

**Einfluss niedermolekularer Substanzen auf die  
Homointeraktion des Amyloid-Vorläuferproteins:  
Das GxxxG-Motiv als Zielstruktur für die  
Modulation der Bildung und Aggregation von A $\beta$**

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  
**Luise Richter**  
aus Nauen

November 2011

---

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. Ferdinand Hucho
- Disputation am: 09.12.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Die Alzheimer-Krankheit .....	6
1.2 Molekulare Grundlagen der Alzheimer-Krankheit .....	7
1.2.1 Charakterisierung und Funktion des APP .....	7
1.2.2 Proteolytische Prozessierung von APP und die Entstehung von A $\beta$ -Peptiden .....	9
1.2.3 A $\beta$ -Peptide als Ursache der Alzheimer-Krankheit .....	11
1.2.4 Der $\gamma$ -Sekretase-Komplex .....	12
1.2.4.1 Charakterisierung und Aufbau des $\gamma$ -Sekretase-Komplexes .....	12
1.2.4.2 Mechanismus der sequentiellen Proteolyse .....	14
1.2.4.3 Substrate der $\gamma$ -Sekretase .....	16
1.2.5 Einfluss des GxxxG-Motivs auf die Produktion und Aggregation von A $\beta$ -Peptiden ...	16
1.3 Therapie der Alzheimer-Krankheit .....	18
1.3.1 Etablierte Therapieformen .....	18
1.3.2 Neue Therapieansätze .....	19
1.3.2.1 Vakzinierung .....	19
1.3.2.2 Sekretase-Stimulation/-Inhibition .....	19
1.3.2.3 Modulation der A $\beta$ -Produktion .....	20
1.4 Zielsetzung .....	22
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>23</b>
2.1 Darstellung der untersuchten Substanzen .....	23
2.2 Untersuchung der Bindungseigenschaften von GSMs und iGSMs .....	24
2.2.1 Analyse der Bindung von Sulindac Sulfid und strukturell verwandter Substanzen an A $\beta$ 42-Peptide .....	24
2.2.2 Analyse der Interaktion weiterer GSMs und iGSMs mit A $\beta$ 42 .....	28
2.2.3 Einfluss von Sulindac Sulfid auf die Sekundärstruktur von A $\beta$ 42 .....	30
2.2.4 NMR-Analyse der Interaktion von Sulindac Sulfid und A $\beta$ 42 .....	30
2.2.5 Analyse der Bindung von Sulindac Sulfid an das rekombinante $\gamma$ -Sekretase-Substrat C100 .....	31
2.2.6 Einfluss von Sulindac Sulfid auf die Sekundärstruktur des rekombinanten $\gamma$ -Sekretase-Substrats C100 .....	32
2.3 Einfluss von GSMs und iGSMs auf die TMS-Dimerisierung .....	32
2.3.1 Etablierung des ToxR-Assays in Gegenwart von potentiell modulierender Substanzen .....	32
2.3.2 Einfluss von Sulindac Sulfid und strukturell verwandter Substanzen auf die Dimerisierung der APP-TMS .....	34
2.3.3 Einfluss weiterer GSMs und iGSMs auf die Dimerisierung der APP-TMS .....	36
2.3.2 Analyse der Spezifität der Wirkung von Sulindac Sulfid und Celecoxib auf die TMS-Dimerisierung .....	38
2.4 Analyse und Charakterisierung neuartiger Sulindac-Derivate .....	41

2.5	Molekulares Ligandenbindungs-Modell .....	45
2.6	Einfluss von Sulindac Sulfid auf die Oligomerisierung von A $\beta$ 42 .....	47
2.7	Einfluss von Sulindac Sulfid auf die Fibrillenbildung von A $\beta$ 42 .....	48
<b>3.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>50</b>
3.1	Die APP-TMS als molekulares Target für GSMs und iGSMs .....	50
3.2	Postulierte Bindungsstellen für GSMs und iGSMs .....	53
3.3	Modulation der Substrat-Dimerisierung als Wirkmechanismus von GSMs und iGSMs .....	54
3.4	Spezifität der Wirkung von Sulindac Sulfid und Celecoxib auf die TMS-Dimerisierung .....	57
3.5	Der Einfluss neuartiger Sulindac-Derivate auf die A $\beta$ 42-Produktion korreliert mit deren Bindung an die A $\beta$ -Sequenz sowie der Modulation der TMS-Dimerisierung ...	59
3.6	Einfluss von Sulindac Sulfid auf die Aggregation von A $\beta$ 42 .....	61
3.7	Modulation der TMS-Dimerisierung als therapeutische Strategie .....	62
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung/Summary</b> .....	<b>64/66</b>
<b>5.</b>	<b>Material</b> .....	<b>68</b>
5.1	Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	68
5.2	Allgemeine Laborchemikalien .....	68
5.3	Pufferlösungen .....	68
5.4	Enzyme und »Kits« .....	68
5.5	Bakterienstämme und Nährmedien .....	68
5.6	Zelllinien und Nährmedien .....	68
5.7	Plasmid-Vektoren .....	69
5.8	Sequenzierprimer .....	69
5.9	Antiseren und Antikörper .....	69
5.10	Geräte .....	70
5.11	Software .....	71
<b>6.</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>72</b>
6.1	Molekularbiologische Methoden .....	72
6.1.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und chemische Transformation ...	72
6.1.2	Herstellung elektrisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und Elektrotransformation .....	72
6.1.3	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	73
6.1.4	Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen .....	73
6.1.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen .....	73
6.1.6	DNA-Agarose-Gelelektrophorese .....	73
6.1.7	Sequenzierungen .....	74
6.2	Proteinbiochemische Methoden .....	74
6.2.1	Peptidsynthese und Lösen von A $\beta$ -Peptiden .....	74
6.2.2	Proteinaufreinigung aus bakteriellen »inclusion bodies« .....	74

6.2.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	75
6.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	76
6.2.5	Coomassie-Färbung .....	77
6.2.6	Dot-Blot- und Western-Blot-Analyse .....	77
6.3	MALDI-MS .....	78
6.4	Circulardichroismus .....	78
6.5	Kernspin-Resonanz-Spektroskopie .....	78
6.6	Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analysen .....	79
6.6.1	Aminkopplung .....	79
6.6.2	Kopplung durch Chelatierung mittels Ni-NTA .....	79
6.6.3	Bindungs-Analysen .....	80
6.7	Größenausschluss-Chromatographie .....	80
6.8	Elektronenmikroskopie .....	81
6.9	Dimerisierungs-Assay .....	82
6.9.1	ToxR-Assay zur Bestimmung der relativen Dimerisierungsstärke .....	82
6.9.2	PD28-Wachstums-Assay zur Kontrolle der Membranintegration .....	83
6.10	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	84
6.11	ELISA .....	84
6.12	Molekulares Modell .....	85
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>86</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>111</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>115</b>
9.1	Publikationen .....	115
9.2	Lebenslauf .....	117
9.3	Danksagung .....	118
9.4	Erklärung .....	119

---

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit ist eine altersbedingte neurodegenerative Erkrankung und stellt die häufigste Ursache der Demenz dar (Selkoe, 2001). Gegenwärtig sind über 35 Millionen Menschen weltweit von einer Demenz betroffen (<http://www.alz.co.uk/>, World Alzheimer Report 2010). In Deutschland allein leben derzeit etwa 1,2 Millionen Demenzkranke, die überwiegende Mehrheit von ihnen leidet an der Alzheimer-Krankheit. Sofern kein Durchbruch in der Prävention und Therapie gelingt, wird die Zahl der Demenzkranken in den nächsten Jahren dramatisch zunehmen. Experten schätzen die weltweite Zahl auf über 65 Millionen Betroffene im Jahr 2030 und 115 Millionen im Jahr 2050 (<http://www.alz.co.uk/>, World Alzheimer Report 2010).

Der Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer beschrieb im Jahre 1906 erstmals die später nach ihm benannte Erkrankung (Alzheimer, 1907). Neben Gedächtnis- und Orientierungsstörungen kennzeichnen Störungen des Denk- und Urteilsvermögens das Krankheitsbild. Häufig sind zudem die Sprache und weitere höhere Hirnleistungen beeinträchtigt, woraus zunehmend eine Wesensveränderung sowie allgemeine Auffälligkeiten im Verhalten in den Vordergrund treten. Im fortgeschrittenen Stadium besteht ein hochgradiger geistiger Abbau, die Patienten sind bettlägerig, inkontinent und auf permanente Betreuung angewiesen (Galimberti und Scarpini, 2011; Holtzman et al., 2011). Die Alzheimer-Krankheit ist damit nicht nur ein schwerwiegendes persönliches Schicksal, sondern hat auch in sozialer und sozioökonomischer Hinsicht weitreichende Folgen.

Auf neuropathologischer Ebene führt die Alzheimer-Krankheit zu einem massiven Untergang von Synapsen und Nervenzellen insbesondere in Strukturen des limbischen Systems und im zerebralen Kortex. Damit verbunden weist das Gehirn eine diffuse Atrophie auf, die mit einer Verschmälerung der Hirnwindungen und einer Erweiterung der Furchen und Hirnkammern einhergeht (Holtzman et al., 2011). Als histologisch auffällige Veränderungen lassen sich nicht lösliche Neurofibrillenbündel (»neurofibrillar tangles«, NFT) aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein und extrazelluläre Ablagerung amyloider Plaques in Hirngewebe und Hirngefäßen nachweisen, wobei die Plaques das charakteristische pathologische Merkmal der Demenz vom Alzheimer-Typ sind. Die Hauptkomponente dieser Plaques stellt das sogenannte Amyloid- $\beta$ -Peptid ( $A\beta$ ) dar, das proteolytisch aus dem membranständigen Amyloid-Vorläuferprotein (»amyloid precursor protein«, APP) herausgeschnitten wird (Glenner und Wong, 1984; Masters und Beyreuther, 1989). Den Großteil der Plaques bildet dabei eine stark zur Aggregation neigende 42 Aminosäuren lange Form des Peptids ( $A\beta_{42}$ ), während ein kleinerer Teil aus dem  $A\beta$ -Peptid mit 40 Aminosäuren ( $A\beta_{40}$ ) besteht. Obwohl in zahlreichen Studien ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Amyloid-Plaques und der Pathologie der Alzheimer-Krankheit gezeigt werden konnte (Hardy und Selkoe, 2002), sind nach heutiger Sicht jedoch nicht die Plaques neurotoxisch. Vielmehr geht die Toxizität von löslichen  $A\beta$ -Oligomeren aus, die direkt oder indirekt zu einem Funktionsverlust und zum Absterben von Nervenzellen führen (Walsh et al., 2002).

Bei der Alzheimer-Krankheit unterscheidet man zwischen der sporadischen Form und der familiären Form (»familial Alzheimer's Disease«, FAD). In den meisten Fällen (95%) entsteht die

Krankheit sporadisch. Die ersten charakteristischen Symptome treten hier meist erst nach dem 65. Lebensjahr auf (Galimberti und Scarpini, 2011). Die Entstehung der sporadischen Alzheimer-Krankheit ist multifaktoriell bedingt. Umweltfaktoren und genetische Prädisposition können dabei den Ausbruch beschleunigen und den Krankheitsverlauf maßgeblich beeinflussen. Der größte Risikofaktor für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit ist das Alter. So liegt die Häufigkeit zu erkranken ab dem 65. Lebensjahr bei 5%, während von den 85-Jährigen und Älteren bereits jeder Dritte betroffen ist (Galimberti und Scarpini, 2011). Der wichtigste genetische Risikofaktor ist das Auftreten des  $\epsilon 4$ -Allels des Apolipoprotein E (ApoE  $\epsilon 4$ ). ApoE nimmt eine regulierende Rolle im Lipidstoffwechsel ein und ist beteiligt an der Aufnahme, am Transport und an der intrazellulären Freisetzung von Cholesterin. Neben dem  $\epsilon 4$ -Allel existieren noch die Isoformen  $\epsilon 2$  und  $\epsilon 3$ , wobei die  $\epsilon 3$ -Variante in der Gesamtpopulation am häufigsten vertreten ist. Heute weiß man, dass das  $\epsilon 4$ -Allel bei sporadischen Alzheimer-Fällen überrepräsentiert ist und das Erkrankungsrisiko mit der Gendosis steigt (Corder et al., 1993; Saunders et al., 1993; Strittmatter et al., 1993). Weiterhin zeigten Autopsie-Proben von Alzheimer-Patienten mit  $\epsilon 4$ -Allel erhöhte cerebrale und vaskuläre A $\beta$ -Ablagerungen (Rebeck et al., 1993; Schmechel et al., 1993). Für Träger des ApoE  $\epsilon 2$ -Allels konnte hingegen ein reduziertes Erkrankungsrisiko festgestellt werden (Corder et al., 1994).

Die familiäre Form der Alzheimer-Krankheit, die weniger als 5% der Fälle betrifft, ist autosomal-dominant vererbt und manifestiert sich schon im frühen Lebensalter, in Einzelfällen sogar schon vor dem 30. Lebensjahr (Galimberti und Scarpini, 2011). Verschiedene Mutationen im APP-Gen sowie in den Genen für Presenilin 1 (PSEN1) und Presenilin 2 (PSEN2) werden als Ursache für die FAD diskutiert (Goate et al., 1991; Levy-Lahad et al., 1995a; Levy-Lahad et al., 1995b; Rogaev et al., 1995; Sherrington et al., 1995). Mittlerweile wurden 32 verschiedene Mutationen im APP-Gen, 185 Mutationen in PSEN1 und 13 in PSEN2 beschrieben (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>, Stand 09/2011).

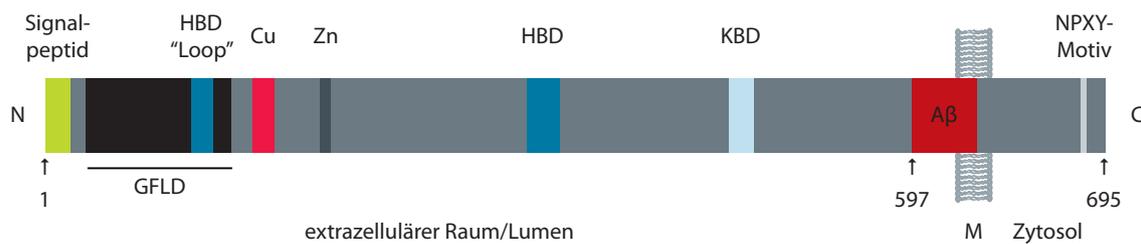
Die Pathologie der Alzheimer-Krankheit ist sehr komplex und eine kausale Therapie ist selbst nach mehr als einem Jahrhundert nach der Entdeckung Alois Alzheimers noch nicht möglich.

## 1.2 Molekulare Grundlagen der Alzheimer-Krankheit

### 1.2.1 Charakterisierung und Funktion des APP

Das humane APP-Gen ist auf dem Chromosom 21 lokalisiert (Tanzi et al., 1987; Goldgaber et al., 1987; Robakis et al., 1987). Von insgesamt 19 Exons können Exon 2, 7, 8 und 15 alternativ gespleißt werden (Tang et al., 2003). Daraus resultieren neun verschiedene APP-Isoformen, die entsprechend ihrer Anzahl an Aminosäuren benannt werden. APP wird ubiquitär exprimiert (Selkoe et al., 1988), wobei die APP-Isoformen von 751 (APP751) und 770 (APP770) Aminosäuren Länge hauptsächlich in nicht-neuronalen Zellen und in peripheren Geweben exprimiert werden, während APP695 die Hauptisoform in neuronalem Gewebe darstellt (Wertkin et al., 1993).

APP ist ein 110–130 kDa großes Typ-I-Transmembranprotein (Selkoe et al., 1988; Weidemann et al., 1989), das aus einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne (Ektodomäne), einer Transmembransequenz (TMS) und einem verhältnismäßig kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Bereich besteht (Kang et al., 1987).



**Abb. 1: Schematische Darstellung von humanem APP695 mit seinen funktionellen und strukturellen Domänen.**

*N-terminal besitzt APP ein Signalpeptid. In der Ektodomäne finden sich eine Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne (»growth factor-like domain«, GFLD) und zwei Heparin-bindende Domänen (HBD). Die erste HBD überlappt mit der »Loop«-Region. Des Weiteren existieren Metallbindungsstellen für Kupfer (Cu) und Zink (Zn) sowie eine Kollagen-bindende Domäne (KBD). Die amyloidogene Aβ-Sequenz ist rot markiert. Im C-Terminus befindet sich die Konsensussequenz zur Clathrin-vermittelten Internalisierung (NPXY). M: Membran, N: N-Terminus, C: C-Terminus.*

APP weist verschiedene funktionelle und strukturelle Domänen auf (Abb. 1). Am N-Terminus besitzt das APP ein Signalpeptid aus 17 Aminosäuren, das für die Translation ins Endoplasmatische Retikulum notwendig ist (Kang et al., 1987). Daran schließt sich ein Abschnitt mit zahlreichen Cysteinen an. Dieser enthält neben der Wachstumsfaktor-ähnlichen Domäne (»growth factor-like domain«, Aminosäuren 28–123) eine Heparin-bindende Domäne (Aminosäuren 96–110) und zwei Bindungsstellen für Metallionen, eine für Kupfer (Aminosäuren 137–151) und eine für Zink (Aminosäuren 181–188) (Beher et al., 1996; Bush et al., 1993; Multhaup et al., 1994; Rossjohn et al., 1999; Small et al., 1994). Die Cystein-Reste C98 und C105 der Heparin-bindenden Domäne bilden eine intramolekulare Disulfidbrücke aus und sind damit strukturgebend für die sogenannte »Loop«-Region (Aminosäuren 91–111) (Kaden et al., 2008; Rossjohn et al., 1999). Weiter C-terminal befinden sich eine zweite Heparin-bindende Domäne im Bereich der Aminosäuren 316–337 (im Folgenden bezogen auf APP695) sowie eine Kollagen-bindende Domäne (Aminosäuren 448–465) (Beher et al., 1996; Multhaup et al., 1995). Im C-Terminus enthält APP ein NPXY-Motiv (Aminosäuren 682–687), das als Sortierungssignal die Clathrin-vermittelte Endozytose des APP reguliert (Chen et al., 1990).

Im Gegensatz zu APP695 enthalten die beiden langen Isoformen, APP751 und APP770, in der Ektodomäne eine 56 Aminosäuren große Protease-Inhibitor-Domäne des Kunitz-Typs (KPI-Domäne), die durch Exon 7 kodiert wird (Kitaguchi et al., 1988; Tanzi et al., 1988). Die Spleißvariante APP770 enthält zudem eine OX-2-Sequenz, die große Homologie zum Glykoprotein MRC OX-2 aufweist (Clark et al., 1985).

In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass APP über mindestens drei Kontaktstellen dimerisiert. Die Dimerisierung wird einerseits durch die erste Heparin-bindende Domäne mit der »Loop«-Region und andererseits durch die Kollagen-bindende Domäne vermittelt (Beher et al., 1996; Kaden et al., 2008; Kaden et al., 2009; Scheuermann et al., 2001). Eine dritte Dimerisierungsstelle existiert in der APP-TMS und wird durch drei konsekutive GxxxG-Motive gebildet (Munter et al., 2007).

APP gehört einer Gen-Familie mit 17 Mitgliedern an. Dazu gehören neben dem APP-Gen auch die beiden Gene, die für die APP ähnlichen Proteine (»amyloid precursor-like protein«, APLP) APLP1 und APLP2 kodieren (Wasco et al., 1992; Wasco et al., 1993). Die Proteine der humanen APP-Familie

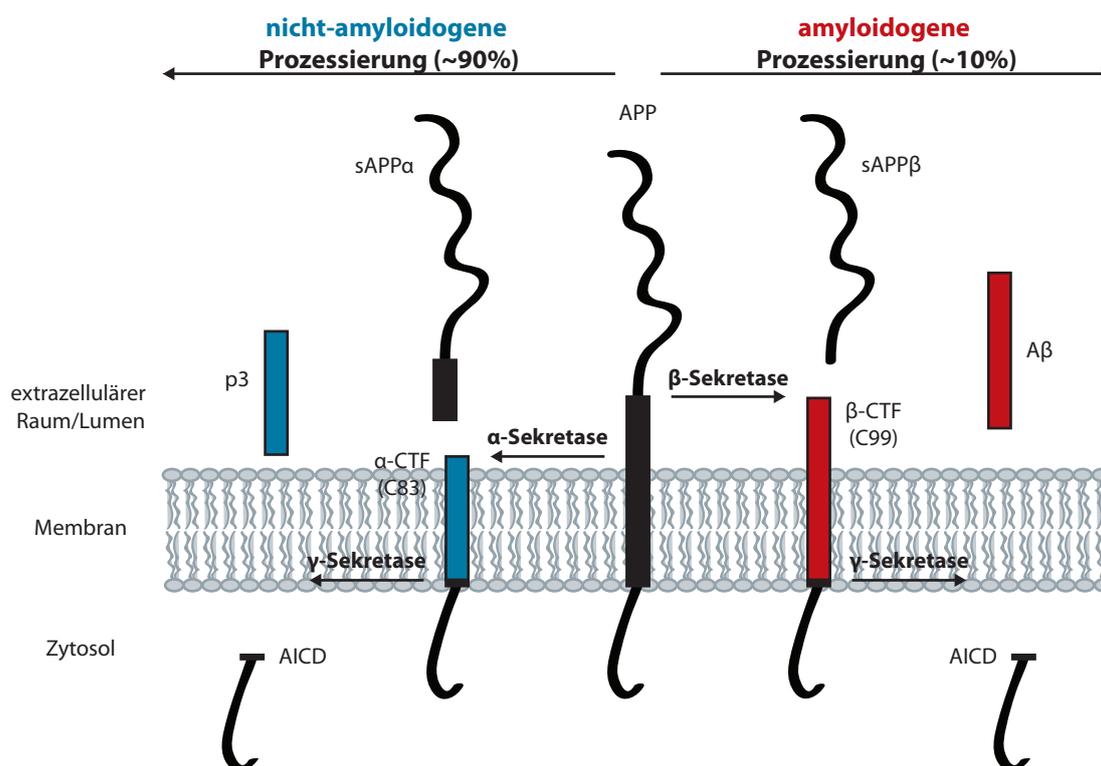
.....  
 gelangen über den konstitutiv sekretorischen Weg und posttranslationale Modifikation an die Zelloberfläche (Dyrks et al., 1988; Weidemann et al., 1989; Buxbaum et al., 1990; Hung und Selkoe, 1994; Walter et al., 1997; Lyckman et al., 1998). Dort kann das gereifte APP internalisiert werden, um im Folgenden entweder in den endosomal-lysosomalen Transport- und Abbauweg eingeschleust zu werden oder über endosomales Recycling wieder an die Zelloberfläche zu gelangen.

Die physiologische Funktion von APP ist nicht abschließend aufgeklärt. Anhand der Primärstruktur wurde bereits im Jahr 1987 postuliert, dass APP Funktionen als Zelloberflächenrezeptor ausüben könnte (Kang et al., 1987). Die Existenz extrazellulärer Liganden konnte bisher jedoch nicht bestätigt werden. Aktuell werden APP-Funktionen im Zusammenhang mit Synapsenbildung und neuronaler Plastizität diskutiert (Priller et al., 2006; Turner et al., 2003). Die Fähigkeiten von APP zur Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix, wie etwa Heparin und Kollagen, und zur Ausbildung von Homo- und Heterodimeren mit Mitgliedern der APP-Familie geben Hinweis auf die Funktion von APP bei der Zell-Zell- sowie der Zell-Matrix-Interaktion (Breen et al., 1991; Chen und Yankner, 1991; Kaden et al., 2009; Soba et al., 2005). Darüber hinaus gibt es Anhaltspunkte, dass APP über eine Interaktion mit Kinesin-1 am vesikulären Transport beteiligt ist (Kamal et al., 2001; Kamal et al., 2000). Mäuse, bei denen beide Allele für APP eliminiert sind, sind lebensfähig und zeigen keinen auffälligen Phänotyp (Zheng et al., 1995; Li et al., 1996; von Koch et al., 1997; Heber et al., 2000), während Mäuse, bei denen das APP sowie beide APLPs inaktiviert sind, eine sehr frühe Letalität zeigen (Herms et al., 2004). Damit scheinen die Mitglieder der APP-Familie partiell redundant und für das postnatale Überleben essentiell zu sein.

### 1.2.2 Proteolytische Prozessierung von APP und die Entstehung von A $\beta$ -Peptiden

APP spielt in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit eine zentrale Rolle, da im sogenannten amyloiden Weg der APP-Prozessierung das A $\beta$ -Peptid freigesetzt wird (Abb. 2). Zuerst schneidet die membrangebundene  $\beta$ -Sekretase (» $\beta$ -site APP-cleaving enzyme«, BACE) in der APP-Ektodomäne und entlässt dabei das lösliche Fragment sAPP $\beta$  (»soluble« APP- $\beta$ ), während das 99-Aminosäuren große C-terminale Fragment (» $\beta$ -C-terminal fragment«,  $\beta$ -CTF oder C99) in der Membran verbleibt (Vassar et al., 1999). Dieser Vorgang wird auch als »ectodomain shedding« bezeichnet. Das  $\beta$ -CTF dient anschließend als Substrat der  $\gamma$ -Sekretase, die nun innerhalb der TMS schneidet, wodurch eine intrazelluläre Domäne (»APP intracellular C-terminal domain«, AICD) und A $\beta$ -Peptide mit unterschiedlicher Länge freigesetzt werden. Vornehmlich werden hierbei A $\beta$ -Peptide mit 40 und 42 Aminosäuren Länge (A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42) gebildet.

Im nicht-amyloiden Weg wird APP hingegen zuerst durch die  $\alpha$ -Sekretase geschnitten, was zur Freisetzung des löslichen sAPP $\alpha$  (»soluble« APP- $\alpha$ ) sowie dem membranständigen  $\alpha$ -CTF mit 83 Aminosäuren (» $\alpha$ -C-terminal fragment«,  $\alpha$ -CTF oder C83) führt (Esch et al., 1990). Die  $\alpha$ -Sekretase spaltet dabei innerhalb der A $\beta$ -Sequenz zwischen den Aminosäure-Resten K16 und L17 und verhindert so die Bildung von A $\beta$ -Peptiden. Das  $\alpha$ -CTF wird ebenfalls durch die  $\gamma$ -Sekretase gespalten. Da der Schnitt der  $\alpha$ -Sekretase innerhalb der A $\beta$ -Sequenz erfolgt, wird ein kürzeres, etwa 3 kDa großes Peptid (p3) generiert (Haass et al., 1993). Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase konkurrieren um das Substrat APP. Unter physiologischen Bedingungen werden etwa 90% des gesamten APP durch die  $\alpha$ -Sekretase prozessiert, was vermutlich über die intrazelluläre Lokalisation von APP und der Sekretasen gesteuert wird.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der APP-Prozessierung.** Die amyloidogene Prozessierung beginnt mit der  $\beta$ -Sekretase, welche in der APP-Ektodomäne spaltet und dabei das lösliche Fragment ( $sAPP\beta$ ) und das membranständige C-terminale Fragment ( $\beta$ -CTF) entstehen lässt. Das  $\beta$ -CTF wird dann von der  $\gamma$ -Sekretase geschnitten, woraufhin  $A\beta$  (rot) sowie AICD aus der Membran entlassen werden. Die nicht-amyloidogene Prozessierung beginnt mit dem Schnitt der  $\alpha$ -Sekretase. Hierbei entstehen lösliches  $sAPP\alpha$  und das  $\alpha$ -CTF. Das  $\alpha$ -CTF verbleibt in der Membran und ist nun ebenfalls Substrat der  $\gamma$ -Sekretase. Durch den Schnitt der  $\gamma$ -Sekretase entstehen das Peptid p3 (blau) sowie AICD.  $sAPP$ : »soluble« APP, AICD: »APP intracellular C-terminal domain«.

Die  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität geht von mehreren Typ-I-Transmembranproteinen der sogenannten Disintegrin- und Metalloproteinase- (»a disintegrin and metalloprotease«, ADAM) Familie aus, die an der Zelloberfläche aktiv sind (Abdul-Hay et al., 2009; Asai et al., 2003). Neben ADAM17 (»tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme«, TACE) besitzen auch die Familienmitglieder ADAM10 und ADAM9  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität (Buxbaum et al., 1998; Koike et al., 1999; Lammich et al., 1999), wobei diese in neuronalen Zellen größtenteils auf ADAM10 zurückzuführen ist (Kuhn et al., 2010). Die Spaltung durch die  $\alpha$ -Sekretase wird vermutlich unabhängig von einer Konsensussequenz katalysiert und erfolgt in einer Distanz von 12 bis 13 Aminosäuren zur Membran. Wichtige Voraussetzung für die Erkennung der Schnittstelle scheint eine  $\alpha$ -helikale Konformation des Substrates im Bereich der Spaltstelle zu sein (Sisodia, 1992). Die Substratspezifität der  $\alpha$ -Sekretasen ist relativ gering. So sind verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle Substrate der ADAMs (Seals und Courtneidge, 2003).

Die  $\beta$ -Sekretase-Aktivität wird bei der APP-Prozessierung hauptsächlich durch BACE1 vermittelt, ein Typ-I-Transmembranprotein, dessen aktives Zentrum sich in der Ektodomäne befindet und aus zwei Aspartat-Resten besteht (Lin et al., 2000; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999; Hussain et al., 1999). BACE1 wird besonders stark im Gehirn exprimiert, während das homologe BACE2 vor allem im peripheren Gewebe zu finden ist (Bennett et al., 2000; Lin et al., 2000; Vassar et al., 1999). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass BACE1 als Dimer vorliegt und in

der Plasmamembran mit so genannten »lipid rafts« assoziiert ist (Cordy et al., 2003; Eehalt et al., 2003; Marlow et al., 2003; Schmechel et al., 2003; Tun et al., 2002; Westmeyer et al., 2004). BACE1 besitzt eine optimale Aktivität bei pH 4,5 und ist demnach in sauren Zellkompartimenten, wie dem Golgi-Apparat, dem trans-Golgi Netzwerk und den Endosomen, lokalisiert (Vassar et al., 1999). Von BACE1 sind gegenwärtig drei alternative Spaltstellen im APP bekannt. Zum einen die klassische  $\beta$ -Schnittstelle an Position D1 in der A $\beta$ -Sequenz, zum anderen an Position E11, die eine kürzere A $\beta$ -Form entstehen lässt. Des Weiteren wurde ein BACE1-Schnitt zwischen L34 und M35 identifiziert, der allerdings erst nach dem  $\gamma$ -Sekretase-Schnitt im A $\beta$ -Peptid erfolgt (Fluhrer et al., 2003). Neben APP konnte eine Reihe weiterer Substrate identifiziert werden, darunter die APP-Homologen APLP1 und APLP2, die Sialyltransferase ST6Gal-I, der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 und die  $\beta$ -Untereinheit spannungsgesteuerter Natriumkanäle (Kitazume et al., 2001; Li und Sudhof, 2004; Lichtenthaler et al., 2003; Wong et al., 2005). BACE1 ist außerdem für die Prozessierung des neuronalen Signalmoleküls Neuregulin-1 verantwortlich und demzufolge für die regulierte Myelinisierung im peripheren Nervensystems essentiell (Hu et al., 2006; Willem et al., 2006).

Die Prozessierungsprodukte von APP spielen ebenfalls eine physiologische Rolle. So kann AICD vermutlich im Komplex mit dem Adapterprotein Fe65 und der Histon-Acetyltransferase Tip60 in den Zellkern translozieren und dort transkriptionell aktiv werden (Cao und Sudhof, 2001; Cao und Sudhof, 2004). Dem bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung gebildeten sAPP $\alpha$  werden neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften zugesprochen, da es positiv auf das Neuriten- und Axonenwachstum wirkt (Mattson et al., 1993; Perez et al., 1997; Ring et al., 2007). Überdies sollen die löslichen APP-Fragmente, und insbesondere das sAPP $\beta$ , die neurale Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen auslösen (Freude et al., 2011).

Bemerkenswerterweise liegt eine Vielzahl der bisher bekannten FAD-Mutationen im APP-Gen in der Nähe der Schnittstellen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Sekretase. Die meisten Mutationen haben entweder eine Erhöhung der Gesamtmenge an A $\beta$ -Peptiden zur Folge oder erhöhen spezifisch die Generierung von A $\beta$ 42 (Citron et al., 1992; Selkoe, 1996). Die Doppelmutation K595N/M596L (bezogen auf APP695), die in einer schwedischen Familie mit FAD nachgewiesen wurde (APP<sub>sw</sub>), erhöht beispielsweise die Affinität der  $\beta$ -Sekretase zu ihrem Substrat, wodurch vermehrt A $\beta$  gebildet wird (Citron et al., 1992; Mullan et al., 1992).

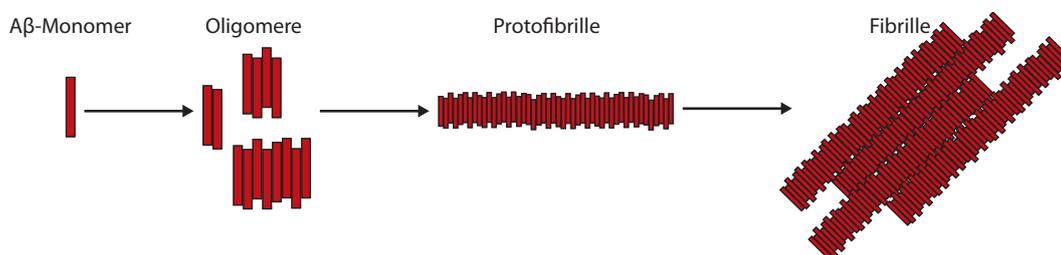
### 1.2.3 A $\beta$ -Peptide als Ursache der Alzheimer-Krankheit

Die aus der amyloidogenen APP-Prozessierung hervorgegangenen A $\beta$ -Peptide können nach Verlassen der hydrophoben Membran in den extrazellulären Raum abgegeben werden (Haass et al., 1992). Im wässrigen Milieu lagern sich die Peptide dann von einer  $\alpha$ -helikalen Struktur in eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur um (Simmons et al., 1994; Xu et al., 2005). Ebenfalls ist bekannt, dass A $\beta$ -Peptide auch intrazellulär zu finden sind (Walsh et al., 2000; Wertkin et al., 1993). Hierbei ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, ob intrazelluläres A $\beta$  dort gebildet wird oder aus dem extrazellulären Raum in die Zelle gelangt.

Obwohl A $\beta$ 42 nur ungefähr 10% der gebildeten A $\beta$ -Menge ausmacht, stellt es die Hauptkomponente der Alzheimer-typischen Plaques dar (Roher et al., 1993b; Roher et al., 1993a). Durch die

beiden zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren Isoleucin und Alanin besitzt das A $\beta$ 42 eine stark erhöhte Hydrophobizität und zeigt infolgedessen im Vergleich zu A $\beta$ 40 eine deutlich höhere Bereitschaft zur Aggregation (Jarrett et al., 1993). Es bildet zunächst lösliche Oligomere, die gemäß ihrer Größe in niedere (2–8-mere) und höhere (10–20-mere) Oligomere unterteilt werden (Hilbich et al., 1991; Walsh et al., 1997). Diese lagern sich im weiteren Verlauf über Protofibrillen zu reifen Fibrillen und schließlich zu amyloiden Plaques zusammen, welche sich extrazellulär ablagern (Abb. 3). Derzeit wird davon ausgegangen, dass weder monomere Formen des A $\beta$ -Peptids noch unlösliche fibrilläre Aggregate die Neurotoxizität bedingen. Vielmehr werden lösliche A $\beta$ -Oligomere für die synaptische Dysfunktion und das Absterben von Nervenzellen verantwortlich gemacht, während die Plaques eine Art Speicher solcher Intermediate darstellen könnten und erst im Falle eines Herauslösens reaktiver A $\beta$ -Oligomere zur Toxizität beitragen würden (Cleary et al., 2005; Klein et al., 2001; Lambert et al., 1998; Walsh et al., 2002). Obwohl bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass insbesondere die niederen Oligomere, wie Di-, Tri- und Tetramere, eine synaptotoxische Wirkung haben, ist der Mechanismus, der zum Verlust von Synapsen und Nervenzellen führt, bis heute noch nicht eindeutig geklärt (Jin et al., 2011; Klyubin et al., 2008; Shankar et al., 2007; Shankar et al., 2008).

Da eine übermäßige Produktion an A $\beta$ , insbesondere an A $\beta$ 42, den Aggregationsprozess und die damit verbundene Entstehung toxischer Oligomere initiiert, wird derzeit die selektive Reduktion von A $\beta$ 42 als vielversprechender Ansatz zur Entwicklung einer wirksamen kausalen Alzheimer-Therapie diskutiert.



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Aggregationsprozesses von A $\beta$ -Peptiden.** Monomeres A $\beta$  lagert sich rasch zu niederen und höheren Oligomeren zusammen, um daraus über Protofibrillen und Fibrillen weiter zu amyloiden Plaques zu aggregieren. Diese sind als charakteristische Ablagerungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten zu finden.

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

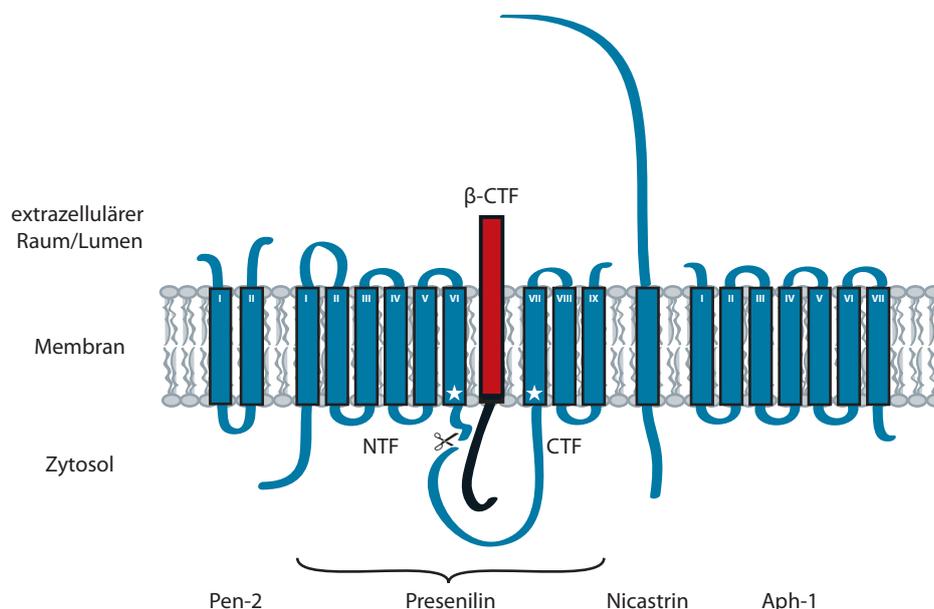
### 1.2.4.1 Charakterisierung und Aufbau des $\gamma$ -Sekretase-Komplexes

Die  $\gamma$ -Sekretase ist eine Aspartatprotease, die Transmembranproteine vom Typ I abbaut. Nachdem die APP-Ektodomäne durch die  $\beta$ -Sekretase abgespalten wurde, erkennt die  $\gamma$ -Sekretase ihr Substrat  $\beta$ -CTF und katalysiert dessen sequentielle proteolytische Spaltung (Struhl und Adachi, 2000; Takami et al., 2009). Außergewöhnlich hierbei ist, dass die Peptidbindung des membranständigen Substrats innerhalb der TMS hydrolysiert wird (»regulated intramembrane proteolysis«, RIP).

Bei der  $\gamma$ -Sekretase handelt es sich um einen Proteinkomplex bestehend aus den vier Komponenten Presenilin, Nicastrin, Aph-1 (»anterior pharynx-defective 1«) und Pen-2 (»presenilin enhancer

protein«) (Abb. 4). Das Presenilin bildet die katalytische Untereinheit (Wolfe et al., 1999), während die anderen drei Proteine notwendige und hinreichende Kofaktoren für die Assemblierung und die enzymatische Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase darstellen (Takahashi et al., 2003; Edbauer et al., 2003; Kimberly et al., 2003; Fraering et al., 2004). Im  $\gamma$ -Sekretase-Komplex treten die Komponenten wahrscheinlich in einer 1:1:1:1-Stöchiometrie auf (Sato et al., 2007), wobei entweder Presenilin 1 (PS1) oder das homologe Presenilin 2 (PS2) eingebaut wird. Die Assemblierung des Komplexes beginnt im Endoplasmatischen Retikulum mit der Zusammenlagerung von Nicastrin und Aph-1. An diesen Subkomplex lagert sich dann Presenilin an, welches nach Anlagerung von Pen-2 endoproteolytisch gespalten wird (Baulac et al., 2003; LaVoie et al., 2003).

Presenilin besteht aus insgesamt neun TMS und besitzt einen zytosolischen N-Terminus sowie eine luminal/extrazelluläre C-terminale Domäne (Henricson et al., 2005; Laudon et al., 2005; Kornilova et al., 2006; Spasic et al., 2006). Das aktive Zentrum wird durch zwei sich gegenüberliegende Aspartat-Reste gebildet. Ein Aspartat-Rest (D257 bei PS1 oder D263 bei PS2) befindet sich in TMS6, der andere (D385 bei PS1 oder D366 bei PS2) ist im hochkonservierten GxGD-Motiv in TMS7 enthalten (Wolfe et al., 1999; Steiner et al., 2000; Yamasaki et al., 2006). Das PAL-Motiv in TMS9 ist sehr wahrscheinlich an der Ausbildung der richtigen Konformation des aktiven Zentrums beteiligt und für die katalytische Aktivität ebenfalls notwendig (Wang et al., 2004; Wang et al., 2006; Tolia et al., 2008). Nach Takagi et al. ist auch TMS1 an der Bildung der katalytischen Pore beteiligt und wird sowohl für die Substraterkennung als auch für die katalytische Reaktion benötigt (Takagi et al., 2010). Für TMS4 von Presenilin wurde eine Bindung mit Pen-2 postuliert (Watanabe et al., 2005; Kim und Sisodia, 2005a). Da sich TMS1 in der Nähe von TMS8 befindet und TMS2 und TMS6 in der Nähe von TMS9 liegen, wird von einer Ringstruktur des Presenilins ausgegangen (Kornilova et al., 2006; Watanabe et al., 2010).



**Abb. 4: Aufbau der  $\gamma$ -Sekretase.** Der  $\gamma$ -Sekretase-Komplex wird aus den Komponenten Presenilin, Nicastrin, Aph-1 und Pen-2 gebildet. Im reifen Komplex liegt Presenilin als Heterodimer bestehend aus einem N-terminalen (PS-NTF) und einem C-terminalen Fragment (PS-CTF) vor. Die katalytisch aktiven Aspartate in TMS6 und TMS7 von Presenilin sind als weiße Sterne abgebildet. Die  $\beta$ -Sequenz des Substrats  $\beta$ -CTF ist rot markiert.

Presenilin katalysiert seine eigene Spaltung (Endoproteolyse) und liegt im aktiven  $\gamma$ -Sekretase-Komplex als Heterodimer vor, bestehend aus einem N-terminalen (PS-NTF) und einem C-terminalen Fragment (PS-CTF) (Thinakaran et al., 1996; Brunkan et al., 2005a; Brunkan et al., 2005b). Die Endoproteolyse erfolgt innerhalb der langen zytosolischen Schleife zwischen TMS6 und TMS7.

Nicastrin ist ein Typ-I-Transmembranprotein mit einer großen, stark glycosylierten extrazellulären Domäne und wird aktuell als Substrat-Akzeptor diskutiert, der  $\gamma$ -Sekretase-Substrate anhand ihres verkürzten N-Terminus erkennt und bindet (Shah et al., 2005; Yu et al., 2000). Aph-1 besteht aus sieben TMS, einem luminalen/extrazellulären N- und einem zyttoplasmatischen C-Terminus. Es stellt ein stabilisierendes Gerüst dar, das für die Assemblierung als auch für die Reifung des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes notwendig ist (Baulac et al., 2003; LaVoie et al., 2003). Hierbei ist ein konserviertes GxxxG-Motiv in TMS4 von zentraler Bedeutung (Lee et al., 2004; Niimura et al., 2005; Araki et al., 2006). Pen-2, ein integrales Membranprotein mit zwei TMS, ist für die Endoproteolyse von Presenilin essentiell (Takasugi et al., 2003; Luo et al., 2003; Hu und Fortini, 2003; Kim und Sisodia, 2005b). Weiterhin wurde gezeigt, dass die C-terminale Domäne von Pen-2 ein Stabilisator der entstehenden Presenilin-Fragmente (PS-NTF und PS-CTF) im reifen  $\gamma$ -Sekretase-Komplex ist (Prokop et al., 2004; Hasegawa et al., 2004).

Die Anwesenheit von Wasser im aktiven Zentrum der  $\gamma$ -Sekretase ist für die Hydrolyse eines Substrats unerlässlich (Lopez-Otin und Bond, 2008). Lazarov et al. haben mittels 3D-Rekonstruktion aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen der aufgereinigten  $\gamma$ -Sekretase zeigen können, dass sich im Inneren des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes eine 20–40 Å große wassergefüllte Pore befindet, die eine hydrolytische Spaltung in der Membrenumgebung möglich macht (Lazarov et al., 2006). Weitere Studien, in denen die Wasserzugänglichkeit der einzelnen Aminosäuren im Presenilin durch Cystein-Scanning-Mutagenese untersucht wurde, konnten dieses Modell stützen (Sato et al., 2006a; Tolia et al., 2006).

Damit eine Peptidbindung innerhalb der TMS hydrolysiert werden kann, muss das Peptidrückgrat der TMS für die Protease zugänglich gemacht werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der initiale Schnitt der  $\gamma$ -Sekretase ( $\epsilon$ -Schnitt) während der APP-Prozessierung nur dann stattfinden kann, wenn das  $\alpha$ -helikale Rückgrat der TMS im Bereich der Schnittstelle entwunden vorliegt (Sato et al., 2009).

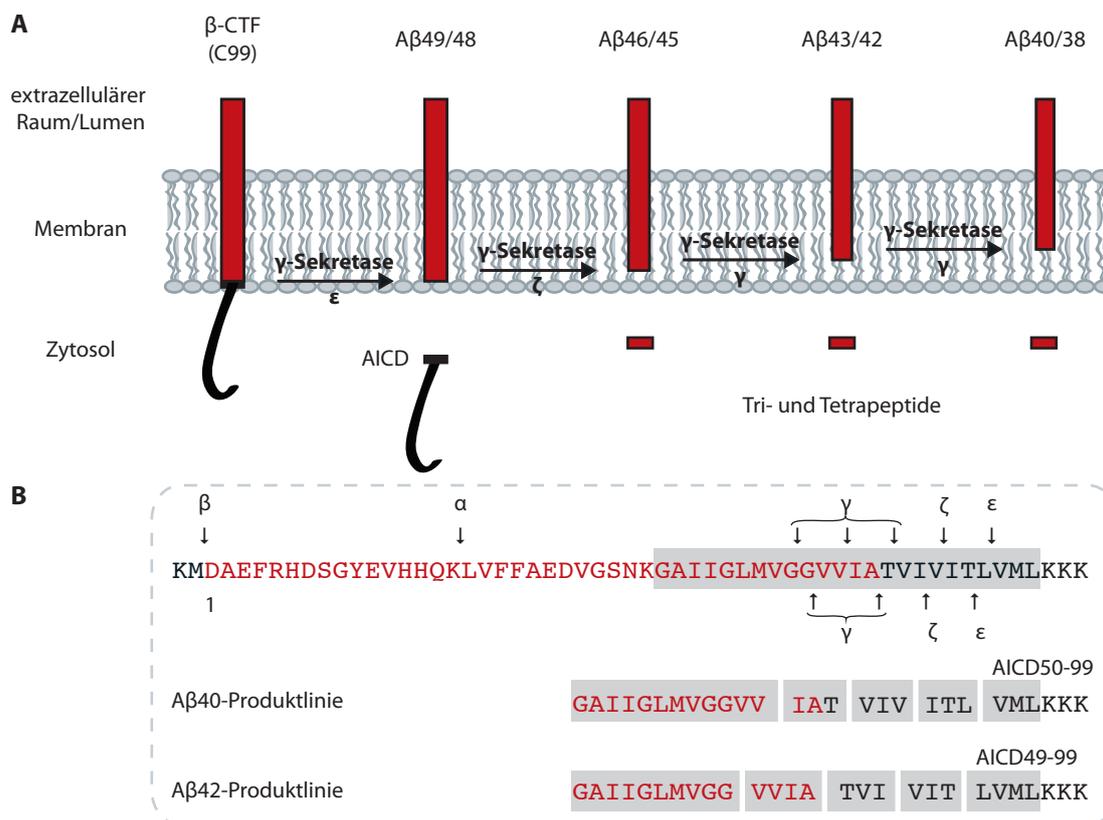
#### 1.2.4.2 Mechanismus der sequentiellen Proteolyse

Die  $\gamma$ -Sekretase prozessiert das  $\beta$ -CTF zu A $\beta$ -Peptiden unterschiedlicher Länge, was auf zahlreiche  $\gamma$ -Sekretase-Schnittstellen in der APP-TMS zurückzuführen ist (Abb. 5A). So schneidet die  $\gamma$ -Sekretase im Bereich der zyttoplasmatischen Seite der Membran bei Aminosäure-Rest L49 ( $\epsilon$ -Schnittstelle, Numerierung entsprechend der A $\beta$ -Sequenz), an der sogenannten  $\zeta$ -Schnittstelle bei Aminosäure-Rest V46 sowie mehrfach in der Membranmitte im Bereich der Aminosäure-Reste V40 und A42 ( $\gamma$ -Schnittstellen) (Weidemann et al., 2002; Zhao et al., 2005).

Heute weiß man, dass sich die Freisetzung der A $\beta$ -Peptide dabei nicht in einem Schritt vollzieht, sondern in einem sequentiellen Prozess durch mehrere aufeinanderfolgende Schnitte (Munter et al., 2007; Qi-Takahara et al., 2005; Weidemann et al., 2002; Zhao et al., 2004). Der  $\epsilon$ -Schnitt stellt dabei den initialen Schnitt der  $\gamma$ -Sekretase dar (Weidemann et al., 2002), wobei entweder A $\beta$ 49

und das AICD 50–99 oder A $\beta$ 48 und das AICD 49–99 entstehen (Kakuda et al., 2006). Ausgehend von A $\beta$ 49 bzw. A $\beta$ 48 findet nun in Richtung N-Terminus eine schrittweise Verkürzung zu kleineren A $\beta$ -Spezies statt (Qi-Takahara et al., 2005; Zhao et al., 2007). Dabei werden Fragmente bestehend aus drei bis vier Aminosäure-Resten abgeschnitten, was in etwa einer Helixwindung der APP-TMS entspricht (Takami et al., 2009).

