INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

> vorgelegt von Diplom-Biologin Christine Elle aus Mannheim

Thema

Charakterisierung des mit der Alzheimer Krankheit assoziierten Genprodukts Presenilin 1 und Interaktion mit β-Catenin

Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup Prof. Dr. Klaus-Armin Nave Für meine Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom September 1996 bis Februar 2001 am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg angefertigt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gerd Multhaup für die interessante Themenstellung, die Anleitung zu selbständiger wissenschaftlicher Arbeit und die Betreuung der Dissertation. Prof. Dr. Gerd Multhaup sowie Prof. Dr. Dr. h. c. Konrad Beyreuther danke ich weiterhin für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich sehr für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Insbesondere danke ich den ehemaligen Mitarbeitern Dr. Dirk Beher für viele Anregungen und Vorschläge hinsichtlich der experimentellen Durchführung der Arbeit sowie Dr. Christian Bergsdorf und Dr. Gisela Peraus für die hilfsbereite Zusammenarbeit. Bei Andrea Schlicksupp, Sylvia Kreger, Markus Strauss, Stefan Scheuermann sowie Dres. Heike Grimm, Christian Bergsdorf, Joachim Stumm, Carsten Schmidt und Dirk Beher bedanke ich mich für ihre Freundschaft und Verbundenheit, vor allem auch nach meiner aktiven Zeit am ZMBH. Bei allen nicht namentlich genannten gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Beyreuther möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken und für die wertvollen Gespräche sowohl fachlicher als auch nicht-fachlicher Art.

Weiterhin möchte ich ganz herzlich meiner Familie Dank aussprechen. Vor allem meinen Eltern Hannelore und Hartwig Elle danke ich dafür, dass sie mich bei der Verwirklichung meiner Ziele immer unterstützt haben, für ihr Verständnis und Zuspruch während dieser Zeit und nicht zuletzt dafür, dass sie mir diese Ausbildung ermöglicht haben. Meinem Bruder Claus Elle danke ich für den kontinuierlichen Zuspruch und die moralische Unterstützung, insbesondere die unaufgeforderte. Ganz besonders möchte ich meinem Freund Michael danken, dass er mit viel Toleranz, Verständnis und Geduld mit mir durch diese Zeit gegangen ist.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
	2.1 Neuropathologie der Alzheimer Krankheit	3
	2.2 Molekularbiologie der Alzheimer Krankheit	5
	2.3 Presenilin-Genfamilie	11
	2.3.1 Presenilin 1 Struktur, Topologie und endoproteolytische Prozessierung	12
	2.3.2 Presenilin 1 und γ-Sekretase Aktivität	14
	2.3.3 Interaktionspartner von Presenilin 1	17
	2.4 Fragestellungen der Arbeit	20
3	Ergebnisse	22
	3.1 Charakterisierung von PS1 in Wildtyp bzw. stabil mit PS1 transfizierten	
	humanen Neuroblastomazellen und Rattenhirngewebe	22
	3.1.1 "Western Blot" Detektion von Vollängen-PS1 und PS1-Fragmenten aus	
	Wildtyp bzw. stabil mit PS1 transfizierten humanen Neuroblastomazell	en
	und Rattenhirngewebe	22
	3.1.2 Immunpräzipitation von Vollängen-PS1 und PS1-Fragmenten aus Wildty	/p
	bzw. stabil mit PS1 transfizierten humanen Neuroblastomazellen	25
	3.2 Klonierung von rekombinanten PS1-Proteinen und GST-PS1-Fusionsproteinen	27
	3.2.1 Klonierung und Aufreinigung von rekombinantem PS1-"loop"-Protein	27
	3.2.2 Klonierung und Aufreinigung von GST-PS1-Fusionsproteinen	28
	3.3 Polyklonale Antiseren gegen PS1	30
	3.3.1 Herstellung polyklonaler Antiseren gegen PS1	30
	3.3.2 Charakterisierung polyklonaler Antiseren gegen den C-terminalen	
	Bereich von PS1	30
	3.3.3 Charakterisierung polyklonaler Antiseren gegen den N-terminalen	
	Bereich von PS1	33
	3.4 Interaktion von PS1 und β-Catenin	37
	3.4.1 Koimmunpräzipitation von PS1-Fragmenten und β-Catenin	37
	3.4.2 Subzelluläre Lokalisation von PS1 und β -Catenin in MDCK, SH-SY5Y-	
	Zellen und primären Neuronen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie	41
	3.5 Pharmakologische Modulation von intrazellulärem β -Catenin mit Hilfe von	
	Lithiumchlorid und deren Auswirkung auf die Sekretion von A β Peptid	
	in MDCK Zellen	46

	3.5.1 Effekt von Lithium Behandlung auf die β -Catenin Menge in der	
	cytosolischen Fraktion und im Kernextrakt von MDCK-Zellen	48
	3.5.2 Effekt von Lithium Behandlung auf die A β Menge im konditionierten	
	Medium von MDCK Zelllinien	49
4	Diskussion	52
	4.1 Charakterisierung von PS1 in Wildtyp bzw. stabil mit PS1 transfizierten	
	humanen Neuroblastomazellen und Rattenhirngewebe	52
	4.2 Klonierung von rekombinanten PS1-Proteinen und GST-PS1-Fusionsproteinen	54
	4.3 Herstellung und Charakterisierung von polyklonalen Antiseren gegen PS1	54
	4.4 Interaktion und subzelluläre Lokalisation von PS1 und β-Catenin	56
	4.5 Pharmakologische Modulation von intrazellulärem β -Catenin mit Hilfe von	
	Lithiumchlorid und deren Auswirkung auf die Sekretion von Aß Peptid	
	in MDCK Zellen	<u>59</u>
	4.6 Ausblick	60
5	Material	<u>62</u>
	5.1 Abkürzungen	
	5.1.1 Aminosäuren	62
	5.1.2 Sonstige Abkürzungen	
	5.2 Reagenzien	65
	5.3 Puffer und Lösungen	67
	5.4 Enzyme	72
	5.4.1 Enzyme zur DNA-Klonierung	72
	5.4.2 Sonstige Enzyme und Proteaseinhibitoren	72
	5.5 Plasmide	72
	5.6 Bakterien	73
	5.7 Radiochemikalien	73
	5.8 Filme	73
	5.9 Eukaryontische Zellen	73
	5.10 Antikörper	74
6	Methoden	76
	6.1 Molekularbiologische Methoden	76
	6.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien mit CaCl ₂	76
	6.1.2 Transformation kompetenter E. coli Zellen	76
	6.1.3 Schnellpräparation von Plasmid-DNA	77
	6.1.4 Gewinnung großer Mengen reiner Plasmid-DNA mittels	

Anionenaustauschchromatographie	77
6.1.5 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	78
6.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	79
6.1.7 Agarose-Gelelektrophorese	79
6.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose	_79
6.1.9 Oligonukleotidsynthese	80
6.1.10 Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen	80
6.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten	80
6.1.12 Polymerasekettenreaktion ("PCR")	81
6.1.13 Sequenzierung von DNA	81
6.2 Proteinbiochemische Methoden	
6.2.1 Gelelektrophorese von Proteinen	82
6.2.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	
6.2.1.2 Tris-Tricin-Gelelektrophorese	
6.2.2 Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen	84
6.2.3 "Western-Blot" Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen,	
ECL-Detektion und Entfernung gebundener Antikörper von	
Nitrozellulose-Membranen ("stripping") zur wiederholten	
ECL-Detektion	
6.2.4 TCA-Fällung von Proteinen	
6.2.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit BCA-Assay	
6.2.6 Aufzucht, Vermehrung und Induktion von transformierten E. coli Zellen	
zur Expression von Fusionsproteinen und rekombinantem PS1	
6.2.6.1 Aufzucht, Vermehrung und Induktion von transformierten	
E. coli Zellen	86
6.2.6.2 Reinigung von Fusionsproteinen und rekombinantem PS1	87
6.2.6.3 Elektroelution der Fusionsproteine aus SDS-Polyacrylamidgeler	n 87
6.2.6.4 Gelfiltrationschromatographie zum Pufferaustausch und zur	
Renaturierung von Proteinen	
6.2.7 Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung polyklonaler Antikörper.	88
6.2.8 Serumgewinnung	89
6.2.9 Aufreinigung von Antikörpern über Protein A-Sepharose Affinitäts-	
chromatographie	_89
6.2.10 Entfernung von ungewünschten Antikörpern gegen GST-Fusionsprotein	<u>89</u>
6.2.11 Herstellung von Zellysaten, cytosolischen Fraktionen und	
Kernextrakten für nachfolgende "Western Blot" Analyse	90
6.2.12 Immunpräzipitation von Proteinen mit Protein A-Sepharose	
in Gegenwart von Detergenzien	92

6.2.12.1 Aufschluß eukaryontischer Zellen für die Immunpräzipitat	ion 92
6.2.12.2 Metabolische Markierung von Proteinen mit ³⁵ S-Methionin	n
und Aufschluß metabolisch markierter eukaryontischer Zelle	en
für die Immunpräzipitation	93
6.2.12.3 Vorbereitung des Mediums metabolisch markierter	
eukaryontischer Zellen für die Immunpräzipitation	
6.2.12.4 Immunpräzipitation von ³⁵ S-Methionin-markierten Protein	en 94
6.2.12.5 Immunpräzipitation von Proteinen aus eukaryontischen	
Zellen und konditioniertem Medium	
6.2.13 Radioaktivitätsmessung	<u>96</u>
6.2.14 Autoradiographie zur Detektion von ³⁵ S-markierten Proteinen	<u>96</u>
6.2.15 Aufschluß eukaryontischer Zellen mit weiteren Detergenzien	
6.2.15.1 Aufschluß eukaryontischer Zellen mit CHAPSO-Lysispuff	fer <u>9</u> 7
6.2.15.2 Aufschluß eukaryontischer Zellen mit Di	igitonin-
Lysispuffer97	
6.3 Zellkulturmethoden	98
6.3.1 Eukaryontische Zellkultur	<u>98</u>
6.3.2 Einfrieren von Zellen	<u>99</u>
6.3.3 Auftauen von Zellen	100
6.3.4 Metabolische Markierung von Proteinen mit ³⁵ S-Methionin	100
6.4 Immunfluoreszenzmethoden	100
6.4.1 Immunfluoreszenzanfärbung von SH-SY5Y-Zellen und primären	
hippokampalen Neuronen	101
6.4.2 Immunfluoreszenzanfärbung von MDCK-Zellen	102
6.5 Herstellung von Rattenhirnhomogenat	102
7 Literaturverzeichnis	104

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zuerst Fragestellungen bearbeitet, die sich auf das Presenilin 1 Protein allgemein, auf dessen Prozessierung zu C- und N-terminalen Fragmenten und die physiologisch vorliegende Form als Heterodimer bezogen. Es wurde untersucht, unter welchen Bedingungen sich Volllängen-PS1 Protein und PS1-Fragmente in überexprimierenden Zellen und Gewebepräparationen aus Rattenhirn nachweisen lassen. Das Volllängenprotein wurde nur bei PS1-transfizierten SH-SY5Y Zellen und einer Inkubationstemperatur von 37 °C vor Gelauftrag nachgewiesen. Eine Inkubation bei 100 °C führte zur Aggregation des Proteins im hochmolekularen Bereich. Das N- und C-terminale Fragment ließ sich auch bei Wildtyp-SH-SY5Y Zellen und Behandlung der Probe bei 37 °C nachweisen. Eine Inkubation bei 100 °C zeigte eine Tendenz zur Aggregation mit zunehmender Zahl der Transmembrandomänen, so dass eine Aggregation des PS1-Volllängenproteins und N-terminalen Fragments, nicht aber des Cterminalen Fragments zu beobachten war. Im Rattenhirngewebe waren nur die Fragmente, nicht aber das PS1-Volllängenprotein nachzuweisen Diese Ergebnisse wurden publiziert (Beher D., Elle C., Underwood J., Davis J., Ward R., Karran E., Masters C., Beyreuther K., and Multhaup G. (1999) *J. Neurochem.* **72**, 1564-1573).

Um weitere Untersuchungen zum Presenilin 1 durchführen zu können, war es erforderlich, geeignete Antikörper gegen PS1 herzustellen. Für die Gewinnung von Antikörpern gegen das Cterminale Fragment wurde der PS1 "loop"-Bereich rekombinant aufgereinigt und als Antigen eingesetzt. Weiterhin wurden N-terminale PS1-Bereiche als GST-Fusionsproteine exprimiert und nach der Aufreinigung als Antigene zur Gewinnung von Antikörpern gegen das N-terminale Fragment eingesetzt. Die so gewonnenen Antikörper wurden auf ihre Spezifität und ihre Funktionalität in "Western Blot" Analysen sowie in der Immunpräzipitation überprüft. Die hergestellten Antikörper gegen den C-terminalen PS1-Bereich sind für die Immunfällung als auch für die "Western Blot" Detektion geeignet, während die Antikörper gegen den N-terminalen PS1-Bereich in der Immunfällung sehr gute Ergebnisse liefern und bei der "Western Blot" Detektion von unterschiedlicher Qualität sind.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit bestand in der Analyse der Interaktion zwischen PS1 und dem bei der sowohl Interaktion von Zellen beteiligten als auch intrazellulär wichtigen Protein β -Catenin. Zur Verifizierung der Interaktion wurden die in dieser Arbeit hergestellten Antikörper verwendet. Mit Hilfe von Koimmunpräzipitationsexperimenten ist es gelungen, sowohl die Interaktion zwischen PS1-NTF und PS1-CTF nachzuweisen als auch die Interaktion des PS1-Heterodimers mit β -Catenin. Die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzanfärbung überprüft. In in SH-SY5Y Zellen und MDCK Zellen zeigte PS1 vor allem eine Anfärbung im Bereich von ER und Golgi, während es in primären, hippokampalen Neuronen auch im Bereich von Synapsen angefärbt wurde. β -Catenin war vor allem an der Plasmamembran und schwächer auch im Zellkern und Cytosol von MDCK Zellen lokalisiert. Da PS1 eine essentielle Komponente des γ -Sekretase Enzymkomplexes darstellt, wurde der Frage auf den Grund gegangen, ob eine erhöhte β -Catenin Menge Einfluß haben könnte auf die Produktion oder Sekretion des bei der Alzheimer Krankheit wichtigen A β -Peptids. Mit Hilfe einer Lithiumchloridbehandlung von MDCK Zellen konnte durch Inhibition der GSK3 β ein Aktivieren des Wnt-Signaltransduktionsweges nachgeahmt werden, was zu einer Anreicherung des intrazellulären β -Catenins führte. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass die Menge an sekretiertem A β -Peptid in Abhängigkeit von der Lithiumkonzentration als auch der Inkubationszeit erhöht war. Es wurde davon ausgegangen, dass β -Catenin, dessen Menge durch GSK3 β reguliert wird, als Ligand von PS1 einen Einfluß auf die γ -Sekretaseaktivität von PS1 ausüben könnte.

2 Einleitung

2.1 Neuropathologie der Alzheimer Krankheit

Die Alzheimer Krankheit ("Alzheimer's disease", AD) ist eine irreversible, neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (1,2). In den westlichen Industrienationen ist die AD die vierthäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs und Diabetes (3). Ein Prozent der Bevölkerung -etwa eine Million Menschen in Deutschland- sind betroffen, und 60-75 % aller Demenzen lassen sich auf die AD zurückführen (4). Einer der Risikofaktoren für AD ist das Alter. So ist bei den über 65 jährigen eins von zehn Individuen betroffen, bei den über 85 jährigen bereits eins von drei Individuen.

Die AD ist gekennzeichnet durch ihren progressiven Verlauf über 5-15 Jahre, in dem sich die Charakteristika einer Demenz zeigen, d. h. der Verlust erworbener, kognitiver Fähigkeiten bis hin zu Persönlichkeitsveränderungen infolge von Hirnschädigungen. Das klinische Bild ist insbesondere gekennzeichnet durch den Verlust des Kurz- und Langzeitgedächtnisses, des räumlichen und zeitlichen Orientierungsvermögens und den Verlust höherer, cerebraler Leistungen, was u. a. zu Sprachstörungen und Verhaltensänderungen führen kann (5). Die Krankheit verläuft in mehreren Phasen. In der Frühphase kann der Patient viele Beschwerden noch kompensieren. Im Laufe der Zeit gelingt dies allerdings immer weniger, was zu Depressionen bei den Patienten führen kann, solange sie diese Defizite noch wahrnehmen. Im fortgeschrittenen Stadium ziehen sich die Patienten immer mehr in ihre Erinnerungswelt zurück. In der Endphase der Krankheit erkennen die Patienten oft nicht mehr ihre Angehörigen. Sie verlieren zunehmend die Kontrolle über ihre Körperfunktionen und werden zu Pflegefällen. Die Krankheit ist lethal, wobei die Todesursache eine Sekundärerkrankung ist, die sich der Patient aufgrund seines geschwächten Zustandes zuzieht. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist die AD nicht heilbar. Verabreichte Medikamente sind im wesentlichen Acetylcholinesterase-Inhibitoren, die zu einer Abschwächung der Symptome führen, nicht aber die Krankheitsursache bekämpfen. Neuesten Studien zufolge wirken cholesterinsenkende Substanzen, sog. Statine, im Vorfeld der Krankheit vorbeugend (6). Eine zweifelsfreie Diagnose der AD ist bislang nur durch neurohistopathologische Untersuchungen an Gehirnen verstorbener Patienten möglich. Im Mittelpunkt der Forschung stehen daher die Suche nach geeigneten Substanzen für die Therapie und nach geeigneten Markern für eine frühzeitige Diagnose der AD.

Auf zellulärer Ebene ist das klinische Bild durch neuronale Dysfunktion und neuronalen Zelltod geprägt (7,8). Auf molekularer Ebene treten Amyloidablagerungen mit Schwerpunkten im Hippocampus und cerebralen und entorhinalen Cortex auf (9). Der Nervenarzt Alois Alzheimer erkannte erstmals diese Amyloidablagerungen und den Zusammenhang mit der später nach ihm benannten Krankheit. Da die Ablagerungen nach Anfärbung mit dem Farbstoff Kongorot im Polarisationsmikroskop eine grüne Doppelbrechung zeigten, wurden sie als "Amyloid" bezeichnet (10). Die Reaktion mit dem Farbstoff Kongorot kommt durch die β -Faltblattstruktur der Proteine zustande. Der Begriff "Amyloid" (griech.: stärkeähnlich) ist auf Virchow zurückzuführen. Da sich die Amyloidablagerungen mit Jod anfärben ließen, schloß er auf eine Polysaccharidstruktur (11,12). Friedreich und Kekule wiesen jedoch 1859 nach, daß es sich bei den Ablagerungen um Proteine handelt (13). Amyloidablagerungen finden sich außer bei der Alzheimer Krankheit auch bei anderen Krankheiten, die unter dem Begriff "Amyloidosen" zusammengefaßt werden. Heute verwendet man den Begriff "Amyloid" für Proteinaggregate mit folgenden Eigenschaften: grüne Doppelbrechung im polarisierten Licht nach Kongorot-Färbung, β-Faltblatt Sekundärstruktur und Ausbildung einer fibrillären Quartärstruktur, die im Elektronenmikroskop als 6-10 nm dicke Proteinfilamentstruktur zu erkennen ist (14,15).

Bei der Alzheimer Krankheit kommen Proteinablagerungen in drei Formen vor: intrazellulär, extrazellulär und in Blutgefäßwänden. Die intrazellulären Ablagerungen gestalten sich als neurofibrilläre Bündel ("neurofibrillary tangles", NFT), die im wesentlichen das Mikrotubuliassoziierte Protein Tau in hyperphosphorylierter Form enthalten (16,17) und sind im Perikaryon, Axon- und Dendritenbereich von Neuronen vorzufinden. Im Elektronenmikroskop erscheinen NFT als gepaarte helikale Filamente ("paired helical filaments", PHF). Die extrazellulär auftretenden Ablagerungen sind die sogenannten diffusen oder amorphen Plaques, die amyloiden, neuritischen Plaques ("amyloid plaque core", APC) und die senilen Plaques. Als dritte Form sind Ablagerungen in den Wänden von neokortikalen und meningealen Blutgefäßen vorzufinden, die als kongophile Angiopathie ("amyloid of the congophilic angiopathy", ACA) bezeichnet werden (18). Die Zahl der intra- und extrazellulären Proteinablagerungen korreliert mit dem Grad der Demenz (19). Die AD zeichnet sich durch eine lange präklinische Phase aus. Der Zeitraum zwischen dem ersten Auftreten von Amyloidablagerungen und dem Ausbruch der Krankheit, d.h. dem Auftreten erster Symptome, umfaßt 30 Jahre, die zwischen der 5. und 8. Lebensdekade einzuordnen sind (20,21). Bei Patienten mit "Down Syndrom" (Trisomie 21) treten alle drei Formen von Ablagerungen auf, allerdings etwa 50 Jahre früher als bei Alzheimer Patienten. Bereits zu Beginn der dritten Lebensdekade sind Amyloidablagerungen bei Down Patienten histologisch nachweisbar (20).

2.2 Molekularbiologie der Alzheimer Krankheit

Die genetischen Ursachen der Alzheimer Krankheit sind heterogen. Unter dem Begriff "erbliche AD" ("Familial AD"; FAD) werden Mutationen in verschiedenen Genen zusammengefaßt, die durch autosomal dominanten Erbgang mit zwingender phänotypischer Ausprägung zum Krankheitsbild der AD führen. Man stellt dieser Gruppe die sogenannten sporadischen Fälle gegenüber, bei denen keine FAD-Mutationen zugrundeliegen, es aber durch Akkumulation von autosomal-dominant vererbten Risikofaktoren mit geringerer Penetranz zur Krankheit führen kann. So gesehen kann man die AD treffender als multifaktorielles Syndrom denn als singuläre Krankheit bezeichnen. Die Mehrheit der AD Fälle (~90%) ist der sporadischen Form zuzurechnen. Nach dem Zeitpunkt des Einsetzens der Krankheit unterscheidet man eine früh einsetzende Form der AD ("early onset" AD; EOAD), bei der sich das Krankheitsbild im allgemeinen vor dem 65. Lebensjahr, meist schon in der 4. und 5. Lebensdekade zeigt, und eine spät einsetzende AD ("late onset" AD; LOAD). Die EOAD Formen sind meist auf genetische Ursachen zurückzuführen, während die Mehrheit der Fälle mit sporadischer AD ab einem Lebensalter von 65 Jahren auftritt und daher der LOAD zuzuordnen ist.

FAD-Gene

Bisher wurden drei Gene identifiziert, bei denen Mutationen zu FAD führen. Mutationen im Gen für das Amyloid-Vorläuferprotein ("Amyloid Precursor Protein", APP) auf Chromosom 21, Mutationen im Presenilin 1 Gen auf Chromosom 14 und Mutationen im Presenilin 2 Gen auf Chromosom 1. Das ɛ4-Allel des Apolipoprotein E (Apo E) Gens auf Chromosom 19 erhöht das Risiko für die spät einsetzende, sporadische Form der AD, während das E2-Allel schützend wirken könnte (22,23). Als ein weiterer genetischer Risikofaktor wird das α -2-Makroglobulin-Gen (A2M) auf Chromosom 12 diskutiert (24). Homozygotes Vorliegen des Allels 1 im PS1-Gen wird mit einen erhöhten Risiko für LOAD assoziiert (25). Die Lokalisation des APP-Gens auf Chromosom 21 macht deutlich, warum es bei Down Patienten bereits 50 Jahre früher zu Amyloidablagerungen kommt als bei Alzheimer Patienten. Die Mutationen im APP-Gen wurden in den flankierenden Bereichen vor und nach der A β -Domäne lokalisiert (26-28), also unmittelbar in der Nähe der Prozessierungsorte jener Sekretasen, die zur Freisetzung des amyloiden Aß-Fragments führen. Mutationen im APP und in den Presenilinen haben eine vermehrte Produktion von Aß zur Folge, insbesondere Presenilin-Mutationen führen zu einer verstärkten Produktion der längeren Form A β 42. Bei einer holländischen Familie mit kongophiler Angiopathie (HCHWA-D) liegt eine Punktmutation innerhalb der Aβ-Domäne vor (29,30). Bei einer schwedischen Familie wurde eine Doppelmutation N-terminal der ersten Aminosäure in Aβ entdeckt, was APP_{swe} zu

einem besseren Substrat für β -Sekretase macht was dann zu einer erhöhten Produktion von A β (A β 40 und A β 42) führt (31).

APP Struktur und APP Genfamilie

Das A β Polypeptid geht durch proteolytische Spaltung aus einem größeren Protein, dem Amyloid-Vorläufer-Protein ("amyloid precursor protein", APP) hervor (32). APP ist ein ubiquitär exprimiertes, N- und O-glykosyliertes , sulfatiertes Typ I-Membranprotein mit Merkmalen eines Zelloberflächenrezeptors (32,33). Das APP-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 21 lokalisiert und in nur einer Kopie vorhanden (32,34,35). Durch alternatives Spleißen des 19 Exons umfassenden Gens entstehen verschiedene Isoformen, die zu Primärtranslationsprodukten mit einer Länge von 770, 751, 714, 695, 563 und 365 Aminosäuren führen (32,36-41).

Die APP-Isoformen zeichnen sich, abgesehen von den Domänen, die von den dem alternativen Spleißen unterliegenden Exons kodiert werden, durch den Besitz eines Signalpeptids, gefolgt von einer cysteinreichen Domäne, einer sauren und einer stark glykosylierten Domäne, einer Transmembrandomäne und dem cytoplasmatischen C-Terminus aus. Der weitaus größere Proteinanteil ist extrazellulär ("Ektodomäne"), während sich an die von Exon 17 kodierte Transmembrandomäne nur eine kurze, cytoplasmatische Domäne anschließt. A β wird von der zweiten Hälfte des Exons 16 und vom Anfang des Exons 17 kodiert, liegt somit zum Teil im extrazellulären Bereich und zum Teil im Transmembranbereich von APP (siehe Abb. 1.1).

Die 770, 751, 714 und 695 Aminosäuren langen Isoformen gehen aus alternativem Spleißen der Exons 7 und 8 hervor. Die beiden längsten Formen, APP 770 und APP 751, besitzen eine Kunitz-Typ II-Serinprotease-Inhibitordomäne (KPI-Domäne), die von Exon 7 kodiert wird und *in vitro* als Inhibitor für einige Proteasen wirkt (38,42). Durch das in Leukozyten entdeckte alternative Spleißen des Exons 15 entsteht das sogenannte L-APP (43).

Das APP-Gen wird sowohl im Gehirn als auch in peripheren Geweben exprimiert, wobei die Expression in Gehirn und Niere am stärksten ist (44-48). Während APP ubiquitär exprimiert wird, bleiben die Amyloidablagerungen stets auf das Gehirn beschränkt. Das im Gehirn hauptsächlich vorhandene APP 695 besitzt nicht die Exons 7 und 8, hingegen das Exon 15, welches den L-APP Formen fehlt, die typischerweise von nicht-neuronalen Zellen exprimiert werden (49). Man hat weiterhin Amyloid-ähnliche Proteine identifiziert ("amyloid precursor-like proteins", APLP1 und 2), die in mehreren Domänen große Homologie zu APP zeigen (50,51), aber nicht die A β -Sequenz enthalten. Auch in anderen Organismen sind APP homologe Proteine bekannt, z.B. in *Drosophila* (APPL) und *Caenorhabditis elegans* (APL-1) (52,53).



Abb. 2.1 Schematische Darstellung von APP 695 und A β Peptid Die Abbildung zeigt die Einteilung des APP in Domänen. In der vergößerten Darstellung des A β Peptids sind die Sekretaseschnittstellen der α -, β - und γ -Sekrtetasen angegeben sowie die Positionen der FAD Mutationen *Swedish* und *London*.

<u>Aβ-Fragment</u>

Amyloidablagerungen ist Die Hauptproteinkomponente der ein Peptid mit einem Molekulargewicht von 4 kDa und β -Faltblattstruktur, welches wegen dieser Eigenschaften als A β oder β A4 bezeichnet wird (54-56). Das A β Peptid besteht aus 36-43 Aminosäuren (18,19,32) und kommt in zwei Hauptformen vor: einer kürzeren Form mit einer Länge von hauptsächlich 40 Aminosäureresten (A β 40) und einer längeren Form mit 42 Aminosäureresten (A β 42), die ein starkes Aggregationspotential aufweist (57). In den Plaques ist hauptsächlich A β 42 vorzufinden, vaskuläre Ablagerungen bestehen vor allem aus A β 40 und A β 38. Sekretiertes A β ist unter physiologischen Bedingungen schwer löslich und besitzt die Fähigkeit zur Selbstaggregation über hydrophobe Wechselwirkungen (56). Insgesamt ist A β 40 in weitaus größerer Menge vorhanden als A β 42 (Verhältnis A β 40:A β 42 9:1), jedoch besitzt A β 42 aufgrund seiner stärkeren Tendenz zu aggregieren und somit Initiationsschritt bei der Bildung von Plaques zu sein ein erheblich größeres "Schadenspotential" als Aβ40.



Abb. 2.2 APP-Prozessierung durch α -, β - und γ -Sekretasen Beim nicht amyloidogenen Abbau werden durch die α -Sekretase zunächst APP_{sec} α und p3-CT freigesetzt. P3-CT kann durch die γ -Sekretase in p3 und CT gespalten werden. Beim amyloidogenen Abbau von APP werden durch die β -Sekretase zunächst APP_{sec} β und A4CT freigesetzt. Anschließend wird A4CT durch die γ -Sekretase in A β und CT gespalten.

APP-Prozessierung

APP Proteine können während des Transports vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Komplex zur Plasmamembran proteolytisch gespalten werden. Erfolgt die Spaltung innerhalb der A β -Domäne, entstehen die sekretierten APP-Formen (33). Spaltendes Enzym ist die sogenannte α -Sekretase, die C-terminal des Lysinrestes an Position 16 im A β schneidet (58). Da die A β -Domäne bei dieser Prozessierung zerstört wird, sind das über diesen sekretorischen Weg entstehende sekretorische APP (APP_{sec}) und das 10 kDa große, in der Membran verbleibende C-terminale Fragment (C83) nicht mehr amyloidogen. APP_{sec} wird im CSF von AD Patienten und normalen Individuen gefunden (33). Bislang identifizierte α -Sekretasen gehören zur ADAM

(,,<u>a</u> disintegrin <u>and metalloprotease</u>") Familie. Neben ADAM-10 wurde auch ADAM-17 (TACE ,,tumor necrosis factor α -converting enzyme") als α -Sekretase identifiziert (59).

Bei der Prozessierung von APP, die zur Freisetzung von A β führt, spaltet eine sogenannte β -Sekretase C-terminal des Restes 596 in APP 695 und produziert so den N-Terminus von A β . Dieses Enzym wurde kürzlich identifiziert und als BACE ("<u>b</u>eta-site <u>APP c</u>leaving <u>e</u>nzyme") bezeichnet (60). Es handelt sich um eine membranständige Aspartyl-Protease, deren Aktivität zur Freisetzung des unmittelbaren Vorläufermoleküls für die A β -Generierung führt, des A4CT-Fragments (C99-Fragment). BACE liegt im ER als "Prä-Pro-BACE" vor. Bei der Maturierung des Proteins im Golgi-Kompartiment entsteht durch Entfernung des Signalpeptids das "Pro-BACE", aus dem durch Abspaltung der Pro-Domäne das BACE resultiert. Auch "Pro-BACE" ist katalytisch aktiv und die Pro-Domäne unterstützt die Proteinfaltung (61). Durch posttranslationale Modifikationen, darunter Glykosylierung, Ausbildung von Disulfidbrücken und Propeptid-Prozessierung, läuft BACE in SDS-PAGE mit einem apparenten Molekulargewicht von ~70 kDa, viel höher als das theoretische Molekulargewicht von ~50 kDa (62-64). Eine verwandte Transmembran-Aspartylprotease BACE2 zeigt ähnliche Substratspezifität, ist aber nicht stark im Gehirn exprimiert (65).

