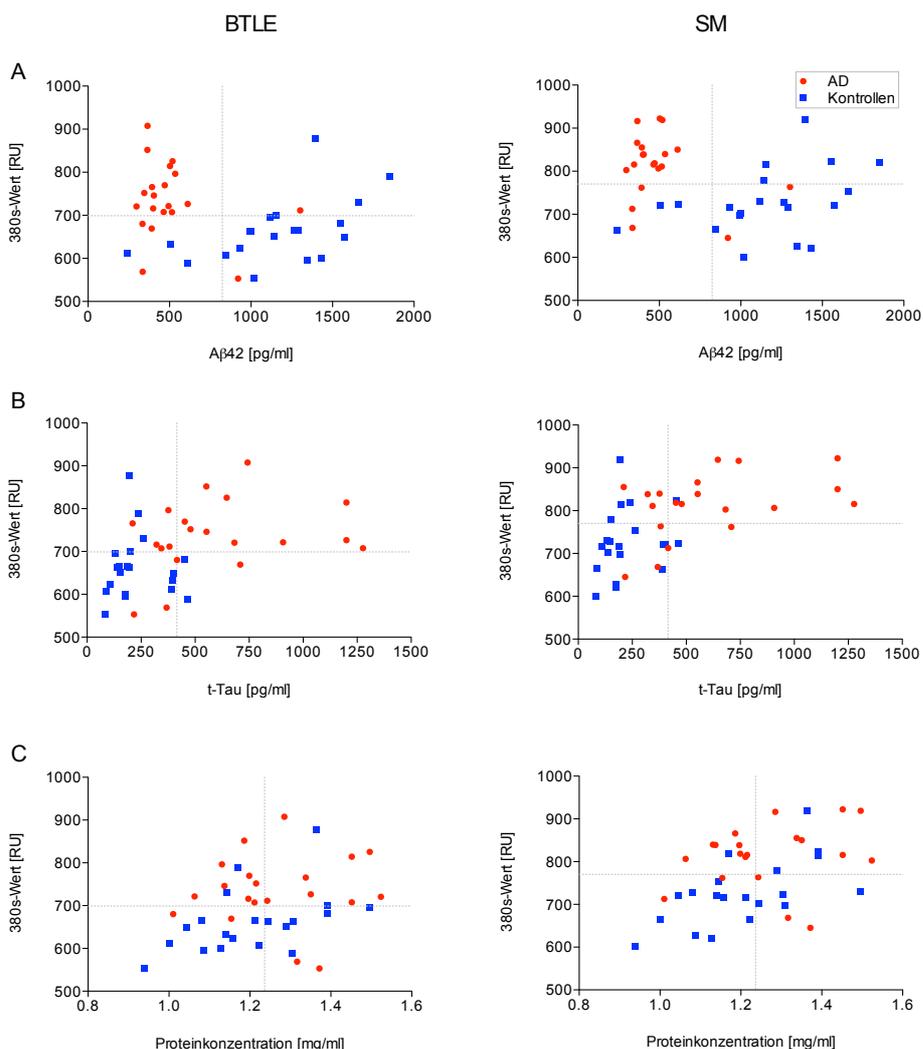
Die statistische Auswertung der einzelnen 380s-Werte ergab einen signifikanten Unterschied der CSF-Lipid Interaktion zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Für jede der drei untersuchten Lipidoberflächen war die Bindung der CSF-Proben von Alzheimer-Patienten signifikant stärker als die der Kontrollgruppe. Speziell auf der mit SM beschichteten Oberfläche war die Differenz besonders groß und gleichzeitig die gemessene Assoziation am höchsten. Die Interaktion zwischen CSF-Proben und BTLE war etwas geringer. Die Bindung an die PC-Oberfläche war hingegen am schwächsten. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen, war jedoch auch auf diesen beiden Oberflächen noch deutlich zu messen.

Um einen Zusammenhang zwischen der unterschiedlich starken Lipidbindung von AD-CSF und Kontroll-CSF mit der A $\beta$ 42wt- und der Gesamt-Tau-Konzentration zu prüfen, wurden die ermittelten 380s-Werte den jeweiligen bekannten Proteinkonzentrationen gegenübergestellt. Zusätzlich wurde die Abhängigkeit der ermittelten Bindungswerte von der gemessenen Gesamtproteinkonzentration untersucht, um die Unterschiede in der Bindungsintensität allein durch eine geringe Proteinkonzentration auszuschließen. Die Korrelationen wurden nur für die BTLE- und die SM-Messungen vorgenommen, da hier die größten Unterschiede zwischen den AD-Patienten und Kontrollen gemessen werden konnten.

In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der Korrelationen dargestellt. Bei der Gegenüberstellung von 380s-Werten und der A $\beta$ 42wt-Konzentration konnte keine direkte Abhängigkeit festgestellt werden (Abb. 34A). Es zeigte sich hingegen, dass CSF-Proben mit höheren A $\beta$ 42wt-Konzentrationen eine geringere Lipidbindung hervorriefen. Dieser Effekt war sowohl auf BTLE als auch auf SM zu beobachten und könnte damit erklärt werden, dass toxische Oligomere im ELISA nicht detektiert werden können und nur in sehr geringen Konzentrationen im CSF vorliegen. Somit würde eine Korrelation mit den ELISA-Daten, bei der vorwiegend Monomeres bzw. Dimeres A $\beta$  detektiert wird, nicht den eigentlichen Unterschied im Gehalt an toxischen Oligomere erklären können.

Die Lipidbindung ist auch von der t-Tau-Konzentration der einzelnen CSF-Proben unabhängig (Abb. 34B). Es konnte nicht festgestellt werden, dass hohe Tau-Konzentrationen mit einer erhöhten oder erniedrigten Lipidinteraktion einhergehen. Dies galt für die BTLE- und die SM-Oberfläche gleichermaßen.

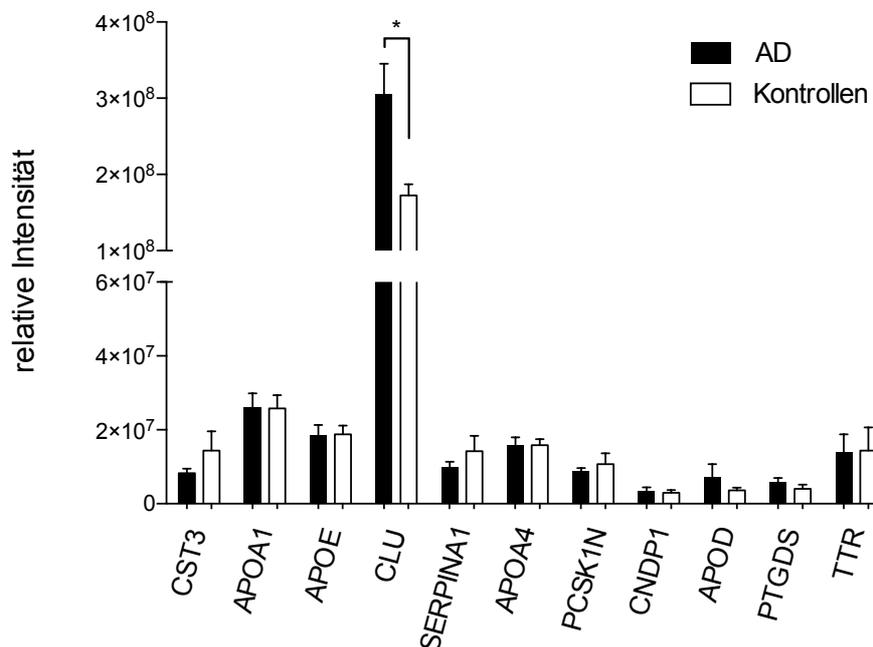
Für die Gesamtproteinkonzentration ergab sich ein ähnliches Bild. Weder bei geringen noch bei hohen Proteinkonzentrationen konnte eine Abhängigkeit detektiert werden, die mit der jeweiligen Lipidbindung in Zusammenhang gebracht werden konnte (Abb. 34C).



**Abb. 34: Korrelationen der 380s-Werte mit den Aβ42wt-, t-Tau- und Gesamtproteinkonzentrationen der CSF-Proben.** (A) Vergleich der 380s-Werte auf BTLE und SM mit der jeweiligen Aβ42wt-Konzentration. (B) Korrelation von t-Tau mit den 380s-Werten und (C) Beziehung der Proteinkonzentration und der 380s-Werte. In der linken Spalte sind jeweils die Angaben für die BTLE- und rechts für die SM-Interaktion dargestellt. In jedem Diagramm ist der jeweilige Mittelwert aller CSF-Proben durch eine grau gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Um näher zu untersuchen welche möglichen Bindungspartner für die gemessene Interaktion verantwortlich sind, wurden mit Hilfe der „auto recovery“-Funktion des Biacore-Geräts, die nach der Dissoziation auf der SM-Oberfläche gebundenen Interaktionspartner wiedergewonnen. Anschließend wurden die Proteine tryptisch verdaut und in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Murat Eravci mittels LC-MS-Analyse identifiziert. Insgesamt konnten auf diese Weise 53 verschiedene Proteine nachgewiesen werden. Für die statistische Auswertung wurden jedoch nur Proteine ausgewählt, die in beiden Patientengruppen in mindestens fünf der jeweils zehn untersuchten Proben gemessen wurden. Auf diese Weise sollte eine belastbare Statistik erzeugt werden und eventuell zufällig gemessene Proteine aussortiert werden. Nach Anwendung dieses Kriteriums blieben 11 Proteine übrig. Für das Protein Clusterin (CLU) konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen AD-Patienten und Kontrollen detektiert werden (Abb. 35). Die Signalintensität für CLU war dabei um ein ca. zehnfaches höher im

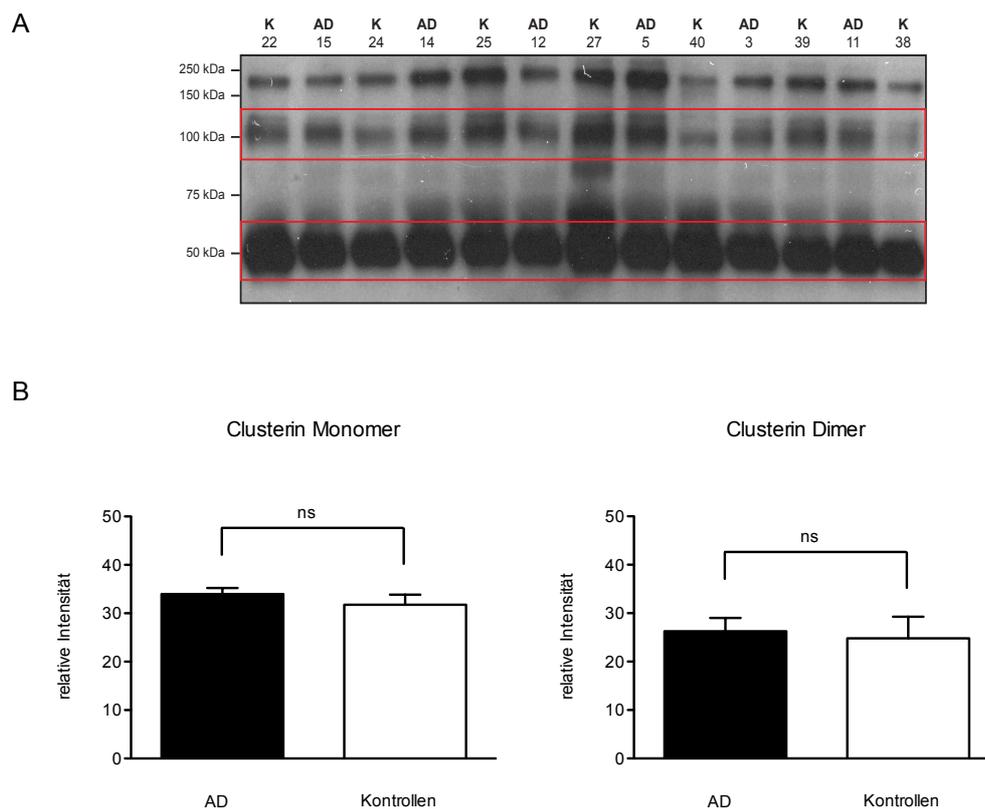
Vergleich mit den anderen identifizierten Proteinen für die statistisch keine Differenzen festgestellt werden konnten.



**Abb. 35: Identifizierung von Proteinen aus CSF-Proben nach der Bindung an eine mit SM beschichtete Sensorchip-Oberfläche.** Dargestellt sind die identifizierten Proteine, die nach der SPR-Messung an der Sensorchip-Oberfläche gebunden waren und nach Ausführung des Recovery-Programms per LC-MS detektiert werden konnten. Folgende Proteine wurden in mindestens 5 der jeweils 10 Proben in der AD-Patienten- bzw. Kontrollgruppe identifiziert: Cystatin-C (CST3), Apolipoprotein A1 (APOA1), Apolipoprotein E (APOE), Clusterin (CLU), Serpin Peptidase Inhibitor A1 (SERPINA1), Apolipoprotein A4 (APOA4), Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1 Inhibitor (PCSK1N), Carnosine Dipeptidase 1 (CNDP1), Apolipoprotein D (APOD), Prostaglandin D2 Synthase (PTGDS), Transthyretin (TTR). Die Auswertung wurde mit dem Programm MaxQuant anhand des „Label-free“-Algorithmus berechnet. Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied an mit \*  $p < 0,05$ , Welch t-Test.

Es stellte sich nun die Frage, ob Clusterin im CSF der AD-Patienten im Vergleich mit den Kontrollen quantitativ vermehrt vorhanden ist und der Unterschied auf diese Weise zu erklären ist. Mittels Western Blot-Analyse wurde das enthaltene Clusterin in den verwendeten CSF-Proben nachgewiesen (Abb. 36A). Die Quantifizierung wurde insgesamt aus 14 AD-Patienten- und 14 Kontrollproben, sowohl für das Monomer wie auch für die dimere Form vorgenommen (Abb. 36B).

Es zeigte sich jedoch nach der Quantifizierung des Clusterin-Gehalts, dass kein Unterschied zwischen AD-CSF und Kontroll-CSF besteht. Die erhöhte Bindung des Clusterins aus dem AD-CSF, wird daher möglicherweise durch veränderte Bindungseigenschaften des Proteins verursacht.



**Abb. 36: Vergleich der Clusterin-Menge im CSF von AD-Patienten und Kontrollen.** (A) Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot der untersuchten CSF-Proben (AD: CSF von AD-Patienten; K: CSF der Kontrollpatienten; Nummer: interne Identifikationsnummer). Zur Detektion wurde der anti-Clusterin Antikörper AT109 verwendet. Clusterin Monomer (~50 kDa) bzw. Dimer (~100 kDa) sind jeweils rot umrandet. (B) Densitometrische Quantifizierung des CSF-Clusterin aus (A). Insgesamt wurde zwischen 14 AD-Proben und 14 Kontrollproben die Clusterin-Monomer bzw. Dimer-Menge quantitativ verglichen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. ns= nicht signifikant, Welch t-Test.

## 3 DISKUSSION

### 3.1 Einfluss von APP FAD-Mutationen auf die $\gamma$ -Sekretase-Spaltung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die untersuchten APP FAD-Mutationen T714I, V717F, L723P den  $\epsilon$ -Schnitt an Position 48/49 begünstigen. Die Prozessierung durch die  $\gamma$ -Sekretase folgt dadurch verstärkt der A $\beta$ 42-Produktlinie und produziert mehr A $\beta$ 42. Die weiteren sequenziellen Schnitte waren nicht wesentlich beeinflusst. Neben der spezifischen Erhöhung der Produkte aus der A $\beta$ 42-Produktlinie konnte zusätzlich eine Verringerung der Gesamtmenge von A $\beta$  und AICD durch die FAD-Mutationen festgestellt werden.

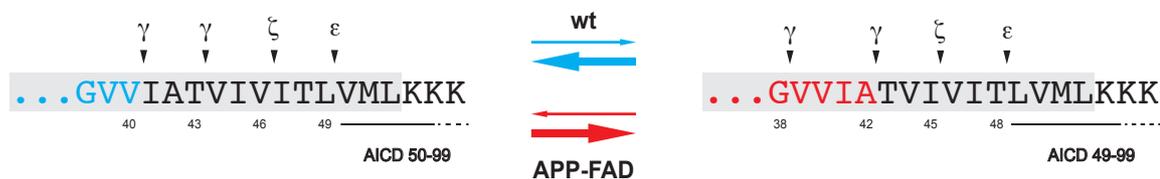
#### 3.1.1 Einfluss der APP FAD-Mutationen auf den $\epsilon$ -Schnitt

Der Einfluss von familiären APP-Mutationen auf die Prozessierung der  $\gamma$ -Sekretase wurde bereits *in vivo* und *in vitro* wiederholt untersucht. Dabei wurde hauptsächlich die Verteilung der produzierten A $\beta$ -Spezies analysiert und festgestellt, dass familiäre Mutationen im APP-Gen verstärkt Produkte der A $\beta$ 42-Linie, überwiegend A $\beta$ 42 und A $\beta$ 38, herstellen und dadurch eine Erhöhung des A $\beta$ 42/40-Verhältnisses verursachen (Suzuki et al., 1994; Borchelt et al., 1996; Scheuner et al., 1996; Hecimovic et al., 2004; Munter et al., 2010; Chávez-Gutiérrez et al., 2012). Diese Auswirkungen konnten auch für die drei untersuchten Mutationen in den *in vitro*-Experimenten dieser Arbeit bestätigt werden. Die ELISA- und MALDI-MS-Analysen zeigten, dass die Mutationen T714I und L723P vermehrt A $\beta$ 42 sowie A $\beta$ 38 produzieren und weniger A $\beta$ 40. Auch durch die Mutation V717F wurde A $\beta$ 42 signifikant erhöht. Bisher unbekannt war jedoch der Mechanismus, über den familiäre APP-Mutationen die Erhöhung des A $\beta$ 42/40-Verhältnisses verursachen. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten aufzeigen:

1. Alle untersuchten familiären APP-Mutationen wirken sich spezifisch auf den  $\epsilon$ -Schnitt aus, wodurch die Prozessierung verstärkt der A $\beta$ 42-Produktlinie folgt.
2. Die veränderte Prozessierung durch die  $\gamma$ -Sekretase wird vermutlich durch eine mutationsbedingte Änderung der Substratkonformation verursacht.

Durch den direkten Nachweis der Tri- und Tetrapeptide konnte erstmals der vollständige Spaltprozess der  $\gamma$ -Sekretase gezielt untersucht werden und der Mechanismus, über den familiäre APP-Mutationen zu einer Veränderung des A $\beta$ 42/40-Verhältnis führen, aufgeklärt werden. Die Ergebnisse belegen, dass alle drei APP FAD-Mutationen einen Wechsel in die A $\beta$ 42-Produktlinie schon ab der  $\epsilon$ -Spaltstelle bewirken. Sobald jedoch der  $\epsilon$ -Schnitt erfolgt ist, setzt die  $\gamma$ -Sekretase die Prozessierung strikt nach dem sequenziellen Spaltmuster durch Tri- bzw. Tetrapeptidabspaltung anhand der beiden bekannten Produktlinien fort (Abb. 37). Das Tripeptidmuster belegt, dass die konkreten Positionen der drei Mutationen keinen wesentlichen Einfluss besitzen und der Proteolysemechanismus nicht verändert wird.

Der Effekt von APP FAD-Mutationen auf den  $\epsilon$ -Schnitt wird durch Daten von Chávez-Gutiérrez et al. unterstützt, welche eine Reduktion des initialen Spaltproduktes der A $\beta$ 40-Produktlinie AICD50-99 im *in vitro*-Ansatz mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachwiesen (Chávez-Gutiérrez et al., 2012). Mögliche Auswirkungen auf die folgenden Proteolyse-schritte wurden in dieser Publikation hingegen nicht überprüft.



**Abb. 37: Auswirkung von familiären APP-Mutationen auf die sequenzielle Prozessierung der  $\gamma$ -Sekretase.** APP-TMS (grau) mit eingezeichneten Schnittstellen der sequenziellen Proteolyse für die A $\beta$ 40-Produktlinie (links) und die A $\beta$ 42-Produktlinie (rechts). Im physiologischen Zustand wird das wildtypische APP  $\beta$ -CTF vorwiegend zu A $\beta$ 40 (blau) und ein geringer Teil zu A $\beta$ 42 prozessiert (A $\beta$ 42/40-Verhältnis ca. 1:9). Durch familiäre APP-Mutationen im  $\gamma$ -Sekretase-Spaltbereich wird die initiale Enzym-Substrat-Positionierung beeinflusst. Dies verursacht eine Verschiebung des  $\epsilon$ -Schnittes von der Position 49-50 zur Position 48-49. Infolgedessen wird proportional mehr A $\beta$ 42 hergestellt (A $\beta$ 42/40-Verhältnis ca.  $\geq 1:1$ ).