Nach einem kürzlich aufgestellten Modell erfolgt die Prozessierung entlang zweier »Produktlinien« (Abb. 5B): Die A $\beta$ 40-Produktlinie führt von A $\beta$ 49 über A $\beta$ 46 zu A $\beta$ 43 und weiter zu A $\beta$ 40 und A $\beta$ 37. Die A $\beta$ 42-Produktlinie hingegen generiert aus A $\beta$ 48 über A $\beta$ 45 das A $\beta$ 42-Peptid, woraus wiederum A $\beta$ 39 oder A $\beta$ 38 entstehen können (Munter et al., 2007; Qi-Takahara et al., 2005; Takami et al., 2009). Auch die während dieser sequentiellen Proteolyse entstehenden Tripeptide A $\beta$ 47–49, A $\beta$ 44–46 und A $\beta$ 41–43 der A $\beta$ 40-Produktlinie und A $\beta$ 46–48, A $\beta$ 43–45 und A $\beta$ 40–42 sowie das Tetrapeptid A $\beta$ 39–42 der A $\beta$ 42-Produktlinie konnten mittlerweile mit Hilfe von MALDI-MS-Analysen nachgewiesen werden (Takami et al., 2009), was die Existenz dieser beiden Produktlinien bestätigt.



**Abb. 5: Schematische Darstellung des sequentiellen Proteolysemechanismus der  $\gamma$ -Sekretase.** (A) Das  $\beta$ -CTF wird zuerst durch den  $\epsilon$ -Schnitt der  $\gamma$ -Sekretase am C-terminalen Ende der TMS gespalten. Hierbei werden AICD und A $\beta$ -Peptide mit 49 oder 48 Aminosäuren generiert. A $\beta$ 49 und A $\beta$ 48 sind wiederum Substrate der  $\gamma$ -Sekretase und werden durch den  $\zeta$ -Schnitt um weitere drei Aminosäuren verkürzt, so dass A $\beta$ 46 bzw. A $\beta$ 45 entstehen. Der nun folgende  $\gamma$ -Schnitt verkürzt A $\beta$ 46 und A $\beta$ 45 zu A $\beta$ 43 bzw. A $\beta$ 42 und generiert daraus in einem weiteren Schritt A $\beta$ 40 bzw. A $\beta$ 38. (B) Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der APP695-Sequenz (Aminosäuren 619–651) mit den Schnittstellen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase. Die A $\beta$ 42-Sequenz ist rot markiert. Die TMS ist grau unterlegt. Aus der sequentiellen Proteolyse ergeben sich zwei unabhängige Produktlinien. Ausgehend von A $\beta$ 49 und A $\beta$ 48 werden Peptide aus drei oder vier Aminosäuren abgespalten.

### 1.2.4.3 Substrate der $\gamma$ -Sekretase

Bisher sind über 60 Typ-I-Transmembranproteine mit unterschiedlichen zellulären Funktionen als Substrate der  $\gamma$ -Sekretase bekannt (McCarthy et al., 2009). Die  $\gamma$ -Sekretase prozessiert unter anderem auch APLP1 und APLP2, CD44, die Rezeptor-Tyrosin-Kinase ErbB-4, die Notch-Rezeptoren 1–4 sowie die Notch-Liganden Delta und Jagged (De Strooper et al., 1999; Eggert et al., 2004; Ikeuchi und Sisodia, 2003; Lammich et al., 2002; LaVoie und Selkoe, 2003; Ni et al., 2001; Okochi et al., 2002; Scheinfeld et al., 2002; Six et al., 2003). Die Substrate der  $\gamma$ -Sekretase besitzen dabei keinerlei Gemeinsamkeiten in ihrer Sequenz, vielmehr scheint der Schnitt von der Topologie, der Flexibilität und der Länge des jeweiligen Substrats abhängig zu sein. So ist das »ectodomain shedding« eine entscheidende Voraussetzung für die Substraterkennung (Struhl und Adachi, 2000).

Notch wird in ganz ähnlicher Weise wie APP prozessiert. Nach Bindung eines Liganden wird Notch zunächst an der sogenannten S2-Schnittstelle durch die  $\alpha$ -Sekretase prozessiert. Dadurch wird die Ektodomäne entfernt, während das C-terminale Notch-Fragment NEXT (»Notch extracellular truncation«) in der Membran verankert bleibt (Mumm et al., 2000). Im Weiteren wird NEXT, vermittelt durch die  $\gamma$ -Sekretase, im C-terminalen Bereich der TMS (S3/ $\epsilon$ -Schnittstelle) gespalten, wobei die intrazelluläre Domäne (»Notch intracellular C-terminal domain«, NICD) und ein A $\beta$ -ähnliches Fragment (N $\beta$ ) freigesetzt werden. In Analogie zur APP-Prozessierung schneidet die  $\gamma$ -Sekretase auch hier mehrfach nacheinander und es entstehen verschieden lange N $\beta$ -Peptide (Chandu et al., 2006; Okochi et al., 2006; Okochi et al., 2002). Auch für CD44, APLP1 und APLP2 konnten mehrere A $\beta$ -ähnliche Peptide nachgewiesen werden (Hoggl et al., 2011; Lammich et al., 2002; Yanagida et al., 2009), was vermuten lässt, dass diese und die meisten anderen  $\gamma$ -Sekretase-Substrate sequentiell prozessiert werden.

Viele Substrate sind in der Lage, über die  $\gamma$ -Sekretase-abhängige Freisetzung der intrazellulären Domäne auf die Genexpression Einfluss zu nehmen (Fortini, 2002). Die Prozessierung von Notch beispielsweise spielt während der embryonalen Entwicklung eine bedeutende Rolle. Das dabei entstehende NICD wird in den Zellkern transportiert, um dort über die Bindung an Transkriptionsfaktoren die Transkription von Zielgenen zu steuern, die bei der Zelldifferenzierung mitwirken (Mumm und Kopan, 2000). Die zelluläre Bedeutung der  $\gamma$ -Sekretase wird durch den Phänotyp von solchen Mäusen deutlich, denen das PSEN1-Gen fehlt. Diese Mäuse weisen schwere Defekte in der Skelett- und Gehirnentwicklung auf und sterben bereits kurz nach ihrer Geburt (Shen et al., 1997). Auch die Haut und das Immunsystem scheinen durch den Ausfall von Presenilin-Funktionen und die damit verbundene fehlende Notch-Signaltransduktion betroffen zu sein (Beglopoulos et al., 2004; Soriano et al., 2001; Tournoy et al., 2004; Xia et al., 2001).

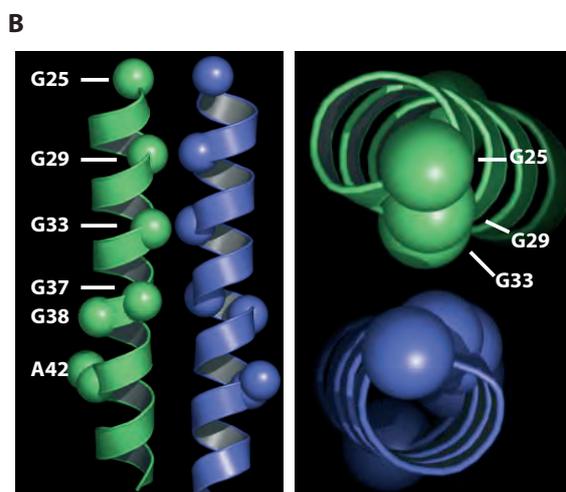
### 1.2.5 Einfluss des GxxxG-Motivs auf die Produktion und Aggregation von A $\beta$ -Peptiden

Kürzlich konnte das zentrale GxxxG-Motiv (G29xxxG33, nach der A $\beta$ -Numerierung) in der APP-TMS als wichtige Dimerisierungsstelle identifiziert werden (Abb. 6), welche nach Abspaltung der APP-Ektodomäne ausschlaggebend für die Dimerisierung des membranständigen  $\beta$ -CTF ist und einen bedeutenden Einfluss auf die Bildung von A $\beta$ -Peptiden hat (Munter et al., 2007). Die GxxxG-vermittelte Dimerisierung führt aufgrund einer sterischen Hinderung im  $\beta$ -CTF zum vorzeitigen Abbruch der sequentiellen Proteolyse durch die  $\gamma$ -Sekretase und zur Bildung von A $\beta$ 40

und A $\beta$ 42. Wird die Dimerisierungsstärke durch einen Aminosäure-Austausch im GxxxG-Motiv gezielt herabgesetzt, so kann die  $\gamma$ -Sekretase weiter voranschreiten und es entstehen überwiegend kürzere, nicht toxische A $\beta$ -Peptide (Munter et al., 2007). Diese Erkenntnisse stellten eine Erweiterung des von Qi-Takahara et al. vorgeschlagenen Produktlinien-Modells dar.

Das GxxxG-Motiv ist ein klassisches Dimerisierungs-Motiv. In einer  $\alpha$ -helikalen Konformation der TMS liegen die Glycin-Reste im Abstand von vier Resten auf der gleichen Seite einer Helix und bilden aufgrund fehlender Seitenketten eine flache Helix-Oberfläche (Senes et al., 2004). Infolge dieser strukturellen Besonderheit können zwei benachbarte Helices in sehr engen Kontakt treten, so dass an der Kontaktfläche ausgedehnte van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brücken-Bindungen ausgebildet werden können (Senes et al., 2004). Auch die Ausbildung interhelikaler Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen den C $\alpha$ -Wasserstoff-Atomen der Glycine und den Carbonyl-Sauerstoffatomen der Rückgrate (C $\alpha$ -H...O) werden begünstigt (Senes et al., 2001). Auf diese Weise entsteht ein rechtshändiges Helix-Helix-Paar, was sich unter einem negativen Winkel kreuzt ( $\Omega < 0$ ).

Nach statistischen Analysen ist das GxxxG-Motiv das am stärksten überrepräsentierte Paar von Aminosäure-Resten in TMS, was auf eine weitverbreitete Funktion dieses Dimerisierungs-Motivs hindeutet (Arkin und Brunger, 1998; Senes et al., 2000). Interessanterweise dimerisieren z.B. auch die  $\gamma$ -Sekretase-Substrate Notch, Syndecan-3, E-cadherin, ErbB4 und über ihre TMS (Asundi und Carey, 1995; Huber et al., 1999; Mendrola et al., 2002; Vooijs et al., 2004). Über 25% der  $\gamma$ -Sekretase-Substrate besitzen ein GxxxG-Motiv (Beel und Sanders, 2008). Dem Einfluss der Dimerisierungsstärke auf die  $\gamma$ -Sekretase-abhängige Prozessierung wurde bisher allerdings nur wenig Beachtung geschenkt. Möglicherweise ist dieser aber auch nicht für alle dimerisierenden  $\gamma$ -Sekretase-Substrate von Bedeutung.



**Abb. 6: Das GxxxG-Motiv in der APP-TMS.** (A) Dargestellt ist ein Ausschnitt aus der APP695-Sequenz (Aminosäuren 595–652). Die Glycine der drei konsekutiven GxxxG-Motive sind rot markiert und entsprechend der A $\beta$ -Sequenz nummeriert. Die TMS ist grau unterlegt. (B) Struktur-Modell der dimeren APP-TMS mit Sichtweise entlang der Dimer-Kontaktfläche (links) und entlang der Dimer-Achse (rechts). Die Glycin-Reste des GxxxG-Motivs sowie der Alanin-Rest an Position 42 sind als Kugeln hervorgehoben. Aus Munter et al. (2007) entnommen und modifiziert.

Das GxxxG-Motiv spielt auch in  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen eine wichtige Rolle. Sobald sich die  $\alpha$ -helikale TMS in wässriger Umgebung befindet, forcieren die GxxxG-Motive die Bildung von  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen und erhöhen deren Stabilität (Liu et al., 2005). Im A $\beta$ -Peptid löst vor allem das zentrale GxxxG-Motiv eine Verdichtung der einzelnen  $\beta$ -Faltblätter zu Amyloid-Fibrillen aus und erhöht damit deren Aggregation (Xu et al., 2005). Unlängst haben Sato et al. mittels kurzer Inhibitor-Peptide, die direkt an das GxxxG-Motiv im A $\beta$  binden, die Aggregation effektiv verhindern können (Sato et al., 2006b). Ein gezielter Aminosäure-Austausch im GxxxG-Motiv konnte des Weiteren zeigen, dass das Glycin an Position 33 die Bildung besonders toxischer Oligomere fördert, während eine Substitution zu Alanin oder Isoleucin die Toxizität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* deutlich reduziert. Damit ist das GxxxG-Motiv für das pathologische Verhalten des A $\beta$ 42-Peptids essentiell (Harmer et al., 2009).

### 1.3 Therapie der Alzheimer-Krankheit

#### 1.3.1 Etablierte Therapieformen

Obwohl Dank intensiver Forschung mittlerweile sehr viel über die molekularen Ursachen der Alzheimer-Krankheit aufgeklärt werden konnte, ist eine Heilung bis heute nicht möglich. Um jedoch die geistige Leistungsfähigkeit und die Alltagsbewältigung der Betroffenen möglichst lange aufrechtzuerhalten, werden Wirkstoffe zur symptomatischen Therapie verabreicht.

Abgeleitet von der Annahme eines Acetylcholinmangels in bestimmten Hirnregionen von Alzheimer-Patienten zielt die Gabe von Acetylcholin-Esterase-Inhibitoren darauf ab, den Neurotransmitter Acetylcholin, der den Reiz eines Nervenimpulses durch den synaptischen Spalt auf das Folgeneuron überträgt, nicht sofort durch die Acetylcholin-Esterase abbauen zu lassen. Durch die erhöhte Acetylcholin-Konzentration im synaptischen Spalt soll eine längere Stimulation des Folgeneurons erreicht und auf diese Weise dem Verlust von cholinergen Neuronen entgegengewirkt werden. Zugelassene Arzneimittel dieser Klasse sind Donepezil, Rivastagmin und Galantamin (Raskind et al., 2000; Rogers und Friedhoff, 1996; Rosler et al., 1999). Für diese Behandlungsmethode konnte eine Verbesserung der Symptome bei Alzheimer-Patienten mit leichtgradiger bis mittelschwerer Demenz erreicht werden (Ibach und Haen, 2004). Das Voranschreiten der Krankheit konnte jedoch nicht hinausgezögert werden.

Der nicht-kompetitive Glutamat-Antagonist Memantin wird zur Regulierung des durch A $\beta$  gestörten glutamatergen Neurotransmittersystems eingesetzt und soll die dauerhafte Aktivierung des N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) Rezeptors unterdrücken (Reisberg et al., 2003). Memantin blockiert dadurch die schädliche Wirkung von Glutamat, die zum Funktionsverlust und schließlich zum Absterben von Nervenzellen führt. Seit 2002 ist Memantin in Deutschland für die Behandlung der Alzheimer-Krankheit mit mittelschwerer bis schwerer Demenz zugelassen. Jedoch wurde bald erkannt, dass die Behandlung mit diesem Arzneimittel nur eine geringfügige Verbesserung der Alltagsfähigkeiten und der kognitiven Leistungsfähigkeit erreichen kann (McShane und Schneider, 2005).

### 1.3.2 Neue Therapieansätze

#### 1.3.2.1 Vakzinierung

Ein moderner Therapieansatz beinhaltet die aktive Immunisierung mit präaggregierten A $\beta$ -Peptiden, welche im APP-transgenen Tiermodell zu verminderten A $\beta$ -Ablagerungen führte (Schenk et al., 1999). Auch eine Verbesserung von Lerndefiziten konnte bei diesen Mäusen durch die aktive Immunisierung erzielt werden (Morgan et al., 2000). Jedoch zeigten sich bei diesem therapeutischen Ansatz bei 18 von 300 Alzheimer-Patienten inflammatorische Reaktionen in Form einer schweren Hirnhautentzündung als Nebenwirkung (Nicoll et al., 2003). Die klinische Studie musste 2002 abgebrochen werden.

Eine Modifikation dieser Methode stellt die passive Immunisierung mit monoklonalen anti-A $\beta$ -Antikörpern dar, die ebenfalls hoffnungsvolle Ergebnisse in Tiermodellen zeigte (Bard et al., 2000; DeMattos et al., 2001). Der vielversprechende Antikörper Bapineuzumab (Wyeth und Elan) erreichte Ende 2007 sogar die Phase III der klinischen Studien. Jedoch wurde kürzlich bekannt, dass als negative Konsequenz einer passiven Immunisierung toxische A $\beta$ 42-Oligomere aus den Plaques herausgelöst werden können, was zur Umverteilung von Plaque-gebundenem A $\beta$  in die Hirngefäße führen kann. Damit verbunden erhöhte sich auch das zerebrale Blutungsrisiko in transgenen Tiermodellen (Racke et al., 2005; Wilcock et al., 2004).

#### 1.3.2.2 Sekretase-Stimulation/-Inhibition

Als potentielle Therapiemöglichkeit werden die Inhibition oder Stimulation der APP-prozessierenden Enzyme diskutiert. Eine Stimulation der  $\alpha$ -Sekretase führt durch die damit einhergehende Reduktion der  $\beta$ -Sekretase-Prozessierung zu einer verminderten A $\beta$ -Produktion. Gleichzeitig entsteht vermehrt sAPP $\alpha$ , das protektiv auf Nervenzellen wirkt. Da die  $\alpha$ -Sekretase jedoch ein großes Substratspektrum besitzt und unter anderem über die Prozessierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verschiedene Stoffwechselwege aktiviert, ist die Gabe von Stimulatoren der  $\alpha$ -Sekretase mit Risiken behaftet.

Eine Inhibition der amyloidogenen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase hat eine Reduktion aller A $\beta$ -Formen zur Folge, wodurch die Akkumulation und Aggregation von A $\beta$ -Peptiden verhindert werden könnte. Die Beobachtung, dass in BACE1- $\rightarrow$ Knockout-Mäusen keine A $\beta$ -Produktion mehr nachzuweisen war und die Tiere zugleich phänotypisch unauffällig waren, führte zur Entwicklung effizienter  $\beta$ -Sekretase-Inhibitoren (Cai et al., 2001; Ghosh et al., 2001; Ghosh et al., 2008; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001; Sinha und Lieberburg, 1999). Aber auch die  $\beta$ -Sekretase erfüllt in anderen Stoffwechselwegen des Körpers wichtige Funktionen, so dass im Fall einer medikamentösen Hemmung der  $\beta$ -Sekretase beispielsweise die Prozessierung von Neuregulin-1 und die damit verbundene Myelinisierung im peripheren Nervensystems mitbeeinflusst werden würde (Willem et al., 2006).  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren zielen darauf ab, die enzymatische Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase vollständig zu unterbinden. Es wurden bereits einige Moleküle entwickelt, die mit sehr hoher Wirksamkeit die Bildung von A $\beta$ -Peptiden vermindern (Wolfe, 2002; Wolfe, 2008). Die Substanz LY-450,139 (auch Semagacestat, Eli Lilly) befindet sich gerade in Phase III der klinischen Prüfung und ist damit der am weitesten in der klinischen Entwicklung vorgeschrittene  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor. Für diesen Inhibitor konnte im Blutplasma von Alzheimer-Patienten eine 50%ige

Reduktion der A $\beta$ -Menge nachgewiesen werden, wohingegen im Liquor keine Veränderung der A $\beta$ -Mengen feststellbar war (Siemers et al., 2005; Siemers et al., 2006). Zudem wurden vor allem gastrointestinale Nebenwirkungen sowie Störungen im blutbildenden System beobachtet, die wohl auf Einschränkungen im Notch-Signaltransduktionsweg zurückzuführen sind.

Die Firma Wyeth befindet sich mit GSI136 und GSI953, zwei weiteren Inhibitoren der  $\gamma$ -Sekretase, in Phase-I-Studien. Vielversprechend erscheint auch der Wirkstoff BMS-708163 (Bristol-Myers Squibb, aktuell in Phase-II-Studien), der die Prozessierung von Notch erst bei 190-fach höherer Konzentration nennenswert beeinflusst, aber bereits eine signifikante dosisabhängige Abnahme von A $\beta$  im Liquor freiwilliger Probanden zeigte (Gillman, 2010). Die Entwicklung hochpotenter und selektiver  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren, die eine ausreichende Verminderung der A $\beta$ -Peptide erzielen, ohne dabei kritische Nebenwirkungen zu verursachen, erscheint trotz der Vielzahl verschiedener  $\gamma$ -Sekretase-Substrate möglich.

### 1.3.2.3 Modulation der A $\beta$ -Produktion

Aufgrund des erheblichen Nebenwirkungspotentials von  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren, wird heute zunehmend an Substanzen geforscht, welche die enzymatische Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase nicht inhibieren, sondern die modulierend auf den Proteolysemechanismus der  $\gamma$ -Sekretase wirken ( $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren, GSMs). Ein solch modulierender Effekt konnte erstmals 2001 für die Substanzen Ibuprofen, Sulindac Sulfid und Indomethacin nachgewiesen werden (Weggen et al., 2001). Diese gehören zur Gruppe der nicht-steroidalen Antiphlogistika (»non-steroidal antiinflammatory drugs«, NSAIDs), die primär dafür bekannt sind, über die Blockade des Enzyms Cyclooxygenase (COX) die Synthese von Entzündungsmediatoren zu hemmen. Epidemiologische Studien gaben Hinweise darauf, dass die Langzeiteinnahme von NSAIDs mit einem deutlich verminderten Alzheimer-Risiko einhergeht, und haben die Aufmerksamkeit der Wissenschaftler auf dem Gebiet der Alzheimer-Forschung auf diese Substanzen gelenkt (in 't Veld et al., 1998; McGeer et al., 1990). In den letzten Jahren konnte sowohl in Zellkulturexperimenten als auch in Tierversuchen mehrfach gezeigt werden, dass NSAIDs in der Lage sind, die Bildung des neurotoxischen A $\beta$ 42 zugunsten des kürzeren A $\beta$ 38 zu senken, ohne dabei die Gesamtmenge an A $\beta$ -Peptiden zu beeinflussen (Eriksen et al., 2003; Kukar et al., 2005; Weggen et al., 2001). Da nicht alle NSAIDs diese Fähigkeit besitzen und auch bei einigen COX-inaktiven Derivaten eine A $\beta$ -Modulation festgestellt werden konnte, ist ein Zusammenhang mit der COX-hemmenden Wirkung der Substanzen auszuschließen (Eriksen et al., 2003; Weggen et al., 2001). So zeigte beispielsweise das COX-inaktive R-Flurbiprofen (auch Tarenflurbil) eine seinem S-Enantiomer vergleichbare Senkung der A $\beta$ 42-Menge (Eriksen et al., 2003). Bemerkenswerterweise beeinflussen GSMs innerhalb bestimmter Dosisbereiche weder die Prozessierung von Notch noch die Spaltung anderer  $\gamma$ -Sekretase-Substrate, wodurch viele unerwünschte Nebenwirkungen vermieden werden können (Weggen et al., 2001; Weggen et al., 2003a). Erstaunlich war auch die Beobachtung, dass einige NSAIDs, wie Celecoxib und Fenofibrat, eine den GSMs entgegengesetzte Wirkung zeigten und die Bildung von A $\beta$ 42 auf Kosten kürzerer A $\beta$ -Formen begünstigten (Kukar et al., 2005). Diese Substanzen werden als inverse GSMs (iGSMs) bezeichnet.

Da die  $\gamma$ -Sekretase-Modulation auch in zellfreien  $\gamma$ -Sekretase-Testsystemen beobachtet wurde, wird u.a. eine direkte Beeinflussung des Enzyms durch eine allosterische Bindung von GSMs an

den Enzym-Komplex vermutet (Beher et al., 2004; Takahashi et al., 2003; Weggen et al., 2003a; Weggen et al., 2003b). Des Weiteren konnte mit Hilfe der FLIM/FRET-Technik (»fluorescence lifetime imaging microscopy/fluorescence resonance energy transfer«) beobachtet werden, dass Ibuprofen eine Konformationsänderung des Enzym-Komplexes induziert. Daraus wurde geschlossen, dass GSMs die Orientierung des Substrats zum katalytischen Zentrum des Enzyms verändern und auf diese Weise das Spaltungsverhalten hin zu kürzeren A $\beta$ -Formen fördern können (Lleo et al., 2004). Allerdings wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie mit photoaktivierbaren GSMs und iGSMs keine Bindung an Komponenten des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes festgestellt, sondern eine spezifische Bindung an das Substrat  $\beta$ -CTF gefunden (Kukar et al., 2008). Zudem wurde postuliert, dass insbesondere die Aminosäuren 28–36 (nach der A $\beta$ -Numerierung) in der APP-TMS für die Interaktion von wesentlicher Bedeutung zu sein scheinen (Kukar et al., 2008). In der gleichen Studie konnte auch gezeigt werden, dass sowohl A $\beta$ 42-reduzierende als auch A $\beta$ 42-steigernde Substanzen hemmend auf die Aggregation von A $\beta$ -Peptiden wirken (Kukar et al., 2008). Der genaue Wirkmechanismus der GSMs und iGSMs wurde bisher noch nicht vollständig aufgeklärt.

Einige vielversprechende Substanzen werden bereits in klinischen Studien getestet. Die Einnahme von R-Flurbiprofen (Flurizan, Myriad) konnte bei Alzheimer-Patienten mit leichtgradiger Demenz den Verfall der geistigen Leistungen verlangsamen. Außerdem konnten diese Patienten viele Alltagsaktivitäten deutlich länger verrichten (Wilcock et al., 2008). Da allerdings im Laufe der Phase-III-Studien keine signifikante Verbesserung der kognitiven Leistungen und keine relevante A $\beta$ 42-Reduktion im Liquor bestätigt werden konnte, wurde die klinische Entwicklung von R-Flurbiprofen eingestellt (Green et al., 2009). Derzeit werden jedoch verschiedene Bemühungen zur Verstärkung der A $\beta$ -modulierenden Wirkung, zur Erhöhung der Hirngängigkeit und zur Verbesserung des Nebenwirkungsprofils unternommen. Kürzlich wurde beispielsweise das NSAID-ähnliche GSM-1 (Merck) veröffentlicht (Page et al., 2008), welches im Gehirn von transgenen Mäusen sehr wirkungsvoll eine Reduktion der A $\beta$ 42-Menge zeigte und von dem möglicherweise ein potenter Wirkstoff zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit abgeleitet werden kann.

#### 1.4 Zielsetzung

Das A $\beta$ 42-Peptid aggregiert zu neurotoxischen Oligomeren und ist ursächlich für den Verlust von Synapsen und Nervenzellen sowie für die klinische Symptomatik der Alzheimer-Krankheit. Die Reduktion der A $\beta$ 42-Bildung ist als therapeutisches Ziel Gegenstand intensiver Forschung. Jedoch gestaltet sich sowohl die Inhibition der  $\beta$ - als auch der  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung aufgrund des großen Substratspektrums dieser Enzyme sehr schwierig.

In zahlreichen Publikationen der letzten Jahre offenbarte sich, dass niedermolekulare Substanzen das sequentielle Voranschreiten der  $\gamma$ -Sekretase während der APP-Prozessierung forcieren können und dadurch überwiegend kürzere A $\beta$ -Peptide auf Kosten des toxischen A $\beta$ 42-Peptids entstehen lassen. Der genaue Wirkmechanismus dieser GSMs ist bisher jedoch nicht bekannt. Interessanterweise konnte dieser A $\beta$ -modulierende Effekt auch für Mutanten des GxxxG-Motivs in der APP-TMS beobachtet werden, die darüber hinaus in der Lage sind, das Ausmaß der TMS-vermittelten Dimerisierung herabzusetzen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die APP-TMS als molekulares Target von klassischen GSMs und iGSMs zu untersuchen. Es sollte zudem festgestellt werden, welche Rolle die GxxxG-Motive für diese Interaktion spielen. Des Weiteren sollte analysiert werden, inwiefern sich die Dimerisierung der APP-TMS durch solche Substanzen modulieren lässt und ob sich ein möglicher Effekt als spezifisch für diese Sequenz herausstellt.

Neben klassischen GSMs und iGSM sollten auch neuartige A $\beta$ -modulierende Substanzen hinsichtlich ihrer Bindung und ihres Einflusses auf die Dimerisierung der APP-TMS analysiert werden, um Rückschlüsse auf die Struktur-Wirkungs-Beziehung dieser Substanzen ziehen zu können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss wirksamer GxxxG-Motiv-bindender GSMs auf die Oligomerisierung und Fibrillenbildung von A $\beta$ 42 zu untersuchen.

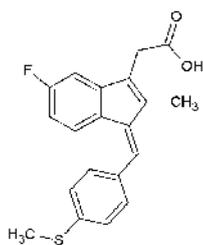
## 2. Ergebnisse

### 2.1 Darstellung der untersuchten Substanzen

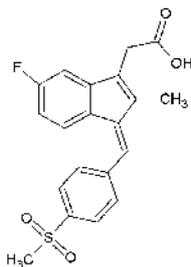
$\gamma$ -Sekretase-Modulatoren (GSMs) sind in der Lage, die A $\beta$ -Produktion dahingehend zu verändern, dass gleichzeitig die A $\beta$ 42-Menge vermindert und A $\beta$ 38-Menge erhöht wird. In dieser Arbeit wurde der Wirkmechanismus wichtiger Vertreter der GSMs näher untersucht.

Sulindac Sulfid (Abb. 7A) gehört in der Gruppe der NSAIDs zu den Indenessäigsäure-Derivaten und weist für die A $\beta$ 42-reduzierende Wirkung einen EC<sub>50</sub>-Wert von 25–50  $\mu$ M auf (Czirr und Weggen, 2006). Die beiden Derivate Sulindac Sulfon (Abb. 7B) und Sulindac (Abb. 7C), die sich vom Sulfid lediglich im Oxidationszustand des Schwefelatoms unterscheiden, haben hingegen keinen modulierenden Einfluss auf die A $\beta$ -Produktion und dienen als Kontrollen. Zudem wurde das NSAID Indomethacin (Abb. 7D) untersucht, welches strukturell und pharmakologisch sehr eng mit dem Sulindac Sulfid verwandt ist und eine vergleichbare A $\beta$ -modulatorische Wirkung zeigt (Czirr und Weggen, 2006).

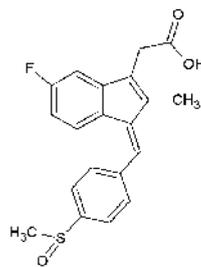
**A** Sulindac Sulfid



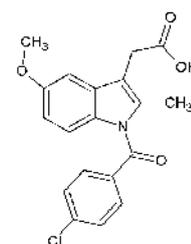
**B** Sulindac Sulfon



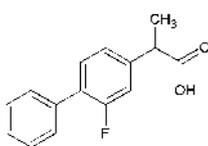
**C** Sulindac



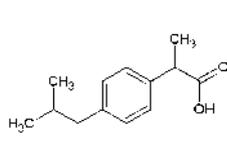
**D** Indomethacin



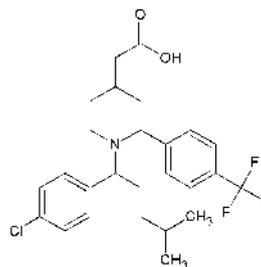
**E** Flurbiprofen



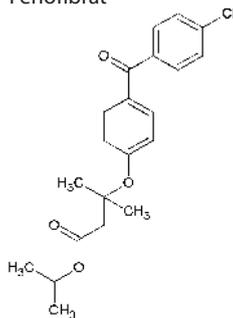
**F** Ibuprofen



**G** GSM-1



**H** Fenofibrat



**I** Celecoxib

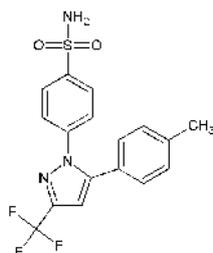


Abb. 7: Chemische Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen.

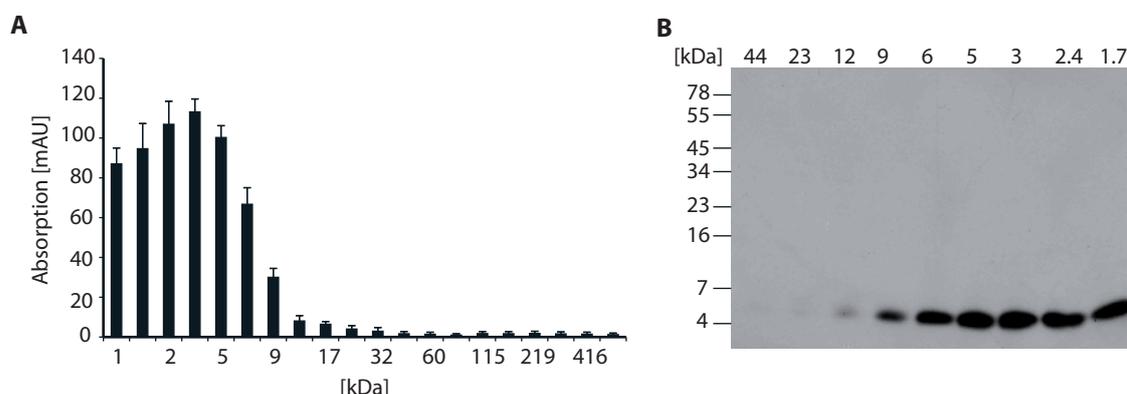
Flurbiprofen (Abb. 7E) und Ibuprofen (Abb. 7F) sind ebenfalls Vertreter aus der Gruppe der NSAIDs, die für ihre Wirkung als GSMs bekannt sind. Diese Arylpropionsäure-Derivate unterscheiden sich in ihrer Struktur wesentlich von Sulindac Sulfid und Indomethacin und zeigen nur eine mäßige Modulation der A $\beta$ -Produktion (Flurbiprofen: EC<sub>50</sub><sub>A $\beta$ 42</sub> = 150–200  $\mu$ M, Ibuprofen: EC<sub>50</sub><sub>A $\beta$ 42</sub> = 250  $\mu$ M). Neben den klassischen GSMs existiert eine Reihe von Substanzen, die bereits in nanomolaren Konzentrationen wirksam sind. In dieser Arbeit wurde das hochwirksame NSAID-ähnliche Phenylpiperidin-Derivat GSM-1 untersucht (EC<sub>50</sub><sub>A $\beta$ 42</sub> = 180 nM).

Zudem kamen im Folgenden auch Fenofibrat (Abb. 7H) und Celecoxib (Abb. 7I) als wichtige Vertreter der sogenannten inversen GSMs (iGSMs) zum Einsatz, die eine den GSMs entgegengesetzte Wirkung zeigen. Während Celecoxib sehr effektiv die A $\beta$ 42-Produktion zu steigern vermag (EC<sub>50</sub><sub>A $\beta$ 42</sub> = 10  $\mu$ M), ist Fenofibrat weniger potent und weist einen ungefähr 10-fach höheren EC<sub>50</sub><sub>A $\beta$ 42</sub>-Wert auf (Kukar et al., 2005).

## 2.2 Untersuchung der Bindungseigenschaften von GSMs und iGSMs

### 2.2.1 Analyse der Bindung von Sulindac Sulfid und strukturell verwandter Substanzen an A $\beta$ 42-Peptide

Um die direkte Interaktion von A $\beta$ -modulierenden Substanzen mit der A $\beta$ -Sequenz zu untersuchen, wurden Oberflächen-Plasmon-Resonanz- (»surface plasmon resonance«, SPR) Analysen mittels Biacore durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde synthetisches A $\beta$ 42-Peptid frisch gelöst und mittels Aminkopplung kovalent an die beschichtete Oberfläche eines Sensorchips immobilisiert (Ligand, Abb. 8A), um anschließend verschiedene Substanzen (Analyten) in aufsteigender Konzentration über den Sensorchip zu geben.



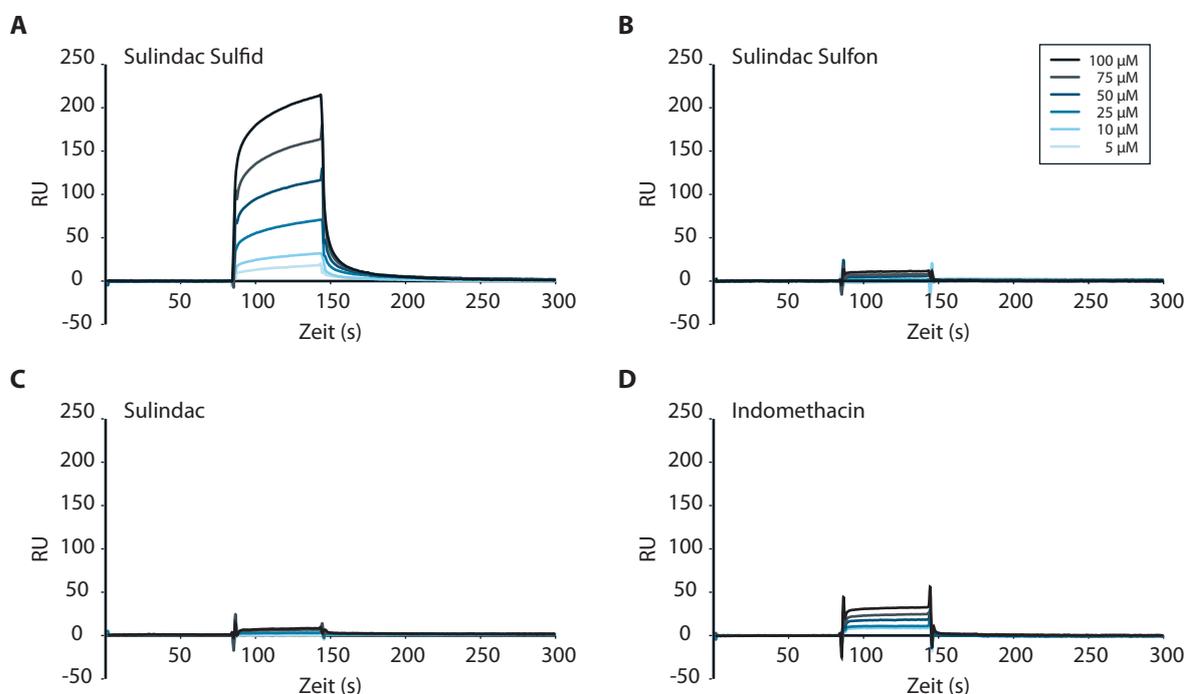
**Abb. 8: Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von A $\beta$ 42 unter den Bedingungen der Aminkopplung.** 40–100  $\mu$ g monomerisiertes A $\beta$ 42 wurden in 40  $\mu$ l alkalisiertem H<sub>2</sub>O (0,12% NH<sub>3</sub>) aufgenommen, sonifiziert und sofort 1:10 mit 10 mM Natriumacetat (pH 3,4) und 300 mM NaCl verdünnt, um auf die Säule (Superose 12) aufgetragen zu werden. NaCl wurde hinzugefügt, um ionische Wechselwirkungen während der Auftrennung zu minimieren. Fraktionen von 500  $\mu$ l wurden bei einer Flussrate von 0,5 ml/min gesammelt. (A) SEC-Fractionen wurden direkt auf eine Nitrozellulosemembran überführt. A $\beta$ 42 wurde mit dem Antikörper W0-2 detektiert. Gezeigt ist die densitometrische Auswertung der Dot-Blot-Analyse der gesammelten Fraktionen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen, n = 4). (B) Western-Blot-Analyse der SEC-Fractionen. Die Proben wurden mittels eines 10–20%igen Tris-Tricin-Gradientengels elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. A $\beta$ 42 wurde mit Hilfe des Antikörpers W0-2 nachgewiesen. Dot-Blot- und Western-Blot-Analyse zeigen, dass A $\beta$ 42 unter den gewählten Bedingungen ausschließlich Monomere bildet

Unter neutralen Pufferbedingungen oligomerisiert A $\beta$ 42 schnell zu niederen und höheren Oligomeren (2-8- und 10-20-mere) (Harmeier et al., 2009). Um den Oligomerisierungszustand von A $\beta$ 42 unter den sauren Bedingungen der Kopplungsreaktion zu prüfen, wurde zunächst eine Größenausschluss-Chromatographie (»size exclusion chromatography«, SEC) in entsprechendem Kopplungspuffer durchgeführt. Aufgrund der hohen Absorption des Puffers war das Peptid bei 215–280 nm nicht detektierbar, so dass kein Chromatogramm aufgenommen werden konnte. Jedoch zeigen Dot-Blot- und Western-Blot-Analyse der gesammelten SEC-Fractionen, dass A $\beta$ 42 unter den gewählten Bedingungen ausschließlich Monomere bildet (Abb. 8B und 8C).

Für die Interaktion mit sehr kleinen Analyten wurde die zu koppelnde A $\beta$ -Menge nach folgender Formel berechnet:

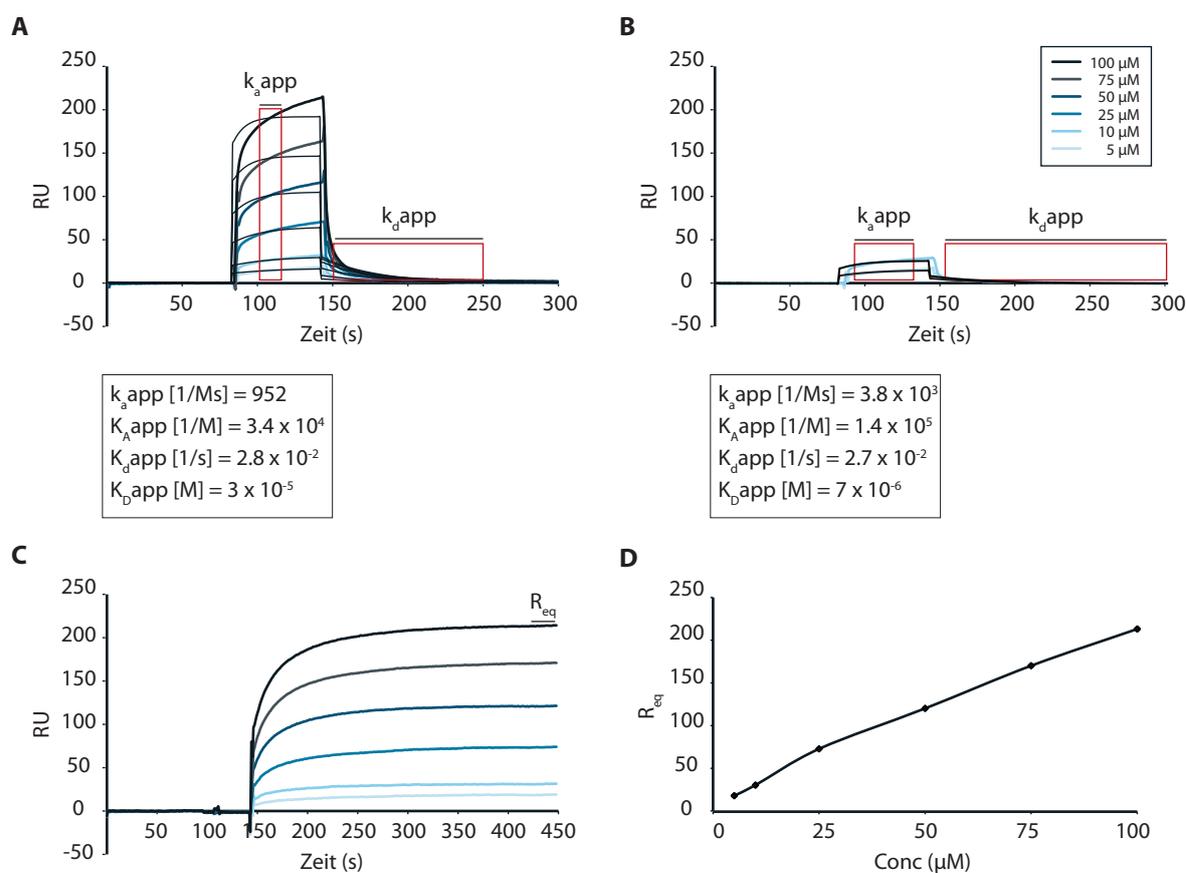
$$R_{\max} = (MW_A/MW_L) \times R_L \times S,$$

wobei  $R_{\max}$  die theoretisch maximale Sensorantwort (Response),  $MW_L$  das Molekulargewicht des immobilisierten Liganden (A $\beta$ 42, MW = 4,5 kDa) und  $MW_A$  das Molekulargewicht des Analyten (zu untersuchende Substanz, durchschnittliches MW = 350 Da) darstellt.  $R_L$  entspricht der gekoppelten Menge an Ligand und  $S$  der molaren Stöchiometrie. Ausgehend von  $R_{\max}$ -Werten von mindestens 50–150 RU (Response Units) und der Annahme einer 1:1-Stöchiometrie wurden in der Regel 600–2000 RU gekoppelt. 1 RU entspricht dabei 1 pg/mm<sup>2</sup> an gekoppeltem Liganden auf der Sensorchip-Oberfläche. Um Kurven aus Messungen mit unterschiedlicher Menge an gekoppeltem Liganden direkt miteinander vergleichen zu können, wurde stets auf eine einheitliche Ligand-Menge normiert.

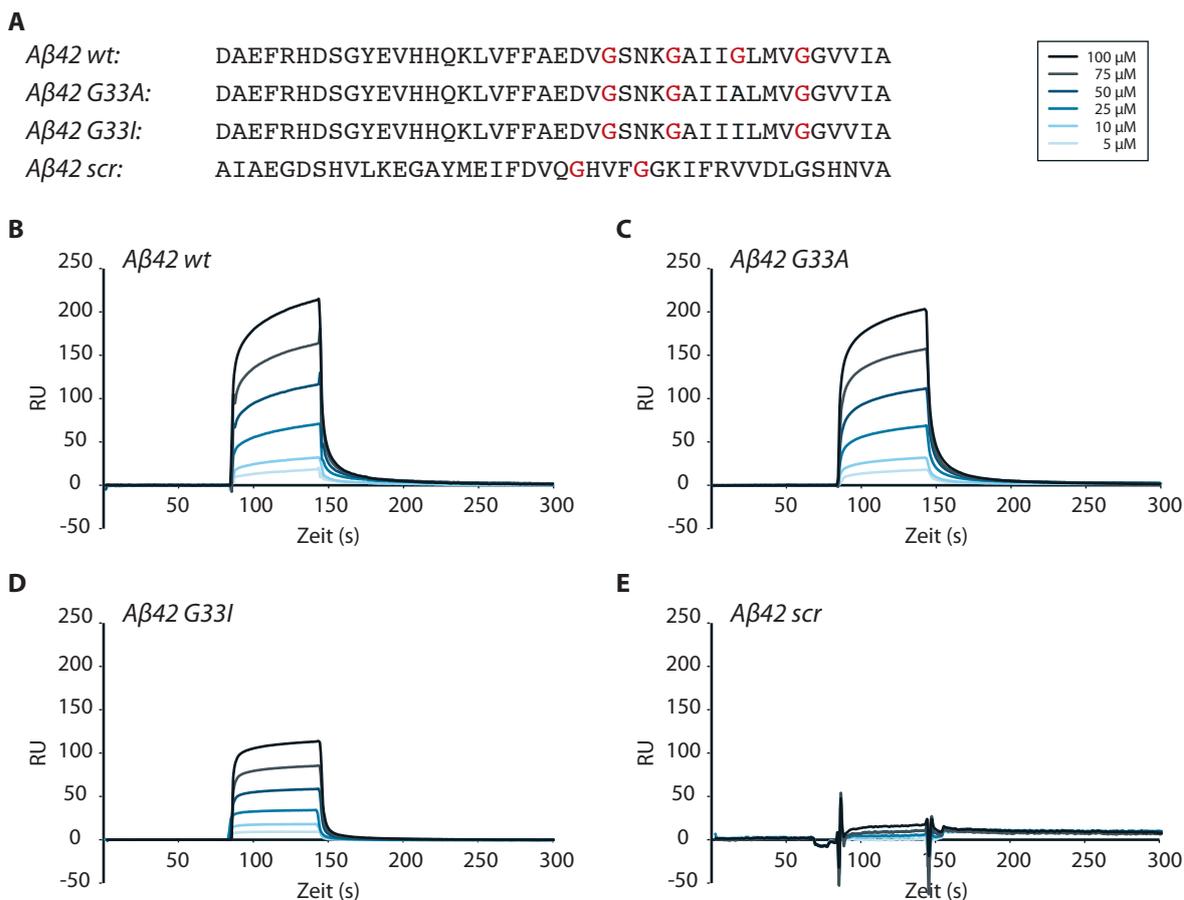


**Abb. 9: Bindungsanalyse mittels SPR.** Bindung von Sulindac Sulfid (A), Sulindac Sulfon (B), Sulindac (C) und Indomethacin (D) an A $\beta$ 42. Synthetisches A $\beta$ 42 wurde an einen Sensorchip immobilisiert (1700 RU). Verschiedene Konzentrationen (5–100  $\mu$ M) der Substanzen wurden für 60 s bei einer Flussrate von 30  $\mu$ l/min injiziert.

Zunächst wurden Sulindac Sulfid und die strukturell verwandten Substanzen Sulindac Sulfon, Sulindac und Indomethacin im SPR-Experiment getestet. Die Ergebnisse in Abbildung 9A zeigen, dass die Injektion von Sulindac Sulfid schnell zu einem deutlichen Anstieg der Basislinie führte. Nach der Injektion ging das Signal auf den Ursprungswert zurück. Dies lässt auf eine schnelle Assoziation und Dissoziation schließen. Die Bindung von Sulindac Sulfid an A $\beta$ 42 ist konzentrationsabhängig. Des Weiteren ist die Bindung spezifisch, da weder für Sulindac noch für sein Sulfon-Derivat eine signifikante Bindung an immobilisiertes A $\beta$ 42 zu beobachten war (Abb. 9B und C). Indomethacin zeigte ebenfalls eine Interaktion mit der A $\beta$ -Sequenz, jedoch fiel diese im Vergleich zu Sulindac Sulfid relativ schwach aus (Abb. 9D).