Der C-Terminus von A β wird durch die sogenannte γ -Sekretase Aktivität erzeugt, die an den Positionen 639 und 640 in APP 695 spaltet (66). FAD-Mutationen im APP-Gen betreffen oft diese kritische Prozessierungsstelle und bewirken nicht nur eine vermehrte Freisetzung von A β , sondern auch Verschiebung der Prozessierung zugunsten der A β 42-Form. Mutationen in PS1 führen zu einer erhöhten A β 42-Produktion in transfizierten Zellen (67-69), transgenen Tieren (67,68,70) und humanem Plasma (71). Folglich verändern Presenilinmutationen die Spezifität der γ -Sekretase Prozessierung von APP. Seit Bekanntwerden dieser Ergebnisse wird diskutiert, ob es sich bei den Presenilinen selbst um die γ -Sekretase/n handelt. Obwohl diese Frage noch nicht vollständig geklärt ist, läßt sich aus den bisherigen Daten und den daraus gewonnenen Erkenntnissen schließen, dass es sich bei den Presenilinen um für die γ -Sekretase Aktivität notwendige Proteine handelt. Gegenstand der aktuellen Forschungen ist vor allem die Identifizierung und Charakterisierung von weiteren Faktoren, die für die γ -Sekretase Aktivität erforderlich sind.

Im Medium von Zellkulturen als auch in CSF findet man neben A β auch ein 3 kDa großes Fragment (p3), dessen N-Terminus durch die α -Sekretase und C-Terminus durch die γ -Sekretase produziert wird (72). Bei dem endosomal-lysosomalen Weg kommt es zur Reinternalisierung von APP an der Plasmamembran. In den späten Endosomen und Lysosomen häufen sich C-terminale APP-Fragmente an, die vermutlich nicht die gesamte A β -Domäne enthalten (66,73,74). Außerdem scheint es zur Entstehung von A β auch ohne Beteiligung der Lysosomen zu kommen, wenn APP vom Endoplasmatischen Retikulum zum späten Golgi und zur Plasmamembran transportiert wird.

APP-Funktionen

Von großer Bedeutung für das Verständnis der AD ist es, die physiologischen Funktionen von APP zu kennen. KPI-enthaltende APPsec-Formen sind Nexin II-Proteasen, die in vivo den Faktor XIa der Blutgerinnungskaskade inhibieren sowie weitere Serinproteasen wie Trypsin und Chymotrypsin (75). Das massive Vorhandensein von APP in Thrombozyten unterstreicht seine Beteiligung an der Blutgerinnungskaskade und bei Wundheilungsprozessen. Außerdem regulieren Nexin II-Proteasen extrazelluläre Proteasen, die auf das Neuritenwachstum (42,76) und die Erhaltung von Synapsenstrukturen (77) wirken. Aufgrund von Zellkulturstudien wird eine Aktivität von APP als wachstumsförderndes oder autokrines Molekül postuliert (78). Die Struktur von APP entspricht der eines typischen Zelloberflächenrezeptors, der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen vermittelt (46,79). Die Ektodomäne von APP weist spezifische Bindungsstellen für einige Komponenten der ECM wie Heparin bzw. Heparansulfatseitenketten von Proteoglykanen, Kollagen und Laminin auf (80-82). Die Affinität von APP für Heparin wird durch eine von Exon 5 kodierte Zinkbindungsstelle reguliert (83,84). Die Interaktion von APP mit ECM Proteinen läßt darauf schließen, daß APP ein zellulärer Rezeptor für die ECM ist, aber auch als Verbindungsmolekül für ECM Komponenten untereinander dient, was insbesondere für APP_{sec} zutreffen dürfte.

Interessanterweise zeigen transgene *Drosophila*, die humanes APP exprimieren, einen "blistered wing" Phänotyp, bei dem die Verbindung zwischen den beiden Zellschichten, aus denen der Flügel besteht, gestört ist (85). Innerhalb des C-Terminus von APP ist eine "NPxY"-Sequenz lokalisiert, die als Bindungsdomäne für Interaktionspartner wie mDab ("mammalian disabled"), X11 und Fe65 fungieren kann, was auf eine Rolle für APP als Rezeptor bei Signaltransduktionskaskaden hinweist (Übersicht in (86)). Das "NPxY"-Motiv spielt eine Rolle bei clathrin-vermittelter Endocytose. Die Bindung von Kupfer (II) an eine konservierte Kupferbindungsstelle im APP führt *in vitro* zur Reduktion zu Kupfer (I), wobei APP oxidiert wird (87). Diese Redoxreaktion bewirkt die Ausbildung einer Disulfidbrücke innerhalb des APP-Moleküls, was die Beteiligung freier Sulfhydrylgruppen im APP impliziert (88).

Die subzelluläre Lokalisation von APP in Neuronen deutet auf eine Beteiligung an neuronalen Differenzierungsprozessen und dem Erhalt neuronaler Strukturen hin. Immunhistochemisch wurde eine prä- als auch postsynaptische Lokalisation von APP nachgewiesen (79). Biochemisch konnte gezeigt werden, dass APP in synaptischen Membranen (89), präsynaptischen Clathrinumhüllten Vesikeln (90) und in großen vesikulären Organellen, die Rab5 enthalten (90,91) angereichert ist. Außerdem wurde es immunzytochemisch in Wachstumskegeln von primären Neuronen nachgewiesen (92-94). In Neuronen ist APP dynamischen Prozessen unterworfen, wie dem anterograden Transport zu den Synapsen (95), der Internalisierung über Clathrin-umhüllte präsynaptische Vesikel mit nachfolgender Sortierung in retrograd transportierte Vesikel und der Transzytose von den Axonen zu den Dendriten (96,97).

2.3 Presenilin-Genfamilie

Die große Mehrheit der autosomal-dominant vererbten "early-onset" AD wird durch Mutationen in zwei weiteren Genen verursacht, dem Presenilin 1-Gen auf Chromosom 14 und dem Presenilin 2-Gen auf Chromosom 1. Im Jahr 1995 wurden die Presenilin-Gene identifiziert und erhielten ihren Namen wegen der früh einsetzenden oder "präsenilen" FAD-Form, zu der die FAD-Mutationen in diesen Genen führen (98-102). Der Zeitpunkt des Krankheitsbeginns unterscheidet sich dennoch je nach Defekt und liegt im Bereich von 25-65 Jahren bei Patienten mit PS1-Mutationen und im Bereich von 40-85 Jahren bei Patienten mit PS2-Mutationen. Das PS1-Gen umfaßt eine Region von 75 kb und besteht aus mindestens 12 Exons, wobei das offene Leseraster von PS1 von 10 Exons kodiert wird (103). Alternatives Spleißen findet statt. Für die überwiegende Mehrheit der EOAD sind Mutationen im PS1-Gen verantwortlich, von denen bisher über 70 identifiziert wurden, die sich in bestimmten Genbereichen anhäufen. Dabei handelt es sich in allen Fällen um "missense"-Mutationen mit einer Ausnahme, bei der die Spleißakzeptorstelle für Exon 9 zerstört ist und es zum Verlust der von Exon 9 kodierten Region kommt (PS1- Δ E9). Bei PS2 sind 2 Mutationen bekannt, die in einer Gruppe von "Wolga-Deutschen" bzw. einer italienischen Familie aufgetreten sind und daher vermutlich sehr selten vorkommen (Übersicht in (104).



Abb. 2.3 Presenilin-Topologie Die Abbildung zeigt das 8 Transmembrandomänenmodell mit dem hydrophilen N-Terminus, der hydrophilen Schleife zwischen TMD 6 und 7 und dem C-Terminus, die im Cytosol lokalisiert sind. In TMD 6 und TMD 7 sind die für die γ -Sekretaseaktivität relevanten Aspartylreste rot markiert.

2.3.1 Presenilin 1 Struktur, Topologie und endoproteolytische Prozessierung

Bei den Presenilinen handelt es sich um integrale Membranproteine mit vermutlich 8 Transmembrandomänen (TMD) (105-107), wobei auch Modelle mit 6 oder 7 TMD vorgeschlagen wurden (108,109). PS1 und PS2 sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 67 % homolog. Innerhalb der stark konservierten Transmembrandomänen liegt die Homologie sogar bei 84 %. Zwischen TMD 6 und 7 ist eine große hydrophile Region mit sauren Resten lokalisiert ("loop"), innerhalb der sich in PS1 zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen, drei Konsensus-Sequenzen für GSK-3β-Phosphorylierung und Bindungsstellen für Interaktionspartner befinden. Mutationen in PS1 finden sich vor allem in den Transmembrandomänen und der hydrophilen Schleife. Das Protein ist so in die Membran insertiert, dass der "loop"-Bereich sowie der N- und C-Terminus ins Cytosol ragen (105,106,110). PS1 zeigt weitere Homologien zu SPE-4 aus *Caenorhabditis elegans*, einem bei der Spermatogenese von *C. elegans* wichtigen integralen Membranprotein, und zu SEL-12 von *C. elegans*, das eine Funktion bei der von der Familie der Notch-Rezeptoren vermittelten Signaltransduktion besitzt (111).

PS1-Endoproteolyse

Das PS1-Protein (PS1) besitzt eine Länge von 467 Aminosäuren und ein apparentes Molekulargewicht von ~46 kDa. PS1 wird endoproteolytisch prozessiert und liegt *in vivo* als stabiler, heterodimerer Komplex bestehend aus einem ~28 kDa N-terminalen Fragment und einem ~18 kDa C-terminalen Fragment vor. Durch "Epitop-Mapping"-Analysen (112) und Radiosequenzierungen (113) konnte gezeigt werden, dass die Spaltung des PS1 Proteins innerhalb der "loop"-Domäne, hauptsächlich an den Aminosäurepositionen 293 und 299 stattfindet. Die für diese Spaltung verantwortliche Protease, auch als "Presenilinase" bezeichnet, wurde bislang noch nicht identifiziert. Für eine autoproteolytische PS1-Aktivität konnte ebenfalls bislang kein experimenteller Nachweis erbracht werden, wenngleich es Hinweise dafür gibt (114,115). Die Endoproteolyse ist ein regulierter und limitierter Prozess. Die Menge an entstehenden PS1-Heterodimeren ist limitiert, sogar bei einer Überexpression des Holoproteins wird nur ein geringer Anteil zu stabilen Heterodimeren metabolisiert, der größte Teil des neu synthetisierten Proteins wird über das Proteasom abgebaut (112,116). Die Expression von exogenem PS1 führt dazu, dass endogene PS1-Heterodimere von den entsprechenden exogenen Heterodimeren ersetzt werden, was auf eine Kompetition um für die Stabilität und Endoproteolyse wichtige limitierte zelluläre Faktoren hinweisen könnte (117). Bei der FAD-Mutation PS1AE9 kann keine endoproteolytische Prozessierung erfolgen, da die von Exon 9 kodierte Region (Aminosäurereste 290-319) und somit die "Presenilinase"-Schnittstelle fehlt (112). Diese fehlende Spaltung hat jedoch keine Auswirkung auf die Funktionalität des Proteins. PS1ΔE9 ist pathogen und führt zu einer erhöhten Aβ42-Produktion (67,118). Preseniline können unter apoptotischen Bedingungen alternativ gespalten werden von Proteasen der Caspase-Familie, wobei die Prozessierungsstelle C-terminal der Endoproteolyseschnittstelle im "loop"-Bereich zwischen den Aminosäureresten Asp 345/Ser346 in PS1 bzw. Asp329/Ser330 in PS2 liegt (119,120). Die bislang erhaltenen Daten sprechen dafür, dass die PS1-Fragmente die funktionellen Einheiten des Proteins darstellen und es sich bei dem PS1-Heterodimer um die biologisch aktive Form des Proteins handelt. In vivo werden vor allem die Fragmente vorgefunden, auch als Bestandteil von hochmolekularen Komplexen (121). Da allerdings auch einige künstliche PS-Varianten erzeugt werden konnten, die unabhängig von einer endoproteolytischen Prozessierung biologisch aktiv oder inaktiv sind (122,123), und nicht zuletzt die PS1AE9 Mutante biologisch aktiv ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen, wie groß die Bedeutung der PS-Endoproteolyse für die biologische und pathologische Funktion tatsächlich ist.

PS-Lokalisation

Die subzelluläre Lokalisation von endogenem Presenilin erstreckt sich auf die frühen Kompartimente des biosynthetischen "pathway", dem ER und Golgi-Kompartiment (124). Konfokale und Elektronen-Mikroskopie in Verbindung mit subzellulärer Fraktionierung haben gezeigt, dass Presenilin Proteine in Neuronen im ER, dem "ER-Golgi-intermediate-compartment" (ERGIC) und zu einem gewissen Anteil im *cis*-Golgi-Kompartiment vorzufinden sind (86,125). Weiterhin konnte eine Anreicherung von PS1-Fragmenten in Membranen von synaptischen

Vesikeln und Wachstumskegeln gezeigt werden (126)((127)). Die zelluläre Lokalisation von Presenilin Fragmenten ist teilweise kolokalisiert mit dem intrazellulären Entstehungsort von A β 42 (128-130). Mit Hilfe der Koimmunpräzipitation konnten nicht maturierte APP-Formen, die in ER und frühem Golgi lokalisiert sind, mit Presenilin präzipitiert werden, was auf eine direkte Interaktion in diesen Kompartimenten hindeutet (131,132). Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, dass diese Ergebnisse zur PS-APP-Interaktion in Experimenten mit transient oder stabil transfizierten Zellen erhalten wurden, die beide Proteine überexprimierten und anderen Gruppen der Nachweis dieser Interaktion nicht gelungen ist (133).

2.3.2 Presenilin 1 und γ-Sekretase Aktivität

Da PS1-Mutationen zu einer erhöhten Produktion von A β 42 führen und andererseits PS1-"knockouts" die A β -Produktion drastisch reduzieren, kam die Frage auf, ob es sich bei den Presenilinen selbst um die γ -Sekretase/n handelt. Preseniline weisen keine deutliche Sequenzhomologie zu bekannten Proteasen auf und durch ihre Homologie zu Spe-4, einem *C. elegans* Protein, das am Vesikeltransport bei der Spermatogenese beteiligt ist, stellte sich zunächst eine direkte Beteiligung bei der Prozessierung von APP nicht als ihre hauptsächliche Funktion dar. Die Überexpression von Presenilinen führt zudem nicht zu einer vermehrten γ -Sekretase-Aktivität (68).

Bereits vor Bekanntsein der Preseniline wurden viele Untersuchungen zur Charakterisierung der γ - (und β -) Sekretasen unternommen, da diese Enzyme in medizinischer Hinsicht, d.h. in Hinblick auf eine Therapiemöglichkeit der AD durch Inhibition der Sekretasen und damit Vermeidung der Entstehung des A β -Fragments, von größtem Interesse waren und natürlich sind. Bei der y-Sekretase handelt es sich um ein Enzym, das das Substrat, das C-terminale APP-Fragment C99 bei vorangegangener β -Sekretase-Spaltung bzw. C83 bei vorangegangener α inmitten der Membran prozessiert. Mittlerweile sprechen einige Sekretase-Spaltung, experimentelle Daten dafür, dass es sich bei den Presenilinen um γ -Sekretasen handelt. Da bei einem "Knockout" von PS1 und PS2 die γ-Sekretase-Aktivität vollständig inhibiert wird (134), sind die Preseniline für γ-Sekretase-Aktivität erforderlich. Ihre subzelluläre Lokalisation (ER, Golgi) stimmt mit dem Ort für γ-Sekretase-Spaltung überein (130). γ-Sekretase-Aktivität findet auch an der Plasmamembran statt, was zunächst im Widerspruch zur PS-Lokalisation zu stehen scheint, aber geringe Mengen PS-Heterodimere wurden an der Plasmamembran im Komplex mit dem membranassoziierten C-Terminus von Notch vorgefunden (135) und geringe Mengen an Presenilin könnten für die enzymatische Aktivität ausreichend sein. Weiterhin konnte in

Experimenten mit subzellulärer und biochemischer Fraktionierung gezeigt werden, dass PS und γ -Sekretase-Aktivität als Bestandteil von hochmolekularen Komplexen in den gleichen Fraktionen vorzufinden sind (136). Zudem ist es gelungen, PS-Untereinheiten mit γ -Sekretase-Inhibitoren zu markieren (137,138). Wichtige Erkenntnisse zur Identität der γ -Sekretase wurden durch die indirekte Charakterisierung mittels Inhibitoren erhalten. Demnach könnte es sich um eine Aspartyl-Protease handeln (138). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Mutation kritischer Aspartylreste in PS1 (Asp257 in TMD 6 bzw. Asp 385 in TMD 7) γ -Sekretase-Aktivität inhibiert und die Aspartylreste auch für die PS1-Endoproteolyse und die Proteolyse von Notch erforderlich sind (114,135). In diesem Zusammenhang ist eine Gegenüberstellung von PS1 und der "Signalpeptid-Peptidase" interessant. In beiden Fällen handelt es sich um Aspartylproteasen mit konservierten Aspartat-Resten in den Transmembrandomänen. Die Topologie von PS1 bedingt die Spaltung von bestimmten Typ I Transmembranproteinen während die Signalpeptid-Peptidase eine genau entgegengesetzte Topologie aufweist und Typ II Transmembranproteine spaltet.

Wenngleich noch nicht eindeutig gezeigt werden konnte, dass die γ -Sekretase und die Preseniline identisch sind, so sind Preseniline für die γ -Sekretase-Aktivität erforderlich. Preseniline könnten eine regulatorische Untereinheit oder einen Kofaktor bei der γ -Sekretase-Spaltung darstellen oder beim "trafficking" der Proteine, die prozessiert werden sollen, beteiligt sein und diese in räumliche Nähe oder geeignete Position zur γ -Sekretase bringen. Das Vorfinden der PS-Fragmente in hochmolekularen Komplexen mit γ -Sekretase-Aktivität unterstützt den Gedanken, dass es sich vielmehr um einen γ -Sekretase-Komplex handeln könnte, der unter der Beteiligung mehrerer Proteine den Prozessierungsschritt ausführt. Die Tatsache, dass es bislang nicht gelungen ist, aufgereinigtem PS alleine γ -Sekretase-Aktivität nachzuweisen, spricht ebenfalls für eine Beteiligung weiterer Proteine. Bereits identifiziert wurden die Proteine Aph1 (139) und Pen-2 (140,141).

PS1 ist neben der Prozessierung von APP auch an der Prozessierung von Notch beteiligt (142). Notch-Rezeptoren spielen eine Rolle in der Embryonalentwicklung, weiterhin bei der Regulation von neuronalen Differenzierungsprozessen, aber auch bei der Spermatogenese, Oogenese und Myogenese. Die Prozessierungsstelle für die γ -Sekretase-ähnliche Aktivität (reguliert durch PS) am C-Terminus von Notch liegt innerhalb der Membran. Die Prozessierung (bei Ligandenbindung) erfolgt nach vorangegangener Spaltung des Notch-Rezeptors durch Furin und die Metalloproteinase kuzbanian und führt zur Freisetzung des NICD-Fragments ("Notch intracellular domain"), das wiederum im Zellkern durch Interaktion mit weiteren Faktoren die Transkription von Zielgenen beeinflußt (143). Da nach wie vor der Vermeidung der Entstehung des A β -Fragments hohe Priorität bei der Suche nach Therapiemöglichkeiten eingeräumt wird, muß bei der Suche nach γ -Sekretase-Inhibitoren auch beachtet werden, welche weiteren Prozessierungsschritte eine solche Inhibition betreffen würde und welche u.U. gravierende Folgen das *in vivo* haben würde.

Neben APP und Notch wurden als alternative Substrate für PS1 u.a. auch CD44 (144) und LRP identifiziert. Man muß auch erwähnen, dass sämtliche Substrate der γ -Sekretase eine weitere Prozessierung erfahren durch die sogenannte ε -Sekretase. Während der γ -Sekretase Schnitt in der Membranmitte erfolgt, findet der ε -Sekretase Schnitt auch innerhalb der Membran, aber nahe der cytoplasmatischen Domäne statt. Für beide Prozessierungsschritte ist die Expression von PS1 notwendig und die Spaltung wird durch γ -Sekretase Inhibitoren inhibiert. Die Sequenz der Schnitte konnte allerdings noch nicht aufgeklärt werden (ob erst γ -Sekretase, dann ε -Sekretase oder umgekehrt oder simultan).

PS-Funktionen

Die bislang erhaltenen Daten legen die Vermutung nahe, dass es sich bei PS1 um ein Protein handelt, das beim "trafficking" sowie dem Metabolismus ausgewählter Membranproteine, darunter APP, Notch, APLP1 und TrkB, eine Rolle spielt. Die Beteiligung bei zellulären Differenzierungsprozessen und embryonaler Entwicklung, die den Presenilinen schon bald nach ihrer Entdeckung zugeschrieben wurde, hat sich im fatalen Phänotyp von PS1-"knockout"-Mäusen gezeigt, die starke Unterentwicklung und Mißbildungen wie Skelettdeformationen aufzeigen sowie gravierende vaskuläre Läsionen und Hämorrhagien im Gehirn (145,146). Der PS1^{-/-} Phänotyp ist lethal und die Mäuse sterben kurz vor oder bei der Geburt. Die gestörte Entwicklung und die zerebralen Probleme können teilweise durch das fehlende Notch-"Signalling" erklärt werden. Mäuse mit inaktivierten Notch1-Genen zeigen einen ähnlichen Phänotyp, sterben allerdings noch früher. Mäuse, denen PS1 und PS2 fehlen, zeigen den kompletten Notch-Mangel-Phänotyp, was dafür spricht, dass PS2 teilweise den Funktionsverlust in PS1-"knockout"-Mäusen kompensieren kann (147,148). Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Presenilinen beim Notch-"Signaling" wurden durch Versuche mit C. elegans erhalten, die die PS-homologen Proteine sel-12, spe-4 und hop1 besitzen. Sel-12^{-/-} Tiere zeigen einen im Verlust der Notch-Funktion begründeten Phänotyp und sind nicht mehr zur Eiablage fähig. Dieser Defekt, kann durch humane PS1- und PS2-Gene aufgehoben werden, sel-12 also funktionell durch PS ersetzt werden (111,149,150). Sel-12 wiederum ist beteiligt am lin-12 Signaltransduktionsweg, wobei lin-12 ein Homolog von Notch ist. In Drosophila führt eine "lossof-function" Mutation im einzigen vorhandenen PS-Gen zu einem Notch-ähnlichen Phäntotyp (151,152). Mögliche Funktionen der Preseniline sind daher die Beteiligung bei Signaltransduktionsprozessen, die über die weitere Entwicklung der Zelle entscheiden, bei der Prozessierung und dem Transport von Proteinen, bei Apoptose sowie der zellulären Antwort auf Stress (Übersicht in (153,154).

2.3.3 Interaktionspartner von PS1

Seit dem Bekanntwerden der Preseniline wurden eine Reihe von Interaktionspartnern entdeckt. Wie bereits erwähnt, sind PS N- und C-terminale Fragmente Bestandteile hochmolekularer 150-250 kDa Komplexe (121,155), die auch β -Catenin und Nicastrin enthalten (156). In Hefe-,,2-hybrid-Assays" wurden Interaktionen mit dem Aktin-bindenden Protein Filamin, Calciumbindenden Proteinen wie dem so genannten Calsenilin (Calcium+Presenilin, (157), dem Calmyrin und Sorcin, antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-X_L, der an der Regulation des Vesikeltransports beteiligten GTPase Rab11, dem Gehirn G-Protein G₀, Notch, der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β , tau und β -Cateninen gezeigt. Das Mikrotubuli-assoziierte Protein tau sowie β -Catenin sind bekannte Substrate der GSK3 β , und kürzlich wurde auch PS1 als weiteres Substrat identifiziert (158). Eine mögliche Beeinflussung der Phosphorylierung von Tau durch PS1 FAD-Mutationen wäre weiterhin denkbar. Die Verschiedenheit der mit PS interagierenden Proteine deutet auf mögliche PS-Funktionen bei der Regulation von Signaltransduktionswegen, darunter Wnt und Notch, aber auch Apoptose und Calcium-Homöostase hin.

Von besonderem Interesse ist die Interaktion der Preseniline mit Mitgliedern der Armadillo-Proteinfamilie, darunter β -Catenin (155), γ -Catenin, dem neuronalen δ -Catenin (159), p0071 (160) und neural-spezifischem Plakophilin. Armadillo ist das β -Catenin homologe Protein in *Drosophila* und zeichnet sich durch die mehrfache Wiederholung des Armadillo-Motivs aus, eine 42 Aminosäuren lange Konsensussequenz, innerhalb der Protein-Protein-Wechselwirkungen stattfinden. Ein Bereich am Ende des hydrophilen "loop" von PS1 (Aminosäurereste 372-399) zeigt teilweise Homologie zu dieser Armadillo-Konsensussequenz (161). Die Interaktion von PS1 und β -Catenin wird den Bereichen AA322-450 im PS1 und der Region 445-676 im β -Catenin zugeschrieben (162). Andere Gruppen haben den an der Bindung beteiligten PS1-Bereich auf die AA372-399 eingeschränkt (155). Das β -Catenin Protein ist an wichtigen Prozessen innerhalb der Zelle und bei der Interaktion zwischen Zellen beteiligt. Ein Teil des β -Catenins ist an der Plasmamembran lokalisiert, wo es an das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin gebunden vorliegt, das wiederum mit Proteinen der ECM interagiert. Gleichzeitig interagiert β -Catenin mit α -Catenin, das wiederum an Aktin bindet, und stellt so die Verbindung zum Cytoskelett her. junctions" bei. Ein weiterer Teil des zellulären β -Catenins befindet sich im Cytosol im Komplex mit Axin, APC ("adenomatous polyposis coli") und GSK3 β und ist beteiligt am Wnt-Signaltransduktionsweg (163).

Es ist bekannt, dass der Wnt-Signaltransduktionsweg eine entscheidende Rolle während der Entwicklung des Tieres spielt, dort wiederum bei der Zelladhäsion und bei für die Zellentwicklung wichtigen Entscheidungsprozessen. Defekte innerhalb dieser Kaskade führen zu unterschiedlichen physiologischen Abnormalitäten, darunter Veränderungen in frühen Entwicklungsprozessen bis hin zur Krebsentstehung (164-166). Der Begriff Wnt ist ein Akronym für die orthologen Gene wingless in *Drosophila* (167) und Wnt1 (früher int-1) in der Maus *Mus musculus*. Humane Wnt-Gene wurden durch Sequenzhomologie zu diesen ersten Mitgliedern der Wnt-Familie identifiziert. Sie kodieren für sekretierte Glykoproteine mit einer Länge von 350-400 Aminosäuren und einem konservierten Verteilungsmuster für Cysteinreste über das gesamte Protein.



Abb. 2.4 Schema der Diversifizierung des Wnt-Signaltransduktionsweges Erläuterungen siehe Text; Abbildung entnommen aus: Huelsken J., Birchmeier W. (2001) Current Opinion in Genetics & Development 11, 547-553 (168)

Das gegenwärtige Modell des Wnt-Signaltransduktionsweges schlägt vor, dass in der Abwesenheit eines Wnt-Liganden cytosolisches β -Catenin von der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β konstitutiv phosphoryliert und so für den proteasomalen Abbau markiert wird. Durch nachfolgende Ubiquitinierung und raschen Abbau durch das 26S Proteasom bleibt die Menge an β -Catenin im Cytosol gering (169-171). Es wird davon ausgegangen, dass GSK3 β in Komplex mit Axin und APC vorliegt und die Phosphorylierung dieser beiden Proteine durch GSK3ß die Phosphorylierung des β-Catenins begünstigt. Die Gegenwart von extrazellulären Wnt-Liganden führt zur Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges. Wnt-Liganden binden an membranverankerte Rezeptoren der Frizzled (Fzd) Proteinfamilie, die das Signal in das Innere der Zelle weiterleiten, indem sie das Dishevelled (Dsh) Protein aktivieren. Dsh wiederum inaktiviert GSK3 β , was zu einer Anreicherung von intrazellulärem β -Catenin führt. In Folge dieser Anreicherung gelangt β -Catenin in den Zellkern, wo eine Interaktion mit Mitgliedern der Lef/TCF ("T cell-specific transcription factor 1) Familie von Transkriptionsregulatoren stattfindet, die schließlich zur Aktivierung von Wnt-Zielgenen führt, darunter beispielsweise Cyclin D1, c-myc und Metalloproteasen.

Seitdem bekannt ist, dass PS1 und β-Catenin Interaktionspartner sind, wird diskutiert, welche Effekte diese Interaktion auf β -Catenin aber auch hinsichtlich der Bildung von A β bei Vorliegen von PS1 FAD-Mutationen haben könnte. Die Untersuchungen zur funktionellen Relevanz der PS1-B-Catenin-Wechselwirkung haben kontroverse Ergebnisse hervorgebracht. Es konnte gezeigt werden, dass PS1 an der Regulation der cytosolischen β-Catenin Menge beteiligt ist, wobei FAD-Mutationen in PS1 zu einer erhöhten Degradation und damit zu geringerer Stabilität des β-Catenins führten (172,173). Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass während PS1wt den Abbau von ß-Catenin stimuliert, PS1-Mutanten dies nicht tun und somit die Stabilität des β-Catenins erhöhen (174). Neuere Untersuchungen von Killick et al. haben dieser kontroversen Diskussion eine weitere Schlußfolgerung hinzugefügt. Demnach wird die Stabilität und Transkriptionsaktivität des β-Catenins durch wt PS1 negativ reguliert. Diese negative Regulierung wird von PS1-Mutanten hingegen schwächer ausgeübt (175). Weiterhin wurde gezeigt, dass PS FAD-Mutationen das intrazelluläre "trafficking" von β-Catenin nach Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges verändern (176). Diese Aktivierung ist experimentell durch niedrige Lithium-Konzentrationen zu erreichen. Li⁺-Ionen inhibieren GSK3β (177,178). Die durch Lithium-Ionen bzw. GSK3β-Inhibition induzierte Translokation von β-Catenin in den Zellkern läßt sich innerhalb kurzer Zeit nachweisen, ist aber signifikant reduziert in humanen Fibroblasten von heterozygoten Trägern pathogener PS1- und PS2-Mutationen (176).

Neueste Untersuchungen befassen sich mit der physiologischen Bedeutung von drei hochkonservierten GSK3 β -Konsensus-Phosphorylierungsstellen innerhalb des PS1-"loops". Es konnte gezeigt werden, dass eine dieser (S/T)xxxS-Konsensusbereiche, nämlich STPES³⁵⁷ mit den Aminosäureresten Ser³⁵³ und Ser³⁵⁷ ausreichend und notwendig für die Interaktion mit β -Catenin ist (158). Mutationen des Ser³⁹⁷ innerhalb eines weiteren GSK3 β -Konsensusmotivs haben einen Anstieg des C-terminalen PS1-Fragments, nicht aber des NTF oder Holoproteins zur Folge (179).

2.4 Fragestellungen der Arbeit

Die vorliegende Doktorarbeit hatte zum Ziel, genauere Erkenntnisse hinsichtlich Vorkommnis, Lokalisation und mögliche Interaktionen von Presenilin 1 bzw. dem PS1 C- und N-terminalen Fragment zu erhalten. Zu Beginn dieser Arbeit war nur wenig bekannt über die subzelluläre Lokalisation des Proteins, über die funktionell aktive Form, die Funktion der Preseniline generell oder mögliche Interaktionspartner. Daher standen Experimente zur näheren Charakterisierung der PS1-Fragmente sowie zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation zunächst im Vordergrund. Außerdem sollten Untersuchungen zur Interaktion von PS1 und β -Catenin angestellt werden und überprüft werden, ob und wie sich die Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges auf die Bildung des A β -Fragments auswirkt. Um die geplanten Experimente ausführen zu können, mußten geeignete Antikörper gegen die Presenilin-Fragmente hergestellt werden. Die vorhandenen Antiseren waren in begrenzter Menge vorhanden, nicht spezifisch oder nicht ausreichend spezifisch.