Die Ergebnisse der Tripeptidanalyse zeigen, dass die Mutationen hauptsächlich die initiale Wechselwirkung von Substrat und Enzym verändern und dadurch einen verstärkten Wechsel in die A $\beta$ 42-Produktlinie auslösen. Die durchgeführten CD-Messungen lieferten erste Hinweise, dass die Wechselwirkung möglicherweise durch eine veränderte Substratkonformation ausgelöst wird, da sich die drei untersuchten C100 FAD-Substrate deutlich vom Wildtyp unterscheiden. Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass eine veränderte Substratkonformation die Positionierung bzw. Orientierung des Substrats innerhalb des aktiven Zentrums verursacht und die FAD-Substrate eine Prozessierung entlang der A $\beta$ 42-Produktlinie im Vergleich zum Wildtyp-Substrat begünstigen. Weiterhin ist vorstellbar, dass die Aminosäuresubstitutionen die molekulare Oberfläche des Substrats verändern und sich dadurch auf die Enzym-Substrat-Interaktion auswirken. Munter et al. konnten für die Mutationen T714I und V717F an einem computergestützten Modell verdeutlichen, dass diese beiden Substitutionen durch die größeren Aminosäureketten die Oberfläche des Substrats verändern. (Munter et al., 2010). Auch bei der Mutation L723P wird durch Prolin eine größere zyklische Seitenkette eingefügt, die speziell die helikale Struktur des Substrats stark modifiziert. Daher ist zu vermuten, dass besonders die Substitution durch größere Aminosäureseitenketten die Enzym-Substrat-Interaktionsfläche beeinflusst und den  $\epsilon$ -Schnitt an Position 48/49 begünstigt. Zudem ergaben NMR-Untersuchungen des C100wt-Substrats von Barrett et al., dass im Bereich der Glycine 708 und 709 eine Krümmung vorhanden ist. Das dort dargelegte Interaktionsmodell von Substrat und Enzym verdeutlichte, dass die C-terminal angrenzende Region - also der Spaltbereich der  $\gamma$ -Sekretase - in einer Verengung des kanalförmigen aktiven Zentrums liegt,

wodurch sich Aminosäuresubstitutionen zusätzlich stärker auswirken können (Barrett et al., 2012).

Insgesamt ergibt sich aus diesen Untersuchungen eine zentrale Bedeutung des  $\epsilon$ -Schnitts als ausschlaggebender Faktor für die Entscheidung nach welcher Produktlinie die Prozessierung verläuft. Eine gezielte Modulation dieser Enzym-Substrat-Interaktion hin zu einer vermehrt der A $\beta$ 40-Produktlinie folgenden Prozessierung, könnte daher therapeutisch nicht nur für die familiäre sondern auch für die sporadische Form der Alzheimer-Krankheit relevant sein.

### 3.1.2 Einfluss der APP FAD-Mutationen auf die Produktion von Gesamt-A $\beta$ und AICD

Für die untersuchten FAD-Mutationen T714I, V717F und L723P wurde eine zum Teil verringerte Gesamt-A $\beta$ -Menge im *in vitro*  $\gamma$ -Sekretase-Test festgestellt. Die Reduktion des Gesamt-A $\beta$  korrelierte mit einem Rückgang der Produktion von Gesamt-AICD und weist auf eine reduzierte  $\epsilon$ -Spalteffizienz hin.

Diese Auswirkung von APP FAD-Mutanten wurde bisher mehrfach beobachtet. In Analysen von Hecimovic et al. wurde für die FAD-Mutationen T714I und L723P im Vergleich zum Wildtyp ein Rückgang des Gesamt-AICD-Levels beobachtet (Hecimovic et al., 2004). Zudem wurde auch in einer kinetischen Analyse eine reduzierte  $\epsilon$ -Spalteffizienz festgestellt, bei der verschiedene Konzentrationen der FAD C99-Substrate zu einem meist erniedrigten Gesamt-AICD im Vergleich zum Wildtyp führten (Chávez-Gutiérrez et al., 2012).

Aus diesen Daten lässt sich folgern, dass die Alzheimer-Pathologie ausgelöst durch familiäre Mutationen eher unabhängig von der absoluten A $\beta$ -Menge ist und vielmehr die qualitative Verteilung der A $\beta$ -Spezies, insbesondere das A $\beta$ 42/40-Verhältnis, relevant ist. Diese Annahme unterstützen auch Ergebnisse von Kuperstein et al., die schon bei geringfügigen qualitativen Veränderungen des A $\beta$ 42/40-Verhältnis einen starken Einfluss auf die Neurotoxizität und das Aggregationsverhalten des Peptidgemisches durch eine Stabilisierung von neurotoxischen A $\beta$ -Oligomeren beobachteten (Kuperstein et al., 2010).

Für die drei APP FAD-Mutationen wurden quantitative Unterschiede in der Gesamt-A $\beta$ -Menge und die Beeinflussung des  $\epsilon$ -Schnitts mit einer verstärkten Prozessierung entlang der A $\beta$ 42-Produktlinie ermittelt. Dies zeigt für eine therapeutische Intervention zwei Aspekte auf: 1. Eine alleinige Reduktion der  $\gamma$ -Sekretase-Prozessierung muss nicht zwangsläufig zu einer Verbesserung der Amyloid-Pathologie führen. 2. Die Einwirkung auf das spezifische Gemisch der verschiedenen A $\beta$ -Spezies durch eine gezielte Reduktion von A $\beta$ 42 zugunsten der kürzeren, nicht neurotoxisch wirkenden Spezies A $\beta$ 40 oder A $\beta$ 38, ist von besonderer Bedeutung.

### 3.2 Bindung von A $\beta$ an Lipide der Plasmamembran

Um herauszufinden ob die Toxizität von A $\beta$ -Peptiden durch die Interaktion mit Lipiden vermittelt wird, wurde erstmals vergleichend die Interaktion zwischen A $\beta$ 42wt, A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I mit sechs Lipiden bzw. Lipidgemischen durchgeführt. A $\beta$ 42wt gilt als neurotoxisch wirkendes Peptid in der AD, A $\beta$ 40wt besitzt hingegen keine bzw. nur eine sehr geringe Toxizität. Zusätzlich wurde auch die GxxxG-Mutation A $\beta$ 42 G33I analysiert. Diese Substitution weist eine schnelle Aggregation auf und bildet fast ausschließlich höhere Oligomere, jedoch keine fibrillären Strukturen und ist nicht neurotoxisch (Harmeier et al., 2009). Durch Verwendung dieser Mutation sollte zusätzlich die Auswirkung des GxxxG-Motivs und des hohen Oligomerisierungszustands auf die Bindung an Lipide untersucht werden. Alle drei untersuchten Peptide sind hydrophob und schnell aggregierend, wobei A $\beta$ 42 G33I durch die Substitution von Glycin zu Isoleucin eine deutlich höhere Hydrophobizität besitzt als A $\beta$ 42wt. Das A $\beta$ 40wt-Peptid - verkürzt um die Aminosäuren Isoleucin und Alanin - ist hingegen wesentlich hydrophiler.

Mittels SPR-Technik wurde die direkte Interaktion dieser drei A $\beta$ -Peptide mit Lipidoberflächen verschiedener Zusammensetzung untersucht. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass das toxische A $\beta$ 42wt auf allen analysierten Lipidoberflächen eine stärkere Interaktion zeigte, als die beiden nicht toxischen Peptide A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I. Bei einer Peptidkonzentration von 5  $\mu$ M wurde speziell für die beiden Sphingolipide GM1 und SM eine sehr starke Assoziation festgestellt. Diese war gegenüber PE:PC, SM:Chol und besonders PC signifikant erhöht. Die Dissoziation war für A $\beta$ 42wt zwischen den untersuchten Lipidoberflächen nicht signifikant verändert, jedoch im Vergleich mit A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I deutlich verlangsamt. Die aufgeführten Unterschiede zeigten sich auch auf der BTLE-Oberfläche, die in etwa der physiologischen Lipidzusammensetzung neuronaler Plasmamembranen entspricht. Mit dieser Untersuchung konnte für A $\beta$ 42wt und A $\beta$ 40wt erstmals ein spezifischer Unterschied in der Interaktion mit ausgewählten Lipiden nachgewiesen werden.

In der Literatur wurde bisher mehrfach GM1 als A $\beta$ -bindendes und funktionell bedeutsames Lipid beschrieben. Für diese Interaktion wurde gezeigt, dass die Bindung von A $\beta$ 42 oder A $\beta$ 40 an GM1 einen Aggregationskeim generiert und die Peptidaggregation dadurch beschleunigt wird (Ikeda et al., 2011; Evangelisti et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit SM ein weiteres Lipid ermittelt werden, das speziell mit A $\beta$ 42wt stark interagiert und eine spezifische, konzentrationsabhängige Interaktion zeigte. Aus den Bindungskurven von GM1 und SM ist zudem erkennbar, dass A $\beta$ 42wt am Ende der Injektion keinen Gleichgewichtszustand zwischen Assoziation und Dissoziation erreichte. Im Gegensatz dazu gelangten die Bindungskurven von A $\beta$ 40wt schnell an ein Maximum. Dies

---

weist darauf hin, dass SM ebenso wie GM1 die Aggregation des A $\beta$ 42wt-Peptids auf der Lipidoberfläche forcieren kann.

Desweiteren wurden mittels SPR-Messungen auf SM- und PC-Oberflächen die Auswirkungen des Oligomerisierungsgrades von A $\beta$  auf die Lipidinteraktion untersucht. Nachgewiesen wurde hierbei eine besonders hohe Bindungsaffinität von A $\beta$ 42wt-Tetrameren gegenüber SM, die auf PC erheblich verringert war. A $\beta$ 42wt-Monomere interagierten auch mit der Oberfläche, zeigten aber eine deutlich reduzierte Bindung. Besonders interessant war, dass für Monomere und Tetramere von A $\beta$ 40wt sowie Oligomere von A $\beta$ 42 G33I, auf SM und auch auf PC keine spezifischen Signale gemessen werden konnten. Eine Bindung fand nicht statt. Hinsichtlich der in der Literatur beschriebenen toxischen Eigenschaften der untersuchten A $\beta$ -Oligomere lässt sich feststellen, dass das Bindungsverhalten an SM und PC mit deren zelltoxischer Wirkung korreliert (Harmeier et al., 2009). Die Analysen zeigen, dass besonders die neurotoxischen Tetramere von A $\beta$ 42wt ein hohes Bindungspotential besitzen.

Ferner zeigen die Ergebnisse der Calcein-Freisetzungs-Analysen auf, dass A $\beta$  nicht nur verstärkt an SM bindet, sondern von SM gebildete Membrandoppelschichten auch besonders labil gegenüber A $\beta$ -Peptiden sind und diese Lipidstruktur lokal stören können. A $\beta$ 42wt erzeugte die höchste Calcein-Freisetzung bei der Inkubation mit SM-Liposomen. Erstmals konnte mit den Analysen gezeigt werden, dass SM auch bei der Insertion von A $\beta$ 42wt in die Membrandoppelschicht von Bedeutung ist. Eine Erhöhung der Bindung und Insertion in SM-reiche Membranen wurde schon für A $\beta$ 40wt mittels „plasmon wave guard“ (PWR) - Spektroskopie nachgewiesen (Devanathan et al., 2006).

Die unterschiedlich starke Bindung von A $\beta$ 42 bzw. A $\beta$ 40 an SM lässt eine Mitwirkung der beiden C-terminalen Aminosäuren Isoleucin und Alanin des A $\beta$ 42wt-Peptids nicht nur bei der Oligomerisierung, sondern auch bei der Bindung vermuten. Dies belegt die deutlich stärkere Bindung von A $\beta$ 42wt-Tetrameren im Vergleich zu A $\beta$ 40wt-Tetrameren. Möglicherweise beeinflussen diese Aminosäuren die Bindung über eine Erhöhung der Hydrophobizität und durch strukturelle Änderungen. In den durchgeführten Experimenten wurde gezeigt, dass die C-terminale Region - also der Bereich 28-42 - besonders stark an SM bindet, jedoch der Bereich 1-28 kaum mit SM interagiert. Dies steht im Widerspruch zu einer Publikation von Mahfoud et al., in der ein spezifisches SM-Bindungsmotiv für A $\beta$ 40wt im N-terminalen Teil des Peptids postuliert wird (Mahfoud et al., 2002). An der Ausbildung des SM-Bindemotivs werden die Aminosäuren Asp7, Tyr10, Glu11, His13, His14 und Phe20 vermutet. Da dieses Motiv im eher unstrukturierten Bereich des Peptids liegt und sowohl in A $\beta$ 42wt als auch in A $\beta$ 40wt vorhanden ist, erscheint die Erklärung der unterschiedlichen Bindungseigenschaften allein anhand dieses Motivs nicht plausibel. Gegen diese Annahme spricht zusätzlich auch

das Ergebnis der SPR-Messung des A $\beta$ -Peptids 1-15, in dem bis auf die am Bindemotiv beteiligte Aminosäure Phe20 alle relevanten Reste beinhaltet sind. Die Bindung dieses Peptids ist jedoch um das Dreifache geringer als die Bindung des Peptids 16-42, was nur dadurch erklärt werden kann, dass Phe20 maßgeblich für die Ausbildung des Bindemotivs ist. Zudem weisen die SPR-Analysen zwischen A $\beta$  und Lipidoberfläche auf eine von einer 1:1 Stöchiometrie abweichende komplexere Stöchiometrie hin. Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass nicht nur ein definiertes Bindungsmotiv, sondern vielmehr mehrere Bindungsstellen für die A $\beta$ -Lipidinteraktion verantwortlich sind. Hinweise darauf ergeben sich aus der Arbeit von Barz und Urbanc. Durch Moleküldynamik-Simulation wurde gezeigt, dass A $\beta$ 42 im Vergleich zu A $\beta$ 40 einen flexibleren N-Terminus besitzt und sowohl hydrophobe Aminosäurereste als auch geladene - wie z. B. Lysin an Position 28 - gegenüber der hydrophilen Umgebung stärker exponiert vorliegen (Barz und Urbanc, 2012). Für die initiale Interaktion von A $\beta$ 42 mit der Lipidkopfgruppe könnten daher elektrostatische Wechselwirkungen wichtig sein. Die erhöhte Hydrophobizität der C-terminalen Region begünstigt schließlich die Bindung von A $\beta$ 42 auf der Lipidoberfläche. Der Unterschied in der Bindung von A $\beta$  an SM- bzw. Phosphoglycerid-Lipidschichten ist möglicherweise mit der hohen lateralen Packungsdichte von SM und der dadurch gesteigerten Ladungsdichte auf der Membranoberfläche zu erklären, was eine verstärkte Interaktion von SM mit A $\beta$ 42wt erklären würde.

In der Literatur ist ein toxischer Mechanismus im Zusammenhang mit SM für das Protein Lysenin aus dem Kompostwurm *Eisenia foetida* beschrieben. Lysenin bindet spezifisch an SM-Cluster, oligomerisiert und bildet Poren mit einem Durchmesser von ca. 3 nm (Yamaji-Hasegawa et al., 2003; Ishitsuka und Kobayashi, 2007). Lysenin ist ein 33 kDa großes Protein und besitzt keine Homologie zu A $\beta$ . Die Porenbildung als möglicher toxischer Mechanismus von A $\beta$  wird indes schon länger diskutiert (Demuro et al., 2005; Deshpande et al., 2006). Durch die Entdeckung von Lysenin war es erstmals möglich, „Lipid rafts“ funktionell und strukturell zu charakterisieren. Auf diese Weise wurden SM-reiche Domänen räumlich und funktionell von GM1-reichen Regionen abgegrenzt (Kiyokawa et al., 2005).

Aus den Arbeitsergebnissen kann im Hinblick auf einen potentiellen Pathomechanismus geschlossen werden, dass Membranregionen mit einem hohen Anteil SM, wie z.B. „Lipid rafts“ oder sogenannte SM-Cluster, für die Membraninteraktion mit A $\beta$ 42wt-Tetrameren eine besondere Bedeutung erlangen und möglicherweise eine spezifische Funktion bei der Vermittlung der Toxizität *in vivo* einnehmen.

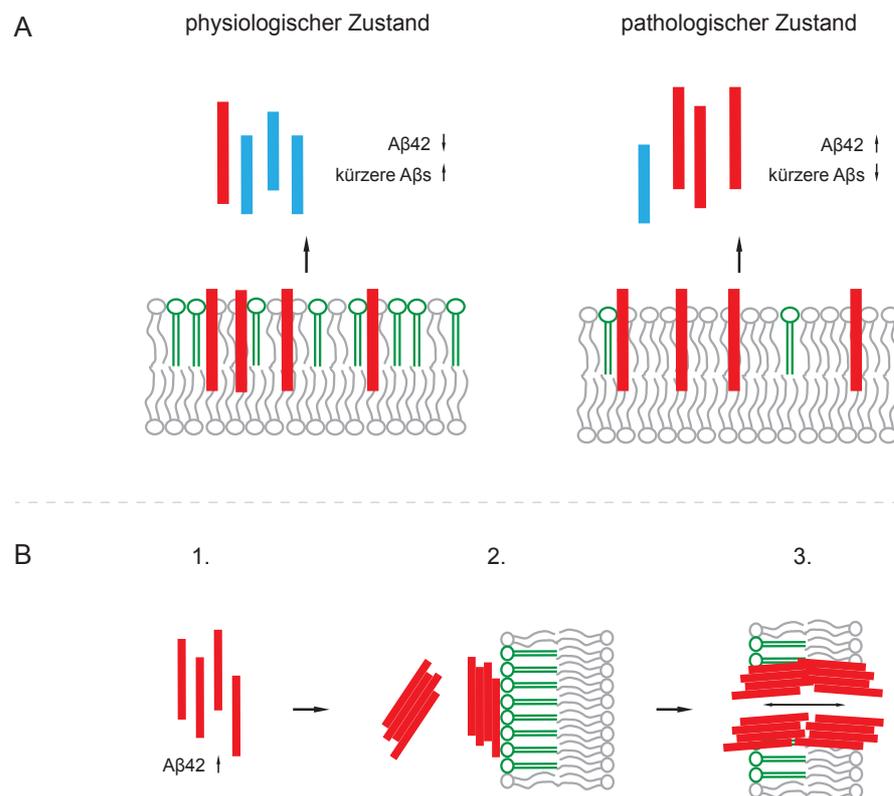
Die Rolle von Cholesterin in der Alzheimer-Krankheit wird kontrovers diskutiert. Zumeist wird ein erhöhter Cholesterinspiegel im mittleren Lebensalter mit einem verstärkten Risiko für die spätere Erkrankung an Alzheimer angenommen wird (Kivipelto et al., 2002; Hartmann et al., 2007; Anstey et al., 2008). In dieser Arbeit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass ein Gemisch

von Cholesterin und SM im Verhältnis 1:4 sowohl die SPR-Bindung verringerte als auch die Fluoreszenzfreisetzung in der Calcein-Analyse reduzierte. Unter der Annahme, dass der Bindung von A $\beta$  an SM ein toxischer Mechanismus zugrunde liegt, würde sich ein protektiver Effekt von Cholesterin ergeben. Dies zeigen auch Experimente, bei denen membranlokalisiertes Cholesterin in humanen Neuroblastomazellen mittels Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin reduziert und dadurch eine Erhöhung von A $\beta$ -Oligomeren an der Plasmamembran festgestellt wurde (Cecchi et al., 2008).

Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil einer geordneten „Lipid raft“-Struktur und eine Reduktion von Cholesterin führt zu einer gestörten Bildung von „Lipid rafts“ (Hao et al., 2001). In verschiedenen Studien wurde belegt, dass sich ein erhöhter Cholesterin-Gehalt in der Membran auf die APP-Prozessierung durch einen Anstieg der A $\beta$ -Produktion auswirkt. Dies wurde durch den Nachweis von APP und BACE1 innerhalb der Raftregionen und einer erhöhten Endozytose von APP begründet (Simons et al., 1998; Eehalt et al., 2003; Belyaev et al., 2010). Im Gegensatz dazu geht eine Cholesterin-Reduktion mit einer verstärkten  $\alpha$ -Sekretase Prozessierung einher (Kojro et al., 2001). Daher müssen die erhöhte Bindung von A $\beta$ -Oligomeren durch einen erniedrigten Cholesteringehalt in der Membran einerseits und die Auswirkung eines Cholesterinanstiegs auf die APP-Prozessierung respektive A $\beta$ -Produktion andererseits als zwei voneinander getrennte Vorgänge betrachtet werden.

