# Interaktionen der molekularen Lipidumgebung mit dem Alzheimer Amyloid-Vorläuferprotein

## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von Diplom-Biologe Oliver Schmitt aus Karlsdorf-Neuthard

2007

# Interaktionen der molekularen Lipidumgebung mit dem Alzheimer Amyloid-Vorläuferprotein

## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von Diplom-Biologe Oliver Schmitt aus

Karlsdorf-Neuthard

## Tag der mündlichen Prüfung:

# Interaktionen der molekularen Lipidumgebung mit dem Alzheimer Amyloid-Vorläuferprotein

Gutachter: Prof. Dr. F. T. Wieland Gutachter: Prof. Dr. W. Nickel

# INHALTSVERZEICHNIS

1	1 ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT				
1.1	Zus	sammenfassung	1		
1.2	Ab	stract	3		
2	EINL	EITUNG	5		
2.1	Die	Alzheimer Krankheit	5		
2	.1.1	Epidemiologie der Alzheimer Krankheit	5		
2	.1.2	Histologische Veränderungen im Gehirn	6		
2	.1.3	Genetik der Alzheimer Krankheit	9		
2.2	Das	s Amyloid-Vorläuferprotein (APP)	11		
2	.2.1	APP und die APP Genfamilie	11		
2	.2.2	Modifikationen und proteolytische Prozessierung von APP	14		
2.3	Pre	seniline, γ-Sekretase und die regulierte intramembranöse Proteolyse	18		
2	.3.1	Preseniline	18		
2	.3.2	γ-Sekretase	19		
2	.3.3	Die regulierte intramembranöse Proteolyse	22		
2.4	Lip	ide und Alzheimer Krankheit	24		
3	FRAG	GESTELLUNG DER ARBEIT	29		
4	ERG	EBNISSE	30		
4.1	Un	tersuchung der molekularen Membranumgebung von photoaktivierbarem C99	30		
4	.1.1	Vorarbeiten zur in vitro Translation von photolabilem C99 (durchgeführt von Dr. Liyun Zhao)	32		
4	.1.2	Konstruktion von SP-C99* mit optimierter Signalsequenz in pcDNA3.1 Vektoren	33		
4	.1.3	Optimierung der Suppressionsbedingungen in der in vitro Translation	34		
4.	.1.4	In vitro Translation und Membraninsertion von SP-C99*	35		
4	.1.5	Crosslink Experimente mit photoreaktiven Aminosäurederivaten	36		
4	.1.6	Verdau des Crosslink Produkts mit Phospholipase A2	38		

4.2 He	rstellung von stabilen N2a Zelllinien mit schaltbarer SP-C99* Expression	38
4.2.1	Klonierung eines bicistronischen Vektors mit SP-C99* und eGFP	40
4.2.2	Transduktionen und Sortierungen von TAM2 bzw. SP-C99* positiven N2a Zellen	40
4.2.3	Analyse der N2a <sub>SP-C99*</sub> Zelllinien	43
4.2.3.	1 FACS Experimente	43
4.2.3.2	2 Western Blot	45
4.2.3.	3 Immunfluoreszenz	47
4.3 Na	chweis von C83/C99/APP in Präparationen von Detergens resistenten Membranen	49
4.4 Ve	rgleich der subzellulären Lokalisation verschiedener C99 Spezies in Vero-Zellen	52
4.5 Fü	tterungsexperimente mit photoaktivierbaren Lipidvorläufern	57
4.5.1	Kinetik der Markierung von SP-C99* Wildtyp mit 10-azi-Stearinsäure	58
4.5.2	Markierung verschiedener SP-C99* Spezies mit photolabilen Lipidvorläufermolekülen	60
4.5.3	Versuch der massenspektrometrischen Identizierung des an SP-C99* quervernetzten Lipids	62
4.5.4	Fütterungsexperiment mit radioaktiven photoaktivierbaren Lipidvorläufern	63
4.6 Ma	akiennaan oon SD C004 een ainiinaan dan COS7 Zellen mit na disalatioon ahataaktirinaha	
4.0 Ma	rkierungen von SF-C99 <sup>°°</sup> -exprimierenden COS/-Zenen mit radioaktiven, photoaktivierba	ren 66
Lipiuvoria	lurer molekulen	00
4.7 La	beling von γ-Sekretase-Untereinheiten mit radioaktiven photoaktivierbaren Lipidvorläufe	rn in
SH-SY5Y	Zellen	67
5 DISK	USSION	72
- 1 (200		
5.1 (299		74
5.2 v-Sekr	etase	80
, ~		
6 MAT	ERIAL UND METHODEN	84
6.1 Ve	rwendetes Material	84
6.1.1	Chemikalien	84
6.1.2	Radiochemikalien	85
6.1.3	Nährmedien	86
6.1.4	Wasser/Puffer/Lösungen	86
6.1.5	Oligonukleotide und Sequenzierung	87
6.1.6	Plasmide	88
6.1.7	Primärantikörper	88
6.1.8	Sekundärantikörper	90
610	Prokarovntische Zellen	91

6.1.10	Eukaroyntische Zellen	91
6.1.11	Materialien für molekularbiologische Experimente	91
6.1.12	Materialien für biochemische Experimente	92
6.1.13	Materialien für zellbiologische Experimente	93
6.1.14	Geräte	93
6.2 Me	thoden	94
6.2.1	Molekularbiologische Methoden	94
6.2.1.	1 Präparation von DNA	94
6.2.1.	2 Reinigung von PCR-Produkten und Umpufferung von DNA-Fragmenten	94
6.2.1.	3 DNA-Aufreinigung aus Agarose-Gelen	95
6.2.1.	4 Phenol-Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA	95
6.2.1.	5 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen	95
6.2.1.	6 Restriktionsverdau von DNA (Sambrook et al., 1989)	96
6.2.1.	7 Dephosphorylierung überstehender DNA-Enden (Sambrook et al., 1989)	96
6.2.1.	8 Ligation von DNA-Fragmenten (Sambrook et al., 1989)	97
6.2.1.	9 Transformation von DH5 $\alpha$ -Zellen mit Plasmid-DNA (Hanahan, 1983)	97
6.2.1.	10 Polymerase Kettenreaktion	98
6.2.1.	11 Ortsspezifische Mutagenese	99
6.2.1.	12 Klonierung der verwendeten Plasmide	100
6.2.1.	13 In Vitro Transkription	103
6.2.1.	14 In Vitro Translation	105
6.2.2	Elektrophoretische Methoden	107
6.2.2.	1 Agarose-Gel Elektrophorese	107
6.2.2.	2 Invitrogen 10-20% Tris/Tricine Gele	108
6.2.2.	3 TBE-Harnstoff Gele	108
6.2.3	Immunologische Methoden	108
6.2.3.	1 Western Blotting	108
6.2.3.	2 Immunpräzipitation	111
6.2.3.	3 Immunfluoreszenz	113
6.2.4	Biochemische Methoden	114
6.2.4.	1 Proteinbestimmung nach Lowry	114
6.2.4.	2 Isolierung von Detergens resistenten Membranbereichen (DRMs)	115
6.2.4.	3 Herstellung von Methyl-β-Cyclodextrin-komplexiertem [ <sup>3</sup> H]-photo-Cholesterin	116
6.2.4.	4 Herstellung einer chemisch (Tmd)Phe-aminoacylierten Amber-Suppressor-tRNA	116
6.2.4.	5 Phospholipase A2 Verdau	117
6.2.5	Zellbiologische Methoden	117
6.2.5.	l Kultur von Zellen	117
6.2.5.	2 Transfektion von COS7-Zellen (Invitrogen, Lipofectin Manual)	118
6.2.5.	3 Transfektion von Vero-Zellen (Elektroporation)	118

	6.2.5.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen	119
	6.2.5.6 Virusproduktion	120
	6.2.5.7 Transduktion	120
	6.2.5.8 FACS-Sortierungen	121
	6.2.5.9 Photochemische in vivo Markierung von N2a Zellen mit Lipidvorläufern	121
	6.2.5.10 Photochemische in vivo Markierung von Zellen mit radioaktiven Lipidvorläufern	122
7	LITERATURVERZEICHNIS	124

### 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

145

### **1 ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT**

#### 1.1 Zusammenfassung

Die Alzheimer Krankheit ("Alzheimer's Disease" = AD) ist eine weitverbreitete neurodegenerative Erkrankung des Nervensystems. Von zentraler Bedeutung für die Pathogenese ist eine veränderte proteolytische Freisetzung des Amyloid- $\beta$  Peptids (A $\beta$ ) aus dem Amyloid-Vorläuferprotein ("Amyloid Precursor Protein" = APP), da die Aggregation von A $\beta$  nach gängiger Meinung eine neuropathologische Kaskade auslöst. APP wird in der Zelle durch verschiedene als Sekretasen bezeichnete Proteasen prozessiert, wobei zwei proteolytische Szenarien möglich sind. Im nicht amyloidogenen Abbau wird APP innerhalb der A $\beta$ -Sequenz von der  $\alpha$ -Sekretase geschnitten, wodurch die Entstehung des pathologischen A $\beta$  Peptids verhindert wird. Die amyloidogene Prozessierung wird initiiert durch die Aktivität einer  $\beta$ -Sekretase, die APP aminoterminal (N-terminal) von A $\beta$  spaltet. Die Entscheidung, über welchen der beiden Proteolysewege APP abgebaut wird, wird maßgeblich durch Lipide reguliert.

In beiden Prozessierungsrouten wird jeweils eine große N-terminale Domäne ins Lumen bzw. extrazellulär freigesetzt, während das resultierende carboxyterminale (C-terminale) Fragment membranverankert bleibt. Diese C-terminalen Fragmente sind Substrate für eine sogenannte  $\gamma$ -Sekretase. Im Falle des amyloidogenen Abbaus wird das 99 Aminosäuren (AS) lange, membrangebundene Fragment (C99) C-terminal von A $\beta$  geschnitten und somit das Peptid aus der Membran freisetzt. Diese zweite Proteolyse ist heterogen und resultiert hauptsächlich in A $\beta$ -Spezies mit einer Länge von entweder 40 oder 42 AS. Die APP Mutationen London und Florida führen zu einem erhöhten A $\beta_{42}/A\beta_{40}$  Verhältnis und verursachen eine besonders schwere Form von AD, da die Entstehung von A $\beta_{42}$ , das stärker zur Aggregation neigt, der initiierende Schritt in der AD Pathogenese zu sein scheint. Die molekulare und zelluläre Basis des APP Transports, der Prozessierung und der A $\beta$  Produktion sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Komponenten, die mit C99 innerhalb der Lipidmembran interagieren. In einem *in vitro* System mit an spezifischen Positionen photoaktivierbarem, in Mikrosomenmembranen inseriertem C99, konnte bei UV-Bestrahlung eine Quervernetzung mit Phosphoglycerolipiden beobachtet werden. Dieses Ergebnis wurde in C99-exprimierenden N2a Zellen, die mit photolabilen und radioaktiven Lipidvorstufen markiert wurden, *in vivo* verifiziert. So interagierten C99 Moleküle mit Lipiden, die aus einem photolabilen Derivat der Stearinsäure aufgebaut waren, nicht aber mit radioaktiven, photoaktivierbaren Derivaten von Phosphatidylcholin (PC), Sphingolipiden oder Cholesterin. Während endogenes APP in Präparationen von Detergens resistenten Membranbereichen (DRMs) zu einem geringen Prozentsatz mit DRMs assoziiert vorliegt, konnte überexprimiertes C99 nicht in DRMs nachgewiesen werden. Die subzelluläre Lokalisation von C99 ist in der Literatur sehr umstritten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fusionsproteine aus YFP ("yellow fluorescent protein") oder CFP ("cyan fluorescent protein") mit C99 in Vero Zellen im Golgi-Apparat lokalisiert sind. C99 Wildtyp und C99 mit den pathogenen Mutationen London und Florida verhielten sich in Crosslink-Experimenten, der subzellulären Verteilung und in Präparationen von DRMs identisch.

In einem Markierungsexperiment von SH-SY5Y-Zellen mit photolabilen Lipidvorläufer-Molekülen wurde von den fünf Komponenten der  $\gamma$ -Sekretase nur glykosyliertes Nicastrin (Nct) mit [<sup>3</sup>H]-photo-Cholesterin markiert, während mit nichtglykosyliertem Nct oder den weiteren  $\gamma$ -Sekretase Untereinheiten keine Interaktion mit Cholesterin detektiert werden konnte. Reifes Nct wurde zusammen mit einem weiteren, noch nicht identifizierten Protein, mit [<sup>3</sup>H]-photo-Sphingosin markiert. Demgegenüber war die Interaktion von Nct mit [<sup>3</sup>H]photo-Phosphatidylcholin war nur sehr schwach und zeigte keine Präferenz für reifes oder unreifes Nct. Demnach scheint mindestens eine Komponente der  $\gamma$ -Sekretase eine hohe Affinität für Raft-Lipide zu haben, während C99 offensichtlich hauptsächlich außerhalb von DRMs existiert. Geringe Mengen von C99, das mit DRMs assoziiert vorliegt, könnten zur Produktion von A $\beta_{42}$  führen, was aber noch genauer untersucht werden muss.

#### 1.2 Abstract

Alzheimer's Disease (AD) is a widespread neurodegenerative disorder of the nervous system. An essential event in the pathogenesis of AD is a change in the proteolysis of amyloid precursor protein (APP) to produce amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ), aggregation of which is generally believed to initiate a neurotoxic cascade. APP is processed in the cell by several proteases, called secretases, which are partially lipid-regulated. One of at least two possible APP cleavage pathways generates the membrane-bound C-terminal fragment C99, which is a substrate for  $\gamma$ -secretase and leads to A $\beta$  production. This second cleavage step is heterogeneous, mainly resulting in A $\beta$  species of either 40 or 42 amino acids. APP London and Florida mutations show an increase in the A $\beta_{42}/A\beta_{40}$  ratio and cause a very severe form of AD. The generation of A $\beta_{42}$ , which is prone to aggregation, seems to be an initial step in AD pathogenesis. However, the molecular and cellular basis of APP trafficking and processing, and A $\beta$  generation are still not fully understood.

It was the aim of this work to elucidate components directly interacting with C99 in the membrane bilayer. To this end a photoactivatable amino acid was introduced at various defined positions within different C99 species in an *in vitro* site-directed photocrosslinking approach. We found a specific interaction of C99 with a phosphoglycerolipid of the membrane. This interaction was verified in an *in vivo* labeling experiment with photolabile lipid precursors and N2a cells expressing C99. C99 crosslinked to a phosphoglycerolipid generated from a photoactivatable derivative of stearic acid, whereas no C99 labeling with the radioactive photolabile derivatives of phosphatidylcholine, sphingosine or cholesterol could be detected. While endogeneous APP was associated to some degree with detergent resistant membranes (DRMs), overexpressed C99 was not detectable in DRMs. In the literature the subcellular localization of C99 is still highly debated. The data in this work demonstrate that fusion proteins of YFP (yellow fluorescent protein) or CFP (cyan fluorescent protein) with C99 located to the Golgi apparatus of Vero cells. C99 wild type and C99 with the pathogenic mutations London and Florida showed no differences in crosslink experiments, subcellular localization or in preparations of DRMs.

In a labeling experiment of SH-SY5Y cells with the photolabile lipid precursors, only one of five components of the  $\gamma$ -secretase was labeled with [<sup>3</sup>H]-photo-cholesterol. This subunit was the mature highly glycosylated form of nicastrin (Nct), whereas immature Nct and other components of the secretase were not crosslinked to the photolabile lipid. Along with a still

unidentified protein, mature Nct was also labeled with [<sup>3</sup>H]-photo-sphingosine. On the other hand, the interaction of Nct with [<sup>3</sup>H]-photo-phosphatidylcholine was only weak and showed no preference for mature or immature Nct. Therefore at least one  $\gamma$ -secretase component seems to possess a high affinity for raft lipids, whereas C99 exists predominantly outside of rafts. Small amounts of C99 associated with DRMs could lead to A $\beta_{42}$  production, but this has to be investigated in more detail.

### **2** EINLEITUNG

#### 2.1 Die Alzheimer Krankheit

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts beschrieb der Nervenarzt Alois Alzheimer erstmals eine progressive Demenzerkrankung als "eigenartige Erkrankung der Hirnrinde" (Alzheimer, 1907; Maurer *et al.*, 1997). Seine 51-jährige Patientin Auguste Deter litt an Verminderung der geistigen Leistungsfähigkeit, fortschreitendem Gedächtnisschwund, Konzentrationsschwäche, Orientierungslosigkeit, Halluzinationen und Stimmungsschwankungen und verstarb 4½ Jahre nach der Diagnose. Bei der Autopsie fand Alzheimer eine ausgedehnte Atrophie des Gehirns im Bereich des zerebralen Kortex. In seinen histopathologischen Untersuchungsergebnissen beschrieb er massive Ablagerungen "flammenartiger Gestalt" innerhalb von Neuronen sowie extrazelluläre fokale Ablagerungen im Bereich des Zerebralkortex, die er als "miliare Herdchen" bezeichnete. Er entdeckte dadurch die organische Basis einer Krankheit, die bis dahin als psychisch bedingt galt. Seit 1910 wird diese Demenzerkrankung daher nach ihrem Entdecker als "Alzheimer Krankheit" bezeichnet (Kraepelin, 1910).

#### 2.1.1 Epidemiologie der Alzheimer Krankheit

100 Jahre nach ihrer Entdeckung gehört die Alzheimer Krankheit (AD) im westeuropäischen und nordamerikanischen Raum neben Herz-Kreislauferkrankungen, Krebs und Hirninfarkten zu den vier häufigsten Todesursachen (Katzman, 1986; Katzman *et al.*, 1994) und betrifft weltweit inzwischen 15 Millionen Menschen. Sie ist viel verbreiteter als Morbus Parkinson, Chorea Huntington oder andere neurodegenerative Erkrankungen und für 50-70% aller neuropathologischen Veränderungen verantwortlich (St George-Hyslop, 2000).

In den Industrienationen leiden mittlerweile 2% der Bevölkerung an AD, doch ist für die nächsten 50 Jahren eine Zunahme der Krankheitshäufigkeit um das Dreifache prognostiziert (Mattson, 2004), was vor allem auf die steigende Lebenserwartung zurückzuführen ist (Roush, 1996). Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Prävalenz der 60-69jährigen nur 0,3% beträgt, während sie bei den 70-79jährigen auf 3,2% und bei den 80-89jährigen auf 10,8% steigt. Etwa 40% der über 90jährigen sind schließlich von AD betroffen (Ott *et al.*, 1995; Rocca *et al.*, 1991).

Der Gesundheitszustand einer an AD erkrankten Person verschlechtert sich in der Regel so sehr, dass sie nach 5-15 Jahren an Sekundärerkrankungen (z.B. Lungenentzündung, Kreislauferkrankungen oder Infektionen der Harnblase) verstirbt (St George-Hyslop, 2000).

#### 2.1.2 Histologische Veränderungen im Gehirn

Die eindeutige Diagnose von AD erfordert bislang die pathohistologische Untersuchung des Gehirns und ist daher erst *post mortem* möglich. Dabei zeigen Gehirne von AD Patienten zwei Typen charakteristischer Proteinablagerungen. Diese treten zwischen den Nervenzellen als extrazelluläre amyloide Plaques und innerhalb der Nervenzellen als intrazelluläre Neurofibrillenbündel auf (Muller-Hill & Beyreuther, 1989). Bei ca. 80% der Patienten findet sich darüber hinaus aggregiertes Protein in den Wänden der Blutgefäße, wo es als "cerebrovaskuläres Amyloid" oder "kongophile Angiopathie" bezeichnet wird (Glenner & Wong, 1984).

Plaques und Neurofibrillenbündel sind bereits in einem sehr frühen Stadium der Erkrankung in Hirnbereichen lokalisiert, die eine wichtige Funktion bei Gedächtnis- und Lernprozessen oder Emotionsbildung ausüben (Cummings & Cotman, 1995). Nervenzellen innerhalb dieser Gehirnregionen weisen häufig eine veränderte Morphologie auf und besitzen eine reduzierte Anzahl an Synapsen (Braak *et al.*, 2000). Der massive Verlust von Neuronen, Synapsen und Hirnsubstanz führt im Verlauf der Krankheit zu zunehmender Demenz (Lassmann *et al.*, 1993; Masters *et al.*, 1985; Terry *et al.*, 1991).

Die intrazellulären Neurofibrillenbündel finden sich im Perikaryon und in Dendriten von Nervenzellen als gepaarte, helikale Filamente von ca. 20nm Durchmesser. Sie bestehen hauptsächlich aus einer hyperphosphorylierten Form des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau, sowie aus Ubiquitin und einer Reihe weiterer Proteine (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Kosik *et al.*, 1989; Mandelkow & Mandelkow, 1998). Diese Ablagerungen kommen auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Pick und der kortikobasalen Degeneration vor und sind daher kein direktes Kennzeichen für AD, sondern wohl eher eine Folge neuronalen Verfalls.