Ein erster Schwerpunkt der Arbeit bestand darin, Vollängen-PS1 sowie PS1-Fragmente in Lysaten verschiedener Zellinien nachzuweisen. Im Mittelpunkt stand die humane Neuroblastomazellinie (SH-SY5Y-Zellen) und Rattenhirnhomogenat. Da zum Zeitpunkt der Analysen nicht bekannt war, unter welchen Bedingungen sich Vollängen-PS1-Protein und PS1-Fragmente nachweisen lassen, wurden mit "Western Blot" Detektion PS1-Proteine aus unterschiedlich behandelten Proben nachgewiesen. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse wurden publiziert (126).

Aus oben erwähnten Gründen war die Herstellung von Antikörpern gegen PS1 notwendig. Es sollte daher mit der Klonierung von geeigneten PS1-Bereichen begonnen werden, die später zur Immunisierung von Kaninchen verwendet werden sollten. Da insbesondere die vorhandenen, gegen den C-terminalen PS1-Bereich gerichteten Antikörper unzureichende Qualität aufwiesen,

sollte der gesamte PS1-"loop"-Bereich rekombinant in E. coli exprimiert und die aufgereinigten Proteine für die Immunisierung von Kaninchen eingesetzt werden. Um auch Antikörper gegen den N-Terminus zu erhalten, wurden als weitere Bereiche der PS1 N-Terminus bis zur ersten Transmembrandomäne sowie bis zur zweiten Transmembrandomäne ausgewählt, wobei diese Abschnitte als GST-Fusionsproteine in E. coli exprimiert und nachfolgend aufgereinigt werden sollten. Das Plasmid pRSETB-PS1-loop wurde freundlicherweise von Roberto Cappai (Melbourne) zur Verfügung gestellt. Die Proteinaufreinigung aus E. coli BL 21 Bakterien erfolgte unter Mithilfe von Andrea Schlicksupp, der hierfür ausdrücklich gedankt wird. Nach Erstimmunisierung und Folgeimmunisierungen sollten die Antiseren in regelmäßigen Abständen überprüft werden und das finale Serum bei ausreichender Spezifität und Titergehalt gewonnen werden. Die erhaltenen Antiseren waren dann in "Western Blot" Analysen und Immunpräzipitationen näher zu charakterisieren und ihre Verwendung bei der Immunfluoreszenzanfärbung von Zellen zu überprüfen und mit Referenz-Antikörpern zu vergleichen.

Den Presenilinen wurde schon bald nach ihrer Entdeckung die Beteiligung bei zellulären Differenzierungsprozessen und embryonaler Entwicklung zugeschrieben. Die Interaktion mit β -Catenin, das bei der Zelladhäsion und im Wnt-Signaltransduktionsweg relevant ist, unterstützt diese Annahme. Es sollte daher die Interaktion von PS1 und β -Catenin verifiziert werden. Dazu wurden die Lysate von SH-SY5Y- sowie MDCK-Zellen verwendet. Polarisierte Zellen wie es neuronale Zellen bzw. Endothelzellen sind, wurden für derartige Untersuchungen herangezogen, da neuronale Zellen und Epithelzellen beteiligt sind bei der Entstehung seniler Plaques sowie zerebraler, amyloider Angiopathie. Untersuchungen zum Transport von APP wurden mit MDCK-Zellen durchgeführt (180). Ein weiterer Vorteil bestand darin, dass diese Zellen ausreichende Mengen an β -Catenin synthetisieren. Die Verifizierung der Interaktion von PS1 und β -Catenin in SH-SY5Y- und MDCK-Zellen sollte mittels Ko-Immunpräzipitation und nachfolgender "Western Blot" Analyse unter Verwendung der in dieser Arbeit hergestellten Antiseren erfolgen.

Nach der Identifizierung von β -Catenin als PS1-Interaktionspartner (162) und angesichts der Bedeutung von β -Catenin innerhalb des Wnt-Signaltransduktionswegs stellte sich die Frage nach einer möglichen Auswirkung auf die Bildung des A β -Fragments. Untersuchungen hierzu wurden mit MDCK-Zellen durchgeführt. Durch Kultivieren der Zellen in Gegenwart von Lithiumchlorid sollte eine Anreicherung von β -Catenin in der Zelle erreicht und ein möglicher Effekt auf die Bildung bzw. Sekretion des A β -Fragments beobachtet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von PS1 in Wildtyp bzw. stabil mit PS1 transfizierten humanen Neuroblastomazellen und Rattenhirngewebe

3.1.1 "Western Blot" Detektion von Vollängen-PS1 und PS1-Fragmenten aus Wildtyp bzw. stabil mit PS1 transfizierten humanen Neuroblastomazellen und Rattenhirngewebe

Da zum Zeitpunkt der Analysen noch nicht bekannt war, unter welchen Bedingungen sich Volllängen-PS1-Protein und PS1-Fragmente nachweisen lassen, wurden mit "Western Blot" Detektion PS1-Proteine aus unterschiedlich behandelten Lysaten von SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen. Es wurden Lysate von PS1-transfizierten, Vektor-transfizierten und Wildtyp SH-SY5Y-Zellen verwendet, die entweder für 30 min bei 37 °C oder für 5 min bei 100 °C inkubiert wurden.



Abb. 3.1 "Western Blot" Detektion von PS1-full length und PS1-CTF aus Lysaten von SH-SY5Y-Zellen Spur 1, 2, 3: Detektion von PS1-CTF und Volllängen-PS1 aus bei 37°C behandeltem Lysat von verschiedenen SH-SY5Y-Zellinien mit pAk C6; Spur 4: Probe bei 100 °C inkubiert; Spur 5, 6, 7: analog zu Spur 1, 2, 3 mit jeweiligem Antigen zur Kompetition

Das C-terminale PS1-Fragment wird in allen Zelllysaten bei etwa 18 kDa detektiert (Spur 1, 2, 3, 4). In Spur 4 wurde Lysat aus PS1-transfizierten SH-SY5Y-Zellen aufgetragen, das vor dem Gelauftrag bei 100 °C inkubiert wurde. Auch bei dieser Probe wird PS1-CTF von dem gegen das C-terminale Fragment gerichteten Antikörper C6 detektiert. Das PS1-Volllängenprotein wird nur in der bei 37 °C behandelten Probe mit Lysat aus PS1-transfizierten SH-SY5Y-Zellen detektiert (Spur 3), nicht hingegen im Lysat von Vektor- oder nicht transfizierten Zellen bzw. der bei 100 °C behandelten Probe (Spur 1, 2, 4). In nicht mit PS1 transfizierten Zellen ist die Menge an Volllängenprotein zu gering, um detektiert werden zu können (Spur 1, 2). Das Erhitzen der Probe auf 100 °C hat zur Folge, dass das vorhandene Volllängenprotein aus dem Lysat von PS1transfizierten Zellen aggregiert und als Aggregat im hochmolekularen Bereich zu detektieren ist (Spur 4, angezeigt durch Pfeilkopf). In den Proben 5, 6 und 7 wurde die "Western Blot" Detektion in Gegenwart des entsprechenden Peptids, welches zur Herstellung des Antikörpers benutzt wurde durchgeführt. Durch diese Kompetition wurden die gegen PS1-CTF gerichteten Antikörper mit dem Peptid abgesättigt und folglich keine entsprechenden Banden markiert (Spur 5, 6, 7). Bei der in allen Proben markierten Bande bei etwa 50 kDa (angezeigt durch *) handelt es sich daher um eine durch unspezifisch bindende Antikörper hervorgerufene Immunreaktivität.



Abb. 3.2 "Western Blot" Detektion von PS1-Gesamtprotein und PS1-NTF aus Lysaten von SH-SY5Y-Zellen Spur 1, 2, 3: Detektion von PS1-NTF und Volllängen-PS1 aus bei 37°C behandeltem Lysat von verschiedenen SH-SY5Y-Zellinien mit pAk 95/23; Spur 4: Probe bei 100 °C inkubiert; Spur 5, 6, 7: analog zu Spur 1, 2, 3 mit jeweiligem Antigen zur Kompetition

PS1-NTF wird in Lysaten von Wildtyp (Spur 1), Vektor-transfizierten (Spur 2) und PS1transfizierten SH-SY5Y-Zellen (Spur 3) detektiert. PS1-Volllängenprotein wird nur im Lysat von mit PS1-transfizierten Zellen detektiert (Spur 3). Wird diese Probe vor Gelauftrag für 5 min bei 100 °C denaturiert, so aggregieren sowohl das PS1-NTF als auch das Volllängenprotein und sind als Bande im hochmolekularen Bereich wiederzufinden (Spur 4, angezeigt durch Pfeilkopf). Bei der Detektion in Gegenwart des kompetitierenden Antigens werden keine Banden detektiert, was die Spezifität des verwendeten pAk 95/23 hervorhebt.



Abb. 3.3 "Western Blot" Detektion von PS1-Fragmenten aus Rattenhirnhomogenat Spur 1, 2: Detektion von PS1-CTF mit pAk C6; Spur 3, 4: Detektion von PS1-NTF mit pAk 95/23; Proben in Spur 1, 3 vor Gelauftrag bei 37 °C inkubiert, Proben aus Spur 2, 4 vor Gelauftrag bei 100 °C inkubiert

In den Proben aus Rattenhirngewebe wird kein PS1-Volllängenprotein detektiert, was die Annahme bestätigt, dass die funktionelle Form von PS1 im Organismus nicht das Volllängenprotein ist, sondern die Fragmente. Der polyklonale Antikörper C6 detektiert das C-terminale Fragment sowohl in der vor Gelauftrag bei 37 °C behandelten Probe als auch in der gekochten Probe. Weiterhin ist bei der mit 37 °C behandelten Probe ein PS1-CTF mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 22 kDa vorhanden, bei dem es sich um eine phosphorylierte Form des CTF handeln könnte (angezeigt durch weißen Pfeil; (181)). Bei den weiterhin detektierten Banden handelt es sich um unspezifische Immunreaktivitäten des Antikörpers (angezeigt durch *), wie in weiteren Proben mit Kompetition untersucht wurde (nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abbildung 3.1 führt das Kochen der Probe auch hier zu einem Aggregieren des N-terminalen Fragments. In Spur 3 detektiert das polyklonale Antiserum 95/23 das N-terminale PS1-Fragment bei einem Molekulargewicht von 28 kDa, das Erhitzen der Probe auf 100 °C führt zur Agrregation und zur Detektion einer Bande im hochmolekularen Bereich (Spur 4, angezeigt durch Pfeilkopf).

Die Analysen haben gezeigt, dass bei den Fragmenten je nach Herkunft geringe Unterschiede im apparenten Molekulargewicht vorliegen: PS1-NTF aus Zellen läuft bei etwa 28 kDa, PS1-NTF aus Rattenhirngewebe bei etwa 29 kDa. Für PS1-CTF sind es entsprechende Molekulargewichtsgrößen von 18 bzw. 20 kDa.

3.1.2 Immunpräzipitation von Vollängen-PS1 und PS1-Fragmenten aus Wildtyp bzw. stabil mit PS1 transfizierten humanen Neuroblastomazellen

Neben der Detektion im "Western Blot" wurden PS1-Fragmente als auch PS1-Volllängenprotein mit den polyklonalen Antiseren C6 und 95/23 immunpräzipitiert und die spezifische Immunpräzipitation in Gegenwart des entsprechenden Antigens blockiert.



Abb. 3.4 IP von PS1 aus Zelllysat von ³⁵S-Methionin-markierten PS1-transfizierten SH-SY5Y-Zellen mit 95/23 und C6 Antiserum Spur 1, 3, 5, 7: IP von PS1-NTF und Volllängen-PS1 aus Lysat von verschiedenen SH-SY5Y-Zellinien mit pAk 95/23; Spur 2, 4, 6: IP von PS1-CTF und Volllängen-PS1 aus Lysat von verschiedenen SH-SY5Y-Zellinien mit pAk C6; Spur 6,7: IP in Gegenwart des entsprechenden Antigens

Die IPs von Lysaten der mit PS1 transfizierten SH-SY5Y-Zellen mit beiden verwendeten Antiseren führen zur Präzipiation des PS1-Volllängenproteins bei etwa 46 kDa und dem N-terminalen Fragment (Spur 1) bzw. dem C-terminalen Fragment (Spur 2). Weiterhin werden vom polyklonalen Antikörper 95/23 das N-terminale PS1-Fragment aus Lysaten von mit dem pCEP4-

Vektor und Wildtyp SH-SY5Y-Zellen immunpräzipitiert (Spur 3, 5), allerdings kein PS1-Volllängenprotein. Ebenso präzipitiert das Antiserum C6 PS1-CTF aber kein PS1-Volllängenprotein aus dem Lysat von Vektor-transfizierten SH-SY5Y-Zellen (Spur 4). Bei den Proben 6 und 7 wurde die IP in Gegenwart des entsprechenden Antigens durchgeführt. Die in diesen Proben immunpräzipitierten Proteine sind somit auf unspezifische Reaktionen der Antiseren zurückzuführen. Die schwache Bande, die im Bereich von 46 kDa in Spur 7 präzipitiert wurde, könnte darauf zurückgeführt werden, dass nicht alle Antikörper vom Antigen abgesättigt wurden oder aber neben dem PS1-Volllängenprotein ein weiteres Protein mit dem gleichen Molekulargewicht unspezifisch vom Antikörper 95/23 erkannt wird.

3.2 Klonierung von rekombinanten PS1-Proteinen und GST-PS1-Fusionsproteinen

3.2.1 Klonierung und Aufreinigung von rekombinantem PS1-"loop"-Protein

Da die vorhandenen Antiseren nur in begrenzter Menge vorhanden, nicht spezifisch oder nicht ausreichend spezifisch waren, mußten geeignete Antikörper gegen die Presenilin-Fragmente hergestellt werden um die geplanten Experimente ausführen zu können. Da vor allem gegen den C-terminalen Bereich von PS1 gerichtete Antikörper nicht in ausreichender Menge oder Spezifität vorhanden waren, stand die Herstellung von diesen Antiseren zunächst im Vordergrund. Als Antigen wurde die Region des hydrophilen "loop"-Bereichs von PS1 ausgewählt. Zum einen sollte diese hydrophile Domäne keine Probleme in Hinblick auf die Löslichkeit darstellen, zum anderen konnten bereits spezifische Antiseren von anderen Gruppen gegen diese Region hergestellt werden.

Zur Gewinnung von rekombinantem PS1-"loop"-Protein wurden AS 263-407 in den Vektor pRSETB kloniert. Das Plasmid pRSETB-PS1-loop wurde freundlicherweise von Roberto Cappai (Melbourne) zur Verfügung gestellt. Das Konstrukt wurde mit Hilfe von DNA-Sequenzierung überprüft und in *E. coli* BL21 Zellen exprimiert. Das rekombinante PS1-"loop"-Protein wurde nach Sonifizierung des Bakteriensediments zur Aufreinigung auf präparative SDS-Gele aufgetragen, aus den entsprechenden Gelbereichen elektroeluiert und durch nachfolgende Gelfiltrationschromatographie umgepuffert und renaturiert. Von der erhaltenen Proteinlösung wurde mittels BCA-Test eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt und die Reinheit der Probe in SDS-PAGE durch Anfärbung mit Coomassie-Färbelösung überprüft.



Abb. 3.5 Rekombinantes PS1-loop Protein Jeweils 5 μ l der 2. Eluatfraktion (1 μ g/ μ l, Spur 1) bzw. der dritten Eluatfraktion (0,6 μ g/ μ l, Spur 2) nach Gelfiltrationschromatographie

Das rekombinante PS1-"loop"-Protein besitzt ein Molekulargewicht von etwa 20 kDa und ist sehr rein in der Probe enthalten.

3.2.2 Klonierung und Aufreinigung von GST-PS1-Fusionsproteinen

Um Antikörper für den Nachweis von PS1-NTF und PS1-Holoprotein zu gewinnen, wurde der N-Terminus von PS1 bis zur Transmembrandomäne 1 (TMD1) bzw. die N-terminale Region bis zur TMD2 als Antigen verwendet. Diese Bereiche wurden als Antigene ausgewählt, da der N-Terminus von PS1 als cytosolische Domäne gut zugänglich ist und eine gute Immunreaktivität der Antikörper erwartet wurde. Die PS1-Bereiche AS2-81 bzw. AS2-132 wurden in den pGEX-5X-1 Vektor kloniert und in *E. coli* DH5α Zellen exprimiert. Die Aufreinigung der GST-PS1-Fusionsproteine war am effizientesten mit präparativer SDS-PAGE, Elektroelution und nachfolgender Gelfiltrationschromatographie. Da ein Verlust an Protein vermieden werden sollte, wurde das GST nicht abgespalten und das gesamte Fusionsprotein zur Immunisierung verwendet. Die Proteine wurden durch Coomassie-Anfärbung im SDS-Gel und durch "Western-Blot" Detektion mit gegen GST bzw. PS1 gerichteten Antikörpern überprüft.



Abb. 3.6 GST-PS1-Fusionsproteine Coomassie-angefärbt; Spur 1 und 2: Fusionsprotein mit N-terminalem PS1-Bereich AS2-81; Spur 3 und 4: FP mit N-terminalem PS1-Bereich AS 2-132
Das GST-PS1-Fusionsprotein, das den PS1-Bereich bis zur ersten Transmembrandomäne enthält, besitzt ein apparentes Molekulargewicht von etwa 33 kDa. Das Fusionsprotein mit dem PS1-N-terminalen Bereich bis zur zweiten Transmembrandomäne besitzt ein apparentes Molekulargewicht von etwa 40 kDa. Das Coomassie-angefärbte SDS-Gel zeigt neben den Fusionsproteinen auch einen geringen Anteil an Abbauprodukten dieser Proteine.



Abb. 3.7 "Western Blot" Analyse von GST-PS1-Fusionsproteinen Spur 1 und 2: Detektion der GST-Fusionsproteine mit pAk gegen GST; Spur 3 und 4: Detektion der GST-Fusionsproteine mit pAk 95/23 gegen PS1-N-Terminus

Die erhaltenen Proben mit den GST-PS1-Fusionsproteinen wurden in einer "Western-Blot" Analyse mit Antikörpern gegen GST bzw. PS1 überprüft. Die gegen GST gerichteten Antikörper zeigen in Gegenwart des GST-PS1-Fusionsproteins bis TMD1 Immunreaktivität mit Proteinbanden im Bereich von etwa 34 kDa (Spur 1). In der Spur mit dem GST-PS1-Fusionsprotein bis TMD2 markiert der Antikörper Banden im Bereich von 30 und etwa 40 kDa (Spur 2). Bei der Detektion mit gegen PS1 gerichtetem Antikörper werden die gleichen Banden markiert und Abbauprodukte der jeweiligen Proteine.

3.3 Polyklonale Antiseren gegen PS1

3.3.1 Herstellung polyklonaler Antiseren gegen PS1

Zur Gewinnung von Antikörpern gegen den C-terminalen Bereich von PS1 wurden Kaninchen mit rekombinant exprimiertem PS1-"loop"-Protein (AS 263-407) immunisiert. Für die Gewinnung von Antikörpern gegen die N-terminale Region von PS1 wurden Kaninchen mit PS1-GST-Fusionsproteinen immunisiert. Die Immunisierungen erfolgten mit jeweils etwa 500 μ g aufgereinigtem Antigen im Abstand von 3-4 Wochen.

Antiserum	gerichtet gegen	Antigen
29414	PS1-CTF	PS1 AS263-407 (PS1-,,loop"), denaturiert
29498	PS1-CTF	PS1 AS263-407 (PS1-,,loop"), denaturiert
128	PS1-NTF	PS1 AS2-81 (PS1-N-Terminus bis TMD1), nativ
129	PS1-NTF	PS1 AS2-81 (PS1-N-Terminus bis TMD1), denaturiert
130	PS1-NTF	PS1 AS2-132 (PS1-N-Terminus bis TMD2), nativ
131	PS1-NTF	PS1 AS2-132 (PS1-N-Terminus bis TMD2), denaturiert

3.3.2 Charakterisierung polyklonaler Antiseren gegen den C-terminalen Bereich von PS1

Die hergestellten polyklonalen Antiseren gegen den C-terminalen Bereich von PS1 wurden mittels Immunpräzipitation der mit ³⁵S-Methionin metabolisch markierten Proteine und mit "Western-Blot" Analyse charakterisiert. Für diese Analysen wurden sowohl stabil PS1 exprimierende SH-SY5Y Zellen als auch Wildtyp SH-SY5Y und Wildtyp MDCK Zellen verwendet.



Abb. 3.8 Immunpräzipitation von PS1 aus Zelllysat von ³⁵S-Methionin-markierten SH-SY5Y-Zellen mit polyklonalen Antiseren 29498, 29414 und 95/23 Spur 1: IP mit pAk 29498 gegen PS1-loop; Spur 2: IP mit pAk 29414 gegen PS1-loop; Spur 3 und 4: IP mit pAk 95/23 gegen PS1-N-Terminus

In den ersten drei Spuren wurde für die Immunpräzipitation Lysat von PS1-transfizierten SH-SY5Y-Zellen verwendet, in Spur 4 Lysat von SH-SY5Y-wt Zellen. Beim Vergleich der Immunpräzipitate von Spur 3 und 4 läßt sich deutlich der Unterschied in der Menge an vorhandenem PS1 Protein feststellen. Aus dem Lysat der Wildtyp-Zellen wird praktisch kein Volllängen-PS1 immunpräzipitiert. Die entsprechende Bande bei etwa 46 kDa ist in Spur 4 nicht zu erkennen. Auch beim Vergleich der Menge an N-terminalem Fragment, was der Bande bei 28 kDa entspricht, wird in den Wildtyp-Zellen erheblich weniger Protein immunpräzipitiert.

Die beiden gegen den PS1-loop gerichteten polyklonalen Antiseren 29498 und 29414 immunpräzipitieren Volllängen-PS1 als auch C-terminales PS1-Fragment. Die dem Volllängenprotein entsprechende Bande verläuft bei etwa 46 kDa, also oberhalb der in allen Proben und Vorinkubationen mit Präimmunserum enthaltenen unspezifischen Bande bei 43 kDa (angezeigt durch *). Die Banden mit dem Präzipitat an C-terminalem Fragment sind schwach ausgeprägt und laufen bei etwa 18 kDa. Dabei ist in der IP mit Ak 29414 die Bande etwas stärker als mit 29498. Deutlichere Signale werden in weiteren IPs erhalten (vgl. Abb. 3.7).



Abb. 3.9 "Western Blot" Detektion von PS1 mit polyklonalen PS1-Antiseren 29498, 29414 und C6 Spur 1 und 2: Detektion mit pAk 29498; Spur 3 und 4: Detektion mit pAk 29414; Spur 5 und 6: Detektion mit pAk C6; Spur 7 und 8: Detektion mit pAk 29498; Zelllysat von SH-SY5Ywt-Zellen (Spur 1, 3, 5, 7); Zelllysat von PS1-transfizierten SH-SY5Y-Zellen (Spur 2, 4, 6, 8)

Teil A der Abbildung zeigt im Vergleich die Detektion von Volllängenprotein und PS1-Cterminalem Fragment mit den in dieser Arbeit hergestellten polyklonalen Antiseren 29498 und 29414. Nur bei Verwendung der Lysate von PS1-transfizierten SH-SY5Y Zellen wird PS1-Volllängenprotein markiert. Die bei 46 kDa laufende Bande wird von allen verwendeten Antikörpern detektiert (Spur 2, 4, 6, 8). Auch PS1-CTF wird bei Lysaten von transfizierten Zellen von allen Antikörpern deutlich markiert. Weitaus geringer ist die in Wildtyp SH-SY5Y Zellen vorhandene Menge an PS1-CTF, was zu schwächeren Banden im Bereich von 18 kDa führt (Spur 1, 3, 5, 7). Im Teil B der Abbildung ist der direkte Vergleich der Detektion mit dem in dieser Arbeit hergestellten Ak 29498 und einem bereits beschriebenen, von einer anderen Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellten C-terminalen PS1-Antikörper C6, der gegen die Reste 344-358 von PS1 und somit das CTF gerichtet ist, dargestellt. Der pAk 29498 detektiert gleichermaßen einwandfrei die entsprechenden Banden und liefert im Vergleich zu pAk 29414 in der "Western Blot" Analyse die besseren Ergebnisse.



Abb. 3.10 Immunpräzipitation mit nachfolgender "Western Blot" Detektion von PS1-CTF aus MDCKwt- und SH-SY5Y-Zelllysaten Spur1: Lysat von MDCKwt-Zellen; Spur 2: Lysat von SH-SY5Y-SPA4CT-Zellen; IP mit pAk 29414; "Western Blot" Detektion mit pAk 29498

Bei der IP mit den Zelllysaten von MDCKwt- und SH-SY5Y-Zellen wurden unterschiedliche Mengen eingesetzt, so dass die unterschiedlich starken Signale bei der Detektion keinen direkten Rückschluß auf die in den Zellen vorhandene Menge von PS1-CTF zulassen. In beiden Proben wird PS1-CTF von pAk 29414 immunpräzipitiert und nachfolgend von pAk 29498 detektiert. Die Bande verläuft etwas oberhalb der Markerproteinbande bei 18 kDa. Die Funktionalität der selbst hergestellten Antikörper 29498 und 29414 gegen PS1 in Immunpräzipitation und "Western Blot" Analyse ist unter den hier angestellten Versuchsbedingungen gegeben und PS1-CTF wird immunpräzipitiert sowie detektiert.

3.3.3 Charakterisierung polyklonaler Antiseren gegen den N-terminalen Bereich von PS1

Wie weiter oben beschrieben, wurden vier weitere Kaninchen mit GST-PS1-Fusionsproteinen immunisiert. Die so gewonnenen gegen den N-terminalen Bereich von PS1 gerichteten Antikörper 128 bis 131 wurden mit Hilfe von Immunpräzipitation und "Western Blot" Analyse überprüft und mit weiteren Antiseren verglichen.



Abb. 3.11 Immunpräzipitation von PS1 aus Zelllysaten von ³⁵S-Methionin-markierten PS1transfizierten SH-SY5Y-Zellen mit polyklonalen PS1-Antiseren 95/23, 29414, 128, 129, 130 und 131 Die Zellen wurden für 4 h mit 300 μ Ci ³⁵S-Methionin markiert und PS1 mit den angezeigten Antiseren aus den Zelllysaten immunpräzipitiert. Spur 1 bis 6: Präzipitate der Vorinkubation mit Präimmunseren der jeweiligen Antikörper; Spur 7 bis 12: Immunpräzipitation nach Vorinkubation

Um die Antiseren bezüglich der Erkennung/Präzipitation von Volllängen-PS1 und PS1-Fragmenten zu analysieren, wurden Lysate von stabil mit PS1 transfizierten SH-SY5Y Zellen verwendet. In der Vorinkubation der Zelllysate mit den Präimmunseren wird eine Bande mit etwa 40 kDa unspezifisch immunpräzipitiert und wenige weitere Banden im hochmolekularen Bereich. Alle in dieser Arbeit hergestellten gegen den N-Terminus von PS1 gerichteten Antikörper. präzipitieren das Volllängenprotein und PS1-NTF (Spur 9, 10, 11, 12). Dabei ist pAk 128 hervorzuheben, der fast keine unspezifischen Banden präzipitiert. Im direkten Vergleich zu dem bereits beschriebenen pAk 95/23 ist die Spezifität der in dieser Arbeit hergestellten Antikörper 128, 129, 130 und 131 von vergleichbarer Qualität. Spur 8 zeigt die Immunpräzipitation mit dem gegen den PS1-loop gerichteten pAk 29414, der das Volllängenprotein und PS1-CTF mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 18 kDa präzipitiert.



Abb. 3.12 Immunpräzipitation von PS1 aus Zelllysat von ³⁵S-Methionin-markierten PS1transfizierten SH-SY5Y-Zellen mit 95/23 und aufgereinigten PS1-Antiseren 29498, 29414, 128, 129, 130 und 131 Spur 1, 2: pAk 29498 und 29414 aufgereinigt mittels Protein A-Sepharose Affinitätschromatographie; Spur 3, 4, 5, 6: pAk 128, 129, 130 und 131 aufgereinigt mittels GST-Sepharose; Spuren 8 bis 14: Vorinkubation mit den jeweiligen Präimmunseren

Die gegen den PS1-loop gerichteten polyklonalen Antiseren 29498 und 29414 wurden über Protein A-Sepharose Affinitätschromatographie aufgereinigt und präzipitieren spezifisch Volllängenprotein bei etwa 46 kDa und PS1-CTF bei etwa 21 kDa wie der Vergleich zur Vorpräzipitation mit Präimmunserum zeigt (Spur 1, 2, 8, 9). Die gegen den N-terminalen PS1-Bereich gerichteten Antikörper wurden durch Immunisierung mit GST-PS1-Fusionsproteinen hergestellt. Um unerwünschte Antikörper zu entfernen, wurden die Seren mit GST-Sepharose inkubiert, um die ebenfalls vorhandenen gegen GST gerichteten Antikörper an die Matrix zu binden. Diese Prozedur hat im Ergebnis jedoch nicht die Spezifität der Antikörper erhöht, was der Vergleich mit pAk 95/23 (Spur 7) und mit den IPs in Abb. 3.11 zeigt. Die erhöhte Intensität unspezifisch präzipitierter Banden auch bei der Voripräzipitation mit Präimmunseren läßt sich weiterhin mit der Verwendung von Lysaten erklären, die aus Zellen in anderen Passagen hergestellt wurden, mit einer anderen Zelldichte oder Unterschieden in der metabolischen Markierung.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass die in dieser Arbeit hergestellten Antiseren PS1-FL und PS1-Fragmente aus metabolisch markierten Zellen spezifisch präzipitieren. Eine weitergehende Aufreinigung der Antiseren brachte keine Verbesserung bezüglich der Präzipitation unspezifischer Banden und wurde deshalb für weiterführende Experimente nicht mehr durchgeführt.



Abb 3.13 "Western Blot" Detektion von PS1 aus Lysaten PS1-transfizierter SH-SY5Y- und MDCKwt-Zellen mit pAk 95/23, 128 und 131 Spur 1, 3, 5: Lysat von PS1-transfizierten SH-SY5Y-Zellen; Spur 2,4,6: Lysat von MDCKwt-Zellen

Die gegen N-terminale PS1-Bereiche gerichteten pAk 128 und 131 (sowie 129 und 130, nicht gezeigt) zeigen nur schwache Immunreaktivität gegenüber PS1 bei der Verwendung in der "Western Blot" Analyse. Es werden nur schwache Banden im Bereich des PS1-NTF bei etwa 28

kDa markiert, wobei auch die von pAk 95/23 detektierten Banden schwach ausgeprägt sind. Im Bereich des Volllängenproteins bei etwa 46 kDa ist das Signal von pAk 131 verglichen mit den beiden anderen verwendeten Antikörpern am stärksten. Im Ergebnis läßt sich feststellen, dass die selbst hergestellten und gegen den N-terminalen PS1-Bereich gerichteten polyklonalen Antiseren in der "Western Blot" Analyse nicht die gewünschte Qualität zeigen, in der Immunpräzipitation allerdings sehr gute Ergebnisse liefern.

3.4 Interaktion von PS1 und β-Catenin

3.4.1 Koimmunpräzipitation von PS1-Fragmenten und β-Catenin

Seitdem bekannt ist, dass PS1 und β -Catenin Interaktionspartner sind (162), wird diskutiert, welche Effekte diese Interaktion auch hinsichtlich der Bildung von A β haben könnte. Um zunächst diese Interaktion zu verifizieren, wurden Lysate von SH-SY5Y-Zellen sowie MDCK-Zellen für die Immunpräzipitation mit nachfolgendem "Western Blot" verwendet. Der Versuch wurde mindestens dreimal durchgeführt, wobei die Koimmunpräzipitation sowohl mit CHAPSO-Lysispuffer als auch mit Digitonin-Lysispuffer erfolgreich war und zu gleichen Ergebnissen führte. Diese Detergenzien wurden gewählt, um eine milde Solubilisierung der Zellen durchzuführen und bei der Lyse die Proteinkomplexe nicht zu zerstören. Die in den Abbildungen 3.14 und 3.15 gezeigten Immunpräzipitationen wurden mit 1 % Digitonin-Lysispuffer durchgeführt. Verwendet wurden Lysate von SH-SY5Y-Zellen und von MDCK-Zellen (beide mit dem γ -Sekretase Substrat SPA4CT transfiziert), wobei die Transfektion der Zellen hier nicht von Relevanz ist (nähere Angaben siehe Kap. 5.9).