Neben Cholesterin könnten jedoch auch andere „Lipid raft“-assoziierte Lipide wie SM oder GM1 eine Bedeutung bei der Prozessierung von APP besitzen. Die Prozessierung von APP ist ein komplexer Prozess, bei dem die Enzym-Substrat Positionierung entscheidend für die Spaltung anhand der beiden Produktlinien ist. Vorstellbar ist daher, dass die Lipidumgebung ebenso einen starken Einfluss auf die Prozessierung besitzt. Nachgewiesen wurde in dieser Arbeit, dass auch monomeres A $\beta$ 42wt an SM bindet. Daraus wird die Hypothese entwickelt, dass möglicherweise eine stabilisierende direkte oder indirekte Wechselwirkung zwischen monomerem A $\beta$ 42wt und Lipiden während der Prozessierung besteht. Eine Reduktion dieser A $\beta$ -bindenden Lipide würde eine vermehrte Freisetzung von A $\beta$ 42wt in den Extrazellularraum zur Folge haben. Unter physiologischen Bedingungen würde A $\beta$ 42wt hingegen überwiegend in der Membran verbleiben und weiter zu kürzeren nicht toxischen A $\beta$ -Spezies, wie etwa A $\beta$ 38 abgebaut werden. In zwei Studien wurde eine direkte Bindung zwischen Cholesterin und C99 nachgewiesen (Beel et al., 2010; Barrett et al., 2012). Daher könnte die Stabilisierung des membranständigen A $\beta$ s auch indirekt über das gebundene Cholesterin vermittelt werden. Basierend auf diesen Annahmen könnten die Daten von Sawamura et al. in SM-defizienten CHO-Zellen erklärt werden. A $\beta$ 42wt lag dort erhöht vor, A $\beta$ 40wt zeigte hingegen keine Veränderung. Durch Zugabe von exogenem Sphingosin wurde der beschriebene Effekt wieder rückgängig gemacht (Sawamura et al., 2004). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Bindung von A $\beta$ 40-Oligomeren an GM1 eine Reduktion der Membranfluidi-

tät bewirkt und sich dadurch die A $\beta$ 42-Produktion erhöht. Der gleiche Effekt wurde durch das spezifisch an GM1 bindende Choleratoxin beobachtet (Peters et al., 2009). Für SM und andere A $\beta$ -bindende Lipide wären daher sowohl protektive als auch toxische Funktionen im A $\beta$ -Metabolismus vorstellbar. Zum einen sind SM-reiche Membranregionen, wie *in vitro* gezeigt, besonders labil gegenüber A $\beta$ -Peptiden. Demnach könnte es in diesen Regionen zur Bildung von Membranporen durch A $\beta$ 42wt-Tetramere und folglich dem Absterben von Neuronen kommen (Abb. 38B).



**Abb. 38: Modell von zwei möglichen Auswirkungen der A $\beta$ -Lipid-Interaktion** (A) Im physiologischen Zustand wird das toxische A $\beta$ 42 (rot) vorwiegend durch A $\beta$ -bindende Lipide (grün), wie SM oder GM1, in der Membran gehalten und weiter zu kürzeren, nicht toxischen A $\beta$ -Spezies (blau) prozessiert. Im pathologischen Zustand hingegen sind entweder A $\beta$ -bindende Lipide quantitativ verringert oder es liegt eine veränderte „Lipid raft“-Struktur vor, so dass A $\beta$ 42 bei der Prozessierung verstärkt die Membran verlässt und nicht mehr weiter prozessiert wird. Der  $\gamma$ -Sekretase Enzymkomplex ist im Modell der Einfachheit halber nicht dargestellt. (B) Eine erhöhte Produktion von A $\beta$ 42 führt zu einer verstärkten Bildung toxischer A $\beta$ 42-Tetramere (1.). Diese lagern sich vorzugsweise an Membranregionen an, die reich an A $\beta$ -bindenden Lipiden sind (2.) und bilden dort Poren oder Kanäle aus (3.). Dies könnte schließlich den neuronalen Zelltod auslösen.

Zum anderen könnte SM sowie auch GM1 A $\beta$  im physiologischen Zustand während der Prozessierung stabilisieren und eine vermehrte A $\beta$ 42-Freisetzung verhindern. Die altersbedingten Veränderungen des Lipidmetabolismus im Gehirn wären schließlich der Auslöser dafür, dass sich die Verteilung von SM, GM1 und Cholesterin verschiebt mit weitreichenden Auswirkungen auf die Eigenschaften der neuronalen Plasmamembran (Svennerholm et al., 1989; Löhmann et al; 2010). Durch diese Veränderungen bedingt, würde primär die A $\beta$ 42-Produktion gesteigert werden und eine weitere Prozessierung zu kürzeren Spezies verhindert. Die beschriebene Bindung von A $\beta$ -Oligomeren an GM1 bzw. die spezifische Inhibition

der neutralen Sphingomyelinase durch A $\beta$ 42wt (Grimm et al., 2005) würden so zusätzlich einen Anstieg von A $\beta$ 42 auslösen und einen sich selbst verstärkenden Prozess in Gang bringen. Dies könnte den erst langsamen Anfang einer sporadischen Alzheimererkrankung und die schließlich stetige Zunahme des Krankheitsprozesses erklären (Abb. 38A).

Die Ergebnisse zeigen, dass SM ein wichtiger Bindungspartner für die A $\beta$ -Plasmamembraninteraktion sein kann. SM liegt mit ca. 10-15% der Membranphospholipide, und einem weit höheren Anteil in der neuronalen Plasmamembran vor (Barenholz und Thompson, 1980; Hicks et al., 2012). SM ist eine Hauptkomponente von „Lipid rafts“, die in Neuronen besonders im axonalen und dendritischen Bereich eine hohe Dichte aufweisen (Simons und Toomre, 2000).

Hieraus lässt sich ableiten, dass die Interaktion von löslichen A $\beta$ 42wt-Tetrameren mit SM, besonders in neuronalen Geweben von Bedeutung sein kann. Die Bindung wird dabei entscheidend vom oligomeren Zustand, der Peptidkonformation sowie der gegenüber A $\beta$ 40wt deutlich erhöhten Hydrophobizität von A $\beta$ 42wt beeinflusst. Ob dieser Interaktion ein primärer toxischer Mechanismus zugrunde liegt, der für die molekulare Pathologie der Alzheimerkrankheit essentiell ist, muss anhand weiterer Experimente untersucht werden. Ein erster Hinweis könnte sich beispielsweise aus der gezielten Einwirkung auf die SM-Synthese und der folgenden Analyse der zelltoxischen Wirkung von A $\beta$ 42wt in Zellkultur ergeben.

### 3.3 Bindung humaner CSF-Proben an Lipide

Es ist bekannt, dass in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) von Alzheimer-Patienten erhöhte Konzentrationen niederer A $\beta$ -Oligomere vorliegen und diese mit dem Fortschreiten der Erkrankung ansteigen (Fukumoto et al., 2010; Gao et al., 2010; Santos et al., 2012, Wang-Dietrich et al., 2013). Im Abschnitt 2.2 konnte gezeigt werden, dass besonders niedere A $\beta$ 42-Oligomere - speziell Tetramere - an Lipidoberflächen binden, und vorzugsweise an SM-Oberflächen. Es sollte daher möglich sein, durch Messung der Interaktion von CSF mit Lipiden, einen Unterschied zwischen AD-Patienten und einer Kontrollgruppe zu detektieren. Deswegen wurde hier erstmals die Interaktion zwischen CSF von AD-Patienten in einem leichten Stadium der Demenz sowie einer Kontrollgruppe nicht dementer Personen und PC-, BTLE- und SM-beschichteten Oberflächen untersucht.

Interessanterweise ergaben die durchgeführten SPR-Messungen im Mittel auf allen drei untersuchten Lipidoberflächen eine signifikant höhere Assoziation der CSF-Proben von AD-Patienten, die besonders ausgeprägt auf der SM-Oberfläche war. Die Bindungskurven wurden am Maximum der Assoziationskurve, bei 380 sec verglichen. Daraus ergab sich auf der SM-Oberfläche ein Unterschied von 11% zwischen CSF von AD-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe. Für die BTLE-Oberfläche betrug die Differenz 9,8% und für die PC-

Oberfläche 14%. Die Stärke der Interaktion war auf dem mit PC beschichteten Sensorchip jedoch um etwa die Hälfte vermindert im Vergleich zu den beiden anderen Lipidoberflächen. Diese Ergebnisse zeigen, dass anhand der CSF-Lipid-Interaktion eine Unterscheidung zwischen AD-Patienten im Anfangsstadium der Demenz und der Kontrollgruppe möglich ist.

Um eine Abhängigkeit der gemessenen Bindungswerten bei 380 sec mit den bereits in den CSF-Proben bestimmten Konzentrationen, für A $\beta$ 42, t-Tau und dem Gesamtproteingehalt zu prüfen, wurden diese miteinander korreliert. Es ergab sich jedoch keine direkte Abhängigkeit. Auf diese Weise konnte eindeutig gezeigt werden, dass weder die Proteingesamtkonzentration noch die Menge an t-Tau im CSF einen Einfluss auf die gemessene Lipidbindung haben. Für den A $\beta$ 42-Gehalt konnte dies ebenso festgestellt werden. Es muss jedoch erwähnt werden, dass der standardmäßig verwendete A $\beta$ 42-ELISA nicht die Konzentration von A $\beta$ 42-Oligomeren im CSF abbildet. Demzufolge besteht die Möglichkeit, dass die gemessenen Unterschiede durch A $\beta$ 42-Oligomere oder durch unbekannte Bindungspartner verursacht werden. Dies wurde überprüft indem die gesamte Lipidschicht inklusive der gebundenen Proteine von der Sensorchipoberfläche eluiert, durch die Protease Trypsin verdaut und mittels LC-MS analysiert wurde. Die Proteinidentifizierung wurde ausschließlich auf SM-beschichteten Oberflächen durchgeführt und erbrachte als Interaktionspartner insgesamt 11 Proteine. Neben den Apolipoproteinen APOE, APOA1, APOA4 und APOD wurden Protease-Inhibitoren wie Cys C, SERPINA1 und PCSK1N identifiziert. Weiterhin konnte das Serumtransportprotein TTR und die Prostaglandinsynthase PTGDS gemessen werden. Einige der hier detektierten Proteine wurden bisher schon mit der AD in Zusammenhang gebracht. Genetische Studien konnten für APOA1 (Vollbach et al., 2005), APOD (Helisalmi et al., 2004; Desai et al., 2003; Chen et al., 2008) eine Assoziation mit der AD zeigen. Cys C wurde auch als Risikofaktor für die AD beschrieben (Beyer et al., 2001; Cathcart et al., 2005). Es gab jedoch auch Studien, die diesen Zusammenhang für Cys C nicht bestätigen konnten (Helisalmi et al., 2009). Desweiteren wurde gezeigt, dass die Konzentrationen dieser Proteine im CSF von AD-Patienten zum Teil signifikant verändert sind. Die Studien kamen jedoch teilweise zu gegensätzlichen Ergebnissen (Puchades et al., 2003; Hu et al., 2005; Zellner et al., 2009). Bezogen auf die in dieser Studie gemessene Bindung an SM wurden die oben aufgeführten Proteine nur in vergleichsweise geringen Mengen detektiert und kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen festgestellt. Daraus folgt, dass die Proteine eine Affinität gegenüber SM besitzen, diese jedoch zwischen AD- und Kontrollproben nicht verändert ist. Nimmt man aus den veröffentlichten Daten an, dass einige der detektierten Proteine in unterschiedlichen Konzentrationen im CSF vorliegen so zeigte dies jedoch keinen Einfluss auf das SM-Bindungsverhalten. Entgegen der Erwartung wurden keine A $\beta$ 42-Oligomere auf der SM-Oberfläche detektiert. Eine Erklärung hierfür ist auf die mit <1pM nur sehr geringe Konzentration im CSF zurückzuführen (Georganopoulou et al., 2005).

Zudem ist die Detektion von A $\beta$ -Oligomeren mit der verwendeten massenspektrometrischen Methode aufgrund der starken Hydrophobizität und schlechten Ionisierbarkeit erschwert. Ein Nachweis der Oligomere wird zusätzlich durch die vergleichsweise höher abundanten Proteine verhindert.

Für das Glykoprotein Clusterin (CLU) wurde im Gegensatz zu den anderen Proteinen ein ca. zehnfach höheres Signal gemessen und war in den Alzheimerproben signifikant erhöht (ca. 77%). Dies kann die stärkere Bindung der CSF-Proben von Alzheimer-Patienten durch eine höhere Assoziation von CLU an die SM-Oberfläche erklären. Die CLU-Menge in den verwendeten CSF-Proben wurde mittels Western Blot quantifiziert und ergab keine Unterschiede zwischen AD-Patienten und Kontrollgruppe, was zusätzlich den Schluss zulässt, dass die erhöhte Assoziation von CLU in den AD-Proben durch eine Veränderung der Bindungseigenschaften ausgelöst wird. CLU ist in genetischen Assoziationsstudien mehrfach als Risikofaktor für die AD beschrieben worden und gilt derzeit als eines der drei höchstassoziierten Risikogene (Harold et al., 2009; Lambert et al., 2009; Seshadri et al., 2010; Naj et al., 2011). Es gibt *in vitro*-Studien die belegen, dass CLU und A $\beta$ 40-Oligomere Komplexe bilden können und das Wachstum zu größeren Aggregaten bzw. fibrillären Strukturen verhindert. Daraus wurde gefolgert, dass CLU eine protektive Funktion besitzt und lösliche, potentiell neurotoxisch wirkende A $\beta$ -Oligomere über längere Zeit komplexiert, bis diese schließlich zellulär abgebaut werden können (Narayan et al., 2012). Gegenteilige Ergebnisse wurden durch *in vivo*-Experimente mit Amyloid-überexprimierenden PDAPP-Mäusen, denen das CLU-Gen fehlte, erzielt. Hier wurde eine Reduktion fibrillärer A $\beta$ -Strukturen bei verringertem Verlust von Nervenfortsätzen im Bereich von amyloiden Plaques festgestellt (DeMattos et al., 2002). Die genaue Funktion von CLU ist in der AD somit noch nicht endgültig geklärt.

Die unterschiedliche Bindung von CLU an SM und die aus der Literatur bekannte Interaktion von A $\beta$ -Oligomeren und CLU lässt folgende Schlüsse zu: Entweder CLU selbst liegt in den AD-Proben verändert vor wodurch eine erhöhte Affinität gegenüber SM ausgelöst wird, oder CLU liegt möglicherweise im AD-CSF vermehrt im Komplex mit A $\beta$ -Oligomeren vor und verursacht dadurch den ermittelten Unterschied. Der genaue funktionelle Zusammenhang der Bindung von A $\beta$ 42-Tetrameren an SM und die ebenso gemessene Interaktion von CLU und SM, kann mit den bisherigen Daten nicht abschließend geklärt werden. Es ergeben sich jedoch zwei Hypothesen, die anhand weiterer Experimente konkretisiert werden müssen. Zum einen könnte die erhöhte Bindung von CLU in den AD-Proben durch bereits an SM gebundene A $\beta$ -Oligomere vermittelt werden. Zum anderen könnte CLU im Komplex mit A $\beta$ -Oligomeren im CSF vorliegen und dadurch verstärkt an SM binden. Dieses könnte anhand von SPR-Bindungsexperimenten mit rekombinantem CLU (mit/ohne A $\beta$ -Oligomere) überprüft werden und schließlich Auskunft über die Affinität der jeweiligen Komplexe an SM-

---

Oberflächen geben. Weiterhin ist der Nachweis der Bindung von CLU und toxischen A $\beta$ 42-Oligomeren mittels Immunpräzipitation im CSF ein essentielles Experiment, um das physiologische Vorkommen dieser Komplexe *in vivo* zu bestätigen. Erste Hinweise darauf ergeben sich aus Experimenten von Calero et al.. Hierbei wurde A $\beta$  auf einer Affinitätschromatographiesäule immobilisiert und CLU aus humanem Plasma als Hauptbindungspartner isoliert (Calero et al., 2012).

Die Untersuchungen dieser Studie wurden mit CSF-Proben von Personen unterschiedlichen Alters durchgeführt. Im Hinblick auf weiterführende Analysen soll überprüft werden, ob die hier etablierte Methodik zur Differenzierung verschiedener Stadien der Krankheit geeignet ist. Hierbei ist besonders auf altersangepasste Proben zu achten. Weiterführend ergibt sich die Möglichkeit diese etablierte Technik auch im Blut bzw. Plasma von AD-Patienten zu prüfen, da sowohl Clusterin als auch A $\beta$ -Oligomere im Blut vorhanden sind (Thambisetty et al., 2010; Zhou et al., 2012).

Schließlich lassen sich aus der hohen Affinität von A $\beta$ 42-Tetrameren und der starken Interaktion von CLU gegenüber SM möglicherweise entscheidende funktionelle Zusammenhänge erkennen, die CLU als Risikofaktor in der AD erklären. Zudem ergibt sich auf Basis der vorliegenden Daten ein völlig neuartiger Ansatz im Vergleich zur aktuellen Diagnostik der Alzheimer-Krankheit. Dafür eignet sich zum einen die unterschiedliche Bindung von CSF der AD-Patienten und CSF der Kontrollgruppe auf Lipidoberflächen und zum anderen die erhöhte Bindung von CLU aus den AD-CSF-Proben im Vergleich zu Kontroll-CSF-Proben.

## 4 ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY

### 4.1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei Teilprojekte verfolgt: (1) Untersuchung des Einflusses von ausgewählten familiären APP-Mutationen (APP-FAD) auf den Spaltmechanismus der  $\gamma$ -Sekretase. (2) Analyse der Interaktion von A $\beta$ -Peptiden mit Lipiden der zellulären Plasmamembran im Hinblick auf einen möglichen Toxizitätsmechanismus (3) Charakterisierung der Bindung von Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) an Lipidoberflächen mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR).

(1) In diesem Teilprojekt wurde der Einfluss von ausgewählten APP FAD-Mutationen auf die sequenzielle Prozessierung der  $\gamma$ -Sekretase erstmals mittels chromatographischer und massenspektrometrischer Methoden untersucht. Über den direkten Nachweis der entstehenden Tri- und Tetrapeptide wurde im Detail gezeigt, dass alle drei untersuchten APP FAD-Mutationen (T714I, V717F, L723P) gleichermaßen den Wechsel in die A $\beta$ 42-Produktlinie bereits an der  $\epsilon$ -Schnittposition vollziehen. Der sequenzielle Mechanismus der  $\gamma$ -Sekretase wird durch die konkrete Position der Mutationen nicht beeinflusst.

Mittels ELISA wurde nachgewiesen, dass die Mutationen T714I und L723P die Produktion von A $\beta$ 42 und A $\beta$ 38 besonders erhöhen, sowie A $\beta$ 40 verringern. V717F wirkte hingegen auf das A $\beta$ 42/40-Verhältnis alleinig über eine verstärkte A $\beta$ 42-Produktion.

Im *in vitro*  $\gamma$ -Sekretase-Ansatz zeigten die APP FAD-Mutationen beachtliche Unterschiede in der Gesamtmenge von A $\beta$  und AICD. Die Reduktion von Gesamt-A $\beta$  korrelierte dabei mit dem Rückgang von Gesamt-AICD, wodurch zusätzlich ein Effekt der Mutationen auf die  $\epsilon$ -Spalteffizienz aufgezeigt wurde. Ebenso wurde anhand von Zirkulardichroismus-Analysen Veränderungen der Konformation der drei FAD-C100-Substrate im Vergleich zum Wildtyp festgestellt.

Aus den Analysen der  $\gamma$ -Sekretase-Prozessierung von APP FAD-Mutationen ergibt sich eine zentrale Bedeutung des  $\epsilon$ -Schnitts als entscheidender Faktor für die Initiierung der Produktlinien. Diese Erkenntnis könnte für die Entwicklung neuer Therapeutika von Bedeutung sein, um spezifisch den  $\epsilon$ -Schnitt zu beeinflussen und die A $\beta$ -Produktion vermehrt in die A $\beta$ 40-Produktlinie zu verschieben.