Demgegenüber handelt es sich bei den amyloiden Plaques und dem vaskulären Amyloid um Proteinaggregate, die typisch für AD sind. Diese Proteinablagerungen wurden bereits Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckt und als amyloid, also "stärkeähnlich" bezeichnet, da sie sich mit Färbemethoden nachweisen lassen, mit denen auch Stärke angefärbt werden kann (Virchow, 1853). Der Hauptbestandteil der amyloiden Plaques und des cerebrovaskulären Amyloids, das A<sup>β</sup> Peptid, wurde vor 22 Jahren von zwei unabhängigen Labors biochemisch isoliert und sequenziert (Glenner & Wong, 1984; Masters et al., 1985). Die ursprüngliche Bezeichnung βA4 leitet sich von seiner β-Faltblattstruktur, der amyloiden Färbbarkeit und dem Molekulargewicht von etwa 4kDa ab. Die Aß Aggregate bilden sich durch eine Umlagerung des A $\beta$  Peptids von einem  $\alpha$ -helikalen Konformationszustand zu einer  $\beta$ -Faltblattstruktur (Norstedt et al., 1994). Dabei spielt der N-Terminus des Peptids eine initiierende Rolle. Protonierungen an Asp- und Glu-Seitenketten und Deprotonierungen an His-Seitenketten destabilisieren die α-Helix, wobei sich ab einer kritischen Konzentration parallel angeordnete Peptide in Schichten zu Oligomeren zusammenlagern (Zagorski & Barrow, 1992) und schließlich amyloide Fibrillen mit einem Durchmesser von 7nm bis 10nm bilden. Vor allem in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium sind diese Ablagerungen von Neuronen mit axonalen Läsionen, aktivierten Mikrogliazellen und zahlreichen Astrozyten umgeben (Dickson, 1997). Es wird postuliert, dass die Akkumulation von Aß in proteaseresistente Plaques oder als lösliche Aggregate zu einer pathologischen Kaskade führt (Abb. 1), die in betroffenen Nervenzellen zu oxidativen Schäden, einer Störung des Energiestoffwechsels, einer Veränderung der Kalziumregulation, der Zerstörung von Synapsen und schließlich zu neuronaler Toxizität führt (Golde, 2003; Mattson, 2004; Walsh & Selkoe, 2004). Heute wird der Begriff "Amyloid" für Proteinaggregate verwendet, die sich durch eine β-Faltblattkonformation, die Bildung von unlöslichen Fibrillen, sowie die nach Kongo-Rot-Färbung charakteristische Doppelbrechung von polarisiertem Licht (Divry & Florkin, 1927) auszeichnen. Als "Amyloidosen" werden also auch die Proteinaggregate anderer degenerativen Gehirnerkrankungen bezeichnet; sie sind dort aber aus anderen Proteinen aufgebaut (Merlini & Bellotti, 2003; Selkoe, 2003).



Abb. 1: Hypothese der amyloiden Kaskade. Quelle: Golde, 2003.

Mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und N-methyl-[<sup>11</sup>C]2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazol bzw. [<sup>11</sup>C]PIB (<u>Pi</u>ttsburgh Compound-<u>B</u>) als radioaktivem Marker scheint es nun erstmals möglich, Plaques *in vivo* und vor dem Auftreten früher Demenzsymptome abbilden zu können (Mintun *et al.*, 2006). Sobald geeignete Therapien für AD zur Verfügung stehen, könnte nun also mit einer Behandlung begonnen werden, bevor es zur massiven Schädigung von Neuronen kommt.

#### 2.1.3 Genetik der Alzheimer Krankheit

In den meisten Fällen von AD ist der auslösende Faktor bislang unbekannt. Solche sporadische Fälle treten in der Regel erst nach dem 65. Lebensjahr auf (LOAD = ,,late onset AD"). Daneben existieren sehr aggressive, präsenile Formen der Erkrankung (EOFAD = ,,early onset familial AD"), die bisweilen weit vor dem 60. Lebensjahr auftreten können und durch eine autosomal dominante Vererbung mit vollständiger Penetranz gekennzeichnet sind (Selkoe, 2001). Da sich der Krankheitsverlauf in sporadischen und vererbten AD Fällen gleicht, können Erkenntnisse aus Studien mit der EOFAD Form vermutlich direkt auf die viel häufiger vorkommenden Fälle von LOAD übertragen werden. Durch epidemiologische Untersuchungen wurden bisher drei Gene identifiziert, die in mutierter Form FAD (,,familial AD") auslösen können. Es sind dies die Gene für das Amyloid-Vorläuferprotein (APP) auf Chromosom 1. APP wird an verschiedenen Positionen gespalten, wobei als Produkt Aβ entstehen kann. Das katalytische Zentrum einer der Proteasen, die zur Produktion von Aβ führen, wird von PS1 oder PS2 gebildet.

Unter physiologischen Bedingungen entsteht aus APP durch proteolytische Spaltung hauptsächlich das 40 AS lange Peptid A $\beta_{40}$  und nur geringe Mengen einer 42 AS langen Variante A $\beta_{42}$  (Scheuner *et al.*, 1996). Für die Pathogenese ist A $\beta_{42}$  allerdings von größerer Bedeutung, denn es ist die Hauptkomponente der senilen Plaques (Iwatsubo *et al.*, 1994). So ist allen bisher identifizierten EOFAD Mutationen auch gemeinsam, dass sich das Verhältnis von A $\beta_{42}$  zu A $\beta_{40}$  erhöht oder generell vermehrt A $\beta$  gebildet wird (Bentahir *et al.*, 2006; Selkoe, 2004). Während APP-Mutationen in der Nähe der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretaseschnittstelle in der Regel zur verstärkten A $\beta$  Produktion führen, verschieben Veränderungen in der Nähe der  $\gamma$ -Sekretaseschnittstelle, wie APP London oder APP Florida, das Verhältnis von A $\beta_{40}$  zu A $\beta_{42}$ in Richtung des hydrophoberen und stärker zur Aggregation neigenden A $\beta_{42}$  (**Abb. 2**).



Abb. 2: APP Mutationen und deren Einfluß auf die proteolytische Prozessierung. Die meisten der insgesamt 27 EOFAD Mutationen von APP befinden sich in der Nähe der Sekretase-Schnittstellen. Während Mutationen nahe der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretaseschnittstelle meist eine erhöhte A $\beta$  Produktion verursachen, erhöhen Mutationen an der  $\gamma$ -Sekretaseschnittstelle das Verhältnis A $\beta_{42}/A\beta_{40}$ . Exemplarisch sind die Mutationen Schwedisch, Flämisch, sowie London und Florida angezeigt.

Mutationen des Presenilin Gens, dessen Translationsprodukt das katalytisch aktive Zentrum der  $\gamma$ -Sekretase bildet, haben den gleichen Effekt (Borchelt *et al.*, 1996; Selkoe, 2001). A $\beta_{42}$  ist durch die beiden zusätzlichen AS IIe und Ala hydrophober und neigt deutlich stärker zur Aggregation (Jarrett *et al.*, 1993a; Jarrett *et al.*, 1993b). Dadurch kommt es zur raschen Bildung von Oligomeren und schließlich amyloiden Plaques im Gehirn (Hardy, 1997).

Darüber hinaus konnte das in drei Allelen vorkommende Apolipoprotein E (ApoE) als Suszeptibilitätsgen identifiziert werden. Das mit Abstand häufigste Allel ist mit 80% das ApoE  $\varepsilon$ 3. Mit 13% ist das Allel ApoE  $\varepsilon$ 4, das zweithäufigste und wirkt als ein Dosisabhängiger Risikofaktor für AD. Das dritte Allel, ApoE  $\varepsilon$ 2, stellt einen gewissen Schutz vor AD dar, ist aber mit 7% sehr selten (Farrer *et al.*, 1997; Saunders *et al.*, 1993; Strittmatter *et al.*, 1993). Einen Überblick über bekannte, mit AD im Zusammenhang stehende Gene zeigt **Tabelle 1**: **Tab. 1: Krankheitsgene der Alzheimer Krankheit.** APP auf Chromosom 21 (Goate *et al.*, 1991), PS1 auf Chromosom 14 (Sherrington *et al.*, 1995) und PS2 auf Chromosom 1 (Rogaev *et al.*, 1995; Levy-Lahad *et al.*, 1995). Ein Risikogen (Suszeptibilitätsgen) ist das ApoE ε4 Allel auf Chromosom 19 (Strittmatter *et al.*, 1993). Quelle: http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations

Gen	Chromo-	pathogene Mutationen	Anteil an AD	Familien	Erkrankungs-	Molekularer
	som		Fällen		Alter (Jahre)	Effekt
			insgesamt			
FAD-G	ene (autoso	mal dominanter Erbgang mit ko	ompletter Penetranz	)		
APP	21	27 verschiedene Missense	<0,5%	74	Mitte 50	$A\beta$ insgesamt
		Mutationen (14%)			(40-65)	erhöht bzw.
		schwedisch (K595N, M596L)				Aβ42 erhöht
		Florida (I <sub>641</sub> V)				
		London (V <sub>642</sub> I,G,F)				
PS1	14	159 verschiedene Missense	2-5%	353	Mitte 40	Aβ42 erhöht
		Mutationen (80%)			(29-65)	
PS2	1	11 verschiedene Missense	<0,5%	19	Mitte 50	Aβ42 erhöht
		Mutationen (6%)			(40-75)	
Risikogen (Suszeptibilitätsgen)						
ApoE	19	Polymorphismus	30-50%		>55	Erhöhte Aβ
		ApoE ε4 Allel				Plaquedichte

#### 2.2 Das Amyloid-Vorläuferprotein (APP)

#### 2.2.1 APP und die APP Genfamilie

Die APP Genfamilie in Säugern besteht aus drei Genen, die eine große Übereinstimmung in der Domänenstruktur aufweisen: APP und die APP-ähnlichen Proteine (APLP = ,,amyloid precursor like proteins") APLP1 und APLP2 (Sprecher *et al.*, 1993; Wasco *et al.*, 1992; Wasco *et al.*, 1993). APLP1 des Menschen kodiert 650 AS, menschliches APLP2 besteht aus maximal 763 AS. Es zeigt über 90% Identität mit APLP1 und 52% Identität bzw. 71% Ähnlichkeit mit APP (Sprecher *et al.*, 1993; Wasco *et al.*, 1993). Die Proteine der APP Familie sind Typ I Transmembranproteine mit einer großen luminalen bzw. extrazellulären aminoterminalen (N-terminalen) und einer kürzeren zytoplasmatischen carboxyterminalen (Cterminalen) Domäne (De Strooper & Annaert, 2000). Die drei Proteine werden in Säugern ubiquitär exprimiert. Ein homologes Protein APPL (<u>,,a</u>myloid <u>p</u>recursor <u>p</u>rotein <u>l</u>ike") wurde auch in *Drosophila melanogaster* gefunden (Luo, L. *et al.*, 1992). APPL ist 886 AS lang und wird neuronal exprimiert (Torroja *et al.*, 1996). Das APP homologe Protein, APL-1 (<u>,,a</u>myloid <u>p</u>rotein-<u>l</u>ike 1") wurde in *Caenorrhabditis elegans* identifiziert (Daigle & Li, 1993) und ist ein weiteres Beispiel für die evolutionär starke Konservierung von APP. Keines der zu APP homologen Proteine besitzt eine der Aß Region ähnliche Domäne.

Das APP Gen enthält 19 Exons, von denen die Exons 7, 8 und 15 alternativ gespleißt werden können. Dadurch entstehen acht APP-Isoformen, die nach ihrer Länge benannt werden. In den meisten Körperzellen werden hauptsächlich APP751 und APP770 gebildet, während APP695 die dominierende Isoform in neuronalen Zellen bildet (Botelho *et al.*, 2003; Kitaguchi *et al.*, 1988; Ponte *et al.*, 1988; Sandbrink *et al.*, 1994; Tanzi *et al.*, 1988). Gemeinsam ist allen APP-Isoformen ein N-terminales Signalpeptid (SP) mit einer Länge von 17 AS, eine große extrazellulärer Domäne, eine hydrophobe Transmembrandomäne (TMD) mit einer Länge von 24 AS und eine kurze zytoplasmatische Domäne mit einer Länge von 47 AS (**Abb. 3**).



Abb. 3: Schematische Darstellung der APP-Domänenstruktur. Dargestellt sind die Proteindomänen der APP-Isoformen APP695, APP751 und APP770. KPI: Kunitz Typ II Proteaseinhibitordomäne, OX2: MRC-OX2 Thymocyten-Oberflächenantigen.

Der den größten Teil des Proteins ausmachende, extrazelluläre N-terminale Proteinbereich des APP enthält an das Signalpeptid angrenzend eine cysteinreiche, dahinter eine saure, sowie eine stark glykosylierte Domäne (Reinhard et al., 2005; Weidemann et al., 1989). Innerhalb der cysteinreichen Domäne befinden sich eine Kupfer- und eine Zinkbindestelle. In den Spleißvarianten APP751 und APP770 folgt der cysteinreichen Domäne C-terminal eine Serin-Protease-Inhibitordomäne vom Kunitz-Typ II (Kitaguchi et al., 1988; Ponte et al., 1988; Sandbrink et al., 1994; Tanzi et al., 1988). Diese beiden APP-Isoformen werden außerhalb des Gehirns am stärksten exprimiert und erfüllen eine Funktion in der Blutgerinnung. Bei APP 770 schließt sich C-terminal eine Domäne mit Homologie zum MRC-OX2 Rezeptor von T-Zellen und Neuronen an (Muller-Hill & Beyreuther, 1989). Die Aβ-Region beginnt 27 AS N-terminal vor der TMD und reicht 13-17 AS tief ungefähr bis in deren Mitte. Sie enthält eine weitere Kupfer- und Zinkbindestelle. Die kurze zytoplasmatische Domäne enthält Bindestellen für unterschiedliche Proteine, darunter eine G<sub>0</sub>-Protein-Bindedomäne (Lang et al., 1995; Nishimoto et al., 1993; Okamoto et al., 1995) und eine Bindestelle für Proteine wie mDAB1 ("mammalian disabled"), X11, Fe65 und JIP1 (Annaert & De Strooper, 2002; Borg et al., 1996; Fiore et al., 1995; Reinhard et al., 2005) und könnte an der Transaktivierung von Genen beteiligt sein (Araki et al., 2004). Allerdings wurde bislang noch kein Gen identifiziert, dessen Translation von APP oder seinen Spaltprodukten reguliert wird.

Die natürlichen Funktionen von APP sind nicht vollständig geklärt. Es mehren sich allerdings die Hinweise, dass es eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kupfer-Homöostase von Neuronen (Barnham *et al.*, 2003), dem neuronalen Überleben, dem Auswachsen von Neuriten, der Synapsenplastizität und der Zelladhäsion erfüllt (Mattson, 1997). APP wird entlang des Axons zur präsynaptischen Endigung transportiert, wo es akkumuliert. Die daraus resultierenden hohen Konzentrationen können zur A $\beta$  Ablagerung an Synapsen führen (Lazarov, O. *et al.*, 2002). Aufbau und Prozessierung des APP Holoproteins weisen auf eine mögliche Rolle als Plasmamembranrezeptor hin (Kimberly *et al.*, 2001). Bislang wurden jedoch weder Liganden, noch nachgeschaltete Signalkaskaden identifiziert. Auf eine physiologische Funktion von  $\alpha$ -APPs in Antwort auf ein Aktionspotential von den präsynaptischen Endigungen ausgeschüttet wird.



Abb. 4: Schematische Darstellung der APP-Prozessierung. Dargestellt sind die vorherrschenden Schnittstellen und die beteiligten Sekretasen. Die Transmembranregion ist dick,  $\beta$ -APPs ("s" steht, wie auch in  $\alpha$ -APPs für "soluble" [=löslich]) blau, A $\beta$  gelb und P6 grün dargestellt. Für genauere Informationen zu den einzelnen proteolytischen Ereignissen siehe Text.

Weiterhin reguliert  $\alpha$ -APPs die neuronale Erregbarkeit und erhöht die synaptische Plastizität, vielleicht durch die Aktivierung eines Plasmamembranrezeptors, der die Aktivität der Kaliumkanäle moduliert und den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert (Scheuner *et al.*, 1996). Diskutiert wurde auch eine Rolle von APP als Adapterprotein im Kinesin 1 vermittelten, schnellen Transport von Vesikeln entlang der Axone (Gunawardena & Goldstein, 2001; Kamal *et al.*, 2001). Allerdings konnten diese Ergebnisse von anderen Gruppen nicht reproduziert werden (Lazarov, O. *et al.*, 2005).

#### 2.2.2 Modifikationen und proteolytische Prozessierung von APP

APP wird von allen Körperzellen exprimiert, wobei die produzierte Menge vom Entwicklungszustand und der Physiologie der Zelle abhängt (Mattson, 1997; Mattson, 2004). Die APP Moleküle durchlaufen in der Zelle den konstitutiven sekretorischen Weg. Dabei wird das Protein posttranslational N- und O-glykosyliert (Weidemann *et al.*, 1989), Tyrosin-sulfatiert (Weidemann *et al.*, 1989), phosphoryliert (Hung & Selkoe, 1994; Suzuki *et al.*, 1994; Walter *et al.*, 1997) oder durch Sialinsäuren modifiziert (Caporaso *et al.*, 1994).

Besonders folgenschwer ist die Eigenschaft, dass APP durch mehrere proteolytische Ereignisse sequentiell gespalten wird, da einem der entstehenden Abbauprodukte, A $\beta$ , eine Schlüsselrolle bei der AD Pathogenese zugeschrieben wird (siehe 2.1.2 und **Abb. 1**). Die APP-Spaltungen erfolgen an verschiedenen, mit  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  und  $\zeta$  bezeichneten Schnittstellen, wobei unterschiedliche lösliche (APPs = <u>"APP s</u>oluble") und membrangebundene Fragmente von APP entstehen. Die beteiligten proteolytischen Enzyme werden als Sekretasen bezeichnet. Für die APP-Prozessierung gibt es zwei Möglichkeiten, die sich gegenseitig ausschließen: den nicht-amyloidogenen und den amyloidogenen Abbauweg. Die drei bedeutendsten proteolytischen Ereignisse erfolgen durch  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase und sind in **Abb. 4** dargestellt.

Im Fokus der AD-Forschung steht die proteolytische Prozessierung von APP, da eine Modulation der Proteolyse, z.B. durch Mutationen der beteiligten Proteine (siehe Abschnitt 2.1.3), die Krankheit maßgeblich beeinflusst. 95% der APP Holoprotein Moleküle werden über den nicht amyloidogenen Weg abgebaut. In dieser Prozessierungsroute erfolgt der erste proteolytische Schnitt durch die α-Sekretase kurz vor der TMD und innerhalb der Aβ-Domäne, wodurch die Aß-Bildung verhindert wird (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1990). Dadurch wird die 100-120kDa große N-terminale Ektodomäne aAPPs freigesetzt und ins Lumen bzw. extrazellulär abgegeben. Das verbleibende C-terminale Fragment C83 (= $\alpha$ CTF) enthält die TMD und bleibt membranverankert (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1990). Als Orte der α-Sekretase-Aktivität wurden die Plasmamembran, der späte Golgi-Apparat und das Trans-Golgi Netzwerk (TGN) identifiziert (Selkoe, 1998). Die α-Sekretase Proteolyse von APP ähnelt der Prozessierung einer Reihe weiterer integraler Membranproteine, z.B. den Wachstumsfaktoren TGF- $\alpha$  (,,<u>T</u>ransforming <u>G</u>rowth <u>Factor- $\alpha$ </u>") und TNF- $\alpha$  (,,<u>T</u>umor <u>N</u>ecrose Factor-a"), dem Zelladhäsionsmolekül L-Selektin und dem Wachstumsfaktor-Korezeptor Syndecan (Werb & Yan, 1998). Die Prozessierung aller dieser Proteine, einschließlich APP, besteht aus einer konstitutiven Komponente und einer regulierten Komponente, die über die Protein Kinase C (PKC) (Buxbaum et al., 1998; Nitsch et al., 1996) und andere Second Messenger Kaskaden (Mills & Reiner, 1999) aktiviert werden kann. α-Sekretase Aktivität zeigen ADAM-9 (Koike et al., 1999; Roghani et al., 1999), ADAM-10 (Bell et al., 2006; Lammich et al., 1999; Lopez-Perez et al., 2001) und ADAM-17 (TACE = "Tumor Necrose Factor a converting enzyme"; (Blacker et al., 2002; Buxbaum et al., 1998), die im späten Golgi-Apparat und an der Plasmamembran lokalisiert sind und als Disintegrinmetalloproteasen zur Familie der ADAM ("a disintegrin and metalloprotease")

Proteasen zählen (Allinson *et al.*, 2003). Die Produktion von  $\alpha$ -APPs steigt in Folge einer elektrischen Aktivität und Aktivierung des muskarinischen Acetylcholinrezeptors (Nitsch *et al.*, 1992), was nahe legt, dass eine neuronale Aktivität die  $\alpha$ -Sekretase Aktivität steigert.

Der "amyloidogene" Abbauweg ist weit weniger häufig und findet nur in 5% aller Wildtyp APP Moleküle statt. Im Verlauf dieser Prozessierung entsteht das neurotoxische Aß Peptid, wobei APP zunächst durch die β-Sekretase geschnitten wird (Annaert & De Strooper, 2002). Diese Proteolyse erfolgt wie die α-Sekretase Prozessierung im TGN, im späten Golgi und der Plasmamembran, aber auch in Endosomen (Ehehalt et al., 2003; Haass et al., 1995; Huse et al., 2000; Vassar et al., 1999; Walter et al., 2001). Dabei wird ebenfalls ein großes Nterminales Fragment (B-APPs) luminal freigesetzt und ein membraninseriertes Peptid (C99) generiert. Die ß-Sekretase schneidet unmittelbar vor der Aß-Sequenz oder in geringem entsprechend kürzeres C-terminales Fragment (C88) in der Membran verbleibt (Vassar et al., 1999). Als  $\beta$ -Sekretase wurde die Protease BACE-1 ( $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1) identifiziert (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Das BACE-1 Gen liegt auf Chromosom 11. Obwohl BACE-1 vermutlich eine Hauptrolle in der Pathogenese von AD spielt, konnten keine genetische Verbindung, pathogene Mutationen oder Allelassoziationen zwischen BACE-1 und der familiären oder sporadischen AD identifiziert werden (Cruts et al., 2001). Kürzlich wurde eine physiologische Funktion von BACE-1 bei der Ausbildung der Myelinscheide von Neuronen beschrieben (Willem et al., 2006). Durch Analyse der Genom-Datenbank wurde eine zweite mögliche β-Sekretase entdeckt, die BACE-2 genannt wird, 64% Homologie mit BACE-1 aufweist und auf Chromosom 21 kodiert wird (Yan et al., 1999).