Jenachdem welche Interaktion gezeigt werden sollte, wurden die Antikörper für die Immunfällung bzw. für die nachfolgende "Western Blot" Detektion entsprechend ausgewählt:

- → Immunfällung mit Ak gegen PS1 und Detektion mit Ak gegen β-Catenin zum Nachweis der PS1/β-Catenin-Interaktion
- → Immunfällung mit Ak gegen β-Catenin und Detektion mit Ak gegen PS1 zum Nachweis der PS1/β-Catenin-Interaktion
- → Immunfällung mit Ak gegen PS1 und Detektion mit Ak gegen PS1 zum Nachweis der PS1-NTF/CTF-Interaktion



Abb. 3.14 Immunpräzipitation von PS1 und β -Catenin aus Zellysat von SPA4CTtransfizierten SH-SY5Y-Zellen mit nachfolgendem "Western Blot" mit verschiedenen Antikörpern gegen PS1 und β -Catenin Zellaufschluß mit Digitonin-Lysispuffer, Spur 1: 100 µg Lysat direkt aufs Gel aufgetragen; Spur 2-5: gleiche Mengen an Lysat wurden für die IPs verwendet; anschließende "Western-Blot" Detektion mit den links angegebenen Antiseren; Spur 6-9 Vorinkubation der Lysate mit Protein G-Sepharose allein (Spur 6) bzw. Protein A-Sepharose und den angegebenen Präimmunseren (Spur 7-9)

Detektion mit dem mAk gegen β-Catenin:

In der "Western Blot" Detektion mit diesem Antikörper wird β -Catenin detektiert, das im direkt aufgetragenen Lysat enthalten ist (Spur 1). In Spur 2 wird eine starke β -Catenin Bande detektiert, die in der vorangegangenen IP mit dem gleichen gegen β -Catenin gerichteten Antikörper präzipitiert wurde. Das gegen den N-terminus von PS1 gerichtete polyklonale Antiserum 95/23 hat in der vorangegangenen IP PS1 und β -Catenin kopräzipitiert, so dass im "Western Blot" das kopräzipitierte β -Catenin detektiert wird. In den Spuren 4 und 5 wird erst nach längerem Exponieren eine β -Catenin Bande erkennbar (nicht gezeigt), was auf eine geringere Menge an kopräzipitiertem β -Catenin bei der IP mit den polyklonalen Antiseren 128 (gegen PS1-NTF) und 29414 (gegen PS1-CTF) schließen läßt. In der Vorinkubation (Spur 6-9) wird von der Protein G-Sepharose und der Protein A-Sepharose mit den jeweiligen Präimmunseren kein β -Catenin (ko-) präzipitiert. Folglich wird im "Western Blot" keine spezifische Bande detektiert.

Detektion mit dem polyklonalen Antiserum 95/23 gegen PS1 N-Terminus:

Im direkt aufgetragenen Lysat (Spur 1) wird eine schwache Bande des PS1 N-terminalen Fragments detektiert, das oberhalb der 28 kDa Markerbande läuft. Eine ebenfalls schwache Bande findet sich in Spur 2, wobei hier eine Immunpräzipitation mit mAk gegen β -Catenin vorangegangen ist. Bei der unterhalb der PS1-NTF verlaufenden Bande könnte es sich um Protein G handeln (Spur 2, angezeigt durch Pfeilkopf), das mit dem im "Western Blot" eingesetzten Sekundärantikörper reagiert und zum Signal führt. Auch in der Vorinkubation mit Protein G-Sepharose allein (Spur 6) ist dieses Signal wiederzufinden. Bei genauerem Hinsehen läßt sich allerdings auch eine schwache PS1-NTF Bande in der Vorinkubation erkennen, was darauf schließen läßt, dass Protein G-Sepharose allein PS1-NTF präzipitiert, auch ohne Gegenwart des à β-Catenin-Antikörpers. Also handelt es sich bei dem detektierten PS1-NTF nicht um PS1-Fragmente, die mit dem β -Catenin kopräzipitiert wurden, sondern die Proteine assoziieren unspezifisch mit Protein G-Sepharose. In den Spuren 3 und 4 werden starke PS1-NTF Signale erzeugt, sodass die in der vorangegangenen IP verwendeten polyklonalen Antiseren gegen PS1-NTF, 95/23 und 128, deutliche Mengen an PS1-NTF präzipitiert haben, die im "Western Blot" mit dem pAk 95/23 detektiert werden. In Spur 5 ist im Bereich des PS1-NTF ein schwaches Signal zu erkennen, das auf eine geringe Menge an N-terminalem Fragment schließen läßt, die mit dem in der vorherigen IP präzipitierten C-terminalen Fragment kopräzipitiert wurde. Die Vorinkubation der Lysate in Gegenwart von Protein A-Sepharose und den jeweiligen Präimmunseren der in der IP verwendeten Antikörper führt zu keinen Signalen, was die Spezifität der verwendeten Antikörper unterstreicht.

Detektion mit dem polyklonalen Antiserum 29498 gegen PS1 C-Terminus:

In der gezeigten Abbildung ist ein entsprechendes Signal in Spur 5 zu erkennen, das auf das in der vorangegangenen IP mit dem gegen PS1-CTF gerichteten Antikörper 29414 präzipitierten PS1-CTF zurückzuführen ist. Bei längerem Exponieren wird das C-terminale Fragment auch im direkt aufgetragenen Lysat detektiert sowie in der IP mit 95/23 kopräzipitiertes PS1-CTF (nicht gezeigt). Die IP mit à β -Catenin Antikörper führt auch nach längerem Exponieren des Films nicht zu einem Signal, so dass bei dieser Versuchsanordnung kein PS1-CTF mit dem β -Catenin kopräzipitiert wird oder aber, was die wahrscheinlichere Erklärung ist, die Menge zu gering ist, um hier detektiert zu werden. In den Vorinkubationen wird kein PS1-CTF detektiert.



Abb. 3.15 Immunpräzipitation von PS1 und β -Catenin aus Zellysat von SPA4CTtransfizierten MDCK-Zellen mit nachfolgendem "Western Blot" mit verschiedenen Antikörpern gegen PS1 und β -Catenin Zellaufschluß mit Digitonin-Lysispuffer, Spur 1: 100 µg Lysat direkt aufs Gel aufgetragen; Spur 2-5: gleiche Mengen an Lysat wurden für die IPs verwendet; anschließende "Western-Blot" Detektion mit den links angegebenen Antiseren; Spur 6-9 Vorinkubation der Lysate mit Protein G-Sepharose allein (Spur 6) bzw. Protein A-Sepharose und den angegebenen Präimmunseren (Spur 7-9)

Detektion mit dem mAk gegen β -Catenin:

In der direkt auf das Gel aufgetragenen Lysatprobe (Spur 1) wird eine deutliche β -Catenin Bande im Bereich von 100-120 kDa detektiert. Bei vorangegangener IP gegen β -Catenin wird ebenfalls eine Bande mit starker Intensität detektiert und es sind weitere Banden unterhalb dieses Molekulargewichtsbereichs vorhanden (Spur 2). In den Spuren 3-5 erfolgte die vorangegangene IP mit gegen PS1 gerichteten Antikörpern, sodass es sich bei den hier vorhandenen Signalen um mit PS1 kopräzipitiertes β -Catenin handelt. Im Vergleich ist das β -Catenin Signal dabei am stärksten bei vorangegangener IP mit pAk 95/23 gegen PS1-NTF relativ zur IP mit dem gegen den gleichen Bereich gerichteten pAk 128 bzw. dem gegen PS1-CTF gerichteten pAk 29414. Die Vorinkubationen mit Protein G-Sepharose bzw. Protein A-Sepharose und den jeweiligen Präimmunseren zeigen extrem schwache Banden im entsprechenden Molekulargewichtsbereich, was auf geringe unspezifische Immunreaktivität hinweisen könnte.

Detektion mit dem polyklonalen Antiserum 95/23 gegen PS1 N-Terminus:

In Spur 1 wird erst nach längerem Exponieren eine deutliche PS1-NTF Bande sichtbar, was auf eine geringe Menge des Proteins im Lysat oder eine geringe Menge an präzipitiertem und letztlich

detektiertem PS1-NTF schließen läßt. Bei vorangegangener IP mit à β-Catenin Antikörper wird das gleiche Ergebnis erhalten wie bei dem Lysat mit SH-SY5Y-Zellen. Die in der IP und Vorinkubation eingesetzte Protein G-Sepharose allein führt bereits zur Präzipitation des N-terminalen Fragments, sodass schwache Signale im Bereich von 28 kDa detektiert werden. Bei der darunter verlaufenden, stärkeren Bande handelt es sich vermutlich um Protein G (Spur 2, 6, angezeigt durch Pfeilkopf). Bei den IPs mit Antikörpern gegen das N-terminale Fragment (Spur 3, 4) werden im nachfolgenden "Western Blot" deutliche PS1-NTF Banden detektiert. Die IP mit dem Antiserum gegen PS1-CTF kopräzipitiert das N-terminale Fragment, welches als schwache Bande sichtbar ist. In den Vorinkubationen mit den Präimmunseren der verwendeten polyklonalen Antikörper werden keine Banden angefärbt.

Detektion mit dem polyklonalen Antiserum 29498 gegen PS1 C-Terminus:

PS1 C-terminales Fragment ist detektierbar bei vorangegangener IP mit pAk 29414 gegen PS1-CTF, wobei eine starke Bande bei 18 kDa und eine weitere Bande oberhalb detektiert werden (Spur 5). Das C-terminale Fragment wird kopräzipitiert in den IPs mit gegen PS1-NTF gerichteten Antikörpern (Spur 3, 4), wobei deutliche Banden im "Western Blot" erst nach längerem Exponieren gut sichtbar werden. Auch im direkt aufgetragenen Lysat wird erst bei längerem Auflegen des Films eine PS1-CTF Bande detektiert. Die IP mit gegen β -Catenin gerichteten Antikörpern führt nicht zu einem Signal, was auf zu geringe Mengen an kopräzipitiertem C-terminalen Fragment zurückgeführt werden könnte. In den Vorinkubationen wird kein PS1-CTF detektiert.

3.4.2 Subzelluläre Lokalisation von PS1 und β-Catenin in MDCK, SH-SY5Y-Zellen und primären Neuronen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Mittels Immunfluoreszenzanfärbung wurde die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin und PS1 überprüft. Verwendet wurden SH-SY5Y-Zellen sowie MDCK-Zellen und primäre hippokampale Neuronen. In den hier gezeigten Abbildungen erfolgte die Anfärbung von PS1 mit den in dieser Arbeit hergestellten Antiseren, deren Funktionalität in dieser Methode gezeigt werden konnte. Die Durchführung der Immunfluoreszenzanfärbung ist im Methodenteil ausführlich beschrieben (Kapitel 6.4). Der primäre Antikörper wurde jeweils in einer 1:100 oder 1:200 Verdünnung eingesetzt, der sekündäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:250.



Abb. 3.16 Subzelluläre Lokalisation von PS1 in SH-SY5Y Zellen Wildtyp SH-SY5Y Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und angefärbt mit dem pAk 128 gegen PS1-NTF (a und b) und mit dem pAk 29414 gegen PS1-CTF (c) bzw. nur mit dem sekundären Antikörper gegen Kaninchen (d)



Abb. 3.17 Subzelluläre Lokalisation von β -Catenin und PSI in MDCK Zellen Wildtyp MDCK Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und angefärbt mit mAb gegen β -Catenin (a und b) bzw. dem pAk 29414 gegen PS1-CTF (c) und dem pAk 128 gegen PS1-NTF (d). Zur Kontrolle Anfärbung der Zellen nur mit sekundärem Antikörper gegen Maus (e) bzw. gegen Kaninchen (f)



Abb. 3.18 Subzelluläre Lokalisation von PS1 in primären, hippokampalen Neuronen Die Zellen wurden gewonnen (embryonic day 13) und etwa 10 Tage in mit sterilen Deckgläschen ausgelegten Zellkulturschalen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und angefärbt mit pAk 29414 gegen PS1-CTF (a und b) bzw. mit sekundärem Antikörper gegen Kaninchen (c) Die subzelluläre Lokalisation von endogenem PS1 in SH-SY5Y Zellen (Abb. 3.16) erstreckt sich hauptsächlich auf die frühen Kompartimente des biosynthetischen "pathway", dem ER und Golgi-Kompartiment und bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (86,124,125). Diese Lokalisation von PS1 überlappt teilweise mit den intrazellulären Entstehungsorten von A β 42, zu denen das ER gehört (128-130) und unterstützt die postulierte Funktion von PS1 als γ -Sekretase. Dabei ist eine deutliche Kolokalisation von N- und C-terminalem PS1-Fragment festzustellen. Sowohl der gegen PS1-NTF gerichtete Antikörper 128 als auch der gegen PS1-CTF gerichtete Antikörper 29414 färben die gleichen subzellulären Bereiche an und unterstützen die Annahme, dass die beiden Fragmente miteinander assoziiert vorliegen und die biologisch aktive funktionelle Einheit darstellen. Eine PS1-Lokalisation ausschließlich in diesen subzellulären Regionen stand allerdings im Widerspruch zu weiteren nachgewiesenen PS1 Aktivitäten, wie der Prozessierung von Notch, die nahe der Plasmamembran stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass ein geringer Prozentsatz von PS1, möglicherweise 1-10 Prozent, an der Plasmamembran lokalisiert ist (135).

Bei den MDCK Zellen ist eine deutliche Anfärbung des β -Catenin an der Plasmamembran von konfluenten Zellen zu erkennen (Abb. 3.17). Die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin im Cytosol oder Zellkern ist dagegen eher schwach. Die Anfärbung von PS1 in diesen Zellen zeigt eine ähnliche Verteilung wie auch bei den SH-SY5Y Zellen, vorwiegend im ER/Golgi Bereich. Dennoch konnte die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen biochemisch nachgewiesen werden, so dass davon auszugehen ist, dass die PS1 Menge an der Plasmamembran zu gering und die Intensität des Signals zu schwach ist, um die Lokalisation von PS1 an der Plasmamembran mit dieser Methode darstellen zu können. Mit anderen Methoden wie der Immunoelektronenmikroskopie konnte die Gegenwart von PS1 an der Plasmamembran gezeigt werden (182).

Weiterhin konnte eine Anreicherung von PS1-Fragmenten in Membranen von synaptischen Vesikeln und Wachstumskegeln biochemisch gezeigt werden (126,127). Dieses Ergebnis zeigt auch die subzelluläre Lokalisation von PS1 in primären, hippokampalen Neuronen (Abb. 3.18). In diesen Zellen ist eine Lokalisation in ER/Golgi in den Zellkörpern zu beobachten, aber auch in den späteren Kompartimenten. Insbesondere bei der punktierten Anfärbung in den Zellausläufern der Neuronen könnte es sich um synaptische Strukturen handeln, was die biochemisch erhaltenen Ergebnisse unterstützen würde.

3.5 Pharmakologische Modulation von intrazellulärem β-Catenin mit Hilfe von Lithiumchlorid und deren Auswirkung auf die Sekretion von Aβ Peptid in MDCK Zellen

Ein wichtiges Enzym im Wnt-Signaltransduktionsweg ist die Glutathion-Synthase Kinase 3 β (GSK3 β). Diese Serin/Threonin-Kinase phosphoryliert u.a. β -Catenin und markiert es für den proteasomalen Abbau, wenn der Signaltransduktionsweg "ausgeschaltet" ist (169,170). Das "Anschalten" dieser Signalübertragungskette bewirkt die Inhibition der GSK3 β , so dass β -Catenin sich im Cytosol anreichert und in Folge dieser Anreicherung in den Zellkern transloziert, wo es durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren schließlich zur Aktivierung von Wnt-Zielgenen führt. Die Behandlung von Zellen mit Lithiumchlorid ist eine elegante Möglichkeit, einen "angeschalteten Wnt-pathway" nachzuahmen, da Lithium die GSK3 β inhibiert und so zu einer Anreicherung der β -Catenin Menge im Cytosol und im Zellkern führt.

Weiterhin ist PS1 ein Interaktionspartner von GSK3 β . Wenngleich kürzlich publiziert wurde, dass der regulierende Einfluss von PS1 auf β -Catenin unabhängig von der Phosphorylierung des PS1 durch GSK3 β zu sein scheint (183), so ist dennoch zu untersuchen, ob eine Beeinflussung der GSK3 β -Aktivität Auswirkungen auf die Sekretaseaktivität von PS1 und auf die Produktion und Sekretion von A β haben könnte. Bei nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, welche Effekte eine LiCl-Behandlung der Zellen, also die Inhibition der GSK3 β und damit einhergehende Anreicherung von β -Catenin in der Zelle insbesondere auf die Produktion und Sekretion von A β haben könnte.



Abb. 3.19 "Western Blot" Detektion von β -Catenin aus S100-Fraktion und Kernextrakten von MDCKwt- und HEK293wt-Zellen mit bzw. ohne Lithium-Behandlung Spur 1-4: β -Catenin aus S100-Fraktion (100.000g Überstand) von MDCKwt-Lysaten nach 3 stündiger Inkubation der Zellen in Gegenwart von 20 mM LiCl (Spur 2) bzw. Kontrolle (Spur 1); analog HEK293wt-Lysate (Spur 4, 3); Spur 5-8: β -Catenin Detektion aus Kernextrakten von MDCKwt-Zellen nach 3 stündiger Inkubation der Zellen in Gegenwart von 20 mM LiCl (Spur 5) und aus Kernextrakten von HEKwt-Zellen mit LiCl-Behandlung (Spur 8) bzw. Kontrolle (Spur 7); es wurden jeweils 50 µg-Aliquots jeder Fraktion aufgetragen

Das Ergebnis zeigt (Auftrag normierter Gesamtproteinmengen; 50 µg pro Spur), dass die β -Catenin Menge in den jeweiligen Fraktionen der zuvor mit LiCl behandelten Zellen erhöht ist. Die S100-Fraktion entspricht dem 100.000g Überstand und gibt Aufschluß über die cytosolische β -Catenin Menge. Sowohl bei den MDCKwt-Zellen als auch bei den HEK293wt-Zellen führt die Behandlung der Zellen mit LiCl zu einer Anreicherung des cytosolischen β -Catenins. Auch in den Kernextrakten, die aus den Lysaten der jeweiligen Zellen hergestellt wurden, ist die Menge an β -Catenin erhöht bei den mit LiCl behandelten Zellen im Gegensatz zur Kontrolle. Dieser Effekt scheint bei den HEK293wt Zellen deutlicher zu sein als bei den MDCKwt Zellen. Allerdings läßt diese Versuchsanordnung keine Rückschlüsse zu, ob die Inhibition der GSK3 β durch Lithium allein zur Anreicherung des β -Catenins geführt hat, oder ob andere Effekte d.h. Effekte des Lithiums auf andere Proteine direkt oder indirekt zur β -Catenin Anreicherung geführt haben könnten.

3.5.1 Effekt von Lithium Behandlung auf die β -Catenin Menge in der cytosolischen Fraktion und im Kernextrakt von MDCK Zellen

Es sollte festgestellt werden, ob die β -Catenin-Menge innerhalb der Zelle auch durch eine Langzeit-Lithium-Behandlung erhöht wird und somit die in Abb. 3.16 gezeigten Ergebnisse einer kurzzeitigen LiCl-Behandlung bestätigt werden können. Dazu wurden die Zellen verwendet, deren konditioniertes Medium für die Bestimmung der A β -Menge herangezogen wurde.



Abb. 3.20 "Western Blot" Detektion von β -Catenin aus S100-Fraktion und Kernextrakten von MDCK-B5 Zellen mit bzw. ohne Lithium-Behandlung obere Reihe: S100-Fraktionen; untere Reihe: Kernextrakte; β -Catenin nach 1 Tag Inkubation der Zellen in Gegenwart von 50 mM LiCl (Spur 1) bzw. Kontrolle (Spur 2); β -Catenin nach 2 Tagen Inkubation der Zellen in Gegenwart von 50 mM LiCl (Spur 3) bzw. Kontrolle (Spur 4); β -Catenin nach 3 Tagen Inkubation der Zellen in Gegenwart von 50 mM LiCl (Spur 5) pg-Aliquots jeder Fraktion aufgetragen

Das Ergebnis zeigt, dass die β -Catenin Menge im Vergleich zur Kontrolle bei den unterschiedlich lange in Gegenwart von 50 mM LiCl kultivierten Zellen sowohl im Cytosol als auch in der Kernfraktion erhöht ist. Bei den Zellen, die 3 Tage der Gegenwart von LiCl ausgesetzt waren, läßt sich weiterhin feststellen, dass die β -Catenin Menge größer ist, je höher die Lithiumkonzentration im Medium war: 50 mM > 20 mM > Kontrolle. Die Behandlung der Zellen mit LiCl führt zu einer β -Catenin Anreicherung im Cytosol als auch im Kern der MDCK Zellen.

3.5.2 Effekt von Lithium Behandlung auf die A β Menge konditionierten Medium von MDCK Zelllinien

Um den Effekt der Lithium Behandlung auf die Sekretion von A β zu untersuchen, wurden Aliquots der konditionierten Medien entsprechend behandelter Zellen mit monoklonalem Antikörper W0-2 gegen A β immunpräzipitiert, das Immunpräzipitat auf ein SDS-Gel aufgetragen und im nachfolgenden "Western Blot" das A β detektiert. Um die Detektion von A β sicherzustellen, wurde mit drei MDCK-Zellinien gearbeitet: MDCK wt, MDCK B5 (mit A4CT stabil transfiziert) und MDCK A613 (mit APP695 stabil transfiziert), die freundlicherweise von Dr. Tobias Hartmann zur Verfügung gestellt wurden.



Abb. 3.21 "Western Blot" Detektion von A β aus konditioniertem Medium von MDCKwt, MDCK B5 und MDCK A613-Zellen nach Behandlung mit Lithium A β -Detektion im konditionierten Medium von stabil mit A4CT transfizierten MDCK-Zellen nach 1 Tag in Gegenwart von 50 mM LiCl (Spur 2); nach 2 Tagen in Gegenwart von 50 mM LiCl (Spur 5); nach 3 Tagen in Gegenwart von 50 mM LiCl (Spur 8); nach 3 Tagen in Gegenwart von 20 mM LiCl (Spur 11) und nach 3 Tagen ohne LiCl (Spur 14)

Das Ergebnis zeigt, dass nur bei den mit A4CT stabil transfizierten Zellen A β im konditionierten Medium detektiert werden kann. Dabei ist die Menge an A β in den konditionierten Medien der

mit LiCl behandelten Zellen deutlich erhöht. Die Anreicherung ist abhängig sowohl von der Dauer der Inkubation als auch der eingesetzten LiCl-Konzentration. Je höher die LiCl-Konzentration und je länger die Dauer der Behandlung sind, umso größer ist die detektierte A β -Menge im konditionierten Medium.

In MDCK wt Zellen sowie den stabil mit APP695 transfizierten MDCK-Zellen ist die A β -Menge im Medium zu gering, um hier nachgewiesen zu werden. Weiterhin zeigt die Abbildung, dass die Menge an freigesetztem APP, das vom monoklonalen Antikörper W02 ebenfalls immunpräzipitiert und detektiert wird, insgesamt in den konditionierten Medien der mit LiCl behandelten Zellen (Spur 1-9) höher ist als in denen der mit niedriger LiCl-Konzentration behandelten Zellen und den Kontrollen (Spur10-15). Im Bereich von etwa 23 kDa wird eine Bande in allen Proben unspezifisch markiert (angezeigt durch *) Im Ergebnis läßt sich sagen, dass die Behandlung der mit A4CT stabil transfizierten MDCK-Zellen mit LiCl zu einer erhöhten A β -Produktion und/oder Sekretion führt. In der gleichen Weise wurden Zellen anstelle von LiCl mit VPA ("valproic acid") behandelt (0,6-5 mM für 1-3 Tage), wobei ebenfalls ein Anstieg an cytosolischem β -Catenin und A β im konditionierten Medium beobachtet wurde, der aber schwach war im Vergleich zur Lithiumchloridbehandlung (Daten nicht gezeigt).



Abb. 3.22 "Western Blot" Detektion von A β aus konditioniertem Medium von MDCK B5 Zellen nach Behandlung mit Lithium A β -Detektion im konditionierten Medium von stabil mit A4CT transfizierten MDCK-Zellen nach 1 Tag in Gegenwart von 50, 20, 0 mM LiCl (Spur 1-3); nach 2 Tagen in Gegenwart von 50, 20, 0 mM LiCl (Spur 4-6); nach 3 Tagen in Gegenwart von 50, 20, 0 mM LiCl (Spur 7-9)

Dieses Resultat bestätigt die in Abb. 3.20 gezeigten Ergebnisse. Je länger die Zellen in Gegenwart von LiCl kultiviert wurden und je höher die LiCl-Konzentration war, umso mehr A β wurde im konditionierten Medium detektiert. In weiteren "Western Blot" Detektionen wurde das Verhältnis von A β 1-40 und A β 1-42 überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass die Menge von beiden

Fragmenten im konditionierten Medium in Gegenwart von LiCl erhöht war in Abhängigkeit von der Konzentration und Inkubationszeit. Jedoch war die Menge an A β 1-42 im Vergleich zur detektierten Menge an A β 1-40 etwa um den Faktor 10 geringer (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung von PS1 in Wildtyp bzw. stabil mit PS1 transfizierten humanen Neuroblastomazellen und Rattenhirngewebe

Da zum Zeitpunkt der Analysen noch nicht bekannt war, unter welchen Bedingungen sich Volllängen-PS1-Protein und PS1-Fragmente nachweisen lassen, wurden mit "Western Blot" PS1-Proteine aus unterschiedlich behandelten Lysaten von SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen. Es wurden Lysate von PS1-transfizierten, Vektor-transfizierten und nicht transfizierten SH-SY5Y-Zellen verglichen. Da Polypeptide mit mehreren Transmembrandomänen zur Aggregation neigen, wurden die Proben entweder für 30 min bei 37°C oder für 5 min bei 100 °C inkubiert. Weiterhin wurde PS1 aus Rattenhirn detektiert. Bei der Durchführung dieser Versuche standen die polyklonalen Antiseren C6 gegen den hydrophilen PS1-"loop"- Bereich sowie 95/23 gegen den N-Terminus von PS1 zur Verfügung.

In PS1-transfizierten SH-SY5Y-Neuroblastomazellen wurde mit dem Antiserum C6 Polypeptide mit einem apparenten Molekulargewicht von ~43 bzw. ~18 kDa detektiert, die das Volllängenprotein bzw. das C-terminale Fragment repräsentieren. In Übereinstimmung mit den Daten anderer Arbeitsgruppen (112) konnte das 43 kDa-Volllängenprotein jedoch nur in PS1-transfizierten Zellen detektiert werden, während das 18 kDa-Fragment auch als endogenes Polypeptid bei den Vektor-transfizierten Zellen präsent war. Das PS1-Volllängenprotein bildete Aggregate, die im hochmolekularen Bereich sichtbar waren, sobald die Probe bei 100 °C inkubiert wurde. Im Gegensatz dazu blieb das 18 kDa-Fragment auch beim Kochen der Probe erhalten. Außerdem markierte das Antiserum C6 unspezifisch Proteinbanden im Bereich von 50 kDa, die nicht durch Kompetition mit dem entsprechenden Antigen verhindert werden konnten und gleichermaßen bei den Vektorkontrollen als auch den PS1-transfizierten Zellysaten auftraten (Abb. 3.1, Abb. 3.4).

Das gegen die N-terminale Region von PS1 gerichtete Antiserum 95/23 erkannte das N-terminale PS1-Fragment mit einem apparenten Molekulargewicht von 28 kDa in vektortransfizierten Kontrollzellen. Das entsprechende Volllängenprotein konnte von diesem Antiserum ausschließlich in PS1-transfizierten Zellen detektiert werden. Das im "loop"-Bereich nach der sechsten Transmembrandomäne von PS1 endende N-terminale Derivat und das Volllängenprotein aggregierten, wenn die Probe bei 100 °C inkubiert wurde. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Tendenz zur Aggregation auf das N-terminale PS1-Derivat sowie das Volllängenprotein

beschränkt waren, was zu erklären ist durch die vorhandenen sechs bzw. acht Transmembrandomänen (Abb. 3.2, Abb. 3.4).

Das Expressionsmuster in undifferenzierten SH-SY5Y- Neuroblastomazellen wurde mit der PS1-Expression in der schweren Membranfraktion von Rattenhirn Synaptosomen untersucht, um Anhaltspunkte über die PS1 Expression im Hirngewebe zu gewinnen (Abb. 3.3). Wie erwartet wurden die N- und C-terminalen PS1-Fragmente von den Antiseren detektiert, nicht aber PS1-Volllängenprotein. Das Antiserum C6 färbte unspezifische Proteinbanden im Bereich von 43 kDa an, die durch Präabsorption nicht zu verhindern waren. Das N-terminale Antiserum 95/23 erkannte das N-terminale PS1-Fragment bei einem Molekulargewicht von 29 kDa, währen das Cterminale Fragment vom Antiserum C6 bei etwa 20 kDa detektiert wurde. Das N-terminale Fragment aggregierte bei Hitzebehandlung, wie zuvor für das humane Homolog zu beobachten war. All diese immunreaktiven Banden konnten durch Präabsorption mit dem entsprechenenden zur Immunisierung verwendeten Peptid kompetitiert werden. Daher ist das apparente Molekulargewicht der beiden PS1-Fragmente im Rattenhirn etwas höher als das der humanen Derivate in den Zelllinien.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass sich PS1-Volllängenprotein nur in mit PS1 transfizierten Zellen detektieren läßt und beim Erhitzen der Probe auf 100 °C hochmolekulare Aggregate formt. Die PS1-Fragmente hingegen lassen sich in mit PS1 transfizierten Zellen, Vektor-transfizierten und Wildtyp Zellen sowie Rattenhirnhomogenat nachweisen. Das Erhitzen der Probe auf 100 °C führt beim N-terminalen Fragment zur Aggregation, das C-terminale Fragment bleibt erhalten. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die PS1-Fragmente *in vivo* als Komplex vorliegen und dies sehr wahrscheinlich die funktionelle Form darstellt. PS1 Volllängenprotein wird nur in mit PS1 transfizierten Zellen nachgewiesen. Die Endoproteolyse ist ein regulierter und limitierter Prozess. Die Menge an entstehenden PS1-Heterodimeren ist limitiert, sogar bei einer Überexpression des Holoproteins wird nur ein geringer Anteil zu stabilen Heterodimeren metabolisiert, der größte Teil des neu synthetisierten Proteins wird über das Proteasom abgebaut (112,184). Da die Expression von exogenem PS1 dazu führt, dass endogene PS1-Heterodimere von den entsprechenden exogenen Heterodimeren ersetzt werden, läßt sich vermuten, dass eine Kompetition um für die Stabilität und Endoproteolyse wichtige limitierte zelluläre Faktoren bestehen könnte (117).