(2) Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die systematische Analyse der A $\beta$ -Lipid-Interaktion mittels SPR. Gezeigt wurde, dass das neurotoxische A $\beta$ 42wt-Peptid stärker an Sphingomyelin (SM), GM1, Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), SM:Cholesterin (4:1) und einem physiologischen Lipidgemisch neuronaler Zellmembranen (BTLE) bindet als die

nicht toxischen Spezies A $\beta$ 40wt und A $\beta$ 42 G33I. Damit ergab sich erstmals ein beachtlicher Unterschied zwischen A $\beta$ 42wt und A $\beta$ 40wt bei der Interaktion mit Lipiden, der vor allem für SM und GM1 nachgewiesen wurde.

Mittels chromatographischer Trennung verschiedener A $\beta$ -Oligomerformen und anschließender SPR-Bindungsanalysen stellte sich interessanterweise eine besonders hohe Interaktion von A $\beta$ 42wt-Tetrameren - den toxisch wirkenden Oligomerformen - auf SM gegenüber PC heraus. Oligomere von A $\beta$ 40wt oder A $\beta$ 42 G33I zeigten hingegen keine Interaktion.

Ferner wurde über Calcein-Freisetzungs-Analysen ermittelt, dass SM-Membrandoppelschichten gegenüber A $\beta$ 42wt besonders labil und lokal leicht zu stören sind.

Aus diesen Daten ergeben sich daher neue Hypothesen im Hinblick auf einen potentiellen Pathomechanismus. Membranregionen mit einem hohen Anteil SM, wie z.B. „Lipid rafts“ oder SM-Cluster könnten für die Membraninteraktion mit A $\beta$ 42wt-Tetrameren von besonderer Bedeutung sein und eine spezifische Funktion bei der Vermittlung der Toxizität *in vivo* einnehmen.

(3) In diesem Teilprojekt wurde erstmals die Bindung zwischen CSF von Alzheimer-Patienten (AD) und einer Kontrollgruppe auf mit PC, SM und BTLE beschichteten Oberflächen mittels SPR untersucht.

Auf allen untersuchten Lipidoberflächen konnte eine signifikant höhere Assoziation der CSF-Proben aus AD-Patienten detektiert werden, die besonders ausgeprägt auf der SM-Oberfläche war und eine Unterscheidung zwischen beiden Gruppen ermöglichte.

Um die Ursache dieser Differenz näher zu untersuchen, wurden die gebundenen Interaktionspartner aus der SPR-Analyse aufgereinigt und die Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert. Das Protein Clusterin (CLU) wurde als mit Abstand stärkster Bindungspartner ermittelt und war im AD-CSF signifikant erhöht. Dieses Ergebnis ist bemerkenswert, da CLU in genetischen Assoziationsstudien mehrfach als Risikofaktor beschrieben wurde und derzeit als eines der drei zentralen Risikogene in der AD gilt.

Zusammenfassend lassen sich aus der starken Interaktion von CLU gegenüber SM und der im Teilprojekt 2 nachgewiesenen hohen Affinität von A $\beta$ 42-Tetrameren möglicherweise entscheidende funktionelle Zusammenhänge erkennen, die CLU als Risikofaktor in der AD erklären. Zudem ergibt sich auf Basis der vorliegenden Daten ein völlig neuartiger Ansatz im Vergleich zur aktuellen Diagnostik der Alzheimer-Krankheit.

## 4.2 Summary

This work includes three sub-projects: (1) Evaluation of the impact of selected familial APP mutations (APP FAD) on the cleavage mechanism of the  $\gamma$ -secretase. (2) Analysis of the interaction of A $\beta$ -peptides with lipids of the plasma membrane in particular with regard to a possible toxic mechanism (3) Characterization of the binding of human cerebrospinal fluid (CSF) to lipid surfaces using surface plasmon resonance (SPR).

(1) In the present study the effect of APP FAD-mutations on the sequential processing of  $\gamma$ -secretase was investigated by chromatographic and mass spectrometric methods. Direct detection of the tri- and tetra-peptides generated during  $\gamma$ -secretase processing *in vitro* was accomplished. It was shown in detail that all three investigated APP FAD mutations (T714I, V717F, L723P) shift the processing into the A $\beta$ 42-line already at the  $\epsilon$ -cleavage site. The sequential mechanism of  $\gamma$ -secretase was not influenced by the specific position of the FAD mutations.

By ELISA it has been demonstrated that the mutations T714I and L723P increase the production of A $\beta$ 42 and A $\beta$ 38, and reduce A $\beta$ 40. V717F changes the A $\beta$ 42/40-ratio solely by an enhanced production of A $\beta$ 42.

In an *in vitro*  $\gamma$ -secretase-approach the APP FAD mutations showed significant differences in the total amount of A $\beta$  and AICD. The reduction of total A $\beta$  correlated with the decrease of total AICD, which showed an additional effect on the  $\epsilon$ -cleavage efficiency. Based on circular dichroism analysis conformational differences of the three FAD C100 substrates could be detected compared to the wt.

The analysis of the  $\gamma$ -secretase processing of APP-FAD mutations suggests a central importance of the  $\epsilon$ -cleavage site as a crucial factor for the initiation of the two product lines. This finding may be useful for developing new therapeutic agents that specifically shift the A $\beta$  production to the A $\beta$ 40 product line.

(2) A focus of this work was the systematic analysis of A $\beta$ -lipid interactions using SPR. It was demonstrated that the neurotoxic peptide A $\beta$ 42wt binds more strongly to sphingomyelin (SM), GM1, phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), SM: cholesterol (4:1), and a physiological mixture of neuronal lipid membranes (BTLE) than its non-toxic counterparts A $\beta$ 40wt and A $\beta$ 42 G33I. The results show for the first time a significant difference between A $\beta$ 42wt and A $\beta$ 40wt in the interaction with specific lipids in particular with SM and GM1.

The chromatographic separation of different oligomeric forms of A $\beta$  and following SPR analysis, presented a particularly high interaction of A $\beta$ 42wt tetramers - the proven toxic oligomeric form - on SM compared to PC. Oligomers of A $\beta$ 40wt or A $\beta$ 42 G33I on the other hand showed no interaction.

It was also determined by using calcein release assay that SM-membrane bilayers are particularly labile towards A $\beta$ 42wt and get easily disturbed.

The data of this study, therefore, yield new hypotheses regarding a potential pathogenic mechanism. Membrane regions with a high percentage of SM, such as "lipid rafts" or SM-clusters could be of particular importance for the membrane interaction with A $\beta$ 42wt tetramers and may play a crucial role in mediating their *in vivo* toxicity.

(3) In this project the binding of CSF samples of AD patients (AD) and samples of a control group were investigated on PC, SM and BTLE coated surfaces by SPR. All three examined lipid surfaces have shown a significantly higher association of CSF samples from AD patients, which was particularly pronounced on the SM surface and allowed a distinction between the two groups.

To investigate the cause of this difference in more detail, the bound interaction partners from the SPR analysis were purified and the proteins were identified by mass spectrometry. The protein Clusterin (CLU) has been identified as by far the strongest binding partner and was significantly increased in the AD CSF samples. This result is remarkable, since in genome-wide association studies CLU was repeatedly described as a risk factor, and is currently considered as one of three key risk genes in the AD.

In summary, the evidence of the high affinity of A $\beta$ 42 tetramers detected in the Project 2 and the strong interaction of CLU on SM-coated surfaces may lead to the explanation of functional relationships and CLU as a risk factor in AD. Moreover, this data result in a completely new approach as compared to the current diagnosis of Alzheimer's disease.

## 5 MATERIAL

### 5.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Einmalwaren wie Reaktionsgefäße, Mikrotiterplatten und Petrischalen wurden von Sarstedt (Nümbrecht), BD (USA), PAA (Österreich) und Greiner (Österreich) bezogen. Es wurden Pipettenspitzen von Sarstedt (Nümbrecht) und Roth (Karlsruhe) verwendet. Zellkulturplatten und Zellkulturschalen wurden von TPP (Schweiz) bezogen und Kryoröhrchen von Nunc/Thermo Scientific (Langenselbold). Für Western Blots wurde Filterpapier von Whatman Int. Ltd. (GB), Nitrozellulosemembranen von Macherey-Nagel (Düren) und Röntgenfilme von Amersham (GB) verwendet. Tris-Tricine Fertiggele stammten von Anamed (Groß-Bieberau). Elektroporationsküvetten wurden von Bio-Rad (München) geliefert.

### 5.2 Allgemeine Laborchemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien zum Ansetzen von Puffern und Reaktionslösungen wurden von Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Roth GmbH (Karlsruhe), Fluka (Schweiz), Bio-Rad (München) oder Merck (Darmstadt) in der Qualitätsstufe *pro analysis* bezogen.

### 5.3 Enzyme, Standards und „Kits“

In dieser Arbeit wurden, falls nicht an anderer Stelle gesondert aufgeführt Enzyme, Enzyminhibitoren, Standards und Kits der Firmen Roche (Schweiz), Macherey-Nagel (Düren), Bruker Daltonics (Bremen), Invitrogen (Karlsruhe), Pierce (USA), Bio-Rad (München), Promega (Heidelberg), Stratagene (USA), Biorline (GB) verwendet.

### 5.4 Pufferlösungen

Die verwendeten Puffer wurden, falls nicht gesondert in den jeweiligen Kapiteln beschrieben, nach Sambrook und Russell (Sambrook und Russell 2000) angesetzt. Zum Ansetzen wässriger Pufferlösungen wurde stets MilliQ<sup>TM</sup>-Wasser verwendet.

### 5.5 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme DH5 $\alpha$  und XL1-Blue stammten von der Firma Invitrogen (Karlsruhe), Nährmedium: LB-Medium

## 5.6 Plasmid-Vektoren

- pCEP4 (Invitrogen, Karlsruhe), Ampicillin- und Hygromycin-Resistenz, Insert: APPwt, APP T714I, APP V717F, APP L723P (Die Konstrukte stammten von Dr. Lisa Münter, AG Prof. Dr. Gerd Multhaup)
  
- pQE60 (Qiagen, Hilden), Ampicillin-Resistenz, Insert: C100wt (Das Konstrukt stammte von Prof. Dr. Christian Haass, LMU-München). Die Mutationen C100 T714I, V717F und L723P wurden durch Frau Dr. Luise Richter in das C100wt-Konstrukt kloniert.

## 5.7 Zelllinien und Nährmedien

SH-SY5Y-Zellen, humane Neuroblastoma-Zelllinie (DSMZ, Braunschweig)

Nährmedium: 500 ml DMEM/ HAM's F12  
+ 10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS)  
+ 1,2% (v/v) L-Glutamin  
+ 0,5% (v/v) 100 mM Natriumpyruvat  
+ 1,2% (v/v) 100x Nicht-essentielle Aminosäuren

Selektionsmedium enthielt zusätzlich 250 µg/ml Hygromycin B. Bei Bedarf wurde dem Nährmedium 1x Penicillin/Streptomycin hinzugefügt.

Alle sterilen Zellkulturmedien, Zusätze, Waschlösungen (PBS), sowie Trypsin/EDTA-Lösungen stammten von PAA (Österreich) oder Biochrom (Berlin).

## 5.8 Antikörper

- W0-2: monoklonaler IgG Maus-Antikörper gegen Gesamt-Aβ (Epitop Aβ 4-10, von TGC, Schweiz), Western Blot: 1:10.000, Immunpräzipitation: 5 µg/ml
- APS18: monoklonaler IgG Maus-Antikörper gegen PS1-CTF (Epitop PS1 313-334, von Alexis, Schweiz), Western Blot: 1:3000
- Anti-His: monoklonaler IgG Maus-Antikörper gegen 6x His-Marker (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), Western Blot: 1:5000, Immunpräzipitation: 5 µg/ml
- APP-CTF: polyklonaler IgG Kaninchen-Antikörper gegen APP-CTF (Epitop APP 751-770, Calbiochem, USA), Western Blot: 1:10.000
- AT109: polyklonaler IgG Kaninchen-Antikörper gegen humanes Clusterin (Enzo Life Sciences, USA), Western Blot: 1:1000

- Anti-Mouse-HRP: Sekundärantikörper mit konjugierter Meerrettich-Peroxidase (HRP) zur Chemilumineszenz-Detektion muriner Primärantikörper (Promega, USA), Western Blot: 1:10.000
- Anti-Rabbit-HRP: Sekundärantikörper mit konjugierter Meerrettich-Peroxidase (HRP) zur Chemilumineszenz-Detektion von Primärantikörpern aus Kaninchen (Promega, USA), Western Blot: 1:10.000

## 5.9 Lipide

Die verwendeten Lipide SM, PC, PE, GM1 und das neuronale Lipidgemisch BTLE, isoliert aus Schweinehirn, wurden von Avanti Polar Lipids (USA) bezogen, Cholesterin von Sigma-Aldrich (Deisenhofen).

## 5.10 Geräte

- Autoklav Varioklav 135S (H+P, Oberschleißheim)
- Äkta-FPLC Anlage (Pharmacia, Freiburg)
- Begasungsbrutschrank HERA Cell 240 (Heraeus, USA)
- Biacore 3000 (GE Healthcare, GB)
- Blot-Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR (Cawo, Schrobhausen)
- Brutschrank Modell 600 (Mettler, Schwabach)
- CD-Spektropolarimeter J-810 (Jasco, USA)
- Chromatographieanlage Äkta FPLC Explorer (Pharmacia, Freiburg)
- Gefrierbox Nalgene Cryo 1C Freezing Container (Nalgene Nunc, USA)
- Elektroporator Gene Pulser II (Bio-Rad, München)
- French Press zum Zellaufschluss, French Pressure Cell-Press (SLM Amico, USA)
- Heizblock UBD2 (Grant, GB)
- Kaffeemaschine De'Longhi EN 266BAE, Limousine Black (Nespresso, Düsseldorf)
- Kühlfalle RVT400 Thermo (Savant, USA)
- Lichtmikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Jena)
- Massenspektrometer Ultraflex II (Bruker Daltonic, Bremen)
- Massenspektrometer Orbitrap Velos (Thermo Scientific, USA)
- Millipore water purification systems, Q Gard 1 (Millipore, USA)
- Nano-Chromatographieanlage Dionex UltiMate® 3000 (Thermo Scientific, USA)
- Netzgeräte für SDS-PAGE: Electrophoresis Power Supply EPS 301 (Amersham, USA)
- Pipettierhilfen:
  - Pipetman P2, P10, 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)
- Rotations-Vakuumpkonzentrator SpeedVac (Savant, USA)
- SDS-PAGE-Apparaturen:
  - für Tricin-SDS-PAGE: Vertikal-Elektrophorese-System für Minigele XCell SureLock (Invitrogen, Karlsruhe)
- Schütteltische für Bakterienkulturen HR225, HR250 (Infors-HR, Bottmingen)
- Sterilwerkbank Herasafe (Heraeus, USA)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg)
- Ultraschallbad Elmasonic S30 (Elma, Singen)
- Überkopfschüttler Reax 2 (Heidolph, Schwabach)
- Vakuumpumpe CVC2 (Vacuubrand, Wertheim)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA)
- Waagen:
  - Feinwaage: MC1 AC120S (Sartorius, Göttingen)
  - Grobwaage: L2200P (Sartorius, Göttingen)
- Wasserbad U3 (Julabo, Seelbach)
- Wet-Blot-Apparatur Trans-Blot Cell (Bio-Rad, München)
- Zellzähler CASY® Cell Counter Model DT (Roche, Schweiz)
- Zentrifugen:
  - Kühlzentrifuge GS-6KR (Beckman, München)
  - Minizentrifuge Spectrafuge (Labnet, USA)
  - Tischzentrifuge Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg)
  - Ultrazentrifuge J2-MC (Beckman, München)
  - Zellzentrifuge Megafuge 1.0 und Multifuge 3 S-R (Heraeus, USA)

## 5.11 Software

- Bildbearbeitung: Adobe Photoshop CS5, Adobe Illustrator CS5
- Datenverarbeitung: Microsoft Excel 2008 und 2011 für Mac, GraphPad Prism 5 für Mac
- Textverarbeitung: Microsoft Word 2008 und 2011 für Mac
- Internet-Datenbanken: PubMed, ExPasy Bioinformatics Resource Portal
- Protein-Identifizierung aus MS-Daten: MaxQuant, Perseus
- Literaturverwaltung: Zotero (George Mason University, USA)
- Sequenzdatenvergleich: Clone Manager 5.2 (Sci-Ed, USA)
- Densitometrische Analyse: ImageJ 1.45s (NIH, USA)

## 6 METHODEN

### 6.1 Molekularbiologische Methoden

#### 6.1.1 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen

##### **Elektrotransformation**

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde eine Retransformation mit elektrokompetenten XL1-Blue-Zellen durchgeführt. Für die Elektroporation wurden 50 ng zu transformierende Plasmid-DNA mit 50  $\mu$ l der elektrokompetenten Zellen vorsichtig in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette vermischt und 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Elektrottransformation bei 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F und 1,8 kV mit einem Gene Pulser II (Bio-Rad, München). Die transformierten Zellen wurden sofort mit 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde sodann auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten (100  $\mu$ g/ml Ampicillin) ausplattiert oder zum Animpfen einer 4 ml-Übernachtskultur verwendet.

##### **Chemische Transformation**

Die Vermehrung von Plasmid-DNA aus Mutations-PCR-Ansätzen erfolgte in chemisch kompetenten DH5 $\alpha$  *E.coli*-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe). Es wurden je 50 ng der Plasmid-DNA mit 50  $\mu$ l der chemisch kompetenten Zellen vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte die Permeabilisierung der Zellen durch einen Hitzeschock für 45 sec bei 42°C im Wasserbad. Die Zellen wurden 2 min auf Eis gekühlt, 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) hinzugefügt und für 30 min bei 37°C vermehrt. 200  $\mu$ l des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum (100  $\mu$ g/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. In Folge wurden Einzelklone in LB-Medium vermehrt und die Plasmid-DNA aus den Zellen präpariert

#### 6.1.2 DNA-Präparation

Die Aufreinigung von bis zu 5  $\mu$ g Plasmid-DNA (Mini-Präparation) aus 3 ml-Übernachtskulturen erfolgte mittels alkalischer Lyse der Bakterienzellen und Denaturierung der genomischen DNA. Zelllyse, Proteinfällung, Plasmid-DNA Fällung und Reinigung wurden nach Angaben des NucleoBond PC500-Kits (Macherey-Nagel, Düren) unter Verwendung der enthaltenen Pufferlösungen, durchgeführt. Größere Plasmid-DNA Mengen (Midi-Präparation) wurden mit dem NucleoBond Xtra Midi-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 6.1.3 Spektrophotometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Konzentration von unverdünnten Plasmid-DNA Präparationen wurde mittels NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, USA) photometrisch bestimmt. Die Reinheit des jeweiligen DNA-Ansatzes wurde anhand des Quotienten A260/A280 beurteilt und lag üblicherweise zwischen 1,8-1,9.

### 6.1.4 DNA-Sequenzierung

Die Plasmid-DNA aus Mini- und Midi-Präparationen wurde sequenziert, um die Korrektheit der eingefügten Sequenzen zu überprüfen. Dabei wurden die unten aufgeführten Sequenzprimer verwendet. Alle Sequenzierungen erfolgten durch die Firma GATC Biotech (Konstanz). Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels Clone Manager 5.2 (Sci-Ed, USA) mit der jeweiligen Originalsequenz verglichen.

Sequenzierprimer:

APP1828-FP: CGAAGTTGAGCCTGTTGATC

## 6.2 Zellbiologische Methoden

### 6.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle zellbiologischen Experimente wurden an der Sterilwerkbank durchgeführt. Es wurden ausschließlich steril verpackte Einmalwaren oder vorher autoklavierte Reagenzien und Materialien benutzt. Die verwendete humane Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y wurde in Nährmedium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden in Wildtypmedium (siehe 5.7) angezüchtet. Stabil transfizierte Zellen (mit Vektor pCEP4) wurden zusätzlich in 250 µg/ml Hygromycin B enthaltendem Selektionsmedium kultiviert.

Zum Auftauen von Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank direkt im 37°C warmen Wasserbad vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen sofort in vorgewärmtem Wildtypmedium aufgenommen, für 5 min bei 500 rpm abzentrifugiert, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und in einer sterilen Zellkulturschale ausgesät.

