

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Alzheimer Krankheit und das Amyloid-Vorläuferprotein	1
1.2 Die β -Sekretase (BACE)	3
1.3 Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins	8
1.4 Molekulare Ursachen der Alzheimer Krankheit	10
1.5 Genetische Ursachen der Alzheimer Krankheit	11
2. Zielsetzung der Arbeit	13
3. Material und Methoden	16
3.1 Laborchemikalien	16
3.2 Antikörper	17
3.3 Chromatographiesysteme	19
3.4 Materialien für proteinbiochemische Techniken	19
3.5 Materialien für Klonierungsexperimente	20
3.5.1 Oligonukleotide	21
3.5.2 Plasmide	22
3.6 Puffer, Lösungen, Medien	22
3.6.1 Puffer	22
3.6.2 Lösungen	24
3.6.3 Nährmedien für Bakterienkultur	26
3.7 Klonierungs- und Nukleinsäuretechniken	26
3.7.1 DNA Konzentrationsbestimmung	27
3.7.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
3.7.3 Agarosegelelektrophorese	28
3.7.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	28
3.7.5 Umpuffern von DNA Lösungen	28
3.7.6 Ligation	29
3.7.7 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> und Elektrotransformation	29
3.7.8 Plasmidpräparation	30
3.7.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	32
3.7.10 Gerichtete Mutagenese	33
3.8 Säugerzellkultur	36
3.8.1 Säugerzelllinien für Proteinexpression	36

3.8.2 Material für Säugerzellkultur	36
3.8.3 Kultivierung	37
3.8.4 Transfektion	38
3.8.5 Kryogene Lagerung	39
3.9 Aufschlussmethoden zur Gewinnung von Proteinextrakten	39
3.9.1 Herstellung von Lysaten aus Säugerzellen	39
3.9.2 Homogenisation von Hirngewebe	40
3.10 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	40
3.11 Immunblot	41
3.12 Immunpräzipitation	42
3.13 Wessel-Flügge-Fällung von Proteinen	42
3.14 Chromatographische Methoden	42
3.14.1 Reinigung der rekombinanten BACE Ektodomäne	42
3.14.2 Ionenaustauschchromatographie von BACE aus Hirnhomogenat	43
3.14.3 Immobilisierte Metallionen Chelat Adsorptionschromatographie	44
3.14.4 Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Pepstatin-A	44
4. Ergebnisse	45
4.1 Mutagenese von BACE	45
4.2 BACE bildet Dimere im humanen Hirn	47
4.3 Charakterisierung von BACE aus humanem Hirngewebe	50
4.4 Affinitätschromatographie von BACE-Dimeren und monomerem BACE-NT	53
4.5 Prozessierung von APP durch putative BACE-Dimere	54
4.6 Dimerisierung der BACE-Ektodomäne über Disulfidbrücken	58
4.6.1 Expression verkürzter BACE-Formen	58
4.6.2 <i>In vivo</i> Aktivität verkürzter BACE-Formen	62
4.7 Metallbindungsstudien	64
4.8 Bestimmung des BSC-1 Epitops	66
5. Diskussion	67
6. Zusammenfassung	75
7. Anhang	78
7.1 Abkürzungsverzeichnis	78
7.2 Klonierungsstrategie	81
8. Literatur	82