BACE-1 und BACE-2 gehören zu einer Familie membranständiger Aspartylproteasen. Sie werden mehreren posttranslationalen Modifikationen unterzogen, einschließlich N-Glykosylierung, Phosphorylierung (Walter *et al.*, 2001), Disulfidbrückenbildung, Palmitoylierung (Benjannet *et al.*, 2001) und Pro-Peptid Spaltung. Das Arginin-Leucin-Prolin-Arginin (RLPR) Motiv flankiert die Pro-Domäne in BACE-1 und wird durch Furin gespalten, wobei auch andere Prokonvertasen diesen Schnitt durchführen können (Bennett *et al.*, 2000; Creemers *et al.*, 2001). Die Abspaltung der BACE-2 Pro-Domäne verläuft dagegen autokatalytisch (Hussain *et al.*, 2001). BACE-1 ist hauptsächlich im Golgi und im TGN lokalisiert. Offenbar gelangen einige BACE-1 Moleküle auch an die Plasmamembran und in frühe Endosomen. Dieser Transport wird durch das Di-Leucin Motiv Asparaginsäure-

Asparaginsäure-Isoleucin-Serin-Leucin-Leucin-Lysin (DDISLLK) am C-Terminus (Huse *et al.*, 2000) und die Phosphorylierung von S498 innerhalb dieses Motivs (Walter *et al.*, 2001) reguliert. In polarisierten MDCK Zellen wird BACE-1 in das apikale Kompartiment sortiert, während der  $\alpha$ -Sekretase schnitt basolateral stattfindet (Capell *et al.*, 2002). In Übereinstimmung damit wurde gezeigt, dass BACE-1 mit Lipid-Rafts assoziiert ist (Riddell *et al.*, 2001). Beide Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen, die zeigten, dass Cholesterinentzug APP in Richtung des nicht-amyloidogenen Abbauweges lenkt (Annaert & De Strooper, 2002; Kojro *et al.*, 2001).

Bei beiden Prozessierungswegen erfolgt ein zweiter proteolytischer Schnitt durch eine Spaltung wird sogenannte  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität. Diese  $\gamma$ -Sekretase durch einen Multienzymkomplex katalysiert, der als aktive Protease Presenilin 1 (PS1) oder Presenilin 2 (PS2), sowie die drei weitere Komponenten, Nicastrin (Nct), Pen-2 und Aph-1 enthält (Aguzzi & Haass, 2003; De Strooper, 2003; Edbauer et al., 2003; Haass & Steiner, 2002; Iwatsubo, 2004). Das katalytische Zentrum der  $\gamma$ -Sekretase wird durch die Aspartylprotease-Aktivität von PS1 oder PS2 gebildet. Obwohl die Preseniline hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert sind (Annaert et al., 1999), findet sich die y-Sekretase-Aktivität in post-endozytotischen Kompartimenten (Haass et al., 1992a; Peraus et al., 1997), was als "räumliches Paradoxon" (spatial paradox) bezeichnet wurde (Cupers et al., 2001). Heute geht man davon aus, dass die vier Komponenten der  $\gamma$ -Sekretase schon früh in ihrer Biogenese interagieren (siehe Abschnitt 2.3.2). Nct wird dann glykosyliert und Presenilin endoproteolytisch in N- und C-terminales Fragment gespalten, wodurch die aktive γ-Sekretase gebildet wird (Vetrivel et al., 2005). APP ist nur eines von mehr als 25 Proteinen, die alle durch die  $\gamma$ -Sekretase geschnitten werden (Nyborg *et al.*, 2006).

Im nicht amyloidogenen Abbauweg entsteht aus C83 durch Spaltung an der  $\gamma$ -Stelle das Peptid p3 (Haass *et al.*, 1993; Seubert *et al.*, 1992; Zhong *et al.*, 1994), das luminal bzw. extrazellulär sezerniert wird und das zytoplasmatische Peptid p6 (= AICD = <u>APP intrac</u>ellular <u>d</u>omain), das möglicherweise eine Rolle als Transkriptionsfaktor einnimmt (Kimberly *et al.*, 2001). Wird APP über den amyloidogenen Weg abgebaut, entsteht durch die  $\gamma$ -Sekretase Prozessierung von C99 ebenfalls p6. Das luminal bzw. extrazellulär sezernierte Peptid A $\beta$  ist 39-43 AS lang und somit etwa 16 AS länger als p3 (Dyrks *et al.*, 1993; Higaki *et al.*, 1995; Lichtenthaler *et al.*, 1997). A $\beta$ -Peptide zeigen am C-Terminus eine starke Heterogenität, die dadurch entsteht, dass die  $\gamma$ -Sekretase an unterschiedlichen Positionen innerhalb der TMD schneiden kann. Die A $\beta$  Hauptspezies A $\beta_{40}$  endet mit dem Aminosäurerest Valin40. Seltener entsteht ein A $\beta_{42}$  Peptid mit Alanin42 als letzter AS (Fukuyama *et al.*, 2000; Haass *et al.*, 1992b; Scheuner *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 1996). Peptide mit einer Länge von 39, 41 oder 43 AS werden nur in extrem geringen Mengen gebildet. Das um die beiden AS Isoleucin41 und Alanin42 längere A $\beta_{42}$  ist deutlich hydrophober als A $\beta_{40}$  und neigt viel stärker zur Aggregation. Obwohl nur ca. 10% aller A $\beta$  Peptide 42 AS lang sind, ist A $\beta_{42}$  die Hauptspezies in den cerebralen Plaques (Iwatsubo *et al.*, 1994; Jarrett *et al.*, 1993a; Jarrett *et al.*, 1993b; Naslund *et al.*, 1994; Roher *et al.*, 1993; Tamaoka *et al.*, 1994). Die Bedeutung der beiden zusätzlichen AS in A $\beta_{42}$  wird durch den Befund unterstrichen, dass in präamyloiden Plaques von Down-Syndrom-Patienten hauptsächlich p3<sub>42</sub> und nur wenig p3<sub>40</sub> nachgewiesen werden konnte (Lalowski *et al.*, 1996).

C99 scheint von der  $\gamma$ -Sekretase nicht direkt an Position 39-43 geschnitten zu werden. Vielmehr scheint das zytoplasmatische p6 durch einen initiierenden Schnitt des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes an Position A $\beta_{49}$  ( $\epsilon$ -Schnittstelle) freigesetzt zu werden. A $\beta_{49}$  wird anschließend vermutlich an der  $\zeta$ -Schnittstelle zu A $\beta_{46}$  geschnitten, ehe der finale Schnitt an der  $\gamma$ -Schnittstelle erfolgt und A $\beta_{40}$  bzw. A $\beta_{42}$  ins Lumen oder den extrazellulären Raum abgegeben werden (Zhao *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2007).

#### 2.3 Preseniline, γ-Sekretase und die regulierte intramembranöse Proteolyse

#### 2.3.1 Preseniline

Die Preseniline (PS) wurden ursprünglich durch genetische Screenings nach Mutationen, die EOFAD verursachen, entdeckt (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Rogaev *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995). Sie sind in der Evolution sehr stark konserviert und homologe Proteine konnten in Vertebraten, Invertebraten und selbst in *Dictyostelium* und Pflanzen gefunden werden. PS1 und PS2 kommen in Säugern vor und sind die Prototypen der schnell wachsenden Proteinfamilie. Mutationen, die in beiden PS einen Funktionsverlust verursachen, führen zu einen Notch Phänotyp in Mäusen (Donoviel *et al.*, 1999; Herreman *et al.*, 1999). Die PS sind ca. 50kDa groß und enthalten 7 bis 9 stark hydrophobe Regionen, wobei die meisten topologischen Modelle von 8 (Doan *et al.*, 1996; Fraser *et al.*, 2000; Li & Greenwald, 1998) oder 9 (Spasic *et al.*, 2006) TMDs ausgehen. Zwei große hydrophile Regionen, die N- terminale Domäne und der große Loop zwischen den TMDs 6 und 7 sind zytoplasmatisch (De Strooper *et al.*, 1997; Doan *et al.*, 1996). Diese hydrophilen Domänen sind in den verschiedenen PS recht heterogen, daher ist es wahrscheinlich, dass diese Regionen die funktionelle Spezifität des jeweiligen PS bestimmen. Die C-terminale Domäne ist ungewöhnlich hydrophob und daher eng mit der Membran assoziiert. Diese C-terminale Region könnte in die Anbindung der TMDs von Substratproteinen involviert sein (Annaert *et al.*, 2001). Alle TMDs und die kurzen Verbindungen dazwischen sind stark konserviert, mit dem höchsten Grad an Übereinstimmungen an der TMD 6 und der C-terminalen Region ab TMD 7. Diese beiden Regionen bilden mit je einem Aspartat (D257 und D385) das katalytische Zentrum der  $\gamma$ -Sekretase (Kimberly *et al.*, 2000; Podlisny *et al.*, 1997), weshalb man Presenilin als ungewöhnliche Aspartylprotease betrachten kann (Wolfe *et al.*, 1999).

Preseniline werden als Vorläuferproteine synthetisiert, die kurz nach ihrer Biosynthese, durch eine bislang unbekannte Presenilinase, in ein 28kDa großes N-terminales Fragment (NTF) und ein 19kDa großes C-terminales Fragment (CTF) gespalten werden (Podlisny *et al.*, 1997; Thinakaran *et al.*, 1996; Thinakaran *et al.*, 1997). NTF und CTF sind stabil und werden in einer 1:1 Stöchiometrie in Proteinkomplexe eingebaut, deren Größe intensiv diskutiert wird und die je nach angewandter Methodik sehr stark zwischen 200kDa und 440kDa variiert (Capell *et al.*, 1998; Edbauer *et al.*, 2002; Kimberly *et al.*, 2003; Thinakaran *et al.*, 1997). Diese Komplexe bilden vermutlich die intakte  $\gamma$ -Sekretase. Das ungeschnittene Holoprotein wird sehr schnell durch das Proteasom abgebaut (Kim *et al.*, 1997) und ist daher als endogenes Protein kaum nachweisbar.

Endogen exprimiertes PS1 ist am stärksten im ER, dem "intermediate Compartment" (IC), dem Cis-Golgi Netzwerk (CGN) und in einigen Transportvesikeln lokalisiert (Annaert *et al.*, 1999). Allerdings findet sich der größte Teil der PS-vermittelten  $\gamma$ -Sekretase Aktivität in den späten Kompartimenten (Perez *et al.*, 1999). Dieses räumliche Paradoxon wird dadurch gestützt, dass der größte Teil des PS2 im ER nicht als  $\gamma$ -Sekretase aktiv ist (Cupers *et al.*, 2001; Maltese *et al.*, 2001).

#### 2.3.2 $\gamma$ -Sekretase

Für eine funktionelle  $\gamma$ -Sekretase sind neben PS weitere Komponenten nötig, die gemeinsam einen hochmolekularen Proteinkomplex bilden. Eine dieser Komponenten ist Nct, ein ca. 130kDa großes, stark glykosyliertes Transmembranprotein, das gut an PS-NTF und

PS-CTF bindet (Chung & Struhl, 2001; Yu *et al.*, 2000). Synthetisiert wird Nct als etwa 110kDa großes Vorläuferprotein, das PS benötigt, um auf dem sekretorischen Weg die Plasmamembran erreichen zu können. In PS-defizienten Zellen akkumuliert der Nct Vorläufer im ER. Umgekehrt führt die Suppression der Nct Expression durch siRNA zu einer Verringerung des Steady-State Levels von PS, was darauf hinweist, dass Nct einer der stabilisierenden Faktoren für die PS Fragmente ist (Edbauer *et al.*, 2002).

Eine weitere Untereinheit der  $\gamma$ -Sekretase ist Aph-1 (,,<u>a</u>nterior <u>ph</u>arynx defective"), ein ca. 30kDa großes, sieben mal die Membran durchspannendes Protein, das in einer Reihe alternativer Spleißvarianten vorkommt (Gu *et al.*, 2003). Aph-1 wird für den subzellulären Transport von Nct an die Plasmamembran benötigt (Francis *et al.*, 2002; Goutte *et al.*, 2002) und scheint für die Stabilität der  $\gamma$ -Sekretase essentiell zu sein. Die vierte  $\gamma$ -Sekretase Komponente, Pen-2 (,,<u>p</u>resenilin <u>en</u>hancer"), ist ein kleines Hairpin-Protein mit ca. 12kDa, das die Endoproteolyse von PS erleichtert (Takasugi *et al.*, 2003).

Die Herabregulation von PS (De Strooper *et al.*, 1998), Nct (Edbauer *et al.*, 2002), Aph-1 oder Pen-2 (Francis *et al.*, 2002; Lee, S. F. *et al.*, 2002; Takasugi *et al.*, 2003) mittels siRNA führt zu einer Abnahme der  $\gamma$ -Sekretase Aktivität. Daher werden alle vier Proteine für die Prozessierung von APP und weiterer Substrate wie Notch benötigt. Umgekehrt führt die Überexpression von drei der vier Proteine nicht zu einer gesteigerten Proteolyse von APP, während die simultane Überexpression aller vier  $\gamma$ -Sekretase Bestandteile zur Prozessierung und Stabilisierung von PS, der verstärkten Expression von vollständig glykosyliertem Nct und einer eindeutigen Steigerung der  $\gamma$ -Sekretase Aktivität *in vitro* und *in vivo* führt (Edbauer *et al.*, 2003; Kimberly *et al.*, 2003; Takasugi *et al.*, 2003). Dennoch besteht die Möglichkeit, dass andere Proteine oder Membranlipide limitierende Faktoren für die Gesamtaktivität der  $\gamma$ -Sekretase sind (De Strooper, 2003).

Durch Funktionsverlust und Überexpressionsexperimente wurde offensichtlich, dass die vier Kernkomponenten der γ-Sekretase Aktivität sich gegenseitig in ihrer Stabilität und Reifung beeinflussen (siehe **Tab. 2** und **Abb. 5**) (Edbauer *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2003; Kimberly *et al.*, 2003; Lee, S. F. *et al.*, 2002; Luo, W. J. *et al.*, 2003; Steiner *et al.*, 2002; Takasugi *et al.*, 2003).

	Funktionszugewinn	Funktionsverlust	Funktionsverlust
	(Überexpression in Zellen)	(in Zellen)	(in Tieren)
PS	Akkumulation des PS	Pen-2↓, Nct Glykosylierung↓,	Notch Phänotyp (C. elegans,
	Vorläuferproteins, keine	Nct Transport an	D. melanogaster, M.
	Stabilisierung	Plasmamembran↓	musculus)
Nct	Unglykosyliertes Nct	PS↓, Pen-2↓	Notch Phänotyp (C. elegans,
	akkumuliert		D. melanogaster, M. musculus)
Aph-1	Akkumulation des PS	PS↓, Nct Transport an	Notch Phänotyp (C. elegans)
	Vorläufermoleküls,	Plasmamembran↓	
	Stabilisierung von Nct?		
Pen-2	Prozessierung von	Akkumulation des PS	Notch Phänotyp (C. elegans,
	stabilisiertem PS	Vorläufermoleküls	M. musculus)
Lumen Zytoplas	ma Aph-1 N	Presenilin	Nicastrin Pen-2

# **Tab. 2:** Funktionsverlust und Funktionszugewinneffekte der verschiedenen γ-Sekretase Untereinheiten. (De Strooper, 2003)

Abb. 5: Schematische Darstellung der vier Kernkomponenten der  $\gamma$ -Sekretase. Presenilin bildet mit zwei Aspartatresten (gelbe Sterne) der Transmembrandomänen 6 und 7 das katalytische Zentrum der  $\gamma$ -Sekretase, wird aber erst durch endoproteolytische Prozessierung enzymatisch aktiv. Nicastrin ist ein Typ I Transmembranprotein und wird stark glykosyliert (gelbe Kugeln). Aph-1 (anterior pharynx defective) und Pen-2 (presenilin enhancer) gehören ebenfalls zum Kernkomplex der aktiven  $\gamma$ -Sekretase.

Die aktive  $\gamma$ -Sekretase wird durch die stufenweise Assemblierung der vier Kernkomponenten gebildet. Im ER assoziieren Aph-1 und unreifes Nct und bilden einen frühen Subkomplex. Nach der Anbindung des ungeschnittenen PS verlässt der stabile Komplex das ER. Vermutlich im IC lagert sich Pen-2 an den Komplex an, was die Endoproteolyse von PS erlaubt, wodurch das aktive Enzym entsteht (Iwatsubo, 2004; LaVoie *et al.*, 2003; Takasugi *et al.*, 2003), in dem Nct immer in stark glykosylierter Form vorliegt

(**Abb. 6**). Durch Anfügung eines ER-Zurückhaltungssignals an die zytoplasmatische Domäne von Nct konnte allerdings gezeigt werden, dass eine aktive  $\gamma$ -Sekretase auch mit nicht glykosyliertem Nct im ER entstehen kann (Capell *et al.*, 2005).



Abb. 6: Sequentielle Assemblierung der  $\gamma$ -Sekretase. Ungeschnittenes PS wird schnell abgebaut, während ein Teil des PS an einen leichten (LMW = light molecular weight) Subkomplex aus Aph-1 und Nct bindet. Der entstehende schwere (HMW = high molecular weight) Komplex ist stabil. Die Anlagerung von Pen-2 erleichtert die Endoproteolyse von PS, wodurch die aktive  $\gamma$ -Sekretase entsteht. Zylinder repräsentieren TMDs, gelbe Kugeln an Nct Glykolysierungen und Sterne zwischen den TMD 6 und 7 von PS unaktive (rot) und aktive (gelb) Aspartate des katalytischen Zentrums der  $\gamma$ -Sekretase. Quelle: (Iwatsubo, 2004)

#### 2.3.3 Die regulierte intramembranöse Proteolyse

Bemerkenswert ist, dass die γ-Sekretase innerhalb der hydrophoben Membran Wasser für die Hydrolyse von Peptidbindungen benötigt. Dieser Umstand führte zur Postulierung eines neuen proteolytischen Mechanismus, bei dem Proteasen ihre Substrate innerhalb der Lipid-Doppelschicht schneiden und der als "regulierte intramembranöse Proteolyse" (RIP) bezeichnet wird (Brown, M. S. *et al.*, 2000). Inzwischen wurden mehrere Proteasen beschrieben, die innerhalb der Membran Peptidbindungen spalten können. Diese Enzyme gehören zu Metalloproteasen, Serinproteasen oder, wie die  $\gamma$ -Sekretase, zu Aspartylproteasen und zeigen keinerlei Sequenzhomologien zu cytosolischen Proteasen (Kopan & Ilagan, 2004; Wolfe & Kopan, 2004). Im Falle der  $\gamma$ -Sekretase wird der intramembranöse Schnitt wohl dadurch ermöglicht, dass der Komplex eine wässrige Kammer mit je einer zytoplasmatischen und einer luminalen Pore ausbildet (Lazarov, V. K. *et al.*, 2006).

Ca. 5% der aktiven  $\gamma$ -Sekretase existiert an der Plasmamembran als intakter Komplex und schneidet dort auch ihre Substrate durch RIP (Chyung *et al.*, 2005). Die aktive  $\gamma$ -Sekretase wurde auch in Syntaxin 6-, Syntaxin 13- und VAMP4-positiven Vesikeln nachgewiesen und akkumuliert daher wohl im späten Golgi und in Endosomen (Baulac *et al.*, 2003; Vetrivel *et al.*, 2004), also genau dort, wo BACE vermutlich biologisch aktiv ist (Haass *et al.*, 1995; Vassar *et al.*, 1999; Walter *et al.*, 2001). Die Zahl identifizierter  $\gamma$ -Sekretase Substrate steigt immer weiter, so werden neben APP und Notch auch weitere Typ 1 Transmembranproteine, wie z.B. ErbB4, E-cadherin, Delta/Jagged, Nectin-1 $\alpha$ , CD44 und LRP durch die  $\gamma$ -Sekretase prozessiert (Medina & Dotti, 2003). Daher handelt es sich bei RIP von APP und Notch wohl um spezielle Beispiele eines eher generellen Prozesses. Eine Gemeinsamkeit aller  $\gamma$ -Sekretase-Proteolysen ist ein Prozess, der als "ectodomain shedding" bezeichnet wird. Es handelt sich hierbei um eine initiierende Proteolyse nahe der TMD, die – analog zur  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Spaltung von APP – der  $\gamma$ -Sekretasespaltung vorausgeht. Dadurch wird die Ektodomäne des jeweiligen Proteins fast vollständig entfernt.

Interessanterweise agieren die meisten  $\gamma$ -Sekretase Substrate in der interzellulären Kommunikation oder Adhäsion. Bei mehreren dieser Proteine wird durch die Proteolyse eine intrazelluläre Domäne (<u>intracellular domain = ICD</u>) ins Cytosol freigesetzt, die dann in den Kern wandert und als Transkriptionsfaktor aktiv wird (Wolfe & Kopan, 2004). Daher wird RIP bei der Regulation von Signaltransduktionsprozessen und der Kontrolle der Transkription eine entscheidende Bedeutung zugesprochen (Brown et al., 2000; Wolfe und Kopan, 2004).

Das breite Substratspektrum der  $\gamma$ -Sekretase könnte andeuten, dass sie neben ihrer Rolle in der Signaltransduktion eine allgemeinere Funktion im Abbau von Transmembranproteinen einnehmen könnte, also als eine Art Proteasom der Membran fungiert (Kopan & Ilagan, 2004).

#### 2.4 Lipide und Alzheimer Krankheit

Biologische Membranen spielen bei nahezu allen physiologischen Prozessen innerhalb der Zelle eine Rolle. Die molekulare Organisation der zellulären Membranen bildet die strukturelle Basis für all diese spezialisierten Aufgaben. Es wurden viele Modellmembranen mit unterschiedlicher molekularer Organisation vorgeschlagen, doch lange Zeit war das Flüssigmosaikmodell allgemein akzeptiert (Singer & Nicolson, 1972). Demnach sind Phospholipide mit ihren ionischen und polaren Kopfgruppen nach außen zur wässrigen Phase angeordnet, während die unpolaren Fettsäureketten ins Innere der Membran zeigen und eine Matrix formen. Lücken und Hohlräume zwischen diesen Ketten werden mit Lipiden, von denen Cholesterin die Hauptkomponente ist, gefüllt (Sankaram & Thompson, 1990; Simons & Ikonen, 1997).