4.2 Klonierung von rekombinanten PS1-Proteinen und GST-PS1-Fusionsproteinen

Die Klonierung des hydrophilen "loop"-Bereichs von PS1 in den pRSETB-Vektor sowie die nachfolgende Expression des rekombinantem PS1-"loop"-Proteins in E. coli BL21 Zellen und die Aufreinigung des Proteins waren erfolgreich. Das hergestellte Protein war in ausreichender Menge und Reinheit vorhanden, um für die Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung von Antikörpern eingesetzt werden zu können. Auch die Klonierung und Aufreinigung von GST-PS1-Fusionsproteinen führte zur Bereitstellung von hochreinem Antigen für entsprechende Immunisierungen. Die entsprechenden Bereiche des PS1-N-Terminus (AS2-81 bzw. AS2-132) wurden in den pGEX-5X-1 Vektor kloniert und in E. coli DH5a Zellen exprimiert. Diese Bereiche wurden als Antigene ausgewählt, da der N-Terminus von PS1 mit seinem cytosolisch lokalisierten Bereich aufgrund der hydrophilen Eigenschaften gut zugänglich ist und eine gute Immunreaktivität der Antikörper zu erwarten war. Die Aufreinigung der GST-PS1-Fusionsproteine war am effizientesten mit einer Kombination aus präparativer SDS-PAGE, Elektroelution und nachfolgender Gelfiltrationschromatographie zur Renaturierung und zum Pufferwechsel. Nach der Aufreinigung wurden die erhaltenen Fusionsproteine mittels "Western-Blot" Analyse sowie durch Coomassie-Anfärbung im SDS-Gel überprüft und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet.

4.3 Herstellung und Charakterisierung von polyklonalen Antiseren gegen PS1

Da die vorhandenen Antiseren gegen PS1 nur in begrenzter Menge vorhanden, nicht spezifisch oder nicht ausreichend spezifisch waren, mußten geeignete Antikörper gegen die Presenilin-Fragmente hergestellt werden um die geplanten Experimente ausführen zu können. Da vor allem gegen den C-terminalen Bereich von PS1 gerichtete Antikörper nicht in ausreichender Menge oder Spezifität vorhanden waren, stand die Herstellung von diesen Antiseren zunächst im Vordergrund. Als Antigen wurde die Region des hydrophilen "loop"-Bereichs von PS1 ausgewählt. Zum einen sollte diese hydrophile Domäne keine Probleme in Hinblick auf die Löslichkeit darstellen, zum anderen konnten bereits spezifische Antiseren von anderen Gruppen gegen diese Region hergestellt werden. Zur Herstellung von Antikörpern gegen den PS1 N-Terminus wurden die N-terminalen Bereiche bis zur ersten und bis zur zweiten Tranmembrandomäne ausgewählt (AS2-81 bzw. AS2-132). Die Immunisierungen der Kaninchen wurde durchgeführt wie in Kap. 6.2.7 beschrieben. Folgende polyklonale Antiseren wurden hergestellt:

Antiserum	gerichtet gegen	Antigen
29414	PS1-CTF	PS1 AS263-407 (PS1-"loop"), denaturiert
29498	PS1-CTF	PS1 AS263-407 (PS1-"loop"), denaturiert
128	PS1-NTF	PS1 AS2-81 (PS1-N-Terminus bis TMD1), nativ
129	PS1-NTF	PS1 AS2-81 (PS1-N-Terminus bis TMD21, denaturiert
130	PS1-NTF	PS1 AS2-132 (PS1-N-Terminus bis TMD2), nativ
131	PS1-NTF	PS1 AS2-132 (PS1-N-Terminus bis TMD2), denaturiert

Die gegen den hydrophilen PS1-"loop" gerichteten Antiseren 29414 und 29498 detektierten im "Western Blot" das PS1-C-terminale Fragment sowie PS1-Volllängenprotein bei einer Verdünnung von 1:2000 (Abb. 3.9). Dabei war das Ergebnis des Antikörpers 29498 deutlich besser als von 29414. Beide Antiseren zeigten eine spezifische Detektion von Volllängen-PS1 und PS1-CTF bei Verwendung von Lysaten PS1-transfizierter SH-SY5Y-Zellen. Bei der Verwendung von SH-SY5Ywt-Lysat wurde das C-terminale Fragment detektiert, aber kein Volllängenprotein, welches bei nicht PS1-transfizierten Zellen rasch degradiert wird und daher nur in sehr geringer Menge vorhanden ist. Bei einer Konzentration von 1:2000 zeigten die Antiseren sehr gute Ergebnisse und erzeugten keine Hintergrundfärbung durch unspezifische Immunreaktionen. Insbesondere das Antiserum 29498 wurde im Rahmen von Kooperationen auch anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt, deren Ergebnisse publiziert wurden (136).

Auch in der Immunpräzipitation zeigten die beiden Antiseren gute Ergebnisse (Abb. 3.8), wobei hier das Antiserum 29414 etwas bessere Signale erzeugte. Beide Antikörper immunpräzipitierten Volllängen-PS1 als auch C-terminales Fragment. Gerade bei der Präzipitation des CTF war der Antikörper 29414 deutlich besser. Bei gleichen Mengen an eingesetztem Lysat in der Immunfällung präzipitierte 29414 deutlich mehr Volllängen-PS1 und CTF während das unterhalb der Volllängen-PS1-Bande verlaufende, durch unspezifische Immunreaktivität hervorgerufene Signal schwächer war als bei 29498.

Die gegen den N-terminalen Bereich von PS1 gerichteten Antiseren mit der Bezeichnung 128 bis 131 eignen sich sehr gut in der Immunpräzipitation von PS1-NTF und Volllängen-PS1 (Abb. 3.11). In der "Western Blot" Detektion waren die Antikörper von unterschiedlicher Qualität (Abb. 3.12).

Zusammenfassend läßt sich feststellen: Die Charakterisierung der gegen den hydrophilen "loop"-Bereich von PS1 gerichteten Antiseren 29414 und 29498 hat gezeigt, dass das Antiserum 29414 besonders für die Immunpräzipitation geeignet ist, während vor allem das Antiserum 29498 sehr gut für die "Western-Blot" Detektion von Volllängen-PS1 sowie dem C-terminalen Fragment geeignet ist. Die gegen den N-terminalen Bereich von PS1 gerichteten Antikörper sind sowohl für "Western Blot" Detektion (vor allem Antikörper 128) als auch für die Immunpräzipitation einsetzbar.

4.4 Interaktion und subzelluläre Lokalisation von PS1 und β-Catenin

Da PS1 und β -Catenin als Interaktionspartner identifiziert wurden, sollte die Interaktion überprüft werden, insbesondere unter Verwendung der in dieser Arbeit hergestellten Antiseren. Es war vorgesehen, die Ko-Immunpräzipitation von PS1-Heterodimeren und β -Catenin aus Lysaten von neuronalen, aber auch nicht neuronalen Zellen durchzuführen. Aus diesem Grund wurden die Lysate von SH-SY5Y-Zellen sowie MDCK-Zellen verwendet, die durch milde Solubilisierung der Zellen mit Digitonin-Lysispuffer hergestellt wurden, um die Komplexe nicht zu zerstören. Für beide Zelltypen wurde das gleiche Ergebnis erhalten.

Es ist gelungen, eine Ko-Immunpräzipitation von β -Catenin und PS1-Fragmenten zu zeigen. Dabei zeigten die selbst hergestellten Antiseren 128 (gegen PS1-NTF) und 29414 (gegen PS1-CTF) eine geringere Effizienz als das als Referenz verwendete polyklonale Antiserum 95/23 (gegen PS1-NTF), und das kopräzipitierte β -Catenin konnte erst nach längerem Exponieren detektiert werden. Deutlich stärker war erwartungsgemäß das β -Catenin Signal, wenn zuvor gegen β -Catenin immunpräzipitiert wurde bzw. Lysat direkt aufgetragen wurde.

Jenachdem welche Interaktion gezeigt werden sollte, wurden die Antikörper für die Immunfällung bzw. für die nachfolgende "Western Blot" Detektion entsprechend ausgewählt:

- Immunfällung mit Ak gegen PS1 und Detektion mit Ak gegen β-Catenin zum Nachweis der PS1/β-Catenin-Interaktion
- Immunfällung mit Ak gegen β-Catenin und Detektion mit Ak gegen PS1 zum Nachweis der PS1/β-Catenin-Interaktion
- → Immunfällung mit Ak gegen PS1 und Detektion mit Ak gegen PS1 zum Nachweis der PS1-NTF/CTF-Interaktion

Bei der Detektion mit Antikörpern gegen das N-terminale Fragment konnte in allen Proben ein Signal festgestellt werden. Bei vorangegangener IP gegen PS1-NTF war das Signal erwartungsgemäß sehr stark. Bei vorangestellter IP gegen PS1-CTF wurde ein schwächeres Signal erhalten. Auch im direkt aufgetragenen Lysat war die PS1-NTF Bande relativ schwach. Die durch die IP gegen β -Catenin erhaltene kopräzipitierte Menge an PS1-NTF war sehr gering. Da diese Bande allerdings auch in der Kontroll-IP ohne β -Catenin Antikörper sondern nur mit Protein G Sepharose erhalten wurde, muß davon ausgegangen werden, dass die verwendete Protein G Sepharose unspezifisch das N-terminale PS1-Fragment präzipitiert.

In der Detektion mit dem polyklonalen Antiserum 29498 gegen PS1 C-Terminus wurde eine PS1-CTF Bande in der Probe mit vorangegangener IP gegen PS1-CTF erhalten. Nach längerem Exponieren wurde das C-terminale Fragment auch im direkt aufgetragenen Lysat detektiert sowie in der IP mit 95/23 kopräzipitiertes PS1-CTF. Die IP mit à β -Catenin Antikörper führte auch nach längerem Exponieren des Films zu keinem Signal, so dass bei dieser Versuchsanordnung kein PS1-CTF mit dem β -Catenin kopräzipitiert wurde oder aber die Menge zu gering war, um hier detektiert werden zu können. Andere Gruppen konnten eine Koimmunpräzipitation zeigen (155,185).

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die Interaktion von β -Catenin und PS1-Fragmenten mit den gegen PS1 gerichteten Antikörpern erfolgreich gezeigt werden konnte. Insbesondere die selbst hergestellten Antikörper gegen PS1-CTF und PS1-NTF sind in der Lage, β -Catenin zu kopräzipitieren. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass die PS1-Fragmente selbst im Komplex vorliegen und somit ein Heterodimer bilden. Mit den in dieser Arbeit hergestellten Antikörpern konnte die Interaktion in beiderlei Hinsicht verifiziert werden, d.h. durch IP mit Antikörpern gegen PS1-NTF und nachfolgender Detektion mit à PS1-CTF Antikörpern und umgekehrt.

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin und PS1 in MDCK- und SH-SY5Y-Zellen sowie primären hippokampalen Neuronen überprüft. Dabei wurden die in dieser Arbeit hergestellten Antikörper gegen PS1 sowie Referenzantikörper verwendet.

Die subzelluläre Lokalisation von endogenem PS1 in SH-SY5Y Zellen (Abb. 3.16) erstreckt sich hauptsächlich auf die frühen Kompartimente des biosynthetischen "pathway", dem ER und Golgi-Kompartiment sowie dem "ER-Golgi-intermediate-compartment" (ERGIC) und bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (86,124,125). Eine Kolokalisation von PS1-NTF und PS1-CTF konnte gezeigt werden, wobei die in dieser Arbeit hergestellten polyklonalen Antikörper verwendet wurden. Diese Lokalisation von PS1 überlappt teilweise mit den intrazellülären Entstehungsorten von A β , zu denen auch das ER u.a. gehört (128-130) und unterstützt die postulierte Funktion von PS1 als γ -Sekretase. Eine PS1-Lokalisation ausschließlich in diesen

subzellulären Regionen stand allerdings im Widerspruch zu weiteren nachgewiesenen PS1 Aktivitäten, wie der Prozessierung des Notch Rezeptors, die an der Plasmamembran nach Bindung eines extrazellulären Liganden stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass PS1 Notch im ER/Golgi bindet und als Komplex zur Plasmamembran kotransportiert wird (135). Zudem haben Oberflächenbiotinylierungsexperimente gezeigt, dass ein geringer Prozentsatz von PS1, möglicherweise 1-10 Prozent, an der Plasmamembran lokalisiert ist (135), aber die Intensität dieses Signals in der Immunfluoreszenzanfärbung relativ zu dem ER/Golgi Signal zu schwach wäre, um mit dieser Methode PS1 an der Membran nachzuweisen. Weiterhin konnte eine Anreicherung von PS1-Fragmenten in Membranen von synaptischen Vesikeln und Wachstumskegeln biochemisch gezeigt werden (126,127). Dieses Ergebnis zeigt auch die subzelluläre Lokalisation von PS1 in primären, hippokampalen Neuronen (Abb. 3.18). In diesen Zellen ist eine prominente ER und Golgi-Lokalisation in den Zellkörpern zu beobachten, aber auch eine PS1-Lokalisation in den späteren Kompartimenten. Insbesondere bei der punktierten Anfärbung in den Neuriten könnte es sich um Synapsen handeln, was die biochemisch erhaltenen Ergebnisse unterstützen würde. Die gleichen Strukturen wurden auch mit Antikörpern gegen Synatophysin angefärbt, die Markerproteine für Synapsen sind (Daten nicht gezeigt). Diese Verteilung des PS1 im neuronalen Gewebe könnte auf eine mögliche Funktion bei der Entstehung und dem Erhalt synaptischer Strukturen hindeuten.

Bei den MDCK Zellen ist eine deutliche Anfärbung des β -Catenin an der Plasmamembran von konfluenten Zellen zu erkennen Abb. 3.17). Dieses wurde erwartet, da β -Catenin mit Cadherinen Komplexe bildet (186,187). Eine Ko-Immunfluoreszenzanfärbung mit Antikörpern gegen E-Cadherin konnte nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin im Cytosol oder Zellkern ist dagegen eher schwach. Die Anfärbung von PS1 in diesen Zellen zeigt eine ähnliche Verteilung wie auch bei den SH-SY5Y Zellen, vorwiegend im ER/Golgi Bereich. Dennoch konnte die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen biochemisch nachgewiesen werden, so dass davon auszugehen ist, dass die PS1 Menge an der Plasmamembran zu gering und die Intensität des Signals zu schwach ist, um die Lokalisation von PS1 an der Plasmamembran mit dieser Methode darstellen zu können. Mit anderen Methoden wie der Immunoelektronenmikroskopie konnte die Gegenwart von PS1 an der Plasmamembran gezeigt werden (182).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass PS1-NTF und PS1-CTF kolokalisiert vorliegen, wobei in SH-SY5Y Zellen sowie MDCK Zellen ein prominentes Vorkommen in ER und Golgi gezeigt werden konnte. Eine solche Lokalisation würde die postulierte γ -Sekretaseaktivität in diesen Kompartimenten unterstützen. Im neuronalen Rattenhirngewebe, den primären hippokampalen Neuronen, die nach der Präparation etwa 10 Tage kultiviert wurden und dabei eine Vielzahl von Vernetzungen ausgebildet haben, war neben einer ER/Golgi-Lokalisation im Zellkörper auch eine Lokalisation in den Neuriten feststellbar. Da diese Anfärbung innerhalb der Zellausläufer nicht homogen verteilt, sondern an einzelnen Stellen konzentriert vorlag, bei denen es sich um synaptische Strukturen handeln könnte. Diese Verteilung könnte auf mögliche Funktionen des PS1 z. B. bei der Entstehung bzw. dem Erhalt dieser Strukturen hinweisen.

4.5 Pharmakologische Modulation von intrazellulärem β-Catenin mit Hilfe von Lithiumchlorid und deren Auswirkung auf die Sekretion von Aβ Peptid in MDCK Zellen

Ein wichtiges Enzym im Wnt-Signaltransduktionsweg ist die Glutathion-Synthase Kinase 3β (GSK3 β). Diese Serin/Threonin-Kinase phosphoryliert u.a. β -Catenin und markiert es für den proteasomalen Abbau, wenn der pathway "ausgeschaltet", d. h. nicht aktiv ist. Das "Anschalten"/Aktivieren des pathway bewirkt die Inhibition der GSK3 β , so dass β -Catenin sich im Cytosol anreichert und in Folge dieser Anreicherung in den Zellkern transloziert, wo es durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren schließlich zur Aktivierung von Wnt-Zielgenen führt. Die Behandlung von Zellen mit Lithiumchlorid ist eine elegante Möglichkeit, einen "angeschalteten Wnt-pathway" nachzuahmen, da Lithium die GSK3 β inhibiert und so zu einer Anreicherung der β -Catenin Menge im Cytosol und im Zellkern führt.

Weiterhin ist PS1 ein Interaktionspartner von GSK3 β . Wenngleich kürzlich publiziert wurde, dass der regulierende Einfluss von PS1 auf β -Catenin unabhängig von der Phosphorylierung des PS1 durch GSK3 β zu sein scheint (183), so ist dennoch zu untersuchen, ob eine Beeinflussung der GSK3 β -Aktivität Auswirkungen auf die Sekretaseaktivität von PS1 und auf die Produktion und Sekretion von A β haben könnte. Es wurde davon ausgegangen, dass β -Catenin, dessen Menge durch GSK3 β reguliert wird, als Ligand von PS1 einen Einflu β auf die γ -Sekretaseaktivität von PS1 ausüben könnte. Daher wurde eine pharmakologische Modulation über Lithiumchlorid, das die GSK3 β inhibiert und somit zur Akkumulation von β -Catenin führt, durchgeführt. Sollte β -Catenin regulatorische Funktionen auf die PS1- γ -Sekretaseaktivität ausüben, so sollte die LiCl Behandlung Veränderungen in Hinblick auf A β Produktion oder A β Sekretion bewirken.

Es wurden MDCK Zellen verwendet, die stabil transfiziert waren mit dem γ -Sekretase Substrat C100 (99 C-terminale Aminosäurereste von APP). Dies erlaubte die Analyse unabhängig von der β -Sekretaseaktivität. Die Behandlung von MDCK-Zellen mit Lithiumchlorid führte in einer dosis- und zeitabhängigen Weise zu einer Anreicherung von β -Catenin im Cytosol sowie im

Kernextrakt der Zellen, als auch zu einem gleichzeitigen Anstieg der A β Sekretion im konditionierten Medium. Der Anstieg an sekretiertem Aβ war insbesondere bei 2- und 3-tägiger Inkubation in Gegenwart von hohen Lithium-Konzentrationen sehr deutlich. Neuere Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe (188) haben berichtet, dass Lithium die A β Sekretion bei mit APP C100 (APP-C-Terminus mit einer Länge von 99 Aminosäuren) transfizierten COS7-Zellen inhibiert. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den selbst erhaltenen Resultaten. Die Ursache hierfür könnte jedoch in den sehr unterschiedlich gewählten Versuchsbedingungen liegen. Zum einen wurde mit transient transfizierten COS7-Zellen gearbeitet, in unserer Versuchsanordnung mit stabil transfizierten MDCK-Zellen. Da es sich hierbei um grundsätzlich verschiedene Zelltypen handelt, ist nicht auszuschließen bzw. sogar davon auszugehen, dass bedingt durch die Morphologie der Zellen, völlig verschiedene Signaltransduktionsund Proteintransportmechanismen durchlaufen werden. Bei MDCK-Zellen handelt es sich um polarisierte Zellen. Aufgrund dieser Gemeinsamkeit mit neuronalen Zellen dienen sie als Modellsystem, um polarisiertes "Sortieren" von APP und verschiedenen Sekretaseaktivitäten zu untersuchen. MDCK-Zellen ermöglichen eine stabile Transfektion bei moderaten Expressionslevels und scheinen ähnliche Mechanismen zum polarisierten ,sorting' zu verwenden wie Neuronen (189). Aus diesem Grund wurde bei den eigenen Versuchen auf diese Zellen zurückgegriffen. COS7-Zellen hingegen weisen diese Eigenschaften nicht auf. In der Publikation von Sun et al. wird weiterhin gezeigt, dass während die Sekretion von Aβ durch die Gegenwart von Lithiumchlorid reduziert wird, APP C100 in Abhängigkeit der Lithiumkonzentration akkumuliert. Die kontroversen Ergebnisse deuten darauf hin, dass es bei einer kurzzeitigen Lithiumbehandlung unterschiedliche Effekte auf die Sekretion geben könnte wie bei der langzeitigen Behandlung.

4.6 Ausblick

Basierend auf den Untersuchungen des PS1 im neuronalen Gewebe, sollte es in Zukunft möglich sein, die funktionelle Rolle dieses Proteins und seinen Einfluß auf neuronale Prozesse besser zu analysieren. Eine wichtige Erkenntnis liefert die in dieser Arbeit gezeigte Charakterisierung von PS1 in transfizierten Zellen und Hirngewebe. Dabei wurde nachgewiesen, dass das PS1 nicht als Volllängenprotein im neuronalen Gewebe vorkommt, sondern dass die PS1-Fragmente *in vivo* als Komplex vorliegen und dies sehr wahrscheinlich die funktionelle Form des Proteins darstellt. Es wurde weiterhin gezeigt, dass eine Inkubation der Proben bei 100 °C zur Aggregation des N-terminalen Fragments und des PS1 Volllängenproteins führt. Diese Tendenz zur Aggregation läßt sich erklären durch das Vorhandensein der sechs bzw. acht Transmembrandomänen. Das C-

terminale Fragment bleibt auch beim Erhitzen der Probe auf 100 °C erhalten. Die Herstellung von Antikörpern gegen PS1 in dieser Arbeit war erforderlich, um geplante Experimente durchführen zu können. Diese Antikörper wurden charakterisiert und ihre Spezifität und Funktionalität bei verschiedenen Methoden nachgewiesen, sodass sie als wichtige Werkzeuge für zukünftige Studien zur Verfügung stehen.

Die Interaktion von PS1 und β -Catenin konnte verifiziert werden, wenngleich die Bedeutung dieser Interaktion noch unklar ist. Eine Einflußnahme von PS1 auf die Stabilität von β -Catenin ist gezeigt worden, wird aber kontrovers diskutiert. Auch ist noch nicht abschließend geklärt, wie sich diese Interaktion auf die γ -Sekretaseaktivität von PS1 auswirken könnte. In dieser Arbeit wurde der Einfluß einer β -Catenin Anreicherung auf die Sekretion von A β untersucht. Die Modulation der intrazellulären β -Catenin Menge mit Hilfe von Lithiumchlorid hat einen Anstieg an sekretiertem A β bewirkt. In zukünftigen Experimenten könnte analysiert werden, auf welche Weise eine Anreicherung von β -Catenin Effekte auf PS1 haben könnte, die wiederum dessen γ -Sekretaseaktivität beeinfluß auf den zellulären Stoffwechsel, auf Apoptose aber auch auf eine veränderte Lokalisation von Proteinen zählen würde. Zu beachten wäre dabei auch, dass Lithium-Salze (Chlorid, Carbonat) zur Behandlung von manisch depressiven Erkrankungen eingesetzt werden und ein unerwünschter Nebeneffekt möglicherweise ein A β Anstieg sein könnte. Dann wäre allerdings eine detailliertere Analyse mit dem isolierten Enzym erforderlich.

Weitergehende Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von PS1 könnten zu einem besseren Verständnis seiner potentiellen Funktionen führen. Die Identifikation von PS1 in synaptischen Strukturen und neuronenspezifischen Kompartimenten unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Analysen. Da diese Strukturen essentiell sind für ein intaktes und normal funktionierendes Nervensystem, könnten Informationen zur Bedeutung des PS1 aber auch des APP in diesen Arealen Hinweise darauf geben, warum es bei Mutationen in diesen Genen zur Entstehung der Alzheimer Krankheit und den damit einhergehenden neurodegenerativen Prozessen kommen muß.

5 Material

5.1 Abkürzungen

5.1.1 Aminosäuren

А	(Ala)	Alanin
С	(Cys)	Cystein
D	(Asp)	Asparaginsäure
E	(Glu)	Glutaminsäure
F	(Phe)	Phenylalanin
G	(Gly)	Glycin
Н	(His)	Histidin
Ι	(Ile)	Isoleucin
K	(Lys)	Lysin
L	(Leu)	Leucin
М	(Met)	Methionin
Ν	(Asn)	Asparagin
Р	(Pro)	Prolin
Q	(Glu)	Glutamin
R	(Arg)	Arginin
S	(Ser)	Serin
Т	(Thr)	Threonin
V	(Val)	Valin
W	(Trp)	Tryptophan
Y	(Tyr)	Tyrosin

5.1.2 Sonstige Abkürzungen

à	anti
А	Ampere oder Alanin
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer Krankheit ("Alzheimer's Disease")

Ak	Antikörper
1. Ak	primärer Antkörper
2. Ak	sekundärer Antikörper
Amp	Ampicillin
APLP	Amyloid Vorläufer ähnliches Protein ("amyloid
	precursor like protein")
APP	Amyloid Vorläufer Protein ("amyloid precursor protein")
APPs	sekretorisches Amyloid Vorläufer Protein
APRP	Amyloid Vorläufer verwandtes Protein ("amyloid
	precursor related protein")
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
A _x	Absorption bei der Wellenlänge x nm
BCA	4,4'-Dicarboxy-2,2'-Bichinolin ("Bicinchoninic Acid")
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
СРМ	"counts per minute"
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit, Liquor cerebrospinalis
DABCO	1,4 Diazabicyclo (2,2,2) octane
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholsäure
DS	Down Syndrom
ds	doppelsträngig (DNA)
DTAF	Dichlorotriazinyl Amino Fluorescein
DTT	Dithiothreitol
dYT	doppelt konzentriertes Vollmedium
ECL	"Enhanced Chemiluminescence"
ECM	Extrazelluläre Matrix

Ethylendiamintetraessigsäure Endoplasmatisches Retikulum und weitere Erbliche Alzheimer Krankheit ("Familial Alzheimer's Disease") konstante Region eines Immunglobulins fötales Kälberserum Flurescein-6-isothiocyanat gramm oder Erdbeschleunigung $g = 1.12 \text{ x r x } (\text{rpm}/1000)^2$
Endoplasmatisches Retikulum und weitere Erbliche Alzheimer Krankheit ("Familial Alzheimer's Disease") konstante Region eines Immunglobulins fötales Kälberserum Flurescein-6-isothiocyanat gramm oder Erdbeschleunigung $g = 1.12 \text{ x r x } (\text{rpm}/1000)^2$
und weitere Erbliche Alzheimer Krankheit ("Familial Alzheimer's Disease") konstante Region eines Immunglobulins fötales Kälberserum Flurescein-6-isothiocyanat gramm oder Erdbeschleunigung $g = 1.12 \text{ x r x } (\text{rpm}/1000)^2$
Erbliche Alzheimer Krankheit ("Familial Alzheimer's Disease") konstante Region eines Immunglobulins fötales Kälberserum Flurescein-6-isothiocyanat gramm oder Erdbeschleunigung $g = 1.12 \text{ x r x } (\text{rpm}/1000)^2$
konstante Region eines Immunglobulins fötales Kälberserum Flurescein-6-isothiocyanat gramm oder Erdbeschleunigung $g = 1.12 \text{ x r x } (\text{rpm}/1000)^2$
fötales Kälberserum Flurescein-6-isothiocyanat gramm oder Erdbeschleunigung $g = 1.12 \text{ x r x } (\text{rpm}/1000)^2$
Flurescein-6-isothiocyanat gramm oder Erdbeschleunigung $g = 1.12 \text{ x r x } (\text{rpm}/1000)^2$
gramm oder Erdbeschleunigung $g = 1.12 \text{ x r x} (\text{rpm}/1000)^2$
Goat Normal Serum
Glutathion S-Transferase
Stunde
Hepes Puffer
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
Meerettichperoxidase
Immunglobulin
Immunpräzipitation
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
Kilobasen
Kilodalton
Liter
Lösung
mol/l
monoklonaler Antikörper
Minimum Essential Medium
Minute
relatives Molekulargewicht
Molekulargewicht
Nitrozellulose
N-Ethyl-maleimid
Nonidet P-40
offenes Leseraster ("open reading frame")
zur Analyse
Polyacrylamid
Polyacrylamid Gelelektrophorese
phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PFA

pН
PMSF
PS1
PS2
rpm
RT
S
SDS
SDS-PAGE
SPR
Tab
TBE
TCA
TEMED
TGN
TMD
Tris
TRITC
Tween-20
ÜN
U
V
Vol
V/V
w/v
w/w
YT
ZMBH
ZNS

5.2 Reagenzien

Acetonitril	J.T. Baker, Groß-Gerau
30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisarylamid	National Diagnostics, Manville,

Stocklösung Agarose (Ultra Pure) Albumin aus Hühnereiweiß Ameisensäure p.A. Aprotinin APS Bacto-Hefeextrakt Bacto-Trypton Borsäure Chloroform (Trichlormethan) p.A. "Complete Freund's Adjuvant" "Complete" Inhibitorencocktail Coomassie Brilliant Blue R Deoxycholsäure Dialyseschläuche dialysiertes FCS Diethanolamin DNA-Größenstandard ("1 kb ladder") ECL-Detektionsreagenzien **ECL-Hyperfilm** Essigsäure p.A. Ethidiumbromid GF-5 Gelfiltrationssäulen Harnstoff Hepes, freie Säure Hepes, Na-Salz "Incomplete Freund's Adjuvant" **IPTG** Isopropanol p.A. Leupeptin Magermilchpulver 2-Mercaptoethanol Molekulargewichtsmarker vorgefärbt: hoher Bereich niedriger Bereich "broad range"

USA

Gibco BRL, Eggenstein Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt **Biomol**, Hamburg Merck, Darmstadt Difko Laboratories, Detroit, USA Difko Laboratories, Detroit, USA Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Sigma, Deisenhofen Boehringer, Mannheim Sigma, Deisenhofen Serva, Heidelberg Migge, Heidelberg Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen Gibco BRL, Eggenstein Amersham, Braunschweig Amersham, Braunschweig Roth, Karlsruhe Sigma, Deisenhofen KMF, Sankt Augustin Gibco BRL, Eggenstein Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen **Biomol**, Hamburg Roth, Karlsruhe **Biomol**, Hamburg Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen

Sigma, Deisenhofen Gibco BRL, Eggenstein New England Biolabs

¹⁴ C-markiert	Amersham, Braunschweig
NC-Membranen für "Western Blots"	Schleicher & Schuell, Dassel
NP-40	Fluka Biochemika, Neu-Ulm
PMSF	Serva, Heidelberg
Protein A-Sepharose CL-4B	Pharmacia, Freiburg
Protein G-Sepharose	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin	Serva, Heidelberg
Röntgenfilme, Kodak X-OMAT AR	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure p.A.	Merck, Darmstadt
sekundäre Antikörper	Serva, Heidelberg
SDS	BioRad, München
TCA	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
Triton X100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Whatman Papier 3MM	Schleicher & Schuell, Dassel

Zellkultur:		
Medien und L	ösungen	Sigma, Deisenhofen
Zellkulturscha	alen	Sarstedt, Nümbrecht
Cryovial-Gefa	іве	Nalgene, Heidelberg
Antibiotika:	Hygomycin B	Boehringer, Mannheim
	Zeocin	Invitrogen, Heidelberg
	Geneticindisulfat (G418)	Sigma, Deisenhofen

Sämtliche hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Chemikalienausgabe des Theoretikums der Universität Heidelberg, INF 346, bezogen und waren von p.A. Qualität. Spezielle Materialien sind im Methodenteil unter den entsprechenden Kapiteln aufgeführt.