Die Langzeitaufbewahrung von Zellen erfolgte mittels Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden konfluent gewachsene Zellen abgelöst und bei 500 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet einer 10 cm Zellkulturschale wurde in 3 ml Einfriermedium (Wildtypmedium, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und anschließend zu je 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Kryoröhrchen wurden zunächst in einer vorgekühlten und mit Isopropanol befüllten Einfrierbox für 24-48 h bei -80°C gelagert, bevor sie zur langfristigen Lagerung in den Stickstofftank überführt wurden.

Definierte Zellzahlen wurden mittels CASY<sup>®</sup> Cell Counter Systems (Roche, Schweiz) gezählt und anschließend in der gewünschten Konzentration in entsprechenden Zellschalen ausgesät.

### **6.2.2 Herstellung stabiler eukaryotischer Zelllinien**

Die Herstellung stabiler SH-SY5Y Zelllinien erfolgte mit dem Transfektionsreagenz TransFectin Lipid Reagenz (Bio-Rad, München). Nach Herstellerangaben wurden pro Transfektionsansatz 2-3 µg Plasmid-DNA und 5 µl TransFectin in serumfreien OptiMEM (Invitrogen, Karlsruhe) Medium vermischt und auf die ca. 80% konfluenten Zellen gegeben. Die Zellen waren dafür in 6-Well Platten ausgesät worden. Nach ca. 1-2 h wurde den Zellen Wildtyp-medium (ohne Antibiotikum) hinzugefügt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf 6 cm-Zellkulturschalen umgesetzt und die Selektion am darauf folgenden Tag mit 250 µg/ml Hygromycin B enthaltenden Medium begonnen.

## **6.3 Proteinbiochemische Methoden**

### **6.3.1 Peptidsynthese und Lösen von A $\beta$ -Peptiden**

Alle in dieser Arbeit verwendeten synthetischen A $\beta$ -Peptide wurden von der Firma Peptide Speciality Laboratories (Heidelberg) hergestellt. Jede neue Peptidlieferung wurde vor der Verwendung für eigene Experimente auf Reinheit und Korrektheit der jeweiligen Peptidmasse mittels MALDI-MS kontrolliert.

Zur Langzeitlagerung wurden A $\beta$ -Peptide in 98% (v/v) Ameisensäure monomerisiert (Roher et al., 1996) und in entsprechenden Gebrauchsmengen aliquotiert. Das Lösungsmittel wurde im Rotations-Vakuumkonzentrator abgezogen und die vollständig getrockneten Peptid-Aliquots anschließend bei -20°C bzw. -80°C gelagert. Für die Experimente wurden monomerisierte A $\beta$ -Aliquots mit alkalisiertem Wasser (0,12% (v/v) NH<sub>3</sub>) für ca. 10 min im Ultraschallbad gelöst (Schmechel et al., 2003), die Peptidkonzentration per NanoDrop<sup>™</sup> 1000 (Thermo Scientific, USA) kontrolliert und unmittelbar verwendet.

### **6.3.2 Proteinaufreinigung aus bakteriellen Einschlusskörpern („inclusion bodies“)**

#### **Induktion der Proteinexpression in *E.coli***

Zur Expression von C100 wurde eine Übernachtskultur mit pQE60-C100 transformierten *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-Blue in frischem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin 1:20 verdünnt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 160 rpm, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von ca. 0,5-0,6 erreicht war. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach weiteren 4 h Inkubation wurden die Zellen zunächst für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend 12 min bei 4500 rpm und

4°C abzentrifugiert. Das Gewicht des erhaltenen Zellpellets wurde bestimmt und entweder sofort weiterverarbeitet oder bis zur späteren Proteinaufreinigung bei -20°C gelagert.

### **Zellaufschluss, Lösung und Rückfaltung der Proteine**

Für den Zellaufschluss wurden die Zellpellets in TE-Puffer (20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) im Verhältnis 10 ml pro 1 g Pellet gelöst und in der French Press ca. 2-3 mal aufgeschlossen bis eine zähflüssige Lösung entstand. Die Einschlusskörper („inclusion bodies“) wurden bei 12.000 rpm, 12°C für 10 min abzentrifugiert, das Pellet anschließend in 5 ml Harnstoffpuffer (20mM Tris/HCl, pH 8,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 6 M Harnstoff, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1% (v/v) Triton X, 1% (w/v) SDS, 1x Complete Proteaseinhibitor (Roche, Schweiz)) aufgenommen, durch Ultraschallbehandlung gelöst und für 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler homogenisiert. Nach Zentrifugation der Proteinlösung bei 12.000 rpm, 12°C für 10 min wurde der Überstand sofort 1:5 mit Tris/NaCl-Equilibrierungspuffer (20mM Tris/HCl, pH 7,5, 50mM NaCl) verdünnt und bei 4°C aufbewahrt.

### **Nickel-NTA-Säulenchromatographie**

Zur Aufreinigung des exprimierten C100 wurde die Proteinlösung mit 1 ml Ni-NTA-Agarose (Quiagen, Hilden) versetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Das Säulenmaterial wurde zuvor mit 40-fachem Volumen Tris/NaCl-Equilibrierungspuffer gewaschen und 3 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Die Proteinlösung wurde nun für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert, ein Großteil des Überstandes verworfen, das Pellet mit 2 ml Waschpuffer (50 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,3% (w/v) SDS) aufgeschlemmt und vollständig in eine kleine Säule überführt. Anschließend wurde die Lösung mit insgesamt 45 ml Waschpuffer schrittweise gewaschen. Das Säulenmaterial wurde nun mit zweifachem Volumen Elutionspuffer (50 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,3% (w/v) SDS, 50 mM EDTA, 1x Complete Proteaseinhibitor (Roche, Schweiz)) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert, dann bei 1200 rpm pelletiert. Dieser Schritt wurde 4-6 mal wiederholt und die jeweiligen Elutionsfraktionen aufgefangen und dann bei -20°C gelagert.

### **6.3.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

#### **BCA-Test**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde nach der Bicinchoninsäure Methode (Smith et al., 1985) durchgeführt. Diese beruht auf der Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup>, welches mit Bicinchoninsäure einen bei 562 nm messbaren Farbkomplex bildet. Nach Herstellerangaben wurden 10-20 µl einer Proteinlösung 1:10 mit dem BCA-Reagenz aus dem BCA Protein Assay Kit (Pierce/Thermo Scientific, USA) versetzt und in Zweifachbestimmung auf einer Mikrotiterplatte ca. 15 min bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption

bei 562 nm auf einem Plattenphotometer gemessen. Die Berechnung der jeweiligen Proteinkonzentration erfolgte anhand einer mitgeführten BSA-Standardreihe.

### **RCDC Protein-Test**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von C100-Elutionsfraktionen wurde prinzipiell der gegenüber Detergenzien weniger anfällige RCDC Protein-Assay (Bio-Rad, München) verwendet. Der Test basiert auf der Lowry-Methode (Lowry et al., 1951) und wurde nach dem Herstellerprotokoll in 1,5ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Absorption wurde bei 750 nm im Küvettenphotometer (Schichtdicke 1cm) vermessen. Eine in entsprechendem Puffer gelöste BSA-Standardreihe wurde zur Berechnung der Proteinkonzentration in den jeweiligen Proben mitgeführt.

### **NanoDrop™-Bestimmung**

Die Konzentration von A $\beta$ -Lösungen wurde vorwiegend mittels NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, USA) bestimmt. Unter Angabe des jeweiligen Molekulargewichtes und molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm wurde in einem Volumen von 1-2  $\mu$ l der entsprechenden Lösungen die Absorption bei 280 nm photometrisch gemessen.

## **6.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

### **Probenvorbereitung**

Die Proteinproben wurden vor dem Beladen des Gels mit 1x Probenpuffer (4x Probenpuffer: 250 mM Tris/HCl, pH 6,8, 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerin, 0,005% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert.

### **Tricin-SDS-PAGE**

Die Größenauftrennung von kleinen Proteinen und Peptiden erfolgte mit Hilfe des Tris-Tricin Gelsystems nach Schagger und von Jagow (Schagger und von Jagow, 1987). So wurde beispielsweise die elektrophoretische Auftrennung von A $\beta$ -Peptiden auf 10-20%igen Tris-Tricine Gradientengelen (Anamed, Darmstadt) bei 100 mA pro Gel in SDS-Tris-Tricin Laufpuffer (0,1 M Tris/HCl, 0,1 M Tricin 0,1% (w/v) SDS) durchgeführt. Als Proteinstandard diente in der Regel der „SeeBlue® Plus2 pre-stained“-Marker (Invitrogen, Karlsruhe).

## **6.3.5 Western Blot Analyse**

### **Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen**

Die mittels SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennten Proteine und Peptide wurden im Nassblotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte in einer Transblot-Zell-Apparatur (Bio-Rad, München) bei 4°C für 2-3 h bei 400 mA oder über Nacht

bei 180 mA in ethanolhaltigem Blotpuffer (25 mM Tris/HCl, 0,2 M Glycin, 20% (v/v) Ethanol). Zur Kontrolle des gleichmäßigen Proteinübertrags wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Lösung (0,2% (w/v) Ponceau, 1% (v/v) Essigsäure) reversibel angefärbt. Zur Entfärbung wurde die Membran mehrfach mit PBS gewaschen. Sollten A $\beta$ -Peptide nachgewiesen werden, so wurden die Membranen in PBS für ca. 5 min erhitzt.

### **Immundetektion von Proteinen**

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, können diese über spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Die Membran wurde zuerst in 10% (w/v) Magermilchpulver in PBS für 1 h blockiert, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Anschließend folgten drei Waschschrte je 10 min mit PBST (PBS + 0,1% Tween 20), dann wurde die Membran für 1-2 h oder über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Primärantikörper (Verdünnung siehe 5.8 in PBS + 5% (w/v) Magermilchpulver) inkubiert. Ungebundener Primärantikörper wurde mit drei weiteren Waschschrten mit PBST entfernt. Es folgte die Inkubation mit einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper für 1 h. Nach erneutem dreimaligem waschen wurde die Membran 1 min mit frisch angesetzter ECL-Entwicklerlösung (1 ml Lösung A (0,25 mg/ml Luminol in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,6), 0,1 ml Lösung B (1,1 mg/ml p-Hydroxycoumarinsäure in DMSO) und 0,3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v)) benetzt. Die von der konjugierten Meerrettich-Peroxidase katalysierte Chemilumineszenz-Reaktion ermöglichte schließlich eine direkte Detektion der Proteine nach Auflegen eines Röntgenfilms. Die Expositionszeit der Filme variierte dabei abhängig von der Signalintensität zwischen 10 sec bis 10 min.

### **6.3.6 Immunpräzipitation von Proteinen**

A $\beta$  und AICD wurden aus *in vitro*- $\gamma$ -Sekretase-Ansätzen mittels Immunpräzipitation aufkonzentriert. Dafür wurde den jeweiligen Ansätzen 30  $\mu$ l Protein G- bzw. A-Sepharose™ (Amersham, GB) und 5  $\mu$ g Antikörper hinzugefügt und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Bei 2000 rpm wurde die Sepharose™ für 5 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Proben für die SDS-PAGE wurden vor der Elution zweimal mit PBS gewaschen, MALDI-Proben zusätzlich zweimal mit 100 mM Ammoniumacetat und schließlich wurde die jeweilige Lösung durch Zentrifugation entfernt. Die Elution erfolgte zweimal mit je 500  $\mu$ l 50% Essigsäure für 5 min. Beide Elutionsfraktionen wurden vereinigt und im Rotations-Vakuumkonzentrator getrocknet.

### 6.3.7 *In vitro* $\gamma$ -Sekretase-Test

Alle Schritte dieses Tests wurden vollständig auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Für ein Experiment wurden SH-SY5Y Zellen aus 5-10 konfluenten 15 cm Zellkulturschalen in eiskaltem PBS aufgenommen und bei 1000 rpm 4°C für 10 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 ml Puffer A (20 mM PIPES, 140 mM KCl, 250 mM Sucrose, 5 mM EGTA, pH 7) und 1x Complete Proteaseinhibitor (Roche, Schweiz) gelöst und in einem Glas-Homogenisator mit 70-90 Stößen aufgebrochen. Ein Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm, 4°C für 15 min pelletierte Zellkerne, Organelle und nicht zerstörte Zellen. Der Überstand wurde dann bei 35.000 rpm für 1 h in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert und das so gewonnene Pellet vorsichtig in 200  $\mu$ l Puffer B (50 mM PIPES, 250 mM Sucrose, 1 mM EGTA, pH 7), 200  $\mu$ l Puffer B mit 2% CHAPSO und 1x Complete Proteaseinhibitor gut gelöst. Nach einer Inkubation von 45 min auf Eis wurde der Ansatz erneut bei 35.000 rpm 30 min zentrifugiert, anschließend die Proteinkonzentration mittels NanoDrop bei 280 nm vermessen und auf 1,5 mg/ml eingestellt. Die 400  $\mu$ l Membransuspension wurde nun mit 1,4 ml Puffer B und 1x Complete Proteaseinhibitor verdünnt und gleichmäßig auf 6-8 Ansätze verteilt.

Für den eigentlichen  $\gamma$ -Sekretase-Test wurde je nach Ansatz 250 nM des Substrats C100 und/oder 0,5  $\mu$ M des spezifischen  $\gamma$ -Sekretase Inhibitors L685 (Merck Millipore, USA) für in der Regel 2 h bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion auf Eis gestellt und 0,5  $\mu$ M L685-Inhibitor hinzugefügt. Die Detektion der Spaltprodukte konnte nun entweder nach Wessel-Flügge-Fällung der Proteine im Western Blot oder durch Immunpräzipitation mittels spezifischer Antikörper weitergeführt werden (Wessel und Flügge, 1984).

## 6.4 Bioanalytische Methoden

### 6.4.1 Zirkulardichroismus Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

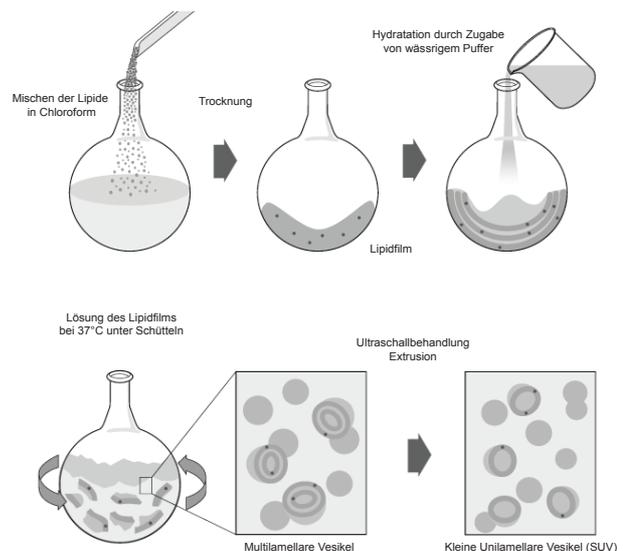
Zur Bestimmung der Sekundärstruktur von C100-Proben wurden Messungen an einem J-810 Spektropolarimeter (Jasco, USA) durchgeführt. Die Proben wurden dafür mit Hilfe von 10 kDa-Größenausschlussfiltern „Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Device“ (Millipore, USA) nach Herstellerangaben in 50 mM Natriumphosphat (pH 7,4) umgepuffert und auf eine Konzentration von 50  $\mu$ M eingeeengt. Die Messungen wurden in einer Küvette aus UV-Quarzglas (Hellma, Jena) mit einer Schichtdicke von 0,2 mm bei 20°C, einer Aufnahmege- schwindigkeit von 100 nm/min im Wellenlängenbereich von 250-190 nm und 1 s „response time“ je vierfach gemessen. Die Sensitivität betrug 100 mdeg und die Bandbreite 2 nm. Von jedem der akkumulierten Proben-Spektren wurde ein entsprechendes Pufferspektrum abgezogen.

### 6.4.2 Oberflächenplasmonresonanz Spektroskopie

Die Oberflächenplasmonresonanz-Analysen („surface plasmon resonance“, SPR) wurden an einem Biacore 3000-Gerät (GE Healthcare, GB) bei 25°C durchgeführt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden stets steril filtriert und im Ultraschallbad für 20 min entgast.

#### Präparation von Liposomen

Die zu untersuchenden Lipide (Avanti Polar Lipids, USA) wurden in Chloroform zu je 10 mg/ml aliquotiert. Für die Präparation von 1 ml Liposomenlösung wurde ein Volumen von 500 µl der gelösten Lipide in den gewünschten Anteilen in einem 50 ml Erlennmeyerkolben sorgfältig vermischt und eine homogene Mischung erzeugt (Abb. 39). In einem Exsikkator wurde unter Vakuum das Lösungsmittel vollständig für mindestens 1 h abgezogen, so dass am Boden des Gefäßes ein getrockneter Lipidfilm entstand. Anschließend erfolgte die hydrophobe Hydratation der Lipide in einem wässrigen Puffer, in der Regel PBS. Der Ansatz wurde dann bei 37°C auf einem Schütteltisch für 2 h inkubiert. Zum besseren Ablösen des Lipidfilms wurden der Suspension Glaskügelchen (Roth, Karlsruhe) hinzugefügt. Die hergestellte Liposomenlösung enthielt nun ungeordnete, multilamellare Vesikel, die 20 min im Ultraschallbad behandelt wurden und im Anschluss daran durch Extrusion mit einem 50 nm Polycarbonatfilter (Avanti Polar Lipids, USA) auf eine durchschnittliche Vesikelgröße von 50 nm gebracht wurden, sogenannte „small unilamellar vesicles“ (SUV). Die fertige Liposomenlösung konnte nun für weitere Experimente verwendet werden.



**Abb. 39: Präparationsschritte der Liposomenherstellung von „small unilamellar vesicles“ (SUVs).** Entnommen und modifiziert aus [avantilipids.com](http://avantilipids.com).

#### Kopplung von Liposomen

Um Bindungsanalysen von Peptid-Lipid Interaktionen durchzuführen, wurden Liposomen auf einen L1-Sensorchip (GE Healthcare, GB) reversibel gekoppelt. Die Sensorchips besitzen lipophile Gruppen, die über eine carboxymethylierte Dextranmatrix kovalent auf der Oberfläche gebunden sind, wodurch eine Einlagerung der lipophilen Reste in den Bilayer der präparierten Liposomen möglich ist. Die direkt gebundenen Liposomen erzeugen so ein flächiges Plasmamembranmodell für Peptid-Lipid-Bindungsstudien.

Die Equilibrierung der Oberfläche erfolgte durch zwei kurze Injektionen mit dem nicht-ionischen Detergenz Octyl- $\beta$ -D-Glycopyranosid in einer Konzentration von 40 mM. 50  $\mu$ l Liposomenlösung wurden mit einer Flussrate von 2  $\mu$ l/min über die Oberfläche gegeben und diese mit einer kurzen Injektion 50 mM NaOH bei 100  $\mu$ l/min von lose assoziierte Liposomen gereinigt. In der Regel wurden je nach Lipidmischung 10.000-12.000 RU auf dem Sensorchip gekoppelt, die ausreichten eine Sensorchipoberfläche vollständig zu bedecken.

### **Interaktionsmessung**

Für die jeweiligen Messungen wurden die Analyten in dem entsprechenden Laufpuffer auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Bei frisch gelösten A $\beta$ -Proben wurde darauf geachtet, dass jeder Ansatz die gleiche Menge des A $\beta$ -Lösungsmittels 0,12% (v/v) NH<sub>3</sub> enthält. Die Interaktion erfolgte mit der „kinject“-Funktion, wobei die Analyten für mindestens 300 sec mit einer Flussgeschwindigkeit von 10  $\mu$ l/min auf die jeweilige Lipidoberfläche injiziert wurden. Darauf folgte eine Dissoziationszeit von 600 sec. Für SPR-Analysen mit A $\beta$ -Peptiden wurde generell jede Konzentration auf einer einzelnen Flusszelle gemessen und eine Pufferkontrolle von den erhaltenen Sensogrammen subtrahiert. Die Regeneration bzw. vollständige Reinigung der Oberfläche wurde mittels 40 mM Octyl- $\beta$ -D-Glycopyranosid durchgeführt.