1988 postulierten Simons und van Meer die Existenz von Lipidmikrodomänen, sogenannten "Lipid Rafts" (Simons & van Meer, 1988). Demnach scheinen die Lipide nicht, wie im Flüssigmosaikmodell vorgeschlagen, gleichmäßig über die gesamte Membran eines Organells verteilt zu sein, sondern teilweise sehr dynamische Cholesterin- und Glykosphingolipidreiche Mikrodomänen auszubilden (Brown, D. A. & London, 1998; Simons & Ikonen, 1997). Diesen Membranbereichen wurde eine physiologische Bedeutung bei Signalprozessen (Janes *et al.*, 2000; Schlegel *et al.*, 2000; Simons & Ikonen, 1997), der Zelladhäsion (Kasahara *et al.*, 2000), der Cholesterinhomöostase (Fielding & Fielding, 1997; Ikonen & Parton, 2000; Schlegel *et al.*, 2000), sowie der Infektion durch Mikroorganismen (Fivaz *et al.*, 1999) zugeschrieben. Es gibt zwei Typen von Lipidmikrodomänen, Rafts und Caveolae (Abrami *et al.*, 2001), die leicht unterscheidbar sind: Rafts sind flache Gebilde, während Caveolae die Form flaschenförmiger Einstülpungen haben. Weiterhin sind Membranproteine der Caveolin Familie exklusiv in Caveolae lokalisiert (Ikonen & Parton, 2000; Schlegel *et al.*, 2000), wohingegen Proteine mit GPI-Anker unter steady state Bedingungen selektiv in Rafts angereichert scheinen (Schnitzer *et al.*, 1995).

Lipid Rafts sind dynamische Zusammenlagerungen von Cholesterin und Sphingolipiden auf der lateralen Seite der Lipid-Doppelschicht, die sich wie "bewegliche Plattformen" verhalten (Simons & Ikonen, 1997). Die Lipid-Doppelschicht in Rafts ist asymmetrisch mit einer Anreicherung von Sphingolipiden und Glykosphingolipiden in der luminalen/ exoplasmatischen Schicht und Glycerolipiden (Phosphatidylserin/Phosphatidylethanolamin) in der zytoplasmatischen Schicht. Freiräume zwischen Sphingolipiden und Phosphoglycerolipiden sind mit Cholesterinmolekülen aufgefüllt. Cholesterin wird im ER synthetisiert (Dietschy & Turley, 2001), während die Sphingolipidsynthese und Modifikationen an der Kopfgruppe hauptsächlich im Golgi-Apparat vollendet werden (van Meer, 1989). Cholesterin-Sphingolipid Rafts assemblieren in Säugerzellen vermutlich zuerst im Golgi (Brown, D. A. & London, 1998; Brown, D. A. & Rose, 1992; Scheiffele *et al.*, 1997) und werden dann an die Plasmamembran transportiert, wo sie kontinuierlich endozytiert und recycled werden. Allerdings wurde beschrieben, dass in Hefezellen Rafts schon im ER existieren (Bagnat *et al.*, 2000). Die Größe von Rafts schwankt je nach angewandter Messmethodik sehr stark zwischen 4nm und 700nm (Anderson, R. G. & Jacobson, 2002). Die meisten Messergebnisse deuten allerdings einen Durchmesser von etwa 50nm an, was ca. 3500 Sphingolipidmolekülen entsprechen würde (Chauhan, 2003; Simons & Ehehalt, 2002; Simons & Ikonen, 1997).

Das Gehirn ist das cholesterinreichste Organ (Dietschy & Turley, 2001) und bezüglich seines Cholesterinspiegels autark. Es muss den Großteil des benötigten Cholesterins selbst bilden (Simons *et al.*, 2001), da es durch die Blut-Hirn-Schranke von zirkulierenden Lipoproteinen getrennt ist. Neuronale und nicht neuronale Gehirnzellen decken ihren Cholesterinbedarf durch *de novo* Synthese (Morell & Jurevics, 1996) und nehmen nur sehr wenig aus dem Plasma auf (Kabara, 1973). Bei einem zu hohen Cholesterinspiegel im Gehirn wird überschüssiges Cholesterin in 24-Hydrocholesterin konvertiert, das die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (Bjorkhem *et al.*, 1998). Der zelluläre Cholesterinspiegel wird streng reguliert, da Cholesterin die Membranfunktionen durch Regulation der physikalisch-chemischen Eigenschaften beeinflusst (Chauhan, 2003; Simons *et al.*, 2001).

Im Falle eines erhöhten Cholesterinspiegels scheint eine Veränderung der Membranfluidität, Membrandicke und anderer Effekte zu einer erhöhten A $\beta$  Produktion führen. So sind die Assoziation und Kolokalisation von APP mit der  $\alpha$ -Sekretase kritisch für deren Enzymaktivität (Anderson, J. P. *et al.*, 1991; Maruyama *et al.*, 1991). Die  $\alpha$ -Sekretase benötigt in die Membran inseriertes APP und schneidet ihr Substrat in einer definierten Entfernung zur Membran und nicht an einer spezifischen Aminosäuresequenz (Sisodia, 1992). Eine Veränderung in der Lipidzusammensetzung der Membran durch Erhöhung des Cholesterinspiegels inhibiert den Kontakt der  $\alpha$ -Sekretase mit APP (Bodovitz & Klein, 1996). Auch die subzelluläre Verteilung von Cholesterin reguliert die proteolytische Prozessierung von APP (Puglielli *et al.*, 2001; Runz *et al.*, 2002).

Weiterhin besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Menge an Cholesterinestern und der Entstehung von A $\beta$  (Puglielli *et al.*, 2001). Es konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass die Inhibition des Enzyms, das freies Cholesterin in Cholesterinester überführt, nicht nur die AD Pathologie dramatisch reduziert, sondern darüber hinaus kognitive Defizite rückgängig macht (Hutter-Paier *et al.*, 2004).

In Studien mit kultivierten Zellen wurde gezeigt, dass eine Cholesterinanreicherung in der Membran eine Dosis-abhängige Verminderung der  $\alpha$ -APPs Freisetzung verursacht (Bodovitz & Klein, 1996; Racchi et al., 1997), während ein Absenken der zellulären Cholesterinkonzentration die sekretierte α-APPs Menge erhöht (Racchi et al., 1997). Eine erhöhte Cholesterinkonzentration erniedrigt die Aktivität der potentiellen α-Sekretase ADAM 10, während eine Verminderung von Cholesterin und die Behandlung mit Cholesterin senkenden Medikamenten, wie Lovastatin die  $\alpha$ -Sekretaseaktivität und Expression von ADAM 10 stimuliert (Kojro et al., 2001). Dagegen bewirken die Extraktion von Cholesterin durch Methyl-B-Cyclodextrin (MBCD) oder das Cholesterin senkende Medikament Simvastatin eine dramatische Verminderung der Aß Produktion (Fassbender et al., 2001; Simons et al., 1998). Die Senkung des Cholesterinspiegels verursacht auch eine deutliche Verminderung des zellulären C99 Spiegels und eine Reduktion der ß-Sekretase Aktivität, wohingegen eine Cholesterinerhöhung die β-Sekretase Aktivität 4-fach erhöht (Frears *et al.*, 1999). Diese Befunde wurden durch Tiermodelle gestützt; so führt eine Suppression der Cholesterinsynthese durch Simvastatin zur drastischen Reduktion der cerebralen Aß Konzentration in Meerschweinchen (Fassbender et al., 2001). In transgenen APP überexprimierenden Mäusen bewirkte eine cholesterinreiche Kost eine Erhöhung des Aß Spiegels und vermehrte Plaquebildung, sowie eine Verminderung der  $\alpha$ -APPs Menge (Refolo et al., 2000). Da die Cholesterinerhöhung mit einer Steigerung der Aß Produktion und wahrscheinlich auch der verstärkten Assemblierung von Rafts einhergeht, liegt die Vermutung nahe, dass Raft-Mikrodomänen eine Rolle in der amyloidogenen Prozessierung von APP spielen. Tatsächlich wurde gezeigt, dass der amyloidogene Abbauweg in Rafts stattfindet, während die α-Sekretase ausserhalb von Rafts schneidet (Ehehalt et al., 2003; Kojro et al., 2001; Lee, S. J. et al., 1998; Simons et al., 1998; Simons et al., 2001). Circa 5% des zellulären APP ist in DRMs (Detergens resistente Membranen), die vermutlich Rafts repräsentieren, lokalisiert (Bouillot et al., 1996).

Demgegenüber stehen allerdings Beobachtungen, laut denen eine moderate Verminderung des Cholesterinspiegels in Membranen eine Erhöhung der BACE1-APP Kolokalisation und damit einhergehend eine verstärkte A $\beta$  Produktion verursacht (Abad-Rodriguez *et al.*, 2004). Die Sekretasen des amyloidogenen Abbauwegs und ihr Substrat APP würden demnach in verschiedenen Membranbereichen lokalisiert sein. Während sich  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen in DRMs befinden, akkumuliert APP in Detergens löslichen Membranregionen. Eine moderate Cholesterinsenkung könnte somit in einer Freisetzung von BACE1 aus DRMs resultieren, während eine drastische Erniedrigung des Cholesterinspiegels die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase inhibiert (Kaether & Haass, 2004).

Es wurde berichtet, dass sowohl BACE1, als auch APP und C99 Homodimere bilden können (Goo & Park, 2004; Scheuermann *et al.*, 2001; Westmeyer *et al.*, 2004). Die Oligomerisierung von Raft-Komponenten kann zu einer erhöhten Raft-Affinität führen, so wurde für viele Oberflächenrezeptoren, wie Immunglobulin-, T-Zell- und B-Zellrezeptoren gezeigt, dass durch eine Dimerisierung oder Oligomerisierung nach der Bindung von Liganden, die Assoziation mit DRMs erhöht war (Cheng *et al.*, 2001; Janes *et al.*, 2000; Langlet *et al.*, 2000). Daher könnte die Dimerisierung die Raft- Assoziation von APP, C99 und BACE1 regulieren.

Von A $\beta$  und Presenilin wurden ebenfalls signifikante Mengen in DRMs von Gehirngewebe oder neuronalen Zellkulturen identifiziert (Lee, S. J. *et al.*, 1998; Morishima-Kawashima & Ihara, 1998; Parkin *et al.*, 1999). Wenn A $\beta$  mit cholesterinreichen Membranen assoziiert, scheint dies die Konformation des Peptids so zu verändern, dass es verstärkt zur Aggregation neigt (Kakio *et al.*, 2001; Mizuno *et al.*, 1999). So bindet das in Rafts vorhandene Gangliosid GM1 an A $\beta$  und verursacht vermutlich eine Veränderung der A $\beta$  Konformation, was dessen Oligomerisierung erleichtert (Ariga *et al.*, 2001; Chauhan, 2003; McLaurin & Chakrabartty, 1996; Yamamoto *et al.*, 2007; Yanagisawa *et al.*, 1995).

Wie durch die A $\beta$ -Affinität für GM1 angedeutet, scheinen neben Cholesterin auch Sphingolipide, die zweite Hauptkomponente von Rafts, die APP Prozessierung zu beeinflussen. So wurde über Strukturanalysen und Vergleich mit dem HIV-1 Hüllprotein gp120 in A $\beta$  eine Sphingolipid-Bindedomäne mit Ähnlichkeit zum V3 Loop vorgeschlagen (Mahfoud *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass bei einer Hemmung der Serin-Palmitoyltransferase, die den initiierenden Schritt der Sphingolipid-Biosynthese katalysiert, die Sekretion von  $\alpha$ -APPs und die Entstehung von C83 deutlich zunehmen, wohingegen die Gesamtmenge an APP und die  $\beta$ -Sekretase Aktivität unverändert bleiben. Weiterhin weisen Sphingolipid-defiziente Zellen eine erhöhte Sekretion von A $\beta_{42}$  auf, während die A $\beta_{40}$  Defekt in der Serin-Palmitoyltransferase beobachtet, wobei exogene Sphingosingabe oder Transfektion mit intaktem Enzym die natürliche APP Prozessierung wiederherstellte (Sawamura *et al.*, 2004). Der Sphingolipidbaustein Ceramid reguliert verschiedenste biochemische Ereignisse und ist in Gehirnen von AD Patienten angereichert. Ceramid stabilisiert BACE1 und verlängert dessen Halbwertszeit, was zur verstärkten A $\beta$  Produktion führt (Puglielli *et al.*, 2003). Durch die Rekonstitution von BACE in großen unilamellaren Vesikeln (LUVs = large unilamellar vesicles), konnte gezeigt werden, dass neutrale Sphingolipide (Cerebroside), anionische Phosphoglycerolipide und Sterole (Cholesterin) die  $\beta$ -Sekretase Aktivität *in vitro* stimulieren (Kalvodova *et al.*, 2005).

Ein weiterer Anhaltspunkt, dass Cholesterin den APP Metabolismus beeinflusst, ist eine genetische Verbindung zwischen dem AD Risiko und dem  $\epsilon$ 4 Allel von ApoE, das in Neuronen die Cholesterinhomöostase beeinflusst (Myers & Goate, 2001). Eine neuere Studie beschreibt, dass die Bindung von Lipid beladenem ApoE an den ApoE Rezeptor 2 (ApoER2) die Endozytose von APP, der  $\beta$ -Sekretase und von ApoER2 in Endosomen reguliert, wo der amyloidogene Abbauweg stattfindet und schließlich A $\beta$  entsteht (He *et al.*, 2007).

### **3** FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Verschiedene pathogene Mutationen im APP Gen resultieren in einer veränderten proteolytischen Prozessierung des Proteins (siehe Abschnitt 2.1.3). Diese Mutationen häufen sich an den Schnittstellen der drei unterschiedlichen Proteasen,  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Sekretase (Bentahir *et al.*, 2006; Selkoe, 2001; Selkoe, 2004).

Mutationen in der Nähe der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretaseschnittstelle verschieben die APP Prozessierung in Richtung des amyloidogenen Abbauwegs und führen somit zu einer verstärkten A $\beta$  Produktion. Demgegenüber bewirken Mutationen in der Nähe der  $\gamma$ -Sekretaseschnittstelle, wie die London oder Florida Mutation, eine Verschiebung des Verhältnisses von A $\beta_{40}$  zu A $\beta_{42}$  in Richtung des hydrophoberen und stärker zur Aggregation neigenden A $\beta_{42}$  (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Lichtenthaler *et al.*, 1999) (**Abb. 2**). Veränderungen der Presenilin Gene, deren Translationsprodukte das katalytisch aktive Zentrum der  $\gamma$ -Sekretase bilden, haben den selben Effekt (Selkoe, 2001). Die Presenilin-Mutationen sind zum Teil weit vom katalytischen Zentrum entfernt, was gegen eine verschobene Spezifität der Substraterkennung spricht. Es scheint vielmehr so, als ob ein allgemeineres Prinzip die veränderte Prozessierung bewirkt. Diese Theorie wird durch den Befund gestützt, dass die  $\gamma$ -Sekretase ein sehr breites Substratspektrum besitzt und ihre Substrate oft an mehr als einer definierten Position schneidet. So scheint der Abstand zur Membranoberfläche für die Proteolyse wichtiger zu sein, als die Aminosäuresequenz des Substrats (Kopan & Ilagan, 2004).

Da verschiedene Organellen unterschiedlich zusammengesetzte Membranen haben und auch die Membran eines Kompartiments in eher fluide und kondensiertere Bereiche aufgeteilt ist, könnten Lipidinteraktionen die  $\gamma$ -Sekretase Proteolyse direkt beeinflussen. Tatsächlich wurde gezeigt, dass verschiedene Lipide einen Einfluss auf die APP Prozessierung, auch auf der Ebene der  $\gamma$ -Sekretase Aktivität ausüben (siehe 2.4).

In dieser Arbeit sollten C99 Wildtyp und die C99 EOFAD Mutanten London und Florida in ihrer subzellulären Verteilung, ihrer Lokalisation in DRMs oder fluide Membranbereiche und ihren Interaktionen mit der molekularen Transmembranumgebung verglichen werden.

Weiterhin sollte bestimmt werden, ob das  $\gamma$ -Sekretase-Substrat C99 oder die  $\gamma$ -Sekretase selbst mit spezifischen Membranlipidklassen direkt interagieren.
# **4 ERGEBNISSE**

# 4.1 Untersuchung der molekularen Membranumgebung von photoaktivierbarem C99

Eine Methode zur Analyse von direkten Protein-Protein bzw. Protein-Lipidinteraktionen ist die Photoaffinitätsmarkierung des zu untersuchenden Proteins. Dabei kann man sich die Reaktivität von Diazirinringen zu Nutze machen. Diazirine sind zyklische Isomere der aliphatischen Diazoverbindungen. Bei Bestrahlung mit UV-Licht bilden sie unter Stickstoffeliminierung hochreaktive Carbene, die mit benachbarten Molekülen kovalente Bindungen eingehen.

Um zu untersuchen, ob APP Wildtyp (wt) und die APP EOFAD-Mutationen London (L) und Florida (F) innerhalb der Membran mit unterschiedlichen Lipiden interagieren, sollte radioaktives photoaktivierbares C99 *in vitro* translatiert und in Mikrosomenmembranen eingebaut werden. C99 ist das membrangebundene Produkt der  $\beta$ -Sekretase Spaltung und ein Substrat der  $\gamma$ -Sekretase.

Die Herstellung photolabiler C99 Mutanten erfolgte in drei Schritten:

- In SP-C99 cDNAs im pBS-Vektor (Dyrks *et al.*, 1993; Grziwa *et al.*, 2003; Lichtenthaler *et al.*, 1997; Tienari *et al.*, 1996) wurden je ein Codon für AS 19, 20, 39, 41, 43, 44, 45, 47, 60, 86 und 91 mittels ortsspezifischer Mutagenese gegen ein Amber-Stop-Codon (TAG) ausgetauscht. SP-C99 ist ein Protein, das aus dem Signalpeptid von APP, einem Linker mit den beiden Aminosäuren LE und dem β-Sekretase Produkt C99 besteht. Diese Klonierungen wurden von Dr. Liyun Zhao im Labor durchgeführt.
- in vitro Transkription einer Nonsense Suppressor-tRNA, deren Anticodon zum Amber-Stop-Codon komplementär ist (6.2.1.13 A) und Beladung dieser tRNA mit dem chemisch synthetisierten, photolabilen Aminosäurederivat (Tmd)Phe

(<u>Trifluoromethyld</u>iazirinyl-<u>phe</u>nylalanin =  $F^*$ ) (6.2.4.4). Die beladene tRNA wird im Folgenden als Amber-Suppressor-tRNA<sup>F\*</sup> bezeichnet.

3. *in vitro* Transkription der cDNAs und Expression der verschiedenen SP-C99 Mutanten in einem *in vitro* Translations-System in Anwesenheit von Mikrosomen, [<sup>35</sup>S]-Methionin und Amber-Suppressor-tRNA<sup>F\*</sup>. Auf diese Weise lässt sich membraninseriertes, radioaktives C99-Protein generieren, das an einer definierten Stelle eine photoaktivierbare AS enthält (Abb. 7; 6.2.1.14).



Abb. 7: Einführung der photolabilen Aminosäure (Tmd)Phe in SP-C99 Wildtyp, London und Florida. In jeweils zwei Konstrukten wurde (Tmd)Phe N-terminal bzw. C-terminal der Transmembrandomäne eingebaut. Der Fokus der Crosslink-Experimente liegt mit 7 Positionen innerhalb der TMD, speziell in der Nähe der  $\gamma$ -Sekretase Schnittstelle an Position 40 bzw. 42.

Nach Synthese des photoaktivierbaren Proteins erfolgt die Quervernetzung mit benachbarten Molekülen durch die Bestrahlung mit UV-Licht. Nach Photoaktivierung reagiert die photolabile Gruppe als Carben mit jeder Verbindung, die näher als 3Å lokalisiert ist. Diese Reaktion ist unabhängig von den chemischen Eigenschaften des benachbarten Moleküls. Im löslichen System ist als Bindungspartner daher vorwiegend Wasser zu erwarten, oder eben ein spezifischer, da weniger als 3Å entfernter, Bindungspartner. Im Membransystem kann man wegen der geringeren Menge an Wasser mit größeren Ausbeuten der Photoreaktion rechnen.

# 4.1.1 Vorarbeiten zur *in vitro* Translation von photolabilem C99 (durchgeführt von Dr. Liyun Zhao)

Um zu testen, ob radioaktives, photoaktivierbares C99 in einem *in vitro* Translationssystem synthetisiert werden kann, wurde die cDNA von SP-C99wt mit Amber-Stop-Mutationen an neun verschiedenen Positionen *in vitro* transkribiert (6.2.1.13 B). Die erhaltenen mRNAs wurden anschließend als Templates für eine *in vitro* Translation im Kaninchen Retikulozytenlysat eingesetzt, die jeweils in Gegenwart oder Abwesenheit von Amber-Suppressor-tRNA<sup>F\*</sup> und Mikrosomen durchgeführt wurde. Die Ansätze wurden anschließend über SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und Autoradiographie analysiert (**Abb. 8**). Dabei wurde der Einfluss der Amber-SuppressortRNA<sup>F\*</sup> und von Mikrosomen auf die Translationseffizienz und Suppression untersucht.



Abb. 8: Test der *in vitro* Translation. 9 verschiedene photolabile Konstrukte von SP-C99 Wildtyp wurden *in vitro* translatiert. Durch Zugabe von mit einer photolabilen Aminosäure (F\*) beladenen Suppressor-tRNA, wurde der Abbruch der Translation am Amber-Stop Codon supprimiert. 20% der 50 $\mu$ l Ansätze wurden im 10% Tris-Tricine Gel aufgetrennt und über Autoradiographie analysiert. Blaue Sterne zeigen die Abbruchprodukte am Amber-Stopcodon, das Suppressionsprodukt läuft bei ca. 12,5kDa.