**Abb. 10: Bestimmung kinetischer Parameter für die Bindung von Sulindac Sulfid an A $\beta$ 42.** (A, B) Konzentrationen von 5–100  $\mu$ M Sulindac Sulfid wurden für 60 s bei einer Flussrate von 30  $\mu$ l/min injiziert. Unter Verwendung des 1:1 Langmuir-Bindungsmodells wurden die apparente Assoziations- ( $k_{a,app}$ ) und Dissoziationsrate ( $k_{d,app}$ ) sowie die daraus resultierende apparente Gleichgewichts-Assoziations- ( $K_{A,app}$ ,  $K_{A,app} = k_{a,app}/k_{d,app}$ ) und Gleichgewichts-Dissoziationskonstante ( $K_{D,app}$ ,  $K_{D,app} = k_{d,app}/k_{a,app}$ ) ermittelt. Wurden die Kurven aller Konzentrationen an Sulindac Sulfid in die Auswertung einbezogen (A), betrug  $K_{D,app}$  30  $\mu$ M. (B) Bei Vernachlässigung der höchsten Konzentrationen wurde ein  $K_{D,app}$ -Wert von 7  $\mu$ M berechnet. Dies deutet darauf hin, dass die  $K_{D,app}$ -Werte für diese Interaktion mit steigender Konzentration an Sulindac Sulfid leicht zunehmen. (C) Um die Response im Equilibrium ( $R_{eq}$ ) bestimmen zu können, wurden 5–100  $\mu$ M Sulindac Sulfid für 5 min bei einer Flussrate von 30  $\mu$ l/min injiziert. Für jede Konzentration wurde am Ende der Injektionszeit der  $R_{eq}$ -Wert (mittlere RU bei 425–450 s) ermittelt. Durch Auftragung der  $R_{eq}$ -Werte gegen die eingesetzte Konzentration an Sulindac Sulfid und unter Verwendung des »Steady-state«-Modells erhält man schließlich die Dosis-Antwort-Kurve (D). Die Dosis-Antwort-Kurve ergab über einen weiten Bereich an Konzentrationen nahezu eine Gerade, so dass keine Sättigung erreicht wurde.



**Abb. 11: Bindungsanalyse verschiedener  $A\beta_{42}$ -Peptide mittels SPR.** (A) Dargestellt sind die verwendeten  $A\beta_{42}$ -Peptide. Die Glycin-Reste des GxxxG-Motivs sind rot hervorgehoben. Bindung von Sulindac Sulfid an das wildtypische  $A\beta_{42}$  (B), an die GxxxG-Mutanten  $A\beta_{42}$  G33A (C) und G33I (D) und an das Kontroll-Peptid  $A\beta$  scr (E). Verschiedene Konzentrationen (5–100  $\mu$ M) an Sulindac Sulfid wurden für 60 s bei einer Flussrate von 30  $\mu$ l/min injiziert.

Für Sulindac Sulfid wurden unter Verwendung eines einfachen 1:1 Bindungsmodells (1:1 Langmuir-Bindung) kinetische Parameter bestimmt (Abb. 10). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass sich monomeres  $A\beta_{42}$  auf der Sensorchip-Oberfläche zu oligomeren Formen zusammenlagert, wurde der Begriff apparenter  $K_D$  ( $K_{D,app}$ ) gewählt, um Affinitäten zu beschreiben. Die kinetische Analyse zeigte, dass Sulindac Sulfid mit einer Affinität im mikromolaren Bereich an die  $A\beta$ -Sequenz bindet. So wurde für Konzentrationen von 5–100  $\mu$ M ein  $K_{D,app}$  von 30  $\mu$ M ermittelt (Abb. 10A). Interessanterweise führten geringe Konzentrationen an Sulindac Sulfid (5–10  $\mu$ M) zu einer leichten Zunahme der Affinität (Abb. 10B), was einen Hinweis auf eine komplexere Stöchiometrie gibt. Im Bereich der eingesetzten Konzentrationen an Sulindac Sulfid ergab die ermittelte Dosis-Antwort-Kurve nahezu eine Gerade (Abb. 10C und D). Eine Sättigung wurde nicht erreicht. Die Interpretation der Dosis-Antwort-Kurve und die Berechnung der Stöchiometrie über die Formel

$$S = (R_{max}/R_L) \times (MW_A/MW_L),$$

ergaben eine ansteigende Stöchiometrie von 0,2:1 auf 2:1 für Konzentrationen von 5–100  $\mu$ M Sulindac Sulfid. Die Injektionen von Indomethacin ergaben Sensorgramme, deren Kurven sich nicht zufriedenstellend an das 1:1 Bindungsmodell anpassen ließen und somit keine genauere Analyse zuließen (»BIAevaluation«, Version 4.1, GE Healthcare, München).

Die Spezifität der Bindung von Sulindac Sulfid an A $\beta$ 42 wurde weiter untersucht, indem andere Liganden eingesetzt wurden (Abb. 11A). Zum einen wurden die GxxxG-Mutanten A $\beta$ 42 G33A (Abb. 11C) und G33I (Abb. 11D) verwendet. Zum anderen wurde ein Kontroll-Peptid, bestehend aus allen in A $\beta$ 42 vorkommenden Aminosäuren nur in zufälliger Reihenfolge (scrambled A $\beta$ 42, A $\beta$ 42 scr), als Interaktionspartner für Sulindac Sulfid getestet (Abb. 11E). Sulindac Sulfid bindet neben der wildtypischen A $\beta$ 42-Sequenz sowohl A $\beta$ 42 G33A als auch G33I (Abb. 11C und D). Kinetische Parameter für diese Interaktionen wurden in Tabelle 1 zusammengefasst. Hier wird deutlich, dass Sulindac Sulfid im Vergleich zum A $\beta$ 42-wt-Peptid mit einer leicht abgeschwächten Assoziationsrate und einer erhöhten Dissoziationsrate an die G33A-Mutante bindet. Die Mutation G33I verursachte eine noch viel stärkere Abnahme der Assoziationsrate und steigerte die Dissoziationsrate um mehr als das Doppelte. Demnach beeinflusst der konservative Aminosäure-Austausch von Glycin zu Alanin die Bindung von Sulindac Sulfid nur geringfügig, während Isoleucin mit seiner verzweigten Seitenkette die Bindung sehr viel stärker zu stören scheint. Für A $\beta$ 42 scr zeigte sich nur eine schwache, unspezifische Interaktion mit Sulindac Sulfid (Abb. 11E). Diese Resultate unterstreichen die Spezifität der Bindung von Sulindac Sulfid an die wildtypische A $\beta$ 42-Sequenz.

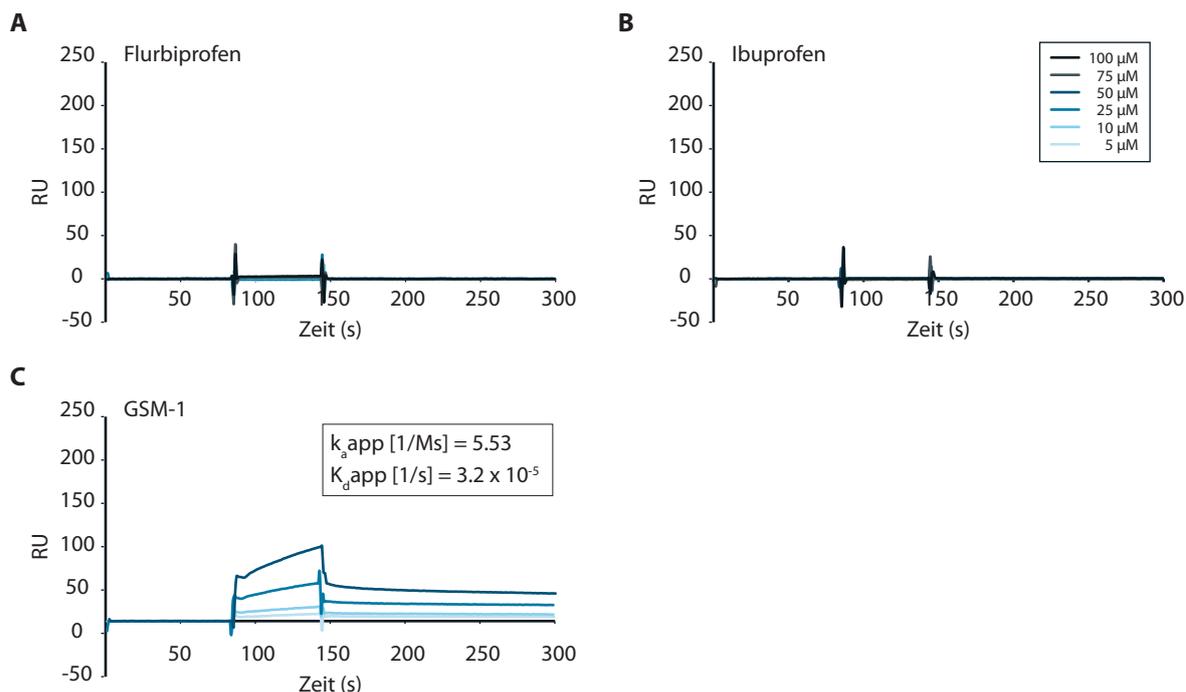
	A $\beta$ 42 wt	A $\beta$ 42 G33A	A $\beta$ 42 G33I
$k_{a,app}$ [1/Ms]	952	947	27,4
$K_{d,app}$ [1/s]	$2.8 \times 10^{-2}$	$3.6 \times 10^{-2}$	$6.3 \times 10^{-2}$

**Tab. 1: Kinetische Parameter aus den Messungen B-D in Abb. 11.** Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurden die Kurven aller Konzentrationen an Sulindac Sulfid einbezogen. Für die Bestimmung der apparenten Assoziationsrate ( $k_{a,app}$ ) wurde der Zeitrahmen von 104–114 s verwendet. Die apparente Dissoziationsrate ( $k_{d,app}$ ) wurde im Zeitrahmen von 150–250 s ermittelt.

Aus den Ergebnissen der SPR-Analysen ergeben sich folgende Schlussfolgerungen: Sulindac Sulfid bindet spezifisch und konzentrationsabhängig an die wildtypische A $\beta$ -Sequenz. Unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie liegt die Affinität dieser Bindung im niedrigen mikromolaren Bereich, wobei sich die Stöchiometrie anscheinend weitaus komplexer gestaltet. Demnach könnte Sulindac Sulfid mit mehr als einer Bindungsstelle in der A $\beta$ -Sequenz interagieren oder mit der aus den drei konsekutiven GxxxG-Motiven gebildeten flachen Molekül-Oberfläche in Kontakt treten. Das zentrale GxxxG-Motiv in der APP-TMS scheint hierbei eine besondere Rolle zu spielen, da sich die Bindung von Sulindac Sulfid durch einen Aminosäure-Austausch an Position G33 zu Alanin oder Isoleucin graduell reduzieren ließ.

### 2.2.2 Analyse der Interaktion weiterer GSMs und iGSMs mit A $\beta$ 42

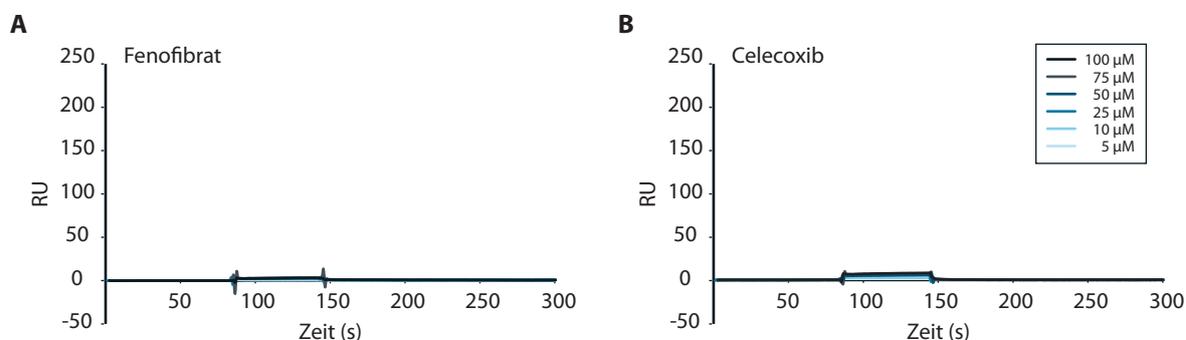
Auch die GSMs Flurbiprofen, Ibuprofen und GSM-1 sowie die beiden iGSMs Fenofibrat und Celecoxib wurden in gleicher Weise wie Sulindac Sulfid hinsichtlich ihrer Interaktion mit der A $\beta$ -Sequenz analysiert (Abb. 12 und 13). Eine spezifische Bindung an immobilisiertes A $\beta$ 42-Peptid wurde weder für Flurbiprofen (Abb. 12A) noch für Ibuprofen (Abb. 12B) festgestellt.



**Abb. 12: SPR-Analysen zur Untersuchung der Bindung von weiteren GSMs an Aβ42.** 1700 RU synthetisches Aβ42 wurden über Aminkopplung an einen Sensorchip immobilisiert. 5–100 µM Flurbiprofen (A) bzw. Ibuprofen (B) wurden für 60 s injiziert. (C) Verschiedene Konzentrationen (5–50 µM) an GSM-1 wurden für 60 s injiziert. Die Flussrate in A–C betrug jeweils 30 µl/min.  $k_{a,app}$ : apparente Assoziationsrate,  $k_{d,app}$ : Dissoziationsrate.

Der hochwirksame Modulator GSM-1 zeigte im Konzentrationsbereich von 5–50 µM hingegen eine deutliche Bindung an die Aβ-Sequenz. Im Vergleich zu den Messungen mit Sulindac Sulfid wiesen die Bindungskurven zwar eine langsamere Assoziation, aber auch eine wesentlich langsamere Dissoziation auf, was sich in den entsprechenden apparenten Assoziations- und Dissoziationsraten widerspiegelte (Abb. 12C). Der Verlauf der hier erhaltenen Bindungskurven ähnelt dabei dem eines polyklonalen Antikörpers, so dass auch für GSM-1 mehr als eine definierte Bindungsstelle in der Aβ-Sequenz zu vermuten ist.

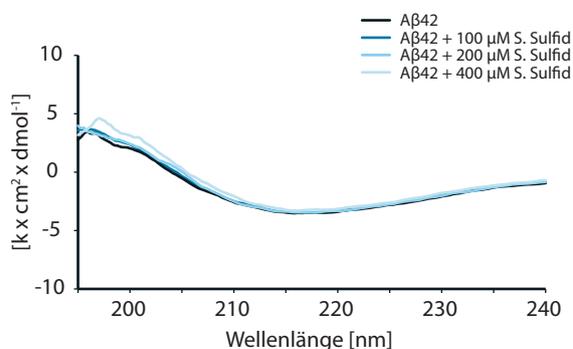
Die beiden iGSMs Fenofibrat noch Celecoxib vermochten unter den gewählten experimentellen Bedingungen im Biacore-Experiment nicht an Aβ42 zu binden (Abb. 13A und B).



**Abb. 13: SPR-Analysen zur Untersuchung der Bindung von iGSMs an Aβ42.** 1700 RU synthetisches Aβ42 wurden über Aminkopplung an einen Sensorchip immobilisiert. 5–100 µM Fenofibrat (A) bzw. Celecoxib (B) wurden für 60 s bei einer Flussrate von 30 µl/min injiziert.

### 2.2.3 Einfluss von Sulindac Sulfid auf die Sekundärstruktur von A $\beta$ 42

A $\beta$ 42 lagert sich nach Verlassen der hydrophoben Membran in hydrophiler Umgebung von der  $\alpha$ -helikalen zur  $\beta$ -Faltblatt-Struktur um (Simmons et al., 1994). Um zu überprüfen, ob die Interaktion mit Sulindac Sulfid mit einer Konformationsänderung von A $\beta$ 42 einhergeht, wurde die Sekundärstruktur des Peptids in Anwesenheit von Sulindac Sulfid mittels Circular dichroismus (CD) bestimmt. Eine Lösung aus 50  $\mu$ M frisch gelöstem A $\beta$ 42 wurde mit 100–400  $\mu$ M Sulindac Sulfid versetzt und im CD-Spektrometer vermessen (Abb. 14). Da DMSO die CD-Messungen stört, wurde Methanol als Lösungsmittel für Sulindac Sulfid verwendet. In Abwesenheit von Sulindac Sulfid zeigte sich ein charakteristisches CD-Spektrum für einen hohen Gehalt an  $\beta$ -Faltblatt. Selbst ein 8-facher molarer Überschuss an Sulindac Sulfid führte keine Änderung des CD-Spektrums herbei. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass Sulindac Sulfid an A $\beta$ 42 bindet, ohne die Konformation des Peptids signifikant zu verändern.

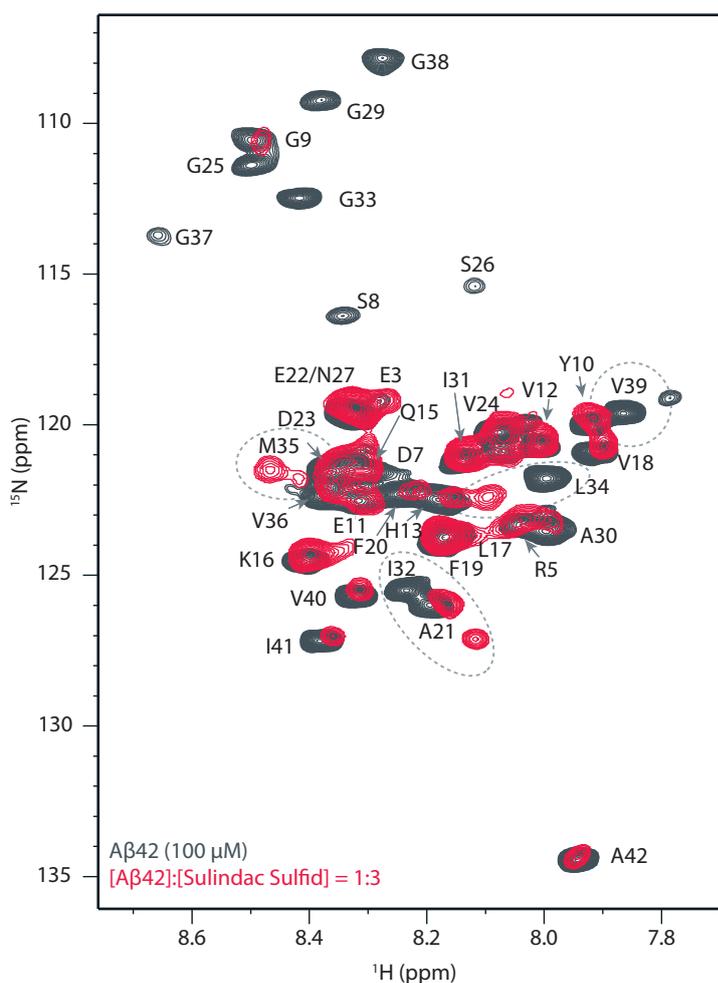


**Abb. 14: Analyse der Sekundärstruktur von A $\beta$ 42 in Anwesenheit von Sulindac Sulfid.** CD-Messungen von frisch gelöstem A $\beta$ 42 (50  $\mu$ M) ergaben ein typisches Spektrum einer  $\beta$ -Faltblatt-Struktur in Ab- und Anwesenheit von 100–400  $\mu$ M Sulindac Sulfid.

### 2.2.4 NMR-Analyse der Interaktion von Sulindac Sulfid und A $\beta$ 42

Die spezifische Interaktion von Sulindac Sulfid mit der A $\beta$ -Sequenz sollte mittels Kernspin-Resonanz- («nuclear magnetic resonance», NMR) Spektroskopie verifiziert werden. Dazu wurde ein zweidimensionales Festkörper-NMR-Spektrum von  $^{15}$ N-markiertem A $\beta$ 42 in Gegenwart von Sulindac Sulfid aufgenommen (Abb. 15). Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Muralidhar Dasari aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernd Reif (TU München) durchgeführt. Eine Veränderung der chemischen Verschiebung zeigt eine Änderung der chemischen Umgebung des Peptid-Rückgrats an und gibt damit Hinweise auf eine Bindung. Für die Aminosäure-Reste I32, L34, M35 und V39 wurde eine Veränderung der chemischen Verschiebung beobachtet. Auffällig ist, dass sich diese Aminosäure-Reste allesamt in der APP-TMS befinden. Die Intensität des Resonanzsignals für die Glycin-Reste des GxxxG-Motivs fiel in Anwesenheit von Sulindac Sulfid stark ab, was möglicherweise auf eine Austauschverbreiterung zurückzuführen ist, die vorrangig die C-terminalen Glycin-Reste betraf.

Die NMR-spektroskopischen Daten weisen ebenfalls auf eine spezifische Interaktion zwischen A $\beta$ 42 und Sulindac Sulfid hin und untermauern die Resultate der SPR-Analysen. Auch hier wurde gezeigt, dass die Bindung maßgeblich durch die APP-TMS vermittelt wird.

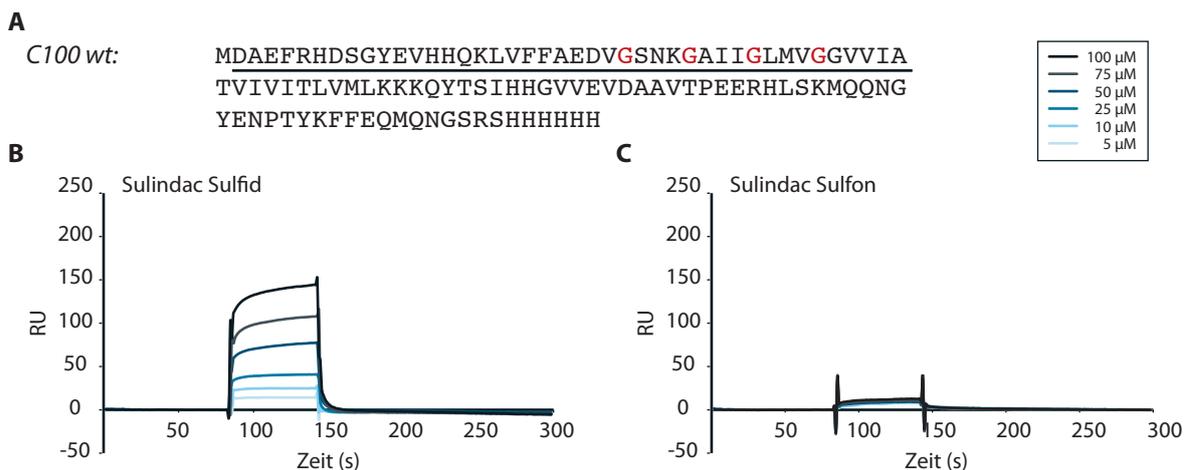


**Abb. 15: Zweidimensionale Festkörper-NMR-Spektroskopie zur Analyse der Bindung von Sulindac Sulfid an Aβ42.** <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-Spektrum von Aβ42 in Abwesenheit (schwarz) und Anwesenheit von Sulindac Sulfid (rot). Das molare Verhältnis von Aβ42:Sulindac Sulfid betrug 1:3. Gestrichelte Linien/Kreise kennzeichnen die chemischen Verschiebungen im Peptid.

### 2.2.5 Analyse der Bindung von Sulindac Sulfid an das rekombinante γ-Sekretase-Substrat C100

Dass kleine Aβ-modulierende Substanzen in der Lage sind, an die β-Faltblatt-Struktur von Aβ42 zu binden, wurde mittels SPR-, CD- und NMR-Analysen nachgewiesen. Da die TMS des γ-Sekretase-Substrats β-CTF α-helikal vorliegt, war von besonderem Interesse zu testen, ob Sulindac Sulfid auch spezifisch mit dem rekombinant hergestellten C100 interagiert. Hierbei handelt es sich um das in *E. coli* aufgereinigte und in Detergenz-Micellen rekonstituierte β-CTF (Abb. 16A), das über einen C-terminal angefügten His-Tag an eine mit Ni-NTA funktionalisierte Sensorchip-Oberfläche gekoppelt wurde.

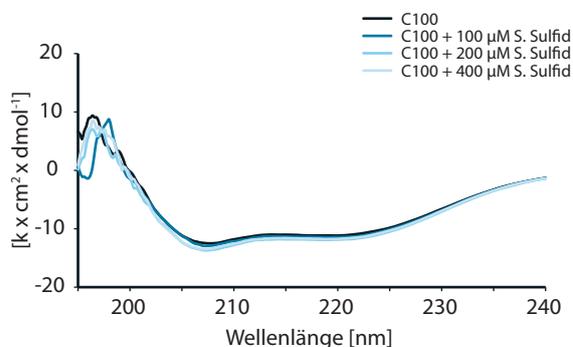
Ähnlich wie bereits für die Interaktion mit dem Aβ42-Peptid gezeigt, ließ sich für Sulindac Sulfid eine konzentrationsabhängige Bindung feststellen (Abb. 16B), nicht jedoch für das Sulfon-Derivat (Abb. 16C). Die Kurven aus den Messungen mit Sulindac Sulfid ließen sich nicht zufriedenstellend an das 1:1 Bindungsmodell anpassen und lieferten somit keine kinetischen Parameter.



**Abb. 16: Untersuchung der Bindung von Sulindac Sulfid an C100 mittels SPR.** (A) Dargestellt ist die Sequenz des rekombinant hergestellten  $\beta$ -CTF (C100). Die darin enthaltene A $\beta$ 42-Sequenz ist unterstrichen. Die Glycin-Reste des GxxxG-Motivs sind rot hervorgehoben. C100 wurde über Nickel an einen NTA-funktionalisierten Sensorchip immobilisiert (1600 RU). (B) Verschiedene Konzentrationen (5–100  $\mu$ M) an Sulindac Sulfid (B) bzw. Sulindac Sulfon (C) wurden für 60 s bei einer Flussrate von 30  $\mu$ l/min injiziert.

### 2.2.6 Einfluss von Sulindac Sulfid auf die Sekundärstruktur des rekombinanten $\gamma$ -Sekretase-Substrats C100

Das aufgereinigte C100 liegt überwiegend in  $\alpha$ -helikaler Konformation vor (Botev et al., 2011). Wurden zu 50  $\mu$ M C100 100–400  $\mu$ M Sulindac Sulfid gegeben, so war im aufgenommenen CD-Spektrum kein Unterschied zur Kontrolle zu beobachten. Dies zeigt, dass die  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur in Anwesenheit von Sulindac Sulfid erhalten bleibt.



**Abb. 17: Analyse der Sekundärstruktur von C100 in Anwesenheit von Sulindac Sulfid.** CD-Messungen von aufgereinigtem C100 (50  $\mu$ M) ergaben in Ab- und Anwesenheit von 100–400  $\mu$ M Sulindac Sulfid eine  $\alpha$ -helikale Konformation.

## 2.3 Einfluss von GSMs und iGSMs auf die TMS-Dimerisierung

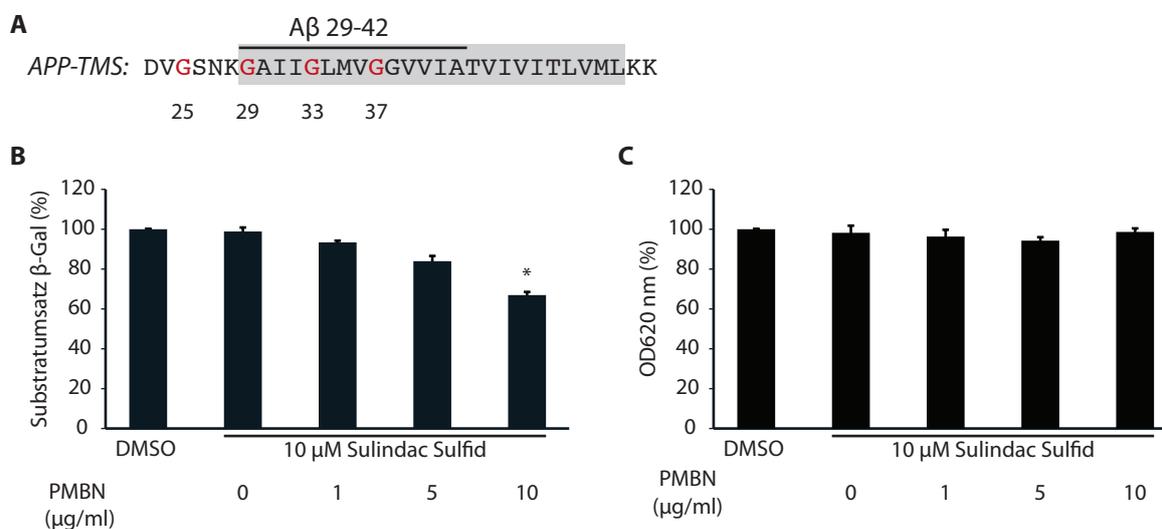
### 2.3.1 Etablierung des ToxR-Assays in Gegenwart von potentiell modulierender Substanzen

Der Einfluss von kleinen Substanzen auf die Dimerisierung der APP-TMS wurde mit Hilfe des bakteriellen ToxR-Systems untersucht (Kolmar et al., 1995; Langosch et al., 1996). Dieses System macht von einem Fusionsprotein Gebrauch, welches aus der zytoplasmatischen Domäne des ToxR-Transkriptionsaktivators (ToxR) aus *V. cholerae*, aus der zu untersuchenden TMS und aus dem periplasmatischen Maltosebindeprotein (MBP) besteht. Wird dieses Fusionsprotein in *E. coli*-Zellen des Indikatorstammes FHK12 exprimiert, so löst die Dimerisierung der TMS die spezifische

Assoziation zweier ToxR-Domänen aus. Als Konsequenz wird die Transkription des Reportergens  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) initiiert, die durch die enzymatische Bildung eines photometrisch messbaren Produkts festgestellt werden kann (Kolmar et al., 1995; Langosch et al., 1996). Dabei korreliert die Menge der gebildeten  $\beta$ -Gal mit der Stärke der Dimerisierung der zu untersuchenden TMS und lässt eine Quantifizierung der TMS-TMS-Affinität zu. Die im ToxR-Fusionprotein verwendete TMS umfasst die Aminosäuren G29–A42 (entsprechend der A $\beta$ -Numerierung, Abb. 18A) und enthält das zentrale GxxxG-Motiv, das für die homophile Interaktion der APP-TMS verantwortlich ist (Munter et al., 2007).

Die äußere Membran von *E. coli* ist für die meisten Moleküle unüberwindbar. Um die Permeabilität der äußeren Bakterienmembran gegenüber kleinen Substanzen zu erhöhen, wurde der ToxR-Assay in der vorliegenden Arbeit dahingehend erweitert, dass Polymyxin-B-Nonapeptid (PMBN) als Hilfsstoff eingesetzt wurde. Als kationisches Peptid kann PMBN mit den Carboxylgruppen der äußeren Lipopolysaccharidschicht interagieren, was eine Veränderung der Membranstabilität und eine Permeabilisierung der Membran zur Folge hat (Vaara, 1991; Kimura et al., 1992).

In Abwesenheit von PMBN führte die Inkubation mit 10  $\mu$ M Sulindac Sulfid zu keiner veränderten Dimerisierung der APP-TMS (Abb. 18B). Hingegen zeigte sich bei Zugabe von 5  $\mu$ g/ml PMBN (Abb. 18C) eine deutliche Abnahme der Dimerisierung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Substratumsatz der  $\beta$ -Gal gleich 100% gesetzt). Dieser Effekt verstärkte sich bei Verwendung von 10  $\mu$ g/ml PMBN noch weiter. Hier betrug die Dimerisierung der APP-TMS nur noch 67%.



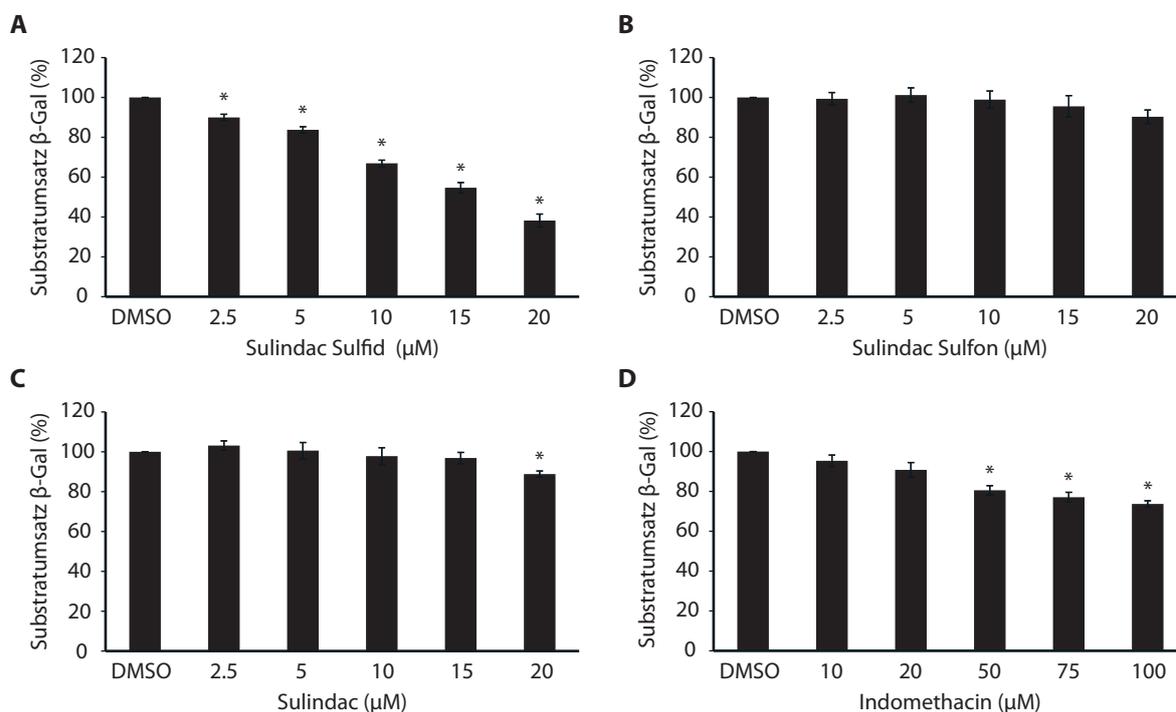
**Abb. 18: Einfluss von Sulindac Sulfid auf die Dimerisierung der APP-TMS in Anwesenheit von PMBN.** (A) Dargestellt sind die Aminosäure-Reste D23 bis K54 der A $\beta$ -Sequenz. Die vollständige APP-TMS ist grau unterlegt. Die Glycin-Reste des GxxxG-Motivs sind rot hervorgehoben. Die gekennzeichnete Sequenz A $\beta$  29–42 entspricht den Aminosäure-Resten, welche als TMS ins ToxR-Fusionsprotein integriert wurden. (B) Um die im ToxR-Assay verwendeten Bakterien für die Test-Substanzen zugänglich zu machen, wurde die optimale Konzentration des Hilfsstoff PMBN getestet. Gemessen am Substratumsatz durch die gebildete  $\beta$ -Gal wurde die Dimerisierungsstärke der APP-TMS in Anwesenheit von 10  $\mu$ M Sulindac Sulfid bei aufsteigender PMBN-Konzentration ermittelt. Die DMSO-Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 4-15$ ). Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zur DMSO-Kontrolle an (\* $p < 0,0001$ , Student t-Test). Sulindac Sulfid reduziert die Dimerisierungsstärke der APP-TMS, jedoch erst in Anwesenheit von PMBN. (C) Die Zelldichte der *E. coli* FHK-Zellen wurde bei 620 nm (OD620) nach 6 h Inkubation gemessen und mit der DMSO-Kontrolle verglichen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 8-15$ ).

Zur Kontrolle wurde die Zelldichte nach 6 h Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Sulindac Sulfid und maximal 10  $\mu\text{g/ml}$  PMBN gemessen. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle war die Zelldichte unverändert, wodurch eine bakterizide Wirkung von PMBN unter den gewählten Bedingungen ausgeschlossen werden kann.

Die Stärke der Dimerisierung der APP-TMS lässt sich demnach durch Sulindac Sulfid reduzieren, jedoch nur in Anwesenheit von PMBN. In folgenden ToxR-Experimenten wurde stets mit einer PMBN-Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  gearbeitet.

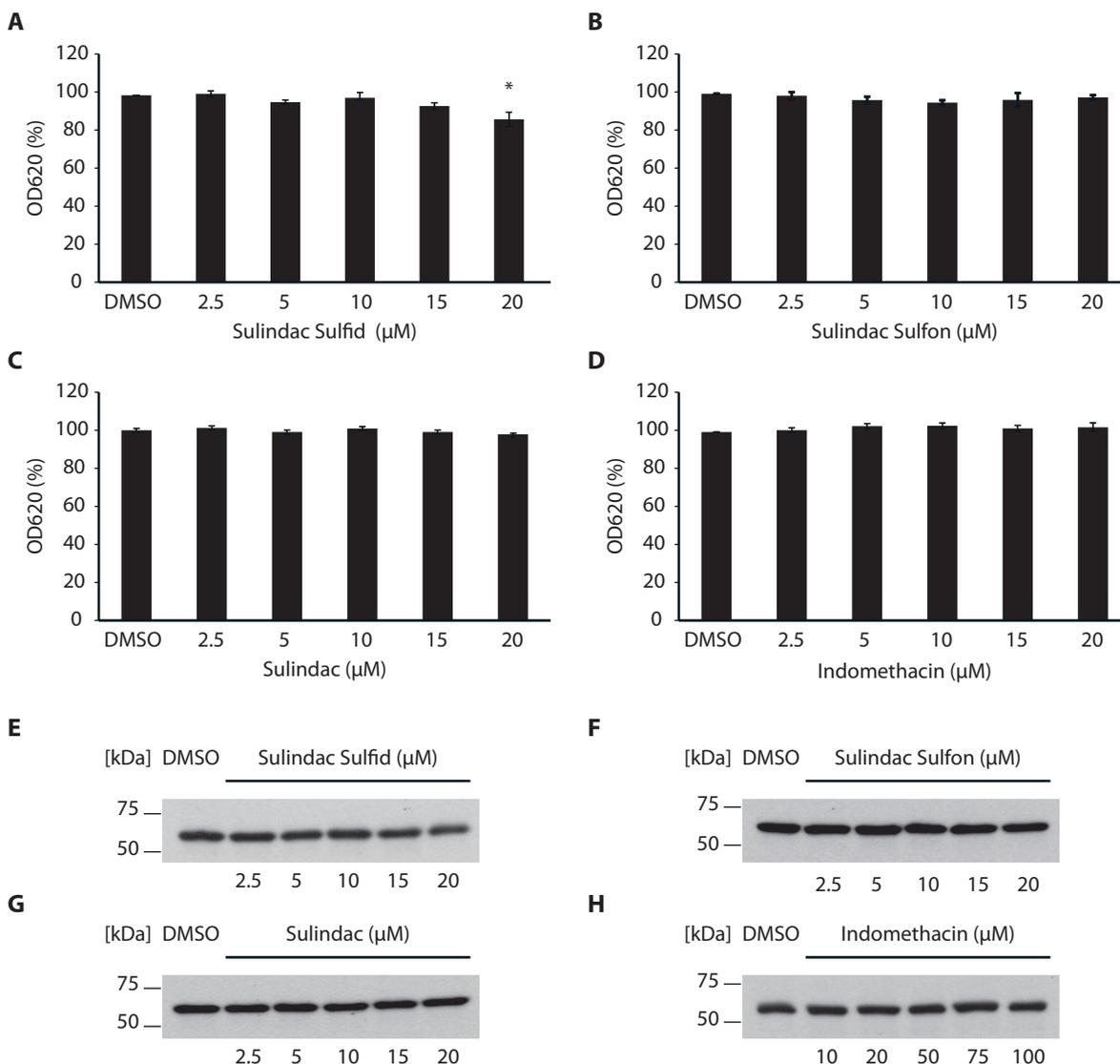
### 2.3.2 Einfluss von Sulindac Sulfid und strukturell verwandter Substanzen auf die Dimerisierung der APP-TMS

Sulindac Sulfid und seine Derivate Sulindac Sulfon und Sulindac sowie Indomethacin wurden dem ToxR-Assay jeweils in aufsteigender Konzentration für 6 h zugesetzt. Die Dimerisierungsstärke der APP-TMS wurde durch Sulindac Sulfid konzentrationsabhängig reduziert (Abb. 19A). Für Sulindac und das Sulfon-Derivat, die beide keinerlei Einfluss auf die A $\beta$ -Produktion haben, zeigte sich ein anderes Bild: Lediglich sehr hohe Konzentrationen ( $\geq 20 \mu\text{M}$ ) an Sulindac verursachen eine Schwächung der Dimerisierung (Abb. 19B). Hier liegt jedoch die Vermutung nahe, dass ein Teil der Substanz durch die Aktivität von in *E. coli* vorkommenden Methioninsulfoxid-Reduktasen zu Sulindac Sulfid reduziert wurde (Etienne et al., 2003).



**Abb. 19: Dimerisierung der APP-TMS in Anwesenheit von Sulindac Sulfid (A), Sulindac Sulfon (B), Sulindac (C) oder Indomethacin (D).** Der Substratumsatz durch die gebildete  $\beta$ -Gal korreliert mit der Dimerisierungsstärke der APP-TMS und wurde für die DMSO-Kontrolle gleich 100% gesetzt (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 8-15$ ). Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zur DMSO-Kontrolle an (\* $p < 0,0001$ , Student t-Test). Sulindac Sulfid schwächt die Dimerisierung der APP-TMS in Abhängigkeit von der Konzentration.

Sulindac Sulfon, welches weder zu Sulindac Sulfid noch zu Sulindac metabolisiert werden kann, beeinflusste die Dimerisierung gar nicht (Abb. 19C). Diese Beobachtung unterstreicht die Spezifität der Dimer-schwächenden Wirkung von Sulindac Sulfid. Auch durch Indomethacin konnte die Dimerisierung herabgesetzt werden (Abb. 19D), jedoch gemessen an den Effekten, die mit gleichen Konzentrationen an Sulindac Sulfid erzielt wurden, war dieser Effekt vergleichsweise schwach. So wurde die Dimerisierungsstärke bei einer Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  Sulindac Sulfid um 10% reduziert, während ein vergleichbarer Effekt erst mit einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  Indomethacin erreicht wurde.



**Abb. 20: Bakterienwachstum und Expressionsspiegel der ToxR-Fusionsproteine nach 6 h Inkubation mit Sulindac Sulfid, Sulindac Sulfon, Sulindac oder Indomethacin.** (A–D) Die Zelldichte der *E. coli* FHK-Zellen wurde bei 620 nm ( $OD_{620}$ ) gemessen. Die DMSO-Kontrolle wurde auf 100% gesetzt (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 8-15$ ). Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zur DMSO-Kontrolle an (\* $p < 0.01$ , Student t-Test). Vergleichbare  $OD_{620}$ -Werte konnten in Anwesenheit der Substanzen ermittelt werden. Lediglich sehr hohe Konzentrationen an Sulindac Sulfid ( $\geq 20 \mu\text{M}$ ) verminderten leicht die Zelldichte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. (E–H) Um die gleichmäßige Expression der ToxR-Fusionsproteine in Anwesenheit der verwendeten Substanzen zu kontrollieren, wurden Bakteriensuspensionen gleicher Zellzahl lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit Hilfe des anti-MBP-Antikörpers detektiert.

Die Zelldichte der behandelten Bakterien wurde kontrolliert, um eine toxische/wachstumshemmende Wirkung der Substanzen Sulindac Sulfid, Sulindac Sulfon, Sulindac und Indomethacin auszuschließen (Abb. 20A-D). Nach 6 h Inkubation in Anwesenheit der Substanzen wurden vergleichbare OD<sub>620</sub>-Werte beobachtet. Nur Konzentrationen  $\geq 20 \mu\text{M}$  an Sulindac Sulfid scheinen die Zelldichte leicht zu reduzieren (Abb. 20A). Hierbei sei jedoch anzumerken, dass für die Bestimmung der Dimerisierungsstärke das gemessene Signal für den Substratumsatz durch die  $\beta$ -Gal stets auf die OD<sub>620</sub> der Zellsuspension normiert wurde.

Es könnte vermutet werden, dass nicht eine geschwächte Dimerisierung sondern eine verminderte Expression des untersuchten ToxR-Fusionsproteins die Signalstärke des ToxR-Systems herabsetzt. Eine Western-Blot-Analyse stellte sicher, dass alle ToxR-Fusionsproteine in einem vergleichbaren Maße exprimiert wurden (Abb. 20E-H).

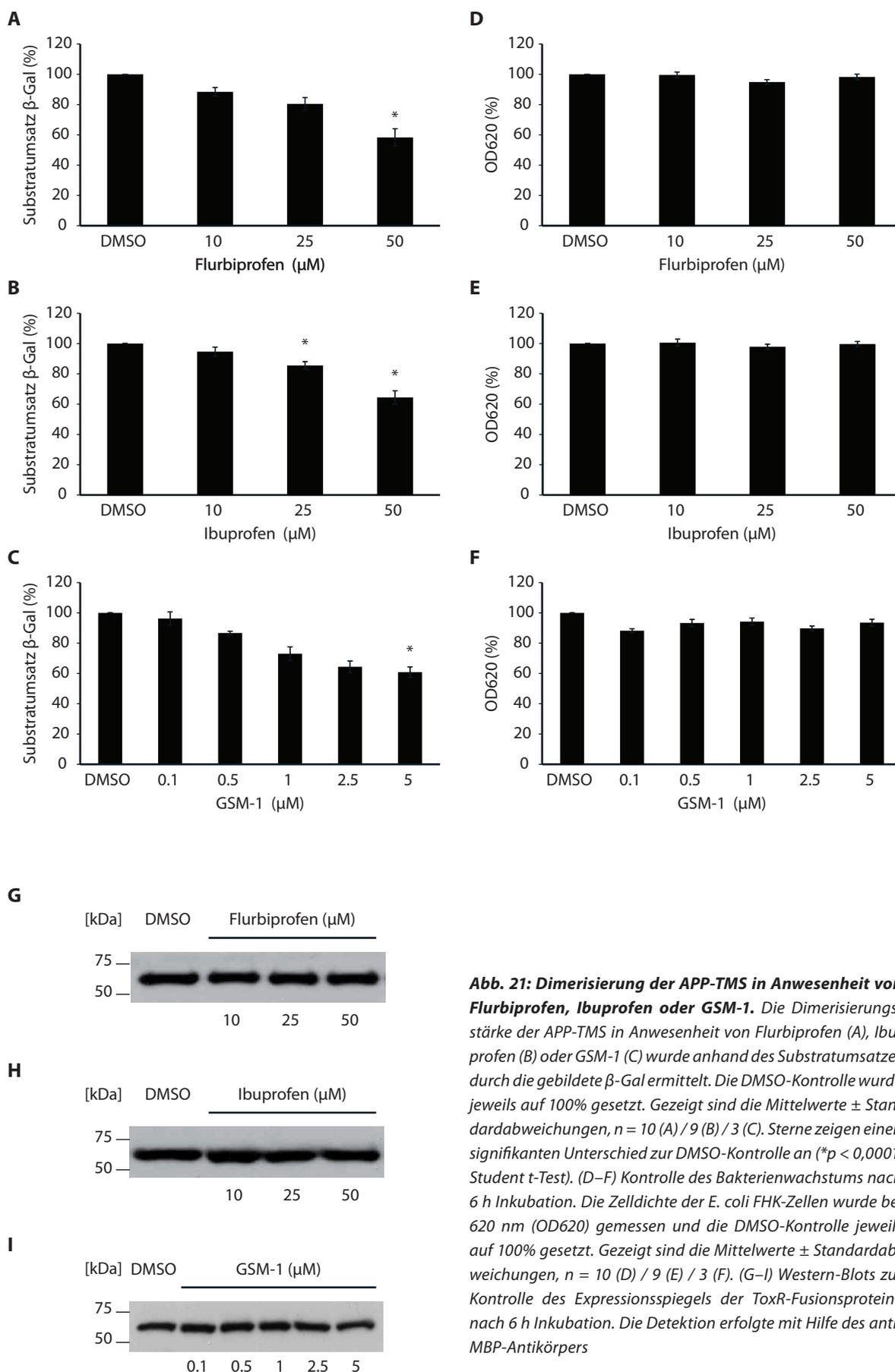
Diese durch das ToxR-System erzielten Resultate lassen darauf schließen, dass die dimerisierende APP-TMS ein molekulares Target für das GSM Sulindac Sulfid und nahe verwandte A $\beta$ 42-reduzierende Substanzen, wie Indomethacin, darstellt. In ihrer Effektivität hinsichtlich des Einflusses auf die Dimerisierung scheinen sich die Substanzen zu unterscheiden, wobei Sulindac Sulfid wesentlich potenter ist.

