



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Klonierung und Charakterisierung eines Presenilin-Homologs aus Zebrafisch (*Danio rerio*)

Autor: Uwe Leimer
Institut / Klinik: Zentralinstitut für Seelische Gesundheit Mannheim (ZI)
Doktorvater: Prof. Dr. C. Haaß

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist die Klonierung eines Presenilin (PS) 1 Homologs aus Zebrafisch (*Danio rerio*), sowie dessen Charakterisierung auf DNA- beziehungsweise Proteinebene.

Aus einer Phagen-cDNA Bank wurde ein vollständiger cDNA-Klon isoliert, dessen theoretisches Translationsprodukt 73,9% AS-Sequenzidentität zu humanem PS1 und 61,8% zu humanem PS2 aufweist. Vor allem der Bereich zwischen der Transmembranregion (TM) 1 und dem Beginn der grossen cytoplasmatischen Schleife einschliesslich der 'Presenilinase'-Schnittstelle, sowie der Abschnitt ab der TM7 bis zum C-Terminus sind stark konserviert. Im Gegensatz hierzu sind der N-terminale Abschnitt bis zum Beginn der TM1, sowie der Bereich nach der Presenilinase-Schnittstelle bis zum Anfang der TM7 nur zu einem sehr geringen Maße konserviert.

Das Transkript war in *D. rerio* Embryonen durch RT-PCR und 'whole mount' *in situ* Hybridisierung auch bereits vor dem Beginn der embryonalen Transkription detektierbar und ist somit sehr wahrscheinlich maternalen Ursprungs, was auf eine wesentliche Funktion des Proteins in der Embryogenese hinweist.

Nach Erzeugung eines spezifischen Antiserums wurden das Holoprotein und seine Proteolyseprodukte, sowohl in zf-Hirngewebe, als auch in transfizierten Zelllinien, proteinchemisch charakterisiert. Sowohl in Hirngewebe, als auch nach stabiler Transfektion in HEK293-Zellen, erfolgte die Prozessierung des Holo Proteins durch die konstitutiv aktive 'Presenilinase'. Darüberhinaus wurde in den stabil transfizierten Zellen der Einfluss des zf-PS1 auf die Expression des endogenen Homologs und die Amyloidogenese untersucht. Die C-terminalen Fragmente des zf-PS1 verdrängten das endogene PS1 und wurden, trotz teilweise erheblicher Sequenzunterschiede zum humanen Homolog, in einen 100-150 kDa-Komplex integriert.

Durch die heterologe Expression von zf-PS1 konnte ein drastischer Einfluss auf die Amyloidogenese nachgewiesen werden. Die Menge an sezerniertem A β 42 war, im Vergleich zu Zellen, die mit humanem PS1wt transfiziert waren, um das dreifache erhöht. Somit scheint das zf-PS1, auf Grund der Sequenzvariationen im Vergleich zu den Säuger-Homologen, zu einer verstärkten Prozessierung des β APP durch die γ -Sekretase zu führen. Der hierbei zu Grunde liegende Mechanismus könnte in einem veränderten Transport der Protease, des Substrats oder einer veränderten Affinität der γ -Sekretase zu ihrem Substrat bestehen.

Nach Mutation eines funktionell wichtigen Aspartylrestes in TM6 konnte eine Veränderung der Prozessierung des zf-PS1 und der Amyloidogenese beobachtet werden. Durch die Einführung der Substitution D374N war die Endoproteolyse des zf-PS1 in die Fragmente inhibiert. Die Sezernierung von A β 40, als auch von A β 42, war zu etwa 90% reduziert. Parallel zur Inhibition der γ -Sekretaseaktivität erfolgte die Akkumulation C-terminaler APP-Fragmente. Diese entstehen bei Prozessierung des β APP durch die α -, beziehungsweise β -Sekretase und sind unter physiologischen Bedingungen ein Substrat der γ -Sekretase. Durch den Funktionsverlust nach Substitution des Aspartats an AS-Position 374 durch ein Asparagin wird dokumentiert, dass das im Verlauf der Evolution konservierte Aspartat in TM6 einen wesentlichen Einfluß auf die Endoproteolyse des zf-PS1 besitzt.

Die Untersuchungen zeigen, dass die physiologische Funktion der Presenilins, trotz der zum Teil erheblichen AS-Sequenzunterschiede zwischen den Species, konserviert sind.