### **Rückgewinnung gebundener Interaktionspartner**

An Lipidoberflächen gebundene Analyte konnten über die „Analyte Recovery“-Funktion von der Oberfläche in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zurückgewonnen werden. Um eine möglichst hohe Menge gebundener Interaktionspartner von der Oberfläche zu gewinnen, wurden bei diesen Experimenten alle vier Flusszellen für eine Messung verwendet. Der Analyt wurde dafür bei einer Flussrate von 5  $\mu$ l/min 8 min injiziert. Um die Lipidoberfläche von unspezifisch gebundenen Proteinen zu reinigen folgte ein Waschschrift der Sensorchipoberfläche mit PBS. Anschließend wurden die Oberflächen der vier Flusszellen mit 40 mM Octyl- $\beta$ -D-Glycopyranosid für 1 min inkubiert und in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Die Identifikation der Proteine konnte nach Trocknung der Proben in einem Rotations-Vakuumkonzentrator schließlich durch LC-MS vollzogen werden.

### **6.4.3 Größenausschlusschromatographie**

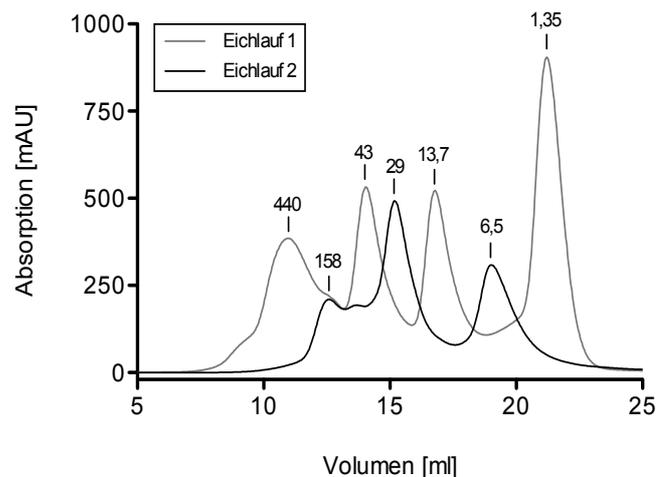
Um die verschiedenen oligomeren Formen des A $\beta$ -Peptids voneinander zu trennen wurde die Größenausschlusschromatographie verwendet. Der Trenneffekt dieser Methode beruht auf einem unterschiedlichen Diffusionsvolumen verschieden großer Moleküle. Als stationäre Phase wurde eine Superose 12 10/300 GL-Säule (GE Healthcare, GB) mit vernetzter Agarose genutzt. Die Säule hat ein Volumen von 24 ml und besitzt einen theoretischen Trennereich von 1-300 kDa. Alle Experimente wurden an einer Äkta-FPLC Anlage (Pharmacia,

Freiburg) mit steril filtrierten und entgastem Laufpuffern durchgeführt. Hierfür diente PBS als Laufpuffer. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

Die Trennung erfolgte nach Equilibrierung der Säule mit mindestens dreifachem Säulenvolumen PBS. Sodann wurde ein Volumen von 500 µl frisch gelöster Aβ-Peptide über die Proben- schleife auf die Säule appliziert.

Für die späteren Interaktionsanalysen wurden die Oligomere in Fraktionen zu 200 µl auf einer Mikrotiterplatte aufgefangen, die Konzentration mittels BCA-Test bestimmt und auf je 2,5 µM eingestellt. Die jeweiligen Fraktionen wurden sofort für die SPR-

Analysen weiter verwendet. Zur Ermittlung der exakten Größenverteilung der einzelnen Aggregatformen wurden Eichläufe mit folgenden Eichsubstanzen durchgeführt: Vitamin B12 (1,35 kDa), Aprotinin (6,5 kDa), RNase A (13,7 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Aldolase (158 kDa), Ferritin (440 kDa) und Blue Dextran (~2000 kDa) (Abb. 40). Aus den ermittelten Elutionsvolumina und den jeweiligen Molekulargewichten der Eichsubstanzen wurde der Verteilungskoeffizient der Substanzen wie folgt berechnet:



**Abb. 40: SEC-Eichläufe zur Molekulargewichtsbestimmung von Aβ-Mono- und Oligomeren.** Als Eichsubstanzen kamen Vitamin B12 (1,35 kDa), Aprotinin (6,5 kDa), RNase A (13,7 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Aldolase (158 kDa), Ferritin (440 kDa) zum Einsatz. Dargestellt sind exemplarische Eichläufe aus mindestens drei unabhängigen Experimenten für die verwendete Säule.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_x} \quad \text{mit } V_x = V_t - V_0$$

( $K_{av}$  = Verteilungskoeffizient,  $V_0$  = Ausschlussvolumen,  $V_e$  = Elutionsvolumen,  $V_t$  = Gesamtvolumen der Säule,  $V_x$  = Volumen der Gelmatrix)

Aus dem Auftrag des Verteilungskoeffizienten gegenüber dem dekadischen Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte, lies sich eine Eichgerade erstellen anhand deren Steigung schließlich die Molekulargewichtsverteilung der einzelnen Aggregatformen des Aβ-Peptids berechnet werden konnte.

#### 6.4.4 Calcein-Freisetzung-Analyse

Für die Freisetzung-Analyse wurde der Fluoreszenzfarbstoff Calcein verwendet. Konzentrationen des Farbstoffes über 50 µM resultieren in einer Fluoreszenzlöschung. Werden die befüllten Vesikel mit membran-destabilisierenden Peptiden vermischt, so kann Calcein aus

den Liposomen entweichen und sich im umgebenen Medium verdünnen. Hierdurch kommt es zu einem messbaren Fluoreszenzanstieg, der sich proportional zur freigesetzten Farbstoffmenge bzw. zur Membranpermeabilisierung-Aktivität der untersuchten Substanz verhält.

### **Präparation Calcein-haltiger Liposomen**

Die Liposomen wurden analog dem in Kapitel 6.4.2 beschriebenen Protokoll hergestellt. Die hydrophobe Hydratation erfolgte hier jedoch in einem entsprechendem Volumen 100 mM Calcein gelöst in PBS, pH 7,4.

### **Gelfiltration von Liposomen**

Mit Calcein befüllte Liposomen wurden von freiem, nicht eingeschlossenem Calcein mittels Gelfiltration getrennt. Dafür wurde ein Säulchen mit ca. 5-8 ml Bettvolumen Sepharose™ CL-4B (GE Healthcare, GB) vorsichtig befüllt und mit fünffachem Bettvolumen PBS equilibriert. Anschließend erfolgte die Trennung durch Auftrag der Liposomenlösung auf die Säule. Die deutlich sichtbare Liposomenfraktion wurde in einem 50 ml Gefäß aufgefangen und sofort 1:10 in PBS verdünnt. Für diese Analyse wurden die gewünschten A $\beta$ -Peptidkonzentrationen in Zweifachbestimmung in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und erst direkt vor der Messung mit je 100  $\mu$ l Liposomensuspension vermischt. Die Fluoreszenzmessung wurde sofort gestartet. Mit Hilfe des Plattenlesegerätes Synergy 2 (Biotek, USA) konnte die Calceinfreisetzung bei einem Anregungsmaximum von 490 nm und einem Emissionsmaximum von 520 nm für 90 min verfolgt werden. Als Referenzwert zum Zeitpunkt Null wurde die initial gemessene Fluoreszenz von den anderen Werten abgezogen. Die ermittelten Werte wurden dann prozentual an einer mitgeführten Kontrolle mit 0,1% Triton X-100 berechnet, wobei der Fluoreszenzwert dieser Kontrolle stets als 100% Farbstofffreisetzung definiert wurde.

### **6.4.5 MALDI-Massenspektrometrie**

Die Analyse der Molekülgröße von Proteinen oder Peptiden erfolgte mit der Matrix-unterstützten Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie („matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry“). Die Methode bestimmt das Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) von Molekülionen, die aus dem Probenkristall intakt desorbiert und ionisiert wurden. Für die Detektion von A $\beta$ -Peptiden wurden die Matrixsubstanzen  $\alpha$ -Cyano-hydroxyzimtsäure (CCA) und Sinapinsäure (SA) in einer jeweils gesättigten Lösung verwendet. Dafür wurden die Substanzen in 0,1% Trifluoressigsäure und 30% Acetonitril im Ultraschallbad gelöst. Nach 5 min Zentrifugation wurde der Überstand für die Präparation nach der „dried-droplet“-Methode zu je 1  $\mu$ l mit der gleichen Menge Probe vermischt und auf ein Stahl-Probenträger aufgetragen (Karras und Hillenkamp, 1988). Nach Trocknung und Kristal-

lisation der Proben erfolgte die Messung mit einem Ultraflex II (Bruker Daltonics, Bremen) in der Regel im positiven Reflektormodus mit dem Programm „RP\_PepMix“.

#### 6.4.6 LC-ESI-Massenspektrometrie

Die Tripeptid-Analysen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Johan Lundkvist (Astrazeneca, Schweden) durch Staffan Schmidt an einem Quantum Triple Quadrupol (Thermo Scientific, USA) Massenspektrometer durchgeführt. Für die Detektion der entstandenen Tripeptide wurde ein Probenvolumen von 70 µl aus dem *in vitro*-γ-Sekretase-Test mit 20 µl internem Standard (571 nM Leucin Enkephalin in 1% Ameisensäure) vermischt und anschließend über einen 0,45 µm Filter (Millipore, USA) gereinigt. Der Durchfluss wurde chromatographisch über eine Hypersil Gold C18-Säule (Thermo Scientific, USA) aufgetrennt, wobei folgender Gradient verwendet wurde: 0-15% Puffer B/0-10 min, 15-70% Puffer B/10-15 min, 0% Puffer B/15-20 min. Puffer A enthielt dabei 0,05% Ameisensäure und Puffer B 95% Acetonitril und 0,05% Ameisensäure. Die Konzentrationen der jeweilig identifizierten Tri- und Tetrapeptide konnte anhand von Standardreihen mit synthetischen Peptiden quantifiziert werden.

Um Proteine zu identifizieren, die bei der Oberflächenresonanzspektrometrie spezifisch an Lipidoberflächen gebunden haben, erfolgte die Analyse mit einem Orbitrap Velos durch Dr. Murat Eravci (Thermo Scientific, USA). Für den Trypsinverdau wurden die getrockneten Proben in 20 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat aufgenommen und vorhandene Disulfidbrücken der Proteine durch Zugabe von 1 µl 10 mM DTT 30 min reduziert und anschließend mit 1 µl 55 mM Jodazetamid für 20 min nicht reversibel carbamidomethyliert. Der Verdau erfolgte mit 0,5 µg/µl Trypsinlösung (Roche, Schweiz) für 3 h bei 37°C und 500 rpm im Thermomixer. Für die LC-MS Messung wurden die Proben nun in je 200 µl Puffer A\* (3% Acetonitril, 0,3% Trifluoressigsäure) verdünnt und gemischt. Die Aufreinigung und Konzentrierung der tryptischen Proteinfragmente wurde nach dem Stage-Tip Protokoll von Rappsilber et al. durchgeführt (Rappsilber et al., 2007). Nach dem Auftrag der Proben auf eine ReproSil-Pur® C18-Silikapillarsäule (Dr. Maisch, Ammerbruch-Entringen) wurden die Proteinfragmente über einen 60 min Gradienten wie folgt aufgetrennt: 4% Puffer B/0-3 min, 4-55% Puffer B/3-63 min, 90% Puffer B/ 64-69 min, 4% Puffer B/ 69-90 min. Puffer A enthielt dabei 0,1% Ameisensäure und Puffer B 80% Acetonitril und 0,1% Ameisensäure. Die eigentliche Messung erfolgte durch „online“-Einspritzung der getrennten Proteinfragmente in das Massenspektrometer. Mit den Programmen MaxQuant und Perseus wurden schließlich die erhaltenen MS- und MS/MS-Daten ausgewertet und die Proteinidentifizierung durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte anhand des „Label free“-Quantifikation Algorithmus, der im Programm MaxQuant implementiert ist.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2012. Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 4. vollständig überarbeitete Auflage. ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Alzheimer, A., 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin 146–8.
- Andreasen, N., Minthon, L., Davidsson, P., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Winblad, B., Blennow, K., 2001. Evaluation of CSF-tau and CSF-Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. Arch. Neurol. 58, 373–379.
- Anstey, K.J., Lipnicki, D.M., Low, L.-F., 2008. Cholesterol as a risk factor for dementia and cognitive decline: a systematic review of prospective studies with meta-analysis. Am J Geriatr Psychiatry 16, 343–354.
- Ariga, T., McDonald, M.P., Yu, R.K., 2008. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease--a review. J. Lipid Res. 49, 1157–1175.
- Arispe, N., Pollard, H.B., Rojas, E., 1994. beta-Amyloid Ca(2+)-channel hypothesis for neuronal death in Alzheimer disease. Mol. Cell. Biochem. 140, 119–125.
- Barenholz, Y., Thompson, T.E., 1980. Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. Biochim. Biophys. Acta 604, 129–158.
- Barrett, P.J., Song, Y., Van Horn, W.D., Hustedt, E.J., Schafer, J.M., Hadziselimovic, A., Beel, A.J., Sanders, C.R., 2012. The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. Science 336, 1168–1171.
- Barz, B., Urbanc, B., 2012. Dimer formation enhances structural differences between amyloid  $\beta$ -protein (1-40) and (1-42): an explicit-solvent molecular dynamics study. PLoS ONE 7, e34345.
- Beel, A.J., Sakakura, M., Barrett, P.J., Sanders, C.R., 2010. Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: An important interaction in lipid-Alzheimer's disease relationships? Biochim. Biophys. Acta 1801, 975–982.
- Behr, D., Hesse, L., Masters, C.L., 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., Kellett, K.A.B., Beckett, C., Makova, N.Z., Revett, T.J., Nalivaeva, N.N., Hooper, N.M., Turner, A.J., 2010. The Transcriptionally Active Amyloid Precursor Protein (APP) Intracellular Domain Is Preferentially Produced from the 695 Isoform of APP in a  $\beta$ -Secretase-dependent Pathway. J. Biol. Chem. 285, 41443–41454.

- Bergman, A., Religa, D., Karlström, H., Laudon, H., Winblad, B., Lannfelt, L., Lundkvist, J., Näslund, J., 2003. APP intracellular domain formation and unaltered signaling in the presence of familial Alzheimer's disease mutations. *Exp. Cell Res.* 287, 1–9.
- Bertram, L., Lill, C.M., Tanzi, R.E., 2010. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron* 68, 270–281.
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D., Tanzi, R.E., 2007. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat. Genet.* 39, 17–23.
- Beyer, K., Lao, J.I., Gómez, M., Riutort, N., Latorre, P., Mate, J.L., Ariza, A., 2001. Alzheimer's disease and the cystatin C gene polymorphism: an association study. *Neurosci. Lett.* 315, 17–20.
- Blennow, K., Hampel, H., 2003. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2, 605–613.
- 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., Sisodia, S.S., 1996. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Aβ<sub>1-42</sub>/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., Koksche, B., Hildebrand, P.W., Bittl, R., Multhaup, G., 2011. The amyloid precursor protein C-terminal fragment C100 occurs in monomeric and dimeric stable conformations and binds γ-secretase modulators. *Biochemistry* 50, 828–835.
- Bush, A.I., Multhaup, G., Moir, R.D., Williamson, T.G., Small, D.H., Rumble, B., Pollwein, P., Beyreuther, K., Masters, C.L., 1993. A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 268, 16109–16112.
- Calero, M., Rostagno, A., Ghiso, J., 2012. Search for amyloid-binding proteins by affinity chromatography. *Methods Mol. Biol.* 849, 213–223.
- Cao, X., Südhof, T.C., 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115–120.
- Cao, X., Südhof, T.C., 2004. Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J. Biol. Chem.* 279, 24601–24611.
- Casey, G., 2012. Alzheimer's and other dementias. *Nurs N Z* 18, 20–24.
- Cathcart, H.M., Huang, R., Lanham, I.S., Corder, E.H., Poduslo, S.E., 2005. Cystatin C as a risk factor for Alzheimer disease. *Neurology* 64, 755–757.

- Cecchi, C., Rosati, F., Pensalfini, A., Formigli, L., Nosi, D., Liguri, G., Dichiaro, F., Morello, M., Danza, G., Pieraccini, G., Peri, A., Serio, M., Stefani, M., 2008. Seladin-1/DHCR24 protects neuroblastoma cells against Abeta toxicity by increasing membrane cholesterol content. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 1990–2002.
- Chan, R.B., Oliveira, T.G., Cortes, E.P., Honig, L.S., Duff, K.E., Small, S.A., Wenk, M.R., Shui, G., Di Paolo, G., 2012. Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 287, 2678–2688.
- Chávez-Gutiérrez, L., Bammens, L., Benilova, I., Vandersteen, A., Benurwar, M., Borgers, M., Lismont, S., Zhou, L., Van Cleynenbreugel, S., Esselmann, H., Wiltfang, J., Serneels, L., Karran, E., Gijsen, H., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Broersen, K., De Strooper, B., 2012. The mechanism of  $\gamma$ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J.* 31, 2261–2274.
- Chen, W.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1990. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 265, 3116–3123.
- Chen, Y., Jia, L., Wei, C., Wang, F., Lv, H., Jia, J., 2008. Association between polymorphisms in the apolipoprotein D gene and sporadic Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1233, 196–202.
- Cheng, H., Vetrivel, K.S., Gong, P., Meckler, X., Parent, A., Thinakaran, G., 2007. Mechanisms of disease: new therapeutic strategies for Alzheimer's disease—targeting APP processing in lipid rafts. *Nat Clin Pract Neurol* 3, 374–382.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., Selkoe, D.J., 1992. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672–674.
- Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., Ashe, K.H., 2005. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* 8, 79–84.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.
- Cordy, J.M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N.M., Turner, A.J., 2003. Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 11735–11740.
- De Felice, F.G., Velasco, P.T., Lambert, M.P., Viola, K., Fernandez, S.J., Ferreira, S.T., Klein, W.L., 2007. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J. Biol. Chem.* 282, 11590–11601.

- De Strooper, B., Annaert, W., 2010. Novel research horizons for presenilins and  $\gamma$ -secretases in cell biology and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 235–260.
- DeMattos, R.B., O'dell, M.A., Parsadanian, M., Taylor, J.W., Harmony, J.A.K., Bales, K.R., Paul, S.M., Aronow, B.J., Holtzman, D.M., 2002. Clusterin promotes amyloid plaque formation and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *PNAS* 99, 10843–10848.
- Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S.C., Parker, I., Glabe, C.G., 2005. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* 280, 17294–17300.
- Desai, P.P., Hendrie, H.C., Evans, R.M., Murrell, J.R., DeKosky, S.T., Kamboh, M.I., 2003. Genetic variation in apolipoprotein D affects the risk of Alzheimer disease in African-Americans. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 116B, 98–101.
- Deshpande, A., Mina, E., Glabe, C., Busciglio, J., 2006. Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J. Neurosci.* 26, 6011–6018.
- Devanathan, S., Salamon, Z., Lindblom, G., Gröbner, G., Tollin, G., 2006. Effects of sphingomyelin, cholesterol and zinc ions on the binding, insertion and aggregation of the amyloid A $\beta$ 1–40 peptide in solid-supported lipid bilayers. *FEBS Journal* 273, 1389–1402.
- Di Paolo, G., Kim, T.-W., 2011. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 284–296.
- Dulin, F., L veill , F., Ortega, J.B., Mornon, J.-P., Buisson, A., Callebaut, I., Colloc'h, N., 2008. P3 peptide, a truncated form of A beta devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett.* 582, 1865–1870.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H., Haass, C., 2003. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat. Cell Biol.* 5, 486–488.
- Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., Simons, K., 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* 160, 113–123.
- Evangelisti, E., Cecchi, C., Cascella, R., Sgromo, C., Becatti, M., Dobson, C.M., Chiti, F., Stefani, M., 2012. Membrane lipid composition and its physicochemical properties define cell vulnerability to aberrant protein oligomers. *J. Cell. Sci.* 125, 2416–2427.
- Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., Von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., Hartmann, T., 2001. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides A $\beta$ 242 and A $\beta$ 40 in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5856–5861.