### 2.3.3 Einfluss weiterer GSMs und iGSMs auf die Dimerisierung der APP-TMS

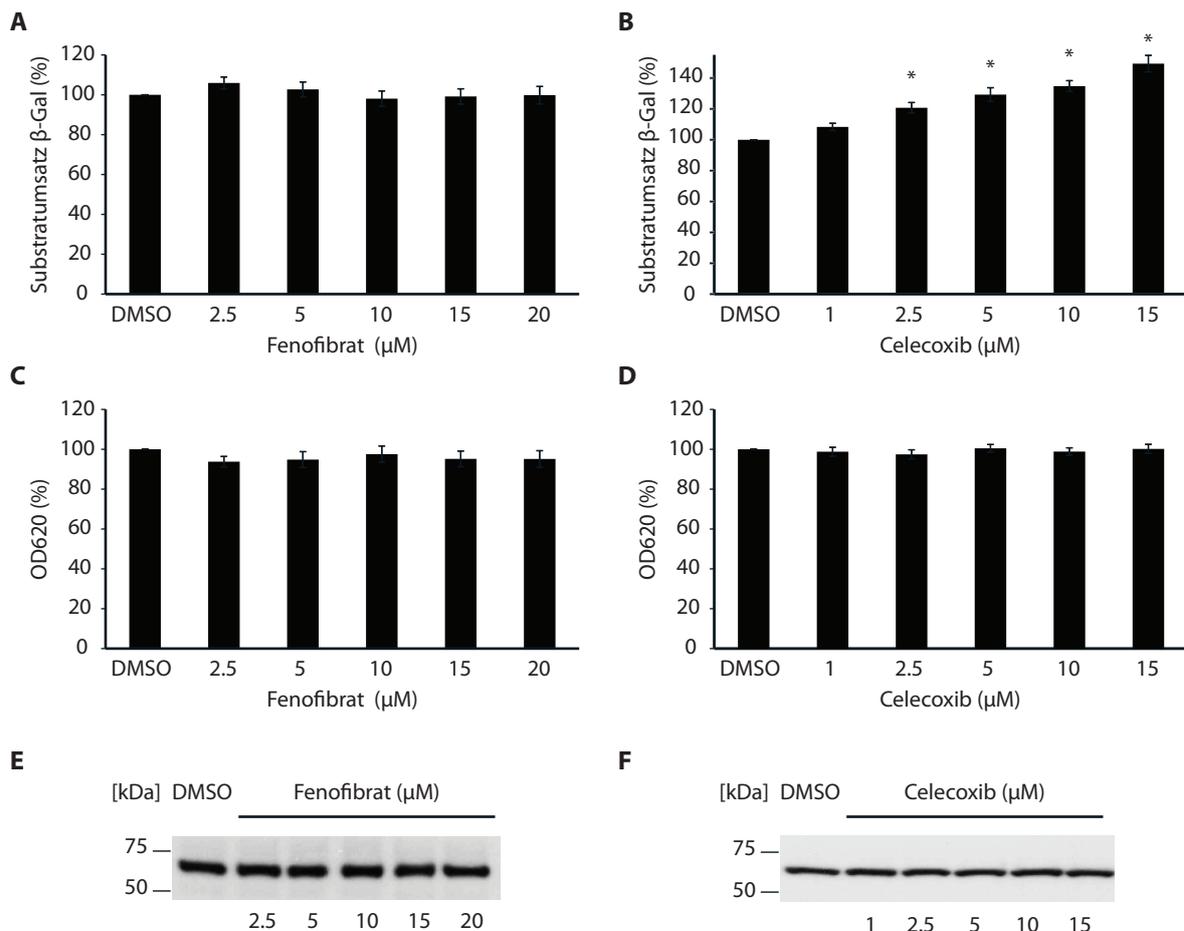
Des Weiteren wurden Flurbiprofen, Ibuprofen und GSM-1 mittels ToxR-System untersucht (Abb. 21). Sowohl Flurbiprofen als auch Ibuprofen führten im ToxR-Assay zu einer Reduktion der Dimerisierungsstärke (Abb. 21A und B). Allerdings waren hierfür relativ hohe Konzentrationen notwendig. So mussten für eine Abnahme der Dimerisierung um ca. 40% etwa  $50 \mu\text{M}$  Flurbiprofen oder  $50 \mu\text{M}$  Ibuprofen eingesetzt werden. Bemerkenswerterweise zeigte das potente GSM-1, welches einen sehr geringen EC<sub>50</sub>-Wert für die A $\beta$ 42-reduzierende Wirkung hat, im Vergleich zu Sulindac Sulfid einen deutlich verstärkten Effekt (Abb. 21C). Schon  $0,5 \mu\text{M}$  GSM-1 waren ausreichend, um die Dimerisierungsstärke um über 10% herabzusetzen. In Anwesenheit von  $5 \mu\text{M}$  GSM-1 betrug die Dimerisierung gegenüber der DMSO-Kontrolle nur noch 60%.

Die GSMs Flurbiprofen, Ibuprofen und GSM-1 beeinflussten unter den gewählten experimentellen Bedingungen des ToxR-Assays weder die Zelldichte der verwendeten Bakterien (Abb. 21D-F) noch den Expressionsspiegel des ToxR-Fusionsproteins (Abb. 21H-I).

Da sich für eine Gruppe von GSMs eine spezifische Dimer-schwächende Wirkung zeigte, stellte sich die Frage, ob sich im Umkehrschluss die Dimerisierung der APP-TMS durch iGSMs verstärken lässt. Die Substanz Fenofibrat zeigte im ToxR-Assay jedoch bei Konzentrationen bis zu  $20 \mu\text{M}$  keinen Einfluss auf die Dimerisierung (Abb. 22A). Höhere Konzentrationen an Fenofibrat konnten nicht getestet werden, da Fenofibrat sehr hydrophob ist und im verwendeten Medium ausfiel. Ganz anders verhielt sich das iGSM Celecoxib (Abb. 22B). Die Stärke der Dimerisierung der APP-TMS ließ sich durch Celecoxib modulieren. Besonders interessant ist, dass hierbei verglichen mit den getesteten GSMs die entgegengesetzte Wirkung beobachtet werden konnte und bereits  $2,5 \mu\text{M}$  zu einer um 20% verstärkten Dimerisierung führten.



**Abb. 21: Dimerisierung der APP-TMS in Anwesenheit von Flurbiprofen, Ibuprofen oder GSM-1.** Die Dimerisierungsstärke der APP-TMS in Anwesenheit von Flurbiprofen (A), Ibuprofen (B) oder GSM-1 (C) wurde anhand des Substratumsatzes durch die gebildete  $\beta$ -Gal ermittelt. Die DMSO-Kontrolle wurde jeweils auf 100% gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 10$  (A) / 9 (B) / 3 (C). Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zur DMSO-Kontrolle an (\* $p < 0,0001$ , Student t-Test). (D–F) Kontrolle des Bakterienwachstums nach 6 h Inkubation. Die Zelldichte der *E. coli* FHK-Zellen wurde bei 620 nm (OD620) gemessen und die DMSO-Kontrolle jeweils auf 100% gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 10$  (D) / 9 (E) / 3 (F). (G–I) Western-Blots zur Kontrolle des Expressionspiegels der ToxR-Fusionsproteine nach 6 h Inkubation. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des anti-MBP-Antikörpers



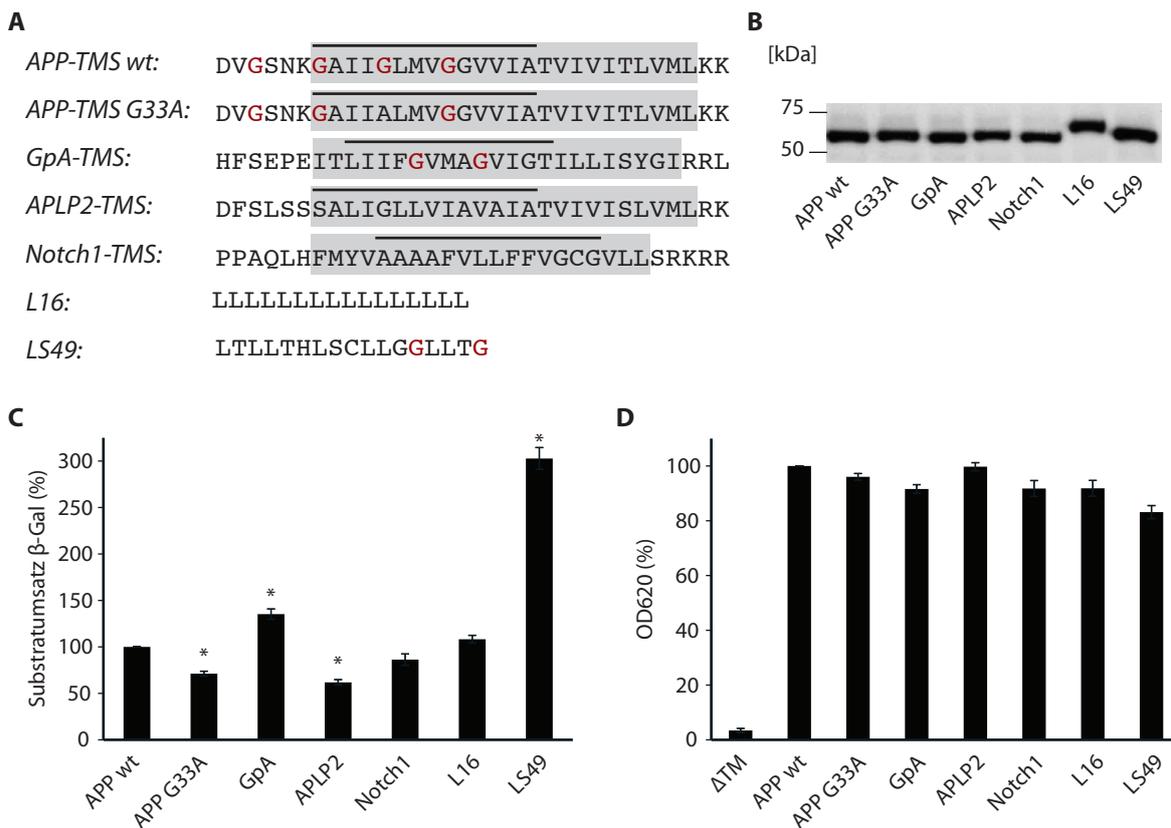
**Abb. 22: Dimerisierung der APP-TMS in Anwesenheit der iGSMs Fenofibrat und Celecoxib.** Die Dimerisierungsstärke der APP-TMS in Anwesenheit von Fenofibrat (A) oder Celecoxib (B) wurde anhand des Substratumsatzes durch die gebildete  $\beta$ -Gal ermittelt. Die DMSO-Kontrolle wurde jeweils auf 100% gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 9-10$  (A) /  $11-14$  (B). Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zur DMSO-Kontrolle an ( $*p < 0,0001$ , Student t-Test). (C, D) Bakterienwachstum nach 6 h Inkubation. Die Zelldichte der *E. coli* FHK-Zellen wurde bei 620 nm (OD620) gemessen und die DMSO-Kontrolle jeweils auf 100% gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 9-10$  (C) /  $11-14$  (D). (E, F) Western-Blots zur Kontrolle des Expressionsspiegels der ToxR-Fusionsproteine nach 6 h Inkubation. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des anti-MBP-Antikörpers.

Durch die Inkubation mit Fenofibrat und Celecoxib wurde die Zelldichte der im ToxR-Assay verwendeten Bakterien nicht beeinflusst (Abb. 22C und D). Auch der Expressionsspiegel des ToxR-Fusionsproteins war gegenüber der DMSO-Kontrolle stets vergleichbar (Abb. 22E und F).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sowohl GSMs als auch iGSMs mit der APP-TMS interagieren und auf die Dimerisierungsstärke Einfluss nehmen können.

### 2.3.2 Analyse der Spezifität der Wirkung von Sulindac Sulfid und Celecoxib auf die TMS-Dimerisierung

Neben APP existiert eine Vielzahl von Transmembranproteinen, die über ihre TMS dimerisieren, darunter auch andere Substrate der  $\gamma$ -Sekretase. Aus diesem Grund war von besonderem Interesse, die Spezifität der GSMs und iGSMs hinsichtlich ihrer modulierenden Wirkung bei der APP-TMS-Dimerisierung zu analysieren.



**Abb. 23: Dimerisierung ausgewählter ToxR-Fusionsproteine.** (A) Dargestellt sind Sequenz-Ausschnitte der Transmembranproteine APP, APP mit der GxxxG-Mutation G33A, GpA, APLP2 und Notch1 sowie die Oligo-Leucin-Sequenzen L16 und LS49. Die jeweiligen TMS sind grau unterlegt. Glycin-Reste, die einem GxxxG-Motiv zugeordnet werden können, sind rot hervorgehoben. Aminosäuresequenzen der im Kontext von ToxR exprimierten TMS sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet. (B) Zur Kontrolle der gleichmäßigen Expression der ToxR-Fusionsproteine wurden gleiche Zellzahlen lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte im Western-Blot mittels anti-MBP-Antikörpers. (C) Anhand des Substratumsatzes durch die gebildete  $\beta$ -Gal konnte die Dimerisierung der untersuchten TMS verglichen werden. Der Substratumsatz des Konstrukts APP-TMS wt wurde gleich 100% gesetzt (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 12-17$ ). Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zu APP-TMS wt an (\* $p < 0,0001$ , Student t-Test). (D) PD28-Assay als Kontrolle der Membranintegration der verwendeten Konstrukte. Die Zelldichte wurde bei 620 nm nach 48 h Inkubation gemessen. Die Zelldichte der Sequenz APP-TMS wt wurde auf 100% gesetzt (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 5-8$ ). Transfizierte PD28-Zellen können die MBP-Defizienz durch korrekte und effiziente Membranintegration komplementieren und in Medium mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen.

Dazu wurden zunächst alternative Konstrukte im ToxR-System auf ihre Selbstaffinität untersucht und mit derjenigen der wildtypischen APP-TMS verglichen (Abb. 23). Es wurden neben der bereits gut untersuchten APP-GxxxG-Mutante, bei der das Glycin an Position 33 (entsprechend der A $\beta$ -Numerierung) zu Alanin ausgetauscht wurde (APP-TMS G33A) (Munter et al., 2007), die Sequenz K75–T87 des Transmembranproteins Glycophorin A (GpA-TMS), die Sequenz S693–A706 des APP-homologen APLP2 (APLP2-TMS) sowie die Sequenz A1740–G1753 aus dem  $\gamma$ -Sekretase-Substrat Notch1 (Notch1-TMS) getestet (Abb. 23A). Des Weiteren kamen die Oligo-Leucin-Sequenzen L16 mit mittelmäßiger und LS49 mit hoher Selbstaffinität zum Einsatz (Herrmann et al., 2009).

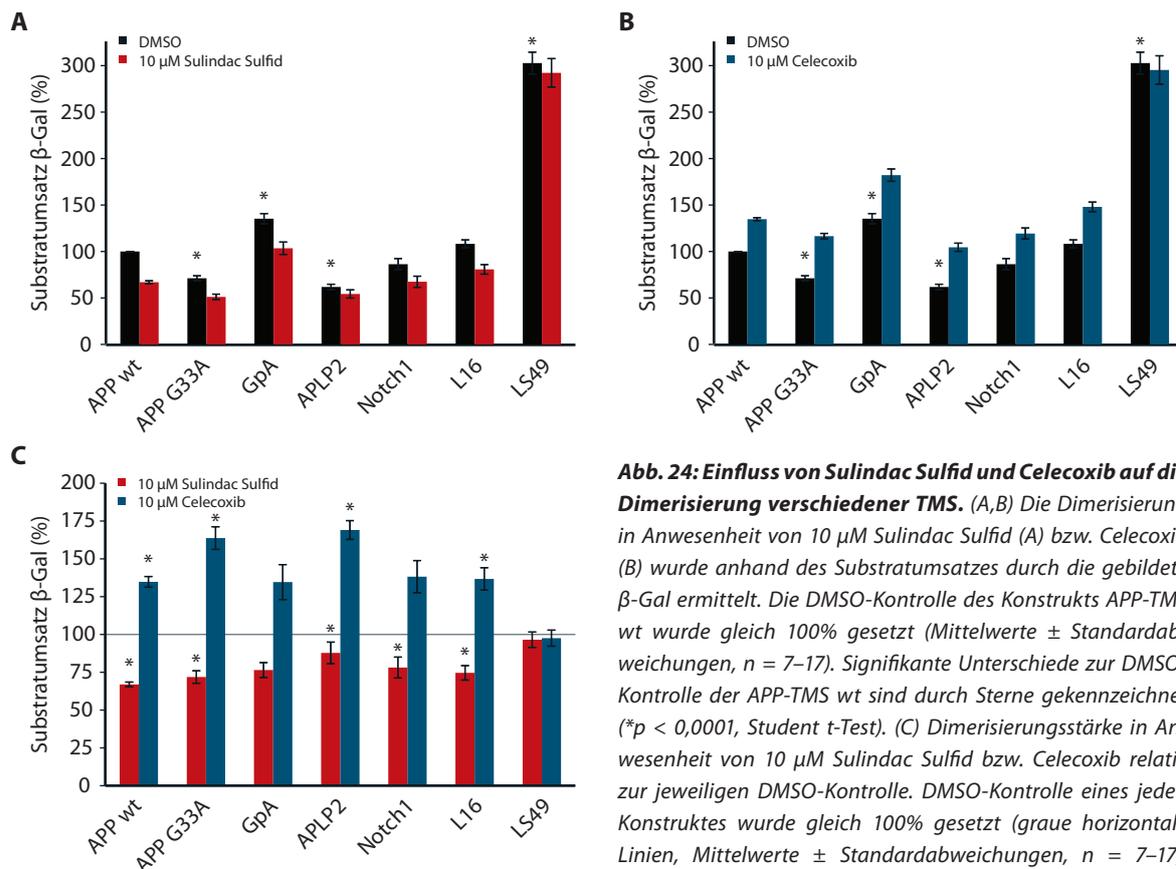
Wie bereits gezeigt, führte die Mutation G33A in der APP-TMS zu einer Destabilisierung des Dimers (Munter et al., 2007). Hier wurde im Vergleich zur wildtypischen Sequenz eine Reduktion der Dimerisierung um 24% ermittelt. Die Affinität, mit der das bereits gut charakterisierte Konstrukt GpA-TMS dimerisiert, war vergleichsweise hoch (128%) und liegt im Wesentlichen an

der dichten Packung der Seitenketten an der Kontaktfläche, die das GxxxG-Motiv ermöglicht (MacKenzie und Fleming, 2008). Im Gegensatz dazu wies die TMS von APLP2 eine relativ geringe bis mäßige Dimerisierung auf (65%), während sich die Konstrukte Notch1-TMS und L16 recht ähnlich der wildtypischen APP-TMS verhielten und nur eine leichte Schwächung des Substratumsatzes durch die  $\beta$ -Gal zeigten (87% bzw. 93%). Besonders auffallend war die hohe Selbstaffinität der Modell-Sequenz LS49 (~300%), die wohl maßgeblich vom gleichzeitigen Vorhandensein des Histidins und des GxxxG-Motivs abhängt (Herrmann et al., 2009). Zusammengefasst können die Selbstaffinitäten der untersuchten Sequenzen folgendermaßen dargestellt werden: LS49 > GpA-TMS > APP-TMS wt > L16 > Notch1-TMS > APP-TMS G33A > APLP2-TMS (Abb. 23C).

Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass der Expressionsspiegel fast aller Konstrukte mit der wildtypischen APP-TMS vergleichbar war (Abb. 23B). Lediglich das APLP2-Konstrukt scheint etwas schwächer exprimiert worden zu sein. Dies könnte mit zum verringerten Substratumsatz durch die  $\beta$ -Gal beigetragen haben. Die ToxR-Fusionsproteine mit den Sequenzen L16 oder LS49 besitzen zusätzlich einen His-Tag. Der dadurch erzeugte Größenunterschied war nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel detektierbar.

Um als Ursache für die unterschiedliche Signalstärke im ToxR-Assay unterschiedliche Konzentrationen der ToxR-Fusionsproteine in der inneren Bakterienmembran auszuschließen, wurde deren Membranintegration mittels PD28-Assay überprüft. Bei diesem Kontrollexperiment wurden die Konstrukte in MBP-defizienten *E. coli*-Zellen des Stammes PD28 exprimiert. Das Konstrukt  $\Delta$ TM ist ein ToxR-Fusionsprotein mit deletierter TMS. Es liegt als Monomer im Zytoplasma exprimierender Bakterienzellen vor und repräsentiert den basalen Expressionsspiegel der  $\beta$ -Gal durch den *ctx*-Promotor (Brosig und Langosch, 1998). Alle verwendeten Konstrukte waren in der Lage, die MBP-Defizienz von PD28-Zellen zu komplementieren, so dass die transformierten PD28-Zellen in einem Mangelmedium mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen konnten (Abb. 23D). Die Effizienz der Membranintegration der untersuchten Konstrukte war dabei ungefähr genauso hoch wie die von APP-TMS wt und lässt somit auf eine vergleichbare Konzentration der ToxR-Fusionsproteine in der inneren Bakterienmembran schließen.

Nachdem die Selbstaffinität der verschiedenen Sequenzen bestimmt worden war, wurde deren Interaktion in Anwesenheit von 10  $\mu$ M Sulindac Sulfid (Abb. 24A) bzw. 10  $\mu$ M Celecoxib (Abb. 24B) mittels ToxR-System analysiert. Hierbei wird deutlich, dass sich nicht nur die Dimerisierungsstärke der APP-TMS durch Sulindac Sulfid und Celecoxib modulieren lässt. So wurde die Dimerisierung der G33A-Mutante durch Sulindac Sulfid um weitere 20% reduziert. Celecoxib hingegen scheint die geschwächte Dimerisierung von G33A aufzuheben und das Dimer effektiv zu stabilisieren, so dass die Dimerisierungsstärke in Gegenwart von 10  $\mu$ M Celecoxib sogar über das Niveau der wildtypischen APP-TMS angestiegen war (117%). Ähnlich verhielt es sich mit den anderen TMS, bis auf LS49. Für eine bessere Vergleichbarkeit und zur Darstellung des prozentualen Einflusses der beiden Substanzen auf die verschiedenen Sequenzen wurden diese Daten auf die DMSO-Kontrolle der jeweilig untersuchten ToxR-Konstrukte normiert (Abb. 24C). Offensichtlich ist Sulindac Sulfid in der Lage, die Dimerisierungsstärke ganz verschiedener TMS um ungefähr 25% zu vermindern, während Celecoxib den gegenteiligen Effekt zeigte und die Dimerisierung um wenigstens 30% zu steigern vermag. Die TMS von APLP2, welche vergleichsweise schwach dimerisierte, zeigte nach Inkubation mit Sulindac Sulfid eine eher gemäßigte Reduktion der



**Abb. 24: Einfluss von Sulindac Sulfid und Celecoxib auf die Dimerisierung verschiedener TMS.** (A,B) Die Dimerisierung in Anwesenheit von 10 µM Sulindac Sulfid (A) bzw. Celecoxib (B) wurde anhand des Substratumsatzes durch die gebildete β-Gal ermittelt. Die DMSO-Kontrolle des Konstrukts APP-TMS wt wurde gleich 100% gesetzt (Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 7–17). Signifikante Unterschiede zur DMSO-Kontrolle der APP-TMS wt sind durch Sterne gekennzeichnet (\*p < 0,0001, Student t-Test). (C) Dimerisierungsstärke in Anwesenheit von 10 µM Sulindac Sulfid bzw. Celecoxib relativ zur jeweiligen DMSO-Kontrolle. DMSO-Kontrolle eines jeden Konstruktes wurde gleich 100% gesetzt (graue horizontale Linien, Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 7–17). Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum jeweiligen Referenzwert an (\*p < 0,0001, Student t-Test).

Dimerisierung (Reduktion um 12%). Celecoxib jedoch konnte die Selbstaffinität dieses Konstruktes überdurchschnittlich stark erhöhen. Interessanterweise konnte für die besonders hochaffine TMS LS49 kein signifikanter Einfluss der Substanzen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass neben der wildtypischen APP-TMS durchaus auch weitere Sequenzen der Dimer-stabilisierenden bzw. Dimer-schwächenden Wirkung von GSMs bzw. iGSMs ausgesetzt sein können. Ist die Affinität, mit der die TMS dimerisieren, allerdings sehr hoch, so lässt sich die Dimerisierungsstärke nicht mehr effektiv modulieren.

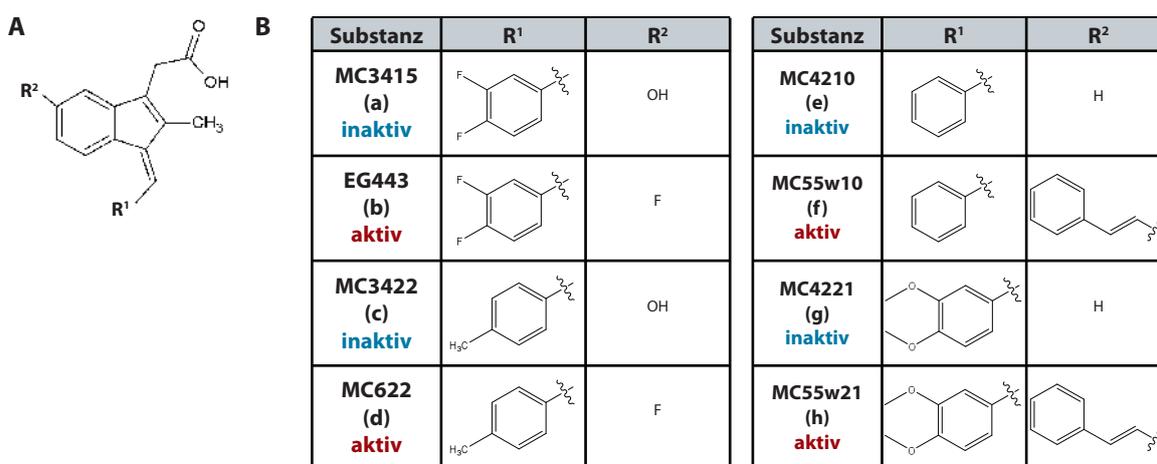
## 2.4 Analyse und Charakterisierung neuartiger Sulindac-Derivate

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits deutlich gezeigt werden, dass sich geringfügige strukturelle Unterschiede nicht nur auf die Aβ-modulierende Wirkung, sondern auch auf die Affinität gegenüber der Aβ-Sequenz und auf die Fähigkeit, die Dimerisierungsstärke von TMS zu reduzieren, auswirken können. So bindet das GSM Sulindac Sulfid effektiv an Aβ42 und vermindert die Dimerisierung der APP-TMS bereits in niedrigen mikromolaren Konzentrationen, während sich Sulindac bezüglich dieser Eigenschaften inaktiv verhält.

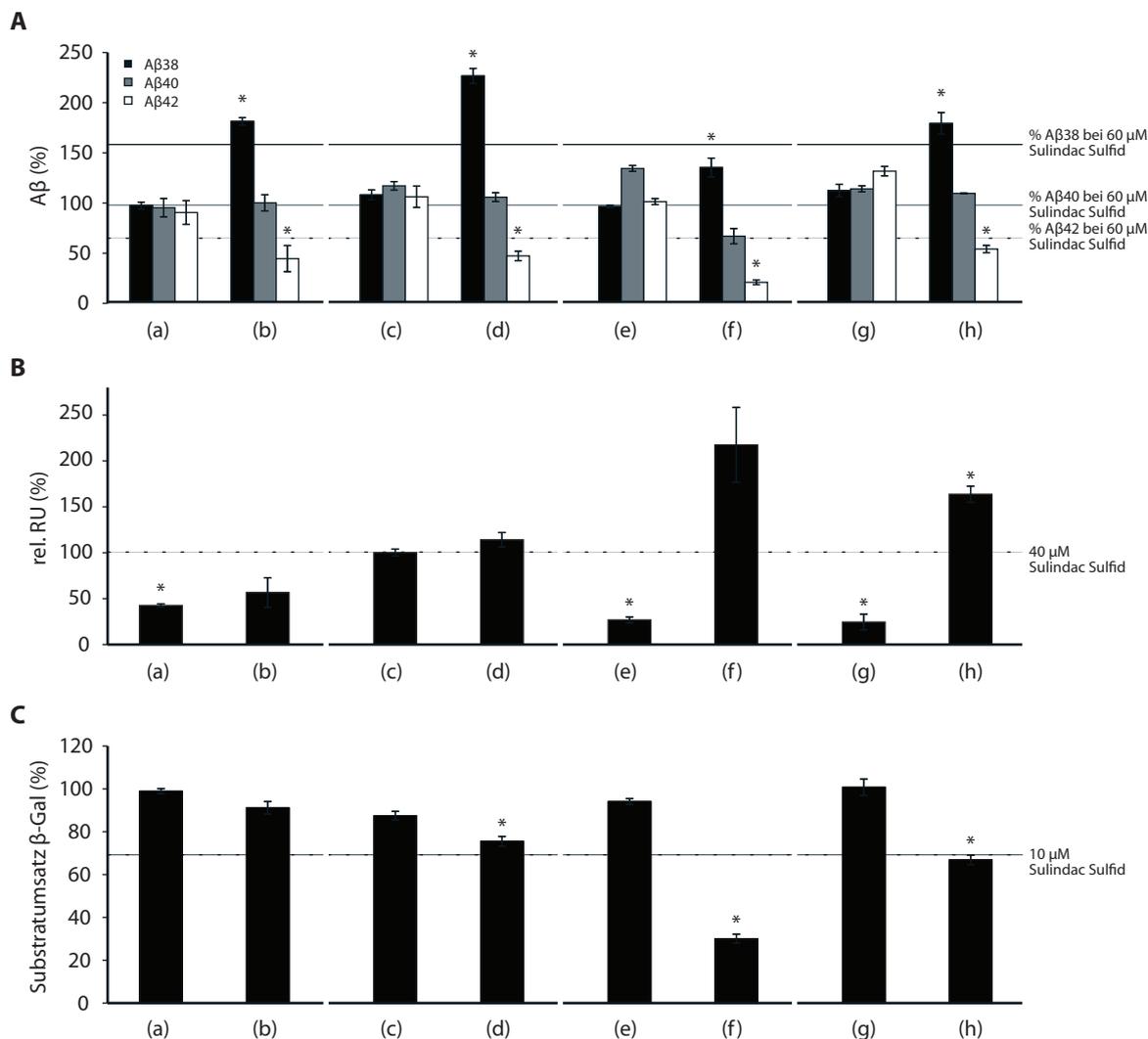
Um genauere Aussagen über die Struktur-Wirkungs-Beziehung von Sulindac-Derivaten treffen zu können und eine Strategie zur chemischen Optimierung zu entwickeln, wurden abgeleitet von der Sulindac-Grundstruktur verwandte Substanzen synthetisiert und anschließend im Zellsystem auf ihre Aβ-modulierende Wirkung hin untersucht. Im Labor von Prof. Dr. Herbert

Waldmann (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund) wurde hierbei der Heterozyklus von Sulindac durch Einführung hydrophober funktioneller Gruppen an Position R<sup>1</sup> oder Elektronen-ziehender Substituenten an Position R<sup>2</sup> modifiziert (Abb. 25).

In einer in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sascha Weggen (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurden CHO-Zellen, die sowohl das humane Wildtyp-APP751 als auch das humane Wildtyp-PS1 stabil überexprimierten, für 24 h mit je 60 µM dieser Substanzen behandelt, um dann die Aβ<sub>38</sub>-, Aβ<sub>40</sub>- und Aβ<sub>42</sub>-Mengen aus konditioniertem Medium mittels ELISA (»enzyme-linked immunosorbent assay«) zu quantifizieren (Abb. 26A). Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle verminderten die Substanzen (b), (d), (f) und (h) Aβ<sub>42</sub> um weit mehr als 70%, wobei Substanz (f) mit einer Reduktion der Aβ<sub>42</sub>-Menge auf 20% den deutlichsten Effekt zeigte. Substanz (g) erhöhte die Aβ<sub>42</sub>-Menge leicht, wobei dieser Effekt nicht signifikant war. Des Weiteren zeigten die Substanzen (b), (d), (f) und (h) eine verstärkte Prozessierung zu Aβ<sub>38</sub>, was eine inverse Beziehung zwischen Aβ<sub>42</sub> und Aβ<sub>38</sub> erkennen lässt. Die Erhöhung von Aβ<sub>38</sub> durch Substanz (f) war dabei verhältnismäßig gering und erreichte den Effekt von Sulindac Sulfid (Erhöhung von Aβ<sub>38</sub> um ~165%) nicht. Vergleichbar mit Sulindac Sulfid zeigten die meisten Derivate keinen Einfluss auf die Aβ<sub>40</sub>-Produktion. Eine Ausnahme stellte Substanz (e) dar, die zu einer erhöhten Aβ<sub>40</sub>-Menge führte. Außerdem wurde für Substanz (f), welche die größte Aβ<sub>42</sub>-reduzierende Wirkung hatte, eine leichte Abnahme der Aβ<sub>40</sub>-Menge beobachtet. Die Wirkung der Substanz (f) auf die Aβ-Produktion ähneln den Effekten der sorgfältig analysierten GxxxG-Mutante G33I (Munter et al., 2007). Diese Mutante, welche die Dimerisierung der APP-TMS fast vollständig verhindern konnte, zeigte ebenfalls eine wesentliche Reduktion der Aβ<sub>40</sub>- und Aβ<sub>42</sub>-Menge, während Aβ<sub>38</sub> nur wenig erhöht wurde. Entsprechend dieser Ergebnisse konnten Sulindac-Derivate mit gleichem Substituenten in Position R<sup>1</sup> in Zweiergruppen bestehend aus jeweils einer aktiven und einer inaktiven Substanz zusammengefasst werden. Als aktiv wurden diejenigen Substanzen klassifiziert, die im Vergleich zu Sulindac Sulfid die Aβ<sub>42</sub>-Generierung mit gleicher oder erhöhter Effektivität herabsetzen konnten (Abb. 25).



**Abb. 25: Übersicht über neuartige Sulindac-Derivate.** (A) Sulindac-Grundstruktur, von der neue Substanzen abgeleitet wurden. (B) Tabellarische Übersicht über die strukturellen Eigenschaften der untersuchten Sulindac-Derivate. Substanzen, die im Zellsystem eine Aβ<sub>42</sub>-reduzierende Wirkung besaßen, wurden als »aktiv« klassifiziert, andernfalls als »inaktiv«. R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>: Substituenten.



**Abb. 26: Sulindac-Derivate und Analyse ihrer Aβ-modulierenden Wirkung, ihrer Bindung an die Aβ-Sequenz sowie ihres Einflusses auf die Dimerisierung der APP-TMS.** (A) ELISA: Aβ38-, Aβ40- und Aβ42-Menge nach Behandlung von CHO-Zellen (APP CHO PS1-wt) mit einer Substanzkonzentration von 60 μM. Die DMSO-Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt (Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3). Signifikante Unterschiede zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (\*p < 0,005, Student t-Test). 60 μM Sulindac Sulfid erhöhen Aβ38 um ca. 60% (schwarze horizontale Linie) und reduzieren Aβ42 um ca. 40% (gestrichelte horizontale Linie), ohne dabei Aβ40 zu beeinflussen (graue horizontale Linie). (B) SPR-Analyse: Substanzkonzentrationen von 40 μM wurden bei einer Flussrate von 30 μl/min über immobilisiertes Aβ42 gegeben. Die Assoziationsphase wurde für 30 s verfolgt. Die Sensorgramme wurden um das entsprechende Molekulargewicht der Substanzen korrigiert. RU-Werte am Ende jeder Injektion wurden in Prozent angegeben (RU nach Injektion von 40 μM Sulindac Sulfid wurden auf 100% gesetzt, gestrichelte horizontale Linie, Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3, \*p < 0,01, Student t-Test). (C) ToxR-Assay: Das ToxR-Fusionsprotein mit der APP-TMS und eine Substanzkonzentration von je 10 μM wurden verwendet. Bei dieser Konzentration führt Sulindac Sulfid zu einer Reduktion der Dimerisierungsstärke der APP-TMS um 33% (gestrichelte horizontale Linie). Die DMSO-Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt (Mittelwerte ± Standardabweichungen, n = 3, \*p < 0,01, Student t-Test).

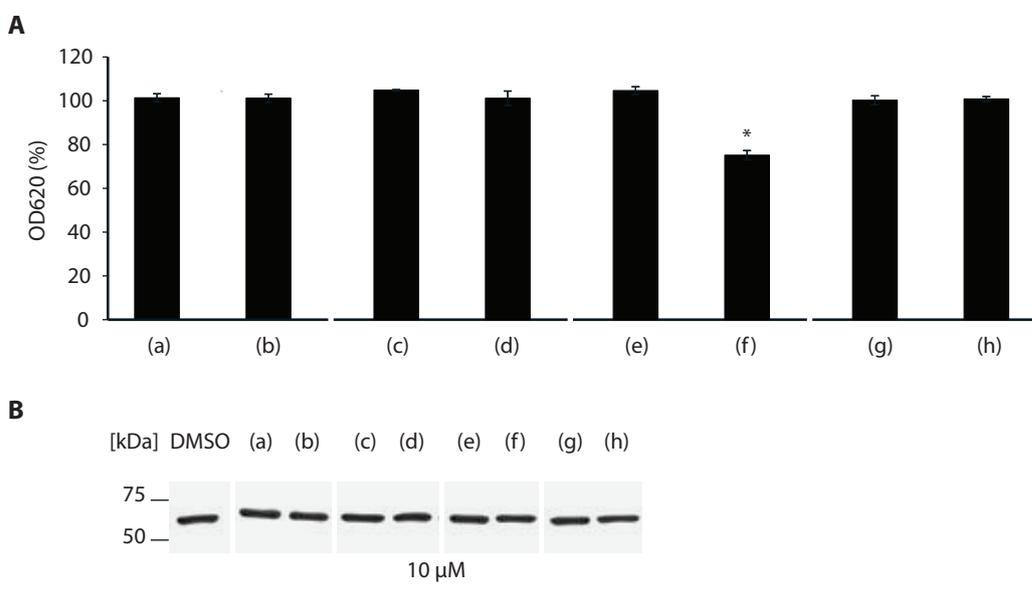
Im Folgenden sollten diese Substanzen auch hinsichtlich ihrer Bindung an die Aβ-Sequenz und ihres Einflusses auf die Dimerisierungsstärke der APP-TMS analysiert werden. Um mit Hilfe der Biacore-Technik die direkte Interaktion mit der Aβ-Sequenz zu untersuchen, wurden je 40 μM dieser Substanzen auf immobilisiertes Aβ42-Peptid injiziert und die durchschnittlichen RU am Ende jeder Injektion mit demjenigen Signal verglichen, das eine Injektion von 40 μM Sulindac Sulfid hervorrief (Abb. 26B). Vier Substanzen zeigten eine reduzierte Bindung an immobilisiertes

Aβ42, nämlich (a), (b), (e) und (g). Zwei Sulindac-Derivate, (c) und (d), vermochten genauso gut wie Sulindac Sulfid mit Aβ42 zu interagieren, während die Substanzen (f) und (h) sogar zu einem erhöhten Signal führten.

Der Einfluss dieser Substanzen auf die Dimerisierungsstärke der APP-TMS wurde ermittelt, indem 10 μM dieser Substanzen im bakteriellen ToxR-System eingesetzt wurden (Abb. 26C). Bemerkenswerterweise bewirkten die drei Substanzen (d), (f) und (h), die auch eine Aβ42-reduzierende Wirkung zeigten, eine deutlich abgeschwächte Dimerisierung der APP-TMS. Derivat (f) bewirkte sogar eine Schwächung der Dimerisierungsstärke um 70% und stellte sich somit als besonders potente Substanz heraus. Hingegen hatten (a), (c), (e) und (g) nahezu keinen Effekt auf die Dimerisierung der APP-TMS sowie auf die Aβ42-Produktion. Substanz (b) zeigte bezüglich der Dimerisierungsstärke nur einen geringfügigen Effekt, was sich sehr gut mit der vergleichsweise schwachen Bindung an Aβ42 deckt. Diese Substanz war jedoch in der Lage, die Aβ42-Menge zu vermindern.

Das Wachstum der im ToxR-Assay verwendeten Bakterien wurde durch Zugabe der Substanzen nicht beeinflusst (Abb. 27A). Lediglich (f) führte unter den gewählten Bedingungen zu einer leichten Abnahme der Zelldichte. Die Expression des ToxR-Fusionsproteins war gegenüber der DMSO-Kontrolle stets vergleichbar (Abb. 27B).

Zusammengefasst zeigten die Substanzen graduelle Effekte in Hinsicht auf die Modulation der Aβ-Produktion, die direkte Interaktion mit der Aβ-Sequenz und die Beeinflussung der Dimerisierungsstärke der APP-TMS. Diesbezüglich verhielt sich Substanz (d) ganz ähnlich dem Sulindac Sulfid, während (f) und (h) sogar noch wirkungsvoller waren.



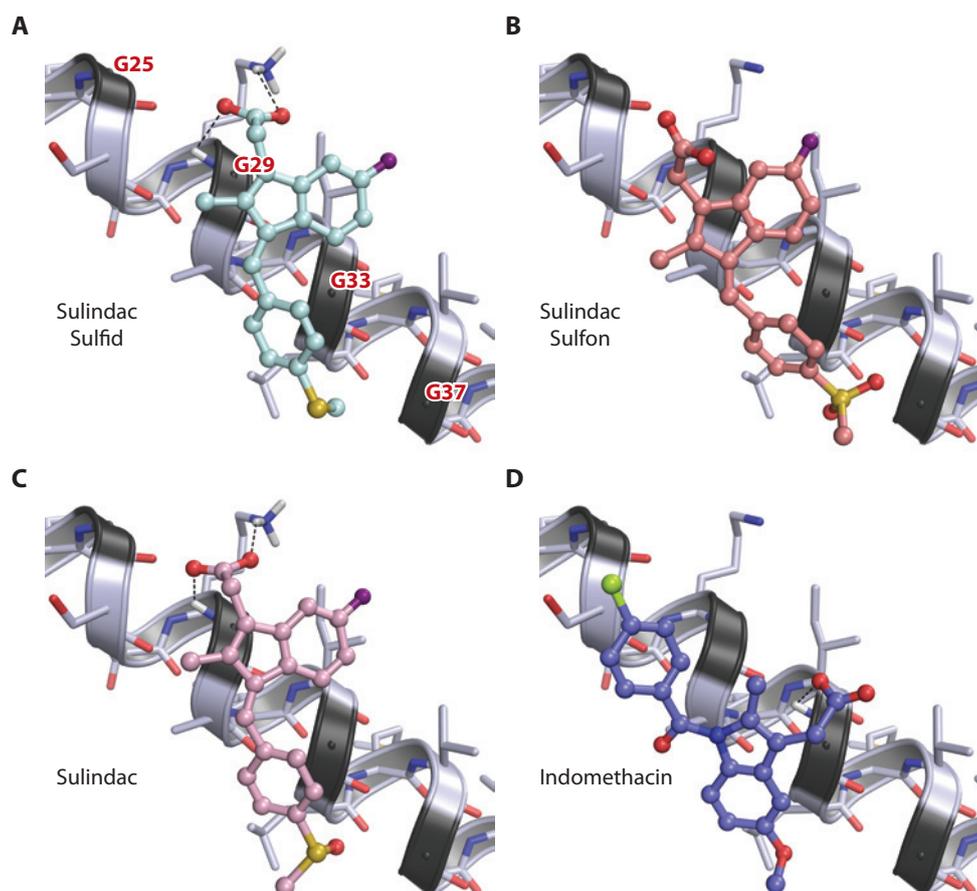
**Abb. 27: Bakterienwachstum und Expressionsspiegel der ToxR-Fusionsproteine nach 6 h Inkubation mit Sulindac-Derivaten.** (A) Vergleichbare OD620-Werte konnten in Anwesenheit der Substanzen (a) – (h) ermittelt werden. Lediglich 10 μM (f) verminderten die Zelldichte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle leicht. (B) Um die gleichmäßige Expression der ToxR-Fusionsproteine in Anwesenheit der Sulindac-Derivate zu kontrollieren, wurden Bakteriensuspensionen gleicher Zellzahl lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit Hilfe des anti-MBP-Antikörpers detektiert.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich weiterhin ableiten, dass Substituenten an Position R<sup>2</sup> einen wesentlichen Einfluss auf die genannten Aspekte haben. So war hier die Einführung von Elektronenziehenden Substituenten, insbesondere von Fluor und von Phenylethenyl-Substituenten, für die Wirkung essentiell. Hingegen beeinflussten die Substituenten an Position R<sup>1</sup> insbesondere die Lipophilie der Substanzen. Die Substanzen waren umso potenter, je hydrophober ihr Substituent an Position R<sup>1</sup> war. Dies könnte womöglich auch die Unterschiede zwischen Sulindac Sulfid und den beiden inaktiven Derivaten Sulindac und Sulindac Sulfon erklären.

Obwohl hier sehr verschiedene experimentelle Ansätze miteinander verknüpft wurden, verdeutlichen diese Resultate eindrucksvoll den Zusammenhang zwischen A $\beta$ -modulierender Wirkung, Affinität zur A $\beta$ -Sequenz und Einfluss auf die Dimerisierungsstärke der APP-TMS.

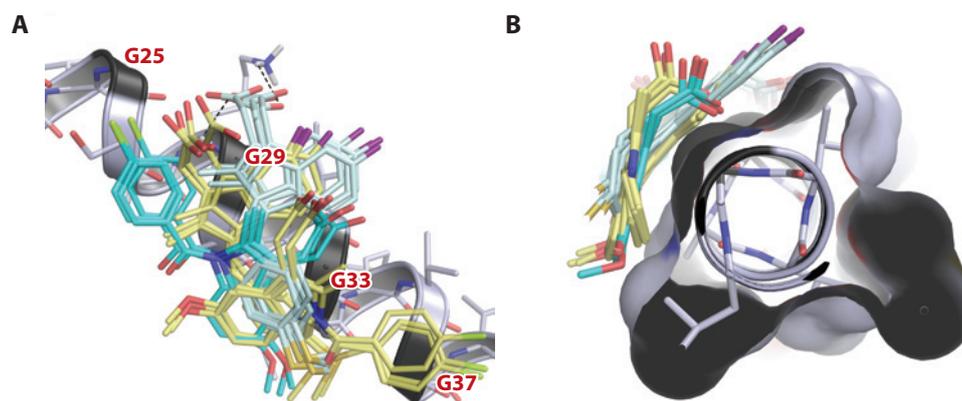
### 2.5 Molekulares Ligandenbindungs-Modell

Mittels SPR-Analysen konnte gezeigt werden, dass Sulindac Sulfid, Indomethacin und GSM-1 spezifisch an die Sequenz von A $\beta$ 42 binden. Es stellte sich zudem heraus, dass die APP-TMS für diese Interaktion von Bedeutung ist.

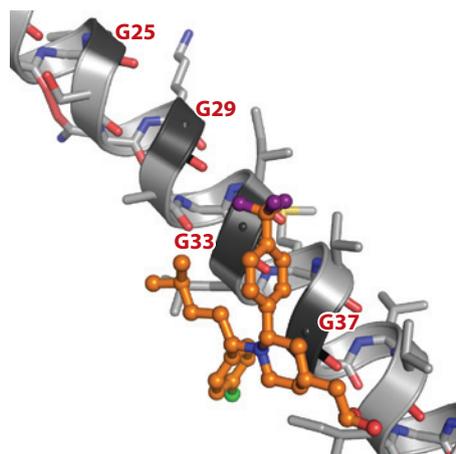


**Abb. 28: Computergestütztes Modell der Interaktion von Sulindac Sulfid und strukturell verwandter Substanzen mit der APP-TMS.** Dargestellt sind die Aminosäuren E23 bis V45. Für Sulindac Sulfid (A), Sulindac Sulfon (B), Sulindac (C) und Indomethacin (D) sind Ergebnisse mit höchstem »GOLD-Score« gezeigt. Sauerstoff-Atome sind rot, Stickstoff-Atome dunkelblau, Schwefel-Atome orange, Fluor-Atome violett und Chlor-Atome hellgrün gekennzeichnet. Potentielle Wasserstoff-Brücken-Bindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt.

Um die Bindungsstellen dieser Substanzen innerhalb der APP-TMS genauer zu bestimmen und die wahrscheinlichste räumliche Anordnung eines solchen Komplexes darzustellen, wurde von Dr. Peter W. Hildebrand (Charité, Berlin) mit Hilfe einer Software zur Simulation von Ligandenbindungen an Proteinen (»GOLD«) ein molekulares Modell erstellt (Abb. 28). Dazu wurde die Interaktion der Substanzen mit dem  $\alpha$ -helikalen Sequenz-Bereich von E23 bis V45 modelliert. Betrachtet man Sulindac Sulfid, seine inaktiven Derivate und Indomethacin in Abbildung 30, so fällt auf, dass sich alle Substanzen entlang einer flachen Helix-Oberfläche anlagerten, welche durch die Glycin-Reste G25, G29, G33 und G37 des GxxxG-Motivs gebildet wird. Alle vier Substanzen sind aufgrund ihres aromatischen Charakters sehr flach und rigide und können daher vorzugsweise Bindungen mit flachen Protein-Oberflächen eingehen. Des Weiteren besitzen die Substanzen eine günstige Länge von 10–12,5 Å und passen dadurch genau zwischen die Amid-Gruppen zweier benachbarter Glycine. Da sich die aromatischen Ringe der Substanzen nahezu parallel zur Helix-Achse anordnen, scheinen auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den delokalisierten  $\pi$ -Elektronen und einer partiell positiv geladenen N–H- oder C–H-Gruppe zum Tragen zu kommen (N–H... $\pi$  oder C–H... $\pi$ ) (McGaughey et al., 1998). Die Unterschiede in der Affinität der Substanzen gegenüber der APP-TMS sind vermutlich auf die uneinheitliche Ausbildung von Wasserstoff-Brücken-Bindungen zurückzuführen. So ist die Carboxyl-Gruppe von Sulindac Sulfid (Abb. 28A) bzw. Sulindac (Abb. 28B) über Wasserstoff-Brücken mit der Amid-Gruppe von G29 oder mit der freien Amino-Gruppe von K28 verbunden. Im Gegensatz zu Sulindac Sulfid bestehen jedoch Abstoßungskräfte zwischen der Sulfoxid-Gruppe im Sulindac und der Acyl-Gruppe von G33, was die deutlich schwächere Affinität von Sulindac zur APP-TMS erklärt. Für Sulindac Sulfon (Abb. 28C) wurden keinerlei Wasserstoff-Brücken-Wechselwirkungen mit Aminosäuren der APP-TMS gefunden, hingegen scheint eine Abstoßung bedingt durch die Sulfon-Gruppe gegeben. Indomethacin lagerte sich interessanterweise in entgegengesetzter Orientierung an die Helix-Oberfläche an und konnte über seine Carboxyl-Gruppe mit der Amid-Gruppe von G33 Wasserstoff-Brücken-Bindungen ausbilden (Abb. 28D). Abstoßungskräfte existieren aufgrund des hydrophoben Chlors als Substituenten nicht.



**Abb. 29: Interaktion von Sulindac Sulfid und Indomethacin mit der APP-TMS.** Dargestellt sind die Aminosäuren E23 bis V45. Gezeigt sind neben Ergebnissen mit höchstem »GOLD-Score« auch solche mit zweitbestem »GOLD-Score«. (A) Seitenansicht der Helix. Die Glycine des GxxxG-Motivs bilden die Kontaktfläche für die GSMs. Bevorzugt werden die Aminosäure-Reste G29 und G33. (B) Die Sichtweise entlang der Helix-Achse zeigt die flache Molekül-Oberfläche der APP-TMS, die durch die Glycine gebildet wird. Nur an diese Seite der Helix lagern sich die GSMs an. Sauerstoff-Atome sind rot, Stickstoff-Atome dunkelblau, Schwefel-Atome orange, Fluor-Atome violett und Chlor-Atome hellgrün gekennzeichnet. Gestrichelte Linien: potentielle Wasserstoff-Brücken-Bindungen.