Die jeweils erste Spur jeder photoaktivierbaren Mutante zeigt eine *in vitro* translatierte Probe ohne Amber-Suppressor-tRNA<sup>F\*</sup>. Dadurch endet die Translation am Amber-Stop-

Codon, und es wird kein photolabiles Phenylalanin-Derivat eingebaut. Deshalb kann kein vollständiges C99 entstehen, wie bei F19F\* und F20F\* deutlich zu sehen ist. In einigen Fällen (V39F\*, V44F\*, I45F\*, I47F\*, I60F\*, Y86F\* und Y91F\*) wurde auch ohne SuppressortRNA eine radioaktive Bande mit dem Molekulargewicht von C99 detektiert, deren Ursprung nicht geklärt werden konnte.

Die zweite Spur jeder Mutante enthält das *in vitro* Translationsprodukt derselben mRNA, wobei die Reaktion mit Amber-Suppressor-tRNA<sup>F\*</sup> durchgeführt wurde. Dadurch sollte es zur Suppression des Translationsabbruchs und der Synthese von full length C99 kommen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart der Suppressor-tRNA in allen Fällen die Menge von intaktem C99 zunahm. Allerdings wurde keine nennenswerte Abnahme der Abbruchprodukte (Abb. 8, blaue Sterne) beobachtet, was auf eine sehr schlechte Suppressionseffizienz hindeutet.

Die Gegenwart von Mikrosomen hatte keinen Einfluss auf Translations- und Suppressionseffizienz, wie die jeweils dritte Spur jeder Mutante zeigt. Da die kotranslationale Insertion von C99 in die Mikrosomenmembranen zu einer Abspaltung des 17 AS langen Signalpeptids führt, würde man in den Proben mit Mikrosomen eine schnellere Migration im SDS-Gel erwarten. Allerdings wurde bereits beschrieben, dass SP-C99 im SDS-Gel etwas schneller wandert als C99 ohne Signalsequenz (Grziwa *et al.*, 2003), möglicherweise wegen einer kompakteren Sekundärstruktur, die durch das hydrophobe Signalpeptid induziert und nicht durch SDS aufgelöst wird. Demzufolge wäre es möglich, dass die Laufeigenschaften beider Proteine in dem hier angewandten Gelsystem identisch sind.

Dieses Vorexperiment von Dr. Liyun Zhao zeigte, dass es prinzipiell möglich ist, C99wt mit einer photoaktivierbarer AS *in vitro* zu translatieren. Allerdings war die Suppression nur sehr schwach und der Einbau in Mikrosomenmembranen konnte in dem gewählten Tris-Tricin-Gelsystem nicht nachgewiesen werden.

### 4.1.2 Konstruktion von SP-C99\* mit optimierter Signalsequenz in pcDNA3.1 Vektoren

Zur experimentellen Analyse der molekularen Interaktionspartner von APP innerhalb der TMD wurden die pBS/SP-C99 Konstrukte von Dr. Liyun Zhao mit den eingefügten Amber-Stop Mutationen umkloniert.

Das ursprünglich beschriebene SP-C99 (Dyrks et al., 1993) besteht aus den 99 Cterminalen Aminosäuren von APP (C99), an dessen N-Terminus das APP Signalpeptid (SP) mit den zwei in der APP-Sequenz folgenden Aminosäuren Leucin und Glutaminsäure fusioniert wurde.

Die wahrscheinliche Schnittstelle der Signalpeptidase liegt in diesem Fall direkt hinter der Signalsequenz und vor dem Linker aus den beiden AS. Statt C99 entsteht mit diesem Konstrukt also ein N-terminal um zwei AS längeres Protein. Eine Deletion der beiden AS würde in einer noch geringere Schnitteffizienz vor C99 resultieren. Somit wurde, um die Abspaltung der Signalsequenz direkt vor C99 zu erreichen, die Aminosäuren LE durch DA ersetzt. Alle Vorhersagen der Signalpeptidase-Schnittstellen erfolgten mit dem Programm SignalP V1.1. Die Klonierungen wurde mittels ortspezifischer Mutagenese durchgeführt (6.2.1.12 A).

Zusätzlich erfolgte ein Wechsel des Vektorsystems von pBS SK+ auf pcDNA3.1 (6.2.1.12 B). Der pcDNA3.1 Vektor ermöglicht durch den starken CMV Promotor auch die Expression in eukaroyntischen Zellen (Abschnitt 4.6). Zusätzlich vereinfacht die hohe Kopienzahl von pcDNA3.1 in *E. coli* Zellen die Präparation großer Vektormengen. Alle pcDNA3.1/SP-C99 Plasmide wurden durch Sequenzierung des gesamten für SP-C99 codierenden Bereiches überprüft.

Im Folgenden werden, um Verwechslungen mit in der Literatur angewandten cDNAs auszuschließen (Dyrks *et al.*, 1993; Grziwa *et al.*, 2003; Lichtenthaler *et al.*, 1997; Tienari *et al.*, 1996), Konstrukte mit optimierter Signalsequenz als C99\* bzw. SP-C99\* bezeichnet.

#### 4.1.3 Optimierung der Suppressionsbedingungen in der in vitro Translation

Die SP-C99\* Konstrukte mit Amber-Stop-Codons sollten *in vitro* translatiert werden. Dazu wurden zunächst die Suppressionsbedingungen für die Mutante SP-C99\*wt mit der photolabilen Aminosäure (Tmd)Phe anstelle von Isoleucin41 (I41F\*) ausgetestet. SP-C99\*wt I41F\* wurde in der *in vitro* Translation mit Hilfe des Kaninchen-Retikulozytenlysat-Systems exprimiert, wobei zur radioaktiven Markierung der Translationsprodukte [<sup>35</sup>S]-Methionin und zur Suppression des Amber-Stop-Codons Suppressor-tRNA<sup>F\*</sup> eingesetzt wurde. Die *in vitro* translatierten Proben wurden über SDS-PAGE und Autoradiographie ausgewertet (**Abb. 9 A**).



**Abb. 9:** Abhängigkeit der *in vitro* Translations- und Suppressionseffizienz von der Magnesium-Konzentration. SP-C99\* wurde mit Amber-Suppressor-tRNA<sup>F\*</sup>, [<sup>35</sup>S]-Methionin und unterschiedlichen Mg-Konzentrationen *in vitro* translatiert. Die Ansätze wurden mittels SDS-PAGE (10% Tris-Tricin) aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. A) Grobe Einengung der geeigneten Magnesiumkonzentration. B) Titration der optimalen Magnesiumkonzentration.

Unter optimalen Translationsbedingungen (kein Zusatz von Magnesium (Mg<sup>2+</sup>)-Ionen) konnte nahezu keine Suppression beobachtet werden. Bei hohen Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen konnte hingegen keine effiziente Translation erreicht werden. Daher wurde die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration austitriert und Bedingungen etabliert, die eine bestmögliche Ausbeute der verschiedenen photoaktivierbaren SP-C99\*-Mutanten erlaubten. Eine Mg<sup>2+</sup>-Konzentration von 3,55mM erwies sich im Falle der I41F\* Mutante von SP-C99\*wt als optimal (**Abb. 9 B**). Diese Mg<sup>2+</sup>-Konzentration führte auch bei allen anderen C99\*-Mutanten zu einer optimierten Suppressionsrate (nicht gezeigt).

#### 4.1.4 In vitro Translation und Membraninsertion von SP-C99\*

Die photolabile SP-C99\*wt Mutante I47F\* und nicht photoaktivierbares SP-C99\*wt wurden in einer *in vitro* Translation durch das Kaninchen-Retikulozytenlysat-System in Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-Methionin und Amber-Suppressor-tRNA<sup>F\*</sup> exprimiert (**Abb. 10**). Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE und Autoradiographie.





**Abb. 10: Abspaltung des Signalpeptids des Abbruchprodukts von SP-C99\* I47F\* und SP-C99\*.** *In vitro* Translationsprodukte von SP-C99\*wt I47F\* (Spur 1 und 2) und nicht photoaktivierbarem SP-C99\*wt (Spur 3 und 4) wurden durch ein 16,5% Tris-Tricin Gel analysiert. Die Translationsansätze erfolgten ohne (Spur 1 und 3) bzw. mit Mikrosomen (Spur 2 und 4).

Die Zugabe von Mikrosomen führte sowohl im Abbruchprodukt der I47F\* Mutante, als auch im vollständigen SP-C99\*wt zu einer partiellen Abspaltung des Signalpeptids, wodurch das Abbruchprodukt und C99\* in einem 16,5% Tris-Tricin Gel (Schagger & von Jagow, 1987) eine schnellere Migration aufweisen (**Abb. 10**, Spur 2 und 4). In anderen Gelsystemen, wie 10% Tris-Tricin Gelen, konnten SP-C99\* und C99\* nicht aufgetrennt werden.

4.1.5 Crosslink Experimente mit photoreaktiven Aminosäurederivaten

Um zu testen, ob SP-C99\* mit Molekülen innerhalb der Mikrosomenmembran reagiert, wurden verschiedene photolabile Mutanten von SP-C99\*wt, SP-C99\*L und SP-C99\*F in der Gegenwart von [<sup>35</sup>S]-Methionin, Suppressor-tRNA<sup>F\*</sup> und Mikrosomen *in vitro* translatiert. Anschließend erfolgte die Quervernetzung durch Bestrahlung mit UV-Licht und die Analyse der verschiedenen Ansätze mittels SDS-PAGE und Autoradiographie.

Wurde die photoaktivierbare AS in die TMD eingebaut (Abb. 11, V39F\*, I41F\*, I43F\*) so konnte bei SP-C99\*wt und bei beiden SP-C99\* EOFAD-Mutanten jeweils ein Kreuzvernetzungsprodukt nachgewiesen werden. Dieses "Crosslink"-Produkt wanderte in

einem 10% Tris-Tricin Gel etwas langsamer als nicht quervernetztes SP-C99\*. In *in vitro* Translationsansätzen der drei SP-C99\* Varianten, die die photolabile AS außerhalb ihrer TMD tragen, konnten keine Kreuzvernetzungsprodukte detektiert werden (**Abb. 11**, F19F\*, Y91F\*). Daher ist wahrscheinlich, dass es sich bei den "Crosslink"-Partnern um Membranmoleküle handelt.



Abb. 11: Kreuzvernetzungsexperiment mit SP-C99\* Wildtyp, London und Florida mit photolabiler AS an verschiedenen Positionen innerhalb und ausserhalb der TMD. Die verschiedenen SP-C99\* Spezies wurden in Gegenwart von Mikrosomen, Suppressor-tRNA<sup>F\*</sup> und [<sup>35</sup>S]-Methionin *in vitro* translatiert, teilweise UV belichtet und über SDS-PAGE und Autoradiographie auf Kreuzvernetzungsprodukte analysiert. Pro Spur wurden 20% eines 50µl Ansatzes aufgetragen.

Obwohl im 10% Tris-Tricin Gel SP-C99\* nicht von C99\* unterschieden werden kann, wurde dieses Gel zur Analyse von Kreuzvernetzungsprodukten verwendet, da SP-C99\* hier als schärfere Bande läuft und somit "Crosslink"-Produkte besser detektiert werden konnten.

4.1.6 Verdau des Crosslink Produkts mit Phospholipase A2

Um den Charakter des Moleküls, das mit der TMD von C99\* kreuzvernetzt wird, näher zu bestimmen, wurde das "Crosslink"-Produkt der Mutante SP-C99\*wt I41F\* mit Phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) verdaut (**Abb.12**).



**Abb. 12: Verdau des Crosslink Produkts von C99\* Wildtyp I41F\* mit PLA<sub>2</sub>.** C99\*wt I41F\* wurde *in vitro* translatiert und entweder UV-belichtet (Spur 2) oder nicht (Spur 1). Das kreuzvernetzte Produkt wurde anschließend mit PLA<sub>2</sub> verdaut (Spur 4). Spur 3 zeigt die Kontrolle des Verdaus ohne PLA<sub>2</sub>.

PLA<sub>2</sub> spaltet Phospholipide am zweiten Kohlenstoff-Atom ( $C_{\beta}$ -Atom) durch die Hydrolyse des Fettsäureesters in der sn-2 Position. Nach Behandlung von kreuzvernetztem SP-C99\*wt I41F\* mit PLA<sub>2</sub> wandert das quervernetzte Produkt wieder schneller im 10% Tris-Tricin Gel. Demnach scheint es sich bei dem kreuzvernetzten Molekül um ein Phosphoglycerolipid zu handeln. Die Laufeigenschaften des verdauten Produktes entsprechen nicht denen des nichtkreuzvernetzten SP-C99\*wt I41F\*, da ein Teil des Moleküls (entweder die Fettsäure oder das Lyso-Phosphoglycerolipid) kovalent an C99\* gebunden bleibt.

#### 4.2 Herstellung von stabilen N2a Zelllinien mit schaltbarer SP-C99\* Expression

Da durch das Kaninchen Retikulozytenlysat nur sehr geringe Proteinmengen *in vitro* translatiert werden können, war eine Identifizierung des Quervernetzungspartners mittels massenspektrometrischer Analyse nicht möglich.

Darüber hinaus führt die Abhängigkeit des *in vitro* Ansatzes von ER-Membranen dazu, dass Interaktionen, die erst in späteren Kompartimenten stattfinden, in diesem System nicht nachgewiesen werden können. Daher sollten Zelllinien generiert werden, die nach Doxycyclin(Dox)-Induktion SP-C99\*

Wildtyp oder die SP-C99\* EOFAD-Mutanten London und Florida exprimieren. Das von diesen Zellen exprimierte und von der Signalpeptidase prozessierte Protein entspricht exakt dem humanen Substrat der  $\gamma$ -Sekretase im amyloidogenen Prozessierungsweg.

Um stabile N2a Zelllinien zu generieren, die Dox-abhängig SP-C99\* exprimieren, waren zwei Transduktionsschritte nötig. In der ersten Transduktion wurde der Transaktivator rtTA2-M2 für die Dox-abhängige Proteinexpression ins Genom der Wildtyp N2a Zellen integriert. Die zweite Transduktion erfolgte mit SP-C99\* (**Abb.13**).





Zusammen mit den jeweiligen Genen wurde nach einer Sequenz für eine interne ribosomale Eintrittstelle ("internal ribosomal entry site" = IRES), die eine bicistronische mRNA ermöglicht, ein Markerprotein (CD2 oder eGFP) transduziert. CD2 als Plasmamembranmarker läßt sich leicht durch Antikörper anfärben und die für CD2 positiven

Zellen durch FACS (<u>"fluorescence activated cell sorting</u>") Sortierung anreichern. Die Analyse der zweiten Transduktion erfolgte über die eGFP (<u>"enhanced green fluorescent protein</u>") Expression.

# 4.2.1 Klonierung eines bicistronischen Vektors mit SP-C99\* und eGFP

Für das bicistronische Konstrukt aus SP-C99\* Wildtyp, London oder Florida, dem IRES Element und eGFP wurde SP-C99\* aus dem pcDNA3.1 Vektor durch die Restriktionsendonukleasen BamHI und XhoI ausgeschnitten. Zusätzlich wurde ein pBKS-Vektor, der IRES und eGFP enthält, mit XhoI und NotI verdaut, wodurch das IRES-eGFP Fragment freigesetzt wurde. Der Zielvektor pRevTRE2 (Clontech) wurde schließlich durch BamHI und NotI linearisiert. Bei der anschließenden Trippelligation von SP-C99\*, IRES-eGFP und pRevTRE2 entstand ein retroviraler Vektor, der das einklonierte bicistronische Konstrukt in Antwort auf ein Tetracyclin abhängiges Element ("Tet response element" = TRE) exprimiert. Der Vektor wurde über ein Midi-Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt und anschließend sequenziert.

# 4.2.2 Transduktionen und Sortierungen von TAM2 bzw. SP-C99\* positiven N2a Zellen

Zur Herstellung der Zelllinien wurden Virion-Verpackungszellen (HEK293T) mit einem retroviralen Expressionsplasmid und zwei Helferplasmiden transfiziert, die die Zellen zur Produktion von Virionen mit der gewünschten RNA anregen. Es waren zwei Transfektionsrunden mit zwei verschiedenen retroviralen Expressionsplasmiden nötig, um einerseits Virionen mit dem Dox-regulierten Transaktivator und andererseits solche mit SP-C99\* zu generieren. Beide Transfektionen von HEK293T Zellen wurden mit den Helferplasmiden pVPack-GP (kodiert die internen Strukturproteine des Virions und die reverse Transkriptase) und pVPack-eco (kodiert das Virion-Hüllprotein, das durch Bindung des ecotropen Mausrezeptors [MCAT-1] eine Infektion ermöglicht (Davey *et al.*, 1997)) durchgeführt. Die gebildeten Virionen waren somit in der Lage, MCAT-1 positive Zellen, d.h. alle Mauszellen (z.B. N2a) zu infizieren.

Eines der beiden retroviralen Expressionsplasmide war pBI-CD2 mit einem bicistronischen Konstrukt, bestehend aus dem Dox-sensitiven Transaktivator rtTA2-M2 (Urlinger *et al.*, 2000) und einer verkürzten Version des Plasmamembranproteins CD2 (Liu *et al.*, 2000).Das Konstrukt steht unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors. In einer Transfektion von HEK293T wurden mit pBI-CD2 Virionen produziert, die die infizierten Wirtszellen zur konstitutiven Expression des Dox-sensitiven Transaktivators rtTA2-M2 (TAM2) und verkürztem CD2 befähigten.

Das zweite Expressionsplasmid war pRevTRE2-SPC99\*, bestehend aus SP-C99\* cDNAs einem IRES-Element und eGFP. Nach erfolgter Transfektion wurden von den Helferzellen Virionen produziert, die in infizierten Wirtszellen die TAM2 regulierte Expression von SP-C99\* und eGFP ermöglichten.

N2a Wildtyp Zellen (CD2 negativ und MCAT-1 positiv) wurden zunächst mit Virionen transduziert, die die bicistronische RNA für den Dox-abhängigen Transaktivator und für CD2 als Markerprotein enthielten. 50000 CD2 positive Zellen wurden durch FACS-Sortierung mit einem polyklonalen Antikörper gegen CD2 aus Ratte und einem sekundären Anti-Ratte Antikörper, der an Alexa 488 gekoppelt war, isoliert (nicht gezeigt). Diese Zellen werden im Folgenden als N2a<sub>TAM2/CD2</sub> bezeichnet und dienten als Wirte für eine zweite Transduktion, durch die die Gene für SP-C99\* Wildtyp, London oder Florida, zusammen mit eGFP ins Genom der Zelle integriert wurden (**Abb. 13**).

Die mit beiden Virionen-Typen transduzierten Zellen sollten SP-C99\* und eGFP nur bei Zugabe von Dox exprimieren. Daher wurden die Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von 1µg/ml Dox mehrfach auf eGFP Expression am FACS ("<u>F</u>luorescence <u>a</u>ctivated <u>c</u>ell <u>s</u>orting") sortiert, um für die drei SP-C99\* Spezies je einen Zellklon zu erhalten, der SP-C99\* strikt Dox-abhängig exprimierte (**Abb. 14**, gezeigt ist die Sortierung der SP-C99\*wt-exprimierenden Zellen). Diese Sortierungssequenz nennt man Hell-Dunkel-Hell-Sortierung.



Abb. 14: Isolierung des N2a<sub>SP-C99\*wt</sub> Zellklons mit regulierbarer eGFP-Expression. N2a<sub>TAM2/CD2</sub> Zellen wurden mit Virionen transduziert, die SPC99\*wt-IRES-eGFP ins Genom der Zelle integrieren. Dargestellt ist eine Sequenz von FACS-Sortierungsschritten, die man als Hell-Dunkel-Hell-Sortierung bezeichnet. Von dem Pool der dreifach sortierten Zellen wurden Einzelklone isoliert und analysiert. Histogramme: x-Achse zeigt die Intensität der eGFP-Fluoreszenz; y-Achse zeigt die Anzahl der Zellen. Detaillierte Beschreibung siehe Text.

Nach der Transduktion war der Anteil der Zellen, die unter Dox-Induktion eGFP exprimierten, extrem gering, daher wurden 50000 Zellen mit der stärksten eGFP Expression isoliert. Die Zellen dieses Pools exprimierten in einem zweiten Sortierungsschritt viel größere Mengen an eGFP, was durch die Verschiebung einer Zellpopulation zu höheren Fluoreszenz-Intensitäten deutlich wird. Allerdings waren diese Zellen nicht regulierbar und produzierten eGFP unabhängig von der Dox-Induktion. Um die konstitutiv eGFP-exprimierenden Zellen zu selektionieren, wurden im FACS-Sorter jene Zellen gesammelt, die ohne Dox kein eGFP exprimierten. Der so erhaltene Zellpool zeigte nach Dox-Induktion wieder eine sehr schwache Expression von eGFP. Von diesen Zellen wurden, wie bei der ersten Sortierung, diejenigen isoliert, die bei erfolgter Induktion die höchste Fluoreszenzintensität aufweisen. In den resultierenden Zellen konnte nun erstmals eine deutliche Dox-abhängige Verschiebung zu höherer Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Allerdings die blieben Fluoreszenzintensitäten schwach und der Zellpool war sehr inhomogen. Daher wurden auf Basis dieser Zellen 48 Einzelklone isoliert und auf ihre Induzierbarkeit und eGFP-Expression analysiert.

Dieses Verfahren wurde mit den drei Virionen für SP-C99\*wt, SP-C99\*L und SP-C99\*F durchgeführt. Die erhaltenen Zelllinien waren Dox-induzierbar für die jeweilige SP-C99\* Spezies, doch waren die absoluten Mengen an exprimiertem eGFP nur sehr schwer anpassbar.

## 4.2.3 Analyse der N2a<sub>SP-C99\*</sub> Zelllinien

Die drei generierten Zelllinien mit den verschiedenen induzierbaren SP-C99\* Spezies wurden detailliert analysiert und mit ihrer unmittelbaren Vorläuferzelllinie N2a<sub>TAM2/CD2</sub> verglichen.