5.3 Puffer und Lösungen

APS 10 %

DNA Probenpuffer (6x) 0,25 % Bromphenol Blau

	0,25 %	Xylene Cyanol FF
	30 % G	lycerin
DNA-Größenstandard ("1 kb ladder")	10000 bp	900 bp
relevanter Bereich	8000 bp	800 bp
	6000 bp	700 bp
	5000 bp	600 bp
	4000 bp	500 bp
	3500 bp	400 bp
	3000 bp	300 bp
	2500 bp	200 bp
	2000 bp	100 bp
	1500 bp	
	1200 bp	
	1031 bp	
dYT Medium	1,6 % T	rypton
	1,0 % H	lefeextrakt
	0,5 %N	aCl
	pH 7,0	
dYT Medium mit Ampicillin	wie dY	Г Medium
-	75 µg/n	nl Ampicillin
Fixierungslösung für SDS-Gele	30 % M	ethanol
	10 % Es	ssigsäure
LB Agarnlatten	10%T	rvnton
	0.5 % F	lefeextrakt
	1.0 % N	laCl
	1,5 % E	acto Agar
LB Agarplatten mit Ampicillin	wie LB	Agarplatten
· - •	75 µg/n	nl Ampicillin

Molekulargewichtsstandards: vorgefärbt, hoher Bereich

230,0 kDa α₂-Macroglobulin 135,0 kDa β-Galactosidase 97,0 kDa Fructose-6-phosphat Kinase 78,0 kDa Pyruvat Kinase 57,5 kDa Pyruvat Kinase 38,5 kDa Lactat Dehydrogenase 33,5 kDa Triosephosphat Isomerase

Die Markerproteine verhalten sich je nach verwendetem Gelsystem sehr heterogen und laufen nicht immer im Bereich des angegebenen apparenten Molekulargewichts. Die Abweichung kann bis zu 15 % des angegeben Wertes betragen.

vorgefärbt, niedriger Bereich	43,2 kDa Ovalbumin
	28,3 kDa Carboanhydrase
	18,3 kDa β-Lactoglobulin
	14,0 kDa Lysozym
	5,5 kDa Rinder Trypsin Inhibitor
	2,7 kDa Insulin A- u. B-Kette
¹⁴ C-markiert, hoher Bereich	220,0 kDa Myosin
	97,4 kDa Phosphorylase b
	66,0 kDa Rinderserumalbumin
	46,0 kDa Ovalbumin
	30,0 kDa Carboanhydrase
	14,3 kDa Lysozym
¹⁴ C-markiert, niedriger Bereich	30,0 kDa Carboanhydrase
	21,5 kDa Trypsin-Inhibitor
	12,5 kDa Cytochrom c
	6,5 kDa Aprotinin
	5,74 kDa Rinder-Insulin

Durch normale Probenaufbereitung (Versetzen der Probe mit SDS-Probenpuffer und dadurch Lösen der Disulfidbrücken; SDS-PAGE) konnte das Insulin in die B-Kette (3,4 kDa) und die A-Kette (2,35 kDa) zerfallen.

10x PBS	80 g NaCl
	2 g KCl
	14,4 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	2,4 g KH ₂ PO ₄
	ad 1 l H ₂ O
2x SDS Probenpuffer	0,125 M Tris/HCl pH 6,8
	4 % SDS (w/v)
	20 % Glycerin (v/v)
	0,02 % Bromphenolblau (w/v)
	10 % Mercaptoethanol (v/v)
1x SDS Probenpuffer	62.5 mM Tris/HCl pH 6.8
	2 % SDS
	10 % Glycerin
	0,01 % Bromphenolblau
	5 % Mercaptoethanol
1x modifizierter SDS Probenpuffer	62.5 mM Tris/HCl pH 6.8
	2 % SDS
	6 % Glycerin
	0,01 % Bromphenolblau
	5 % Mercaptoethanol
	2 M Harnstoff
	50 mM DTT
8x SDS Laufnuffer	40 ml 20% SDS
ox 505 Laupuner	118.4 g Glycin
	24 g Tris
	ad 11 H ₂ O
	<u></u>
10x TBE Elektrophoresepuffer	108 g Tris

	55 g Borsäure
	40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
	ad 1 1 H ₂ O
TE Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0
	1 mM EDTA pH 8,0
Tris/Tricin-Puffer:	
Gelpuffer	3 M Tris/HCl pH 8,45
	0,3 % Tris
10x Anodenlaufpuffer	2 M Tris/HCl pH 8,9
10x Kathodenlaufpuffer	1 M Tris
	1 M Tricin
	1 % SDS
	pH 8,25
Western Blot Transferpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,0
	190 mM Glycin
	10 % Methanol (v/v)
Zellkulturmedien:	
SH-SY5Y-Medium:	250 ml MEM
	250 ml Nutrient Mixture F12
	(oder 500 ml DMEM)
	50 ml FCS
	5 ml L-Glutamin
	5 ml nicht-essentielle AS (100 fach)
MDCK II-Medium:	500 ml MEM
	25 ml FCS

10 ml 1 M Hepes, pH 7,2 5 ml L-Glutamin

500 ml DMEM

71

HEK-Medium:

50 ml FCS 5 ml L-Glutamin

Zugabe von entsprechenden Antibiotika:

400 μg/ml Geneticindisulfat 300 μg/ml Hygromycin 400 μg/ml Zeocin

5.4 Enzyme

5.4.1 Enzyme zur DNA-Klonierung

Die verwendeten Restriktionsenzyme, T4 DNA-Ligase sowie entsprechende Reaktionspuffer stammten von Boehringer Mannheim (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Promega (Heidelberg) oder Gibco BRL (Eggenstein). Sie wurden gemäß den Angaben der Hersteller eingesetzt. Zum Verdau von 1 µg Plasmid-DNA wurden etwa 3 Einheiten ("units") Enzym eingesetzt.

5.4.2 Sonstige Enzyme und Proteaseinhibitoren

Die verwendeten Enzyme sind unter den entsprechenden Kapiteln im Methodenteil aufgeführt. Die Proteaseinhibitoren Leupeptin und Aprotinin wurden von Biomol (Hamburg), PMSF von Merck (Darmstadt) und "Complete" Proteasen-Inhibitoren-Cocktail von Boehringer (Mannheim) bezogen.

5.5 Plasmide

Der Vektor pGEX-5X-1 zur Expression von GST-Fusionsproteinen wurde von Pharmacia (Freiburg) und der pSP70-Vektor von Promega/Serva (Heidelberg) bezogen. Das Plasmid pRSETB-PS1-loop wurde freundlicherweise von Roberto Cappai (Melbourne) zur Verfügung gestellt.

5.6 Bakterien

E. coli DH5α Bakterien: F⁻, endA1, hsdR17, rk⁻, mk⁺, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, s80dlacZ M15 (190) *E. coli* BL 21 Bakterien: F⁻, *dcm ompT hsdS*(r_B, m_B) gal (191)

5.7 Radiochemikalien

³⁵S-Methionin (>1000 Ci/mmol) sowie die ¹⁴C-markierten Markerproteine wurden von der Fa. Amersham (Braunschweig) bezogen.

5.8 Filme

Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm Hyperfilm ECL Sigma, Deisenhofen Amersham, Braunschweig

5.9 Eukaryontische Zellen

SH-SY5Ywt-Zellen (Tumorzellinie, humane Neuroblastomzellen) wurden von ATCC (Manassas, VA, USA) bezogen. Mit SPA4CT stabil transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden freundlicherweise von Heike Grimm (ZMBH, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Mit pCEP4-Vektor und mit pCEP4-PS1wt stabil transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden von SmithKline Beecham Pharmaceuticals (Harlow, UK) zur Verfügung gestellt. Stabil transfizierte MDCK-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Tobias Hartmann zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden jeweils mit dem pHD-Vektor-Konstrukt transfiziert (MDCK B5 mit pHD-SPA4CT; MDCK A613 mit pHD-APPwt) und mit dem SV2Neo-Vektor kotransfiziert, der die Antibiotikaresistenz trägt (192).

5.10 Antikörper

Polyklonale Antikörper aus Kaninchen:

Polyklonales Antiserum 95/23, gerichtet gegen die Aminosäurereste 1-20 von humanem PS1 und hergestellt durch Immunisierung mit synthetischem PS1-Peptid (AS 1-20) gekoppelt an Diphtherie-Toxoid. Das Antiserum wurde freundlicherweise von John Underwood (Melbourne) zur Verfügung gestellt.

Polyklonales Antiserum C6, gerichtet gegen die Aminosäurereste 344-358 von humanem PS1. Das Antiserum wurde freundlicherweise von SmithKline Beecham Pharmaceuticals (Harlow, UK) zur Verfügung gestellt.

Polyklonaler Antikörper 22734 (IgA), der durch Immunisierung mit Fd-APP770sec hergestellt wurde (Dirk Beher, MSD, Harlow, UK).

Polyklonales Antiserum 84730, gerichtet gegen synthetisches A β -Peptid 1-40 (Gerd Multhaup, ZMBH).

Polyklonaler Antikörper 23850, der durch Immunisierung mit TP N474 hergestellt wurde und gegen den C-Terminus von APP gerichtet ist (Dirk Beher, MSD, Harlow, UK).

Polyklonales Antiserum aus Ziege gerichtet gegen GST; Pharmacia (Freiburg)

Monoklonale Antikörper aus Maus:

Monoklonaler Antikörper 22C11 gegen APP (33), gerichtet gegen den von Exons 2 und 3 kodierten APP N-Terminus.

Monoklonaler Antikörper W02, gerichtet gegen den N-Terminus von A β und A4CT, hergestellt mit synthetischem Peptid A β 1-16 (193)

Monoklonaler Antikörper G2-10 gerichtet gegen den freien C-Terminus von A β 40, hergestellt mit synthetischem Peptid A β 33-40 (193)

Monoklonaler Antikörper G2-11 gerichtet gegen den freien C-Terminus von A β 42, hergestellt mit synthetischem Peptid A β 35-42 (193)

Monoklonaler Antikörper APS 18 gerichtet gegen die Aminosäurereste 313-334 von humanem PS1. Das Antiserum wurde freundlicherweise von Anke Diehlmann (ZMBH, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Monoklonaler Antikörper gegen β -Catenin (Klon 14), gerichtet gegen die Aminosäurereste 571-781 von Maus β -Catenin; Transduction Lab (Heidelberg)

Monoklonaler Antikörper gegen E-Cadherin (Klon 36), gerichtet gegen die Aminosäurereste 735-883 von humanem E-Cadherin; Transduction Lab (Heidelberg)

Sonstige Antikörper

Polyklonale Antikörper aus Ziege, gerichtet gegen die leichte und schwere Kette von Maus oder Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt (Promega, Heidelberg)

Sekundärer HRP-konjugierter Antikörper aus Kaninchen, gerichtet gegen Antikörper aus Ziege (GST-Antikörper s.o.); DAKO (Hamburg)

Flurescein-gekoppelter sekundärer Antikörper aus Ziege, gerichtet gegen Kaninchen (Alexa Fluor(R) 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugate, Molecular Probes) oder Maus IgG (Alexa Fluor(R) 488 goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate bzw. Alexa Fluor(R) 568 goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate, Molecular Probes)

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

6.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien mit CaCl₂ (194)

Lösungen:

100 mM MgCl₂ 100 mM CaCl₂ 85 mM CaCl₂/15 % Glycerin

200 ml dYT Medium wurden mit 2 ml *E. coli* Übernachtkultur angeimpft und für 1,5-2 h bei 37 °C bis zum Erreichen einer definierten Zelldichte inkubiert, die über eine Messung der A_{590} kontrolliert wurde. Bei A_{590} =0,4 wurden die Bakterien für 5 min bei 4100 g und 4 °C abzentrifugiert. Für alle weiteren Schritte wurden eisgekühlte Lösungen und vorgekühlte Pipetten benutzt. Die Sedimente aus je 50 ml Ausgangskultur wurden in 5 ml 100 mM MgCl₂ vorsichtig resuspendiert, je zwei Ansätze vereinigt und mit 100 mM MgCl₂ auf 50 ml Endvolumen aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 4100 g und 4 °C vorsichtig in 5 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert und mit 100 mM CaCl₂ auf ein Endvolumen von 50 ml aufgefüllt. Nach 30-60 min Inkubation auf Eis wurde erneut für 5 min bei 4100 g und 4 °C zentrifugiert und die Sedimente in 5 ml 85 mM CaCl₂/15 % Glycerin resuspendiert. 300 µl Aliquots wurden in Trockeneis/Ethanol eingefroren und bei –80 °C gelagert.

6.1.2 Transformation kompetenter E. coli Zellen (190)

Für die Transformation wurde ein 300 μ l Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, und bis zu 50 ng Plasmid-DNA zugegeben (maximal 5 % des Bakterienvolumens). Der Transformationsansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert, exakt 90 s bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und für 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 700 μ l dYT-Medium zugegeben und der Ansatz für 60 min bei 37 °C geschüttelt, damit sich die Antibiotikaresistenz ausprägen konnte. 20-300 μ l der Kultur wurden auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

6.1.3 Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Lösungen:

Puffer P1: 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA (mit 100 µg/ml Dnase freie Rnase) Puffer P2: 200 mM NaOH; 1 % SDS Puffer P3: 2,55 M KAc, pH 4,8

Die Anreicherung und Reinigung von Plasmid-DNA aus 2 ml Bakterienkulturen erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Qiagen ohne Benutzung von Anionenaustauschersäulen nach folgendem Protokoll: Für die Minipräp wurden mehrere Einzelkolonien mit einer sterilen Impföse in je 2 ml dYT-Medium mit Ampicillin überimpft. Die Kulturen wurden ÜN bei 37 °C geschüttelt. 1,5 ml der ÜN-Kultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und für 1 min bei 13000 rpm bei RT zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 150 µl P1-Puffer vollständig resuspendiert. Es wurden 150 µl P2-Puffer hinzugegeben, vorsichtig gemischt (alkalische Lyse) und der Ansatz 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 150 µl P3-Puffer zugegeben und nach vorsichtigem Mischen 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach erneutem Überführen des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß wurden 900 µl eiskaltes Ethanol zugegeben und der Ansatz für 5 min bei -20 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Sediment einmal vorsichtig mit 70 % Ethanol gewaschen. Das nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C erhaltene DNA-Sediment wurde im 37 °C Heizblock oder Wasserbad für etwa 5 min getrocknet und anschließend in 50 µl H₂O bzw. TE-Puffer gelöst.

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA für Sequenzierungsreaktionen wurde anstatt der oben beschriebenen Ethanolfällung der DNA eine Isolierung der DNA über Anionenaustauschersäulen der Firma Qiagen durchgeführt. Hierbei wurde gemäß den Angaben des Herstellers verfahren.

6.1.4 Gewinnung großer Mengen reiner Plasmid-DNA mittels Anionenaustauschchromatographie

Große Mengen Plasmid-DNA wurden aus 500 ml Übernachtkulturen unter Verwendung des "Nucleobond AX 500-Kits" nach der Anleitung des Herstellers (Fa. Macherey u. Nagel) gewonnen. Lösungen:

S1: 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 400 μg/ml Rnase A
S2: 200 mM NaOH; 1 % SDS
S3: 2,8 M K-Acetat pH 5,2
N2: 100 mM Tris/H₃PO₄ pH 6,3; 15 % Ethanol; 0,9 M KCl
N3: 100 mM Tris/H₃PO₄ pH 6,3; 15 % Ethanol; 1,15 M KCl
N5: 100 mM Tris/H₃PO₄ pH 8,5; 15 % Ethanol; 1 M KCl

250 ml dYT Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit 1 ml *E. coli* Übernachtkultur angeimpft und ÜN bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 6000 rpm (Beckman JA17 Rotor) sedimentiert und in 12 ml S1 Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 12 ml S2 Puffer wurde die Suspension vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 12 ml S3 Puffer zugegeben und nach vorsichtigem Mischen der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 45 min bei 13000 rpm (Beckman JA17 Rotor) und 4 °C wurde das weißliche Präzipitat durch Filtration durch einen Faltenfilter vom Überstand getrennt. Die Ionenaustauschersäule (Nucleobond AX500) wurde mit 5 ml N2 Puffer äquilibriert und der filtrierte Überstand aufgetragen. Anschließend wurde mit 2x 12 ml N3 Puffer gewaschen und die gebundene DNA mit 6 ml N5 Puffer eluiert, wobei die ersten 1,5 ml verworfen wurden (Säulentotvolumen). Zu den 4,5 ml Eluat wurden 3,6 ml Isopropanol (0,8 Vol.) zugefügt und die präzipitierte DNA nach Zentrifugation für 30 min bei 12000 rpm (Beckman JA17 Rotor) und 4 °C mit 70 % Ethanol gewaschen. Die hochreine DNA wurde in 10 mM Tris/HC1 pH 8,0; 10 mM EDTA gelöst und die Konzentration und Reinheit mittels Photometrie bestimmt.

6.1.5 Ethanolfällung von Nukleinsäuren (Meyers et al., 1976)

Lösungen:

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA

3 M Na-Acetat pH 5,2

Eine DNA- bzw. RNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 und dem 2 bis 3 fachen Volumen 100 % Ethanol gemischt und für 10 min bei -70 °C oder mindestens 1 h bei -20

°C inkubiert. Die gefällten Nukleinsäuren wurden durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4 °C) sedimentiert und mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wurde in der Vakuumzentrifuge oder durch Stehenlassen der geöffneten Eppendorfgefäße im 37 °C Wasserbad getrocknet und in 40 - 50 μ l H₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

6.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden über eine Messung der A_{260} (Absorptionsmaximum der Nukleotidbasen) in H₂O ermittelt.

Für einzelsträngige RNA/DNA gilt: Ein Wert von $A_{260nm} = 1$ entspricht 40 µg/ml. Für doppelsträngige DNA gilt: Ein Wert von $A_{260nm} = 1$ entspricht 50 µg/ml. Der Quotient A_{260nm}/A_{280nm} ermöglicht die Reinheit der DNA-Lösung abzuschätzen und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

6.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen:

10x TBE: 890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA 6x DNA Probenpuffer: 0,25 % Bromphenolblau (w/v), 30 % Glycerin, 60 mM EDTA Ethidiumbromid: 10 mg/ml in H₂O

Die DNA-Moleküle wurden analytisch und präparativ in Agarosegelen mit Agarosekonzentrationen von 0,6-2 % bei einer Stromstärke von 100-150 mA aufgetrennt, wobei 1x TBE als Puffersystem diente. Den Gelen wurde Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,5 μ g/ml zugesetzt, sodass die DNA-Moleküle durch die Interkalation des Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar waren. Die Proben wurden vor dem Gelauftrag mit Probenpuffer gemischt. Als Größenmarker wird "1 kb ladder" verwendet.

6.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose

Zur Isolierung von DNA-Molekülen aus Agarose wurde das "QIAquick Gel Extraction" Kit eingesetzt und gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Das gewünschte DNA-Fragment

wurde mit einem Skalpell unter dem UV-Schirm aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und gemäß dem Qiagen-Protokoll die DNA aus der Agarose gewonnen.

6.1.9 Oligonukleotidsynthese

Die Synthese der verwendeten Oligonukleotide erfolgte im Labor von Dr. R. Frank nach der Phosphoamiditmethode in einem DNA-Syntheseautomaten des Typs 380 (Applied Biosystems). Die gelösten Oligonukleotide wurden mit Ethanol gefällt und in H_2O gelöst. Die DNA-Konzentrationnen wurden anschließend über die Messung der A_{260} bestimmt.

6.1.10 Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen

Lösungen:

6x DNA Probenpuffer: 0,25 % Bromphenolblau (w/v), 30 % Glycerin), 60 mM EDTA

Die Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte unter den vom Hersteller genannten Reaktionsbedingungen in einem Endvolumen von 20 µl, wobei meist 0,5-1 µg Plasmid-DNA und 1-5 U Restriktionsenzym eingesetzt wurden. Die Ansätze wurden bei der jeweils empfohlenen Temperatur (meist 37 °C) für 60-90 min inkubiert. Der Verdauansatz wurde anschließend mit DNA-Probenpuffer gemischt und mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Für Restriktionsverdaus mit zwei oder mehr verschiedenen Enzymen wurde derjenige Reaktionspuffer ausgewählt, in dem alle verwendeten Enzyme annähernd gleiche Aktivität besaßen. Die gespaltenen DNA-Fragmente wurden anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

6.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

100 ng geschnittener Plasmid-Vektor wurde mit etwa 10 fachem Überschuß an DNA-Fragment ("Insert") ÜN bei 16 °C in Gegenwart von 1-5 U T4-DNA-Ligase in 1x Ligasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 1 mM ATP; 1 mM DTT, 5 % PEG 8000) inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 20 μ l. Für nachfolgende Transformationen wurden 10 μ l des Ligationsansatzes verwendet.

6.1.12 Polymerasekettenreaktion ("PCR")

Lösungen:

dNTP: je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in ddH₂0 10x Pfu-Puffer (Boehringer Mannheim) Pfu-Polymerase (5 U/μl; Boehringer Mannheim)

Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Ansatzes:

DNA-Matrize	100 ng
10x Pfu-Puffer	5 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl
10 pMol sense-primer	1 µl
10 pMol antisense-primer	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H_2O	ad 50 µl

Das Reaktionsgemisch wird mit 100 µl Mineralöl überschichtet und die Reaktion in einem Perkin Elmer Thermal Cycler 4800 durchgeführt:

6.1.13 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung erfolgte im Labor von Dr. Rainer Frank in einem DNA-Sequenzierautomaten (Applied Biosystems).

6.2 Proteinbiochemische Methoden

6.2.1 Gelelektrophorese von Proteinen

6.2.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (195)

Lösungen für die Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen:

Trenngel						
Acrylamid-	Acrylamid-	2 M Tris/HCl	20 % SDS	APS	TEMED	H ₂ O
endkonz.	stammlsg.	pH 8,8				
%	ml	ml	μl	μl	μ1	ml
12,5	12,5	5,6	150	100	10	11,6
10,0	10,0	5,6	150	100	10	14,1
9,0	9,0	5,6	150	100	10	15,1
7,0	7,0	5,6	150	100	10	17,1
Sammelgel						
Acrylamid-	Acrylamid-	1 M Tris/HCl	20 % SDS	APS	TEMED	H_2O
endkonz.	stammlsg.	pH 6,8				
%	ml	ml	μl	μl	μl	ml
5,0	1,67	1,25	50	50	5	7,0

Die hergestellten Gele hatten eine Standardabmessungvon 20,0 x 20,0 cm und eine Dicke von 1 mm. Das Trenngelvolumen betrug 30 ml, das Sammelgelvolumen 10 ml. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit 100 µl Isopropanol überschichtet, um eine glatte Grenzfläche zu erzeugen. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen, das Sammelgel über das Trenngel geschichtet und ein Probenkamm eingeschoben. Nach der Polymerisation wurde der Kamm herausgezogen und das Gel in einer Vertikalelektrophoresekammer eingespannt. Die Dauer und Temperatur beim Denaturieren der Proben in 2x SDS-Probenpuffer variierten. Generell wurden Proben mit PS1-Fragmenten nicht gekocht, sondern für 30 min bei 37 °C in modifiziertem 2x SDS-Probenpuffer inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte ÜN bei 60-70 V oder 4-5 h bei 200 V.

6.2.1.2 Tris-Tricin-Gelelektrophorese (196)

Lösungen:

Gelpuffer	3 M Tris/HCl pH 8,45 0,3 % Tris
10x Anodenlaufpuffer	2 M Tris/HCl pH 8,9
10x Kathodenlaufpuffer	1 M Tris
	1 M Tricine
	1 % SDS
	рН 8,25

Zusammensetzung eines 10 (12) % Trenngels: 10 ml Gelpuffer 6 (7,3) ml Acrylamidlösung (49,5 % Acrylamid (w/v) mit Acrylamid:Bisacrylamid 49,5:3) 10 (8,5) ml H₂O 3,17 ml Glycerin 150 µl 10 % APS 20 µl TEMED

Zusammensetzung des "spacer" Gels: 10 ml Gelpuffer 10 ml Acrylamidlösung 14 ml H₂O 150 µl APS 20 µl TEMED

Zusammensetzung des Sammelgels: 3,1 ml Gelpuffer 1 ml Acrylamidlösung 8,4 ml H₂O 100 µl APS 10 µl TEMED Eine glatte Trennschicht der einzelnen Gelstufen wurde durch Überschichten mit 0,1 % iger SDS-Lösung oder Isopropanol erreicht. Die Elektrophorese fand bei 120 V für etwa 14 h statt.

6.2.2 Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen (197)

Lösungen:

Coomassie-Färbelösung:	500 ml Methanol
	100 ml Essigsäure
	2 g Coomassie Brilliant Blue R
	400 ml H ₂ O
F (. 1 /F' ' 1"	
Entfarbe-/Fixierlosung:	300 ml Methanol
	100 ml Essigsäure
	600 ml H ₂ O

Diese Methode dient zur Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen, wobei der Farbstoff mit freien Aminogruppen der Proteine über hydrostatische Wechselwirkungen reagiert. Zur Anfärbung der Proteine wurde das Gel für 30-45 min in Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und das Gel in Entfärberlösung inkubiert. Die Entfärbelösung wurde so lange gewechselt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren und der übrige Gelbereich nahezu farblos war. In diesem Zustand konnte das Gel bei 2 h und 75 °C auf Filterpapier (Whatman 3MM) und mit Frischhaltefolie abgedeckt auf dem Geltrockner (DrygelSR, Hoeffer Scientific Instruments San Francisco, Modell SE 2260) getrocknet werden.

6.2.3 "Western Blot" Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen, ECL-Detektion und Entfernung gebundener Antikörper von Nitrozellulose-Membranen ("stripping") zur wiederholten ECL-Detektion ("Western Blot"; (198))

Lösungen:

Transferpuffer

25 mM Tris/HCl pH 8,0 190 mM Glycin 10 % Methanol (v/v)

Absättigungslösung:	5 % Magermilchpulver (w/v) in 1x PBS
Denaturierungslösung:	62,5 mM Tris/HCL pH 6,8 2 % SDS 100 mM 2-Mercaptoethanol
FCI -I umineszenzlösungen:	Oxidationslösung und Luminol-Lösung

ECL-Lumineszenzlösungen: Oxidationslösung und Luminol-Lösung 1:1 unmittelbar vor der Entwicklung gemischt

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel in Transferpuffer kurz gewaschen. Die Nitrozellulose-Membran und vier Whatman Filterpapiere (3 MM) wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten und in Transferpuffer eingeweicht. Das Gel wurde luftblasenfrei zwischen je zwei Filterpapiere auf die Nitrozellulose-Membran gelegt. Der Proteintransfer erfolgte als Naßtransfer ("Tankblot") in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer bei 4 °C entweder bei 350 mA für 3 - 4 h oder bei 150 mA ÜN.

Anschließend wurde die Nitrozellulose-Membran zur Absättigung freier Bindungsstellen 3 h bei RT oder ÜN bei 4 °C in einer Lösung aus 5 % Magermilchpulver in 1x PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran für je 5 min in 1x PBS erfolgte Inkubation mit dem primären Antikörper. Polyklonale Antikörper wurden meist 1:2000 in PBS verdünnt, monoklonale Antikörper 1:10000 in PBS. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT auf dem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in 1x PBS wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Je nach Art des primären Antikörpers wurde ein Ziege-anti-Kaninchen- oder Ziege-anti-Maus-HRP-Konjugat 1:10000 in 1x PBS verdünnt eingesetzt. Die Membran wurde für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Zum Anfärben der Komplexe aus Protein, 1. Antikörper und 2. Antikörper wurde die Membran für 1 min in ECL-Chemolumineszenzlösung (Amersham, Braunschweig) inkubiert. Die Membran wurde dann zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt, und in der Dunkelkammer für verschieden lange Zeitintervalle ein entsprechender Film (ECL-Hyperfilm, Amersham) aufgelegt und anschließend entwickelt. Die Detektion beruht auf einer durch die Meerettichperoxidase katalysierten Reaktion, bei der Luminol in Gegenwart von H_2O_2 und Verstärkerreagenzien unter Lichtemission (428 nm) zu 3-Aminophthalat und N₂ reagiert.

Für eine Detektion mit einem weiteren primären Antikörper wurde das Filter zur Entfernung der gebundenen Antikörper für 30 min bei 50-55 °C in der Denaturierungslösung inkubiert. Anschließend wurde mehrmals mit PBS unter dem Abzug gewaschen. Das Filter wurde in Absättigungslösung inkubiert und alle weiteren Inkubationen wie oben beschrieben durchgeführt.

6.2.4 TCA-Fällung von Proteinen

Die Proteinlösung wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 800 μ l verdünnt, 200 μ l 100 % TCA (w/v) zugegeben und der Ansatz für 15 min auf Eise inkubiert. Danach wurden die Proteine für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Proteinsediment wurde mit 1 ml eiskaltem Aceton für 60 min bei –20 °C gewaschen, nochmals für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

6.2.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit BCA-Assay

Lösungen: BCA-Lösung (Sigma) 4 % (w/v) CuSO₄x5H₂O-Lösung

Zu 100 μ l Probe wurde 1 ml BCA-Reagenz zugefügt, das durch eine 1:40-Verdünnung der 4 % (w/v) CuSO₄x5H₂O-Lösung in der BCA-Lösung frisch hergestellt wurde. Nach einer Inkubation für 15 min bei 37 °C und nachfolgend 15 min bei RT wurde die A₅₆₂ gemessen. Als Eichkurve wurden verschiedene BSA-Verdünnungen benutzt. Bei der Bestimmung des Proteingehalts von Gewebefraktionen wurde SDS ad 0,1 % hinzugefügt.

6.2.6 Aufzucht, Vermehrung und Induktion von transformierten *E. coli* Zellen zur Expression von Fusionsproteinen und rekombinantem PS1

6.2.6.1 Aufzucht, Vermehrung und Induktion von transformierten E. coli Zellen

Kleinkultur:

2 ml LB- oder dYT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ÜN bei 37 °C geschüttelt.

Anzuchtkultur:

25 ml LB- oder dYT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit 1 ml Kleinkultur im Erlenmeyerkolben ÜN bei 37 °C geschüttelt.

Großkultur:

500 ml LB- oder dYT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit 12,5 ml Anzuchtkultur angeimpft und im Erlenmeyerkolben (besser auf zwei Kolben verteilen) für 2 h bei 37 °C geschüttelt. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Expression und Synthese von Fusionsproteinen induziert und der Ansatz ÜN bei 37 °C geschüttelt.

6.2.6.2 Reinigung von Fusionsproteinen und rekombinantem PS1

Lösungen:

E. coli-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA *E. coli*-Puffer mit 1 % NP-40 (v/v)
5 % DOC (Desoxycholat) (w/v)
1 mM MgCl₂

Die Bakterien aus einer induzierten 500 ml Großkultur wurden auf zwei Zentrifugenflaschen verteilt und für 10 min bei 7000 rpm (Beckman JA10 Rotor) abzentrifugiert. Das Sediment wurde 2 h bei –80 °C inkubiert und jeweils in 60 ml *E. coli* Puffer resuspendiert. Nach dem resuspendieren in 60 ml *E. coli* Puffer wurden 1,2 ml 5 % DOC, 1 ml 1 M MgCl₂ und 2 mg Dnase I zugefügt. Der Nukleinsäureverdau erfolgte für 30 min unter Rühren bei RT. Nach der Zentrifugation für 12 min bei 8000 rpm (Beckman JA17 Rotor) wurde das Sediment in 25 ml *E. coli* Puffer mit 1 % NP-40 sonifiziert und für 12 min bei 8000 rpm zentrifugiert (Beckman JA17 Rotor). Das resultierende Sediment wurde in 25 ml *E. coli* Puffer sonifiziert und für 12 min bei 8000 rpm zentrifugiert (Beckman JA17 Rotor). Dieser Arbeitsschritt wurde wiederholt und das resultierende Sediment wurde in 3 ml 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und entweder für 5 min bei 100 °C oder für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf präparative SDS-Gele aufgetragen.

6.2.6.3 Elektroelution von Fusionsproteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen

Lösungen:

Elutionspuffer: 0,1 M Tris/Acetat pH 7,4; 0,05 % SDS

Nach der Proteinauftrennung in präparativen SDS-Gelen wurde eine 2-3 cm breite Färbespur abgeschnitten und mit Coomassie angefärbt. Die gewünschten Banden wurden anhand der Position der Proteine auf dem Färbestreifen ausgeschnitten. Die Gelstreifen wurden mit dem Skalpell in kleine Stückchen geschnitten und in einen mit 4-5 ml Elutionspuffer gefüllten Dialyseschlauch überführt. Die Elution erfolgte für 2,5 h bei einer Stromstärke von 170 mA in einer Agarosegelelektrophoresekammer. Ein einminütiges Umpolen am Ende der Elution stellte sicher, dass die Proteine im Eluat waren und nicht an der Wand des Dialyseschlauches verblieben. Nach der Entnahme des Eluats aus dem Schlauch wurde es durch Filtration in einer Säule (Bakerbond spe, 1 ml "Filtration column", J.T. Baker, Groß-Gerau) von Polyacrylamidresten befreit.