**Abb. 30: Computergestütztes Modell der Interaktion von GSM-1 mit der APP-TMS.** Dargestellt sind die Aminosäuren E23 bis V45. Gezeigt sind Ergebnisse mit höchstem »GOLD-Score«. Sauerstoff-Atome sind rot, Stickstoff-Atome dunkelblau, Schwefel-Atome orange, Fluor-Atome violett und Chlor-Atome hellgrün gekennzeichnet.

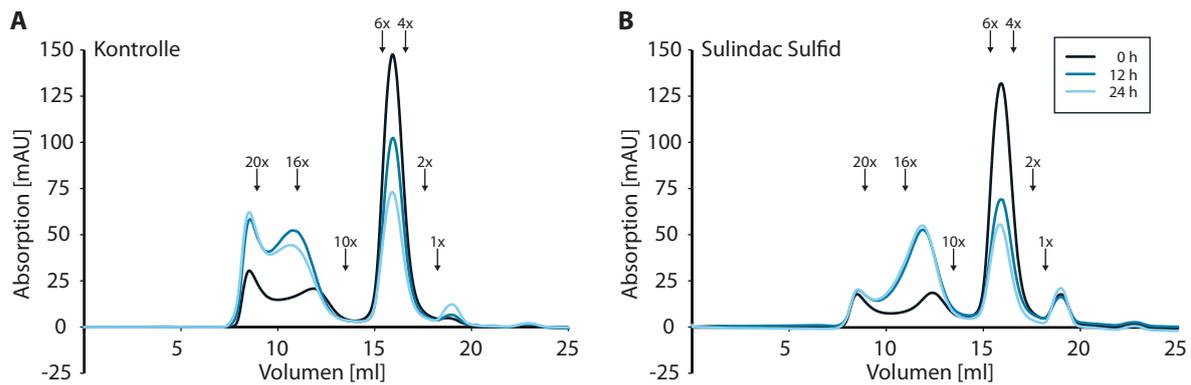
Aus Abbildung 29, in der auch Ergebnisse mit weniger gut bewertetem »GOLD-Score« dargestellt sind, wird deutlich, dass Sulindac Sulfid, anstatt an eine definierte Bindungstasche zu binden, eher mit der flachen Molekül-Oberfläche im Bereich der drei konsekutiven GxxxG-Motive interagieren kann.

Das molekulare Modell für die Interaktion der APP-TMS mit dem potenten GSM-1 zeigt, dass sich auch hier ein Komplex aus TMS und Substanz ausbilden kann (Abb. 30). Interessanterweise scheint GSM-1 das am weitesten C-terminal gelegene GxxxG-Motiv zu bevorzugen und lagerte sich in idealer Weise mit seinem Piperidin-Ring an G33 und mit seinem Trifluoromethyl-substituierten Phenyl-Ring an G37 der APP-TMS an. Die aromatischen Ringe lagen dabei fast parallel zur Helix-Achse, so dass die delokalisierten  $\pi$ -Elektronen optimal mit partiell positiv geladenen N–H- oder C–H-Gruppen der TMS wechselwirken können (McGaughey et al., 1998). Der Chlorophenyl-Ring ordnete sich genau dazwischen senkrecht zur Helix-Achse an.

Zusammengefasst bildet das GxxxG-Motiv der APP-TMS eine ideale Kontakt-Oberfläche für GSMs wie Sulindac Sulfid, Indomethacin und GSM-1, die bevorzugt zwischen den Glycin-Resten G29 und G33 bzw. G33 und G37 binden. Demnach konnten die experimentellen Daten durch das molekulare Ligandenbindungs-Modell unterstützt werden.

## 2.6 Einfluss von Sulindac Sulfid auf die Oligomerisierung von A $\beta$ 42

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass die durch A $\beta$ 42 vermittelten toxischen Effekte nicht auf die abgelagerten Plaques oder Fibrillen zurückzuführen sind, sondern vielmehr niedere Oligomere toxisch wirken. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, dass Sulindac Sulfid und ähnliche GSMs an die A $\beta$ -Sequenz binden und die Dimerisierung effektiv reduzieren können, warf die Frage auf, ob Sulindac Sulfid auch in der Lage ist, höhere oligomere Strukturen aufzulösen. Aus diesem Grund wurde die Oligomerisierung von A $\beta$ 42 in Anwesenheit von Sulindac Sulfid mittels SEC bei 214 nm verfolgt (Abb. 31). Dazu wurde eine Lösung aus 0,2 mM frisch gelöstem A $\beta$ 42 mit 1,25 mM Sulindac Sulfid oder mit dem Lösungsmittel als Kontrolle versetzt und anschließend für 24 h bei RT inkubiert. Da DMSO im relevanten Spektralbereich sehr stark absorbiert, wurde Methanol als Lösungsmittel für Sulindac Sulfid verwendet. Sulindac Sulfid selbst beeinträchtigte unter den gewählten experimentellen Bedingungen die Absorption des Peptids nicht. Nach 0 h, 12 h sowie 24 h wurden Aliquote der gleichen Stammlösung entnommen, abzentrifugiert und über eine SEC-Säule aufgetrennt.



**Abb. 31: Einfluss von Sulindac Sulfid auf die Oligomerisierung von Aβ42.** Synthetisches Aβ42 (100 μM) wurde für 24 h bei 25°C mit Methanol (8%) zur Kontrolle (A) oder mit 1,25 mM Sulindac Sulfid (B) inkubiert. Nach 0 h, 12 h und 24 h wurden jeweils 100 μl-Aliquote 1:4 mit PBS verdünnt und auf eine Superose 12 Säule gegeben. Die Oligomerisierungszustände (1x, 2x, 4x, ...) von Aβ42 sind im Chromatogramm durch Pfeile markiert.

Wie bereits von Harmeier et al. gezeigt, lag das frisch gelöste Aβ42-Peptid nicht nur in Form von Monomeren und Dimeren vor, sondern bildet in erster Linie große Mengen tetramerer und hexamerer Oligomerformen und geringere Mengen höherer Oligomere wie 16- und 20-mere (Abb. 31A) (Harmeier et al., 2009). Nach 12 h zeigte sich eine deutliche Abnahme von Tetrameren und Hexameren zugunsten von höheren Oligomeren. Der Anteil an niederen Oligomeren nahm über die folgenden 12 h noch weiter ab, wohingegen sich die Konzentration der höheren Oligomere nicht wesentlich veränderte. Es ist aber anzunehmen, dass über den langen Zeitraum von 24 h auch eine Aggregation hin zu protofibrillären Strukturen und reifen Fibrillen stattfand.

Im Beisein von Sulindac Sulfid zeigte das frisch gelöste Peptid eine zur Kontrolle ähnliche Oligomerverteilung. Auch hier waren vor allem Tetramere und Hexamere und nur kleine Mengen an Dimeren und höheren Oligomeren detektierbar (Abb. 31B). Bemerkenswerterweise nahm hier aber der Anteil an niederen Oligomeren über 24 h weitaus stärker ab. Nach 12 h und 24 h wurden insbesondere 16-mere gefunden. Dass die Konzentration der höheren Oligomere, insbesondere der 20-mere, zu diesen Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle insgesamt etwas niedriger war, ist vermutlich auf die Ausbildung noch höherer Aggregate zurückzuführen.

Der Peak beim Elutionsvolumen von 18,9 ml liegt außerhalb des molekularen Größenbereichs für Aβ42-Peptide und entspricht niedermolekularen Begleitkomponenten (z.B. Salzen).

Die Chromatogramme von frisch gelöstem Aβ42 in Abwesenheit und Anwesenheit von Sulindac Sulfid weisen große Ähnlichkeit auf. Wurde der Oligomerisierungszustand über einen Zeitraum von 24 h betrachtet, scheint Sulindac Sulfid jedoch tendenziell die Ausbildung höherer Aggregate auf Kosten der niederen Oligomere zu induzieren.

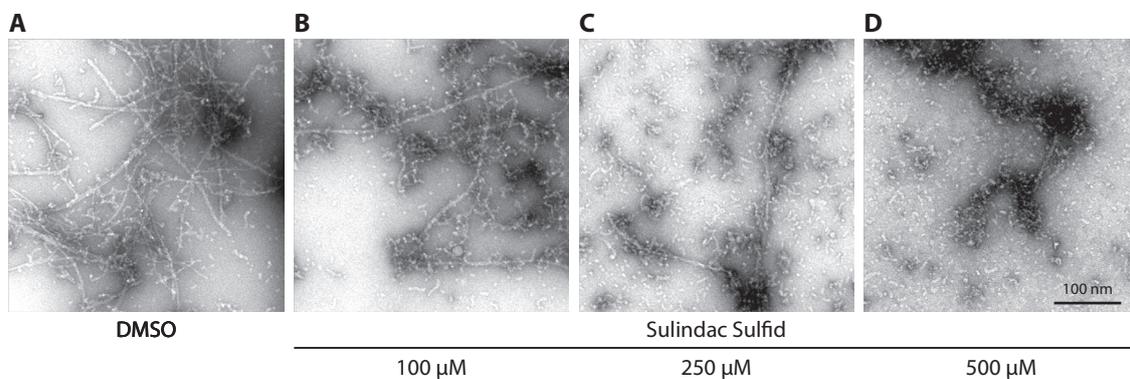
## 2.7 Einfluss von Sulindac Sulfid auf die Fibrillenbildung von Aβ42

In Gegenwart von Sulindac Sulfid zeigte sich für Aβ42 eine schnellere Abnahme niederer Oligomere. Um zu untersuchen, ob sich die Anwesenheit von Sulindac Sulfid auch auf den weiteren Aggregationsprozess auswirkt und die Substanz die Peptide schneller zu Fibrillen aggregieren lässt, wurde frisch gelöstes Peptid auf eine Konzentration von 50 μM eingestellt, direkt mit 100 μM, 250 μM oder 500 μM Sulindac Sulfid versetzt und für 48 h bei RT inkubiert. Als Kontrolle

diente eine mit DMSO versetzte A $\beta$ -Probe. Die Fibrillenbildung wurde anschließend mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen in Zusammenarbeit mit Dr. Rudi Lurz (Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin) analysiert.

Die Aufnahmen des Kontroll-Ansatzes zeigten, dass der Großteil des Peptids nach 48 h zu typischen maturierten A $\beta$ -Fibrillen gereift war (Walsh et al., 1997). Die entstandenen Fibrillen wiesen eine hohe Rigidität und eine durchschnittliche Länge von 595 nm  $\pm$  231 nm auf (Abb. 32A). Der Fibrillendurchmesser betrug in der Regel 11-14 nm. Lediglich ein geringer Teil des Peptids lag noch in Form von protofibrillären oder kleineren Aggregaten vor. In Gegenwart von 100  $\mu$ M Sulindac Sulfid aggregierte A $\beta$ 42 ebenfalls zu reifen Fibrillen (Abb. 32B), deren Dicke und Länge sich kaum von Fibrillen der DMSO-Kontrolle unterschied (Länge: 582 nm  $\pm$  203 nm). Auffällig war jedoch, dass hier vermehrt kleinere Aggregate mit einem Durchmesser von 11-14 nm und einer Länge von 50 nm  $\pm$  15 nm gefunden wurden. Wurde die Konzentration an Sulindac Sulfid auf 250  $\mu$ M erhöht, traten nur noch vereinzelt längere A $\beta$ -Fibrillen auf, wohingegen der Anteil an Protofibrillen, die in ihrer Länge nur 33 nm  $\pm$  9 nm umfassten, merklich zunahm (Abb. 32C). Bei Zugabe eines 10-fach molaren Überschusses an Sulindac Sulfid war die Fibrillenbildung fast vollständig inhibiert. Hier fanden sich nahezu keine reifen Fibrillen mehr. Vielmehr bildeten sich stark verkürzte Aggregate, die sich teilweise auch zu größeren amorphen Strukturen zusammenschlössen (Abb. 32D).

Diese Resultate zeigen, dass die Aggregation von A $\beta$ 42 zu einer reifen Fibrille im Beisein von Sulindac Sulfid deutlich erschwert ist und die Substanz die Fibrillenbildung konzentrationsabhängig stört.



**Abb. 32: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von aggregiertem A $\beta$ 42.** Synthetisches A $\beta$ 42 wurde für 48 h bei 25°C in Gegenwart von Sulindac Sulfid inkubiert. Mit zunehmender Konzentration an Sulindac Sulfid nimmt die Ausbildung langer Fibrillen ab. Bei einer Konzentration von 500  $\mu$ M Sulindac Sulfid A $\beta$ 42 sind fast nur noch protofibrilläre Strukturen zu beobachten.

### 3. Diskussion

Die GxxxG-vermittelte Dimerisierung der APP-TMS begünstigt die Bildung des neurotoxischen A $\beta$ 42-Peptids und stellt daher einen Risikofaktor für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit dar (Munter et al., 2007). Da sowohl eine abgeschwächte Dimerisierung der APP-TMS als auch die Anwesenheit niedermolekularer Substanzen die  $\gamma$ -Sekretase-abhängige Prozessierung modulieren und dadurch eine reziproke Veränderung der A $\beta$ 42- und A $\beta$ 38-Mengen herbeiführen kann (Kukar et al., 2005; Munter et al., 2007; Weggen et al., 2001), wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals klassische A $\beta$ 42-reduzierende (GSMs) sowie A $\beta$ 42-steigernde Substanzen (iGSMs) hinsichtlich ihres Einflusses auf die Dimerisierung eingehend untersucht.

Das GxxxG-Motiv im A $\beta$ 42-Peptid fördert zudem die Ausbildung toxisch wirkender Oligomere (Harmeier et al., 2009). Um auszuschließen, dass sich potentiell protektive Substanzen möglicherweise nachteilig auf den Aggregationsprozess auswirken und solche oligomeren Formen des A $\beta$ 42-Peptids stabilisieren, wurde in dieser Arbeit des Weiteren der Einfluss A $\beta$ 42-reduzierender Substanzen auf die Oligomerisierung und Fibrillenbildung von A $\beta$ 42 analysiert.

#### 3.1 Die APP-TMS als molekulares Target für GSMs und iGSMs

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die dimerisierende APP-TMS ein molekulares Target für Substanzen mit A $\beta$ -modulierender Wirkung darstellt. Im Folgenden werden sowohl experimentelle Hinweise aus dieser Arbeit als auch Befunde aus verschiedenen Publikationen aufgeführt, die diese Annahme untermauern:

Mittels SPR-Analyse wurde für die direkte Bindung des GSMs Sulindac Sulfid an die A $\beta$ -Sequenz eine Affinität im niedrigen mikromolaren Bereich ermittelt, während für Sulindac und sein Sulfon-Derivat keine signifikante Bindung an immobilisiertes A $\beta$ 42 festgestellt wurde. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus Zellkulturexperimenten, in denen Sulindac Sulfid je nach verwendeter Zelllinie und eingesetztem Medium für die A $\beta$ 42-reduzierende Wirkung einen EC50-Wert von 25–50  $\mu$ M aufweist, wohingegen weder Sulindac noch sein Sulfon-Derivat in der Lage sind, die A $\beta$ -Produktion zu beeinflussen (Czirr und Weggen, 2006; Weggen et al., 2001). Die Interaktion von Indomethacin mit der A $\beta$ -Sequenz ist entsprechend der gewonnenen SPR-Daten relativ gering, obwohl Indomethacin verglichen mit Sulindac Sulfid eine ähnliche Wirkung auf die A $\beta$ -Produktion zeigt (Czirr und Weggen, 2006; Weggen et al., 2001). Dass Flurbiprofen und Ibuprofen keinerlei Bindung an A $\beta$ 42 zeigten, ist vermutlich mit der mäßigen A $\beta$ -modulierende Wirkung dieser GSMs zu erklären (Czirr und Weggen, 2006). Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass die A $\beta$ 42-Reduktion durch diese Arylpropionsäure-Derivate über einen völlig anderen Mechanismus vermittelt wird.

Photoaffinitätsmarkierungs-Studien mit photoaktivierbaren Flurbiprofen- bzw. Fenofibrat-Derivaten von Kukar et al. konnten zeigen, dass GSMs und iGSMs nicht durch die Komponenten des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes gebunden werden, sondern durch APP, die APP-CTFs und A $\beta$ . Als minimale Bindungsstelle stellte sich der Bereich um die Aminosäuren 28–36 (nach der A $\beta$ -Numerierung) in der APP-TMS heraus, der auch das zentrale GxxxG-Motiv umfasst (Kukar et al., 2008). Interessanterweise konnte die Bindung der markierten Substanzen an rekombinant hergestelltes C100 auch durch solche GSMs wie Sulindac Sulfid und Indomethacin kompetiert werden,

.....  
was auf eine ähnliche Bindungsstelle dieser Substanzen hindeutet. Da die Konkurrenz durch Indomethacin im Vergleich zu Sulindac Sulfid jedoch weniger effizient war (Kukar et al., 2008), könnten für diese Substanz potentiell noch weitere Interaktionspartner oder andere Wirkmechanismen existieren, durch welche eine Modulation der A $\beta$ -Spezies hervorgerufen wird. Weiterhin ging aus dieser Studie hervor, dass bereits geringfügige strukturelle Unterschiede, wie im Fall des inaktiven Sulindac Sulfons, eine Konkurrenz vollständig verhindern können (Kukar et al., 2008).

Die Spezifität der Bindung von GSMs an C100 wurde später in Frage gestellt, als diese Interaktion in NMR-Analysen mit aufgereinigtem und in LMPG-Mizellen rekonstituiertem C100 nicht bestätigt werden konnte (Beel et al., 2009). Die gegensätzlichen Resultate sind laut Schlussfolgerung dieser Autoren darauf zurückzuführen, dass das von Kukar et al. untersuchte C100 (in 0,25% CHAPSO) unter den gewählten experimentellen Bedingungen wohl nicht als monodisperses Protein sondern als hochmolekulares Aggregat vorgelegen haben muss (Beel et al., 2009). Experimentelle Beweise, die diese Vermutung unterstützen, gibt es allerdings nicht. Hingegen wurde in der NMR-Studie wiederum nicht nachgewiesen, dass das verwendete Detergenz LMPG die Spaltung des C100 durch die  $\gamma$ -Sekretase überhaupt erlaubt. Dies lässt Zweifel über die native Konformation dieses Substrats offen.

In den SPR-Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte neben der Bindung von Sulindac Sulfid an die A $\beta$ -Sequenz auch eine Interaktion dieser Substanz mit C100 gezeigt werden. Dabei konnte sichergestellt werden, dass während der Kopplung an die Sensorchip-Oberfläche sowohl das frisch gelöste A $\beta$ 42 vorwiegend Monomere bildet als auch das nach der Methode von Botev et al. in SDS-Mizellen rekonstituierte C100 (Botev et al., 2011). Die NMR-spektroskopischen Daten, die in dieser Arbeit mit A $\beta$ 42 in Anwesenheit und Abwesenheit von Sulindac Sulfid gewonnen wurden, unterstützen zudem die Annahme, dass GSMs direkt mit der A $\beta$ -Sequenz wechselwirken und dass die APP-TMS maßgeblich an der Interaktion beteiligt ist. Um noch weitere Anhaltspunkte dafür zu finden, wurden neben dem wildtypischen A $\beta$ 42 auch Peptide mit Mutationen an Position 33 in den SPR-Analysen verwendet. Der Befund, dass die Bindung von Sulindac Sulfid an A $\beta$ 42 durch die Mutation G33A bereits leicht abgeschwächt wird, sowie der Befund, dass sich die Interaktion durch stärkere Mutationen im zentralen GxxxG-Motiv (G33I) noch sehr viel stärker stören lässt, machen deutlich, dass die Intaktheit des GxxxG-Motivs für die spezifische Bindung an die APP-TMS eine entscheidende Rolle spielt. Ein ähnliches Resultat lieferte auch eine SPR-Analyse mit C100 G33I, in der im Vergleich zum C100 wt eine verminderte Bindung an die Mutante festzustellen war (Botev et al., 2011).

Bemerkenswerterweise scheint die Sekundärstruktur für die Bindung von GSMs an die APP-TMS weniger von Bedeutung zu sein, da Sulindac Sulfid neben der  $\beta$ -Faltblatt-Struktur von A $\beta$ 42 auch mit dem  $\alpha$ -helikalen  $\gamma$ -Sekretase-Substrat C100 spezifisch in Wechselwirkung tritt. Daraus lässt sich vermutlich auch die duale Wirkung von Sulindac Sulfid ableiten, die einerseits die Modulation der A $\beta$ -Produktion und andererseits den Einfluss auf den Aggregationsprozess von A $\beta$ 42 einschließt.

Des Weiteren weisen die SPR-Experimente mit Sulindac Sulfid auf eine von einer 1:1 Stöchiometrie abweichende komplexere Stöchiometrie hin, die mit zunehmender Substanz-Konzentration von 0,2:1 auf 2:1 ansteigt. Diese Resultate legen nahe, dass Sulindac Sulfid wohl nicht

.....

nur mit einer genau definierten Bindungsstelle in der A $\beta$ -Sequenz interagiert, sondern vielmehr mit der durch die drei konsekutiven GxxxG-Motive gebildeten Molekül-Oberfläche in Kontakt treten kann. Für die  $\alpha$ -helikale Konformation der APP-TMS konnte diese Annahme mit Hilfe eines molekularen Ligandenbindungs-Modells bestätigt werden. Demzufolge bildet der gesamte die GxxxG-Motive umfassende Bereich der APP-TMS eine flache hydrophobe Helix-Oberfläche und erfüllt somit eine optimale Voraussetzung für die Anlagerung von Sulindac Sulfid sowie des strukturell verwandten Indomethacins. Diese flachen und äußerst rigiden Substanzen legen sich dabei aufgrund ihrer Länge von 10–12,5 Å vorzugsweise zwischen zwei benachbarte Glycine eines GxxxG-Motivs. Offensichtlich liegt eine Präferenz für das zentrale GxxxG-Motiv vor, wobei beispielsweise auch eine Interaktion mit dem C-terminal angrenzenden Motiv möglich scheint (Abb. 28 und 29).

Eine Erklärung, warum Sulindac Sulfid und Indomethacin, nicht jedoch Sulindac und Sulindac Sulfon mit der APP-TMS wechselwirken können, konnte ebenfalls aus den in dieser Arbeit erstellten Modellen abgeleitet werden. So bedingen Abstoßungskräfte zwischen der Sulfoxid- bzw. der Sulfon-Gruppe der beiden inaktiven Derivate und Aminosäuren der APP-TMS die deutlich schwächere Bindungsneigung. Zudem mangelt es im Fall dieser Substanzen an der Ausbildung von Wasserstoff-Brücken-Wechselwirkungen, die gleichsam wie für die Assoziation zweier nah beieinanderliegender Helices auch für die Bindung niedermolekularer Substanzen von Bedeutung zu sein scheint (Senes et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass das potente GSM-1, das sich strukturell von Sulindac Sulfid unterscheidet, ebenfalls an die A $\beta$ -Sequenz bindet. Aus den Bindungskurven der SPR-Analysen ging interessanterweise hervor, dass vermutlich auch GSM-1 mehr als eine definierte Bindungsstelle in der A $\beta$ -Sequenz besitzt. Insbesondere die langsame Dissoziationsrate weist darauf hin, dass der Komplex aus A $\beta$ 42-Peptid und Substanz vergleichsweise sehr stabil ist und könnte möglicherweise erklärend für die effiziente A $\beta$ 42-reduzierende Wirkung von GSM-1 sein. Auch wenn die Ergebnisse des molekularen Ligandenbindungs-Modells mit höchstem »Gold-Score« nahelegen, dass insbesondere das am weitesten C-terminal gelegene GxxxG-Motiv in der APP-TMS für die Interaktion mit GSM-1 verantwortlich ist, so ist wohl auch bei dieser Substanz davon auszugehen, dass die gesamte Dimer-Kontaktfläche als molekulares Target in Frage kommt. Inwiefern die untersuchten Substanzen auch in weiteren Bereichen der A $\beta$ -Sequenz binden, konnte mittels der computergestützten Modelle nicht abgeschätzt werden, da lediglich die Sequenz von E23 bis V45 in die Berechnungen einbezogen wurde.

Nach Ergebnissen dieser Arbeit zeigen weder Celecoxib noch Fenofibrat eine direkte Bindung an die A $\beta$ -Sequenz. Dies steht im scheinbaren Widerspruch zu veröffentlichten Daten, da in der bereits erwähnten Studie auch ein photoaktivierbares Fenofibrat-Derivat mit der APP-TMS quervernetzt werden konnte (Kukar et al., 2008). Vor dem Hintergrund, dass immobilisiertes A $\beta$ 42 in den SPR-Experimenten überwiegend als Monomer vorlag, während das  $\gamma$ -Sekretase-Substrat in aufgereinigter Form (als C100) bzw. angereichert in solubilisierten Membranfraktionen (als  $\beta$ -CTF) vermutlich zu einem beträchtlichen Anteil auch als Dimer auftrat (Botev et al., 2011; Kukar et al., 2008; Wang et al., 2011), ist eine Präferenz von iGSMs für das Substrat-Dimer anzunehmen. Dies würde auch die gegensätzlichen Resultate erklären. Auch wenn derzeit keine experimentellen Beweise für diese Vermutung vorliegen, deutet ein erstes vorläufiges molekulares

Ligandenbindungs-Modell darauf hin, dass das iGSM Celecoxib bevorzugt an die dimere APP-TMS bindet und dabei die beiden TMS-Helices wie eine Art Klammer zusammenhält (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren sprechen auch die Ergebnisse der ToxR-Assays für diese Hypothese.

### 3.2 Postulierte Bindungsstellen für GSMs und iGSMs

Wie einleitend beschrieben geht aus verschiedenen Veröffentlichungen die Annahme hervor, dass GSMs und iGSMs allosterisch an den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex binden und das Enzym somit in seiner Schnittspezifität beeinflussen können (Beher et al., 2004; Takahashi et al., 2003; Weggen et al., 2003a; Weggen et al., 2003b). Tatsächlich schlagen die Autoren einer jüngst publizierten Photoaffinitätsmarkierungs-Studie einen Bindungsmechanismus vor, wonach GSM-1 sowie ein strukturell verwandtes iGSM an die hydrophobe C-terminale Hälfte der TMS1 von Presenilin 1 binden (Aminosäuren 61–110) und dadurch eine konformationelle Änderung an der hydrophilen zytosolischen Seite dieser TMS hervorrufen (Ohki et al., 2011). Diese hydrophobe Region nimmt sowohl an der Assemblierung des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes als auch an der Substraterkennung teil und ist zudem dafür bekannt, über intensive TMS-TMS-Interaktionen mit benachbarten TMS im Presenilin 1 maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Presenilin-Struktur beteiligt zu sein (Takagi et al., 2010; Watanabe et al., 2010). Es ist daher durchaus denkbar, dass neben dem GxxxG-Motiv in der APP-TMS auch diese hydrophobe C-terminale Hälfte der TMS1 die Bindung bestimmter niedermolekularer Substanzen begünstigt, zumal beide Targets sogar eine ähnliche topologische Position innerhalb des Lipid-Bilayers der Membran aufweisen. Ein Rückschluss auf eine Interaktion von Sulindac Sulfid und strukturell verwandten Substanzen mit dieser Region kann jedoch nicht gezogen werden, da in dieser Publikation weder eine direkte Bindung noch eine Konkurrenz durch diese Substanzen gezeigt wurde (Ohki et al., 2011).

Des Weiteren gibt es Indizien, dass durch sehr hohe Konzentrationen an Sulindac Sulfid oder Indomethacin auch der Proteolysemechanismus einer Signalpeptid-Peptidase (SPP), einer Presenilin-ähnlichen Aspartatprotease mit inverser Topologie, gegenüber einem synthetischen Prolaktin-Signalpeptid beeinflusst werden kann (Sato et al., 2006). Eine spezifische Bindungsstelle für GSMs wurde in diesem Enzym bisher allerdings nicht nachgewiesen.

Zudem wurde für sogenannte GSMs der zweiten Generation, die sich von klassischen NSAID-ähnlichen GSMs im Wesentlichen durch das Fehlen der Carboxylgruppe unterscheiden, die Bindung an Pen-2 postuliert (Kounnas et al., 2010). Die Interaktion soll dabei entweder direkt oder über ein Heterodimer bestehend aus Pen-2 und dem NTF von Presenilin 1 vermittelt werden (Kim und Sisodia, 2005; Kounnas et al., 2010). Diese neuartigen Substanzen mit einem Phenylimidazol als Pharmakophor vermindern neben A $\beta$ 42 allerdings auch A $\beta$ 40 und erhöhen gleichzeitig sowohl A $\beta$ 38 als auch A $\beta$ 37 (Kounnas et al., 2010). Folglich wirken sich solche Substanzen nicht nur auf die A $\beta$ 42-Produktlinie (A $\beta$ 48–A $\beta$ 45–A $\beta$ 42–A $\beta$ 38) aus, sondern beeinflussen überlappend auch deutlich die A $\beta$ 40-Produktlinie (A $\beta$ 49–A $\beta$ 46–A $\beta$ 43–A $\beta$ 40–A $\beta$ 37). Ein vergleichbarer Effekt auf die A $\beta$ -Produktion wurde außerdem für GSMs der zweiten Generation mit verbrückten Ringsystemen gefunden, die an das NTF von Presenilin 1 und Presenilin 2 binden können (Ebke et al., 2011). Insofern ist nahe liegend, dass solche Substanzen die Entstehung von A $\beta$ -Peptiden durch Interaktion mit Komponenten des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes über einen von dem der klassischen GSMs generell verschiedenen Mechanismus modulieren können. Ferner ist nicht

.....  
 auszuschließen, dass GSMs mit verschiedenen molekulare Targets wechselwirken oder auch genau an der Kontaktfläche zwischen Enzym und Substrat wirken könnten (Uemura et al., 2010).

Diesen Ergebnissen und den Befunden der vorliegenden Arbeit zufolge, lassen sich A $\beta$ -modulierende Substanzen in verschiedene Gruppen einteilen: (i) Substanzen, die ihre Wirkung primär über die Bindung an das Substrat vermitteln, (ii) Substanzen, die vorwiegend über die Bindung an Komponenten des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes wirken und (iii) Substanzen, die in der Lage sind, sowohl mit der  $\gamma$ -Sekretase als auch mit seinem Substrat direkt zu interagieren. Schließlich bleibt auch festzuhalten, dass anscheinend insbesondere hydrophobe TMS-Bereiche, die zu intensiven Wechselwirkungen mit anderen TMS neigen, für eine spezifische Bindung von GSMs und iGSMs geeignet sind.

### 3.3 Modulation der Substrat-Dimerisierung als Wirkmechanismus von GSMs und iGSMs

Aktuell werden verschiedene Mechanismen der Wirkung von GSMs und iGSMs kontrovers diskutiert. So wird beispielsweise von Autoren einer FLIM/FRET-Studie angenommen, dass GSMs wie Ibuprofen und Flurbiprofen eine Konformationsänderung im Presenilin auslösen und infolgedessen die Ausrichtung des Substrats zum katalytischen Zentrum der  $\gamma$ -Sekretase beeinflussen können (Lleo et al., 2004). Darüber hinaus wird vermutet, dass sich die Position des  $\gamma$ -Sekretase-Substrats durch die direkte Interaktion mit GSMs oder iGSMs relativ zum katalytischen Zentrum des Enzyms verändert. Demnach würden GSMs dem Substrat ermöglichen, weiter im Lipid-Bilayer der Membran zu »versinken«, während iGSMs das Substrat eher in Richtung des luminalen/extrazellulären Raumes aus der Membran »herausschieben« würden (Kukar et al., 2008). Auf diese Weise soll das Spaltungsverhalten der  $\gamma$ -Sekretase hin zu einer verminderten bzw. vermehrten A $\beta$ 42-Produktion moduliert werden. Aus Studien von Gamerdinger et al. gingen die Befunde hervor, dass Sulindac Sulfid biologischen Membranen eine erhöhte Fluidität verleiht und die iGSMs Fenofibrat und Celecoxib indessen analog zu Cholesterol eine verstärkte Rigidität der Membran hervorrufen (Gamerdinger et al., 2007; Gamerdinger et al., 2008). Dadurch gelangten die Autoren indirekt zu der Schlussfolgerung, dass diese strukturellen Membranveränderungen auf die enzymatische Aktivität von Transmembranproteinen Einfluss nehmen können. Allerdings stehen diese Ergebnisse im deutlichen Widerspruch zu anderen Veröffentlichungen, da die veränderte Membranarchitektur offenbar nur eine Modulation der Gesamtmenge von A $\beta$  zur Folge hatte, nicht jedoch eine Modulation der A $\beta$ -Spezies (Gamerdinger et al., 2007; Gamerdinger et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass sowohl Sulindac Sulfid und strukturell verwandte GSMs als auch das Phenylpiperidin-Derivat GSM-1 die Dimerisierungsstärke der APP-TMS in einer biologischen Membran vermindern können, während das iGSM Celecoxib eine Dimer-stabilisierende Wirkung besitzt. Demzufolge ist eine veränderte  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung unmittelbar auf die durch niedermolekulare Substanzen vermittelte Modulation der TMS-Dimerisierung zurückzuführen.

Ein direkter Zusammenhang zwischen A $\beta$ -Produktion und Stabilität des Substrat-Dimers konnte bisher nur für Mutationen im GxxxG-Motiv gezeigt werden (Munter et al., 2010; Munter et al., 2007). Aus den experimentellen Befunden der Mutationsanalysen von Munter et al. gingen die

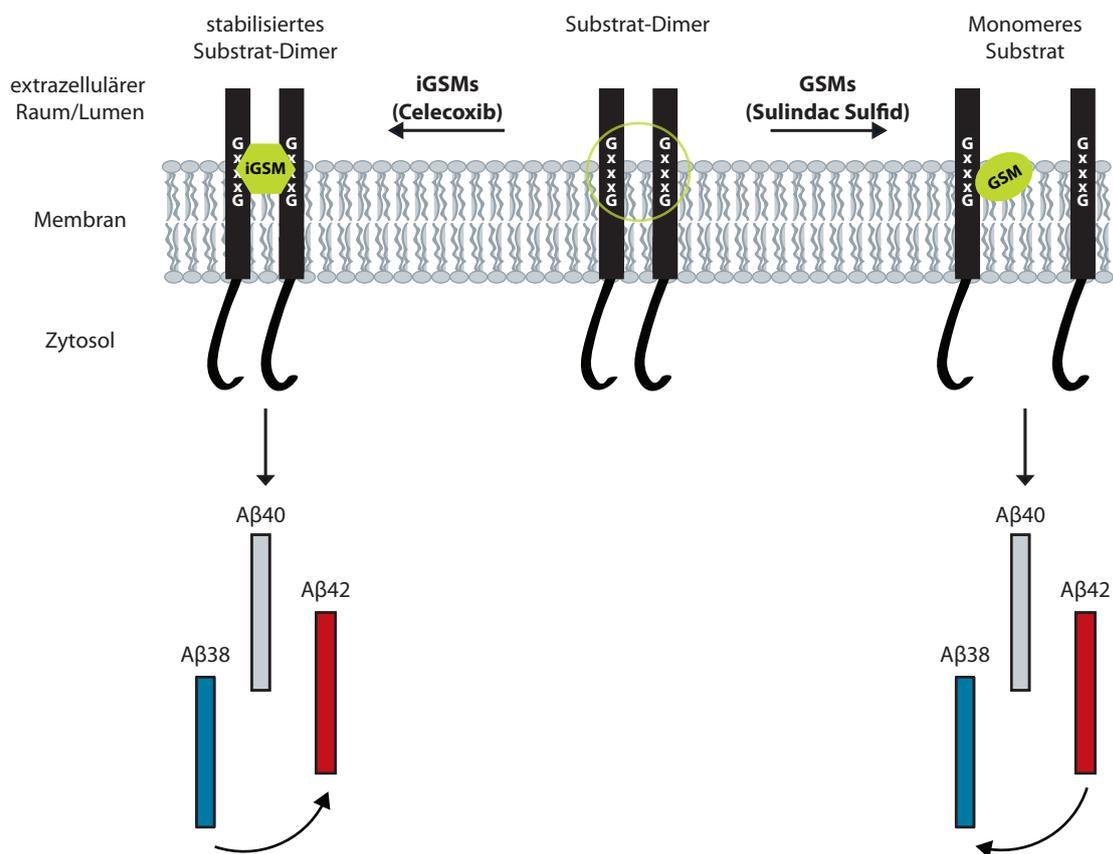
Erkenntnisse hervor, dass die Dimerisierung der APP-TMS einen bedeutenden Risikofaktor der Alzheimer-Krankheit darstellt und dass bereits eine geringfügige Schwächung der Dimerisierungsstärke eine beachtliche Reduktion der A $\beta$ 42-Menge mit sich bringt. So führen die GxxxG-Mutanten G29A und G33A beispielsweise zu einer 7%igen bzw. 23%igen Verminderung der Dimerisierung, reduzieren aber die A $\beta$ 42-Produktion um etwa 60% (Munter et al., 2007). Da 20  $\mu$ M Indomethacin bzw. 2,5  $\mu$ M Sulindac Sulfid bei einer 10%igen Reduktion der Dimerisierung eine vergleichbare Wirkung auf die A $\beta$ 42-Menge zeigen (Kukar et al., 2005; Weggen et al., 2001), können die Effekte dieser Substanzen direkt mit den Effekten der GxxxG-Mutaten verglichen werden. Übereinstimmend mit dem Befund, dass die Dimerisierung vornehmlich die A $\beta$ 42-Produktlinie beeinflusst, modulieren auch Sulindac Sulfid und strukturell verwandte GSMs sowie das potente GSM-1 hauptsächlich A $\beta$ -Spezies dieser Produktlinie und provozieren insbesondere den Prozessierungsschritt von A $\beta$ 42 zu A $\beta$ 38 (Kukar et al., 2005; Munter et al., 2007; Munter et al., 2010; Page et al., 2008; Weggen et al., 2001).

Aufgrund des amphiphilen Charakters des GSMs Sulindac Sulfid ist anzunehmen, dass diese Substanz gewissermaßen in den Lipid-Bilayer der Membran eintauchen kann, wobei die Carboxylgruppe in Richtung der polaren Membran-Oberfläche orientiert ist und sich der Sulfoxid-Substituent im Inneren der Membran im Bereich der hydrophoben Kohlenwasserstoff-Reste befindet. Tatsächlich existieren zwei Veröffentlichungen, in denen beschrieben ist, dass Sulindac Sulfid die Fähigkeit besitzt, in einer solchen Orientierung tief in den Lipid-Bilayer zu interkalieren und infolgedessen Wechselwirkungen mit den Phospholipiden der Membran einzugehen (Fan und Shen, 1981; Hwang und Shen, 1981). Bemerkenswerterweise wurde in diesem Zusammenhang auch gezeigt, dass Sulindac Sulfid mit hydrophoben Bereichen des heptahelikalen Transmembranproteins Bacteriorhodopsin aus *H. salinarum* interagieren und vermutlich auf diese Weise eine räumliche Distanzierung eng benachbarter TMS induzieren kann (Hwang und Shen, 1981). Für die inaktiven Substanzen Sulindac und Sulindac Sulfon hingegen wurde in diesen Studien lediglich eine Anlagerung an die Membran-Oberfläche beobachtet. Da sich die chemischen Strukturen der drei Sulindac-Derivate nur im Oxidationszustand des Schwefelatoms und dementsprechend in ihrer Polarität unterscheiden, wird angenommen, dass die starke Interaktion von Sulindac Sulfid mit der Membranen und mit Membranproteinen auf dessen geringeren elektrischen Dipolmoment (Dipolmomente von Sulindac Sulfid, Sulindac und Sulindac Sulfon sind: 1,50, 3,96 bzw. 4,49) beruht (Fan und Shen, 1981; Hwang und Shen, 1981). Die Befunde aus diesen Veröffentlichungen untermauern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und machen deutlich, dass neben einer ausgeprägten Affinität zur APP-TMS die Fähigkeit, in Membranen zu interkalieren, eine weitere Voraussetzung für die effektive A $\beta$ -modulierende Wirkung darstellt.

Eindrucksvoll ist ebenfalls das Resultat einer Studie, in welcher der Einfluss exogener TMS-Peptide auf die TMS-vermittelte Dimerisierung des bakteriellen Chemotaxis-Rezeptors Tar mittels des ToxR-Systems untersucht wurde. Hierbei zeigte sich nämlich, dass die Dimerisierungsstärke der N-terminalen TMS dieses Rezeptors durch ein homologes Protease-resistentes Peptid konzentrationsabhängig herabgesetzt werden kann (Sal-Man et al., 2004). Demnach könnten wohl auch kurze Peptide die Dimerisierung der APP-TMS modulieren. Auf diese Vermutung aufbauend hat Paul Dembny im Rahmen seiner Diplomarbeit mögliche Effekte des sogenannten Inhibitor-Peptids mit der Sequenz RGTfEGKF-NH<sub>2</sub> auf die Dimerisierung analysiert. Dieses Peptid enthält

ein GxxxG-Motiv und ist dafür bekannt, andere GxxxG-Motive zu binden (Liu et al., 2005). In der Tat ließ sich die Dimerisierung der APP-TMS im Beisein von 50  $\mu\text{M}$  Inhibitor-Peptid um rund 15% schwächen (persönliche Mitteilung P. Dembny und G. Multhaupt). Somit birgt möglicherweise auch dieses kurze Peptid therapeutisches Potential.

Wie für alle nichtkovalenten Interaktionen ist auch für die GxxxG-vermittelte Dimerisierung der APP-TMS anzunehmen, dass in der Membran ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren besteht. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge scheint die Interaktion von GSMs mit der monomeren APP-TMS die Assoziation zweier benachbarter APP-TMS zu kompetieren. Auf diese Weise verschieben GSMs das Monomer-Dimer-Gleichgewicht zugunsten der Monomere. Hingegen bewirken iGSMs eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung des Dimers, möglicherweise bedingt durch eine Stabilisierung bereits existierender Substrat-Dimere. Auch wenn diese Wirkung nicht für alle untersuchten GSMs und iGSMs in gleicher Weise deutlich wurde, lässt sich dieser vorgeschlagene Wirkmechanismus jedoch insbesondere für potente klassische Substanzen in einem schlüssigen Modell zusammenfassen, welches die entgegengesetzten Effekte von GSMs und iGSMs überzeugend miteinander verknüpft (Abb. 33).



**Abb. 33: Modell des Wirkmechanismus von GSMs und iGSMs.** Gewisse GSMs sind in der Lage, durch direkte Interaktion mit der APP-TMS die GxxxG-vermittelte Dimerisierung herabzusetzen (rechts). Dadurch verschiebt sich das Monomer-Dimer-Gleichgewicht zugunsten des monomeren Substrats. Auf diese Weise bekommt die  $\gamma$ -Sekretase Zugang zu weiteren Schnittstellen und A $\beta$ 42 wird weiter zu kürzeren A $\beta$ -Spezies prozessiert. Hingegen stabilisieren einige iGSMs die Dimerisierung der APP-TMS, vermutlich durch Interaktion mit dem Substrat-Dimer (links). Infolgedessen findet eine Verschiebung des Monomer-Dimer-Gleichgewichts in Richtung des Dimers statt. Aufgrund der sterischen Hinderung im Substrat-Dimer bricht die sequentielle Proteolyse durch die  $\gamma$ -Sekretase frühzeitig ab, so dass vermehrt A $\beta$ 42 gebildet wird.

### 3.4 Spezifität der Wirkung von Sulindac Sulfid und Celecoxib auf die TMS-Dimerisierung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Sulindac Sulfid in der Lage ist, die Dimerisierungsstärke von TMS mit vergleichsweise schwacher (APP-TMS G33A und APLP2-TMS), mittelmäßiger (APP-TMS wt, Notch1-TMS und L16) sowie hoher Selbstaffinität (GpA-TMS) zu vermindern. Die Reduktion der TMS-Dimerisierung betrug bei allen in etwa 25%. Die TMS von APLP2 scheint hierbei etwas weniger auf Sulindac Sulfid zu reagieren. Celecoxib bewirkt erwartungsgemäß den gegenteiligen Effekt und stabilisiert die Dimerisierung dieser TMS um wenigstens 30%. Auffallend hierbei war der Befund, dass die Dimerisierung sowohl der TMS der GxxxG-Mutante G33A als auch der APLP2-TMS durch Celecoxib überdurchschnittlich stark erhöht wurde (um etwa 60%).

Nach den Erkenntnissen aus dieser Arbeit lassen diese Resultate die Schlussfolgerung zu, dass solche Dimer-Kontaktflächen mit intaktem GxxxG-Motiv (APP-TMS wt, GpA-TMS) oder aber auch GxxxA-Motiv (APP-TMS G33A) aufgrund der dichten Packung der Seitenketten eine günstige Kontaktfläche für die Interaktion mit Sulindac Sulfid darstellen. Dies ist auch in Einklang mit den SPR-Bindungsstudien, in denen der konservative Aminosäure-Austausch im GxxxG-Motiv von Glycin zu Alanin die Bindung von Sulindac Sulfid an die A $\beta$ -Sequenz nur geringfügig beeinflusste. Die TMS von APLP2 besitzt N-terminal ein GxxxG-ähnliches SxxxG-Motiv, welches bereits in der Rezeptor-Tyrosin-Kinase ErbB2 aus der Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren intensiv untersucht wurde. Dieses Motiv vermittelt ebenfalls die Dimerisierung von TMS-Helices, die jedoch im Vergleich zur GxxxG-vermittelten Dimerisierung in der GpA-TMS wesentlich schwächer ausgeprägt ist (Mendrola et al., 2002). Mit diesem besitzt die APLP2-TMS zwar offenbar auch ein für die Interaktion mit Sulindac Sulfid minimal erforderliches Aminosäure-Motiv, welches allerdings verglichen mit einem GxxxG- oder einem GxxxA-Motiv für die Wirkung von GSMs weniger gut geeignet zu sein scheint. Die Notch1-TMS verfügt über keines der bekannten Dimerisierungs-Motive, jedoch ist die Überrepräsentation von Phenylalanin-Resten in dimerisierenden TMS statistisch hochsignifikant und könnte die Assoziation zweier Notch1-TMS erklären (Unterreitmeier et al., 2007). Vermutlich begünstigen die elektrostatischen Wechselwirkungen mit den delokalisierten  $\pi$ -Elektronen der Phenylalanin-Reste auch die Bindung von Sulindac Sulfid an der Dimer-Kontaktfläche der Notch1-TMS.

Entsprechend der ToxR-Daten und der in dieser Arbeit hergeleiteten Hypothese, dass das iGSM Celecoxib seine A $\beta$ 42-reduzierende Wirkung durch Bindung an die dimere APP-TMS entfaltet, kommen vermutlich auch die TMS von Notch1 und GpA in dimerer Form als Target für diese Substanz in Frage. Darüber hinaus vermag Celecoxib anscheinend sogar noch besser mit der APP-TMS G33A und der APLP2-TMS zu interagieren, die tendenziell weniger stark miteinander assoziieren können. Da gemäß der ToxR-Daten bei diesen beiden TMS das dynamische Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren ohne den Einfluss von Substanzen generell weiter in Richtung des Monomers zu liegen scheint, ist jedoch auch anzunehmen, dass Celecoxib hier eine wesentlich deutlichere Verschiebung des Monomer-Dimer-Gleichgewichts in Richtung des Dimers bewirkt als beispielsweise im Fall der wildtypischen APP-TMS, bei der das Gleichgewicht von vornherein schon viel weiter auf Seiten des Dimers liegt.

Aus molekulardynamischen Simulationen in Membranen ist bekannt, dass die Aminosäure-Seitenketten benachbarter Oligo-Leucin-Sequenzen reißverschlussartig ineinandergreifen und

dabei im Gegensatz zu TMS mit GxxxG-Motiv vorzugsweise linkshändige Helix-Helix-Paare mit positivem Kreuzungswinkel ( $\Omega > 0$ ) bilden (Ash et al., 2004). Da auch die Dimerisierungsstärke der Sequenz L16 von Sulindac Sulfid und Celecoxib beeinflusst wird, scheint die Interaktion mit diesen Substanzen nicht vom Kreuzungswinkel abhängig zu sein.

Mit der Oligo-Leucin-Sequenz LS49 wurde eine Sequenz gefunden, die hinsichtlich ihrer Selbstaffinität weder durch Sulindac Sulfid noch durch Celecoxib moduliert werden kann. Bemerkenswerterweise besitzt LS49 von allen untersuchten Sequenzen die höchste Selbstaffinität. Diese erklärt sich zum einen durch die Existenz des C-terminalen GxxxG-Motivs und zum anderen durch das Vorhandensein des Histidins an Position 6 sowie der Aminosäuren mit hydroxylierter Seitenkette an den Positionen 2, 5 und 8, die allesamt an der Ausbildung ausgeprägter interhelikaler Wasserstoff-Brücken-Bindungen beteiligt und dadurch besonders interaktionsfördernd sind (Herrmann et al., 2009). Es lässt sich nun mutmaßen, dass sich die Helix-Helix-Interaktion energetisch sehr viel günstiger darstellt als eine Assoziation zwischen TMS und GSM. In diesem Fall wäre eine effiziente Konkurrenz durch eine Substanz nur mit sehr viel höheren Konzentrationen möglich. Eine ausbleibende Verstärkung der Dimerisierung dieser Sequenz durch iGSMs könnte gegebenenfalls daraus resultieren, dass der Anteil der dimerisierenden TMS bereits zu hoch ist, als dass eine weitere Steigerung zu erzielen wäre. Vielleicht ist die Sequenz LS49 aber auch allgemein ungünstig, um mit den untersuchten Substanzen in Kontakt zu treten. In jedem Fall zeigt dieses Beispiel, dass nicht jede TMS, die zur Dimerisierung neigt, als molekulares Target für GSMs und iGSMs geeignet ist.