### 4.2.3.1 FACS Experimente

In einer ersten Analyse wurden die Zelllinien N2a<sub>SP-C99\*wt</sub>, N2a<sub>SP-C99\*F</sub> und N2a<sub>SP-C99\*L</sub> auf induzierbare eGFP Expression analysiert (**Abb. 15**).



Abb. 15: FACS-Analyse der N2a<sub>SP-C99\*wt</sub>, N2a<sub>SP-C99\*F</sub> und N2a<sub>SP-C99\*L</sub> Zelllinien und Vergleich mit N2a<sub>TAM2/CD2</sub>. Jede Zelllinie wurde jeweils für 24h mit Dox behandelt oder nicht induziert. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte am FACS-Analyser. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten. A) Faktor der eGFP Fluoreszenz von induzierten gegen nicht induzierte Zellen. B) Absoluten Fluoreszenzintensitäten der induzierten Zelllinien. Schwarze Balken, N2a<sub>TAM2/CD2</sub>; dunkelgraue Balken, N2a<sub>SP-C99\*L7</sub> (EOFAD Mutanten).

Dazu wurden die entsprechenden N2a Zellklone aus einer konfluenten Schale 1:6 verdünnt und in je zwei 3cm Schalen umgesetzt. Nach 24h erfolgte in je einer Schale pro Zelllinie die Induktion mit 1µg/ml Dox, während die zweite, nicht induzierte Schale als Negativkontrolle diente. 24h nach der Induktion wurden die Zellen mit "Cell Dissociation Buffer" von der Schale gelöst und im FACS-Analyzer auf eGFP Fluoreszenz untersucht. In allen SP-C99\*-Zelllinien konnte durch Induktion die eGFP-Fluoreszenz erhöht werden. Allerdings schwankte der Induktionseffekt zwischen 4,7-facher (SP-C99\*<sub>L</sub>) und 10,1-facher (SP-C99\*<sub>F</sub>) Fluoreszenzintensität. In SP-C99\*wt Zellen steigerte sich die Fluoreszenzintensität von nicht induzierten zu induzierten Zellen um den Faktor 7,3 (**Abb. 15 A**).

Noch deutlicher waren die Unterschiede in der absoluten Fluoreszenz. Sie stieg bei induzierten im Vergleich zu nicht induzierten N2a<sub>TAM2/CD2</sub> Zellen um den Faktor 3,5. Bei den jeweils induzierten SP-C99\* Zelllinien war sie zwar immer erhöht (N2a<sub>SP-C99\*L</sub>-Zellen 14,8; N2a<sub>SP-C99\*F</sub> 53,6; N2a<sub>SP-C99\*wt</sub> 61,9), unterlag aber starken Schwankungen (**Abb. 15 B**). Die Unterschiede in Bezug auf Induktionseffizienz und absolut gebildeten eGFP Mengen beruhen auf der Tatsache, dass in den Zelllinien der TAM2 regulierte Promotor unterschiedlich streng reguliert war, d.h. dass vor allem bei N2a<sub>SP-C99\*wt</sub> auch ohne Dox geringe Mengen an eGFP gebildet wurden (siehe auch **Abb. 14** unteres Histogramm, graue Kurve im Vergleich zum Histogramm der transduzierten N2a<sub>TAM2/CD2</sub> Zellen vor der 1. Sortierung).

Es wurde versucht durch unterschiedliche Dox-Konzentrationen (0,05µg/ml - 2µg/ml) die Zellen auf eGFP Expression zu normieren, doch schwankten die produzierten eGFP-Expressionsraten bei Induktion mit geringer Dox-Konzentration beträchtlich.

#### 4.2.3.2 Western Blot

Die Expression von eGFP in den generierten Zelllinien muss nicht zwingend bedeuten, dass auch größere Mengen SP-C99\* synthetisiert werden. So kann die C99\* Menge durch posttranslationale Regulation oder einen erhöhten Turnover des Proteins erheblich von der eGFP Menge abweichen. Tatsächlich scheint die C99-Expression sehr stark reguliert zu sein und hat eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von <1h - 3h (Kaether *et al.*, 2006; Savage *et al.*, 1998). Daher ist endogenes C99 in Zellen kaum nachweisbar.

Um zu untersuchen, ob die drei Zelllinien Dox-abhängig SP-C99\* exprimieren, wurden die Zellen wiederum zwei Tage (d) vor dem Experiment 1:6 verdünnt und 24h vor der Aufarbeitung eine Schale pro Zelltyp induziert (1µg/ml Dox). Die Zellen wurden gewaschen, abgekratzt und in Lyse-Puffer mit 1% Triton X-100 und 0,5% Desoxycholat lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels eines 10-20% Tris-Tricin Gradientengel und eines Westernblots (WB) mit einem Antikörper gegen eine konservierte C-terminale Sequenz von APP (22C14).



Wie in **Abb. 16** dargestellt, konnte in allen drei Zelllinien eine Expression von SP-C99\* nachgewiesen werden.

Abb. 16: Westernblot-Analyse der N2a<sub>SP-C99\*wt</sub>, N2a<sub>SP-C99\*F</sub> und N2a<sub>SP-C99\*L</sub> Zelllinien im Vergleich zu N2a<sub>TAM2/CD2</sub>. A) Die verschiedenen Zelllinien wurden entweder nicht induziert (Negativkontrolle) oder für 24h mit 1µg/ml Dox induziert.  $5x10^6$  Zellen wurden mit 100µl Lysepuffer lysiert und 10% davon mit einem 10-20% Tris-Tricin Gel und WB analysiert. Analyse der Lysate mit einem Antikörper gegen den konservierten C-terminus von APP (22C14). B) Lysat (L) und Kulturmedium (M) von  $5x10^6$  Zellen wurden mit einem Antikörper gegen humanes A $\beta$  (w02) immunpräzipitiert. 10% der Lysate bzw. 40% der immunpräzipitierten Proben wurden durch ein 10-20% Tris-Tricin Gel und einen Westernblot gegen humanes A $\beta_{40}$  (G2-10) analysiert.

Allerdings schwankten in Folgeversuchen die exprimierten Mengen der verschiedenen Spezies erheblich und waren nicht immer im vergleichbaren Rahmen. Im Allgemeinen waren die SP-C99\*-Expressionsraten wie folgt: [SP-C99\*wt] > [SP-C99\*F] > [SP-C99\*L]. Darüber hinaus wurde in einer Induktionskinetik festgestellt, dass die exprimierten SP-C99\* Mengen 18h - 24h nach Dox-Zugabe am höchsten sind, während nach 48h Induktion kaum noch SP-C99\* nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob das synthetisierte humane SP-C99\* wie endogenes Protein von der  $\gamma$ -Sekretase prozessiert wird, wurden N2a<sub>TAM2/CD2</sub> und N2a<sub>SP-C99\*wt</sub> Zellen für 24h mit Dox induziert. Zelllysat und Medium wurden danach mit einem Antikörper gegen humanes APP, C99 und A $\beta$  (w02) immunpräzipitiert. Diese Proben wurden durch SDS-PAGE und WB mit einem Antikörper gegen A $\beta_{40}$  (G2-10) analysiert. Während in den Lysaten der Negativkontrolle und in nicht induzierten N2a<sub>SP-C99\*wt</sub> Zellen kaum A $\beta_{40}$  nachgewiesen werden konnte, zeigten die Immunpräzipitationen (IPs) der Medien beider Zelllinien Signale für A $\beta_{40}$ . Im Falle der SP-C99\*wt-exprimierenden Zellen war die A $\beta$  Menge allerdings deutlich erhöht. Darüber hinaus waren nur im Lysat der induzierten N2a<sub>SP-C99\*wt</sub> Zellen höhere A $\beta_{40}$  Mengen detektierbar. Dies deutet an, dass das überexprimierte SP-C99\*wt in N2a Zellen über den amyloidogenen Proteolyseweg abgebaut wird.

## 4.2.3.3 Immunfluoreszenz

Zur genaueren Charakterisierung der Zelllinien sollte die subzelluläre Lokalisierung der exprimierten SP-C99\* Spezies analysiert werden. Dazu wurden die verschiedenen N2a Zelllinien in Petrischalen mit Deckgläschen umgesetzt und für 24h induziert. Die Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten mit Antikörpern gegen C99, die nur humanes Protein erkennen sollten. Angewandte Antikörper waren: w02, 2C8 und NAB-228, die alle gegen den nicht konservierten N-Terminus von C99 bzw. Aβ gerichtet und daher human spezifisch sind. Keiner der gewählten Antikörper zeigte einen Unterschied zwischen N2a<sub>TAM2/CD2</sub> und induzierten N2a<sub>SP-C99\*</sub> Zelllinien (für NAB-228 exemplarisch gezeigt in **Abb. 17**, erste Spalte).



Abb. 17: Immunofluoreszenz-Analyse der N2a<sub>SP-C99\*wt</sub>, N2a<sub>SP-C99\*F</sub> und N2a<sub>SP-C99\*L</sub> Zelllinien und Vergleich mit N2a<sub>TAM2/CD2</sub>. Alle Zelllinien wurden für 24h mit 1µg/ml Dox induziert und mittels Immunfluoreszenz auf APP-Spaltprodukte untersucht. Die Zellen wurden mit 3% Paraformaldehyd (PFA) fixiert, mit 0,1M Glycin gequencht, mit 0,5% Triton permeabilisiert und anschliessend mit 1% BSA blockiert. Der Nachweis von APP-Prozessierungsprodukten erfolgte mit Maus-Antikörpern gegen humanes APP, C99 und Aβ (linke Spalte), gegen Aβ<sub>40</sub> (mittlere Spalte) oder gegen Aβ<sub>42</sub> (rechte Spalte) und einem sekundären Alexa488 gekoppelten anti-Maus Antikörper.

Ein indirekter Immunfluoreszenz-Test auf exprimiertes SP-C99\* bestand in der Verwendung von Antikörpern, die spezifisch A $\beta_{40}$  (G2-10) oder A $\beta_{42}$  (G2-11) erkennen (**Abb. 17**, mittlere und rechte Spalte). A $\beta_{40}$  konnte in induzierten N2a<sub>SP-C99\*wt</sub> Zellen

detektiert werden. Eine schwache Detektion fand auch in N2a<sub>SP-C99\*F</sub> Zellen statt, während N2a<sub>SP-C99\*L</sub> Zellen und die Negativkontrolle N2a<sub>TAM2/CD2</sub> keine Markierung von A $\beta_{40}$  zeigten. Dies entspricht den Erwartungen, da SP-C99\*wt stärker zur A $\beta_{40}$  Form degradiert wird als die mutierten SP-C99\* Spezies. Doch auch in den Zelllinien N2a<sub>SP-C99\*F</sub> und N2a<sub>SP-C99\*L</sub> müsste A $\beta_{40}$  entstehen. Die FACS (siehe 4.3.2.1) und Westernblot Experimente (siehe 4.3.2.2) legen aber nahe, dass mutiertes SP-C99\* nur in geringeren Mengen gebildet wird, weshalb das in diesen Fällen gebildete A $\beta_{40}$  wohl unter der Nachweisgrenze liegt.

Die Markierung von A $\beta_{42}$  hingegen zeigt die stärkste Markierung in den SP-C99\* Mutanten. Dies ist nicht unerwartet, da bekannt ist, dass London und Florida Mutationen zur verstärkten Bildung von A $\beta_{42}$  führen (Eckman *et al.*, 1997; Lichtenthaler *et al.*, 1999).

# 4.3 Nachweis von C83/C99/APP in Präparationen von Detergens resistenten Membranen

Die Distribution der verschiedenen Sekretasen und APP in Detergens-lösliche oder Detergens-unlösliche Membranbereiche wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht. Dabei wurde mehrfach gezeigt, dass die β-Sekretase BACE-1 teilweise in DRMs, die vermutlich Lipid-Rafts repräsentieren, vorliegt (Ehehalt et al., 2003; Lee, S. J. et al., 1998; Simons et al., 1998; Simons et al., 2001), während die α-Sekretase aus DRMs ausgeschlossen wird (Ehehalt et al., 2003; Kojro et al., 2001; Simons et al., 2001). Die γ-Sekretase und APP Holoprotein scheinen auch teilweise innerhalb von DRMs vorzukommen (Bouillot et al., 1996; Vetrivel et al., 2005). Allerdings ist die Wertung dieser Studien schwierig, weil verschiedene Gruppen unterschiedliche Detergentien für die Präparation von DRMs einsetzen, was einen Vergleich der einzelnen Ergebnisse unmöglich macht. So wurde beispielsweise auch gezeigt, dass APP in einigen neuronalen Zelllinien und Membranpräparationen von murinen und humanen hippocampalen Neuronen fast ausschließlich außerhalb von Triton-, CHAPS- und LubrolWX-DRMs existiert (Abad-Rodriguez et al., 2004; Kaether & Haass, 2004). Demnach wird postuliert, dass der Anteil von BACE-1 innerhalb von DRMs keine Funktion in der Proteolyse von APP erfüllt.

Um zu überprüfen, ob sich SP-C99\*wt und die beiden SP-C99\* EOFAD-Mutanten London und Florida hinsichtlich ihrer DRM-Lokalisation unterscheiden, wurden die drei N2a<sub>SP-C99\*</sub> Zelllinien 24h vor Aufarbeitung mit Dox induziert. Je 10<sup>7</sup> Zellen wurden mit PBS gewaschen, abgekratzt und in Lysepuffer mit 1% Triton X-100 bei 4°C lysiert. Die Trennung der DRM-Fraktion von den löslichen Membranbereichen erfolgte über einen Optiprep Gradienten. DRMs flotieren in diesem Gradienten aufgrund ihrer geringerer Dichte von den 40% Optiprep-Bodenfraktionen in die Interphase zwischen 28% und 0% Optiprep. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit dem Antikörper 22C14 gegen den C-Terminus von APP, C99 und C83 analysiert. Die DRM-Präparationen wurden jeweils durch den Raft-Marker Flotillin getestet.

Während eine geringe Menge des APP Holoproteins in Triton X-100 DRMs nachgewiesen werden konnte, konnte weder C83, noch eine der C99 Spezies in Rafts detektiert werden (Abb. 18).



**Abb. 18: Verhalten von APP, C83 und SP-C99\* in Präparationen von Detergens unlöslichen Membranen.** Die stabilen SP-C99\*-exprimierenden N2a Zelllinien wurden 24h vor der Raft-Präparation induziert. Je 10<sup>7</sup> Zellen jeder Zelllinie wurden mit einem Lysepuffer mit 1% Triton X-100 bei 4°C lysiert und die DRMs in einem Optiprep-Gradienten flotiert. 2% des Lysats und 2% jeder Fraktion wurden auf einem 10-20% Tris-Tricin Gel aufgetrennt und mittels WB mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von APP, C99 und C83 analysiert.

Wie bereits angedeutet, schwankten die exprimierten SP-C99\*-Mengen zwischen den Zelllinien beträchtlich. Auch die Mengen an endogenem APP waren bisweilen unterschiedlich. Dies lag vor allem an dem stark gebremsten Zellwachstum nach Induktion von SP-C99\*L, während die N2a<sub>SP-C99\*F</sub> Mutante nur leicht ihr Wachstum verlangsamte und die SP-C99\*wt-exprimierende Zelllinie ungebremst weiterwuchs.

# 4.4 Vergleich der subzellulären Lokalisation verschiedener C99 Spezies in Vero-Zellen

Da APP, C99 und C83 bei moderater Expression nicht in der Immunfluoreszenz detektiert werden konnten, wurden YFP- und CFP-getaggte Versionen der verschiedenen C99 Spezies kloniert. Zu diesem Zweck wurden C99wt und C99 mit den EOFAD Mutationen London und Florida in die Vektoren pECFP und pEYFP kloniert. Die resultierenden Konstrukte bestehen aus der Sequenz eines Signalpeptids für den kotranslationalen Einbau des Proteins in die ER-Membran, darauf folgt das jeweilige fluoreszierende Protein und C-terminal schließlich die C99 Variante. Das Gen befindet sich unter Kontrolle des starken, konstitutiven CMV Promotors.

Die klonierten Plasmide wurden mittels Elektroporation in Vero Zellen transfiziert. 14h nach der Elektroporation wurden die Zellen gewaschen, fixiert und teilweise mit Primärantikörpern gegen Organellmarker und Alexa 633 gekoppelten Sekundärantikörpern markiert.

Wie in Abb. 19 dargestellt, konnten keine Unterschiede in der Lokalisation der verschiedenen C99 Spezies detektiert werden. Sowohl C99 London (Abb. 19 A), als auch C99 Florida (Abb. 19 B) kolokalisierten mit C99 Wildtyp.



Abb. 19 A: Kolokalisation von C99wt-CFP mit C99L-YFP bzw. von C99wt-YFP mit C99L-CFP. Vero Zellen wurden mit C99wt-Fluoreszenz-Protein und C99L-Fluoreszenzprotein Konstrukten transfiziert, für 14h inkubiert, mit 3% PFA fixiert und durch konfokale Mikroskopie ausgewertet. Die obere Hälfte der Abbildung zeigt zwei Beispiele für die Lokalisation von C99L-YFP und C99wt-CFP, die untere für die Lokalisation von C99L-CFP und C99wt-YFP. In den Bildern der letzten Spalte ("overlay") sind die farbigen Bilder der beiden ersten Spalten übereinandergelegt. Blaue Signale (CFP) und gelbe Signale (YFP) addieren sich zu weiss.



Abb. 19 B: Kolokalisation von C99wt-CFP mit C99F-YFP bzw. von C99wt-YFP mit C99F-CFP. Vero Zellen wurden mit C99wt-Fluoreszenz-Protein und C99F-Fluoreszenzprotein Konstrukten transfiziert, für 14h inkubiert, mit 3% PFA fixiert und durch konfokale Mikroskopie ausgewertet. Die obere Hälfte der Abbildung zeigt zwei Beispiele für die Lokalisation von C99F-YFP und C99wt-CFP, die untere für die Lokalisation von C99F-CFP und C99wt-YFP. In den Bildern der letzten Spalte ("overlay") sind die farbigen Bilder der beiden ersten Spalten übereinandergelegt. Blaue Signale (CFP) und gelbe Signale (YFP) addieren sich zu weiss.

Die konfokalen Fluoreszenzbilder zeigten eine Lokalisation der drei Proteine in einer kompakten Struktur nahe dem Zellkern, wobei es sich um das Golgi Kompartiment handelt (siehe Kolokalisation mit dem Cis-Golgi Marker gm130) (Abb. 20 A).



Abb. 20 A: Kolokalisation von C99wt-CFP bzw. C99wt-YFP mit gm130. Vero Zellen wurden mit C99wt-Fluoreszenzprotein Konstrukten transfiziert und für 14h inkubiert. Die Zellen wurden mit 3% PFA fixiert, mit einem Maus-Antikörper gegen den Cis-Golgi Marker gm130 und einem sekundären Alexa633 gekoppelten anti-Maus-Antikörper gefärbt und durch konfokale Mikroskopie ausgewertet. Die obere Hälfte der Abbildung zeigt zwei Beispiele für die Lokalisation von C99wt-CFP, die untere für die Lokalisation von C99wt-YFP. Die Bilder der linken Spalte zeigen die gm130-Lokalisation. In den Bildern der letzten Spalte (",overlay") sind die farbigen Bilder der beiden ersten Spalten übereinandergelegt. Blaue Signale (CFP) und rote Signale (Alexa 633) addieren sich zu violett, gelbe Signale (YFP) und rote Signale (Alexa 633) addieren sich zu orange.

Das exprimierte C99-FP zeigte keine Kolokalisation mit dem ER-Marker PDI oder mit dem Endosomenmarker rab5 (Abb. 20 B).



Abb. 20 B: Kolokalisation von C99wt-CFP bzw. C99wt-YFP mit rab5 und PDI. Vero Zellen wurden mit C99wt-Fluoreszenzprotein Konstrukten transfiziert und für 14h inkubiert. Die obere Hälfte der Abbildung zeigt zwei Beispiele für frühe Endosomen, die mit einem primären Kaninchen-Antikörper gegen rab5 und einem sekundären anti-Kaninchen-Antikörper, der Alexa633 gekoppelt war, detektiert wurden. Die untere Hälfte zeigt die Lokalisation von PDI als ER-Marker (ebenfalls mit Alexa 633 gekoppeltem sekundären Antikörper). C99-YFP bzw. C99-CFP kolokalisiert mit keinem der beiden Marker. In den Bildern der letzten Spalte ("overlay") sind die farbigen Bilder der beiden ersten Spalten übereinandergelegt. Blaue Signale (CFP) und rote Signale (Alexa 633) addieren sich zu violett, gelbe Signale (YFP) und rote Signale (Alexa 633) addieren sich zu orange.

## 4.5 Fütterungsexperimente mit photoaktivierbaren Lipidvorläufern

Aus den Ergebnissen von Absatz 4.1 geht hervor, dass *in vitro* translatiertes SP-C99\* mit einer photolabilen Gruppe im Transmembranspan bei UV-Belichtung kovalent an ein Phosphoglycerolipid gebunden wird. Diese Interaktion ist nicht überraschend vor dem Hintergrund, dass in diesem Versuch ER-Membranen eingesetzt wurden, die eine hohe Konzentration von Phosphoglycerolipiden und nur sehr geringe Mengen an Sphingolipiden und Cholesterin enthalten. Daher sollte *in vivo* überprüft werden, ob in N2a Zellen exprimiertes SP-C99\*, das wie in Absatz 4.4. gezeigt in post ER-Kompartimenten, wie dem Golgi akkumuliert, weiterhin mit Phosphoglycerolipiden interagiert. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob das Membranprotein SP-C99\* willkürlich mit Membranlipiden interagiert oder ob die Protein-Lipid Interaktionen spezifischer Natur sind.