- Foley, P., 2010. Lipids in Alzheimer's disease: A century-old story. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 750–753.
- Forlenza, O.V., Diniz, B.S., Gattaz, W.F., 2010. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. *BMC Med* 8, 89.
- Fukumori, A., Fluhrer, R., Steiner, H., 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.
- Fukumoto, H., Tokuda, T., Kasai, T., Ishigami, N., Hidaka, H., Kondo, M., Allsop, D., Nakagawa, M., 2010. High-molecular-weight  $\beta$ -amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *FASEB J* 24, 2716–2726.
- Galimberti, D., Scarpini, E., 2012. Progress in Alzheimer's disease. *J. Neurol.* 259, 201–211.
- Gao, C.M., Yam, A.Y., Wang, X., Magdangal, E., Salisbury, C., Peretz, D., Zuckermann, R.N., Connolly, M.D., Hansson, O., Minthon, L., Zetterberg, H., Blennow, K., Fedyns-hyn, J.P., Allauzen, S., 2010. A $\beta$ 40 oligomers identified as a potential biomarker for the diagnosis of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 5, e15725.
- Georganopoulou, D.G., Chang, L., Nam, J.-M., Thaxton, C.S., Mufson, E.J., Klein, W.L., Mirkin, C.A., 2005. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2273–2276.
- Ghisso, J., Rostagno, A., Gardella, J.E., Liem, L., Gorevic, P.D., Frangione, B., 1992. A 109-amino-acid C-terminal fragment of Alzheimer's-disease amyloid precursor protein contains a sequence, -RHDS-, that promotes cell adhesion. *Biochem. J.* 288 ( Pt 3), 1053–1059.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Cairns, N.J., Crowther, R.A., 1992. Tau proteins of alzheimer paired helical filaments: Abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8, 159–168.
- Grimm, M.O.W., Grimm, H.S., Pätzold, A.J., Zinser, E.G., Halonen, R., Duering, M., Tschäpe, J.A., De Strooper, B., Müller, U., Shen, J., Hartmann, T., 2005. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat. Cell Biol.* 7, 1118–1123.
- Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., 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., 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., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D.B., 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322–325.
- Han, X., Holtzman, D., McKeel, D.W., Jr, Kelley, J., Morris, J.C., 2002. Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J. Neurochem.* 82, 809–818.
- Han, X., Rozen, S., Boyle, S.H., Hellegers, C., Cheng, H., Burke, J.R., Welsh-Bohmer, K.A., Doraiswamy, P.M., Kaddurah-Daouk, R., 2011. Metabolomics in Early Alzheimer's Disease: Identification of Altered Plasma Sphingolipidome Using Shotgun Lipidomics. *PLoS One* 6.
- Hansson, E.M., Strömberg, K., Bergstedt, S., Yu, G., Näslund, J., Lundkvist, J., Lendahl, U., 2005. Aph-1 interacts at the cell surface with proteins in the active gamma-secretase complex and membrane-tethered Notch. *J. Neurochem.* 92, 1010–1020.
- Hao, M., Mukherjee, S., Maxfield, F.R., 2001. Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13072–13077.
- Hardy, J., Allsop, D., 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 383–388.
- Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.
- 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., Multhaup, G., 2009. Role of amyloid-beta glycine 33 in oligomerization, toxicity, and neuronal plasticity. *J. Neurosci.* 29, 7582–7590.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., et al., 2009. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 41, 1088–1093.
- Hartmann, T., Kuchenbecker, J., Grimm, M.O.W., 2007. Alzheimer's disease: the lipid connection. *J. Neurochem.* 103 Suppl 1, 159–170.
- 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., 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.
- Hayashi, H., Kimura, N., Yamaguchi, H., Hasegawa, K., Yokoseki, T., Shibata, M., Yamamoto, N., Michikawa, M., Yoshikawa, Y., Terao, K., Matsuzaki, K., Lemere, C.A., Selkoe, D.J., Naiki, H., Yanagisawa, K., 2004. A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J. Neurosci.* 24, 4894–4902.

- He, X., Huang, Y., Li, B., Gong, C.-X., Schuchman, E.H., 2010. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 31, 398–408.
- Hecimovic, S., Wang, J., Dolios, G., Martinez, M., Wang, R., Goate, A.M., 2004. Mutations in APP have independent effects on Abeta and CTFgamma generation. *Neurobiol. Dis.* 17, 205–218.
- Heilig, E.A., Xia, W., Shen, J., 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.
- Helisalmi, S., Hiltunen, M., Vepsäläinen, S., Iivonen, S., Corder, E.H., Lehtovirta, M., Man-nermaa, A., Koivisto, A.M., Soininen, H., 2004. Genetic variation in apolipoprotein D and Alzheimer's disease. *J. Neurol.* 251, 951–957.
- Helisalmi, S., Väkevä, A., Hiltunen, M., Soininen, H., 2009. Flanking markers of cystatin c (CST3) gene do not show association with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 27, 318–321.
- Helms, J.B., Zurzolo, C., 2004. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* 5, 247–254.
- Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretschmar, H., Sisodia, S., Müller, U., 2004. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J.* 23, 4106–4115.
- Hesse, C., Nilsson, C.L., Blennow, K., Davidsson, P., 2001. Identification of the apolipoprotein E4 isoform in cerebrospinal fluid with preparative two-dimensional electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 22, 1834–1837.
- Hesse, L., Behr, D., Masters, C.L., Multhaup, G., 1994. The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett.* 349, 109–116.
- Hicks, D.A., Nalivaeva, N.N., Turner, A.J., 2012. Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling. *Front Physiol* 3, 189.
- Hu, Y., Malone, J.P., Fagan, A.M., Townsend, R.R., Holtzman, D.M., 2005. Comparative proteomic analysis of intra- and interindividual variation in human cerebrospinal fluid. *Mol. Cell Proteomics* 4, 2000–2009.
- Hung, A.Y., Koo, E.H., Haass, C., Selkoe, D.J., 1992. Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 9439–9443.
- Huse, J.T., Liu, K., Pijak, D.S., Carlin, D., Lee, V.M.-Y., Doms, R.W., 2002. Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* 277, 16278–16284.

- Huse, J.T., Pijak, D.S., Leslie, G.J., Lee, V.M., Doms, R.W., 2000. Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J. Biol. Chem.* 275, 33729–33737.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., Smith, T.S., Simmons, D.L., Walsh, F.S., Dingwall, C., Christie, G., 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* 14, 419–427.
- Ikedo, K., Yamaguchi, T., Fukunaga, S., Hoshino, M., Matsuzaki, K., 2011. Mechanism of amyloid  $\beta$ -protein aggregation mediated by GM1 ganglioside clusters. *Biochemistry* 50, 6433–6440.
- Ishitsuka, R., Kobayashi, T., 2007. Cholesterol and lipid/protein ratio control the oligomerization of a sphingomyelin-specific toxin, lysenin. *Biochemistry* 46, 1495–1502.
- Kaden, D., Munter, L.-M., Joshi, M., Treiber, C., Weise, C., Bethge, T., Voigt, P., Schaefer, M., Beyermann, M., Reif, B., 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., Multhaup, G., 2009. Subcellular localization and dimerization of APLP1 are strikingly different from APP and APLP2. *J. Cell. Sci.* 122, 368–377.
- Kakuda, N., Funamoto, S., Yagishita, S., Takami, M., Osawa, S., Dohmae, N., Ihara, Y., 2006. Equimolar production of amyloid beta-protein and amyloid precursor protein intracellular domain from beta-carboxyl-terminal fragment by gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* 281, 14776–14786.
- Kalvodova, L., Kahya, N., Schwille, P., Eehalt, R., Verkade, P., Drechsel, D., Simons, K., 2005. Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. *J. Biol. Chem.* 280, 36815–36823.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Müller-Hill, B., 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733–736.
- Karas, M., Hillenkamp, F., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299–2301.
- Kayed, R., Sokolov, Y., Edmonds, B., McIntire, T.M., Milton, S.C., Hall, J.E., Glabe, C.G., 2004. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J. Biol. Chem.* 279, 46363–46366.

- Kimberly, W.T., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Wolfe, M.S., 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.
- Kivipelto, M., Helkala, E.-L., Laakso, M.P., Hänninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Iivonen, S., Mannermaa, A., Tuomilehto, J., Nissinen, A., Soininen, H., 2002. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Ann. Intern. Med.* 137, 149–155.
- Kiyokawa, E., Baba, T., Otsuka, N., Makino, A., Ohno, S., Kobayashi, T., 2005. Spatial and functional heterogeneity of sphingolipid-rich membrane domains. *J. Biol. Chem.* 280, 24072–24084.
- Klein, W.L., Krafft, G.A., Finch, C.E., 2001. Targeting small Aβ oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci.* 24, 219–224.
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., Fahrenholz, F., 2001. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the α-secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5815–5820.
- König, G., Beyreuther, K., Masters, C.L., Schmitt, H.P., Salbaum, J.M., 1989. PreA4 mRNA distribution in brain areas. *Prog. Clin. Biol. Res.* 317, 1027–1036.
- Korade, Z., Kenworthy, A.K., 2008. Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology* 55, 1265–1273.
- Korolainen, M.A., Nyman, T.A., Nyyssönen, P., Hartikainen, E.S., Pirttilä, T., 2007. Multiplexed proteomic analysis of oxidation and concentrations of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer disease. *Clin. Chem.* 53, 657–665.
- Kosicek, M., Zetterberg, H., Andreasen, N., Peter-Katalinic, J., Hecimovic, S., 2012. Elevated cerebrospinal fluid sphingomyelin levels in prodromal Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 516, 302–305.
- Kuhn, P.-H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C., Lichtenthaler, S.F., 2007. Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by α-, β-, and γ-secretase. *J. Biol. Chem.* 282, 11982–11995.
- 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., De Strooper, B., 2010. Neurotoxicity of Alzheimer's disease Aβ peptides is induced by small changes in the Aβ42 to Aβ40 ratio. *EMBO J.* 29, 3408–3420.
- Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.

- Lambert, J.-C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M.J., Tavernier, B., Letenneur, L., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F., Fiévet, N., Barberger-Gateau, P., Engelborghs, S., De Deyn, P., Mateo, I., Franck, A., Helisalmi, S., Porcellini, E., Hanon, O., De Pancorbo, M.M., Lendon, C., Dufouil, C., Jaillard, C., Leveillard, T., Alvarez, V., Bosco, P., Mancuso, M., Panza, F., Nacmias, B., Bossù, P., Piccardi, P., Annoni, G., Seripa, D., Galimberti, D., Hannequin, D., Licastro, F., Soininen, H., Ritchie, K., Blanché, H., Dartigues, J.-F., Tzourio, C., Gut, I., Van Broeckhoven, C., Alperovitch, A., Lathrop, M., Amouyel, P., 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 41, 1094–1099.
- Lashuel, H.A., Hartley, D., Petre, B.M., Walz, T., Lansbury, P.T., Jr, 2002. Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418, 291.
- Laudon, H., Hansson, E.M., Melén, K., Bergman, A., Farmery, M.R., Winblad, B., Lendahl, U., Von Heijne, G., Näslund, J., 2005. A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J. Biol. Chem.* 280, 35352–35360.
- Lee, S.-F., Shah, S., Li, H., Yu, C., Han, W., 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., 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.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., Tang, J., 2000. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1456–1460.
- Löhmann, C., Schachmann, E., Dandekar, T., Villmann, C., Becker, C.-M., 2010. Developmental profiling by mass spectrometry of phosphocholine containing phospholipids in the rat nervous system reveals temporo-spatial gradients. *J. Neurochem.* 114, 1119–1134.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mahfoud, R., Garmy, N., Maresca, M., Yahi, N., Puigserver, A., Fantini, J., 2002. Identification of a Common Sphingolipid-binding Domain in Alzheimer, Prion, and HIV-1 Proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 11292–11296.
- Masters, C.L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R.N., Beyreuther, K., 1985. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.* 4, 2757–2763.

- Matsuzaki, K., Kato, K., Yanagisawa, K., 2010. Abeta polymerization through interaction with membrane gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 868–877.
- Mattsson, N., Blennow, K., Zetterberg, H., 2010. Inter-laboratory variation in cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: united we stand, divided we fall. *Clin. Chem. Lab. Med.* 48, 603–607.
- McCarthy, J.V., Twomey, C., Wujek, P., 2009. Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis and gamma-secretase activity. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1534–1555.
- Multhaup, G., Bush, A.I., Pollwein, P., Masters, C.L., 1994. Interaction between the zinc (II) and the heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP). *FEBS Lett.* 355, 151–154.
- Munter, L.-M., Botev, A., Richter, L., Hildebrand, P.W., Althoff, V., Weise, C., Kaden, D., 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., Multhaup, G., 2007. GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *EMBO J.* 26, 1702–1712.
- Naj, A.C., Jun, G., Beecham, G.W., Wang, L.-S., Vardarajan, B.N., et al., 2011. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 43, 436–441.
- Narayan, P., Orte, A., Clarke, R.W., Bolognesi, B., Hook, S., Ganzinger, K.A., Meehan, S., Wilson, M.R., Dobson, C.M., Klenerman, D., 2012. The extracellular chaperone clusterin sequesters oligomeric forms of the amyloid- $\beta$ (1-40) peptide. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 79–83.
- Nesic, I., Guix, F.X., Vennekens, K., Michaki, V., Van Veldhoven, P.P., Feiguin, F., De Strooper, B., Dotti, C.G., Wahle, T., 2012. Alterations in phosphatidylethanolamine levels affect the generation of A $\beta$ . *Aging Cell* 11, 63–72.
- Nutu, M., Bourgeois, P., Zetterberg, H., Portelius, E., Andreasson, U., Parent, S., Lipari, F., Hall, S., Constantinescu, R., Hansson, O., Blennow, K., 2012. A $\beta$ 1-15/16 as a Potential Diagnostic Marker in Neurodegenerative Diseases. *Neuromolecular Med.*
- Okada, T., Ikeda, K., Wakabayashi, M., Ogawa, M., Matsuzaki, K., 2008. Formation of Toxic A $\beta$ (1–40) Fibrils on GM1 Ganglioside-Containing Membranes Mimicking Lipid Rafts: Polymorphisms in A $\beta$ (1–40) Fibrils. *Journal of Molecular Biology* 382, 1066–1074.
- Okochi, M., Tagami, S., Yanagida, K., Takami, M., Kodama, T.S., Mori, K., Nakayama, T., Ihara, Y., Takeda, M., 2013.  $\gamma$ -Secretase Modulators and Presenilin 1 Mutants Act Differently on Presenilin/ $\gamma$ -Secretase Function to Cleave A $\beta$ 42 and A $\beta$ 43. *Cell Rep.*

- Osenkowski, P., Li, H., Ye, W., Li, D., Aeschbach, L., Fraering, P.C., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J., Li, H., 2009. Cryoelectron microscopy structure of purified gamma-secretase at 12 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 385, 642–652.
- Ouellet, M., Auger, M., 2008. Chapter 1 Structure and Membrane Interactions of Antimicrobial Peptides as Viewed by Solid-State NMR Spectroscopy, in: Graham A. Webb (Ed.), *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. Academic Press, pp. 1–21.
- Paccaud, J.P., Reith, W., Johansson, B., Magnusson, K.E., Mach, B., Carpentier, J.L., 1993. Clathrin-coated pit-mediated receptor internalization. Role of internalization signals and receptor mobility. *J. Biol. Chem.* 268, 23191–23196.
- Parks, A.L., Curtis, D., 2007. Presenilin diversifies its portfolio. *Trends Genet.* 23, 140–150.
- Peters, I., Igbavboa, U., Schütt, T., Haidari, S., Hartig, U., Rosello, X., Böttner, S., Copanaki, E., Deller, T., Kögel, D., Wood, W.G., Müller, W.E., Eckert, G.P., 2009. The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 964–972.
- Pike, L.J., 2009. The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res* 50, S323–S328.
- Pollard, H.B., Rojas, E., Arispe, N., 1993. A new hypothesis for the mechanism of amyloid toxicity, based on the calcium channel activity of amyloid beta protein (A beta P) in phospholipid bilayer membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695, 165–168.
- Ponte, P., Gonzalez-DeWhitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I., Fuller, F., 1988. A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 331, 525–527.
- Portelius, E., Dean, R.A., Gustavsson, M.K., Andreasson, U., Zetterberg, H., Siemers, E., Blennow, K., 2010. A novel Aβ isoform pattern in CSF reflects gamma-secretase inhibition in Alzheimer disease. *Alzheimers Res Ther* 2, 7.
- Prokop, S., Haass, C., 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.
- Puchades, M., Hansson, S.F., Nilsson, C.L., Andreasen, N., Blennow, K., Davidsson, P., 2003. Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 118, 140–146.
- Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirotsu, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T.C., Wang, R., Ihara, Y., 2005. Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J. Neurosci.* 25, 436–445.
- Rappsilber, J., Mann, M., Ishihama, Y., 2007. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* 2, 1896–1906.

- Refolo, L.M., Pappolla, M.A., LaFrancois, J., Malester, B., Schmidt, S.D., Thomas-Bryant, T., Tint, G.S., Wang, R., Mercken, M., Petanceska, S.S., Duff, K.E., 2001. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 8, 890–899.
- Reiber, H., 2001. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin. Chim. Acta* 310, 173–186.
- Resenberger, U.K., Harmeier, A., Woerner, A.C., Goodman, J.L., Müller, V., Krishnan, R., Vabulas, R.M., Kretzschmar, H.A., Lindquist, S., Hartl, F.U., Multhaup, G., Winklhofer, K.F., Tatzelt, J., 2011. The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of  $\beta$ -sheet-rich conformers independent of prion replication. *EMBO J.* 30, 2057–2070.
- Rogaeva, E., 2002. The solved and unsolved mysteries of the genetics of early-onset Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* 2, 1–10.
- 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., Emmerling, M.R., 1996. Morphology and toxicity of A $\beta$ (1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 271, 20631–20635.
- Roher, A.E., Lowenson, J.D., Clarke, S., Woods, A.S., Cotter, R.J., Gowing, E., Ball, M.J., 1993. beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10836–10840.
- Rossjohn, J., Cappai, R., Feil, S.C., Henry, A., McKinstry, W.J., Galatis, D., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C.L., Parker, M.W., 1999. Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat. Struct. Biol.* 6, 327–331.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 Vol., 0003 ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Santos, A.N., Ewers, M., Minthon, L., Simm, A., Silber, R.-E., Blennow, K., Prvulovic, D., Hansson, O., Hampel, H., 2012. Amyloid- $\beta$  oligomers in cerebrospinal fluid are associated with cognitive decline in patients with Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 29, 171–176.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M.M., Teplow, D.B., 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, T., Diehl, T.S., Narayanan, S., Funamoto, S., Ihara, Y., De Strooper, B., Steiner, H., Haass, C., Wolfe, M.S., 2007. Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J. Biol. Chem.* 282, 33985–33993.

- Sawamura, N., Ko, M., Yu, W., Zou, K., Hanada, K., Suzuki, T., Gong, J.-S., Yanagisawa, K., Michikawa, M., 2004. Modulation of amyloid precursor protein cleavage by cellular sphingolipids. *J. Biol. Chem.* 279, 11984–11991.
- Schägger, H., 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., 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.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., Younkin, S., 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2, 864–870.
- Schmechel, A., Strauss, M., Schlicksupp, A., Pipkorn, R., Haass, C., Bayer, T.A., 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., 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.G., Brunkan, A.L., Hecimovic, S., Li, Y., 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., 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.J., 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487–498.
- Selkoe, D.J., Podlisny, M.B., Joachim, C.L., Vickers, E.A., Lee, G., Fritz, L.C., Oltersdorf, T., 1988. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 7341–7345.
- Seshadri, S., Fitzpatrick, A.L., Ikram, M.A., DeStefano, A.L., Gudnason, V., et al., 2010. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* 303, 1832–1840.
- Shah, S., Lee, S.-F., Tabuchi, K., Hao, Y.-H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C.E., 3rd, Südhof, T., Yu, G., 2005. Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122, 435–447.

- Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., Sabatini, B.L., 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* 27, 2866–2875.
- 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., Selkoe, D.J., 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837–842.
- Shie, F.-S., Jin, L.-W., Cook, D.G., Leverenz, J.B., LeBoeuf, R.C., 2002. Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 13, 455–459.
- Shimojo, M., Sahara, N., Murayama, M., Ichinose, H., Takashima, A., 2007. Decreased A beta secretion by cells expressing familial Alzheimer's disease-linked mutant presenilin 1. *Neurosci. Res.* 57, 446–453.
- Sihlbom, C., Davidsson, P., Sjögren, M., Wahlund, L.-O., Nilsson, C.L., 2008. Structural and quantitative comparison of cerebrospinal fluid glycoproteins in Alzheimer's disease patients and healthy individuals. *Neurochem. Res.* 33, 1332–1340.
- Simmons, L.K., May, P.C., Tomaselli, K.J., Rydel, R.E., Fuson, K.S., Brigham, E.F., Wright, S., Lieberburg, I., Becker, G.W., Brems, D.N., 1994. Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol. Pharmacol.* 45, 373–379.
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., Simons, K., 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6460–6464.
- Simonsen, A.H., McGuire, J., Podust, V.N., Davies, H., Minthon, L., Skoog, I., Andreasen, N., Wallin, A., Waldemar, G., Blennow, K., 2008. Identification of a novel panel of cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 29, 961–968.
- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaari, S.M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L., John, V., 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537–540.
- Small, D.H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., Masters, C.L., 1994. A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 14, 2117–2127.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.

- Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Löwer, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C.L., Müller, U., Kins, S., Beyreuther, K., 2005. Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J.* 24, 3624–3634.
- Söderberg, M., Edlund, C., Alafuzoff, I., Kristensson, K., Dallner, G., 1992. Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type. *J. Neurochem.* 59, 1646–1653.
- St George-Hyslop, P., Haines, J., Rogaeve, E., Mortilla, M., Vaula, G., Pericak-Vance, M., Foncin, J.F., Montesi, M., Bruni, A., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Pollen, D., Polinsky, R., Nee, L., Kennedy, J., Macciardi, F., Rogaeve, E., Liang, Y., Alexandrova, N., Lukiw, W., Schlumpf, K., Tanzi, R., Tsuda, T., Farrer, L., Cantu, J.M., Duara, R., Amaducci, L., Bergamini, L., Gusella, J., Roses, A., Crapper McLachlan, D., 1992. Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nat. Genet.* 2, 330–334.
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M.L., Baumeister, R., Fichteler, K., 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., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., 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.
- Storey, E., Spurck, T., Pickett-Heaps, J., Beyreuther, K., Masters, C.L., 1996. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is found on the surface of static but not activity motile portions of neurites. *Brain Res.* 735, 59–66.
- Struhl, G., Adachi, A., 2000. Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol. Cell* 6, 625–636.
- Suzuki, N., Cheung, T.T., Cai, X.D., Odaka, A., Otvos, L., Jr, Eckman, C., Golde, T.E., Yonkin, 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.
- Svennerholm, L., Boström, K., Fredman, P., Månsson, J.E., Rosengren, B., Rynmark, B.M., 1989. Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. *Biochim. Biophys. Acta* 1005, 109–117.
- Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., Ihara, Y., 2009. gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *J. Neurosci.* 29, 13042–13052.

- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., Iwatsubo, T., 2003. The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422, 438–441.
- Tamboli, I.Y., Hampel, H., Tien, N.T., Tolksdorf, K., Breiden, B., Mathews, P.M., Saftig, P., Sandhoff, K., Walter, J., 2011. Sphingolipid Storage Affects Autophagic Metabolism of the Amyloid Precursor Protein and Promotes A $\beta$  Generation. *J. Neurosci.* 31, 1837–1849.
- Tanzi, R.E., Bertram, L., 2005. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120, 545–555.
- Thambisetty, M., Simmons, A., Velayudhan, L., Hye, A., Campbell, J., Zhang, Y., Wahlund, L.-O., Westman, E., Kinsey, A., Güntert, A., Proitsi, P., Powell, J., Causevic, M., Killick, R., Lunnon, K., Lynham, S., Broadstock, M., Choudhry, F., Howlett, D.R., Williams, R.J., Sharp, S.I., Mitchelmore, C., Tunnard, C., Leung, R., Foy, C., O'Brien, D., Breen, G., Furney, S.J., Ward, M., Kloszewska, I., Mecocci, P., Soininen, H., Tsolaki, M., Velas, B., Hodges, A., Murphy, D.G.M., Parkins, S., Richardson, J.C., Resnick, S.M., Ferrucci, L., Wong, D.F., Zhou, Y., Muehlboeck, S., Evans, A., Francis, P.T., Spenger, C., Lovestone, S., 2010. Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease. *Arch. Gen. Psychiatry* 67, 739–748.
- Thinakaran, G., Koo, E.H., 2008. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* 283, 29615–29619.
- Um, J.W., Nygaard, H.B., Heiss, J.K., Kostylev, M.A., Stagi, M., Vortmeyer, A., Wisniewski, T., Gunther, E.C., Strittmatter, S.M., 2012. Alzheimer amyloid- $\beta$  oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 1227–1235.
- Uzun, S., Kozumplik, O., Folnegović-Smalc, V., 2011. Alzheimer's dementia: current data review. *Coll Antropol* 35, 1333–1337.
- 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., Citron, M., 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741.
- Vingtdeux, V., Marambaud, P., 2012. Identification and biology of  $\alpha$ -secretase. *Journal of Neurochemistry* 120, 34–45.
- Vollbach, H., Heun, R., Morris, C.M., Edwardson, J.A., McKeith, I.G., Jessen, F., Schulz, A., Maier, W., Kölsch, H., 2005. APOA1 polymorphism influences risk for early-onset non-familial AD. *Ann. Neurol.* 58, 436–441.

- Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A.C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Younkin, S.G., Golde, T.E., 2002. Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol. Dis.* 9, 11–23.
- Wakabayashi, T., Craessaerts, K., Bammens, L., Bentahir, M., Borgions, F., Herdewijn, P., Staes, A., Timmerman, E., Vandekerckhove, J., Rubinstein, E., Boucheix, C., Gevaert, K., De Strooper, B., 2009. Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains. *Nat. Cell Biol.* 11, 1340–1346.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J., 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539.
- Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G., Haass, C., 2001. Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J. Biol. Chem.* 276, 14634–14641.
- Wang-Dietrich, L., Funke, S.A., Kühbach, K., Wang, K., Besmehn, A., Willbold, S., Cinar, Y., Bannach, O., Birkmann, E., Willbold, D., 2013. The Amyloid- $\beta$  Oligomer Count in Cerebrospinal Fluid is a Biomarker for Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.*
- Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F.B.M., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C.L., Beyreuther, K., Evin, G., 2002. A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* 41, 2825–2835.
- Wessel, D., Flügge, U.I., 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138, 141–143.
- Westmeyer, G.G., Willem, M., Lichtenthaler, S.F., Lurman, G., Multhaup, G., Assfalg-Machleidt, I., Reiss, K., Saftig, P., Haass, C., 2004. Dimerization of beta-site beta-amyloid precursor protein-cleaving enzyme. *J. Biol. Chem.* 279, 53205–53212.
- Williams, T.L., Day, I.J., Serpell, L.C., 2010. The Effect of Alzheimer's A $\beta$  Aggregation State on the Permeation of Biomimetic Lipid Vesicles. *Langmuir* 26, 17260–17268.
- Williams, T.L., Johnson, B.R.G., Urbanc, B., Jenkins, A.T.A., Connell, S.D.A., Serpell, L.C., 2011. A $\beta$ 42 oligomers, but not fibrils, simultaneously bind to and cause damage to ganglioside-containing lipid membranes. *Biochem. J.* 439, 67–77.
- Williamson, R., Usardi, A., Hanger, D.P., Anderton, B.H., 2008. Membrane-bound beta-amyloid oligomers are recruited into lipid rafts by a fyn-dependent mechanism. *FASEB J.* 22, 1552–1559.

- Wiltfang, J., Esselmann, H., Cupers, P., Neumann, M., Kretzschmar, H., Beyermann, M., Schleuder, D., Jahn, H., Rütter, E., Kornhuber, J., Annaert, W., De Strooper, B., Saffig, 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.
- Wiltfang, J., Lewczuk, P., Riederer, P., Grünblatt, E., Hock, C., Scheltens, P., Hampel, H., Vanderstichele, H., Iqbal, K., Galasko, D., Lannfelt, L., Otto, M., Esselmann, H., Henkel, A.W., Kornhuber, J., Blennow, K., 2005. Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers of Dementia: the role of CSF and blood analysis in the early and differential diagnosis of dementia. *World J. Biol. Psychiatry* 6, 69–84.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., Selkoe, D.J., 1999. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513–517.
- Xu, Y., Shen, J., Luo, X., Zhu, W., Chen, K., Ma, J., Jiang, H., 2005. Conformational transition of amyloid beta-peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 5403–5407.
- Yamaji-Hasegawa, A., Makino, A., Baba, T., Senoh, Y., Kimura-Suda, H., Sato, S.B., Terada, N., Ohno, S., Kiyokawa, E., Umeda, M., Kobayashi, T., 2003. Oligomerization and pore formation of a sphingomyelin-specific toxin, lysenin. *J. Biol. Chem.* 278, 22762–22770.
- Yamasaki, A., Eimer, S., Okochi, M., Smialowska, A., Kaether, C., Baumeister, R., Haass, C., Steiner, H., 2006. The GxGD motif of presenilin contributes to catalytic function and substrate identification of gamma-secretase. *J. Neurosci.* 26, 3821–3828.
- Yamazaki, T., Koo, E.H., Selkoe, D.J., 1997. Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells. *J. Neurosci.* 17, 1004–1010.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., Carter, D.B., Tomasselli, A.G., Parodi, L.A., Henrikson, R.L., Gurney, M.E., 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533–537.
- Yanagisawa, K., 2007. Role of gangliosides in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1943–1951.
- Yanagisawa, K., Odaka, A., Suzuki, N., 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., 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., Rogaeva, E., Xu, D., Liang, Y., Duthie, M., St George-Hyslop, P.H., 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.
- Zellner, M., Veitinger, M., Umlauf, E., 2009. The role of proteomics in dementia and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 118, 181–195.
- Zetterberg, H., R etschi, U., Portelius, E., Brinkmalm, G., Andreasson, U., Blennow, K., Brinkmalm, A., 2008. Clinical proteomics in neurodegenerative disorders. *Acta Neurol. Scand.* 118, 1–11.
- Zhang, Y., Luo, W., Wang, H., Lin, P., Vetrivel, K.S., Liao, F., Li, F., Wong, P.C., Farquhar, M.G., Thinakaran, G., 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., 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., Mao, G., Tan, J., Dong, Y., Cui, M.-Z., Kim, S.-H., 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., Van der Ploeg, L.H., 1995. beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525–531.
- Zheng, H., Koo, E.H., 2006. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1, 5.
- Zhou, L., Chan, K.H., Chu, L.W., Kwan, J.S.C., Song, Y.Q., Chen, L.H., Ho, P.W.L., Cheng, O.Y., Ho, J.W.M., Lam, K.S.L., 2012. Plasma amyloid- $\beta$  oligomers level is a biomarker for Alzheimer's disease diagnosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423, 697–702.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A $\beta$	Amyloid $\beta$ -Peptid
$\alpha$ -CTF	C83; membranständiges APP-Fragment nach $\alpha$ -Sekretase Spaltung
AD	Alzheimer-Krankheit („Alzheimer’s disease“)
ADAM	„a disintegrin and metalloprotease“
AICD	APP intrazelluläre C-Terminale Domäne („APP intracellular C-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 $\alpha$ - bzw. $\beta$ -Sekretase Spaltung
BACE	„ $\beta$ -site APP-cleaving enzyme“
BSA	bovines Serumalbumin
BTLE	„brain total lipid extract“
$\beta$ -CTF	C99; membranständiges APP-Fragment nach $\beta$ -Sekretase Spaltung
°C	Grad Celsius
C100	humanes $\beta$ -CTF mit einem N-terminalen Methioninrest zur rekombinanten Expression in <i>E. coli</i>
CCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxizimtsäure
CB	Kollagen-bindende Domäne („collagen-binding domain“)
CD	zirkularer Dichroismus („circular dichroism“)
Chol	Cholesterin
CLU	Clusterin
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit („cerebrospinal fluid“)
CTF	carboxyterminales Fragment
CuBD	Kupfer-bindende Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
FAD	familiäre Alzheimer-Krankheit („familial Alzheimer’s Disease“)
FCS	fetales Kälberserum („fetal calf serum“)
GM1	Monosialotetrahexosylgangliosid
GRAVY	„Grand average of hydrophobicity“
h	Stunde(n)
HBD	Heparin-bindende Domäne („heparin-binding domain“)
HRP	Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“)
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LC-ESI-MS	„liquid chromatography-electrospray ionization“-Massenspektrometrie

LB	„lysogeny broth“, Nährlösung zur Kultivierung von Bakterien
LTP	Langzeitpotenzierung
M	Mol
mA	Milliampere
MALDI-MS	„matrix-assisted laser-desorption ionization“-Massenspektrometrie
min	Minuten
MMST	Mini-Mental-Status-Test
m/z	Verhältnis der Masse zur Ladung
Nct	Nicastrin
nm	Nanometer
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren
NTA	Nitrilotriessigsäure („nitrilotriacetic acid“)
NTF	aminoterminales Fragment
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate-buffered saline“)
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
Pen-2	„presinilin enhancer“ 2
PS (PS1/PS2)	Presinilin (Presinilin 1/2)
PSEN 1/2	Gen, das für Presinilin 1/2 kodiert
p-Tau	phosphoryliertes Tau
RIP	regulierte Intramembranproteolyse („regulated intramembrane proteolysis“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
RT	Raumtemperatur
RU	„response units“
s bzw. sec	Sekunde(n)
SA	Sinapinsäure
sAPP $\alpha$ /sAPP $\beta$	lösliche APP-Ektodomäne („soluble APP“) nach $\alpha$ - bzw. $\beta$ -Sekretase Spaltung
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie („size exclusion chromatography“)
SELDI-TOF MS	„surface-enhanced laser-desorption ionization“-Massenspektrometrie
SM	Sphingomyelin
SP	Signalpeptid
SPR	Oberflächenplasmonresonanz („surface plasmon resonance“)
SUV	„small unilamellar vesicles“
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
t-Tau	Gesamt-Tau („total-Tau“)
V	Volt bzw. Volumen
v/v	Volumenprozent („volume/volume“)
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent („weight/volume“)
ZD	zytoplasmatische Domäne
ZnBD	Zink-bindende Domäne („Zink-binding domain“)

## 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 Publikationen

#### Artikel

Olsson F., Schmidt S., **Althoff V.**, Jin S., Rosquist S., Lendahl U., Multhaup G., Lundkvist J.  
*„Mechanism of  $\gamma$ -secretase mediated APP processing and modulation.“*

(Manuskript fertig)

Kaden D., Harmeier A., Weise C., Munter L.M., **Althoff V.**, Rost B.R., Hildebrand P.W., Schmitz D., Schaefer M., Lurz R., Skodda S., Yamamoto R., Arlt S., Finckh U., Multhaup G.  
*„Novel APP/A $\beta$  mutation K16N produces highly toxic heteromeric A $\beta$  oligomers.“*

EMBO Mol Med. (2012) 4(7):647-59

Botev A., Munter L.M., Wenzel R., Richter L., **Althoff V.**, Ismer J., Gerling U., Weise C., Kokscho B., Hildebrand P.W., Bittl R., Multhaup G.

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

Biochemistry (2011) 50(5):828-35

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

*„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 (2010) 285(28):21636-43

#### Konferenzbeiträge

**Althoff V.**, Richter L., Munter L.M., Multhaup G.

*„Differential Interaction of A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 to Plasma Membrane Lipids“*

Alzheimer's Association International Conference (AAIC 2012) in Vancouver, Kanada, 14-19 Juli 2012; Vortrag

Kaden D., Harmeier A., Weise C., Munter L.M., **Althoff V.**, Rost B., Hildebrand P., Schmitz D., Lurz R., Finckh U., Multhaup G.

*„Novel APP/A $\beta$  Mutation K16N Produces Highly Toxic Heteromeric A $\beta$  Oligomers“*

Alzheimer's Association International Conference (AAIC 2012) in Vancouver, Kanada, 14-19 Juli 2012; Vortrag

**Althoff V.**, Botev A., Richter L., Munter L. M., Multhaup G.

*„Differential effects of  $\gamma$ -secretase on APP  $\beta$ -CTF wt and FAD mutant cleavage and lipid interaction of amyloid- $\beta$  peptides“*

11th Eibsee Meeting on Cellular Mechanisms of Neurodegeneration in Grainau, 12.-15. Oktober 2011; Poster

**Althoff V.**, Botev A., Richter L., Munter L. M., Multhaup G.

*„Differential effects of  $\gamma$ -secretase on APP  $\beta$ -CTF wt and FAD mutant cleavage and lipid interaction of amyloid- $\beta$  peptides“*

7th Fabisch Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology Regulated Intramembrane Proteolysis in Cancer Development and Neurodegenerative Diseases in Potsdam, 5.-7. Oktober 2011; Poster

**Althoff V.**, Botev A., Richter L., Munter L. M., Multhaup G.

*„Differential effects of  $\gamma$ -secretase on APP  $\beta$ -CTF wt and FAD mutant cleavage and lipid interaction of amyloid- $\beta$  peptides“*

McGill University, Integrated Program in Neuroscience Retreat in Montreal, Kanada, 20.-21. September 2011; Poster

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

*„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) in Barcelona, Spanien, 9.-13. März 2011; Poster

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

*„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. Oktober 2010; Poster

**Althoff V.**, Richter L., Munter L. M., Multhaup G.

*„Generation of A $\beta$ -peptides and characterization of their molecular interactions in the formation of toxic oligomers“*

9th Eibsee Meeting on Cellular Mechanisms of Alzheimer's Disease in Grainau, 11.-14. November 2009; Poster

Botev A., Munter L. M., **Althoff V.**, Weise C. und Multhaup G.

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

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

Botev A., Munter L. M., **Althoff V.**, Weise C. und Multhaup G.

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

3rd NEURAD Summer School in Lille, Frankreich, 18.-21. September 2009; Vortrag

## 9.2 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

### 9.3 Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Gerd Multhaupt. Ich möchte mich ganz besonders für die Überlassung dieses überaus spannenden Themenkomplexes bedanken sowie für die fortwährende Unterstützung und Förderung während dieser Arbeit und die ständige Bereitschaft zur Diskussion und konstruktiven Kritik.

Bei Prof. Dr. Markus Wahl möchte ich mich für das Interesse an dieser Arbeit und die Bereitschaft zur Zweitbegutachtung bedanken.

Ein großer Dank gebührt all meinen aktuellen und „neu-kanadischen“ sowie ehemaligen Kollegen: Lydia Alnajjar, Dr. Christian Barucker, Dr. Tobias Bethge, Dr. Anne Botev, Gerd Buchlow, Paul Dembny, Dr. Vivienne Engelschalt, Dr. Murat Eravci, Susanne Fehse, Sarah Hamppe, Dr. Anja Harmeier, Dr. Daniela Kaden, Filip Liebsch, Magnus Mayer, Dr. Luise Richter, Clara Schäfer, Linda Schauenburg, Andrea Senge, Draginia Wagner und Thomas Wons. Vielen Dank Euch für die gute Arbeitsatmosphäre und die vielen fachlichen und freundschaftlichen Gespräche während der letzten Jahre.

Ein besonderer Dank geht an dieser Stelle an Dr. Lisa Münter, die mich durch ihre herzlich offene Art und wirklich ansteckenden Begeisterung für die Wissenschaft immer wieder motiviert hat und durch vielerlei hilfreiche Ratschläge unterstützt hat.

Einen herzlichen Dank möchte ich auch Dr. Christoph Weise aussprechen. Durch ihn habe ich eine Menge über die Interpretation von Fragmentspektren lernen können. Vielen Dank für die Durchsicht dieser Arbeit und die netten Gespräche auch abseits der Wissenschaft.

Meinen drei Mitarbeitersstudenten Lisa Grohmann, Felix Oestereich und Holger Sieg möchte ich für ihr Interesse und ihre experimentelle Mitarbeit an diesem Projekt danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Kooperationspartner von Astrazeneca in Schweden, Dr. Johan Lundkvist, Staffan Schmid und Fredrik Olsson. Ohne sie hätte es die ELISA- und Tripeptid-Analysen nicht gegeben.

Vielen Dank an Dr. Oliver Peters und Dr. Carola Schipke für die Überlassung von so vielen, wertvollen CSF-Proben, durch die das Teilprojekt 3 überhaupt erst möglich wurde.

Für die Einführung in die Benutzung der DLS-Spektrometrie danke ich Herrn Dr. Bernhard Loll aus dem Labor von Prof. Dr. Markus Wahl.

Bei der Hans und Ilse Breuer-Stiftung möchte ich mich für die dreieinhalbjährige finanzielle Förderung sehr herzlich bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken und meiner Freundin Sarah, für die Begleitung und das große Verständnis in dieser Zeit. Ohne Euch wäre es nicht gegangen!

## 9.4 Erklärung

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

Ich versichere, dass diese Arbeit noch keiner anderen Universität vorgelegt wurde.

Berlin, den 05.03.2013

Veit Althoff