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Modulation der Dimerisierung durch niedermolekulare Substanzen nicht ausschließlich auf die APP-TMS beschränkt ist, sondern darüber hinaus auch verschiedene andere dimerisierende TMS beeinflusst werden können.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden Chimären des C100-Proteins untersucht, bei denen die N-terminale Hälfte der TMS (GAIIGLMVGGVVIAT) durch entsprechende Aminosäurereste der Notch1-TMS (LHFMYVAAAFAVLL) oder der APLP2-TMS (GALIGLLVIAVAIATV) ersetzt wurde (Sagi et al., 2011). Bei letzterer TMS wurde zudem das SxxxG-Motiv in ein GxxxG-Motiv überführt. Die Resultate zeigten, dass die Sensitivität gegenüber Sulindac Sulfid beim Austausch mit der APLP2-TMS erhalten bleibt, während der Austausch mit der TMS von Notch1 zu keiner Modulation der entstandenen chimären A $\beta$ -ähnlichen Peptide führt (Sagi et al., 2011). Obwohl in dieser Studie weder die Konformation noch die Tendenz zur Dimerisierung dieser chimären  $\gamma$ -Sekretase-Substrate analysiert wurde, ist aufgrund der großen Ähnlichkeit der TMS von APLP2 und APP (75% Identität) wohl anzunehmen, dass sich diese TMS im C100 ähnlich verhalten. Die Befunde unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und unterstreichen somit auch die Bedeutung des GxxxG-Motivs für die Interaktion mit Sulindac Sulfid. Hingegen lässt der Austausch mit der Notch1-TMS einen weitaus größeren Einfluss auf die Struktur des chimären Proteins vermuten und daher nur bedingt einen direkten Widerspruch zu den in dieser Arbeit gewonnenen Befunden erkennen.

Bereits in früheren Veröffentlichungen wurde nachgewiesen, dass murines Notch1 über seine TMS dimerisiert und dass das membranständige C-terminale Notch-Fragment NEXT nach erfolgtem »ectodomain shedding« (S2-Schnitt) vergleichbar mit dem  $\beta$ -CTF zunächst im Bereich

der zytoplasmatischen Seite der Membran (S3-Schnitt) durch die  $\gamma$ -Sekretase gespalten wird (Chandu et al., 2006; Okochi et al., 2006; Vooijs et al., 2004). Anschließend erfolgt ebenfalls eine schrittweise Verkürzung zu A $\beta$ -ähnlichen Peptiden, wobei hauptsächlich N $\beta$ 21 und N $\beta$ 25 in einem Verhältnis von ~5:1 gebildet werden (Okochi et al., 2006). Auch für APLP2 konnte kürzlich gezeigt werden, dass durch mehrfaches Schneiden der  $\gamma$ -Sekretase im Bereich der luminalen/extrazellulären Seite der Membran neben einem Peptid aus 39 Aminosäuren mindestens sechs weitere A $\beta$ -ähnliche Peptide entstehen (Hoggl et al., 2011). Inwiefern diese unterschiedlich langen A $\beta$ -ähnlichen Peptide eine physiologische Relevanz haben, ist bisher allerdings nicht bekannt. Es ist jedoch zu vermuten, dass diese Peptide vollständig durch die  $\gamma$ -Sekretase gespalten werden oder aufgrund ihrer geringen Stabilität auch als Substrate anderer Proteasen dienen und auf diese Weise abgebaut werden.

Aus einer Publikation von Okochi et al. geht hervor, dass Sulindac Sulfid und auch Indomethacin die Prozessierung des murinen Notch1 modulieren können, was eine verminderte Produktion von N $\beta$ 25 und eine Erhöhung der N $\beta$ 21-Menge zur Folge hat (Okochi et al., 2006). Genau wie auch bei der Prozessierung von APP wird dabei die Gesamtmenge an N $\beta$ -Peptiden nicht verändert. Auch die  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung an der S3-Schnittstelle wird durch die Wirkung dieser Substanzen nicht unterbunden, so dass das NICD ohne Einschränkungen in den Zellkern translozieren und die Transkription von Zielgenen aktivieren kann (Okochi et al., 2006).

Aus diesen Befunden zusammen mit den Erkenntnissen, dass auch die TMS von Notch1 und APLP2 der modulierenden Wirkung von Sulindac Sulfid und Celecoxib ausgesetzt sind, zeichnet sich ab, dass auch für diese  $\gamma$ -Sekretase-Substrate ein gewisser Zusammenhang zwischen der Stabilität der TMS-Dimerisierung und dem Mechanismus der sequentiellen Proteolyse besteht. Diesbezüglich konnten Mutationsanalysen der Notch1-TMS bisher lediglich ausschließen, dass die  $\gamma$ -Sekretase-abhängige Spaltung von Notch1 durch die TMS-Dimerisierung per se verhindert wird (Vooijs et al., 2004). Dies unterstützt die von Munter et al. aufgestellte Theorie, dass die  $\gamma$ -Sekretase in der Lage ist, auch dimere Substrate zu spalten (Munter et al., 2010; Munter et al., 2007). Da sich die verschiedenen Substrate durch eine sehr unterschiedliche Beschaffenheit der TMS auszeichnen, ist gleichwohl anzunehmen, dass der Proteolysemechanismus der  $\gamma$ -Sekretase von Substrat zu Substrat variiert.

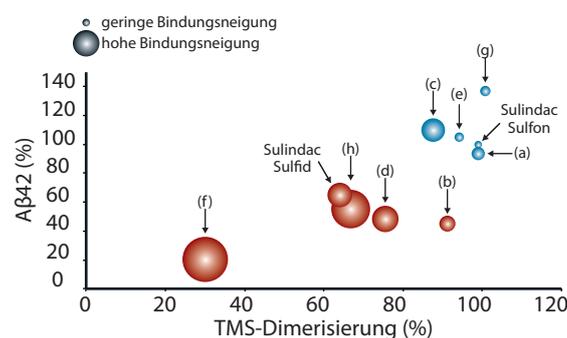
### **3.5 Der Einfluss neuartiger Sulindac-Derivate auf die A $\beta$ 42-Produktion korreliert mit deren Bindung an die A $\beta$ -Sequenz sowie der Modulation der TMS-Dimerisierung**

Mit den in dieser Arbeit etablierten Methoden wurden neuartige Sulindac-Derivate systematisch analysiert. So wurden diese Substanzen im Zellkultursystem auf ihre Fähigkeit zur A $\beta$ -Modulation hin untersucht und mit Sulindac Sulfid verglichen. Die Derivate lassen sich entsprechend ihres Substituenten in Position R<sup>1</sup> in Zweiergruppen einteilen, wovon sich jeweils eine Substanz hinsichtlich der effektiven A $\beta$ 42-Reduktion als aktiv herausstellte, während die andere im Vergleich zu Sulindac Sulfid deutlich weniger aktiv bzw. völlig inaktiv war (Abb. 25). Die Ergebnisse der SPR-Analysen und der ToxR-Assays legen die Vermutung nahe, dass die Wirkung dieser niedermolekularen Substanzen auf die A $\beta$ 42-Generierung direkt mit ihren Bindungseigenschaften und ihrem Einfluss auf die TMS-Dimerisierung korreliert. Um dieser Annahme nachzugehen, wurden für die untersuchten Sulindac-Derivate sowohl die prozentuale A $\beta$ 42-Menge als auch die

prozentuale Dimerisierungsstärke der APP-TMS in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen (Abb. 34). Des Weiteren wurde in dieser Korrelation auch die Tendenz, an die A $\beta$ -Sequenz zu binden, berücksichtigt. Aus der graphischen Darstellung geht hervor, dass Sulindac Sulfid und verwandte Substanzen mit A $\beta$ 42-reduzierender Wirkung zwei wichtige Eigenschaften gemein sind: Sie besitzen einerseits eine starke Neigung, an die A $\beta$ -Sequenz zu binden, und sie setzen andererseits die Dimerisierungsstärke der APP-TMS effektiv herab. Solche Substanzen zeichnen sich strukturell insbesondere durch den Besitz Elektronen-ziehender Substituenten an Position R<sup>2</sup> aus und sind umso wirkungsvoller, je hydrophober ihr Substituent an Position R<sup>1</sup> ist (Abb. 25). Hingegen wirken sich solche Substanzen mit mäßiger bis geringer Bindungsneigung sowie mangelndem Einfluss auf die Dimerisierungsstärke kaum oder gar nicht auf die A $\beta$ 42-Menge aus.

Von allen analysierten Sulindac-Derivaten bildet Substanz (b) eine Ausnahme und ist trotz schwacher Bindung an A $\beta$  und nur geringer Wirkung auf die Stärke der TMS-Dimerisierung in der Lage, die A $\beta$ 42-Menge zu vermindern. Dieser Befund macht erneut deutlich, dass die A $\beta$ -Modulation nicht für jede Substanz über die Bindung an das Substrat vermittelt wird, sondern sich in einigen Fällen wohl auch aus einem anderen molekularen Mechanismus ergibt. Interessanterweise führte Substanz (f), welche hinsichtlich aller drei untersuchten Aspekte besonders effektiv war, zudem zu einer wesentlichen Reduktion der A $\beta$ 40-Menge, während A $\beta$ 38 nur geringfügig erhöht wurde. Somit wirkt sich dieses Derivat nicht nur auf die A $\beta$ 42-Produktlinie aus, sondern auch auf die A $\beta$ 40-Produktlinie. Die Effekte dieser hochpotenten Substanz lassen folglich einen direkten Vergleich zu der starken GxxxG-Mutante G33I zu, die infolge der beinahe vollständig unterbundenen Dimerisierung auch die Produktion von A $\beta$ 40 herabsetzt (Munter et al., 2007).

Durch den Einsatz verschiedenster experimenteller Methoden und Bedingungen lässt sich zusammenfassend bestätigen, dass eine direkte Korrelation zwischen der Bindung von niedermolekularen Substanzen an die A $\beta$ -Sequenz und der herabgesetzten Stabilität des Substrat-Dimers besteht, die schlussendlich in einer verminderten Bildung der neurotoxischen A $\beta$ 42-Spezies resultiert.



**Abb. 34: Korrelation des Einflusses neuartiger Sulindac-Derivate auf die Bildung von A $\beta$ 42 mit deren Bindung an die A $\beta$ -Sequenz und deren Modulation der GxxxG-vermittelten Dimerisierung.** Die einzelnen Datenpunkte setzen sich aus der prozentualen A $\beta$ 42-Menge (ELISA) und der prozentualen Dimerisierungsstärke der APP-TMS (ToxR-Assay) zusammen, jeweils bezogen auf die DMSO-Kontrolle (siehe auch Abb. 25 und 26). Die Tendenz der Substanzen, an die A $\beta$ -Sequenz zu binden (Bindungsneigung) spiegelt sich zudem in der Größe der Datenpunkte wider, wobei ein Datenpunkt umso größer dargestellt ist, desto höher die Bindungsneigung ist. Die prozentuale Bindungsneigung jeder Substanz wurde mittels SPR-Analyse ermittelt und mit Sulindac Sulfid verglichen (siehe auch Abb. 25 und 26).

.....

Diese Erkenntnisse untermauern die in dieser Arbeit entwickelte Theorie, dass der Wirkmechanismus einiger niedermolekularer Substanzen auf der Modulation der TMS-Dimerisierung beruht. Darüber hinaus bieten die in dieser Arbeit etablierten Methoden eine neue vielversprechende Möglichkeit, weitere Substanzen hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungs-Beziehung zu untersuchen und auf diese Weise noch potentere GSMs zu identifizieren.

### **3.6 Einfluss von Sulindac Sulfid auf die Aggregation von A $\beta$ 42**

Niedere Oligomere des A $\beta$ 42-Peptids, insbesondere Di-, Tri- und Tetramere, haben bereits in geringer Konzentration eine toxische Wirkung (Harmeier et al., 2009; Jin et al., 2011; Klyubin et al., 2008; Shankar et al., 2007; Shankar et al., 2008). Vor dem Hintergrund, dass GSMs wie Sulindac Sulfid sowohl an die A $\beta$ -Sequenz binden als auch die Stabilität der GxxxG-vermittelten Dimerisierung effektiv herabsetzen können und dass die GxxxG-Motive nicht nur eine bedeutende Rolle bei der APP-Prozessierung, sondern auch beim Aggregationsprozess des A $\beta$ 42-Peptids spielen (Harmeier et al., 2009; Munter et al., 2007), stellte sich die Frage, welchen Einfluss Sulindac Sulfid auf die Oligomerisierung und Fibrillenbildung von A $\beta$ 42 ausübt. Dabei war von besonderem Interesse, ob Sulindac Sulfid niedere Oligomere zu stabilisieren vermag, wodurch die potentiell protektive Wirkung möglicherweise wieder aufgehoben würde.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Sulindac Sulfid in der Lage ist, die Ausbildung höherer Aggregate auf Kosten niederer Oligomere zu induzieren. So wurde in Anwesenheit von Sulindac Sulfid der Anteil an niederen Oligomeren im Vergleich zur Kontrolle über die Zeit deutlich stärker reduziert. Hingegen war die Fibrillenbildung von A $\beta$ -Peptiden im Beisein von Sulindac Sulfid erschwert und nahm konzentrationsabhängig ab. In Übereinstimmung mit diesen Resultaten weisen erste deskriptive Studien mit Sulindac Sulfid darauf hin, dass NSAIDs und NSAID-ähnliche Substanzen *in vitro* auch als Aggregations-Inhibitoren wirken können, indem sie die Kinetik der Fibrillenbildung verändern und bereits existierende A $\beta$ -Fibrillen destabilisieren (Hirohata et al., 2005). Obwohl nach heutiger Sicht nicht die fibrillären Aggregate die Neurotoxizität bedingen sondern niedere A $\beta$ -Oligomere, postulierten die Autoren dieser Studie einen solchen Effekt als Hauptursache für die protektive Wirkung dieser Substanzen. Der Einfluss auf die löslichen A $\beta$ -Oligomere wurde hier jedoch nicht weiter untersucht (Hirohata et al., 2005).

Wie einleitend beschrieben, fördert das zentrale GxxxG-Motiv die Aggregation und Toxizität des A $\beta$ 42-Peptids (Harmeier et al., 2009; Liu et al., 2005; Xu et al., 2005). Dies konnte kürzlich besonders eindrucksvoll anhand von A $\beta$ 42-Peptiden demonstriert werden, bei denen dieses Motiv durch einen gezielten Aminosäure-Austausch von Glycin zu Alanin oder Isoleucin an Position 33 zerstört wurde. Hier zeigte sich im Vergleich zum wildtypischen Peptid eine merkliche Verschiebung zu höheren Oligomeren, die dann aber keine langen Fibrillen ausbilden konnten. Damit einher ging eine signifikant reduzierte Toxizität dieser Peptide (Harmeier et al., 2009). Es wird vermutet, dass die beschleunigte Oligomerisierung von A $\beta$ 42 G33A und G33I aus einer erhöhten Hydrophobizität an Position 33 und einer damit verbundenen verstärkten Stabilität des Faltungskerns von A $\beta$ 42 (Aminosäuren 21–30) resultiert (Grant et al., 2007; Harmeier, 2008; Harmeier et al., 2009; Lazo et al., 2005). Infolge einer optimalen Abschirmung der hydrophoben Molekül-Oberfläche, unterstützt durch benachbarte hydrophobe Aminosäure-Reste (I31 und/oder M35), kommt es wohl schnell zu einer starken Krümmung und zu einem Abbrechen

aggregierter Untereinheiten, was die mangelnde Fibrillenbildung erklärt (Harmeier et al., 2009). Daher ist davon auszugehen, dass auch die Bindung von Sulindac Sulfid im Bereich des GxxxG-Motivs vermutlich in ähnlicher Weise zu einer planen hydrophoben Molekül-Oberfläche führt. Es ist weiterhin zu vermuten, dass diese bestimmte Konformation des Peptids nicht nur den Aggregationsprozess beeinflusst, sondern auch die Toxizität des Peptids herabsetzt.

Beachtlicher Weise konnte durch die Zugabe des bereits erwähnten GxxxG-bindenden Inhibitor-Peptids ebenfalls die Aggregation des wildtypischen A $\beta$ 42-Peptids zu reifen Fibrillen verhindert werden (Munter, 2007). Somit lässt sich die Aggregation sowohl durch exogene Peptide als auch durch niedermolekulare Substanzen modulieren, die bevorzugt im Bereich der GxxxG-Motive binden.

Zusammenfassend folgt aus den gewonnenen Ergebnissen, dass A $\beta$ 42-reduzierenden Substanzen eine duale Rolle zukommt: Erstens schwächen sie die Dimerisierung der APP-TMS, indem sie in die Membran interkalieren und an die  $\alpha$ -helikale Konformation binden. Auf diese Weise wird die Bildung von A $\beta$ 42-Peptiden herabgesetzt. Zweitens induzieren sie die schnellere Aggregation des A $\beta$ 42-Peptids hin zu höheren Oligomeren, während die Bildung reifer Fibrillen unterbunden wird. Dies resultiert aus der Bindung A $\beta$ 42-reduzierender Substanzen an die  $\beta$ -Faltblattstruktur des Peptids und führt zur Reduktion niederer Oligomere. In beiden Fällen wirken sich solche Substanzen offensichtlich förderlich aus, was schlussendlich auf die duale Rolle des GxxxG-Motivs in der APP-TMS zurückzuführen ist (Harmeier et al., 2009; Munter et al., 2007).

### **3.7 Modulation der TMS-Dimerisierung als therapeutische Strategie**

Zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit existieren bisher nur rein symptomatische Therapiemöglichkeiten, während trotz intensiver Forschung noch keine kausale Behandlung möglich ist. Wie einleitend beschrieben, lässt dies die dringende Notwendigkeit der Entwicklung einer wirksamen Therapie erkennen.

Generell wird bei der Entwicklung von potentiellen Wirkstoffen, die eine bestimmte Enzym-Substrat-Reaktion beeinflussen sollen, fast ausschließlich die Modulation des jeweiligen Enzyms in den Vordergrund gestellt. Dabei kann für gewöhnlich das aktive Zentrum des Enzyms durch einen Wirkstoff besetzt werden, wodurch die Bindung des Substrats und folglich die enzymatische Reaktion verstärkt oder unterbunden wird. Alternativ kann die Enzymaktivität auch dadurch verändert werden, dass eine vom aktiven Zentrum verschiedene Bindungsstelle mit einer Substanz spezifisch in Kontakt tritt. Da ein Enzym häufig gleichzeitig mehrere Substrate besitzt, ist der Angriff auf das Enzym nicht selten mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden – so auch bei der vollständigen Blockade der APP-prozessierenden Sekretasen.

Die Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit legen hingegen einen völlig neuartigen Wirkmechanismus nahe, wonach niedermolekulare Substanzen direkt Einfluss auf die Substrat-Dimerisierung nehmen und auf diese Weise die Bildung toxischer Spaltprodukte effektiv verhindern können. Interessanterweise ist im Fall der APP-TMS nur eine leicht abgeschwächte Dimerisierung notwendig, um bereits eine enorme Wirkung auf die A $\beta$ 42-Menge herbeizuführen. Der protektive Effekt A $\beta$ 42-reduzierender Substanzen wird dabei vermutlich noch durch die beschleunigte Aggregation von A $\beta$ 42 hin zu höheren Oligomeren unterstützt. Folglich ergibt

.....  
sich aus diesem Wirkmechanismus ein vielversprechender Ansatz zur Therapie der Alzheimer-Krankheit.

Der Befund, dass unter Umständen auch andere dimerisierende Sequenzen ein molekulares Target für GSMs und iGSMs darstellen können, macht eine sorgfältige Analyse bezüglich des möglichen Nebenwirkungspotentials solcher Substanzen notwendig. Insbesondere wäre dabei zu klären, welche Relevanz ein solcher modulierender Mechanismus für andere Zielproteine und zelluläre Prozesse hat. Ein weiteres zukünftiges Ziel wäre es, die Struktur-Wirkungs-Beziehung seitens der modulierbaren TMS noch näher zu analysieren, um die minimalen Erfordernisse für eine Bindung potentiell protektiver Substanzen weiter eingrenzen zu können. Darüber hinaus muss gewährleistet sein, dass solche Substanzen die Blut-Hirn-Schranke effizient passieren können und somit auch im Gehirn von Patienten in wirksamen Konzentrationen vorkommen. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend ließen sich neue, hochaffine und selektive Substanzen entwickeln, die idealerweise ausschließlich mit der APP-TMS wechselwirken können. Zweifelsohne sind die in dieser Arbeit etablierten Methoden für die sorgfältige Suche und Charakterisierung geeigneter Wirkstoffe dienlich.

---

## 4. Zusammenfassung

Die 42 Aminosäuren lange Form des Amyloid- $\beta$ -Peptids ( $A\beta_{42}$ ) führt zum Verlust von Synapsen und Nervenzellen und nimmt daher eine ursächliche Rolle bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit ein. Dieses Peptid entsteht durch die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen. Infolge des sequentiellen Proteolysemechanismus der  $\gamma$ -Sekretase werden neben  $A\beta_{42}$  auch weitere  $A\beta$ -Spezies mit unterschiedlicher Länge gebildet.

Das  $\beta$ -CTF (C-terminales APP-Fragment nach erfolgter  $\beta$ -Sekretase-Spaltung) dimerisiert über drei konsekutive GxxxG-Motive in der Transmembransequenz (TMS). Die GxxxG-vermittelte Helix-Helix-Interaktion wirkt sich dabei maßgeblich auf die sukzessive  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung des  $\beta$ -CTF aus und führt vermehrt zur Bildung des neurotoxischen  $A\beta_{42}$ -Peptids. Hingegen begünstigt eine abgeschwächte Dimerisierung, bedingt durch Punktmutationen im zentralen GxxxG-Motiv, die Entstehung von  $A\beta_{38}$  und auch kürzeren  $A\beta$ -Peptiden auf Kosten von  $A\beta_{42}$ . Interessanterweise wurde diese reziproke Veränderung in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten auch für niedermolekulare Substanzen, wie Sulindac Sulfid und Indomethacin, beobachtet, die heute klassische  $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren (GSMs) darstellen. Indessen wurde der entgegengesetzte Effekt für Fenofibrat und Celecoxib gefunden - zwei wichtige Vertreter der inversen  $\gamma$ -Sekretase-Modulatoren (iGSMs). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals der direkte Zusammenhang zwischen der  $A\beta$ -modulierenden Wirkung klassischer GSMs sowie iGSMs und der GxxxG-vermittelten Dimerisierung detailliert untersucht.

Die direkte Interaktion von GSMs mit der  $A\beta$ -Sequenz als mögliches molekulares Target wurde in dieser Arbeit mittels SPR-Analysen und NMR-spektroskopischen Experimenten untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Sulindac Sulfid und Indomethacin als auch das hochwirksame GSM-1 direkt an die  $A\beta$ -Sequenz binden, während inaktive Sulindac-Derivate keine spezifische Bindung zeigten. Es stellte sich heraus, dass die APP-TMS für diese Interaktion von Bedeutung ist. Des Weiteren machten molekulare Ligandenbindungs-Modelle deutlich, dass die flache Dimer-Kontaktfläche der APP-TMS, gebildet aus den Glycin-Resten der drei aufeinanderfolgenden GxxxG-Motive, eine ideale Kontaktfläche für solche  $A\beta_{42}$ -reduzierenden Substanzen darstellt. Diese Ergebnisse unterstützen die experimentellen Daten

Um den Einfluss dieser Substanzen auf die Dimerisierung der APP-TMS in lebenden Zellen zu analysieren, kam ein bakterieller Reporter-gen-basierter Dimerisierungs-Assay zum Einsatz. Die Resultate zeigen bemerkenswerterweise, dass die homophile Helix-Helix Interaktion der APP-TMS durch Sulindac Sulfid und Indomethacin abgeschwächt wird, nicht jedoch durch inaktive Sulindac-Derivate. Zudem offenbarte sich, dass GSM-1 diesbezüglich noch wirkungsvoller war als Sulindac Sulfid.

Des Weiteren wurden neuartige Sulindac-Derivate systematisch untersucht. Beachtlicherweise konnte eine direkte Korrelation hinsichtlich der  $A\beta$ -Modulation, der TMS-Dimerisierung und der Bindung an  $A\beta_{42}$  nachgewiesen werden. Es ließen sich zudem Rückschlüsse auf die Struktur-Wirkungs-Beziehung dieser Substanzen ziehen.

Bei der Analyse klassischer iGSMs stellte sich heraus, dass weder Fenofibrat noch Celecoxib in der Lage war, unter den verwendeten experimentellen Bedingungen an die monomere  $A\beta$ -Sequenz

.....  
zu binden. Dennoch ließ sich die Dimerisierung der APP-TMS durch Celecoxib konzentrationsabhängig stabilisieren. Dies weist also darauf hin, dass bestimmte iGSMs die GxxxG-vermittelte Dimerisierung entgegengesetzt zu GSMs modulieren können.

Zusammengefasst machen diese Befunde deutlich, dass niedermolekulare Substanzen Einfluss auf die A $\beta$ -Bildung nehmen können, indem sie sich direkt auf die Dimerisierung der APP-TMS auswirken. Daraus erschließt sich ein völlig neuartiger Wirkmechanismus für solche Substanzen. Diese Daten wurden teilweise in der internationalen Fachzeitschrift »Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America« (PNAS) veröffentlicht (Richter et al., 2010).

Weitere Untersuchungen mit anderen dimerisierenden Sequenzen legten jedoch nahe, dass die Fähigkeit von Sulindac Sulfid und Celecoxib zur Modulation der Dimerisierung nicht allein auf die APP-TMS beschränkt ist. Folglich besteht die Notwendigkeit, Substanzen mit erhöhter Spezifität gegenüber der TMS von APP zu entwickeln.

Das zentrale GxxxG-Motiv in der APP-TMS spielt zudem eine wesentliche Rolle bei der Aggregation von A $\beta$ 42 und fördert die Ausbildung neurotoxisch wirkender Oligomere. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den möglichen Einfluss protektiver A $\beta$ 42-reduzierender Substanzen auf die Oligomerisierung und Fibrillenbildung von A $\beta$ 42 zu analysieren.

Zu diesem Zweck wurden Größenausschluss-Chromatographien und elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Oligomerisierung von A $\beta$ 42 in Anwesenheit von Sulindac Sulfid beschleunigt war, während die Bildung von reifen Fibrillen maßgeblich unterdrückt wurde.

Diese Ergebnisse zeigen überzeugend, dass durch A $\beta$ 42-reduzierende Substanzen nicht nur die APP-Prozessierung in Richtung kürzerer, nicht toxischer A $\beta$ -Spezies verschoben wird, sondern zudem auch eine Verschiebung der Oligomerisierung von A $\beta$ 42 hin zu höheren, nicht toxischen Oligomeren stattfindet. Beide Eigenschaften lassen sich dabei wohl auf die duale Rolle der GxxxG-Motive in der APP-TMS zurückführen.

Schließlich ergab sich in der vorliegenden Arbeit eine neue und vielversprechende Strategie zur Therapie der Alzheimer-Krankheit, die neue Möglichkeiten zur Identifizierung und Entwicklung neuartiger A $\beta$ 42-reduzierender Substanzen mit optimierten pharmakologischen Eigenschaften eröffnet.

---

## 4. Summary

The 42-amino acid residue isoform of the amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ 42) contributing to synaptic and neuronal loss is thought to be the main culprit in the pathogenesis of Alzheimer's disease. This peptide is generated by proteolytic processing of the amyloid precursor protein (APP) by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases. Besides A $\beta$ 42 several A $\beta$  species of variable length are produced as a result of the sequential  $\gamma$ -secretase cleavage mechanism.

$\beta$ -CTF (C-terminal fragment of APP after  $\beta$ -secretase cleavage) dimerizes via three consecutive GxxxG motifs in its transmembrane sequence (TMS). The GxxxG-mediated helix-helix interaction has regulatory impact on the successive  $\gamma$ -secretase cleavage process, thereby leading to the increased production of the neurotoxic A $\beta$ 42 peptide. In contrast, an attenuated dimerization strength induced by point mutations in the central GxxxG motif results in a reduced A $\beta$ 42 production in favor of A $\beta$ 38 or even shorter A $\beta$  peptides. Interestingly, this inverse regulation has also been observed in numerous *in vitro* and *in vivo* studies for small compounds, like sulindac sulfide and indomethacin, being classified as  $\gamma$ -secretase modulators (GSMs). The opposite effect has been found for fenofibrate and celecoxib, two well-known inverse  $\gamma$ -secretase modulators (iGSMs). In this thesis the direct link between the A $\beta$ -modulating effects of GSMs and iGSMs and the GxxxG-mediated dimerization was analyzed for the first time.

The direct interaction of classical GSMs with the A $\beta$  sequence as a potential molecular target was examined by SPR experiments and NMR spectroscopy. It was observed that sulindac sulfide and indomethacin as well as the highly potent GSM-1 directly bind to the A $\beta$  sequence, whereas all inactive sulindac derivatives did not show specific binding. The APP-TMS was found to be critical for this interaction. Moreover, molecular docking analyses showed that the flat dimer interface within the APP-TMS composed of the alternating glycine residues of the GxxxG motifs forms an ideal contact site for A $\beta$ 42-lowering compounds, further supporting the experimental data.

In order to analyze the compounds' effect on APP-TMS dimerization in living cells a bacterial reporter gene-based dimerization assay was used. Strikingly, it was found that homophilic helix-helix interaction of the APP-TMS was attenuated by sulindac sulfide and indomethacin, but not by inactive sulindac derivatives. In addition, GSM-1 was found to be even more potent than sulindac sulfide.

Furthermore, novel sulindac-derived compounds were systematically analyzed. Remarkably, the results show a tight correlation regarding A $\beta$  modulation, APP-TMS dimerization and A $\beta$ 42 binding, thereby drawing firm structure-activity relationship conclusions of those compounds.

When analyzing classical iGSMs for their ability to bind to the A $\beta$  sequence, neither fenofibrate nor celecoxib were able to interact with monomeric A $\beta$  under the experimental conditions used in this study. However, dimerization of the APP-TMS was stabilized in a dose-dependent manner by celecoxib, indicating an inverse modulation of the GxxxG-mediated dimerization by certain iGSMs.

Collectively, these findings strongly demonstrate that small compounds affect A $\beta$ 42 production by directly interfering with APP-TMS dimerization, thus providing clear evidence for a new molecular

.....  
mechanism of action for those compounds. Parts of these results have been published in: PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Richter et al., 2010).

Further investigations using other dimerizing sequences revealed that the ability of sulindac sulfide and celecoxib to modulate the dimerization strength is not necessarily restricted to the TMS of APP, though. Accordingly, there is a need for compounds showing improved specificity for the APP-TMS as a molecular target.

Additionally, the central GxxxG motif within the APP-TMS plays a pivotal role in early aggregation of A $\beta$ 42 and promotes the formation of neurotoxic oligomers. A further aim was to investigate the possible impact of potentially protective A $\beta$ 42-lowering compounds on A $\beta$ 42 oligomerization and fibrillization.

Therefore, size exclusion chromatography and electron microscopy were performed. It was observed that A $\beta$ 42 oligomerization was accelerated whereas fibril formation was suppressed by sulindac sulfide.

These results convincingly show that A $\beta$ 42-lowering compounds not only shift APP processing towards shorter non-toxic A $\beta$  species but also shift A $\beta$ 42 oligomerization towards higher non-toxic oligomers. Indeed, both properties can be attributed to the dual role of the GxxxG motifs within the APP-TMS.

In conclusion, in this thesis a new promising therapeutic strategy against Alzheimer's disease has been uncovered and opens novel possibilities for the identification and development of new A $\beta$ 42-lowering compounds with optimized pharmacological properties.

---

## 5. Material

### 5.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Alle Plastikwaren wie Reagiergefäße, Mikrotiterplatten und Petrischalen wurden von Sarstedt (Nümbrecht) oder Greiner (Österreich) bezogen. Pipettenspitzen stammten von Steinbrenner (Wiesbaden) oder Roth GmbH (Karlsruhe). Mikrotiterplatten für ELISA (C96 Maxisorp Nunc Immuno-Plates) sowie Kryo-Röhrchen für Zelllinien wurden von Nunc (Wiesbaden) bezogen, Zellkulturtestplatten und Zellkulturschalen von TPP (Schweiz). Es wurden Röntgenfilme (Hyperfilm ECL) von Amersham Pharmacia (GB) verwendet.

### 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 analysi« bezogen.

### 5.3 Pufferlösungen

Alle nicht gesondert aufgelisteten Pufferlösungen wurden nach Sambrook et al. hergestellt (Sambrook, 1989).

### 5.4 Enzyme und »Kits«

Alle in dieser Arbeit verwendeten und nicht gesondert aufgeführten Enzyme und »Kits« wurden von folgenden Firmen bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet: Macherey-Nagel (Düren), Qiagen (Hilden), The Genetics Company (Schweiz), Stratagene (USA), Invitrogen (Karlsruhe), GE Healthcare (München). Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (USA) bezogen.

### 5.5 Bakterienstämme und Nährmedien

Die Bakterienstämme DH5 $\alpha$ , Top10 und XL1-Blue stammten von Invitrogen (Karlsruhe);

Nährmedium: LB-Medium

FHK12 (Bedouelle und Duplay, 1988);

Nährmedium: LB-Medium, FHK-Medium (s. 6.9.1)

PD28 (Kolmar et al., 1994);

Nährmedium: LB-Medium, M9-Minimalmedium (s. 6.9.2)

### 5.6 Zelllinien und Nährmedien

APP CHO PS1-wt, Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters (»chinese hamster ovary cells«), stabil transfiziert mit humanem APP751 wt und PS1 wt (Perez et al., 1996; Xia et al., 1997);

Nährmedium: DMEM

10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS)

2 mM L-Glutamin

1 mM Natriumpyruvat

Bei Bedarf erfolgte der Zusatz von 10 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin.  
Selektionsmedium enthielt zusätzlich 2 µg/ml Puromycin und 200 µg/ml Geneticin (G418).

SH-SY5Y, humane Neuroblastoma-Zelllinie, ATCC-Nummer: CRL-2266 (ATCC, Rockville, USA);

Nährmedium: 50% (v/v) DMEM  
50% (v/v) HAM's F12  
10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS)  
2 mM Glutamin  
1 mM Natriumpyruvat  
1x Nicht-essentielle Aminosäuren

Bei Bedarf erfolgte der Zusatz von 10 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin.  
Selektionsmedium enthielt in der Regel zusätzlich 250 µg/ml Hygromycin.

Alle Medien, Zusätze, Waschpuffer (PBS) sowie Trypsin-Lösungen für die Zellkultur wurden von den Firmen PAA (USA) oder Biochrom (Berlin) bezogen.

### 5.7 Plasmid-Vektoren

pToxRV (Gurezka und Langosch, 2001), Kanamycin-Resistenz;  
Inserts: Aβ 29–42 wt, Aβ 29–42 G33A, GpA, APLP2, Notch1, L16, LS49  
Die Konstrukte stammten von Dr. Lisa Münter (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gerd Multhaup)  
bzw. von Dr. Roswitha Jana Herrmann (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dieter Langosch, TU München).

pQE60 (Quiagen, Hilden), Ampicillin-Resistenz;  
Insert: C100 wt  
Das Konstrukt stammte von Prof. Dr. Christian Haass (LMU, München).

### 5.8 Sequenzierprimer

Die aufgelisteten Sequenzierprimer wurden von GATC synthetisiert.

GATC-pToxR-233F-140809	ATTAGCGGATGCTACCTGAC
GATC-Tox-2226R-129209	GCCAATCCGGATATAGTTCC
GATC-Tox-663F-127154	AGCGCGGTTACCAATTGATC

### 5.9 Antiseren und Antikörper

W0-2: monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes Aβ (The Genetics Company, Schweiz);  
Epitop: Aβ 5–8 (Ida et al., 1996)  
Western-Blot: 0,03 mg/ml, Immunpräzipitation: 0,5 mg/ml

22C11: monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes APP;  
Epitop: APP 66–81, (Hilbich et al., 1993),  
Western-Blot: 1:10000

IC16: monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes Aβ;  
Epitop: Aβ 1–16 (Hahn et al., 2011)  
ELISA: 1:250

BAP-15: mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter, monoklonaler Maus-Antikörper;  
 Epitop: C-Terminus von A $\beta$ 42 (Brockhaus et al., 1998)  
 ELISA: 1:500

BAP-24: mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter, monoklonaler Maus-Antikörper;  
 Epitop: C-Terminus von A $\beta$ 40 (Brockhaus et al., 1998)  
 ELISA: 1:1000

BAP-29: mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter, monoklonaler Maus-Antikörper;  
 Epitop: C-Terminus von A $\beta$ 38 (Brockhaus et al., 1998)  
 ELISA: 1:125

Anti-MBP: polyklonales Kaninchen-Antiserum (New England Biolabs, USA);  
 Western-Blot: 1:10000

2nd-anti-Maus-HRP: mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter Sekundärantikörper zur  
 Chemilumineszenz-Detektion muriner Erstantikörper (Promega, USA);  
 Western-Blot: 1:10000

2nd-anti-Kaninchen-HRP: mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter Sekundärantikörper zur  
 Chemilumineszenz-Detektion von Erstantikörpern aus Kaninchen (Promega, USA);  
 Western-Blot: 1:10000

## 5.10 Geräte

- Autoklav Varioklav 135S (H+P, Oberschleißheim)
- Begasungsbrutschrank HERA Cell 240 (Heraeus-Kendro, USA)
- Biacore 3000 (Ge Healthcare, München)
- Blot-Apparatur Trans-Blot Cell (Bio-Rad, München)
- Brutschrank Modell 600 (Memmert, Schwabach)
- CD-Spektropolarimeter J-810 (Jasco, USA)
- Chromatographieanlage Äkta FPLC Explorer (Pharmacia, Freiburg)
- DNA-Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur (Selbstanfertigung am ZMBH, Uni Heidelberg)
- Dot-Blot-Apparatur Minifold I Dot-Blot-System (Minifold, Schleicher & Schuell, Dassel)
- Einfrierdose Nalgene Cryo 1C Freezing Container (Nalge Nunc, USA)
- Elektroporator Gene Pulser II (Bio-Rad, München)
- Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR (Cawo, Schrobenuhausen)
- Festkörper-NMR-Spektrometer Bruker 600-MHz Avance (Bruker Biospin, Karlsruhe)
- French Press für Zellaufschluss French Pressure Cell-Press (SLM Amico, USA)
- Geldokumentation Alphamager 2200 (Biozym, Hamburg)
- Heizblock UBD2 (Grant, UK)
- Kühlfalle RVT400 Thermo (Savant, USA)
- Lichtmikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Jena)
- Massenspektrometer Ultraflex II (Bruker Daltonic, Bremen)
- Millipore water purification systems, Q Gard 1 (Millipore, USA)
- Netzgeräte:
  - für DNA-Agarose-Gelelektrophorese: Power Supply 2000/200 (Bio-Rad, München)

- für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese: Electrophoresis Power Supply EPS 301 (Amersham, USA)
- PCR-Maschinen Mastercycler oder Mastercycler gradient (Eppendorff, Hamburg)
- Pipettierhilfen:
  - Pipetman P2, P20, P200 & P1000 (Gilson, USA)
  - Pipetboy acu (Integra Biosciences, Schweiz)
- Photometer:
  - Küvettenphotometer SmartSpec 3000 (Bio-Rad, München)
  - Plattenphotometer Anthos HT2 (Anthos, Krefeld)
  - Nanodrop 1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Rotations-Vakuumkonzentrator SpeedVac (Savant, USA)
- SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Apparaturen:
  - für Glycin-SDS-PAGE: Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, München)
  - für Tricin-SDS-PAGE: Vertikal-Elektrophorese-System für Minigele XCell SureLock (Invitrogen, Karlsruhe)
- Schütteltische für Bakterienkulturen HR225, HR250 (Infors-HR, Bottmingen)
- Sterile Werkbank Herasafe (Heraeus-Kendro, USA)
- Thermomixer Comfort (Eppendorff, Hamburg)
- 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)
- 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 (Heraeus, USA)
  - Zellzentrifuge Multifuge 3 S-R (Heraeus-Kendro, USA)

### 5.11 Software

- Bildbearbeitung: Adobe Photoshop CS5, Adobe Illustrator CS5
- Datenauswertung: Microsoft Excel 2008 und 2011 für Mac, GraphPad Prism (GraphPad Software, USA)
- Erstellen von chemische Strukturformeln: ACD/ChemSketch 2.0
- Internet-Datenbanken: NCBI Blast, PubMed, Expasy
- Literaturverwaltung: Bookends 11 (Sonny Software, USA)
- Sequenzdatenvergleich: Clone Manager 5.2 (Sci-Ed, USA)
- Textverarbeitung und Layout: Microsoft Word 2011 für Mac, Adobe InDesign CS5

---

## 6. Methoden

### 6.1 Molekularbiologische Methoden

#### 6.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen und chemische Transformation

Um chemisch kompetente Zellen herzustellen, wurden 50 ml LB-Medium 1:100 aus einer 4 ml-Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C wachsen gelassen, bis bei 620 nm eine optische Dichte (OD<sub>620</sub>) von 0,4–0,5 erreicht war. Die Zellsuspension wurde für 5 min auf 4°C abgekühlt, um dann unter sterilen Bedingungen für 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert zu werden. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls bei 4°C. Das Zellpellet wurde in 2/5 des ursprünglichen Volumens (20 ml) Tfb I resuspendiert und für 5 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 4000 rpm wurde das erhaltene Zellpellet in 1/25 des ursprünglichen Volumens (2 ml) Tfb II resuspendiert, 15 min inkubiert und anschließend aliquotiert. Die Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

50 ng der zu transformierenden DNA und 50 µl der chemisch kompetenten Zellen wurden vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C im Wasserbad. Die Zellen wurden für 2 min auf Eis abgekühlt und dann in 800 µl LB-Medium (ohne Selektionsmarker) aufgenommen. Nach 30–60 min Inkubation bei 37°C wurde der Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin) ausplattiert oder zum Animpfen einer 4 ml-Übernachtskultur genutzt.

- Tfb I: 30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerin, pH 5,8
- Tfb II: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerin, pH 6,5

#### 6.1.2 Herstellung elektrisch kompetenter *E. coli*-Zellen und Elektrotransformation

Zur Herstellung elektrisch kompetenter Zellen wurde zunächst 1 l LB-Medium 1:100 aus einer 50 ml-Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C wachsen gelassen. Nach Erreichen einer OD<sub>620</sub> von 0,4–0,5 wurden die Zellen für 15–30 min auf Eis inkubiert und anschließend unter sterilen Bedingungen bei 4000 rpm für 15 min pelletiert. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls bei 4°C. Das Zellpellet wurde einmal mit 1 l und einmal mit 0,5 l eiskaltem, sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Zellen wurden nun in 20 ml 10% (v/v) Glycerin aufgenommen, zentrifugiert und dann in 3 ml 10% (v/v) Glycerin resuspendiert. Die Zellzahl wurde durch eine photometrische Messung bei 620 nm bestimmt und mit 10% (v/v) Glycerin auf 2–3 x 10<sup>10</sup> Zellen pro ml eingestellt. Die Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

50 ng der zu transformierenden DNA und 50 µl der elektrisch kompetenten Zellen wurden vorsichtig gemischt, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Bio-Rad, München) überführt und für 1 min auf Eis inkubiert. Die Elektrotransformation erfolgte bei 25 µF, 1,8–2,0 kV und 200 Ω unter Verwendung eines Elektroporator Gene Pulser II (Bio-Rad, München). Danach wurden die Zellen sofort in 800 µl LB-Medium (ohne Selektionsmarker) aufgenommen und für 30–60 min bei 37°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin) ausplattiert oder zum Animpfen einer 4 ml-Übernachtskultur verwendet.

### 6.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (ca. 5 µg, Mini-Präparation) erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse unter Verwendung der Puffer aus dem »NucleoBond® PC 500 Kit« (Macherey-Nagel, Düren). Zunächst wurden pro LB-Agarplatte 6–10 Kolonien gepickt, in je 4 ml LB-Medium (mit Selektionsmarker) überführt und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Von dieser Kultur wurden 2 ml bei 4500 rpm für 8 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurde in 400 µl S1-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und dann durch die Zugabe von 400 µl S2-Puffer (200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS) für höchstens 5 min lysiert. Durch Zugabe von 400 µl eiskaltem Neutralisationspuffer S3 (2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1) und eine 20-minütige Inkubation auf Eis erfolgte die Fällung der Proteine, welche anschließend zweimal für 20 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert wurden. Die Plasmid-DNA wurde durch die Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol ausgefällt und für 30 min bei 14000 rpm und 12°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30–50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Midi-Präparation) erfolgte mit dem »NucleoBond® Xtra Midi Kit« (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers.

### 6.1.4 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Küvettenphotometers Smart-Spec 3000 (Bio-Rad, München). Dazu wurde eine DNA-Präparation 1:100 in H<sub>2</sub>O verdünnt und die Absorption sowohl bei 260 nm (A<sub>260</sub>) als auch bei 280 nm (A<sub>280</sub>) in einer Quarzküvette gemessen. Da bei der Messung doppelsträngiger DNA eine A<sub>260</sub> von 1 in etwa einer DNA-Konzentration c von 50 µg/ml entspricht, wurde diese wie folgt berechnet:

$$c = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ µg/ml}$$

Alternativ wurden A<sub>260</sub> und A<sub>280</sub> einer unverdünnten DNA-Präparation mittels Nanodrop 1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) photometrisch bestimmt.

Die Reinheit der DNA-Präparation wurde anhand des Quotienten A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> überprüft, wobei der Quotient üblicherweise um die Werte 1,8–1,9 lag.

### 6.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Restriktionsverdau erfolgte nach Standardmethoden und unter optimalen Bedingungen nach Empfehlungen des Herstellers (New England Biolabs, USA). In der Regel wurden 1–2 µg zu verdauende DNA und ca. 1 U Restriktionsenzym pro µg DNA-Menge eingesetzt. Die Restriktionsansätze enthielten zudem eine Endkonzentration von 1x NEB-Puffer (New England Biolabs, USA) und wurden bei Bedarf mit 100 µg/ml BSA (New England Biolabs, USA) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 1–2 h bei einer für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur.

### 6.1.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Entsprechend der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit 0,8–1,2% (w/v) Agarose (Invitrogen, Karlsruhe) in TBE-Puffer verwendet. Die Zugabe von Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg/ml machte die Visualisierung der DNA unter UV-Licht möglich.

Die zu analysierenden Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und neben dem DNA-Größenstandard »1 kb Plus DNA Ladder« (Invitrogen, Karlsruhe) auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in TBE-Puffer bei einer Spannung von 100–200 V.

- TBE-Puffer: 90 mM Tris/HCl, pH 8,3, 90 mM Borsäure, 0,1 mM EDTA
- 6x DNA-Probenpuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 60% (v/v) Glycerin, 0,1 mM EDTA, pH 8,0

### 6.1.7 Sequenzierungen

DNA-Konstrukte aus Mini- und Midi-Präparation wurden mit fluoreszierenden Primern auf Basis der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977) durch die Firma GATC Biotech (Konstanz) sequenziert, um die Korrektheit der gewünschten Sequenz zu überprüfen. Die verwendeten Sequenzierprimer sind unter 5.3 aufgeführt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software »Clone Manager« (Version 5.2, Sci-Ed, USA) mit der Originalsequenz verglichen.

## 6.2 Proteinbiochemische Methoden

### 6.2.1 Peptidsynthese und Lösen von A $\beta$ -Peptiden

Alle verwendeten synthetischen A $\beta$ -Peptide wurden von der Firma PSL (Heidelberg) oder der Firma AnaSpec (USA) bezogen bzw. von Dr. Michael Beyermann (FMP Berlin) durch Fmoc-Synthese hergestellt (Beyermann et al., 1996).

A $\beta$ -Peptide wurden nach dem Einwiegen in 80% (v/v) Ameisensäure gelöst, da unter dieser Bedingung der Hauptteil des Peptids in monomerer Form vorliegt (Roher et al., 1996). Das Lösungsmittel wurde anschließend für mindestens 1 h im Rotations-Vakuumkonzentrator (SpeedVac, Savant, USA) abgezogen und die Peptide bis zum Gebrauch bei –20°C gelagert. Monomerisierte A $\beta$ -Peptide wurden stets in alkalisiertem H<sub>2</sub>O (0,12% (v/v) NH<sub>3</sub>) durch eine 15-minütige Ultraschallbehandlung gelöst (Schmechel et al., 2003) und unmittelbar danach für diverse Analysen eingesetzt.

Die korrekte Größe und die Reinheit der Peptide wurden stets mittels MALDI-MS (s. 6.3) verifiziert.

### 6.2.2 Proteinaufreinigung aus bakteriellen »inclusion bodies«

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

Kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-Blue wurden mit pQE60-C100 transformiert (s. 6.1.1 und 6.1.2). 50 ml LB-Medium wurden mit 10  $\mu$ l eines Transformationsansatzes angeimpft und die Zellen über Nacht unter Schütteln bei 37°C wachsen gelassen. Diese Übernachtskultur wurde 1:20 in frischem LB-Medium verdünnt. Die Zellen wurden bei 37°C und 160 rpm inkubiert, bis eine OD<sub>620</sub> von 0,5–0,6 gemessen wurde. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Proteinexpression nun induziert. Nach weiteren 4 h Inkubation bei 37°C und 160 rpm wurden die Zellen zunächst 10 min auf 4°C gekühlt und dann für 12 min bei 4500 rpm und 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde bis zur Proteinaufreinigung bei –20°C aufbewahrt.

### Zellaufschluss, Lösung und Rückfaltung der Proteine

Das *E. coli*-Zellpellet wurde in TE-Puffer (10 ml pro 1 g Pellet) resuspendiert und dreimal in der French Press (SLM Amico, USA) aufgeschlossen. Die Einschlusskörper (»inclusion bodies«) wurden bei 12000 rpm und 12°C für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in Harnstoffpuffer (5 ml pro 1 g Pellet) aufgenommen und die Proteine durch eine anschließende Ultraschallbehandlung gelöst. Die Proteinlösung wurde gegebenenfalls 1 h bei 4°C über Kopf geschüttelt und erneut bei 12000 rpm und 12°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort 1:10 mit Equilibrierungspuffer verdünnt und bei 4°C aufbewahrt.