6.2.6.4 Gelfiltrationschromatographie zum Pufferaustausch und zur Renaturierung von Proteinen

Es wurden Säulen (2 ml Excellulose GF-5 mit 5 kDa Ausschlußvolumen; Pierce) mit 2 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 äquilibriert und die Probe in einem Volumen von 400 μ l aufgetragen. Anschließend wurde insgesamt 5x mit je 300 μ l 10 mM Tris/HCl pH 7,5 eluiert und der Säulendurchlauf sowie die Eluate 1-5 in Reaktionsgefäßen aufgefangen. Aliquots der Eluate wurden zur Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA-Test bzw. zur Analyse mit SDS-PAGE herangezogen.

6.2.7 Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung polyklonaler Antikörper

Für die Immunisierung eines Kaninchens wurden 500 µg Protein oder Peptid eingesetzt. Diese Proteinmenge war in 350 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,5 enthalten und wurde mit dem gleichen Volumen an Freundschem Adjuvans versetzt und durch wiederholtes Aufziehen in einer Spritze (Becton Dickinson Plastipak; Microlance Kanüle 0,9x40 mm) eine stabile Emulsion hergestellt. Nach der Entnahme von Präimmunserum durch das Personal der Versuchstierhaltung des ZMBH wurde die erste Immunisierung mit "Freund's Adjuvans Complete" durchgeführt. Alle weiteren Immunisierung erfolgten mit "Freund's Adjuvans Incomplete". Vier Wochen nach der ersten Immunisierung erfolgten im Abstand von drei Wochen weitere Immunisierungen, wobei jeweils 10 Tage nach der Immunisierung Blut abgenommen wurde.

6.2.8 Serumgewinnung

Die Blutentnahme (20-30 ml je Tier) wurde 10 Tage nach Immunisierung durch das Personal der Versuchstierhaltung des ZMBH durchgeführt. Das Blut wurde für 1 h bei 37 °C und danach ÜN bei 4 °C inkubiert. Durch Zentrifugation für 30 min bei 4000 rpm und 4 °C in einer Haereus-Zentrifuge wurde das Serum von den koagulierten Blutbestandteilen getrennt. Das Serum wurde aliquotiert und bei –20 °C aufbewahrt. Eine Überprüfung des Titers erfolgte durch SPR (surface plasmon resonance) Analyse. Dabei wird das zur Immunisierung verwendete Antigen als Ligand an eine Chipoberfläche gekoppelt und die Bindung der Antikörper indirekt gemessen.

6.2.9 Aufreinigung von Antikörpern über Protein A-Sepharose Affinitätschromatographie

Lösungen:

Phosphatpuffer: 20 mM Na-Phosphat pH 7,0 Citratpuffer: 0,1 M Na-Citrat pH 3,2 1 M Tris/HCL pH 8,8

Die Protein A-Säule (1 ml HiTrap Protein A "affinity columns"; Pharmacia, Freiburg) wurde mit einer Peristaltik-Pumpe mit 800µl/min Fließgeschwindigkeit verbunden. Die Säule wurde mit mehreren ml H₂O gespült und mit 10 ml Phosphatpuffer äquilibriert. 1,5 ml Serum wurden mit 1,5 ml Phosphatpuffer gemischt und auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit 15 ml Phosphatpuffer gewaschen und die gebundenen Antikörper in 4x 1 ml Citratpuffer eluiert, wobei zuvor zur Neutralisierung des pH-Wertes 100 µl 1 M Tris/HCl pH 8,8 in die Probengefäße vorgelegt worden waren. Die Säule wurde anschließend mit 10 ml H₂O gewaschen und in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert. Die IgG-Konzentration der Eluate wurde durch eine Messung der Absorption bei 280 nm Wellenlänge (Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäureseitenketten) ermittelt.

6.2.10 Entfernung von ungewünschten Antikörpern gegen GST-Fusionsprotein

Das polyklonale Serum von mit GST-Fusionsproteinen immunisierten Kaninchen enthält neben den erwünschten, gegen das Fusionsprotein gerichteten Antikörpern auch gegen GST gerichtete Antikörper. Um diese aus dem Serum zu entfernen und so eine Anreicherung der erwünschten Antikörper zu erzielen, wird das Serum mit GST-Sepharose inkubiert. Hierfür wird zunächst GST hergestellt durch Transformation von *E. coli* DH5 α Zellen mit dem pGEX-5X-1 Vektor (Pharmacia, Freiburg) und nachfolgender Aufreinigung von GST aus einer induzierten 250 ml Kultur. Das Bakterienpellet wurde in 5 ml PBS/20 % Sucrose resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von Lysozym (100 µg/ml Endkonzentration) und 30 min Rühren auf Eis aufgeschlossen. Anschließend wurde zweimal für 30 Sekunden sonifiziert. Der aus der nachfolgenden Zentrifugation für 20 min bei 9000 rpm und 4 °C (Beckman JA17 Rotor) erhaltene Überstand enthielt u.a. das rekombinante GST und wurde bei –20 °C aufbewahrt.

1 ml Glutathion-Sepharose (Pharmacia, Freiburg) wurde 4x mit PBS gewaschen. 320 μl davon wurden mit 5 ml des GST-haltigen Überstandes (s.o.) für 15 min bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die nunmehr entstandene GST-Sepharose wurde durch eine Zentrifugation bei 1000 rpm und 4 °C in der Haereus Zentrifuge sedimentiert und 5x mit je 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 1 ml Serum mit der GST-Sepharose für 2 h bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert, die Sepharose mit den gebundenen Antikörpern abzentrifugiert und das resultierende Serum in ein neues Probengefäß überführt.

6.2.11 Herstellung von Zellysaten, cytosolischen Fraktionen und Kernextrakten für nachfolgende "Western Blot" Analyse (176,199)

Um die subzelluläre Verteilung von Proteinen, insbesondere die Verteilung von β -Catenin, zu analysieren, wurden cytosolische Fraktionen (S100; Überstand nach 100000 g Ultrazentrifugation) und Kernextrakte hergestellt.

Lösungen:

Puffer A:	10 mM Hepes (pH 7,9 bei 4 °C)
	1,5 mM MgCl ₂
	10 mM KCl
	0,5 mM DTT (vor Gebrauch zugeben)

Puffer B: 0,3 M Hepes 1,4 M KCl 0,03 M MgCl₂

Puffer C: 20 mM Hepes

25 % (v/v) Glycerol
0,42 M NaCl
1,5 mM NaCl
0,2 mM EDTA
0,5 mM PMSF (vor Gebrauch zugeben)
0,5 mM DTT (vor Gebrauch zugeben)

Nach dem Entfernen des Mediums und Waschen der Zellen mit 1x PBS wurden diese entweder mechanisch abgeschabt (SH-SY5Y-, HEK-Zellen) oder trypsiniert (MDCK-Zellen), in ein Falconröhrchen überführt und durch Zentrifugation für 10 min bei 2000 rpm und RT sedimentiert. Die Zellen wurden mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl kaltem Puffer A resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt und das resultierende Zellpellet in 200 µl kaltem Puffer A resuspendiert. Durch 10 maliges Aufziehen in einer Spritze (Becton Dickinson Plastipak; Microlance Kanüle 0,9x40 mm) wurden die Zellen aufgeschlossen (Zellysat). Eine nachfolgende Zentrifugation für 10 min bei 2000 rpm und 4 °C diente dazu, die Zellkerne zu pelletieren.

Der aus dieser Zentrifugation resultierende Überstand wurde in ein Polycarbonatröhrchen überführt (Beckman) und 0,1 Vol. (etwa 20 µl) Puffer B zugegeben. Die Proben wurden für die nachfolgende Ultrazentrifugation mit Puffer A gegeneinander austariert und für 60 min bei 100000 g und 4 °C (53000 g, TLA 120.2 Rotor, Beckman) zentrifugiert. Der Überstand (S100) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, für 1 h mit Con A-Sepharose bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert, um Cadherin-gebundenes Catenin zu entfernen, dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert. Das S100-Sediment wurde verworfen.

Das aus obiger Zentrifugation resultierende Sediment wurde erneut zentrifugiert für 20 min bei 13000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet ("crude nuclei") wurde resuspendiert in 100 µl Puffer C. Die Proben wurden gevortext und die Zellkerne durch 10 maliges Aufziehen in einer Spritze (Becton Dickinson Plastipak; Microlance Kanüle 0,9x40 mm) aufgeschlossen. Die Suspension wurde für 30 min bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert und anschließend für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Überstand ("Kernextrakt") wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert. Das Sediment wurde ebenfalls weggefroren oder in 2x SDS-Probenpuffer gelöst und mittels SDS-PAGE analysiert.

Die Proteinkonzentrationen der S100-Fraktion bzw. Kernextrakte wurden mittels BCA-Test bestimmt und jeweils gleiche Proteinmengen für die nachfolgende Auftrennung im SDS-PAGE und "Western Blot" Analyse eingesetzt.

6.2.12 Immunpräzipitation von Proteinen mit Protein A-Sepharose in Gegenwart von Detergenzien (200)

Protein A ist eine Zellwandkomponente von *Staphylococcus aureus* mit der Fähigkeit, an den konstanten Teil von IgG- und IgM-Subtypen zu binden (Forsgren, A. and Sjoquist, J., 1966). Diese Eigenschaft wird in der Immunfällung dazu ausgenutzt, Antigen-Antikörperkomplexe über immobilisiertes Protein A auszufällen (Kessler, S.W. et al., 1976). Für die Fällung wird meist an Sepharose gekoppeltes Protein A verwendet. Das dadurch selektiv angereicherte Antigen kann anschließend mit verschiedenen Methoden analysiert werden. Beim "IP-Western" wird nach der IP der Komplex aus Antigen, Antikörper und Protein A durch Denaturierung in Probenpuffer aufgelöst und das präzipitierte Antigen in einem "Western Blot" analysiert. Die Immunpräzipitation dient auch zur Charakterisierung von Antikörpern und erlaubt eine Aussage über deren Spezifität. Falls ein Antikörper ein Protein in Gegenwart nichtionischer Detergentien präzipitiert, erkennt er vermutlich eine annähernd native Proteinkonformation.

Protein A-Sepharose Vorbereitung (CL4B, Pharmacia, Freiburg): Die Protein A-Sepharose wurde mindestens eine Stunde in 10 mM Tris/HCl pH 7,5 vorgequollen, zweimal mit diesem Puffer gewaschen und eine Suspension von 100 mg Trockengewicht/ml hergestellt.

Protein A-Sepharose wurde immer bei Immunpräzipitationen mit polyklonalen Antiseren verwendet. Bei Ips mit monoklonalen Antikörpern (β -Catenin; W02 etc.) wurde Protein G-Sepharose (Sigma, Deisenhofen) in einer Menge von 25 μ l je IP-Ansatz eingesetzt. Die Protein G-Sepharose wurde als Suspension in 20 % Ethanol bezogen und vor Gebrauch mehrmals mit 10 mM Tris/HCl pH 7,5 gewaschen. Diese Suspension wurde durch Zugabe von 0,02 % Na-Azid bis zu einigen Wochen bei 4 °C aufbewahrt.

6.2.12.1 Aufschluß eukaryontischer Zellen für die Immunpräzipitation

Lösungen:

Aufschlußpuffer: 50 mM Tris/HCL pH 7,5 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 % NP-40 1 % Triton X100 1 mM PMSF (unmittelbar vor Gebrauch zugeben) 10 μg/ml Leupeptin (dto.) 10 μg/ml Aprotinin (dto.)

Verdünnungspuffer: 50 mM Tris/HCL pH 7,5 150 mM NaCl 2 mM EDTA

Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS mechanisch abgeschabt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 6000 rpm und 4 °C wurden dem Zellsediment 500 µl Aufschlußpuffer zugefügt und der Ansatz nach kräftigem Mischen 20 min auf Eis inkubiert. Wichtig bei MDCK-Zellen: mechanisches Abschaben zerstörte die Zellen, d.h. entweder wurde der Aufschlußpuffer direkt in die Schale geben und diese auf Eis inkubiert oder die Zellen wurden im Aufschlußpuffer mechanisch abgeschabt. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C sedimentiert und der Überstand in ein neues Probengefäß überführt. Für eine nachfolgende IP wurde das Probenvolumen durch Zugabe von 500 µl Verdünnungspuffer auf 1 ml gebracht.

6.2.12.2 Metabolische Markierung von Proteinen mit ³⁵S-Methionin und Aufschluß metabolisch markierter eukaryontischer Zellen für die Immunpräzipitation

Lösungen:

³⁵S-Methionin (10 µCi/µl) (Amersham, Braunschweig)

Aufschlußpuffer:50 mM Tris/HCL pH 7,5150 mM NaCl2 mM EDTA1 % NP-401 % Triton X1001 mM PMSF (unmittelbar vor Gebrauch zugeben)10 µg/ml Leupeptin (dto.)10 µg/ml Aprotinin (dto.)Verdünnungspuffer:50 mM Tris/HCL pH 7,5

150 mM Tris/HCL pH 7,5 150 mM NaCl 2 mM EDTA Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und 45 min in 3 ml MEM (ohne Methionin) bei 37 °C inkubiert. Dann erfolgte Zugabe von 300 μ Ci ³⁵S-Methionin und Inkubation für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit je 2 ml 1x PBS gewaschen und mit 1 ml PBS mechanisch in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 6000 rpm und 4 °C wurde der Überstand entfernt und das Sediment in 500 μ l Aufschlußpuffer resuspendiert. Nach kräftigem Mischen inkubierte der Ansatz für 20 min auf Eis und wurde dann für 10 min bei 13000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in das 500 μ l 1x Verdünnungspuffer vorgelegt waren. Abweichungen von diesem Standardprotokoll sind im Ergebnisteil aufgeführt.

6.2.12.3 Vorbereitung des Mediums metabolisch markierter eukaryontischer Zellen für die Immunpräzipitation

Lösungen:

10x Mediumpuffer: 250 mM Tris/HCl pH 8,5 5 % NP-40 5 % Triton X100 1 mM PMSF 10 μg/ml Leupeptin 10 μg/ml Aprotinin

Das Medium wurde auf 1x Mediumpuffer eingestellt und für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die Immunpräzipitation eingesetzt. Bei konditioniertem Medium von nicht metabolisch markierten Zellen wurde zunächst analog verfahren. Da sich herausstellte, dass die Zugabe von Mediumpuffer die Effiziens der IP nicht beeinträchtigte (Dirk Beher; pers. Mitteilung), wurde auf die Zugabe des Puffers bei den konditioniertem Medien von nicht metabolisch markierten Zellen verzichtet.

6.2.12.4 Immunpräzipitation von ³⁵S-Methionin-markierten Proteinen

Lösungen:

Waschpuffer A

10 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl

0,2 % NP-40 2 mM EDTA

Waschpuffer B

10 mM Tris/HCl pH 7,5 500 mM NaCl 0,2 % NP-40 2 mM EDTA

Waschpuffer C

10 mM Tris/HCl pH 7,5

Der Immunpräzipitation wurde eine Vorinkubation mit Protein A-Sepharose und Präimmunserum vorangestellt. Dies diente dazu, Immunreaktionen mit unspezifischen bzw. unerwünschten im Serum enthaltenen Antikörpern herauszubekommen und war andererseits ein Nachweis für die Spezifität des in der IP eingesetzten Antikörpers. Das Präimmunserum stammte nach Möglichkeit von dem gleichen Kaninchen, aus dem auch das Serum gewonnen wurde.

Zu 1 ml Zellysat bzw. 1-2 ml vorbereitetem Medium wurden 40 µl Protein A-Sepharose-Suspension und 5-20 µl Präimmunserum gegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT auf dem Überkopfschüttler wurde durch Zentrifugation die Protein A-Sepharose mit den unspezifisch gebundenen Proteinen sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 40 µl Protein A-Sepharose-Suspension und 5-20 µl Immunserum gemischt und wiederum 1 h bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Protein A-Sepharose mit den spezifisch gebundenen Proteinen abzentrifugiert. Falls mit dem Überstand eine weitere Immunfällung vorgesehen war, wurde dieser in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zunächst zweimal 15 min mit je 15 µl Protein A-Sepharose-Suspension auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Der nach Abzentrifugieren der Protein A-Sepharose erhaltene Überstand wurde mit 40 µl Protein A-Sepharose-Suspension und 5-20 µl Immunserum gemischt und wie zuvor 1 h bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Das Sediment aus Protein A-Sepharose und spezifisch gebundenen Proteinen (u.U. auch das aus der Präinkubation erhaltene Sediment) wurde für je 2 min auf dem Überkopfschüttler dreimal mit Waschpuffer A, zweimal mit Waschpuffer B und einmal mit Waschpuffer C gewaschen. Die Protein A-Sepharose wurde mit 25 µl 2x SDS-Probenpuffer vermischt, 5 min bei 95 °C oder 30 min bei 37 °C inkubiert, kurz abzentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 4 - 5 h bei 200 V oder ÜN bei 60 V. Das Gel wurde 30 min in Fixierlösung auf dem Schüttler inkubiert und dann bei 73 °C für 2 h auf dem Vakuumtrockner getrocknet. Für die Autoradiographie wurde das Gel zwischen 12 h und mehreren Tagen exponiert.

6.2.12.5 Immunpräzipitation von Proteinen aus eukaryontischen Zellen und konditioniertem Medium

Lösungen:

Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0,2 % NP-40

Der Zellaufschluß und die Medienvorbereitung erfolgten wie bei den metabolisch markierten Zellen. Auch die IPs wurden analog durchgeführt, wobei die Präzipitate 3x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen wurden. Nach Zugabe von 25 µl 2x SDS-Probenpuffer wurden die Präzipitate 5 min bei 95 °C oder 30 min bei 37 °C inkubiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im "Western Blot" analysiert.

6.2.13 Radioaktivitätsmessung

Zur Bestimmung der im Lysat oder Medium von metabolisch markierten Zellen enthaltenen Radioaktivität wurde ein Aliquot der Probe ausgezählt. In einem Scintillationsröhrchen wurden 4 ml Scintillationscocktail (Zinsser) vorgelegt und 10 µl Probe dazugegeben. Nach Verschließen des Röhrchen wurde dieses kurz geschüttelt und für 15-30 min bei 4 °C im dunkeln inkubiert zum Abbau möglicherweise vorhandener statischer Ladungen. Anschließend wurden die Proben im Szintillationszähler (Beckman) ausgezählt, entweder im 1 oder 3 min ³⁵S-Zählprogramm.

6.2.14 Autoradiographie zur Detektion von ³⁵S-markierten Proteinen

Lösungen:

Fixierer: 30 % Methanol 10 % Essigsäure in H₂O Das Gel wurde 30 min in Fixierlösung auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurde es auf zwei mit Wasser angefeuchtete Whatman-Filterpapiere gelegt, mit Haushaltsfolie abgedeckt und bei 73 °C für 2 h auf dem Vakuumtrockner getrocknet. Das Abkühlen auf dem Trockner verhinderte ein Reißen des Gels. Für die Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm mindestens für einen Tag, meist aber für mehrere Tage, auf das getrocknete Gel aufgelegt und in einer Filmkassette exponiert. Anschließend wurde der Film entwickelt.

6.2.15 Aufschluß eukaryontischer Zellen mit weiteren Detergenzien

Neben dem Zellaufschluß mit NP-40 und Triton X100 wurden Zellen auch mit milderen Detergenzien aufgeschlossen, um beispielsweise Proteinkomplexe nicht zu zerstören, sondern in nachfolgender IP und "Western Blot" Analyse nachweisen zu können.

6.2.15.1 Aufschluß eukaryontischer Zellen mit CHAPSO-Lysispuffer

Lösungen:

CHAPSO-Lysispuffer:

Durchführung analog 6.2.12.1 Aufschluß eukaryontischer Zellen für die Immunpräzipitation.

150 mM NaCl

1 mM EDTA 1 % CHAPSO

25 mM Tris/HCl pH 7,5

Inhibitorencocktail vor Gebrauch zugeben

6.2.15.2 Aufschluß eukaryontischer Zellen mit Digitonin-Lysispuffer

Lösungen:

Digitonin-Lysispuffer: 150 mM NaCl 25 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA 1 % Digitonin Inhibitorencocktail vor Gebrauch zugeben Durchführung analog 6.2.12.1 Aufschluß eukaryontischer Zellen für die Immunpräzipitation.

6.3 Zellkulturmethoden

6.3.1 Eukaryontische Zellkultur

Medien:

SH-SY5Y-Zellen:	DMEM mit 4500 mg/l Glucose
	10 % FCS
	1x MEM Nicht-essentielle Aminosäuren
	2 mM Glutamin
MDCK II-Zellen:	MEM
	5 % FCS
	10 mM Hepes, pH 7,2
	2 mM Glutamin
HEK-Zellen:	DMEM mit 4500 mg/l Glucose
	10 % FCS
	2 mM Glutamin

Selektionsantibiotika wurden bei transfizierten Zellen entsprechend der Resistenz zugegeben: 400 µg/ml Geneticindisulfat 300 µg/ml Hygromycin 400 µg/ml Zeocin

Auf die Zugabe von Penicillin/Streptomycin zu den Medien wurde verzichtet, da von einer sauberen Arbeitsweise ausgegangen werden konnte und nur sehr selten Kontaminationen vorkamen. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser kultiviert und die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO2 und 95 % Luftfeuchtigkeit in 10 ml Medium je Schale im Brutschrank. Das Medium pro Schale wurden alle zwei bis drei Tage erneuert.Die adhärenten Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-100 % vereinzelt und höchstens 25x passagiert.

Bei den SH-SY5Y- und HEK-Zellen wurden zu den Zellen einer Schale nach dem Waschen mit 1x PBS (autoklaviert) 3 ml vorgewärmte Trypsin/EDTA-Lösung gegeben und nach kurzer Inkubation bei RT die Zellen mechanisch durch Klopfen gegen den Schalenrand abgelöst. Die Zellsuspension wurde durch Zugabe von 7 ml Medium auf ein Volumen von 10 ml gebracht, die Zellen gut resuspendiert und entsprechend der Vereinzelung, die erreicht werden sollte, Aliquots der Suspension in neue Schalen überführt, in denen 7 ml Medium vorgelegt waren.

Bei den MDCK-Zellen wurden 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung zu den Zellen einer 10 cm Schale gegeben und diese für 10-15 min bei RT inkubiert. Die Trypsin/EDTA-Lösung wurde entfernt, erneut 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung aufgetragen und die Schale für 10-20 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach waren die Zellen vom Schalenboden abgelöst. Falls nicht, wurden die Zellen mechanisch durch kräftiges Klopfen gegen den Schalenrand abgelöst. Die Zellsuspension wurde durch Zugabe von 8 ml Medium auf ein Volumen von 10 ml gebracht, die Zellen gut resuspendiert und entsprechend der Vereinzelung, die erreicht werden sollte, Aliquots der Suspension in neue Schalen überführt, in denen 7 ml Medium vorgelegt waren. Gegebenenfalls wurden 10 μ l Aliquots der Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und eine bestimmte Anzahl von Zellen auf neue Schalen verteilt.

6.3.2 Einfrieren von Zellen

SH-SY5Y- und HEK-Zellen wurden in 1x PBS gewaschen und mit je 5 ml Medium mit einem Schaber vorsichtig abgelöst. Mit weiteren 5 ml Medium wurde die Schale gespült. Die Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen überführt. Nach Zentrifugieren der Zellen für 5 min bei 800 rpm und 21 °C wurde das Medium entfernt. Das Sediment aus Zellen wurde in 1,8 ml Einfriermedium (Medium mit 30 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Cryovial-Gefäß überführt. Die Gefäße wurden in eine mit Isopropanol gefüllte spezielle Einfrierbox für Zellen gegeben und in den –80°C-Schrank zum langsamen Einfrieren der Zellen gestellt. Nach einigen Tagen wurden die Proben zur Langzeitlagerung in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt.

MDCK-Zellen wurden durch mechanisches Abschaben zerstört und mußten daher durch Trypsinieren vom Schalenboden abgelöst werden. Dies erfolgte analog der Prozedur beim Passagieren von MDCK-Zellen. Die sonstigen Schritte wurden ausgeführt wie oben beschrieben.

6.3.3 Auftauen von Zellen

Das Cryovial-Gefäß mit den Zellen wurde innerhalb 1-2 min im 37 °C-Wasserbad aufgetaut und mit Ethanol desinfiziert. Die Zellsuspension wurde in 10 ml vorgewärmtes Medium in einem Falconröhrchen überführt. Durch kurzes Zentrifugieren bei 800 rpm wurde das DMSO entfernt. Das Sediment wurde in 10 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

6.3.4 Metabolische Markierung von Proteinen mit ³⁵S-Methionin

Für eine Langzeitmarkierungwurden die Zellen (in einer 10 cm Schale mit meist 70-100 % Konfluenz) 2x mit PBS gewaschen und für 30-45 min in 3 ml methioninfreiem MEM im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und erneut 3 ml vorgewärmtes, methioninfreies MEM mit 5 % dialysiertem FCS (1 kDa Ausschlußvolumen; Sigma, Deisenhofen) pro Schale aufgetragen. Im Isotopenlabor erfolgte die Zugabe von 300 μ Ci ³⁵S-Methionin (10 μ Ci/ μ l), die Inkubation der Zellen für 4 h bei 37 °C im Brutschrank und die weitere Aufarbeitung (siehe Kapitel 6.2.12).

6.4 Immunfluoreszenzmethoden

Lösungen:

Blocklösung:	PBS/3 % BSA (w/v), 1,5 % normales Ziegen Serum
Inkubationslösung:	PBS/3 % BSA (w/v)
PVA-Eindecklösung:	8 g Polyvinylalkohol wurden in 40 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8,5 bei
	50-60 $^{\circ}\mathrm{C}$ gelöst und nach dem abkühlen 20 ml Glycerin und 1-2,5
	% DABCO zugegeben. Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.
Fixierung:	4 % PFA in PBS oder 4 % PFA/Sucrose
Permeabilisierung:	0,1 % TX100 oder 0,02 % Saponin

Da verschiedene Zellarten auf verschiedene Weisen und mit verschiedenen Reagenzien behandelt wurden, sollen hier die unterschiedlichen Fixierungs- und Permeabilisierungsmethoden aufgeführt werden. Die Absättigung und Inkubation in Gegenwart von Antikörpern wurde bei allen Zellen in ähnlicher Weise durchgeführt, daher gilt diese Beschreibung allgemein.
6.4.1 Immunfluoreszenzanfärbung von SH-SY5Y-Zellen und primären hippokampalen Neuronen

Standardprotokoll I für Fixierung/Permeabilisierung:

Die SH-SY5Y-Zellen wurden meist am Vortag gesplittet und dünn in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät, die mit sterilen Deckgläschen bestückt waren. Primäre hippokampale Neuronen wurden gleich nach der Gewinnung (embryonic day 13) in mit sterilen Deckgläschen ausgelegten Zellkulturschalen ausgesät und etwa zehn Tage kultiviert. Für die Präparation und Überlassung der primären Neuronen möchte ich mich bei Dr. Christine Bergmann bedanken. Die Deckgläschen wurden mit der Pinzette vorsichtig aus der Schale genommen, durch zweimaliges eintauchen in PBS gewaschen und in die vorbereitete "feuchte Kammer" jeweils mit den Zellen nach unten auf die vorgelegte Fixierungslösung aufgelegt. Als "feuchte Kammer" wurde eine Plastikschale mit feuchten Papiertüchern und Parafilm ausgelegt, auf den Tropfen mit etwa 70 μ l Flüssigkeit aufgetropft wurden (bei den Antikörperlösungen nur 35 μ l). Die Fixierung der Zellen erfolgte in Gegenwart von 4 % PFA/PBS für 10 min in der feuchten Kammer, die auf Eis gestellt wurde. Anschließend wurden die Zellen 2 x für 5 min in PBS gewaschen, wobei die Deckgläschen in ein Schiffchen gestellt wurden, das wiederum in einem mit PBS gefüllten Becherglas auf den Schüttler gestellt wurde.

Standardprotokoll II für Fixierung/Permeabilisierung:

Im Gegensatz zum Protokoll I erfolgte die Fixierung mit 4 % PFA/Sucrose-Lösung und 0,05 % Glutardialdehyd für 20 min bei 37° C und 10 min bei RT. Dafür wurden die Deckgläschen zunächst in den Zellkulturschalen belassen, zweimal mit PBS gewaschen und dann im Brutschrank bzw. bei RT inkubiert. Die Permeabilisierung erfolgte in der gleichen Lösung, die zusätzlich 0,02 % Saponin enthielt, für 5 min bei RT.

Alternativ ließen sich speziell SH-SY5Y-Zellen auch mit eiskaltem Methanol in einem Schritt fixieren und permeabilisieren, wobei ein bei -20 °C gelagerter Metallblock mit Haushaltsfolie umwickelt und mit eiskaltem Methanl betropft wurde. Die Deckgläschen wurden für 5 min mit den Zellen nach unten auf den Block gelegt. Diese Methode hat sich allerdings nur bei diesen Zellen bewährt.

Anfärbung mit primären und sekundären Antikörpern:

Grundsätzlich wurde vor dem anfärben mit dem primären Antikörper eine Absättigung mit 1,5 % GNS in 3 % BSA/PBS für eine Stunde bei RT durchgeführt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 1 h bei RT in der feuchten Kammer, wobei der Antikörper meist 1:100 oder 1:200 in 3 % BSA/PBS verdünnt war. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in PBS

erfolgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper für 1 h bei RT in der feuchten Kammer und im dunkeln um die Fluoreszenzeigenschaften möglichst gut zu erhalten. Auch das nachfolgende dreimalige Waschen für 5 min in PBS erfolgte im abgedunkelten Becherglas. Als sekündärer Antikörper wurde DTAF-gekoppelter Ziege anti Kaninchen bzw. Rhodamin-gekoppelter Ziege anti Maus Antikörper in einer 1:250 Verdünnung in 3 % BSA/PBS verwendet. Nach dem Anfärben wurden die Deckgläschen dreimal für 5 min in PBS bei RT (im dunkeln) gewaschen und in PVA-Lösung eingedeckt.

6.4.2 Immunfluoreszenzanfärbung von MDCK-Zellen

Standardprotokoll III für Fixierung/Permeabilisierung:

Im Unterschied zu Protokoll I wurden die Deckgläschen nach dem Permeabilisieren und Waschen zusätzlich für 4 bis 5 min in Gegenwart von 50 mM NH₄Cl inkubiert (,quenchen'). Danach wurde dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und permeabilisiert mit 0,1 % TritonX 100 für 2-5 min bzw. mit 0,03 % Saponin für 5 min. Weiteres Waschen 3x 5 min in PBS folgte.

Anfärbung mit primären und sekundären Antikörpern:

Die Anfärbung mit primären und sekundären Antikörpern erfolgte analog der obigen Beschreibung. Die Absättigung mit GNS entfiel allerdings, und die Inkubationsdauer war jeweils nur 30 min in der feuchten Kammer und auf Eis. Als sekundärer Antikörper kam Fluresceingekoppelter sekundärer Antikörper aus Ziege, gerichtet gegen Kaninchen oder Maus verschiedener Emissionswellenlängen zum Einsatz (Alexa Fluor(R) 488 bzw. 568 nm), jeweils 1:200 in PBS verdünnt. Nach dem Anfärben wurden die Deckgläschen dreimal für 5 min in PBS bei RT (im dunkeln) gewaschen und in PVA-Lösung eingedeckt.