Zu diesem Zweck wurden N $2a_{TAM2/CD2}$  Zellen als Negativkontrolle und die drei verschiedenen N $2a_{SP-C99*}$  Zelllinien in 10cm Petrischalen kultiviert, 24h vor der Aufarbeitung mit 1µg/ml Dox induziert und für unterschiedliche Zeiten mit photolabilen Lipidvorstufen markiert. Einen schematischen Überblick über die Markierungexperimente gibt **Abb. 21**.



Abb. 21: Schematische Darstellung der Analyse spezifischer Wechselwirkungen von Membranproteinen mit photoaktivierbaren Lipiden. Der von der Zelle aufgenommene photolabile Lipidbaustein wird in endogene Lipide eingebaut. Durch Bestrahlung mit UV-Licht wird von den photochemisch aktivierbaren Gruppen Stickstoff abgespalten. Die so aktivierten Lipide gehen mit ihrer unmittelbaren Umgebung eine kovalente Bindung ein (Vernetzungsprodukte).

4.5.1 Kinetik der Markierung von SP-C99\* Wildtyp mit 10-azi-Stearinsäure

Das photoaktivierbare Stearinsäurederivat, 10-azi-Stearinsäure, wird von Zellen aufgenommen und in Lipide eingebaut (Thiele *et al.*, 2000). Dabei entstehen photolabile Phosphoglycerolipide, aber auch photoaktivierbare Sphingolipide. Der Großteil des Stearinsäurederivats wird vermutlich in das mengenmäßig häufigste Phosphoglycerolipid Phosphatidylcholin (PC) eingebaut. Im Labor wurde das photoaktivierbare Stearinsäurederivat von Per Haberkant in Kooperation mit Christoph Thiele (MPI CBG, Dresden) synthetisiert.

Um die *in vitro* Kreuzvernetzung von SP-C99\* mit einem Phosphoglycerolipid *in vivo* zu überprüfen, wurden N2a<sub>SP-C99\*wt</sub> Zellen 24h mit 1µg/ml Dox induziert und für 3h – 9h mit 10azi-Stearinsäure markiert. Die Zellen wurden gewaschen und teilweise für 10min mit UV- Licht bestrahlt, wodurch die photoaktivierbaren Lipide kovalent mit Nachbarmolekülen vernetzt werden. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Lysat über SDS-PAGE und Westernblot mit dem 22C14 Antikörper gegen APP, C99 und C83 analysiert (**Abb. 22**).



Abb. 22: Markierung von SP-C99 Wildtyp mit 10-azi-Stearinsäure. N $2a_{SP-C99*wt}$  Zellen wurden 24h induziert und für 3h – 9h mit 10-azi-Stearinsäure markiert. Ein Teil der Zellen wurden mit UV-Licht bestrahlt, dann wurden die Zellen lysiert und die Lysate durch SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Verwendet wurde der Antikörper 22C14 gegen den äußersten C-Terminus von APP, C99 und C83. Bei SP-C99\*wt ist bereits nach 3h ein Kreuzvernetzungsprodukt (rote Pfeile) durch die verlangsamte Migration detektierbar.

Dabei wurde eine Kreuzvernetzung von SP-C99\*wt mit einem photolabilen Lipid bereits nach 3h Markierungsdauer detektiert, was sich in der SDS-PAGE durch eine verlangsamte Migration darstellte. Nach 6h Markierungsdauer war ein vollständiger Shift von SP-C99\*wt zu einem höheren apparenten Molekulargewicht detektierbar. Zusätzlich zum ersten Kreuzvernetzungsprodukt wurde eine weitere Bande sichtbar. Nach 9h nahm die Intensität dieser Bande zu. Längere Markierungszeiten resultierten in immer diffuseren Signalen für SP-C99\*wt.

Erstaunlicherweise wurde für endogenes C83, das aufgrund seiner geringeren Größe noch stärker seine Laufeigenschaften bei einer Kreuzvernetzung mit Lipiden verändern sollte, nie eine Veränderung der Migration beobachtet.

4.5.2 Markierung verschiedener SP-C99\* Spezies mit photolabilen Lipidvorläufermolekülen

Um zu testen, ob Wildtyp SP-C99\* und die EOFAD-Formen unterschiedlich mit Lipiden interagieren, wurden die N2a Zelllinien zur Expression dieser Proteine induziert, für 6h mit 10-azi-Stearinsäure oder 14-azi-Sphingosin markiert, teilweise UV belichtet und wie im vorigen Markierungsexperiment mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert (**Abb. 23**).



Abb. 23: Kreuzvernetzung verschiedener SP-C99\* Spezies mit photolabilen Lipiden. Verschiedene N2a Zelllinien wurden für 18h mit 1 $\mu$ g/ml Dox zur Expression der jeweiligen SP-C99\* Spezies induziert und für 6h mit 10-azi-Stearinsäure (A) oder 14-azi-Sphingosin (B) markiert. Je ca. 5x10<sup>6</sup> Zellen wurden lysiert, die Kerne sedimentiert und 5% des Lysats durch SDS-PAGE (10-20% Tris-Tricin) und WB mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von APP, C99 und C83 (22C14) analysiert.

Bei Markierungsexperimenten von SP-C99\*-exprimierenden N2a Zellen mit 10-azi-Stearinsäure wurde unabhängig von der C99 Spezies ein Kreuzvernetzungsprodukt detektiert (**Abb. 23 A**). Die unterschiedlichen Expressionslevel machten indes eine quantitative Gegenüberstellung der Kreuzvernetzungsrate unmöglich.

Markierungsexperimente mit 14-azi-Sphingosin hingegen resultierten bei keiner der untersuchten SP-C99\* Spezies in einer Veränderung der Migrationseigenschaften im SDS-Gel (Abb. 23 B). Daraus kann aber nicht der Schluss gezogen werden, dass es zu keiner Kreuzvernetzung mit Sphingolipiden kommt, da ein Vernetzungsprodukt im SDS-Gel unter Umständen genauso wandert wie nicht vernetztes Protein.

4.5.3 Versuch der massenspektrometrischen Identizierung des an SP-C99\* quervernetzten Lipids

Die kreuzvernetzten SP-C99\* Banden wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, eluiert, konzentriert und in verschiedenen Ansätzen massenspektrometrisch untersucht (nicht gezeigt). Die massenspektrometrische Analyse wurde von Leonie Waanders (Gruppe Prof. Dr. Matthias Mann am MPI für Biochemie in Martinsried) durchgeführt. Dabei konnte in keinem Fall das Fragment des Transmembranspans nach Trypsinverdau nachgewiesen werden, während alle anderen Fragmente detektiert wurden.

Zur Optimierung der massenspektrometrischen Analytik wurde rekombinantes, Hisgetaggtes C99 in *Escherichia coli* exprimiert und über eine Nickel-Säule aufgereinigt. Danach wurde das Protein auf ein 10-20% Tris-Tricin Gel aufgetragen, die C99 Bande ausgeschnitten, eluiert und Chloroform/Methanol gefällt. Das so gereinigte C99 konnte mit einem "TopDown" Ansatz, der die Masse des Gesamtproteins misst, an einem LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer nachgewiesen werden. Nach Fragmentierung des Proteins wurden 14 Fragmente detektiert von denen 8 in der TMD lagen.

Mit Lipiden kreuzvernetzte SP-C99\* wurde immunpräzipitiert, ebenfalls aus einem 10-20% Tris-Tricin Gel ausgeschnitten und eluiert. In diesen Proben konnte C99 nicht nachgewiesen werden.

#### 4.5.4 Fütterungsexperiment mit radioaktiven photoaktivierbaren Lipidvorläufern

Mit C99 kreuzvernetzte Lipide konnten massenspektrometrisch nicht identifiziert werden. Um Quervernetzungsprodukte unabhängig von ihrem Einfluss auf die Laufeigenschaften des Proteins im SDS-Gel detektieren zu können, wurde das Markierungsexperiment nicht nur mit photoaktivierbaren sondern gleichzeitig auch radioaktiv markierten Lipidbausteinen durchgeführt.

Für die Markierungsexperimente wurde mit 10-azi-Stearinsäure und [<sup>3</sup>H]-Cholin, mit [<sup>3</sup>H]markiertem 14-azi-Sphingosin oder mit [<sup>3</sup>H]-markiertem 5-azi-Cholesterin gefüttert. Nach Inkorporation in die Zelle werden aus dem Stearinsäurederivat und Cholin das radioaktive photolabile Phosphoglycerolipid Phosphatidylcholin (<sup>3</sup>H-photo-PC) (Thiele *et al.*, 2000) und aus [<sup>3</sup>H]-14-azi-Sphingosin Tritium markierte Sphingolipide synthetisiert (Haberkant, nicht veröffentlichte Daten).

Die Markierungen mit den Vertretern der drei Hauptklassen von Membranlipiden wurden mit den induzierten N2a<sub>SP-C99\*</sub> Zelllinien wie im Versuch mit nicht radioaktiv markierten Lipidvorstufen durchgeführt. Die Lysate wurden anschließend mit einem human-spezifischen Antikörper (w02) gegen den N-Terminus von C99 immunpräzipitiert. Lysate und Immunpräzipitate wurden durch ein 10-20% Tris-Tricin-Gel und einen Westernblot mit dem 22C14 Antikörper gegen den C-Terminus von APP, C99 und C83 analysiert.

Nachdem sich ein Kreuzvernetzungsprodukt von *in vitro* translatiertem photolabilem SP-C99\* mit PLA<sub>2</sub> verdauen lässt (siehe 4.1.6) und SP-C99\* *in vivo* nach 10-azi-Stearinsäure Markierung vollständig mit einem Stoffwechselprodukt des Stearinsäurederivats vernetzt wird (siehe 4.5.1 und 4.5.2), scheint es sich bei den Quervernetzungspartnern von SP-C99\* um Phosphoglycerolipide zu handeln. Bei der Markierung mit <sup>3</sup>H-photo-PC konnte allerdings keine Radioaktivität mit SP-C99\* quervernetzt werden, obwohl PC das am häufigsten vorkommende Phosphoglycerolipid ist (**Abb. 24**).



Abb. 24: Markierungsexperiment von SP-C99\*-exprimierenden N2a-Zellen mit [<sup>3</sup>H]photo-PC. Die unterschiedlichen N2a Zelllinien wurden teilweise für 24h mit Dox induziert und mit [<sup>3</sup>H]-Cholin und 10-azi-Stearinsäure für 18h markiert. Nach UV-Bestrahlung wurden 5% des Lysats abgenommen und das restliche Lysat mit dem human-spezifischen w02 Antikörper immunpräzipitiert. 5% des Lysats und 40% der Immunpräzipitation wurden auf ein 10-20% Tris-Tricin-Gel aufgetragen. Anschließend wurden die Proteine des Gels auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen den konservierten C-Terminus von APP (22C14) entwickelt und mittels Autoradiographie am  $\beta$ -Imager analysiert. Die immunpräzipitierten Proben der unterschiedlichen SP-C99\* Spezies wurden nicht mit Tritium markiertem photo-PC quervernetzt.

Eine Interaktion von SP-C99\* mit Cholesterin wäre nicht unwahrscheinlich, da gezeigt wurde, dass die Cholesterinkonzentration der Zelle und auch die Cholesterinverteilung in einzelne Kompartimente die proteolytische Prozessierung von APP stark beeinflussen.

Obwohl die Markierungsexperimente von SP-C99\* mit 14-azi-Sphingosin keine Veränderung der Laufeigenschaften des Proteins im SDS-Gel verursachten, sollte mit [<sup>3</sup>H]markiertem 14-azi-Sphingosin eindeutig bestimmt werden, ob es zur Interaktion von SP-C99\* mit Sphingolipiden kommt.

Die Markierungen der N2a<sub>SP-C99\*</sub> Zellen mit den radioaktiven, photoaktivierbaren Derivaten von Cholesterin und Sphingosin führten allerdings weder mit dem Cholesterin-(**Abb. 25A**), noch mit dem Sphingosinderivat (**Abb. 25B**) zur Quervernetzung mit den verschiedenen SP-C99\* Spezies.




# 4.6 Markierungen von SP-C99\*-exprimierenden COS7-Zellen mit radioaktiven, photoaktivierbaren Lipidvorläufermolekülen

Weil die SP-C99\* Expression in N2a Zellen nur moderat war, wäre es denkbar, dass tatsächlich stattfindende Interaktionen wegen der schwachen IP-Effizienz nicht mehr detektiert werden können. Dies ist höchst unwahrscheinlich, da im  $\beta$ -Imager Aktivitäten von 400DPM in 2h visualisiert werden und die Zellen bei einer Markierung mit 200 $\mu$ Ci (4,4x10<sup>8</sup> DPM) ca. 10% der Radioaktivität inkorporieren.

Dennoch wurden COS7-Zellen transient mit den pcDNA3.1 Vektoren aus 4.1.2 transfiziert. Diese Vektoren haben das jeweilige SP-C99\* Gen unter dem starken, konstitutiven CMV Promotor und exprimierten daher deutlich höhere Mengen an SP-C99\* als die stabil transduzierten, induzierbaren N2a Zelllinien (**Abb. 26**).



Abb. 26: Transiente Transfektion von COS7-Zellen mit SP-C99\*wt. COS7 Zellen wurden auf 10cm Petrischalen kultiviert und mit Lipofectin transfiziert. Eine Negativkontrolle wurde ohne Lipofectin durchgeführt. Nach 24h wurden die Zellen lysiert, die Kerne sedimentiert und die Lysate über SDS-PAGE und WB mit einem Antikörper gegen den konservierten C-Terminus von APP, C99 und C83 analysiert.

Mit den stark SP-C99\*-exprimierenden COS7 Zellen wurden die Fütterungsexperimente mit radioaktiven photolabilen Lipidbausteinen wiederholt. Dabei wurden die Zellen 24h vor der Aufarbeitung mit Lipofectin transfiziert und mit [<sup>3</sup>H]-photo-PC, [<sup>3</sup>H]-14-azi-Sphingosin oder [<sup>3</sup>H]-5-azi-Cholesterin gefüttert. Die Aufarbeitung erfolgte wie in den vorangegangenen Markierungsexperimenten.

Durch eine IP mit w02 Antikörper konnte in keinem Fall Radioaktivität koimmunpräzipitiert werden (Abb. 27).



Abb. 27: Fütterungsexperiment von COS7-Zellen mit radioaktiv markierten photolabilen Lipidvorläufermolekülen. Die Zellen wurden transfiziert und für 6h mit [<sup>3</sup>H]-photo-Sphingosin, 18h mit [<sup>3</sup>H]-photo-PC oder ebenfalls 18h mit [<sup>3</sup>H]-photo-Cholesterin markiert. Nach der Zelllyse folgte eine Immunpräzipitation der Lysate mit einem human-spezifischen Antikörper (w02). Die Proteine der Lysate und IPs wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch WB auf Membranen transferiert. Die obere Hälfte der Abbildung zeigt die Autoradiographie der Membranen. In der unteren Bildhälfte wurden dieselben Membranen durch einen WB mit einem Antikörper gegen APP, C99 und C83 entwickelt. Proben: L = 5% Lysat, Ü = 5% Überstand der IP, I = 40% Immunpräzipitat C99 Typen: wt = Wildtyp, L = London, F = Florida.

# 4.7 Labeling von γ-Sekretase-Untereinheiten mit radioaktiven photoaktivierbaren Lipidvorläufern in SH-SY5Y Zellen

Im Fokus dieser Arbeit steht die  $\gamma$ -Sekretase vermittelte Proteolyse von C99. Im Vergleich von C99wt mit den beiden C99 EOFAD Mutationen, die eine veränderte  $\gamma$ -Sekretase Prozessierung aufweisen, konnten keine Unterschiede in der *in vitro* Kreuzvernetzung mit

einem Phosphoglycerolipid (4.1.5), in Präparationen von DRMs (4.3) in der subzellulären Lokalisation (4.4) und in der *in vivo* Markierung mit photolabilen (4.5.2) oder radioaktiven photolabilen (4.5.3 und 4.6) Lipidbausteinen detektiert werden.

Dennoch wird die  $\gamma$ -Sekretase Prozessierung von Lipiden reguliert. Daher wurde aus der humanen Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y, die mit radioaktiven photoaktivierbaren Lipiden gefüttert worden war, die aktive, aus fünf Untereinheiten bestehende  $\gamma$ -Sekretase unter nicht dissoziativen Bedingungen koimmunpräzipitiert und auf Interaktionen mit den drei Lipiden PC, Sphingolipide und Cholesterin analysiert. Die fünf Komponenten des  $\gamma$ -Sekretase Komplexes sind Nct, PS-NTF (Presenilin N-terminales Fragment), PS-CTF (Presenilin Cterminales Fragment), Aph1 und Pen2 (**Abb. 5**). Nct hat ein Molekulargewicht (MW) von 114kDa, wobei die reife, hoch glykosylierte Form des Proteins, das ausschließlich in der aktiven  $\gamma$ -Sekretase existiert, im SDS-Gel bei einem apparenten Molekulargewicht von 140kDa läuft. Das PS Holoprotein hat eine Masse von 53kDa, ist aber außerhalb des Komplexes extrem instabil. PS-NTF läuft im Gel bei einem apparenten Isoformen und ist zwischen 23kDa und 26kDa groß. Die fünfte Komponente schließlich ist Pen2 mit einem Molekulargewicht von ca. 13kDa (Kimberly *et al.*, 2003).

Um Interaktionen der  $\gamma$ -Sekretase Untereinheiten mit den verschiedenen photolabilen Lipiden zu analysieren, wurden SH-SY5Y Wildtyp Zellen mit 1% CHAPSO lysiert und die Koimmunpräzipitation mit dem Antikörper MAB1563 gegen PS-NTF im Lysepuffer durchgeführt. Die Proteine der Lysate und IPs wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und über Autoradiographie oder Westernblot mit dem Antikörper 29414 gegen PS-CTF ausgewertet (**Abb. 28**).



Abb. 28: Markierung der  $\gamma$ -Sekretase in SH-SY5Y-Zellen mit radioaktiven photoaktivierbaren Lipidbausteinen.  $1 \times 10^7$  SH-SY5Y Zellen wurden mit je 400µCi [<sup>3</sup>H]-14-azi-Sphingosin (6h), mit [<sup>3</sup>H]-5-azi-Cholesterin (18h) oder mit [<sup>3</sup>H]-photo-PC (18h) markiert. Die Lysate der Zellen wurden unter nicht-dissoziativen Bedingungen mit MAB1563 Antikörpern gegen den PS-NTF immunpräzipitiert und 5% der Lysate bzw. 40% der IPs über SDS-PAGE und WB mit 29414 Antikörpern gegen PS-CTF analysiert.

Innerhalb der aktiven  $\gamma$ -Sekretase liegt PS endoproteolytisch verdaut als N-terminales und C-terminales Fragment vor. Daher kann bei einer Koimmunpräzipitation des C-terminalen Fragments davon ausgegangen werden, dass zumindest Teilkomplexe der  $\gamma$ -Sekretase gefällt wurden.

Die im Westernblot detektierten Mengen an PS-CTF sind sowohl für die Lysate der einzelnen Markierungen, als auch für die unterschiedlichen IPs sehr verschieden. In allen Fällen wurde bei der IP gegen PS-NTF auch der C-Terminus von PS koimmunpräzipitiert, wodurch gezeigt ist, dass unter den gewählten Bedingungen zumindest nicht dissoziierte Teilkomplexe vorliegen. Für die Auswertung der Autoradiographie erfolgte eine Normierung der Lysate auf gleiche absolute Radioaktivität. Die korrespondierenden Immunpräzipitationen sind im selben Verhältnis dargestellt. Im Fütterungsexperiment mit [<sup>3</sup>H]-14-azi-Sphingosin wurden zwei [<sup>3</sup>H]-markierte Proteine koimmunpräzipitiert. Eines hatte ein apparentes MW von ca. 130kDa, das andere von ca. 34kDa. Das Protein mit 120kDa wurde auch durch radioaktives 5-azi-Cholesterin markiert; die Fütterung mit [<sup>3</sup>H]-photo-PC führte zu keiner nachweisbaren Markierung eines Proteins.

Die wahrscheinlichsten Kandidaten für die beiden radioaktiv markierten Proteine in **Abb. 28** sind Nct für das durch das radioaktive, photolabile Sphingosinderivat und das Cholesterinderivat markierte Protein bei ca. 130kDa und PS-NTF für das exklusiv durch das Sphingosinderivat markierte Protein mit ca. 34kDa. Daher wurden in einer Abwandlung des Experiments unter nicht-dissoziativen Bedingungen IPs gegen PS-NTF und Nct unter dissoziativen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde die Zell-Lyse durch einen Puffer mit 1% Triton X-100 und 0,5% Desoxycholat erzielt. Die Lysate und IPs wurden wiederum mittels SDS-PAGE und WB mit Antikörpern gegen Nct (MAB 5556) und PS-CTF (MAB 1563) analysiert (**Abb. 29**).



**Abb. 29: Markierung spezifischer γ-Sekretase Untereinheiten mit radioaktiven photoaktivierbaren Lipidbausteinen.** SH-SY5Y Zellen wurden mit [<sup>3</sup>H]-14-azi-Sphingosin, mit [<sup>3</sup>H]-5-azi-Cholesterin oder mit [<sup>3</sup>H]-photo-PC markiert. Die Lysate der Zellen wurden unter dissoziativen Bedingungen mit MAB1563 Antikörpern gegen den PS-NTF oder mit MAB5556 Antikörpern gegen Nct immunpräzipitiert und Lysate und IPs über SDS-PAGE und WB mit MAB5556 Antikörpern gegen Nct oder 29414 Antikörpern gegen PS-CTF analysiert. Der Komplex dissoziierte unter diesen Bedingungen, da in den immunpräzipitierten Proben kein PS-CTF nachweisbar war.