- TE-Puffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA
- Harnstoffpuffer: 20 mM 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-100, 1% (w/v) SDS, 1x »Complete-Protease-Inhibitor« (Roche, Schweiz)
- Equilibrierungspuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl

### Ni-NTA-Säulenchromatographie

1 ml (Bettvolumen) Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) wurde zunächst mit 40-fachem Bettvolumen Equilibrierungspuffer (s.o.) gewaschen (Zentrifugation jeweils für 3 min bei 1200 rpm bzw. 300 x g), dann mit der verdünnten Proteinlösung versetzt und über Nacht bei 4°C über Kopf geschüttelt. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation. Möglichst viel Überstand wurde verworfen, die Ni-NTA-Agarose mit 2 ml Waschpuffer aufgeschlemmt und dann in eine kleine Säule überführt. Das Säulenmaterial wurde nun 30 mal mit zweifachem Bettvolumen Waschpuffer gewaschen (Zentrifugation jeweils für 3 min bei 1200 rpm bzw 300 rpm). Nach 10 min Inkubation bei RT unter Schütteln erfolgte die Elution viermal mit zweifachem Bettvolumen Elutionspuffer. Die Proben wurden bei 4°C gelagert.

- Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,3% (w/v) SDS
- Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,3% (w/v) SDS, 50 mM EDTA, 0,02% (w/v) NaN<sub>3</sub>, 1x »Complete-Protease-Inhibitor« (Roche, Schweiz)

### Umpuffern und Aufkonzentrieren

Zum Umpuffern und Aufkonzentrieren der aufgereinigten Probe wurde diese mit dem gewünschten Puffer mehrfach auf dem 10 kDa-Größenausschlussfilter »Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Device« (Millipore, USA) nach Angaben des Herstellers gewaschen und gegebenenfalls eingengt.

## 6.2.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

### BCA-Assay

Proteinkonzentrationen wurden in der Regel nach der Bicinchoninsäure- (BCA) Methode (Smith et al., 1985) mit Hilfe des »BCA™ Protein Assay Kit« (Pierce, USA) bestimmt. Nach Angaben des Herstellers wurden je 20 µl der zu untersuchenden Proben mit 200 µl BCA-Lösung auf einer 96-«well«-Mikrotiterplatte für mindestens 15 min bei 50–60°C inkubiert. Die Absorption wurde schließlich bei 562 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben konnten anhand einer mitgeführten BSA-Standardreihe errechnet werden.

- BCA-Lösung: BCA-Reagenz 1:40 versetzt mit 4% (w/v) CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O-Lösung

### RC-DC-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen von C100-Lösungen kam der »RC DC™ Protein Assay Kit« (Bio-Rad, München) zum Einsatz. Die Methode basiert auf der Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951), ist aber wesentlich toleranter gegenüber Detergenzien und Reduktionsmitteln. Der Assay wurde entsprechend der Vorschrift des Herstellers in 1,5 ml-Reagiergefäßen durchgeführt. Die Absorption wurde schließlich bei 750 nm im Küvettenphotometer (Schichtdicke 1 cm) vermessen. Bei jeder Proteinbestimmung wurde eine BSA-Standardreihe in entsprechendem Puffer angesetzt und mitgeführt, die der Ermittlung der Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben diene.

### Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop

Handelte es sich bei der zu untersuchenden Proteinlösung um ein gereinigtes Protein, dessen molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) und Molekulargewicht bekannt waren, erfolgte die Konzentrationsbestimmung photometrisch bei 280 nm mittels Nanodrop 1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

### 6.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das aufzutrennende Proteingemisch wurde zunächst mit 1xSDS-Probenpuffer, wahlweise mit oder ohne 20% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Das negativ geladene Detergenz SDS bindet mit konstantem Ladung-zu-Masse-Verhältnis an die denaturierten Proteine (etwa 1,4 g SDS/ 1 g Protein) und erlaubt somit die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht.

In der Regel erfolgte die Auftrennung von Proteinen mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Proben wurden entsprechend dem Molekulargewicht der erwarteten Proteine auf 8–15%ige Gele geladen und bei 25–35 mA pro Gel in SDS-haltigem Tris-Glycin-Laufpuffer aufgetrennt. Als Größenstandard diene in der Regel der Protein-Marker »Dual Color Precision Plus™ Protein Standards« (Bio-Rad, München).

Für die Auftrennung von niedermolekularen Peptiden und Proteinen ist die Verwendung des Tris-Tricin-Gelsystems nach Schagger und Jagow (Schagger und von Jagow, 1987) wesentlich besser geeignet. So erfolgte die elektrophoretische Auftrennung von A $\beta$ -Peptiden mit Hilfe von 10–20%igen Tris-Tricin-Gradientengelen (Anamed, Darmstadt) bei 40 mA pro Gel in SDS-haltigem Tris-Tricin-Laufpuffer. Hier wurde in der Regel der Protein-Marker »SeeBlue® Pre-Stained Protein Standard« (Invitroge, Karlsruhe) verwendet.

- 4x SDS-Probenpuffer: 250 mM Tris/HCl, pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerin, 0,008% (w/v) Bromphenolblau
- Tris-Glycin-Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 6,8, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
- Tris-Tricin-Laufpuffer: 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M Tricin, 0,1% (w/v) SDS

### 6.2.5 Coomassie-Färbung

Die Färbung von Proteinen im SDS-Polyacrylamid-Gel erfolgte mit kolloidalem Coomassie Brilliantblau (Coomassie G-250) durch Inkubation mit der Färbelösung »GelCode™ Blue Safe Protein Stain« (Pierce, USA) entsprechend der Anweisung des Herstellers. Überschüssige Färbelösung wurde durch mehrfaches Waschen mit H<sub>2</sub>O entfernt.

### 6.2.6 Dot-Blot- und Western-Blot-Analyse

#### Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Für den Dot-Blot wurden zunächst ein Whatman-Papier (Whatman Int. Ltd., GB) und eine Nitrozellulosemembran (Macherey-Nagel, Düren) in PBS eingeweicht und in die Dot-Blot-Apparatur (Schleicher & Schuell, Dassel) eingespannt. Nun wurden 50–400 µl der Proben in die vorgeesehenen »wells« pipettiert. Mittels Pumpe wurde ein Vakuum angelegt, so dass die Proteine auf die Membran gesaugt werden konnten und über hydrophobe Wechselwirkungen auf der Membran haftenblieben. Die Membran wurde aus der Apparatur genommen, kurz getrocknet und anschließend für die Immunodetektion mittels spezifischer Antikörper genutzt.

In der SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennte Proteine wurden im Nassblotverfahren in einer Trans-Blot-Apparatur (Bio-Rad, München) auf Nitrozellulosemembranen übertragen (Western-Blot). Der Transfer erfolgte in Transferpuffer bei 380 mA für 3 h bzw. bei 180 mA über Nacht. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und zur Kontrolle des gleichmäßigen Proteinauftrags und des erfolgreichen Transfers mit einer Ponceaulösung reversibel angefärbt. Die Entfärbung erfolgte durch mehrfaches Waschen der Membran mit PBS.

Sollten A $\beta$ -Peptide auf der Nitrozellulosemembran detektiert werden, so wurde die Membran für 5 min in PBS erhitzt. Dadurch wird das Epitop für den W0-2 Antikörper besser zugänglich und die Signale entsprechend verstärkt.

- Transferpuffer: 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 10% (v/v) Ethanol
- Ponceaulösung: 0,2% (w/v) Ponceau S, 1% (v/v) Essigsäure

#### Immunodetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Die Membranen wurden mit 10% (w/v) Magermilchpulver in PBS für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der gewünschte Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf dem Blot inkubiert und anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS wieder entfernt. Danach erfolgte die Inkubation mit einem Maus- bzw. Kaninchen-spezifischen Sekundärantikörper (Promega, USA), der mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert war und stets in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt wurde. Der Sekundärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Über die gebundenen Antikörper wurden Peptide oder Proteine, die vom jeweiligen Primärantikörper erkannt werden konnten, mittels Chemolumineszenz auf Röntgenfilmen (Amersham-Pharmacia, GB, Hartenstein, Würzburg) indirekt detektiert. Die Chemolumineszenzreaktion wird nach Zugabe des ECL-Reagenzes durch die Meerrettich-Peroxidase katalysiert.

- ECL-Reagenz: 1 ml A (50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,6) + 100 µl B (22 mg p-Hydroxycoumarinsäure in 20 ml DMSO; bei RT und dunkel lagern) + 0,33 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 6.3 MALDI-MS

Bei der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/-Ionisation-Massenspektrometrie (»matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry«, MALDI-MS) erfolgt die Analyse der biologischen Moleküle durch die Bestimmung des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses ( $m/z$ ) der Ionen, die aus der Probe intakt freigesetzt (desorbiert) werden.

Als Matrix wurde entweder  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure (CCA) oder Sinapinsäure (SA) verwendet. CCA und SA wurden dazu in 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure und 30% (v/v) Acetonitril im Ultraschallbad gelöst. Nicht gelöstes Material wurde abzentrifugiert. Die zu untersuchenden Proben wurden 1:1 mit dem Überstand der gesättigten Matrixlösung gemischt, auf den Stahl-Proben-teller (Target) aufgetragen und bei RT vollständig getrocknet, so dass die Matrix zusammen mit den Peptiden bzw. Proteinen auskristallisiert (»Dried-Droplet«-Methode) (Karas und Hillenkamp, 1988). Die Proben wurden dann mit einem Ultraflex II Massenspektrometer (Bruker Daltonic, Bremen) im Reflektor-Modus mit dem Programm »RP-PepMix« vermessen.

### 6.4 Circular dichroismus

Die Sekundärstruktur von Proteinen und Peptiden wurde mittels Circular dichroismus (CD) charakterisiert. Bei dieser Methode wird die Tatsache ausgenutzt, dass links- und rechtsdrehend zirkular polarisiertes Licht von einer optisch aktiven (chiralen) Substanz unterschiedlich stark absorbiert wird.

Aufgrund der Chiralität von Peptidstrukturen ist das CD-Spektrum im fernen UV-Bereich (170 nm bis 250 nm, Amid-Region) sehr empfindlich gegenüber der Sekundärstruktur von Proteinen und Peptiden. Ein CD-Spektrum mit einem Maximum bei 190 nm und zwei Minima bei 210 und 220 nm deuten dabei auf eine  $\alpha$ -helikale Struktur hin, während eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur ein Maximum bei 190 nm und ein Minimum bei 220 nm liefert. Ein CD-Spektrum mit einem Maximum bei 220 nm und einem Minimum bei 190 nm ist charakteristisch für eine zufällige Struktur (»random coil«).

Synthetisches A $\beta$ -Peptid wurde frisch gelöst, in 50 mM Natriumphosphat (pH 7,0) aufgenommen und auf eine Konzentration von 50  $\mu$ M eingestellt. Für die CD-Messungen der C100-Proben wurden die Eluate der Ni-NTA-Säule (s. 6.2.2) in 50 mM Natriumphosphat (pH 7,0) umgepuffert und eine Konzentration von 50  $\mu$ M eingestellt. Die Proben wurden gegebenenfalls mit Sulindac Sulfid, gelöst in Methanol, versetzt, so dass die Methanol-Endkonzentration 8% (v/v) betrug. Alle Proben wurden mit einem Jasco J-810 CD-Spektropolarimeter (Jasco, USA) bei 20°C vermessen. Die Küvette aus UV-Quarzglas (Hellma, Jena) hatte eine Schichtdicke von 0,1 cm. Die CD-Spektren wurden mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 100 nm/min im Wellenbereich von 250–190 nm aufgezeichnet (2 nm Bandbreite, 1 s Response). Die Auflösung betrug 0,2 nm, die Empfindlichkeit des Geräts betrug 100 mdeg. Für jedes CD-Spektrum wurden fünf Wiederholungen akkumuliert und die Spektren um das dazugehörige Lösungsmittelspektrum korrigiert.

### 6.5 Kernspin-Resonanz-Spektroskopie

Alle Kernspin-Resonanz- (»nuclear magnetic resonance«, NMR) Analysen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernd Reif (TU München) an einem Bruker 600-MHz Avance

Festkörper-NMR-Spektrometer (Bruker Biospin, Karlsruhe) bei 5°C durchgeführt. Wie in Dasari et al. beschrieben wurde rekombinantes, <sup>15</sup>N-markiertes Aβ42 in *E. coli* exprimiert und anschließend aus »inclusion bodies« aufgereinigt. Das Peptid wurde nun in 20 mM NaOH durch eine 15–20-minütige Ultraschallbehandlung solubilisiert (Dasari et al., 2011). Das gelöste Peptid wurde nun mit 50 mM Phosphat-Puffer (pH 7,0) auf eine Endkonzentration von 100 μM verdünnt und entweder mit einem dreifachen molaren Überschuss an Sulindac Sulfid oder einer entsprechenden Menge DMSO versetzt und direkt vermessen, um ein zweidimensionales Festkörper-NMR-Spektrum zu generieren.

## 6.6 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analysen

Die Oberflächenplasmonresonanz- (»surface plasmon resonance«, SPR) Analysen wurden mit einem Biacore 3000-Gerät (GE Healthcare, München) bei 25°C durchgeführt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden vor Verwendung steril filtriert und 30 min im Ultraschallbad entgast.

### 6.6.1 Aminkopplung

Für die Kopplung von synthetischen Aβ-Peptiden wurden CM5-Sensorchips (GE Healthcare, München) oder wahlweise SCB CMD500L-Sensorchips (XanTec bioanalytics, Düsseldorf) verwendet. Diese Sensorchips besitzen eine carboxymethylierte Dextran-Oberfläche, die eine kovalente Immobilisierung der gewünschten Liganden über Aminkopplung erlaubt. Bei der Aminkopplung reagieren freie NH<sub>2</sub>-Gruppen des Liganden mit Ester-Gruppen auf dem Sensorchip zu Amidien.

Die Aktivierung der Sensorchip-Oberfläche erfolgte durch eine 7-minütige Injektion eines 1:1-Gemisches aus 0,2 M EDC (1-Ethyl-3-[dimethylaminopropyl]-carbodiimid) und 0,05 M NHS (N-Hydroxysuccinimid) nach Herstellerangaben (GE Healthcare, München), wodurch die Carboxylgruppen der Dextran-Oberfläche in reaktive NHS-Ester überführt werden. Anschließend wurde eine frisch gelöste 1 mg/ml Aβ-Lösung (s. 6.2.1) 1:10 in Kopplungspuffer verdünnt und sofort für 5 min bei einer Flussrate von 10 μl/min gekoppelt. Freie NHS-Ester wurden abschließend mittels einer 7-minütigen Injektion von 1 M Ethanolamin (pH 8,5) abgesättigt. In der Regel wurden 600–2000 RU gekoppelt. Mit der entsprechenden Referenz-Flusszelle wurde analog verfahren, jedoch ohne Zusatz eines Liganden.

- Laufpuffer: PBS (0,005% (v/v) Surfactant P20)
- Kopplungspuffer: 10 mM Natriumacetat, pH 3,4

### 6.6.2 Kopplung durch Chelatierung mittels Ni-NTA

Für die Kopplung von His-Tag-Liganden kamen NTA-Sensorchips (GE Healthcare, München) oder wahlweise SCB NiHC80m-Sensorchips (XanTec bioanalytics, Düsseldorf) zum Einsatz. Die Dextran-Oberfläche dieser Sensorchips ist endständig mit dem NTA-Chelator funktionalisiert und eignet sich nach Komplexbildung von Ni<sup>2+</sup> zur reversiblen Immobilisierung His-Tag-modifizierter Peptide und Proteine (Nieba et al., 1997).

Der Sensorchip wurde initial für 1 min mit Regenerationslösung konditioniert (Flussrate: 20 μl/min). Verbleibende EDTA-Reste wurden unter Verwendung der »EXTRACLEAN«-Funktion aus der Anlage gespült. Anschließend wurden 20 μl Ni<sup>2+</sup>-Lösung injiziert (Flussrate: 5 μl/min) und erneut

die Waschprozedur »EXTRACLEAN« durchgeführt. Die Eluate der Ni-NTA-Säule (s. 6.2.2) wurden in Laufpuffer umgepuffert und bei Bedarf verdünnt. Je 40–200 µl einer 1 µg/ml Lösung wurden bei einer Flussrate von 20 µl/min injiziert. Zur Kontrolle wurde C100 über eine nicht mit Nickel beladene Flusszelle gegeben, wobei kein Anstieg der RU zu verzeichnen war.

Zur Regeneration des Sensorchips wurde bei einer Flussrate von 20 µl/min für 3 min mit Regenerationslösung und dann mit Hilfe der Waschprozedur »EXTRACLEAN« gewaschen. Auf dem Sensorchip präzipitiertes C100 wurde entfernt, indem nacheinander mit je 30 µl 100 mM NaOH, 8 M Harnstoff und 0,5% (w/v) SDS und danach über Nacht mit Laufpuffer gewaschen wurde.

- Laufpuffer: 0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 1 µM EDTA, 0,005% (v/v) Surfactant P20
- Ni<sup>2+</sup>-Lösung: 500 µM NiCl<sub>2</sub> in Laufpuffer
- Regenerationslösung: 0,01 M HEPES, pH 8,5, 0,15 M NaCl, 0,5 M EDTA, 0,005% (v/v) Surfactant P20
- Dispenserpuffer: 0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% (v/v) Surfactant P20

### 6.6.3 Bindungs-Analysen

Für die jeweiligen Messreihen wurden Stammlösungen der zu untersuchenden Substanzen, gelöst in DMSO, jeweils 1:1000 in den entsprechenden Laufpuffer verdünnt. Die Proben wurden in aufsteigender Konzentration unter Verwendung der »KINJECT«-Funktion für mindestens 1 min bei einer Flussrate von 30 µl/min injiziert. Es folgte eine Dissoziationsphase von 200 s. Für den Nullabgleich wurde 0,1% (v/v) DMSO in Laufpuffer (Pufferkontrolle) mitgeführt. Gegebenenfalls wurde nach einem Probenlauf mit 20 mM HCl gespült.

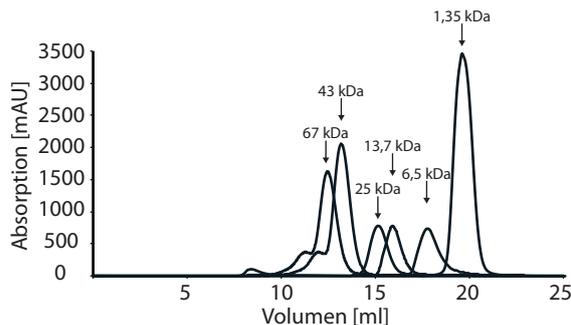
Direkt nach der Kopplung sowie zwischen den einzelnen Messreihen erfolgte in der Regel die Injektion von 30 µl des Antikörpers W0-2 (3,4 µg/ml in Laufpuffer, Flussrate: 30 µl/min), um die Kopplung und die Integrität der Sensorchip-Oberfläche zu überprüfen.

Die Auswertung der aufgenommenen Sensorgramme wurde mit Hilfe der Software »BIAevaluation« (Version 4.1, GE Healthcare, München) vorgenommen. Zunächst wurde die Basislinie (ein Zeitpunkt vor der Injektion) aller Sensorgramme einer Messreihe auf 0 RU gesetzt (»Y-Transform«). Um unspezifische Interaktionen mit der Sensorchip-Oberfläche auszuschließen, wurden dann entsprechende Signale der Referenz-Flusszelle von den Mess-Flusszellen abgezogen. Darüber hinaus wurden Signale der Pufferkontrolle subtrahiert.

### 6.7 Größenausschluss-Chromatographie

Mit Hilfe der Größenausschluss-Chromatographie (»size exclusion chromatography«, SEC) können Moleküle nach ihrer Größe getrennt werden. Die Trennung beruht dabei auf der unterschiedlichen Verteilung von Molekülen zwischen einer stationären Phase (Gelfiltrationsmatrix) und einer mobilen Phase (Laufmittel). Die stationäre Phase besteht dabei aus stark vernetzten Polymeren, die Poren mit definierter Größe ausbilden. Löst man die aufzutrennenden Moleküle im Laufmittel und trägt sie auf die stationäre Phase auf, so bewegen sich während des Trennvorgangs solche Moleküle, die größer sind als die Poren der stationären Phase, mit dem Laufmittel an den Poren vorbei. Kleine gelöste Moleküle hingegen können in die Poren eindringen, wodurch sie zurückgehalten werden und ihre Wanderungsgeschwindigkeit sich vermindert.

Die Größenausschluss-Chromatographie erfolgte an einer Äkta FPLC-Anlage (Pharmacia, Freiburg). Zur Auftrennung von A $\beta$ -Peptiden wurde die Größenausschluss-Säule Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare, München) mit vernetzter Agarose als Gelfiltrationsmatrix verwendet. Diese Säule hat ein Bettvolumen von 24 ml und einen theoretischen Trennbereich von 1–300 kDa. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden vor Verwendung steril filtriert und 30 min im Ultraschallbad entgast. Als Laufmittel diente in der Regel PBS. Die Flussrate betrug stets 0,5 ml/min. Vor dem Probenauftrag wurde die Säule mit dreifachem Bettvolumen Laufmittel equilibriert. Die Proteine wurden dann in einem Volumen von 200  $\mu$ l über eine Probenschlaufe appliziert.



**Abb. 35: SEC-Eichläufe zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von mono- und oligomeren A $\beta$ -Formen.** BSA (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa), RNaseA (13,7 kDa), Aprotinin (6,5 kDa) und Vitamin B12 (1,35 kDa) kamen als Standards zum Einsatz. Dargestellt sind exemplarische Eichläufe aus mindestens drei unabhängigen Säulenläufen für jede verwendete Säule.

Zur Ermittlung der Größenverteilung des A $\beta$ -Monomers sowie von niederen und höheren A $\beta$ -Oligomeren wurden Eichläufe mit folgende Standards durchgeführt: Blue Dextran 2000 (~2000 kDa), BSA (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa), RNase A (13,7 kDa), Aprotinin (6,5 kDa) und Vitamin B12 (1,35 kDa) (Abb. 35). Mit Hilfe des erhaltenen Elutionsprofils konnte eine Eichgerade erstellt werden, indem das Elutionsvolumen der Standards gegen das jeweilige Molekulargewicht aufgetragen wurde. Anhand der Steigung dieser Eichgeraden ließ sich schließlich die Molekulargewichtsverteilung der eluierten mono- und oligomeren A $\beta$ -Formen bestimmen (Walsh et al., 1997).

Nach mindestens jedem zweiten Probenlauf wurde die Säule erst mit zweifachem Bettvolumen 50% (v/v) Ameisensäure oder 1 M NaOH und dann mit dreifachem Bettvolumen H<sub>2</sub>O oder Laufmittel gespült. Die Säule wurde bis zur weiteren Verwendung in 20% (v/v) Ethanol gelagert.

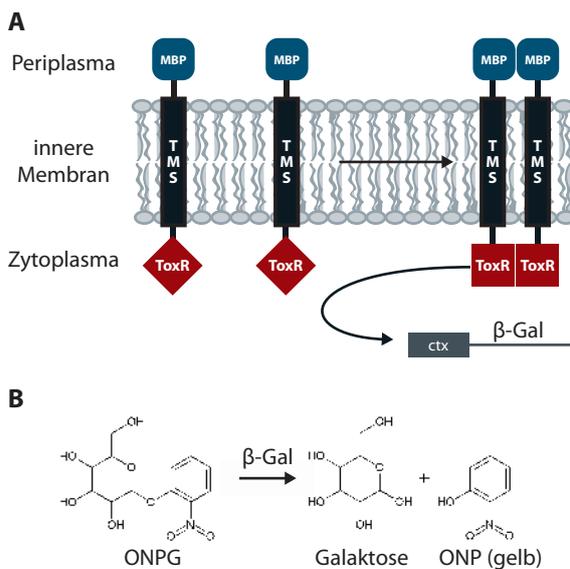
## 6.8 Elektronenmikroskopie

Die Darstellung von 48 h gereiften A $\beta$ 42-Fibrillen wurde in Kooperation mit Dr. Rudi Lurz (Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin) mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen ermöglicht. Dazu wurde zunächst eine frisch gelöste 1 mg/ml A $\beta$ -Lösung (s. 6.2.1) mit PBS auf eine Endkonzentration von 50  $\mu$ M eingestellt, mit Sulindac Sulfid bzw. 1% (v/v) DMSO versetzt und anschließend für 48 h bei RT inkubiert. Zur Detektion der Fibrillen im Elektronenmikroskop wurde das Peptid kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen, um dann mit 2% (w/v) Uranylacetatlösung gefärbt zu werden. Die angefärbten Fibrillen wurden auf einem Kohlenstofffilm immobilisiert und mit einem Philips CM100 Elektronenmikroskop bei 100 kV und einer CCD-Kamera (Tietz Video und Image Processing Systems GmbH, Gauting) aufgenommen. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Adobe Photoshop CS5.

## 6.9 Dimerisierungs-Assay

### 6.9.1 ToxR-Assay zur Bestimmung der relativen Dimerisierungsstärke

Mit Hilfe des bakteriellen ToxR-Systems (Abb. 38A) lassen sich dimerisierende Transmembransequenzen (TMS) in einer nativen Membranumgebung identifizieren und charakterisieren (Langosch et al., 1996). Dabei werden chimäre Proteine bestehend aus der zytoplasmatischen Domäne des ToxR-Transkriptionsaktivators (ToxR) aus *V. cholerae*, aus einer kurzen TMS und aus dem periplasmatischen Maltosebindeprotein (MBP) in *E. coli*-Zellen des Indikatorstammes FHK12 exprimiert (Kolmar et al., 1995; Langosch et al., 1996). In diesem Stamm steht das chromosomal integrierte lacZ-Gen unter Kontrolle des ctx-Promotors (Kolmar et al., 1995). Eine hohe gegenseitige Affinität der zu untersuchenden TMS führt zur Dimerisierung der Fusionsproteine und dadurch zur räumlichen Annäherung der ToxR-Domänen. Da die ToxR-Domänen ausschließlich in dimerer Form den ctx-Promotor aktivieren, hat die Oligomerisierung der betrachteten TMS die Transkriptionsaktivierung des lacZ-Gens und letztlich die Expression des Reporterenzym  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) zur Folge. Die  $\beta$ -Gal-katalysierte Hydrolyse des chromogenen Substrats o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG) zu o-Nitrophenol (ONP, gelbes Spaltprodukt) kann im Bakterienlysat quantifiziert werden (Abb. 38B).



**Abb. 36: Darstellung des ToxR-Systems.** (A) ToxR-Fusionsproteine bestehend aus dem Maltosebindeprotein (MBP), der zu untersuchenden TMS und der zytoplasmatischen Domäne des ToxR-Transkriptionsaktivators (ToxR) werden in *E. coli* des Stammes FHK12 exprimiert. Die TMS-vermittelte Dimerisierung der ToxR-Fusionsproteine in der inneren Membran aktiviert die Transkription des ctx-Promotor-kontrollierten lacZ-Gens und induziert so die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal). (B) Die gebildete  $\beta$ -Gal ist in der Lage, das Substrat ONPG in ein gelbes Produkt (ONP) und Galaktose zu spalten. Die Menge der so erzeugten  $\beta$ -Gal korreliert dabei mit der relativen Dimerisierungsstärke und kann durch den Umsatz des Farbstoff-bildenden Substrats photometrisch bei 405 nm bestimmt werden.

#### Ermittlung der relativen Dimerisierungsstärke (Substratumsatz durch die $\beta$ -Gal)

Kompetente FHK12-Zellen wurden mit den entsprechenden ToxR-Konstrukten transformiert (s. 6.1.1 und 6.1.2). 4 ml FHK-Medium wurden mit 10  $\mu$ l des Transformationsansatzes angeimpft und die Zellen über Nacht unter Schütteln bei 37°C wachsen gelassen. Jeweils 1 ml frisches FHK-Medium wurde mit 10  $\mu$ l der Übernachtskultur angeimpft (Vierfachbestimmung).

Gegebenenfalls wurde das Medium mit einer zu untersuchenden Substanz oder mit einer entsprechenden Menge an DMSO (0,01–0,1%) versetzt. Dem Medium wurde zudem 10  $\mu$ g/ml Polymyxin-B-Nonapeptid (PMBN) als Hilfsstoff zugefügt, um die Permeabilität der äußeren Bakterienmembran gegenüber den Substanzen zu erhöhen, die ansonsten nicht in der Lage wären, diese effektiv zu überwinden (Vaara, 1991). Die Kultivierung erfolgte in 24-«well»-Zellkulturplatten bei

37°C und 200 rpm über einen Zeitraum von 6 h. Anschließend wurden 10 µl jedes 24-«wells» auf eine 96-«well»-Mikrotiterplatte überführt und in je 100 µl Chloroform-gesättigten Z-Puffer aufgenommen. Nun erfolgte die Bestimmung der Zellkonzentrationen durch eine photometrische Messung der OD<sub>620</sub>. Zur Zelllyse wurden je 50 µl vorgewärmter SDS-haltiger Z-Puffer zugegeben und die Mikrotiterplatte für 10 min bei 37°C inkubiert. Die β-Gal-katalysierte Farbreaktion wurde durch Zugabe von je 50 µl Z-Puffer/ONPG gestartet und die Absorption photometrisch bei 405 nm (A<sub>405</sub>) über 20 min verfolgt. Der Substratumsatz durch die β-Gal wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Substratumsatz } \beta\text{-Gal [Miller Units]} = A_{405}/(\text{OD}_{620} \times \text{Zeit [min]})$$

Aus den Vierfachbestimmungen wurde stets ein Mittelwert gebildet. Um den Effekt der untersuchten Substanzen aus mehreren unabhängigen ToxR-Assays zu vergleichen, wurde die DMSO-Kontrolle immer auf 100% gesetzt. Um verschiedene ToxR-Konstrukte über mehrere ToxR-Assays hinweg miteinander vergleichen zu können, wurde jeweils der Mittelwert einer Referenzkonstrukts gleich 100% gesetzt und alle weitere Konstrukte prozentual zum Referenzkonstrukt verglichen.

### **Kontrolle des Expressionsspiegels der ToxR-Fusionsproteine**

Die gleichmäßige Expression der ToxR-Fusionsproteine wurde überprüft, indem im Anschluss an einen ToxR-Assay aus jedem der 24-«wells» 200 µl Kultur entnommen und die jeweiligen Vierfachbestimmungen vereinigt wurden. Die Bakterien wurden zweimal mit PBS gewaschen und bei 3000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und dreimal für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Davon wurden 5–10 µl auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Nachweis der etwa 66 kDa großen ToxR-Fusionsproteine erfolgte im Western-Blot mit Hilfe eines Anti-MBP-Antiserums (New England Biolabs, USA).

- FHK-Medium: 1% (w/v) Hefe-Extrakt, 1,6% (w/v) Bakto-Trypton, 0,5% (w/v) NaCl, 2% (w/v) Glukose, 0,05–0,2% (w/v) L-Arabinose und 0,4 mM IPTG
- Z-Puffer: 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>
- Z-Puffer/Chloroform: Z-Puffer, 10% (v/v) Chloroform, 1% (v/v) β-Mercaptoethanol
- Z-Puffer/SDS: Z-Puffer, 1,6% (w/v) SDS
- Z-Puffer/ONPG: Z-Puffer, 0,4% (w/v) ONPG

### **6.9.2 PD28-Wachstums-Assay zur Kontrolle der Membranintegration**

Das periplasmatische MBP des ToxR-Fusionsproteins dient nicht nur zur Detektion bei der Western-Blot-gestützten Analyse des Expressionsspiegels, sondern auch zur Kontrolle der korrekten und effizienten Membranintegration der chimären Proteine. Das MBP spielt in *E. coli* eine essentielle Rolle bei der energieabhängigen Aufnahme von Maltose über die innere Bakterienmembran. Demnach können MBP-defiziente *E. coli*-Zellen in einem Minimalmedium mit Maltose als einzige Kohlenhydratquelle nur dann wachsen, wenn sie ToxR-Fusionsproteine exprimieren, die in die innere Bakterienmembran integriert sind und deren MBP dabei im Periplasma vorliegt.

Kompetente MBP-defiziente *E. coli* des Stammes PD28 wurden mit den entsprechenden ToxR-Konstrukten transformiert und die Zellen über Nacht in 4 ml LB-Medium bei 37°C kultiviert (s. 6.1.1 und 6.1.2). Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und in 800 µl PBS resuspendiert. Je 2 ml M9-Minimalmedium wurden in einer 12-«well»-Platte vorgelegt und danach mit 10 µl der Bakteriensuspension angeimpft (Dreifachbestimmung). Es erfolgte eine Inkubation für 48 h bei 37°C. Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h wurden je 200 µl der Ansätze auf eine 96-«well»-Mikrotiterplatte überführt und das Zellwachstum durch Messung der OD<sub>620</sub> bestimmt. Als Referenz für eine fehlende bzw. nicht effiziente Membranintegration wurde in jedem Assay ein Konstrukt ohne TMS ( $\Delta$ TM) mitgeführt. Die Mittelwerte aus mehreren unabhängigen PD28-Assays wurden miteinander verglichen, indem ein Referenzkonstrukt jeweils auf 100% gesetzt wurde.

- 5x M9-Salze: 240 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 110 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 45 mM NaCl, 95 mM NH<sub>4</sub>Cl
- M9-Minimalmedium: 1x M9-Salze, 0,4% (w/v) Maltose, 80 µg/ml Leucin, 80 µg/ml Threonin, 2 mM MgSO<sub>4</sub>

### 6.10 Kultivierung eukaryotischer Zellen

SH-SY5Y-Zellen und CHO-Zellen wurden im Brutschrank unter Zusatz von 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### 6.11 ELISA

Der Einfluss der Sulindac-Derivate (Substanzen (a)–(h), s. Abb. 27) auf die APP-Prozessierung wurde mittels A $\beta$ 38-, A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-spezifischer ELISAs (»enzyme-linked immunosorbent assay«) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sascha Weggen (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) untersucht. Dabei wurden CHO-Zellen verwendet, die sowohl das humane Wildtyp-APP751 als auch das humane Wildtyp-PS1 stabil überexprimieren (Czirr et al., 2007). Die Zellen wurden für 24 h mit einer Substanzkonzentration von 60 µM oder mit einer entsprechenden Menge an DMSO behandelt. A $\beta$ 38-, A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Mengen wurden anschließend aus dem konditionierten Medium bestimmt (Czirr et al., 2007). Als Fangantikörper wurde der A $\beta$ -spezifische monoklonale Antikörper IC16, der gegen die N-terminalen 16 Aminosäuren des A $\beta$ -Peptids gerichtet ist, verwendet. Die C-terminal spezifischen Antikörper BAP-29 (A $\beta$ 38), BAP-24 (A $\beta$ 40) bzw. BAP-15 (A $\beta$ 42) wurden mittels »EZ-Link™ Plus Activated Peroxidase Kit« (Thermo Fisher Scientific, USA) entsprechend den Herstellerangaben an HRP gekoppelt und zur Detektion von A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 eingesetzt.

Der Antikörper IC16 wurde 1:250 in PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C an eine geeignete 96-«well»-Mikrotiterplatte gekoppelt. Dazu wurden jeweils 100 µl in jedes »well« überführt. Ungebundener Antikörper wurde anschließend vollständig entfernt und 50 µl ELISA-Probenpuffer in jedes »well« vorgelegt. Zur Quantifizierung der gebildeten A $\beta$ -Spezies wurden 100 µl konditioniertes Medium für A $\beta$ 38, 10 µl für A $\beta$ 40 und 50 µl für A $\beta$ 42 eingesetzt. Jeweils 50 µl der entsprechenden A $\beta$ -Standardreihe wurden geladen. Die HRP-gekoppelten A $\beta$ 38-, A $\beta$ 40- bzw. A $\beta$ 42-spezifischen Detektionsantikörper wurden 1:125, 1:1000 bzw. 1:500 in ELISA-Probenpuffer verdünnt und jeweils 50 µl davon wurden in die entsprechenden »wells« überführt. Gegebenenfalls wurde mit ELISA-Probenpuffer auf ein Endvolumen von 200 µl pro »well« aufgefüllt.

Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Platten dreimal mit PBS-T und ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 50 µl »1-Step™ Ultra TMB ELISA-Substrat« (Thermo Fisher Scientific, USA) erfolgte die Reaktionsentwicklung im Dunkeln für 1-10 min bei RT. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Platte bei 450 nm ausgelesen.

Für die Aβ-Standardreihen wurden die synthetischen Peptide Aβ38, Aβ40 und Aβ42 (Bachem AG, Schweiz) in einer Konzentration von 1 mg/ml in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Direkt vor Gebrauch wurden die Peptide in ELISA-Probenpuffer verdünnt (125-3000 pg/ml).

Die gebildeten Aβ-Spezies wurden bei einer Substanzkonzentration von 60 µM mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm »GraphPad Prism« (GraphPad Software, USA).

- PBS-T: PBS, 0,05% (v/v) Tween-20
- ELISA-Probenpuffer: PBS-T, 0,5% (w/v) BSA

### 6.12 Molekulares Modell

Das Modell der Interaktion der APP-TMS mit ausgewählten Substanzen wurde von Dr. Peter W. Hildebrand (Charité Berlin) mit dem Programm »GOLD« (»Genetic Optimization for Ligand Docking«, Cambridge Crystallographic Data Centre, UK) erstellt. Dieses Programm verwendet einen genetischen Algorithmus zur Vorhersage von Liganden-Positionen in Protein-Bindungs-taschen, wobei sowohl die Konformation als auch die Positionierung des Liganden gleichzeitig optimiert werden (Jones et al., 1997).

Das APP-TMS-Modell, bestehend aus den Aminosäuren E23 bis V45 (entsprechend der Aβ-Numerierung), basierte auf der Struktur von Glycophorin A aus einer früheren Analyse (Munter et al., 2007). Die chemischen Strukturen der zu analysierenden Substanzen wurden der Datenbank »PubChem« entnommen und mit Hilfe der Software »DS-Viewer« (Accelrys, USA) dargestellt. Die computerbasierten Berechnungen wurden unter einer flexiblen Betrachtung von Aminosäure-Seitenketten und Substanzen (»flexible docking«) durchgeführt. Als Fitness-Funktion, mit der die Qualität der Einpassung bewertet wird, wurde der sogenannte »GOLD-Score« verwendet. Dieser beinhaltet folgende Parameter: (i) Energie der Wasserstoff-Brücken zwischen Protein und Ligand, (ii) Energie der van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand, (iii) Energie der internen van-der-Waals-Wechselwirkungen des Liganden und (iv) Energie der Torsionsspannung des Liganden. Alle Abbildungen wurden mit dem Programm »PyMOL Molecular Graphics System« erstellt.

---

## 7. Literaturverzeichnis

- Araki, W., Saito, S., Takahashi-Sasaki, N., Shiraishi, H., Komano, H., and Murayama, K. S. (2006). Characterization of APH-1 mutants with a disrupted transmembrane GxxxG motif. *J Mol Neurosci* 29, 35-43.
- Abdul-Hay, S. O., Edirisinghe, P., and Thatcher, G. R. (2009). Selective modulation of amyloid beta peptide degradation by flurbiprofen, fenofibrate, and related compounds regulates Abeta levels. *J Neurochem*
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin* 64, 146-148.
- Arkin, I. T., and Brunger, A. T. (1998). Statistical analysis of predicted transmembrane alpha-helices. *Biochim Biophys Acta* 1429, 113-128.
- Asai, M., Hattori, C., Szabo, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., and Ishiura, S. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 231-235.
- Ash, W. L., Stockner, T., MacCallum, J. L., and Tieleman, D. P. (2004). Computer modeling of polyleucine-based coiled coil dimers in a realistic membrane environment: insight into helix-helix interactions in membrane proteins. *Biochemistry* 43, 9050-9060.
- Asundi, V. K., and Carey, D. J. (1995). Self-association of N-syndecan (syndecan-3) core protein is mediated by a novel structural motif in the transmembrane domain and ectodomain flanking region. *J Biol Chem* 270, 26404-26410.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R. L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D., and Yednock, T. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6, 916-919.
- Baulac, S., LaVoie, M. J., Kimberly, W. T., Strahle, J., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J., and Xia, W. (2003). Functional gamma-secretase complex assembly in Golgi/trans-Golgi network: interactions among presenilin, nicastrin, Aph1, Pen-2, and gamma-secretase substrates. *Neurobiol Dis* 14, 194-204.
- Bedouelle, H., and Duplay, P. (1988). Production in *Escherichia coli* and one-step purification of bifunctional hybrid proteins which bind maltose. Export of the Klenow polymerase into the periplasmic space. *Eur J Biochem* 171, 541-549.
- Beel, A. J., Barrett, P., Schnier, P. D., Hitchcock, S. A., Bagal, D., Sanders, C. R., and Jordan, J. B. (2009). Non-Specificity of Binding of gamma-Secretase Modulators to the Amyloid Precursor Protein. *Biochemistry*
- Beel, A. J., and Sanders, C. R. (2008). Substrate specificity of gamma-secretase and other intra-membrane proteases. *Cell Mol Life Sci* 65, 1311-1334.

- Beglopoulos, V., Sun, X., Saura, C. A., Lemere, C. A., Kim, R. D., and Shen, J. (2004). Reduced beta-amyloid production and increased inflammatory responses in presenilin conditional knock-out mice. *J Biol Chem* 279, 46907-46914.
- Behr, D., Clarke, E. E., Wrigley, J. D., Martin, A. C., Nadin, A., Churcher, I., and Shearman, M. S. (2004). Selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives target gamma-secretase at a novel site. Evidence for an allosteric mechanism. *J Biol Chem* 279, 43419-43426.
- Behr, D., Hesse, L., Masters, C. L., and Multhaup, G. (1996). Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J Biol Chem* 271, 1613-1620.
- Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J. C., Curran, E., Citron, M., and Vassar, R. (2000). Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem* 275, 20647-20651.
- Beyermann, M., Fechner, K., Furkert, J., Krause, E., and Bienert, M. (1996). A single-point slight alteration set as a tool for structure-activity relationship studies of ovine corticotropin releasing factor. *J Med Chem* 39, 3324-3330.
- Botev, A., Munter, L. M., Wenzel, R., Richter, L., Althoff, V., Ismer, J., Gerling, U., Weise, C., Kokschi, B., Hildebrand, P. W., Bittl, R., and Multhaup, G. (2011). The amyloid precursor protein C-terminal fragment C100 occurs in monomeric and dimeric stable conformations and binds gamma-secretase modulators. *Biochemistry* 50, 828-835.
- Breen, K. C., Bruce, M., and Anderton, B. H. (1991). Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J Neurosci Res* 28, 90-100.
- Brockhaus, M., Grunberg, J., Rohrig, S., Loetscher, H., Wittenburg, N., Baumeister, R., Jacobsen, H., and Haass, C. (1998). Caspase-mediated cleavage is not required for the activity of presenilins in amyloidogenesis and NOTCH signaling. *Neuroreport* 9, 1481-1486.
- Brosig, B., and Langosch, D. (1998). The dimerization motif of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues. *Protein Sci* 7, 1052-1056.
- Brunkan, A. L., Martinez, M., Walker, E. S., and Goate, A. M. (2005a). Presenilin endoproteolysis is an intramolecular cleavage. *Mol Cell Neurosci* 29, 65-73.
- Brunkan, A. L., Martinez, M., Wang, J., Walker, E. S., Behr, D., Shearman, M. S., and Goate, A. M. (2005b). Two domains within the first putative transmembrane domain of presenilin 1 differentially influence presenilinase and gamma-secretase activity. *J Neurochem* 94, 1315-1328.
- Bush, A. I., Multhaup, G., Moir, R. D., Williamson, T. G., Small, D. H., Rumble, B., Pollwein, P., Beyreuther, K., and 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.
- Buxbaum, J. D., Gandy, S. E., Cicchetti, P., Ehrlich, M. E., Czernik, A. J., Fracasso, R. P., Ramabhadran, T. V., Unterbeck, A. J., and Greengard, P. (1990). Processing of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6003-6006.

- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., and Black, R. A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273, 27765-27767.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., and Wong, P. C. (2001). BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4, 233-234.
- Cao, X., and Sudhof, T. C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-120.
- Cao, X., and Sudhof, T. C. (2004). Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem* 279, 24601-24611.
- Chandu, D., Huppert, S. S., and Kopan, R. (2006). Analysis of transmembrane domain mutants is consistent with sequential cleavage of Notch by gamma-secretase. *J Neurochem* 96, 228-235.
- Chen, M., and Yankner, B. A. (1991). An antibody to beta amyloid and the amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types. *Neurosci Lett* 125, 223-226.
- Chen, W. J., Goldstein, J. L., and 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.
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D. J. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-674.
- Clark, M. J., Gagnon, J., Williams, A. F., and Barclay, A. N. (1985). MRC OX-2 antigen: a lymphoid/neuronal membrane glycoprotein with a structure like a single immunoglobulin light chain. *EMBO J* 4, 113-118.
- Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J., and 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., Risch, N. J., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C. J., Rimmler, J. B., Locke, P. A., Conneally, P. M., Schmechel, K. E., and et, a. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7, 180-184.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., and 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., and 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.

- Czirr, E., Leuchtenberger, S., Dorner-Ciossek, C., Schneider, A., Jucker, M., Koo, E. H., Pietrzik, C. U., Baumann, K., and Weggen, S. (2007). Insensitivity to Abeta42-lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gamma-secretase inhibitors is common among aggressive presenilin-1 mutations. *J Biol Chem* 282, 24504-24513.
- Czirr, E., and Weggen, S. (2006). Gamma-secretase modulation with Abeta42-lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs and derived compounds. *Neurodegener Dis* 3, 298-304.
- Dasari, M., Espargaro, A., Sabate, R., Lopez del Amo, J. M., Fink, U., Grelle, G., Bieschke, J., Ventura, S., and Reif, B. (2011). Bacterial inclusion bodies of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides can be employed to study native-like aggregation intermediate states. *Chembiochem* 12, 407-423.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A., and Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.
- DeMattos, R. B., Bales, K. R., Cummins, D. J., Dodart, J. C., Paul, S. M., and Holtzman, D. M. (2001). Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8850-8855.
- Dyrks, T., Weidemann, A., Multhaup, G., Salbaum, J. M., Lemaire, H. G., Kang, J., Muller-Hill, B., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1988). Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J* 7, 949-957.
- Ebke, A., Luebbbers, T., Fukumori, A., Shirotani, K., Haass, C., Baumann, K., and Steiner, H. (2011). Novel {gamma}-secretase modulators directly target presenilin. *J Biol Chem*
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5, 486-488.
- Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C. L., Weidemann, A., and Beyreuther, K. (2004). The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J Biol Chem* 279, 18146-18156.
- Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., and Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160, 113-123.
- Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Smith, T. E., Weggen, S., Das, P., McLendon, D. C., Ozols, V. V., Jessing, K. W., Zavitz, K. H., and Koo, E. H. (2003). NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target  $\gamma$ -secretase and lower A $\beta$ 42 in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 112, 440-449.
- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P. J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.

- Etienne, F., Resnick, L., Sagher, D., Brot, N., and Weissbach, H. (2003). Reduction of Sulindac to its active metabolite, sulindac sulfide: assay and role of the methionine sulfoxide reductase system. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 1005-1010.
- Fan, S. S., and Shen, T. Y. (1981). Membrane effects of antiinflammatory agents. 1. Interaction of sulindac and its metabolites with phospholipid membrane, a magnetic resonance study. *J Med Chem* 24, 1197-1202.
- Fluhrer, R., Multhaup, G., Schlicksupp, A., Okochi, M., Takeda, M., Lammich, S., Willem, M., Westmeyer, G., Bode, W., Walter, J., and Haass, C. (2003). Identification of a beta-secretase activity, which truncates amyloid beta-peptide after its presenilin-dependent generation. *J Biol Chem* 278, 5531-5538.
- Fortini, M. E. (2002). Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 673-684.
- Fraering, P. C., Ye, W., Strub, J. M., Dolios, G., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., van Dorsselaer, A., Wang, R., Selkoe, D. J., and Wolfe, M. S. (2004). Purification and characterization of the human gamma-secretase complex. *Biochemistry* 43, 9774-9789.
- Freude, K. K., Penjwini, M., Davis, J. L., LaFerla, F. M., and Blurton-Jones, M. (2011). Soluble amyloid precursor protein induces rapid neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Biol Chem* 286, 24264-24274.
- Galimberti, D., and Scarpini, E. (2011). Progress in Alzheimer's disease. *J Neurol*
- Gamerding, M., Clement, A. B., and Behl, C. (2007). Cholesterol-like effects of selective cyclooxygenase inhibitors and fibrates on cellular membranes and amyloid-beta production. *Mol Pharmacol* 72, 141-151.
- Gamerding, M., Clement, A. B., and Behl, C. (2008). Effects of sulindac sulfide on the membrane architecture and the activity of gamma-secretase. *Neuropharmacology* 54, 998-1005.
- Ghosh, A. K., Bilcer, G., Harwood, C., Kawahama, R., Shin, D., Hussain, K. A., Hong, L., Loy, J. A., Nguyen, C., Koelsch, G., Ermolieff, J., and Tang, J. (2001). Structure-based design: potent inhibitors of human brain memapsin 2 (beta-secretase). *J Med Chem* 44, 2865-2868.
- Ghosh, A. K., Kumaragurubaran, N., Hong, L., Koelsch, G., and Tang, J. (2008). Memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors: drug development. *Curr Alzheimer Res* 5, 121-131.
- Gillman, K. W., Starrett, J. E., Parker, M. F., Xie, K., Bronson, J. J., Marcin, L. R., McElhone, K. E., Bergstrom, C. P., Mate, R. A., Williams, R., Meredith, J. E., Burton, C. R., Barten, D. M., Toyn, J. H., Roberts, S. B., Lentz, K. A., Houston, J. G., Zaczek, R., Albright, C. F., Decicco, C. P., Macor, J. E., and Olson, R. E. (2010). Discovery and Evaluation of BMS-708163, a Potent, Selective and Orally Bioavailable  $\gamma$ -Secretase Inhibitor. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 1, 120-124.
- Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885-890.

- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., and et, a. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.
- Goldgaber, D., Lerman, M. I., McBride, O. W., Saffiotti, U., and Gajdusek, D. C. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235, 877-880.
- Grant, M. A., Lazo, N. D., Lomakin, A., Condrón, M. M., Arai, H., Yamin, G., Rigby, A. C., and Teplow, D. B. (2007). Familial Alzheimer's disease mutations alter the stability of the amyloid beta-protein monomer folding nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16522-16527.
- Green, R. C., Schneider, L. S., Amato, D. A., Beelen, A. P., Wilcock, G., Swabb, E. A., and Zavitz, K. H. (2009). Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 302, 2557-2564.
- Gurezka, R., and Langosch, D. (2001). In vitro selection of membrane-spanning leucine zipper protein-protein interaction motifs using POSSYCCAT. *J Biol Chem* 276, 45580-45587.
- Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B., and 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., and et, a. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-325.
- Hahn, S., Bruning, T., Ness, J., Czirr, E., Baches, S., Gijssen, H., Korth, C., Pietrzik, C. U., Bulic, B., and Weggen, S. (2011). Presenilin-1 but not amyloid precursor protein mutations present in mouse models of Alzheimer's disease attenuate the response of cultured cells to gamma-secretase modulators regardless of their potency and structure. *J Neurochem* 116, 385-395.
- Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
- Harmeier, A. (2008). Aggregation, Struktur und pathologische Wirkung des Amyloid- $\beta$  Peptides: die Rolle des GxxxG-Motivs. Freie Universität Berlin, p. Dissertation.
- 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., and Multhaup, G. (2009). Role of amyloid-beta glycine 33 in oligomerization, toxicity, and neuronal plasticity. *J Neurosci* 29, 7582-7590.
- 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., and 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.

- Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., Lipp, H. P., Wolfer, D. P., and Muller, U. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20, 7951-7963.
- Henricson, A., Kall, L., and Sonnhammer, E. L. (2005). A novel transmembrane topology of presenilin based on reconciling experimental and computational evidence. *FEBS J* 272, 2727-2733.
- Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretschmar, H., Sisodia, S., and Muller, U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J* 23, 4106-4115.
- Herrmann, J. R., Panitz, J. C., Unterreitmeier, S., Fuchs, A., Frishman, D., and Langosch, D. (2009). Complex patterns of histidine, hydroxylated amino acids and the GxxxG motif mediate high-affinity transmembrane domain interactions. *J Mol Biol* 385, 912-923.
- Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1991). Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol* 218, 149-163.
- Hilbich, C., Monning, U., Grund, C., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1993). Amyloid-like properties of peptides flanking the epitope of amyloid precursor protein-specific monoclonal antibody 22C11. *J Biol Chem* 268, 26571-26577.
- Hirohata, M., Ono, K., Naiki, H., and Yamada, M. (2005). Non-steroidal anti-inflammatory drugs have anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Neuropharmacology* 49, 1088-1099.
- Hogl, S., Kuhn, P. H., Colombo, A., and Lichtenthaler, S. F. (2011). Determination of the proteolytic cleavage sites of the amyloid precursor-like protein 2 by the proteases ADAM10, BACE1 and gamma-secretase. *PLoS One* 6, e21337.
- Holtzman, D. M., Morris, J. C., and Goate, A. M. (2011). Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* 3, 77sr1.
- Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B., Trapp, B. D., and Yan, R. (2006). Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* 9, 1520-1525.
- Hu, Y., and Fortini, M. E. (2003). Different cofactor activities in gamma-secretase assembly: evidence for a nicastrin-Aph-1 subcomplex. *J Cell Biol* 161, 685-690.
- Huber, O., Kemler, R., and Langosch, D. (1999). Mutations affecting transmembrane segment interactions impair adhesiveness of E-cadherin. *J Cell Sci* 112, 4415-4423.
- Hung, A. Y., and Selkoe, D. J. (1994). Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J* 13, 534-542.

- 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., and Christie, G. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14, 419-427.
- Hwang, S. B., and Shen, T. Y. (1981). Membrane effects of antiinflammatory agents. 2. Interaction of nonsteroidal antiinflammatory drugs with liposome and purple membranes. *J Med Chem* 24, 1202-1211.
- Ibach, B., and Haen, E. (2004). Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des* 10, 231-251.
- Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schroder, J., Zerfass, R., Forstl, H., Sandbrink, R., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1996). Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J Biol Chem* 271, 22908-22914.
- Ikeuchi, T., and Sisodia, S. S. (2003). The Notch ligands, Delta1 and Jagged2, are substrates for presenilin-dependent »gamma-secretase« cleavage. *J Biol Chem* 278, 7751-7754.
- in 't Veld, B. A., Launer, L. J., Hoes, A. W., Ott, A., Hofman, A., Breteler, M. M., and Stricker, B. H. (1998). NSAIDs and incident Alzheimer's disease. The Rotterdam Study. *Neurobiol Aging* 19, 607-611.
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., and Lansbury, P. T. J. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4693-4697.
- Jin, M., Shepardson, N., Yang, T., Chen, G., Walsh, D., and Selkoe, D. J. (2011). Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 5819-5824.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., and Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* 267, 727-748.
- Kaden, D., Munter, L. M., Joshi, M., Treiber, C., Weise, C., Bethge, T., Voigt, P., Schaefer, M., Beyermann, M., Reif, B., and 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., and 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., and 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.

- Kamal, A., Almenar-Queralto, A., LeBlanc, J. F., Roberts, E. A., and Goldstein, L. S. (2001). Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414, 643-648.
- Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H., and Goldstein, L. S. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 28, 449-459.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Karas, M., and Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60, 2299-2301.
- Kim, S. H., and Sisodia, S. S. (2005a). Evidence that the »NF« motif in transmembrane domain 4 of presenilin 1 is critical for binding with PEN-2. *J Biol Chem* 280, 41953-41966.
- Kim, S. H., and Sisodia, S. S. (2005b). A sequence within the first transmembrane domain of PEN-2 is critical for PEN-2-mediated endoproteolysis of presenilin 1. *J Biol Chem* 280, 1992-2001.
- Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., and 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.
- Kimura, Y., Matsunaga, H., and Vaara, M. (1992). Polymyxin B octapeptide and polymyxin B heptapeptide are potent outer membrane permeability-increasing agents. *J Antibiot (Tokyo)* 45, 742-749.
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., and Ito, H. (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331, 530-532.
- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T. C., and Hashimoto, Y. (2001). Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13554-13559.
- Klein, W. L., Krafft, G. A., and Finch, C. E. (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 24, 219-224.
- Klyubin, I., Betts, V., Welzel, A. T., Blennow, K., Zetterberg, H., Wallin, A., Lemere, C. A., Cullen, W. K., Peng, Y., Wisniewski, T., Selkoe, D. J., Anwyl, R., Walsh, D. M., and Rowan, M. J. (2008). Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci* 28, 4231-4237.
- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., and Ishiura, S. (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* 343 Pt 2, 371-375.

- Kolmar, H., Frisch, C., Kleemann, G., Gotze, K., Stevens, F. J., and Fritz, H. J. (1994). Dimerization of Bence Jones proteins: linking the rate of transcription from an Escherichia coli promoter to the association constant of REIV. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375, 61-70.
- Kolmar, H., Hennecke, F., Gotze, K., Janzer, B., Vogt, B., Mayer, F., and Fritz, H. J. (1995). Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures. *EMBO J* 14, 3895-3904.
- Kornilova, A. Y., Kim, J., Laudon, H., and Wolfe, M. S. (2006). Deducing the transmembrane domain organization of presenilin-1 in gamma-secretase by cysteine disulfide cross-linking. *Biochemistry* 45, 7598-7604.
- Kounnas, M. Z., Danks, A. M., Cheng, S., Tyree, C., Ackerman, E., Zhang, X., Ahn, K., Nguyen, P., Comer, D., Mao, L., Yu, C., Pleyner, D., Digregorio, P. J., Velicelebi, G., Stauderman, K. A., Comer, W. T., Mobley, W. C., Li, Y. M., Sisodia, S. S., Tanzi, R. E., and Wagner, S. L. (2010). Modulation of gamma-secretase reduces beta-amyloid deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* 67, 769-780.
- Kuhn, P. H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Rossner, S., and Lichtenthaler, S. F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29, 3020-3032.
- Kukar, T., Murphy, M. P., Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Weggen, S., Smith, T. E., Ladd, T., Khan, M. A., Kache, R., Beard, J., Dodson, M., Merit, S., Ozols, V. V., Anastasiadis, P. Z., Das, P., Fauq, A., Koo, E. H., and Golde, T. E. (2005). Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting Abeta42 production. *Nat Med* 11, 545-550.
- Kukar, T. L., Ladd, T. B., Bann, M. A., Fraering, P. C., Narlawar, R., Maharvi, G. M., Healy, B., Chapman, R., Welzel, A. T., Price, R. W., Moore, B., Rangachari, V., Cusack, B., Eriksen, J., Jansen-West, K., Verbeeck, C., Yager, D., Eckman, C., Ye, W., Sagi, S., Cottrell, B. A., Torpey, J., Rosenberry, T. L., Fauq, A., Wolfe, M. S., Schmidt, B., Walsh, D. M., Koo, E. H., and Golde, T. E. (2008). Substrate-targeting gamma-secretase modulators. *Nature* 453, 925-929.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6448-6453.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3922-3927.

- Lammich, S., Okochi, M., Takeda, M., Kaether, C., Capell, A., Zimmer, A. K., Edbauer, D., Walter, J., Steiner, H., and Haass, C. (2002). Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide. *J Biol Chem* 277, 44754-44759.
- Langosch, D., Brosig, B., Kolmar, H., and Fritz, H. J. (1996). Dimerisation of the glycophorin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator. *J Mol Biol* 263, 525-530.
- Laudon, H., Hansson, E. M., Melen, K., Bergman, A., Farmery, M. R., Winblad, B., Lendahl, U., von Heijne, G., and Naslund, J. (2005). A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem* 280, 35352-35360.
- LaVoie, M. J., Fraering, P. C., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Kimberly, W. T., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2003). Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem* 278, 37213-37222.
- LaVoie, M. J., and Selkoe, D. J. (2003). The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J Biol Chem* 278, 34427-34437.
- Lazarov, V. K., Fraering, P. C., Ye, W., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J., and Li, H. (2006). Electron microscopic structure of purified, active gamma-secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6889-6894.
- Lazo, N. D., Grant, M. A., Condrón, M. C., Rigby, A. C., and Teplow, D. B. (2005). On the nucleation of amyloid beta-protein monomer folding. *Protein Sci* 14, 1581-1596.
- 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., and Yu, G. (2004). A conserved GXXXG motif in APH-1 is critical for assembly and activity of the gamma-secretase complex. *J Biol Chem* 279, 4144-4152.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., Yu, C. E., Jondro, P. D., Schmidt, S. D., Wang, K., and et, a. (1995a). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973-977.
- Levy-Lahad, E., Wijsman, E. M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K. A., Weber, J. L., Bird, T. D., and Schellenberg, G. D. (1995b). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269, 970-973.
- Li, Q., and Sudhof, T. C. (2004). Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *J Biol Chem* 279, 10542-10550.
- Li, Z. W., Stark, G., Gotz, J., Rulicke, T., Gschwind, M., Huber, G., Muller, U., and Weissmann, C. (1996). Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6158-6162.

- Lichtenthaler, S. F., Dominguez, D. I., Westmeyer, G. G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., and Seed, B. (2003). The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem* 278, 48713-48719.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1456-1460.
- Liu, W., Crocker, E., Zhang, W., Elliott, J. I., Luy, B., Li, H., Aimoto, S., and Smith, S. O. (2005). Structural role of glycine in amyloid fibrils formed from transmembrane alpha-helices. *Biochemistry* 44, 3591-3597.
- Lleo, A., Berezovska, O., Herl, L., Raju, S., Deng, A., Bacskai, B. J., Frosch, M. P., Irizarry, M., and Hyman, B. T. (2004). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs lower Abeta42 and change presenilin 1 conformation. *Nat Med* 10, 1065-1066.
- Lopez-Otin, C., and Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem* 283, 30433-30437.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., and RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Luo, W. J., Wang, H., Li, H., Kim, B. S., Shah, S., Lee, H. J., Thinakaran, G., Kim, T. W., Yu, G., and Xu, H. (2003). PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem* 278, 7850-7854.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J. C., Yan, Q., Richards, W. G., Citron, M., and Vassar, R. (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 4, 231-232.
- Lyckman, A. W., Confaloni, A. M., Thinakaran, G., Sisodia, S. S., and Moya, K. L. (1998). Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily proteins in the central nervous system. *J Biol Chem* 273, 11100-11106.
- MacKenzie, K. R., and Fleming, K. G. (2008). Association energetics of membrane spanning alpha-helices. *Curr Opin Struct Biol* 18, 412-419.
- Marlow, L., Cain, M., Pappolla, M. A., and Sambamurti, K. (2003). Beta-secretase processing of the Alzheimer's amyloid protein precursor (APP). *J Mol Neurosci* 20, 233-239.
- Masters, C. L., and Beyreuther, K. T. (1989). The pathology of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *Ann Med* 21, 89-90.
- Mattson, M. P., Cheng, B., Culwell, A. R., Esch, F. S., Lieberburg, I., and Rydel, R. E. (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10, 243-254.

- McCarthy, J. V., Twomey, C., and Wujek, P. (2009). Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis and gamma-secretase activity. *Cell Mol Life Sci* 66, 1534-1555.
- McGaughey, G. B., Gagne, M., and Rappe, A. K. (1998). pi-Stacking interactions. Alive and well in proteins. *J Biol Chem* 273, 15458-15463.
- McGeer, P. L., McGeer, E., Rogers, J., and Sibley, J. (1990). Anti-inflammatory drugs and Alzheimer disease. *Lancet* 335, 1037.
- McShane, R., and Schneider, L. S. (2005). Meta-analysis of memantine: summary and commentary on the Cochrane Collaboration's systematic review. *Alzheimers Dement* 1, 67-71.
- Mendrola, J. M., Berger, M. B., King, M. C., and Lemmon, M. A. (2002). The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. *J Biol Chem* 277, 4704-4712.
- Morgan, D., Diamond, D. M., Gottschall, P. E., Ugen, K. E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M., and Arendash, G. W. (2000). A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 982-985.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., and Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1, 345-347.
- Multhaup, G., Bush, A. I., Pollwein, P., and 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.
- Multhaup, G., Mechler, H., and Masters, C. L. (1995). Characterization of the high affinity heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP) and its enhancement by zinc(II). *J Mol Recognit* 8, 247-257.
- Mumm, J. S., and Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* 228, 151-165.
- Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Saxena, M. T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D. J., Ray, W. J., and Kopan, R. (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* 5, 197-206.
- Munter, L. M. (2007). Charakterisierung eines Dimerisierungsmotivs in der A $\beta$ -Region des Amyloid-Vorläuferproteins: Mechanismus der A $\beta$ -Entstehung. Freie Universität Berlin, p. Dissertation.
- Munter, L. M., Botev, A., Richter, L., Hildebrand, P. W., Althoff, V., Weise, C., Kaden, D., and 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., and Multhaup, G. (2007). GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *EMBO J* 26, 1702-1712.

- Ni, C. Y., Murphy, M. P., Golde, T. E., and Carpenter, G. (2001). gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 294, 2179-2181.
- Nicoll, J. A., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H., and Weller, R. O. (2003). Neuro-pathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 9, 448-452.
- Nieba, L., Nieba-Axmann, S. E., Persson, A., Hamalainen, M., Edebratt, F., Hansson, A., Lidholm, J., Magnusson, K., Karlsson, A. F., and Pluckthun, A. (1997). BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip. *Anal Biochem* 252, 217-228.
- Niimura, M., Isoo, N., Takasugi, N., Tsuruoka, M., Ui-Tei, K., Saigo, K., Morohashi, Y., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2005). Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions. *J Biol Chem* 280, 12967-12975.
- Ohki, Y., Higo, T., Uemura, K., Shimada, N., Osawa, S., Berezovska, O., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2011). Phenylpiperidine-type gamma-secretase modulators target the transmembrane domain 1 of presenilin 1. *EMBO J*
- Okochi, M., Fukumori, A., Jiang, J., Itoh, N., Kimura, R., Steiner, H., Haass, C., Tagami, S., and Takeda, M. (2006). Secretion of the Notch-1 Abeta-like peptide during Notch signaling. *J Biol Chem* 281, 7890-7898.
- Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M., and Haass, C. (2002). Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *EMBO J* 21, 5408-5416.
- Page, R. M., Baumann, K., Tomioka, M., Perez-Revuelta, B. I., Fukumori, A., Jacobsen, H., Flohr, A., Luebbbers, T., Ozmen, L., Steiner, H., and Haass, C. (2008). Generation of Abeta38 and Abeta42 is independently and differentially affected by familial Alzheimer disease-associated presenilin mutations and gamma-secretase modulation. *J Biol Chem* 283, 677-683.
- Perez, R. G., Squazzo, S. L., and Koo, E. H. (1996). Enhanced release of amyloid beta-protein from codon 670/671 »Swedish« mutant beta-amyloid precursor protein occurs in both secretory and endocytic pathways. *J Biol Chem* 271, 9100-9107.
- Perez, R. G., Zheng, H., Van der Ploeg, L. H., and Koo, E. H. (1997). The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J Neurosci* 17, 9407-9414.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H. A., and Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 26, 7212-7221.
- Prokop, S., Shirotani, K., Edbauer, D., Haass, C., and Steiner, H. (2004). Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex. *J Biol Chem* 279, 23255-23261.

- Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirotsu, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T. C., Wang, R., and Ihara, Y. (2005). Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci* 25, 436-445.
- Racke, M. M., Boone, L. I., Hepburn, D. L., Parsadainian, M., Bryan, M. T., Ness, D. K., Piroozzi, K. S., Jordan, W. H., Brown, D. D., Hoffman, W. P., Holtzman, D. M., Bales, K. R., Gitter, B. D., May, P. C., Paul, S. M., and DeMattos, R. B. (2005). Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid beta. *J Neurosci* 25, 629-636.
- Raskind, M. A., Peskind, E. R., Wessel, T., and Yuan, W. (2000). Galantamine in AD: A 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. The Galantamine USA-1 Study Group. *Neurology* 54, 2261-2268.
- Rebeck, G. W., Reiter, J. S., Strickland, D. K., and Hyman, B. T. (1993). Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11, 575-580.
- Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., and Mobius, H. J. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 348, 1333-1341.
- Richter, L., Munter, L. M., Ness, J., Hildebrand, P. W., Dasari, M., Unterreitmeier, S., Bulic, B., Beyermann, M., Gust, R., Reif, B., Weggen, S., Langosch, D., and Multhaup, G. (2010). Amyloid beta 42 peptide (Abeta42)-lowering compounds directly bind to Abeta and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14597-14602.
- Ring, S., Weyer, S. W., Kilian, S. B., Waldron, E., Pietrzik, C. U., Filippov, M. A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C. B., Korte, M., Wolfer, D. P., and Muller, U. C. (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci* 27, 7817-7826.
- Robakis, N. K., Ramakrishna, N., Wolfe, G., and Wisniewski, H. M. (1987). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4190-4194.
- Roberds, S. L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M. J., Branstetter, D. G., Chen, K. S., Freedman, S. B., Frigon, N. L., Games, D., Hu, K., Johnson-Wood, K., Kappenman, K. E., Kawabe, T. T., Kola, I., Kuehn, R., Lee, M., Liu, W., Motter, R., Nichols, N. F., Power, M., Robertson, D. W., Schenk, D., Schoor, M., Shopp, G. M., Shuck, M. E., Sinha, S., Svensson, K. A., Tatsuno, G., Tintrup, H., Wijmsman, J., Wright, S., and McConlogue, L. (2001). BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet* 10, 1317-1324.

- Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., and et, a. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775-778.
- Rogers, S. L., and Friedhoff, L. T. (1996). The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. The Donepezil Study Group. *Dementia* 7, 293-303.
- 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., and 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., and Ball, M. J. (1993a). 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.
- Roher, A. E., Palmer, K. C., Yurewicz, E. C., Ball, M. J., and Greenberg, B. D. (1993b). Morphological and biochemical analyses of amyloid plaque core proteins purified from Alzheimer disease brain tissue. *J Neurochem* 61, 1916-1926.
- Rosler, M., Anand, R., Cicin-Sain, A., Gauthier, S., Agid, Y., Dal-Bianco, P., Stahelin, H. B., Hartman, R., and Gharabawi, M. (1999). Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial. *BMJ* 318, 633-638.
- Rosjohn, J., Cappai, R., Feil, S. C., Henry, A., McKinstry, W. J., Galatis, D., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C. L., and 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.
- Sagi, S. A., Lessard, C. B., Winden, K. D., Maruyama, H., Koo, J. C., Weggen, S., Kukar, T. L., Golde, T. E., and Koo, E. H. (2011). Substrate sequence influences  $\gamma$ -secretase modulator activity: role of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*
- Sal-Man, N., Gerber, D., and Shai, Y. (2004). Hetero-assembly between all-L- and all-D-amino acid transmembrane domains: forces involved and implication for inactivation of membrane proteins. *J Mol Biol* 344, 855-864.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Sato, C., Morohashi, Y., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2006a). Structure of the catalytic pore of  $\gamma$ -secretase probed by the accessibility of substituted cysteines. *J Neurosci* 26, 12081-12088.

- Sato, T., Diehl, T. S., Narayanan, S., Funamoto, S., Ihara, Y., De Strooper, B., Steiner, H., Haass, C., and Wolfe, M. S. (2007). Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem* 282, 33985-33993.
- Sato, T., Kienlen-Campard, P., Ahmed, M., Liu, W., Li, H., Elliott, J. I., Aimoto, S., Constantinescu, S. N., Octave, J. N., and Smith, S. O. (2006b). Inhibitors of amyloid toxicity based on beta-sheet packing of Abeta40 and Abeta42. *Biochemistry* 45, 5503-5516.
- Sato, T., Nyborg, A. C., Iwata, N., Diehl, T. S., Saido, T. C., Golde, T. E., and Wolfe, M. S. (2006c). Signal peptide peptidase: biochemical properties and modulation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemistry* 45, 8649-8656.
- Sato, T., Tang, T. C., Reubins, G., Fei, J. Z., Fujimoto, T., Kienlen-Campard, P., Constantinescu, S. N., Octave, J. N., Aimoto, S., and Smith, S. O. (2009). A helix-to-coil transition at the epsilon-cut site in the transmembrane dimer of the amyloid precursor protein is required for proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1421-1426.
- Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., Rosi, B. L., Gusella, J. F., Crapper-MacLachlan, D. R., Alberts, M. J., and et, a. (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1467-1472.
- Schagger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
- Scheinfeld, M. H., Ghersi, E., Laky, K., Fowlkes, B. J., and D'Adamio, L. (2002). Processing of beta-amyloid precursor-like protein-1 and -2 by gamma-secretase regulates transcription. *J Biol Chem* 277, 44195-44201.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., and Seubert, P. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173-177.
- Scheuermann, S., Hamsch, B., Hesse, L., Stumm, J., Schmidt, C., Beher, D., Bayer, T. A., Beyreuther, K., and Multhaup, G. (2001). Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276, 33923-33929.
- Schmechel, A., Zentgraf, H., Scheuermann, S., Fritz, G., Pipkorn, R., Reed, J., Beyreuther, K., Bayer, T. A., and Multhaup, G. (2003). Alzheimer beta-amyloid homodimers facilitate A beta fibrillization and the generation of conformational antibodies. *J Biol Chem* 278, 35317-35324.

- Schmechel, D. E., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Crain, B. J., Hulette, C. M., Joo, S. H., Pericak-Vance, M. A., Goldgaber, D., and Roses, A. D. (1993). Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9649-9653.
- Seals, D. F., and Courtneidge, S. A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17, 7-30.
- Selkoe, D. J. (1996). Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271, 18295-18298.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766.
- Selkoe, D. J., Podlisny, M. B., Joachim, C. L., Vickers, E. A., Lee, G., Fritz, L. C., and Oltersdorf, T. (1988). Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7341-7345.
- Senes, A., Engel, D. E., and DeGrado, W. F. (2004). Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol* 14, 465-479.
- Senes, A., Gerstein, M., and Engelman, D. M. (2000). Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol* 296, 921-936.
- Senes, A., Ubarretxena-Belandia, I., and Engelman, D. M. (2001). The Ca—H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9056-9061.
- Shah, S., Lee, S. F., Tabuchi, K., Hao, Y. H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C. E. r., Sudhof, T., and 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., and 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., and Selkoe, D. J. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14, 837-842.
- Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J., and Tonegawa, S. (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89, 629-639.

- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J. F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R. J., Wasco, W., Da Silva, H. A., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Tanzi, R. E., Roses, A. D., Fraser, P. E., Rommens, J. M., and St George-Hyslop, P. H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.
- Siemers, E., Skinner, M., Dean, R. A., Gonzales, C., Satterwhite, J., Farlow, M., Ness, D., and May, P. C. (2005). Safety, tolerability, and changes in amyloid beta concentrations after administration of a gamma-secretase inhibitor in volunteers. *Clin Neuropharmacol* 28, 126-132.
- Siemers, E. R., Quinn, J. F., Kaye, J., Farlow, M. R., Porsteinsson, A., Tariot, P., Zoulnouni, P., Galvin, J. E., Holtzman, D. M., Knopman, D. S., Satterwhite, J., Gonzales, C., Dean, R. A., and May, P. C. (2006). Effects of a gamma-secretase inhibitor in a randomized study of patients with Alzheimer disease. *Neurology* 66, 602-604.
- 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., and et, a. (1994). Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol* 45, 373-379.
- Sinha, S., and Lieberburg, I. (1999). Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11049-11053.
- Sisodia, S. S. (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6075-6079.
- Six, E., Ndiaye, D., Laabi, Y., Brou, C., Gupta-Rossi, N., Israel, A., and Logeat, F. (2003). The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7638-7643.
- Small, D. H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., and 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., and 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., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C. L., Muller, U., Kins, S., and Beyreuther, K. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J* 24, 3624-3634.
- Soriano, S., Kang, D. E., Fu, M., Pestell, R., Chevallier, N., Zheng, H., and Koo, E. H. (2001). Presenilin 1 negatively regulates beta-catenin/T cell factor/lymphoid enhancer factor-1 signaling independently of beta-amyloid precursor protein and notch processing. *J Cell Biol* 152, 785-794.

- Spasic, D., Tolia, A., Dillen, K., Baert, V., De Strooper, B., Vrijens, S., and Annaert, W. (2006). Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway. *J Biol Chem* 281, 26569-26577.
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. L., Baumeister, R., Fichtler, K., and 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.
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., and Roses, A. D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1977-1981.
- Struhl, G., and Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell* 6, 625-636.
- Takagi, S., Tominaga, A., Sato, C., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2010). Participation of transmembrane domain 1 of presenilin 1 in the catalytic pore structure of the gamma-secretase. *J Neurosci* 30, 15943-15950.
- Takahashi, Y., Hayashi, I., Tominari, Y., Rikimaru, K., Morohashi, Y., Kan, T., Natsugari, H., Fukuyama, T., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2003). Sulindac sulfide is a noncompetitive gamma-secretase inhibitor that preferentially reduces Abeta 42 generation. *J Biol Chem* 278, 18664-18670.
- Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., and 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., and Iwatsubo, T. (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422, 438-441.
- Tang, K., Wang, C., Shen, C., Sheng, S., Ravid, R., and Jing, N. (2003). Identification of a novel alternative splicing isoform of human amyloid precursor protein gene, APP639. *Eur J Neurosci* 18, 102-108.
- Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Watkins, P. C., Bruns, G. A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M. L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D. M., and Neve, R. L. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880-884.
- Tanzi, R. E., McClatchey, A. I., Lamperti, E. D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J. F., and Neve, R. L. (1988). Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331, 528-530.
- Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., Hardy, J., Levey, A. I., Gandy, S. E., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L., and Sisodia, S. S. (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17, 181-190.

- .....
- Tolia, A., Chavez-Gutierrez, L., and De Strooper, B. (2006). Contribution of presenilin transmembrane domains 6 and 7 to a water-containing cavity in the gamma-secretase complex. *J Biol Chem* 281, 27633-27642.
- Tolia, A., Horre, K., and De Strooper, B. (2008). Transmembrane domain 9 of presenilin determines the dynamic conformation of the catalytic site of gamma-secretase. *J Biol Chem* 283, 19793-19803.
- Tournoy, J., Bossuyt, X., Snellinx, A., Regent, M., Garmyn, M., Serneels, L., Saftig, P., Craessaerts, K., De Strooper, B., and Hartmann, D. (2004). Partial loss of presenilins causes seborrhic keratosis and autoimmune disease in mice. *Hum Mol Genet* 13, 1321-1331.
- Tun, H., Marlow, L., Pinnix, I., Kinsey, R., and Sambamurti, K. (2002). Lipid rafts play an important role in A beta biogenesis by regulating the beta-secretase pathway. *J Mol Neurosci* 19, 31-35.
- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., and Abraham, W. C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70, 1-32.
- Uemura, K., Farner, K. C., Hashimoto, T., Nasser-Ghodsi, N., Wolfe, M. S., Koo, E. H., Hyman, B. T., and Berezovska, O. (2010). Substrate docking to gamma-secretase allows access of gamma-secretase modulators to an allosteric site. *Nat Commun* 1, 130.
- Unterreitmeier, S., Fuchs, A., Schaffler, T., Heym, R. G., Frishman, D., and Langosch, D. (2007). Phenylalanine promotes interaction of transmembrane domains via GxxxG motifs. *J Mol Biol* 374, 705-718.
- Vaara, M. (1991). The outer membrane permeability-increasing action of linear analogues of polymyxin B nonapeptide. *Drugs Exp Clin Res* 17, 437-443.
- 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., and Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.
- von Koch, C. S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L. H., Price, D. L., and Sisodia, S. S. (1997). Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging* 18, 661-669.
- Vooijs, M., Schroeter, E. H., Pan, Y., Blandford, M., and Kopan, R. (2004). Ectodomain shedding and intramembrane cleavage of mammalian Notch proteins is not regulated through oligomerization. *J Biol Chem* 279, 50864-50873.
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., and Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535-539.

- Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M., and Teplow, D. B. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem* 272, 22364-22372.
- Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B., and Selkoe, D. J. (2000). The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 39, 10831-10839.
- Walter, J., Capell, A., Hung, A. Y., Langen, H., Schnolzer, M., Thinakaran, G., Sisodia, S. S., Selkoe, D. J., and Haass, C. (1997). Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J Biol Chem* 272, 1896-1903.
- Wang, H., Barreyro, L., Provasi, D., Djemil, I., Torres-Arancivia, C., Filizola, M., and Ubarretxena-Belandia, I. (2011). Molecular determinants and thermodynamics of the amyloid precursor protein transmembrane domain implicated in Alzheimer's disease. *J Mol Biol* 408, 879-895.
- Wang, J., Beher, D., Nyborg, A. C., Shearman, M. S., Golde, T. E., and Goate, A. (2006). C-terminal PAL motif of presenilin and presenilin homologues required for normal active site conformation. *J Neurochem* 96, 218-227.
- Wang, J., Brunkan, A. L., Hecimovic, S., Walker, E., and Goate, A. (2004). Conserved »PAL« sequence in presenilins is essential for gamma-secretase activity, but not required for formation or stabilization of gamma-secretase complexes. *Neurobiol Dis* 15, 654-666.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E., and Solomon, F. (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10758-10762.
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M. D., Romano, D. M., Sisodia, S. S., Hyman, B. T., Neve, R. L., and Tanzi, R. E. (1993). Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* 5, 95-100.
- Watanabe, N., Image Image, I. I., Takagi, S., Image Image, I. I., Tominaga, A., Image Image, I., Tomita, T., Image Image, I. I., Iwatsubo, T., and Image Image, I. (2010). Functional analysis of the transmembrane domains of presenilin 1: participation of transmembrane domains 2 and 6 in the formation of initial substrate-binding site of gamma-secretase. *J Biol Chem* 285, 19738-19746.
- Watanabe, N., Tomita, T., Sato, C., Kitamura, T., Morohashi, Y., and Iwatsubo, T. (2005). Pen-2 is incorporated into the gamma-secretase complex through binding to transmembrane domain 4 of presenilin 1. *J Biol Chem* 280, 41967-41975.
- Weggen, S., Eriksen, J. L., Das, P., Sagi, S. A., Wang, R., Pietrzik, C. U., Findlay, K. A., Smith, T. E., Murphy, M. P., Bulter, T., Kang, D. E., Marquez-Sterling, N., Golde, T. E., and Koo, E. H. (2001). A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414, 212-216.

- Weggen, S., Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Pietrzik, C. U., Golde, T. E., and Koo, E. H. (2003a). Abeta42-lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs preserve intramembrane cleavage of the amyloid precursor protein (APP) and ErbB-4 receptor and signaling through the APP intracellular domain. *J Biol Chem* 278, 30748-30754.
- Weggen, S., Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Pietrzik, C. U., Ozols, V., Fauq, A., Golde, T. E., and Koo, E. H. (2003b). Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid beta 42 production by direct modulation of gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 278, 31831-31837.
- Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F. B., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C. L., Beyreuther, K., and Evin, G. (2002). A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* 41, 2825-2835.
- Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57, 115-126.
- Wertkin, A. M., Turner, R. S., Pleasure, S. J., Golde, T. E., Younkin, S. G., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (1993). Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9513-9517.
- Westmeyer, G. G., Willem, M., Lichtenthaler, S. F., Lurman, G., Multhaup, G., Assfalg-Machleidt, I., Reiss, K., Saftig, P., and Haass, C. (2004). Dimerization of beta-site beta-amyloid precursor protein-cleaving enzyme. *J Biol Chem* 279, 53205-53212.
- Wilcock, D. M., Rojiani, A., Rosenthal, A., Subbarao, S., Freeman, M. J., Gordon, M. N., and Morgan, D. (2004). Passive immunotherapy against Abeta in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *J Neuroinflammation* 1, 24.
- Wilcock, G. K., Black, S. E., Hendrix, S. B., Zavitz, K. H., Swabb, E. A., and Laughlin, M. A. (2008). Efficacy and safety of tarenflurbil in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomised phase II trial. *Lancet Neurol* 7, 483-493.
- Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., and Haass, C. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314, 664-666.
- Wolfe, M. S. (2002). Secretase as a target for Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem* 2, 371-383.
- Wolfe, M. S. (2008). Inhibition and modulation of gamma-secretase for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 5, 391-398.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513-517.

- Wong, H. K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P., and Nukina, N. (2005). beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J Biol Chem* 280, 23009-23017.
- Xia, W., Zhang, J., Perez, R., Koo, E. H., and Selkoe, D. J. (1997). Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8208-8213.
- Xia, X., Qian, S., Soriano, S., Wu, Y., Fletcher, A. M., Wang, X. J., Koo, E. H., Wu, X., and Zheng, H. (2001). Loss of presenilin 1 is associated with enhanced beta-catenin signaling and skin tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10863-10868.
- Xu, Y., Shen, J., Luo, X., Zhu, W., Chen, K., Ma, J., and Jiang, H. (2005). Conformational transition of amyloid beta-peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5403-5407.
- Yamasaki, A., Eimer, S., Okochi, M., Smialowska, A., Kaether, C., Baumeister, R., Haass, C., and Steiner, H. (2006). The GxGD motif of presenilin contributes to catalytic function and substrate identification of gamma-secretase. *J Neurosci* 26, 3821-3828.
- 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., Heinrikson, R. L., and Gurney, M. E. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533-537.
- Yanagida, K., Okochi, M., Tagami, S., Nakayama, T., Kodama, T. S., Nishitomi, K., Jiang, J., Mori, K., Tatsumi, S., Arai, T., Ikeuchi, T., Kasuga, K., Tokuda, T., Kondo, M., Ikeda, M., Deguchi, K., Kazui, H., Tanaka, T., Morihara, T., Hashimoto, R., Kudo, T., Steiner, H., Haass, C., Tsuchiya, K., Akiyama, H., Kuwano, R., and Takeda, M. (2009). The 28-amino acid form of an APLP1-derived Abeta-like peptide is a surrogate marker for Abeta42 production in the central nervous system. *EMBO Mol Med* 1, 223-235.
- Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D. S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D. M., Xu, D. H., Sato, C., Rogaev, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebbersold, R., Farrer, L. S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., and St George-Hyslop, P. (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407, 48-54.
- Zhao, G., Cui, M. Z., Mao, G., Dong, Y., Tan, J., Sun, L., and Xu, X. (2005). gamma-Cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain. *J Biol Chem* 280, 37689-37697.
- Zhao, G., Mao, G., Tan, J., Dong, Y., Cui, M. Z., Kim, S. H., and 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.

Zhao, G., Tan, J., Mao, G., Cui, M. Z., and Xu, X. (2007). The same gamma-secretase accounts for the multiple intramembrane cleavages of APP. *J Neurochem* 100, 1234-1246.

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., and Van der Ploeg, L. H. (1995). beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525-531.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$ :	Amyloid- $\beta$
$\alpha$ -CTF (C83):	» $\alpha$ -C-terminal fragment«, C-terminales APP-Fragment nach $\alpha$ -Sekretase-Spaltung
ADAM:	»a disintegrin and metalloprotease«, $\alpha$ -Sekretase
AICD:	»APP intracellular C-terminal domain“, intrazelluläre C-terminale Domäne von APP
Aph-1:	»anterior pharynx-defective 1«
APLP:	»amyloid precursor-like protein«, Amyloid-Vorläufer-ähnliches Protein
APP:	»amyloid precursor protein«, Amyloid-Vorläuferprotein
APP-CTFs:	»APP C-terminal fragments«, C-terminale APP-Fragmente, $\alpha$ - und $\beta$ -CTF
APP <sup>sw</sup> :	Amyloid-Vorläuferprotein mit der schwedischen Mutation
ApoE:	Apolipoprotein E
Ax:	Absorption bei x nm
$\beta$ -CTF (C99):	» $\beta$ -C-terminal fragment«, C-terminales APP-Fragment nach $\beta$ -Sekretase-Spaltung
$\beta$ -Gal:	$\beta$ -Galaktosidase
BACE:	» $\beta$ -site APP-cleaving enzyme«, $\beta$ -Sekretase
BCA:	Bicinchoninsäure
BSA:	bovines Serumalbumin
°C:	Grad Celsius
C100:	humanes $\beta$ -CTF mit einem N-terminalen Methionin-Rest
CCA:	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizinsäure
CD:	Circulardichroismus
CD44:	transmembranes Glycoprotein, Zelloberflächenrezeptor
COX:	Cyclooxygenase
ctx:	Choleratoxin
Da:	Dalton
DMEM:	»Dulbecco's minimal essential medium«
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	»deoxyribonucleic acid«, Desoxyribonukleinsäure
$\epsilon$ 280:	molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDC:	1-Ethyl-3-[dimethylaminopropyl]-carbodiimid
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EGFR:	»epidermal growth factor receptor«, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA:	»enzyme-linked immunosorbent assay«
ErbB-4:	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen der ErbB-Familie
F:	Farad
FAD:	»familial Alzheimer's Disease«, familiäre Form der Alzheimer-Krankheit
FCS:	»fetal calf serum«, Fötales Kälberserum
FLIM:	»fluorescence lifetime imaging microscopy«
FRET:	»fluorescence resonance energy transfer«

---

g:	Gramm
GFLD:	»growth factor-like domain«, Wachstumsfaktor-ähnlichen Domäne
GSM(s):	$\gamma$ -Sekretase-Modulator(en)
h:	Stunde(n)
HBD:	Heparin-bindende Domäne
Hepes:	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP:	»horseradish peroxidase«, Meerrettich-Peroxidase
<i>H. salinarum</i> :	<i>Halobacterium salinarum</i>
iGSM(s):	inverse(r) $\gamma$ -Sekretase-Modulator(en)
IPTG:	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KBD:	Kollagen-bindende Domäne
KPI:	Protease-Inhibitor-Domäne des Kunitz-Typs
l:	Liter
LB:	»lysogeny broth«, Nährlösung zur Kultivierung von Bakterien
lacZ:	Gen, das für die $\beta$ -Galaktosidase kodiert
M:	molar
MALDI:	»matrix-assisted laser desorption/ionization«, Matrix-unterstützte Laser-Desorption/-Ionisation
MBP:	Maltosebindeprotein
min:	Minute(n)
MOPS:	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MS:	Massenspektrometrie
NEXT:	»Notch extracellular truncation«, C-terminales Notch-Fragment
NFT:	»neurofibrillar tangles«, Neurofibrillenbündel
NHS:	N-Hydroxysuccinimid
NICD:	»Notch intracellular C-terminal domain«, intrazelluläre C-terminale Domäne von Notch
NMDA:	N-Methyl-D-Aspartat
NMR:	»nuclear magnetic resonance«, Kernspin-Resonanz
NSAID(s):	»non-steroidal antiinflammatory drug(s)«, nicht-steroidale Antiphlogistika
NTA:	»nitrilotriacetic acid«, Nitrilotriessigsäure
OD620:	optische Dichte bei 620 nm
ONP:	o-Nitrophenol
ONPG:	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
$\Omega$ :	Kreuzungswinkel; Ohm
p:	Signifikanz
p3:	APP-Spaltprodukt nach $\alpha$ - und $\gamma$ -Sekretase-Spaltung
PBS:	»phosphate-buffered saline«, phosphatgepufferte Salzlösung
PEN-2:	»presenilin enhancer protein«
pH:	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMBN:	Polymyxin-B-Nonapeptid
PS:	Presenilin
PS-CTF:	C-terminales Presenilin-Fragment nach Endoproteolyse

---

PS-NTF:	N-terminales Presenilin-Fragment nach Endoproteolyse
PSEN1:	Gen, das für Presenilin 1 kodiert
PSEN2:	Gen, das für Presenilin 2 kodiert
RIP:	»regulated intramembrane proteolysis«
RNase A:	Ribonuklease A
rpm:	»revolutions per minute«, Umdrehungen pro Minute
RT:	Raumtemperatur
SA:	Sinapinsäure
sAPP $\alpha$ :	»soluble« APP- $\alpha$ , lösliches APP-Fragment nach $\alpha$ -Sekretase-Spaltung
sAPP $\beta$ :	»soluble« APP- $\alpha$ , lösliches APP-Fragment nach $\beta$ -Sekretase-Spaltung
SDS:	»sodium dodecyl sulfate«, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE:	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC:	»size exclusion chromatography«, Größenausschluss-Chromatographie
SPR:	»surface plasmon resonance«, Oberflächen-Plasmon-Resonanz
TACE:	»tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme«, TNF $\alpha$ -spaltendes Enzym
TBE:	Tris-Borat-EDTA
TE:	Tris-EDTA
TMS:	Transmembransequenz(en)
ToxR:	ToxR-Transkriptionsaktivator aus <i>V. cholerae</i>
Tris:	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U:	»unit(s)«, Reaktionseinheit(en)
UV:	ultraviolett
V:	Volt
<i>V. cholerae</i> :	<i>Vibrio cholerae</i>
v/v:	»volume/volume“, Volumenprozent
wt:	Wildtyp
w/v:	»weight/volume«, Gewichtsprozent

.....  
 IUB-Code der Nukleotide:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

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

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

»The APP C-terminal fragment C100 occurs in monomeric and dimeric stable conformations and binds gamma-secretase modulators.«,  
Biochemistry 50: 828-835.

**Richter L.**, Munter L. M., Ness J., Hildebrand P. W., Dasari M., Unterreitmeier S., Bulic B., Beyermann M., Gust R., Reif B., Weggen S., Langosch D., Multhaup G. (2010):

»Amyloid beta 42 peptide (Abeta42)-lowering compounds directly bind to Abeta and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization.«,  
PNAS 107:14597-602.

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 285:21636-43.

#### Konferenzbeiträge

11<sup>th</sup> Eibsee Meeting on Cellular Mechanisms of Neurodegeneration in Grainau, 12.-15.10.2011,  
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.«

7<sup>th</sup> Fabisch Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology in Potsdam, 05.-07.10.2011,  
Vortrag: **Richter L.**, Munter L. M., Ness J., Hildebrand P. W., Dasari M., Unterreitmeier S., Bulic B., Beyermann M., Gust R., Reif B., Weggen S., Langosch D., Multhaup G.:

»Small compounds interfering with APP transmembrane sequence dimerization as promising therapeutic agents against Alzheimer's Disease.«

The McGill Integrated Program in Neuroscience (IPN) Retreat in Montréal, Kanada, 20./21.09.2011,  
Poster: **Richter L.**, Munter L. M., Ness J., Hildebrand P. W., Dasari M., Unterreitmeier S., Bulic B., Beyermann M., Lurz R., Gust R., Reif B., Weggen S., Langosch D., Multhaup G.

»Small compounds interfering with APP transmembrane sequence dimerization as promising therapeutic agents against Alzheimer's Disease.«

10<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (AD/PD) in Barcelona, Spanien, 9.-13.03.2011,

Poster: **Richter L.**, Munter L. M., Ness J., Hildebrand P. W., Dasari M., Unterreitmeier S., Bulic B., Beyermann M., Gust R., Reif B., Weggen S., Langosch D., Multhaup G.:

»APP transmembrane sequence dimerization is affected by A $\beta$ 42-lowering compounds.«

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

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

10<sup>th</sup> Eibsee Meeting on Cellular Mechanisms of Neurodegeneration in Grainau, 27.-30.10.2010, 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.«

13<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) in Honolulu, USA, 11.-15.10.2010, Poster: **Richter L.**, Munter L. M., Ness J., Hildebrand P. W., Dasari M., Unterreitmeier S., Bulic B., Beyermann M., Gust R., Reif B., Weggen S., Langosch D., Multhaup G.:

»A $\beta$ 42-lowering compounds interfere with APP transmembrane sequence dimerization.«

6<sup>th</sup> Fabisch Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology in Berlin, 24.-26.09.2009, Poster: **Richter L.**, Munter L. M., Langosch D., Multhaup G.:

»NSAIDs modulate APP-dimerization.«

3<sup>rd</sup> NEURAD Summer School in Lille, Frankreich, 18.-21.09.2009,

Vortrag: **Richter L.**, Munter L. M., Langosch D., Multhaup G.:

»Effects of NSAIDs on A $\beta$  sequence interaction.«

12<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) in Wien, Österreich, 11.-16.07.2009, Poster: Richter L., Munter L. M., Langosch D., Multhaup G.:

»NSAIDs modulate APP-dimerization.«

Vortrag: Munter L. M., Botev A., **Richter L.**, Weise C., Langosch D. und Multhaup G.:

»Reassessment of APP familial Alzheimer Disease (FAD) mutations.«

8<sup>th</sup> Eibsee Meeting on Cellular Mechanisms of Neurodegeneration in Grainau, 31.10.-01.11.2008,

Poster: Kaden D., **Richter L.**, Munter L. M., Bobowski K., Voigt P., Schaefer M., Multhaup G.:

»Dissection of the individual domains of APP family members involved in homo- and heterotypic interactions.«

2<sup>nd</sup> NEURAD Summer School in Leuven, Belgien, 17.-20.09.2008,

Poster: **Richter L.**, Munter L. M., Langosch D., Multhaup G.:

»NSAIDs binding to the Abeta region.«

## 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 für die Überlassung dieses überaus spannenden Themas, für seine uneingeschränkte Unterstützung am Fortgang dieser Arbeit sowie für seine stetige Bereitschaft zur Diskussion und zur konstruktiven Kritik.

Bei Prof. Dr. Ferdinand Hucho bedanke ich mich ganz herzlich für sein Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

All meinen aktuellen und auch ehemaligen Kollegen Lydia Alnajjar, Veit Althoff, Christian Barucker, Hermann Bayer, Dr. Tobias Bethge, Karolina Bobowski, Dr. Anne Botev, Gerhard Buchlow, Paul Dembny, Dr. Vivienne Engelschalt, Susanne Fehse, Boas Felmy, Sarah Hampe, Dr. Anja Harmeier, Dr. Daniela Kaden, Filip Liebsch, Dr. Kerstin May-Witt, Magnus Mayer, Dr. Lisa Münster, Clara Schäfer, Linda Schauenburg, Andrea Senge, Holger Sieg, Dr. Carina Treiber, Dr. Christoph Weise und Thomas Wons gebührt ein großes Dankeschön für eine tolle Arbeitsatmosphäre, für die Hilfe bei kleinen und größeren Problemen im rauen Laboralltag sowie für die vielen schönen, oft auch humorvollen Stunden. Besten Dank für die Grundversorgung mit Gummibärchen und Kuchen. Dr. Lisa Münster bin ich zu besonders großem Dank verpflichtet. Durch ihre unzähligen, hilfreichen Ratschläge und Ideen hat sie mich stets mit infektiöser Begeisterung für die Alzheimer-Forschung wissenschaftlich begleitet und ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit und auch der PNAS-Veröffentlichung beigetragen. Bei unseren Hiwis Lisa Grohmann, Lisa Janke und Felix Oestereich möchte ich mich für ihre Hilfe bedanken. Ganz herzlich danke ich Sarah Hampe, die mich als Mitarbeitersstudentin, mehrfach als Hiwi und dann schließlich als Diplomandin tatkräftig unterstützt hat. Auch Dr. Daniela Kaden und Dr. Chris Weise gebührt zusätzlicher Dank für die schnelle und aufmerksame Durchsicht dieser Arbeit und für eine schöne gemeinsame Zeit im 3. Stock.

Dr. Peter Hildebrand danke ich sehr für die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit bei der Erstellung zahlreicher, computergestützter Modelle sowie die anregenden Gespräche.

Ein besonderes Dankeschön gilt Dr. Rudi Lurz für die Kooperation betreffend der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Er war mir mit seinen Fachkenntnissen eine große Hilfe.

Meinen aufrichtigen Dank möchte ich an dieser Stelle auch meinen Kooperationspartnern der TU München aussprechen, allen voran Prof. Dr. Dieter Langosch und seinen Mitarbeitern Oxana Pester, Walter Stelzer und Dr. Stephanie Unterreitmeier.

Für die fachliche Unterstützung, für viele, kritische und inspirierende Diskussionen und die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei Prof. Dr. Ronald Gust und Prof. Dr. Bernd Reif bedanken. Mangesh Joshi und Muralidhar Dasari danke ich für die Durchführung der NMR-Messungen.

Für die Bereitstellung wertvoller Reagenzien sowie für die gute Zusammenarbeit danke ich Prof. Dr. Sascha Weggen, Dr. Bruno Bulic, Prof. Dr. Herbert Waldmann und Dr. Todd Golde.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und besonders meinen Eltern, ohne deren Beistand Studium und Promotion nicht möglich gewesen wären. Meinem Partner Matze möchte ich zum einen für die Unterstützung beim Gestalten der Arbeit danken, zum anderen aber vielmehr dafür, dass er meinen Rücken mit großer Ausgeglichenheit, viel Humor und gutem Essen stärkt.

#### **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, 02.11.2011

Luise Richter