6.5 Herstellung von Rattenhirnhomogenat

Lösungen:

Sol A (gepufferte isotonische Saccharose): 5 mM Na-Hepes/HCL pH 7,4; 320 mM Saccharose

Zur Gewinnung von Rattenhirnhomogenat und zur weiteren Fraktionierung von Rattenhirngewebe wurden 6 Rattenvorderhirne (Wistar-Ratten, weiblich, 4-6 Wochen alt) präpariert und während der Präparation in Sol A auf Eis gelagert. Nach der Zugabe von 60-70 ml Sol A wurde in einem Glas-Teflon Homogenisator durch 12maliges Anheben und Absenken des

Kolbens bei 800 rpm ein Rohhomogenat hergestellt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 g_{max} (2400 rpm; Haereuszentrifuge) wurde ein postnukleärer Überstand hergestellt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test wurden Aliquots dieses Homogenats für den Nachweis von PS1 verwendet.

7 Literaturverzeichnis

- 1. Alzheimer, A. (1907) Allg. Z. Psychiatr. Psych. Gerichtl. Med. 64, 146-148
- 2. Katzman, R. (1983) Banbury Report 15, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- 3. Katzman, R. (1986) *N Engl J Med* **314**(15), 964-73
- Ott, A., Breteler, M. M., van Harskamp, F., Claus, J. J., van der Cammen, T. J., Grobbee, D. E., and Hofman, A. (1995) *Bmj* 310(6985), 970-3.
- 5. McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., and Stadlan, E. M. (1984) *Neurology* **34**(7), 939-44
- Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., and Hartmann, T. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10), 5856-61.
- 7. Terry, R. D., Peck, A., DeTeresa, R., Schechter, R., and Horoupian, D. S. (1981) *Ann Neurol* **10**(2), 184-92
- Mann, D. M. A., Iwatsubo, T., Ihara, Y., Cairns, N. J., Lantos, P. L., Bogdanovic, N., Lannfelt, L., Winblad, B., Maatschieman, M. L. C., and Rossor, M. N. (1996) Am J Pathol 148(4), 1257-1266
- 9. Roth, M., Tomlinson, B. E., and Blessed, G. (1966) *Nature* **209**(18), 109-10.
- 10. Divry, P., and Florkin, M. (1927) Soc. Biol. (Paris) 97, 1808-10
- 11. Virchow, R. (1854) Virchows Arch. 6(0), 135-138
- 12. Virchow, R. (1859) Cellularpathologie (0), 334-57, Berlin: Hirschwald
- 13. Friedreich, N., and Kekule, A. (1859) *Virchows Arch.* **16**(1), 50-56
- 14. Glenner, G. G., Eanes, E. D., Bladen, H. A., Linke, R. P., and Termine, J. D. (1974) J. *Histochem. Cytochem.* 22, 1141-58
- 15. Glenner, G. G. (1980) New. Engl. J. Med. 302, 1330-45
- Goedert, M., Sisodia, S. S., and Price, D. L. (1991) Curr Opin Neurobiol 1(3), 441-7 Issn: 0959-4388
- 17. Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (1998) Trends Cell Biol 8(11), 425-7.
- 18. Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984) Biochem Biophys Res Commun 120(3), 885-90
- 19. Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K. (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(12), 4245-9
- Rumble, B., Retallack, R., Hilbich, C., Simms, G., Multhaup, G., Martins, R., Hockey, A., Montgomery, P., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1989) N Engl J Med 320(22), 1446-52

- Davies, L., Wolska, B., Hilbich, C., Multhaup, G., Martins, R., Simms, G., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1988) *Neurology* 38(11), 1688-93.
- 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., Hulette, C., Crain, B., Goldgaber, D., and Roses, A. D. (1993) *Neurology* 43(8), 1467-72
- 23. Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., and Roses, A. D. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5), 1977-81
- Blacker, D., Wilcox, M. A., Laird, N. M., Rodes, L., Horvath, S. M., Go, R. C., Perry, R., Watson, B., Jr., Bassett, S. S., McInnis, M. G., Albert, M. S., Hyman, B. T., and Tanzi, R. E. (1998) *Nat Genet* 19(4), 357-60.
- 25. Wragg, M., Hutton, M., and Talbot, C. (1996) Lancet 347(9000), 509-12
- Goate, A., Chartier Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M., and Hardy, J. (1991) *Nature* 349(6311), 704-6
- Naruse, S., Igarashi, S., Kobayashi, H., Aoki, K., Inuzuka, T., Kaneko, K., Shimizu, T., Iihara, K., Kojima, T., Miyatake, T., and et al. (1991) *Lancet* 337(8747), 978-9 Issn: 0140-6736
- 28. Yoshioka, K., Miki, T., Katsuya, T., Ogihara, T., and Sakaki, Y. (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **178**(3), 1141-6.
- Levy, E., Carman, M. D., Fernandez, M. I., Power, M. D., Lieberburg, I., van, D. S., Bots,
 G. T., Luyendijk, W., and Frangione, B. (1990) *Science* 248(4959), 1124-6
- Van Broeckhoven, C., Haan, J., Bakker, E., Hardy, J. A., Van Hul, W., Wehnert, A., Vegter-Van der Vlis, M., and Roos, R. A. (1990) *Science* 248(4959), 1120-2.
- 31. Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., and Lannfelt, L. (1992) *Nat Genet* 1(5), 345-7
- 32. Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Mueller-Hill, B. (1987) *Nature* **325**(6106), 733-6
- 33. Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1989) *Cell* **57**(1), 115-26
- Goldgaber, D., Lerman, M. I., McBride, O. W., Saffiotti, U., and Gajdusek, D. C. (1987) Science 235(4791), 877-80
- 35. Salbaum, J. M., Weidemann, A., Lemaire, H. G., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1988) *Embo J* 7(9), 2807-13.
- 36. De Sauvage, F., and Octave, J. N. (1989) Science 245(4918), 651-3

- Golde, T. E., Estus, S., Usiak, M., Younkin, L. H., and Younkin, S. G. (1990) Neuron 4(2), 253-67.
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., and Ito, H. (1988) *Nature* 331(6156), 530-2
- Ponte, P., Gonzalez, D. P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I., and Fuller, F. (1988) *Nature* 331(6156), 525-7
- 40. Tanzi, R. E., McClatchey, A. I., Lamperti, E. D., Villa, K. L., Gusella, J. F., and Neve, R. L. (1988) *Nature* 331(6156), 528-30
- 41. Kang, J., and Muller, H. B. (1990) Biochem Biophys Res Commun 166(3), 1192-200
- 42. Oltersdorf, T., Fritz, L. C., Schenk, D. B., Lieberburg, I., Johnson, W. K., Beattie, E. C., Ward, P. J., Blacher, R. W., Dovey, H. F., and Sinha, S. (1989) *Nature* **341**(6238), 144-7
- 43. König, G., Salbaum, J. M., Wiestler, O., Lang, W., Schmitt, H. P., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1991) *Brain Res Mol Brain Res* **9**(3), 259-62
- 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) *Science* 235(4791), 880-4.
- 45. Goedert, M. (1987) Embo J 6(12), 3627-32
- Shivers, B. D., Hilbich, C., Multhaup, G., Salbaum, M., Beyreuther, K., and Seeburg, P. H. (1988) *Embo J* 7(5), 1365-70
- Bahmanyar, S., Higgins, G. A., Goldgaber, D., Lewis, D. A., Morrison, J. H., Wilson, M. C., Shankar, S. K., and Gajdusek, D. C. (1987) *Science* 237(4810), 77-80.
- Zimmermann, K., Herget, T., Salbaum, J. M., Schubert, W., Hilbich, C., Cramer, M., Masters, C. L., Multhaup, G., Kang, J., Lemaire, H. G., and et, a. l. (1988) *Embo J* 7(2), 367-72
- 49. Sandbrink, R., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1994) J Biol Chem 269(19), 14227-34
- 50. Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E., and Solomon, F. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22), 10758-62.
- 51. Wasco, W., Peppercorn, J., and Tanzi, R. E. (1993) Ann NY Acad Sci 695, 203-8
- 52. Luo, L. Q., Martin Morris, L. E., and White, K. (1990) *J Neurosci* **10**(12), 3849-61 Issn: 0270-6474
- 53. Daigle, I., and Li, C. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(24), 12045-9.
- 54. Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1990) Neurobiol Aging 11(1), 66-8
- Beyreuther, K., Bush, A. I., Dyrks, T., Hilbich, C., Konig, G., Monning, U., Multhaup, G., Prior, R., Rumble, B., Schubert, W., and et, a. l. (1991) Ann N Y Acad Sci 640(129), 129-39

- Hilbich, C., Kisters, W. B., Reed, J., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1991) *J Mol Biol* 218(1), 149-63
- 57. Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994) *Neuron* **13**(1), 45-53
- 58. Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P. J. (1990) *Science* **248**(4959), 1122-4
- 59. Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7), 3922-7.
- 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) *Science* 286(5440), 735-41.
- Shi, X. P., Chen, E., Yin, K. C., Na, S., Garsky, V. M., Lai, M. T., Li, Y. M., Platchek, M., Register, R. B., Sardana, M. K., Tang, M. J., Thiebeau, J., Wood, T., Shafer, J. A., and Gardell, S. J. (2001) *J Biol Chem* 276(13), 10366-73.
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaari, S. M., Wang, S., Walker, D., John, V., and et al. (1999) *Nature* 402(6761), 537-40.
- 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) *Mol Cell Neurosci* 14(6), 419-27.
- 64. Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(4), 1456-60.
- 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) *Nature* 402(6761), 533-7.
- 66. 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 al. (1992) *Nature* 359(6393), 322-5 Issn: 0028-0836
- Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C. M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H. H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A. I., Gandy, S. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L., and Younkin, S. G. (1996) *Neuron* 17(5), 1005-1013

- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P., and Selkoe, D. J. (1997) *Nat Med* 3(1), 67-72.
- Tomita, T., Maruyama, K., Saido, T. C., Kume, H., Shinozaki, K., Tokuhiro, S., Capell, A., Walter, J., Grunberg, J., Haass, C., Iwatsubo, T., and Obata, K. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(5), 2025-30.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C. M., Pereztur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M. N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J., and Younkin, S. (1996) *Nature* 383(6602), 710-713
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levylahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., and Younkin, S. (1996) *Nature Med* 2(8), 864-870
- 72. Haass, C., and Selkoe, D. J. (1993) Cell 75(6), 1039-42 Issn: 0092-8674
- 73. Golde, T. E., Estus, S., Younkin, L. H., Selkoe, D. J., and Younkin, S. G. (1992) *Science* **255**(5045), 728-30.
- 74. Estus, S., Golde, T. E., and Younkin, S. G. (1992) Ann N Y Acad Sci 674, 138-48.
- 75. Smith, R. P., Higuchi, D. A., and Broze, G. J. (1990) Science 248(4959), 1126-8
- 76. Robakis, N. K., Ramakrishna, N., Wolfe, G., and Wisniewski, H. M. (1987) *Proc Natl Acad Sci US A* **84**(12), 4190-4
- 77. Monard, D. (1988) Trends Neurosci 11(12), 541-4.
- Saitoh, T., Sundsmo, M., Roch, J. M., Kimura, N., Cole, G., Schubert, D., Oltersdorf, T., and Schenk, D. B. (1989) *Cell* 58(4), 615-22
- 79. Schubert, W., Prior, R., Weidemann, A., Dircksen, H., Multhaup, G., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1991) *Brain Res* **563**(1-2), 184-94 Issn: 0006-8993
- 80. Narindrasorasak, S., Lowery, D., Gonzalez DeWhitt, P., Poorman, R. A., Greenberg, B., and Kisilevsky, R. (1991) *J Biol Chem* **266**(20), 12878-83
- 81. Klier, F. G., Cole, G., Stallcup, W., and Schubert, D. (1990) Brain Res 515(1-2), 336-42
- Beher, D., Hesse, L., Masters, C. L., and Multhaup, G. (1996) J Biol Chem 271(3), 1613-1620
- Multhaup, G., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1993) *Biol Chem Hoppe Seyler* 374(1), 1-8
- 84. Bush, A. I., Martins, R. N., Rumble, B., Moir, R., Fuller, S., Milward, E., Currie, J., Ames, D., Weidemann, A., Fischer, P., and et, a. l. (1990) *J Biol Chem* **265**(26), 15977-83

- 85. Fossgreen, A., Bruckner, B., Czech, C., Masters, C. L., Beyreuther, K., and Paro, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci US A* **95**(23), 13703-8.
- Annaert, W. G., Levesque, L., Craessaerts, K., Dierinck, I., Snellings, G., Westaway, D., George-Hyslop, P. S., Cordell, B., Fraser, P., and De Strooper, B. (1999) *J Cell Biol* 147(2), 277-94.
- 87. Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1996) *Science* **271**(5254), 1406-1409
- 88. Hesse, L., Beher, D., Masters, C. L., and Multhaup, G. (1994) FEBS Lett 349(1), 109-16.
- 89. Shimokawa, M., Yanagisawa, K., Nishiye, H., and Miyatake, T. (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **196**(1), 240-4
- Marquez Sterling, N. R., Lo, A. C. Y., Sisodia, S. S., and Koo, E. H. (1997) *J Neurosci* 17(1), 140-51
- Ikin, A. F., Annaert, W. G., Takei, K., De Camilli, P., Jahn, R., Greengard, P., and Buxbaum, J. D. (1996) *J Biol Chem* 271(50), 31783-31786
- 92. Masliah, E., Mallory, M., Ge, N., and Saitoh, T. (1992) Brain Res 593(2), 323-8
- 93. Ferreira, A., Caceres, A., and Kosik, K. S. (1993) J Neurosci 13(7), 3112-23
- 94. Storey, E., Spurck, T., Pickett Heaps, J., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1996) *Brain Res* **735**(1), 59-66
- 95. Koo, E. H., Sisodia, S. S., Archer, D. R., Martin, L. J., Weidemann, A., Beyreuther, K., Fischer, P., Masters, C. L., and Price, D. L. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(4), 1561-5 Issn: 0027-8424
- 96. Simons, M., Ikonen, E., Tienari, P. J., Cid Arregui, A., Monning, U., Beyreuther, K., and Dotti, C. G. (1995) *J Neurosci Res* **41**(1), 121-8
- 97. Yamazaki, T., Selkoe, D. J., and Koo, E. H. (1995) J Cell Biol 129(2), 431-442
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., and et al. (1995) *Nature* 375(6534), 754-60 issn: 0028-0836
- Schellenberg, G. D., Bird, T. D., Wijsman, E. M., Orr, H. T., Anderson, L., Nemens, E., White, J. A., Bonnycastle, L., Weber, J. L., Alonso, M. E., and et, a. l. (1992) Science 258(5082), 668-71
- 100. Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., and et al. (1995) *Nature* 376(6543), 775-8 issn: 0028-0836
- 101. Wasco, W., Pettingell, W. P., Jondro, P. D., Schmidt, S. D., Gurubhagavatula, S., Rodes, L., DiBlasi, T., Romano, D. M., Guenette, S. Y., Kovacs, D. M., and et al. (1995) *Nat Med* 1(9), 848.

- 102. Clark, R. F., and Group, a. t. A. s. D. C. (1995) Nat Genet 11(2), 219-22
- 103. Alzheimer's Disease Collaborative Group. (1995) Nature Genetics 11, 219-222
- Fraser, P. E., Yang, D. S., Yu, G., Levesque, L., Nishimura, M., Arawaka, S., Serpell, L. C., Rogaeva, E., and St George-Hyslop, P. (2000) *Biochim Biophys Acta* 1502(1), 1-15.
- 105. Doan, A., Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Slunt, H. H., Ratovitsky, T., Podlisny, M., Selkoe, D. J., Seeger, M., Gandy, S. E., Price, D. L., and Sisodia, S. S. (1996) *Neuron* 17(5), 1023-1030
- 106. Li, X. J., and Greenwald, I. (1996) Neuron 17(5), 1015-1021
- 107. Li, X., and Greenwald, I. (1998) Proc Natl Acad Sci US A 95(12), 7109-14.
- 108. Lehmann, S., Chiesa, R., and Harris, D. A. (1997) J Biol Chem 272(18), 12047-51.
- 109. Dewji, N. N., and Singer, S. J. (1997) Proc Natl Acad Sci U S A 94(25), 14025-30.
- De Strooper, B., Beullens, M., Contreras, B., Levesque, L., Craessaerts, K., Cordell, B., Moechars, D., Bollen, M., Fraser, P., George-Hyslop, P. S., and Van Leuven, F. (1997) J Biol Chem 272(6), 3590-8.
- 111. Levitan, D., and Greenwald, I. (1995) Nature 377(6547), 351-4 issn: 0028-0836
- 112. 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) *Neuron* 17(1), 181-190
- Podlisny, M. B., Citron, M., Amarante, P., Sherrington, R., Xia, W., Zhang, J., Diehl, T., Levesque, G., Fraser, P., Haass, C., Koo, E. H., Seubert, P., St George-Hyslop, P., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1997) *Neurobiol Dis* 3(4), 325-37
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999) *Nature* 398(6727), 513-7.
- 115. Beher, D., Wrigley, J. D., Nadin, A., Evin, G., Masters, C. L., Harrison, T., Castro, J. L., and Shearman, M. S. (2001) *J Biol Chem* **276**(48), 45394-402.
- Ratovitski, T., Slunt, H. H., Thinakaran, G., Price, D. L., Sisodia, S. S., and Borchelt, D. R. (1997) *J Biol Chem* 272(39), 24536-41.
- 117. Thinakaran, G., Harris, C. L., Ratovitski, T., Davenport, F., Slunt, H. H., Price, D. L., Borchelt, D. R., and Sisodia, S. S. (1997) *J Biol Chem* 272(45), 28415-22.
- 118. Steiner, H., Romig, H., Grim, M. G., Philipp, U., Pesold, B., Citron, M., Baumeister, R., and Haass, C. (1999) *J Biol Chem* 274(12), 7615-8.
- Loetscher, H., Deuschle, U., Brockhaus, M., Reinhardt, D., Nelboeck, P., Mous, J., Grunberg, J., Haass, C., and Jacobsen, H. (1997) *J Biol Chem* 272(33), 20655-9.
- 120. Kim, T. W., Pettingell, W. H., Jung, Y. K., Kovacs, D. M., and Tanzi, R. E. (1997) *Science* **277**(5324), 373-6.

- Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D. J., and Haass, C. (1998) *J Biol Chem* 273(6), 3205-11.
- 122. Steiner, H., Romig, H., Pesold, B., Philipp, U., Baader, M., Citron, M., Loetscher, H., Jacobsen, H., and Haass, C. (1999) *Biochemistry* **38**(44), 14600-5.
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. L., Baumeister, R., Fechteler, K., and Haass, C. (2000) Nat Cell Biol 2(11), 848-51.
- 124. Kovacs, D. M., Fausett, H. J., Page, K. J., Kim, T. W., Moir, R. D., Merriam, D. E., Hollister, R. D., Hallmark, O. G., Mancini, R., Felsenstein, K. M., Hyman, B. T., Tanzi, R. E., and Wasco, W. (1996) *Nat Med* 2(2), 224-9
- Walter, J., Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Schindzielorz, A., Prior, R., Podlisny, M. B., Fraser, P., Hyslop, P. S., Selkoe, D. J., and Haass, C. (1996) *Mol Med* 2(6), 673-91.
- 126. Beher, D., Elle, C., Underwood, J., Davis, J. B., Ward, R., Karran, E., Masters, C. L., Beyreuther, K., and Multhaup, G. (1999) J Neurochem 72(4), 1564-73.
- Efthimiopoulos, S., Floor, E., Georgakopoulos, A., Shioi, J., Cui, W., Yasothornsrikul, S., Hook, V. Y., Wisniewski, T., Buee, L., and Robakis, N. K. (1998) *J Neurochem* 71(6), 2365-72.
- 128. Xia, W., Zhang, J., Ostaszewski, B. L., Kimberly, W. T., Seubert, P., Koo, E. H., Shen, J., and Selkoe, D. J. (1998) *Biochemistry* **37**(47), 16465-71.
- 129. Wild-Bode, C., Yamazaki, T., Capell, A., Leimer, U., Steiner, H., Ihara, Y., and Haass, C. (1997) *J Biol Chem* **272**(26), 16085-8.
- Hartmann, T., Bieger, S. C., Bruhl, B., Tienari, P. J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G. W., Masters, C. L., Dotti, C. G., Unsicker, K., and Beyreuther, K. (1997) *Nat Med* 3(9), 1016-20.
- 131. Weidemann, A., Paliga, K., Durrwang, U., Czech, C., Evin, G., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1997) *Nat Med* **3**(3), 328-32.
- Xia, W., Zhang, J., Perez, R., Koo, E. H., and Selkoe, D. J. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(15), 8208-13.
- 133. Thinakaran, G., Regard, J. B., Bouton, C. M., Harris, C. L., Price, D. L., Borchelt, D. R., and Sisodia, S. S. (1998) *Neurobiol Dis* 4(6), 438-53.
- Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L., and De Strooper, B. (2000) Nat Cell Biol 2(7), 461-2.
- 135. Ray, W. J., Yao, M., Mumm, J., Schroeter, E. H., Saftig, P., Wolfe, M., Selkoe, D. J., Kopan, R., and Goate, A. M. (1999) *J Biol Chem* 274(51), 36801-7.

- 136. Li, Y. M., Lai, M. T., Xu, M., Huang, Q., DiMuzio-Mower, J., Sardana, M. K., Shi, X. P., Yin, K. C., Shafer, J. A., and Gardell, S. J. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11), 6138-43.
- 137. Li, Y. M., Xu, M., Lai, M. T., Huang, Q., Castro, J. L., DiMuzio-Mower, J., Harrison, T., Lellis, C., Nadin, A., Neduvelil, J. G., Register, R. B., Sardana, M. K., Shearman, M. S., Smith, A. L., Shi, X. P., Yin, K. C., Shafer, J. A., and Gardell, S. J. (2000) *Nature* 405(6787), 689-94.
- 138. Esler, W. P., Kimberly, W. T., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Moore, C. L., Tsai, J. Y., Rahmati, T., Xia, W., Selkoe, D. J., and Wolfe, M. S. (2000) *Nat Cell Biol* 2(7), 428-34.
- Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V. A., and Priess, J. R. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2), 775-9.
- 140. Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M. C., Parks, A. L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R. L., Himes, C. S., Hiebsch, R., Ruble, C., Nye, J. S., and Curtis, D. (2002) *Dev Cell* 3(1), 85-97.
- Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., and Haass, C. (2002) *J Biol Chem* 277(42), 39062-5.
- 142. 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) *Nature* **398**(6727), 518-22.
- 143. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999) Science 284(5415), 770-6.
- 144. Lammich, S., Okochi, M., Takeda, M., Kaether, C., Capell, A., Zimmer, A. K., Edbauer, D., Walter, J., Steiner, H., and Haass, C. (2002) *J Biol Chem* 277(47), 44754-9.
- 145. Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J., and Tonegawa, S. (1997) *Cell* 89(4), 629-39.
- Wong, P. C., Zheng, H., Chen, H., Becher, M. W., Sirinathsinghji, D. J., Trumbauer, M. E., Chen, H. Y., Price, D. L., Van der Ploeg, L. H., and Sisodia, S. S. (1997) *Nature* 387(6630), 288-92.
- 147. Okochi, M., Eimer, S., Bottcher, A., Baumeister, R., Romig, H., Walter, J., Capell, A., Steiner, H., and Haass, C. (2000) *J Biol Chem* 275(52), 40925-32.
- 148. Herreman, A., Hartmann, D., Annaert, W., Saftig, P., Craessaerts, K., Serneels, L., Umans, L., Schrijvers, V., Checler, F., Vanderstichele, H., Baekelandt, V., Dressel, R., Cupers, P., Huylebroeck, D., Zwijsen, A., Van Leuven, F., and De Strooper, B. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21), 11872-7.
- Baumeister, R., Leimer, U., Zweckbronner, I., Jakubek, C., Grunberg, J., and Haass, C. (1997) *Genes Funct* 1(2), 149-59.

- 150. Levitan, D., Doyle, T. G., Brousseau, D., Lee, M. K., Thinakaran, G., Slunt, H. H., Sisodia, S. S., and Greenwald, I. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(00), 14940-14944
- 151. Ye, Y., Lukinova, N., and Fortini, M. E. (1999) Nature 398(6727), 525-9.
- 152. Struhl, G., and Greenwald, I. (1999) Nature 398(6727), 522-5.
- 153. Mattson, M. P., Guo, Q., Furukawa, K., and Pedersen, W. A. (1998) *J Neurochem* 70(1), 1-14.
- 154. Price, D. L., and Sisodia, S. S. (1998) Annu Rev Neurosci 21, 479-505
- 155. Yu, G., Chen, F., Levesque, G., Nishimura, M., Zhang, D. M., Levesque, L., Rogaeva, E., Xu, D., Liang, Y., Duthie, M., St George-Hyslop, P. H., and Fraser, P. E. (1998) *J Biol Chem* 273(26), 16470-5.
- 156. 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., Aebersold, R., Farrer, L. S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., and St George-Hyslop, P. (2000) *Nature* **407**(6800), 48-54.
- 157. Buxbaum, J. D., Choi, E. K., Luo, Y., Lilliehook, C., Crowley, A. C., Merriam, D. E., and Wasco, W. (1998) *Nat Med* 4(10), 1177-81.
- 158. Kirschenbaum, F., Hsu, S. C., Cordell, B., and McCarthy, J. V. (2001) *J Biol Chem* **276**(10), 7366-75.
- 159. Zhou, J., Liyanage, U., Medina, M., Ho, C., Simmons, A. D., Lovett, M., and Kosik, K. S. (1997) *Neuroreport* 8(6), 1489-94.
- 160. Stahl, B., Diehlmann, A., and Sudhof, T. C. (1999) J Biol Chem 274(14), 9141-8.
- 161. Levesque, G., Yu, G., Nishimura, M., Zhang, D. M., Levesque, L., Yu, H., Xu, D., Liang, Y., Rogaeva, E., Ikeda, M., Duthie, M., Murgolo, N., Wang, L., VanderVere, P., Bayne, M. L., Strader, C. D., Rommens, J. M., Fraser, P. E., and St George-Hyslop, P. (1999) J Neurochem 72(3), 999-1008.
- 162. Murayama, M., Tanaka, S., Palacino, J., Murayama, O., Honda, T., Sun, X., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Wolozin, B., and Takashima, A. (1998) *FEBS Lett* **433**(1-2), 73-7.
- 163. Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., and Kikuchi, A. (1998) *Embo J* 17(5), 1371-84.
- 164. Dale, T. C. (1998) *Biochem J* **329**(Pt 2), 209-23.
- 165. Wodarz, A., and Nusse, R. (1998) Annu Rev Cell Dev Biol 14, 59-88
- 166. Bullions, L. C., and Levine, A. J. (1998) Curr Opin Oncol 10(1), 81-7.
- 167. Nusse, R., and Varmus, H. E. (1992) Cell 69(7), 1073-87.
- 168. Huelsken, J., and Birchmeier, W. (2001) Curr Opin Genet Dev 11(5), 547-53.

- 169. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997) *Embo J* 16(13), 3797-804.
- 170. Yost, C., Torres, M., Miller, J. R., Huang, E., Kimelman, D., and Moon, R. T. (1996) Genes Dev 10(12), 1443-54.
- 171. Maniatis, T. (1999) Genes Dev 13(5), 505-10.
- Zhang, Z., Hartmann, H., Do, V. M., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., van de Wetering, M., Clevers, H., Saftig, P., De Strooper, B., He, X., and Yankner, B. A. (1998) *Nature* 395(6703), 698-702.
- 173. Weihl, C. C., Ghadge, G. D., Kennedy, S. G., Hay, N., Miller, R. J., and Roos, R. P. (1999) *J Neurosci* **19**(13), 5360-9.
- Kang, D. E., Soriano, S., Frosch, M. P., Collins, T., Naruse, S., Sisodia, S. S., Leibowitz, G., Levine, F., and Koo, E. H. (1999) *J Neurosci* 19(11), 4229-37.
- 175. Killick, R., Pollard, C. C., Asuni, A. A., Mudher, A. K., Richardson, J. C., Rupniak, H. T., Sheppard, P. W., Varndell, I. M., Brion, J. P., Levey, A. I., Levy, O. A., Vestling, M., Cowburn, R., Lovestone, S., and Anderton, B. H. (2001) *J Biol Chem* 276(51), 48554-61.
- 176. Nishimura, M., Yu, G., Levesque, G., Zhang, D. M., Ruel, L., Chen, F., Milman, P., Holmes, E., Liang, Y., Kawarai, T., Jo, E., Supala, A., Rogaeva, E., Xu, D. M., Janus, C., Levesque, L., Bi, Q., Duthie, M., Rozmahel, R., Mattila, K., Lannfelt, L., Westaway, D., Mount, H. T., Woodgett, J., St George-Hyslop, P., and et al. (1999) *Nat Med* 5(2), 164-9.
- 177. Klein, P. S., and Melton, D. A. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(16), 8455-9.
- 178. Stambolic, V., Ruel, L., and Woodgett, J. R. (1996) Curr Biol 6(12), 1664-8.
- 179. Kirschenbaum, F., Hsu, S. C., Cordell, B., and McCarthy, J. V. (2001) *J Biol Chem* **276**(33), 30701-7.
- Capell, A., Meyn, L., Fluhrer, R., Teplow, D. B., Walter, J., and Haass, C. (2002) J Biol Chem 277(7), 5637-43.
- Walter, J., Grunberg, J., Schindzielorz, A., and Haass, C. (1998) *Biochemistry* 37(17), 5961-7.
- 182. Takashima, A., Sato, M., Mercken, M., Tanaka, S., Kondo, S., Honda, T., Sato, K., Murayama, M., Noguchi, K., Nakazato, Y., and Takahashi, H. (1996) *Biochem Biophys Res Commun* 227(2), 423-6.
- 183. Palacino, J. J., Murphy, M. P., Murayama, O., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Takashima, A., Golde, T. E., and Wolozin, B. (2001) *J Biol Chem* 276(42), 38563-9.
- 184. Steiner, H., Capell, A., Pesold, B., Citron, M., Kloetzel, P. M., Selkoe, D. J., Romig, H., Mendla, K., and Haass, C. (1998) *J Biol Chem* 273(48), 32322-31.

- 185. Georgakopoulos, A., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Shioi, J., Cui, W., Li, H. C., Schutte, M., Gordon, R., Holstein, G. R., Martinelli, G., Mehta, P., Friedrich, V. L., Jr., and Robakis, N. K. (1999) *Mol Cell* 4(6), 893-902.
- 186. Stewart, D. B., and Nelson, W. J. (1997) J Biol Chem 272(47), 29652-62.
- 187. Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., Garcia de Herreros, A., and Dunach, M. (1999) J Biol Chem 274(51), 36734-40.
- 188. Sun, X., Sato, S., Murayama, O., Murayama, M., Park, J. M., Yamaguchi, H., and Takashima, A. (2002) *Neurosci Lett* **321**(1-2), 61-4.
- 189. Dotti, C. G., and Simons, K. (1990) Cell 62(1), 63-72.
- 190. Hanahan, D. (1983) J Mol Biol 166(4), 557-80
- 191. Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986) *J Mol Biol* 189(1), 113-30.
- Hartmann, T., Bergsdorf, C., Sandbrink, R., Tienari, P. J., Multhaup, G., Ida, N., Bieger, S., Dyrks, T., Weidemann, A., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1996) *J Biol Chem* 271(22), 13208-14.
- 193. Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schroder, J., Zerfass, R., Forstl, H., Sandbrink, R., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1996) *J Biol Chem* 271(37), 22908-14.
- 194. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molekular Cloning, A Laboratory Manual 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- 195. Laemmli, U. K. (1970) Nature 227(259), 680-5
- 196. Schagger, H., and von Jagow, G. (1987) Anal Biochem 166(2), 368-79.
- 197. Fairbanks, G., Steck, T. L., and Wallach, D. F. (1971) *Biochemistry* **10**(13), 2606-17
- 198. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Proc Natl Acad Sci US A 76(9), 4350-4
- 199. Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. (1983) *Nucleic Acids Res* 11(5), 1475-89.
- 200. Dobberstein, B., Garoff, H., Warren, G., and Robinson, P. J. (1979) Cell 17(4), 759-69