Die erfolgte Dissoziation des Komplexes wurde gezeigt, da kein PS-CTF in den IPs nachweisbar war. Die IP von PS-NTFs führte unabhängig von dem eingesetzten radioaktiven photoaktivierbaren Lipidvorläufermolekül nicht zur Koimmunpräzipitation von Radioaktivität. Demgegenüber wurde zusammen mit Nct im Falle der Markierung mit [<sup>3</sup>H]-14-azi-Sphingosin und mit [<sup>3</sup>H]-5-azi-Cholesterin Radioaktivität koimmunpräzipitiert. Obwohl im Westernblot reifes und nicht glykosyliertes Nct im Verhältnis von etwa 1:1 nachweisbar waren, wurde ausschließlich die stark glykosylierte Form durch die beiden Lipidvorstufen markiert. Auch das Fütterungsexperiment mit [<sup>3</sup>H]-photo-PC führte zur Markierung von Nct. Allerdings war diese Markierung sehr schwach und zeigte keine Priorität für reifes oder unreifes Nct.

# **5 DISKUSSION**

APP wird in menschlichen Zellen durch die sequentielle Abfolge von mehreren als Sekretasen bezeichnete Proteasen prozessiert. Dabei gibt es zwei alternative proteolytische Abbauwege, die sich gegenseitig ausschließen. Die nicht amyloidogene Prozessierung ist die prominentere Proteolyseroute und degradiert circa 95% aller APP Wildtyp Moleküle. Die verbleibenden 5% der APP Moleküle werden über den amyloidogenen Abbauweg prozessiert, in dessen Verlauf das hydrophobe A $\beta$  Peptid entsteht, das zur Aggregation neigt und dadurch vermutlich eine neurotoxische Kaskade auslöst.

Es ist allgemein akzeptiert, dass Lipide einen starken Einfluss auf die Entscheidung ausüben, über welchen der beiden Prozessierungswege APP abgebaut wird (Abb. 30 A, Seite 83). Allerdings ist die Art und Weise der Regulation der Kern intensiver Diskussionen. Die β-Sekretase liegt teilweise mit Detergens resistenten Membranbereichen (DRMs) assoziiert vor (Ehehalt et al., 2003; Lee, S. J. et al., 1998; Simons et al., 1998; Simons et al., 2001), während die möglichen Kandidaten für die α-Sekretase aus DRMs ausgeschlossen zu sein scheinen (Kojro et al., 2001; Simons et al., 2001). Daher war lange Zeit die gängige Meinung, dass bei einer Anreicherung von Raft-Lipiden in der Membran APP verstärkt in Raft-Mikrodomänen diffundiert, wo es dem amyloidogenen Abbau unterliegt. Tatsächlich wurde durch Beladung von Zellen mit Cholesterin beladenen Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD)-Komplexen gezeigt, dass der amyloidogene Prozessierungsweg unter diesen Bedingungen auf Kosten des nicht amyloidogenen Weges verstärkt wird (Bodovitz & Klein, 1996; Racchi et al., 1997). Umgekehrt führt eine Extraktion von Cholesterin oder eine Senkung des Cholesterinspiegels durch Hemmung der Biosynthese zur verstärkten Aktivität der a-Sekretase und einer Erniedrigung der β-Sekretase Aktivität (Fassbender et al., 2001; Racchi et al., 1997; Simons et al., 1998). Änderungen der Konzentration von Sphingolipiden, einer weiteren Raft-Komponente, haben denselben Effekt. So führte die Inhibition der Palmitoyltransferase, die den initiierenden Schritt der Sphingolipid-Biosynthese katalysiert, zur erhöhten Sekretion von α-APPs und zur gesteigerten C83 Produktion (Sawamura et al., 2004). Ebenfalls wies eine Zelllinie mit inaktiver Palmitoyltransferase eine erhöhte  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität auf. Darüber hinaus scheinen Glykosphingolipide und anionische

Phospholipide die  $\beta$ -Sekretase Aktivität zu erhöhen, wie durch Rekonstitution von BACE1 in großen unilamellaren Vesikeln gezeigt wurde (Kalvodova *et al.*, 2005).

Die Experimente zum Einfluss von Cholesterin stoßen teilweise auf Kritik, da die Membranen mit sehr hohen Mengen an Cholesterin beladen wurden und auch die Senkungen des Cholesterinspiegels jenseits eines physiologischen Rahmens stattfanden. So konnte in der Tat gezeigt werden, dass eine moderate Verminderung des Cholesterinspiegels in Membranen eine Erhöhung der BACE1-APP Kolokalisation und damit einhergehend eine verstärkte A $\beta$  Produktion verursacht (Abad-Rodriguez *et al.*, 2004; Kaether & Haass, 2004). Laut diesen Studien liegt APP in murinen Neuroblastoma N2a Zellen zwar zu einem geringen Prozentsatz mit DRMs assoziiert vor, die DRMs von humanen Neuroblastoma SH-SY5Y Zellen sowie die primären Kulturen von Hippocampusneuronen aus Ratte enthalten unter physiologischen Bedingungen allerdings kein APP. Auch in humanen hippocampalen Membranen sowie in murinen hippocampalen Membranen von transgenen Mäusen mit humanem APP konnte kein APP in DRM-Fraktionen nachgewiesen werden. Demzufolge wird argumentiert, dass BACE1 innerhalb von DRMs der APP-Proteolyse entzogen ist. Die starke Reduktion von Raft-Lipiden in den erwähnten Publikationen würde allerdings zur Hemmung der  $\beta$ -Sekretase Aktivität führen.

Auch die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase scheint von Lipiden reguliert zu werden. So wurde postuliert, dass eine Inhibition der Sphingolipid-Biosynthese die A $\beta_{42}$  Sekretion erhöhte, während die Sekretion von A $\beta_{40}$  unverändert blieb (Sawamura *et al.*, 2004). Umgekehrt wurde die Prozessierung von APP als ein möglicher Lipid-Sensor beschrieben. Diesem Model zufolge würde A $\beta_{40}$  die Cholesterinsynthese durch Inhibition der Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase hemmen, während A $\beta_{42}$  durch Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase den Abbau von Sphingomyelin aktiviert (Grimm *et al.*, 2005). Somit würden die verschiedenen A $\beta$ -Spezies zur Reduktion der wichtigsten Lipidkomponenten der Rafts führen. Diese Ergebnisse lassen sich jedoch schwer einordnen, da die Lipid-Analyse der verwendeten Zelllinien überraschend starke Unterschiede auswiesen. So enthalten die PS negativen (PS1/2)<sup>-/-</sup> embryonalen Mausfibroblasten im Vergleich zu PS1 Retransfektanten etwa die doppelte Menge an Cholesterin und Sphingomyelin, während der PC-Level unverändert blieb. Das würde bedeuten, dass in den PS<sup>-/-</sup>-Zellen sowohl der Anteil an Lipid Rafts, als auch die Menge and Gesamtlipid und somit der Gesamtmembran drastisch erhöht würde. Bedenkt man, dass Zellen ihren Lipid-Haushalt normalerweise streng regulieren, wären solche drastischen Änderungen der Lipid-Konzentrationen und vor allem der Lipidmengen sicher nicht tolerierbar.

Neben der Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase scheint auch die Lokalisation des Enzyms durch Lipide beeinflusst zu werden. So wird in Zelllinien mit einem Defekt im Niemann-Pick C1 (NPC) Protein sowie neuronale Zellen, bei denen der Cholesterintransport von endozytotischen Organellen zum ER gehemmt wird, eine Mislokalisation der  $\gamma$ -Sekretase in späten Endosomen beobachtet. Dies geht einher mit einer gesteigerten  $\gamma$ -Sekretase Aktivität und erhöhten Mengen an endosomalem und sekretiertem A $\beta_{40}$  und A $\beta_{42}$  (Runz *et al.*, 2002; Yamazaki *et al.*, 2001). Die Akkumulation von Cholesterin in späten Endosomen und Lysosomen verbunden mit einer Anreicherung von C99, gesteigerten A $\beta_{40}$  und A $\beta_{42}$ Konzentrationen und einer erhöhten  $\gamma$ -Sekretase Aktivität konnte in einem Mausmodell von NPC bestätigt werden (Burns *et al.*, 2003).

#### 5.1 C99

### Untersuchungen mit photoaktivierbarem C99

Der Einfluss von Lipden auf die Aktivität und Lokalisation der y-Sekretase hat weitreichende Folgen für die Prozessierung der verschieden Substrate und vor allem auf die Mengen an gebildetem, neurotoxischen Aß. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist jedoch weitgehend unbekannt. Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Hypothese, dass die  $\gamma$ -Sekretase-Proteolyse in unterschiedlichen Lipidumgebungen stattfindet und dass sich das Verhältnis von  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  in Abhängigkeit dieser Lipidumgebungen verändert (Abb. 30 B, Seite 83). Daher wurde das direkte  $\gamma$ -Sekretase Substrat des amyloidogenen Abbauwegs, C99, in seiner Wildtypform und als die EOFAD-Mutanten London und Florida für Studien gewählt. Beide klinischen Mutanten zeichnen sich durch eine Erhöhung des A $\beta_{42}/A\beta_{40}$ Verhältnisses aus (Eckman et al., 1997; Goate et al., 1991; Lichtenthaler et al., 1997) und führen, wegen der erhöhten Aggregationsfähigkeit von Aβ<sub>42</sub>, zu stärkerer Plaquebildung. Durch die in vitro Translation von photoaktivierbarem Wildtyp- und EOFAD SP-C99\*, sollten Interaktionspartner dieser Proteine innerhalb der Membran untersucht werden (4.1). Die ursprünglich von Dr. Liyun Zhao verwendeten cDNAs von SP-C99 führten zu einer Nterminal um die beiden Aminosäuren LE verlängerten Form von C99. Um eine effiziente Abspaltung des Signalspeptides zu gewährleisten und mögliche Einflüsse auf extramembranöse Bindungen zu minimieren wurden die beiden Aminosäuren LE durch DA ersetzt, was in einer Spaltung der Signalpeptidase exakt vor der A $\beta$ -Sequenz von C99 resultieren sollte (4.1.2). Mit diesen optimierten Konstrukten (SP-C99\*) wurde die Translations- und Suppressionseffizienz erhöht (4.1.3) und die effiziente Abspaltung des Signalpeptids nachgewiesen (4.1.4).

Auf qualitativer Ebene konnte mit allen in der TMD photoaktivierbaren SP-C99\* Spezies ein Kreuzvernetzungsprodukt nachgewiesen werden (4.1.5). Eine quantitative Gegenüberstellung der Vernetzungseffizienz war jedoch wegen unterschiedlicher Expressionsraten nicht möglich. Eine Normierung der exprimierten Mengen an SP-C99\* erwies sich als nicht durchführbar, da minimale Unterschiede in der RNA-Konzentration und Reinheit bereits enorme Auswirkungen auf die Translationseffizienz hatten.

Ein Phospholipase A2 Verdau konnte zeigen, dass es sich bei den quervernetzten Molekülen um ein Phosphoglycerolipid handelte (Abb. 30 C, Seite 83). Vor dem Hintergrund, dass in der ER-Membran sehr geringe Mengen an Sphingolipiden und Cholesterin existieren, war dies nicht unerwartet. Dennoch ist natürlich auch die ER-Membran in ihrer Lipidzusammensetzung heterogen und es ergab sich die Frage, ob die C99-Phospholipid Interaktion willkürlich stattfindet oder ob es sich bei den kreuzvernetzten Molekülen um ein spezielles Phosphoglycerolipid handelt. Die im *in vitro* Translationsansatz generierten Mengen an photoaktivierbarem C99 waren zur Klärung dieser Frage durch massenspektrometrische Bestimmungen oder biochemische Ansätze allerdings zu niedrig.

Dieses *in vitro* System hat zudem den Nachteil, dass alle Interaktionen auf ER-Membranen beschränkt sind. Um diese Beschränkungen zu überkommen, wurde ein Wechsel des Versuchsaufbaus zu einem *in vivo* Ansatz angestrebt. Dies hatte zusätzlich den Vorteil, dass Studien mit dem aktiven  $\gamma$ -Sekretase Komplex möglich wurden. Die Untereinheiten der  $\gamma$ -Sekretase liegen im ER zwar in hohen Konzentrationen vor, eine enzymatische Aktivität des Komplexes kann jedoch erst in post-Golgi Kompartimenten nachgewiesen werden (Baulac *et al.*, 2003; Vetrivel *et al.*, 2004).

### Konstruktion und Charakterisierung von C99-exprimierenden N2a Zelllinien

Es wurden N2a Zelllinien konstruiert, die unter einem Tetrazyklinregulator die verschiedenen SP-C99\* Spezies exprimierten (4.2). Über wiederholte FACS-Sortierungen erfolgte die Isolierung von Einzelklonen, die auf Expression des Reporterproteins eGFP (4.2.3.1) und von SP-C99\* (4.2.3.2), sowie dessen Prozessierung (4.2.3.2 und 4.2.3.3) analysiert wurden. Da für die Immunofluoreszenz von ungetaggtem C99 keine geeigneten

Antikörper beschrieben sind und auch selbst generierte Antikörper keinen Unterschied zwischen C99\*-exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen erkannten, erfolgte der Immunfluoreszenz-Nachweis der C99\* Expression indirekt anhand der gebildeten Prozessierungsprodukte A $\beta_{42}$  und A $\beta_{40}$  (4.2.3.3).

Aβ<sub>40</sub> konnte in induzierten N2a<sub>SP-C99\*wt</sub> Zellen detektiert werden. Eine schwache Detektion fand auch in N2a<sub>SP-C99\*F</sub> Zellen statt, während N2a<sub>SP-C99\*L</sub> Zellen und die Negativkontrolle N2a<sub>TAM2/CD2</sub> keine Markierung von Aβ<sub>40</sub> zeigten. Dies entspricht grundsätzlich den Erwartungen, da SP-C99\*wt stärker zur Aβ<sub>40</sub> Form degradiert wird als die mutierten SP-C99\* Spezies. Andererseits müsste auch in den Zelllinien N2a<sub>SP-C99\*F</sub> und N2a<sub>SP-C99\*L</sub> Aβ<sub>40</sub> gebildet werden. Die FACS (siehe 4.3.2.1) und Westernblot Experimente (siehe 4.3.2.2) legen aber nahe, dass die klinischen Mutanten in wesentlich geringeren Mengen als das wild-typ C99 gebildet werden, weshalb das in diesen Fällen gebildete Aβ<sub>40</sub> wohl für N2a<sub>SP-C99\*F</sub> an der Grenze der Nachweisgrenze liegt und für N2a<sub>SP-C99\*L</sub> nicht mehr detektierbar ist.

Im Gegensatz dazu zeigt die Markierung von  $A\beta_{42}$  die stärkste Markierung in den SP-C99\* Mutanten, obwohl die exprimierten SP-C99\* Mengen vermutlich hinter derjenigen in N2a<sub>SP-C99wt</sub> zurückbleiben. Da bekannt ist, dass London und Florida Mutationen zur verstärkten Bildung von  $A\beta_{42}$  führen (Eckman *et al.*, 1997; Lichtenthaler *et al.*, 1999), kann diese Immunfluoreszenz nicht nur als Kontrolle für die Expression der verschiedenen SP-C99\* Spezies gewertet werden, sondern auch als Hinweis auf deren korrekte proteolytische Prozessierung. Die Etablierung von Bedingungen zur gleichen Expressionsrate der verschiedenen SP-C99\* Spezies erwies sich als nicht möglich, da die Expression von SP-C99\* von den Zellen sehr stark reguliert wurde.

## Untersuchungen zum Verhalten von APP, C99 und C83 in DRM-Präparationen

Die SP-C99\*-exprimierenden N2a Zelllinien wurden einer DRM-Präparation mit Triton X-100 unterzogen. Dabei konnte gezeigt werden, dass entsprechend den Literaturangaben endogenes murines APP Holoprotein zu ca. 5% in Fraktionen eines Optiprep-Gradienten flotiert, in denen der Raftmarker Flotillin nachgewiesen wurde (Abad-Rodriguez *et al.*, 2004). Weder endogenes Maus C83, noch die verschiedenen exprimierten SP-C99\* Spezies konnten in diesen DRM-Fraktionen detektiert werden (Abb. 30 C, Seite 83). Die Zusammensetzung der DRMs variiert stark abhängig von den verwendeten Detergenzien (Chamberlain, 2004) und erschwert die Wertung verschiedener Gruppen zur Raft Lokalisation von APP, seinen Abbauprodukten und der an der Prozessierung beteiligten Proteasen (Urano *et al.*, 2005; Vetrivel *et al.*, 2004; Wahrle *et al.*, 2002). In einer Studie mit dem Detergens Lubrol WX wurde gezeigt, dass die C-terminalen Fragmente C83 und C99 in DRMs in Rafts flotieren, während APP Holoprotein zu über 95% in löslichen Membranbereichen lokalisiert bleibt (Vetrivel *et al.*, 2005). Eigene Lubrol WX DRM-Präparationen ergaben jedoch, dass alle untersuchten Proteine, einschließlich Flotillin, über mehrere Fraktionen des Gradienten verteilt sind. Die daraus resultierende Verdünnung der Proteine hatte zur Folge, dass die geringen Mengen C99\* nicht mehr nachgewiesen werden konnten (nicht gezeigt).

### Subzelluläre Verteilung von Fluoreszenzprotein-C99 Fusionsproteinen

Um die subzelluläre Verteilung von Wildtyp und EOFAD C99 zu bestimmen, wurden cDNAs kloniert, die aus der Sequenz eines Signalpeptids, eines fluoreszierenden Proteins und einer C99 Variante bestanden. Das jeweilige Gen befand sich unter Kontrolle des starken, konstitutiven CMV Promotors. Vero Zellen wurden transient mit den cDNAs für die verschiedenen Fusionsproteine transfiziert. Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass C99wt und die C99 EOFAD Mutanten kolokalisieren (4.4). Die konfokalen Fluoreszenzbilder zeigten eine Lokalisation der drei Proteine in einer kompakten Struktur nahe dem Zellkern und kolokalisierten mit dem Cis-Golgi Marker gm130.

Die wahrscheinlichsten Orte, wo überexprimiertes C99-FP akkumulieren könnte, wären im ER und in frühen Endosomen. So wäre es denkbar, dass eine überexprimiertes C99-FP nicht vollständig über den sekretorischen Weg transportiert werden kann und im ER akkumuliert. Andererseits wurde beschrieben, dass ein Fusionsprotein aus C99 und GFP bei  $\gamma$ -Sekretase Inhibition in frühen Endosomen akkumuliert. In diesem Konstrukt war das fluoreszierende Protein C-terminal von C99 (Kaether *et al.*, 2006). Das in dieser Arbeit exprimierte C99-FP zeigte jedoch keine Kolokalisation mit dem ER-Marker PDI oder mit dem Endosomenmarker rab5.

# C99 Markierungsversuche mit photoaktivierbaren Lipidvorstufen

Im *in vitro* Translationsansatz (4.1) wurde eine Interaktion von SP-C99\* mit einer photolabilen Gruppe im Transmembranspan mit den Phosphoglycerolipiden der ER-Membranen gefunden. Es sollte *in vivo* überprüft werden, ob in N2a Zellen exprimiertes SP-C99\*, das wie in Absatz 4.4. gezeigt in post ER-Kompartimenten, wie dem Golgi akkumuliert, weiterhin mit Phosphoglycerolipiden interagiert. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob das Membranprotein SP-C99\* willkürlich mit Membranlipiden interagiert oder ob die Protein-Lipid Interaktionen spezifischer Natur sind.

Das photoaktivierbare Stearinsäurederivat, 10-azi-Stearinsäure, wird von Zellen aufgenommen und in Lipide eingebaut (Thiele *et al.*, 2000). Dabei entstehen photolabile Phosphoglycerolipide, aber auch photoaktivierbare Sphingolipide. Der Großteil des Stearinsäurederivats wird vermutlich in das mengenmäßig häufigste Phosphoglycerolipid Phosphatidylcholin (PC) eingebaut (Thiele *et al.*, 2000).

Bei Markierungsexperimenten von SP-C99\*-exprimierenden N2a Zellen mit 10-azi-Stearinsäure wurde unabhängig von der C99 Spezies ein Kreuzvernetzungsprodukt detektiert, was sich im SDS-PAGE durch eine verlangsamte Migration darstellte (4.5.2). Da sich das Laufverhalten von quervernetztem SP-C99\* mit steigender Markierungsdauer mit 10-azi-Stearinsäure in definierten Stufen ändert, wäre denkbar, dass SP-C99\* mit mehr als einem Lipid vernetzt wird. Die unterschiedlichen Expressionslevel machten indes eine quantitative Gegenüberstellung der Kreuzvernetzungsrate unmöglich.

Markierungsexperimente mit 14-azi-Sphingosin hingegen resultierten bei keiner der untersuchten SP-C99\* Spezies in einer Veränderung der Migrationseigenschaften im SDS-Gel. Demnach scheint es sich bei dem mit C99\* kreuzvernetzten Molekül nach 10-azi-Stearinsäuremarkierung um ein Phosphoglycerolipid zu handeln (Abb. 30 C, Seite 83).

Erstaunlicherweise wurde für endogenes C83, das aufgrund seiner geringeren Größe noch stärker seine Laufeigenschaften bei einer Kreuzvernetzung mit Lipiden verändern sollte, nie eine Veränderung der Migration beobachtet. Dies bedeutet zwar nicht zwingend, dass C83 nicht mit photolabilen Lipiden interagiert, doch da es sich um eine luminal 16 AS kürzere Form von C99 handelt, ist zumindest unwahrscheinlich, dass es auf eine Lipid-Kreuzvernetzung nicht mit einer Änderung des Laufverhaltens im SDS-PAGE reagieren würde. Prinzipiell ist allerdings nicht vorhersagbar, wie Lipid-vernetzte Proteine sich im SDS-Gel verhalten, so wurde gezeigt, dass p24 nach Vernetzung mit einem Sphingolipid schneller im SDS-Gel wandert (Haberkant, nicht veröffentlichte Daten). Eine Vernetzung mit Cholesterin führte in allen bisher untersuchten Fällen nie zu einer Veränderung des Laufverhaltens eines Proteins im SDS-Gel (Christoph Thiele, MPI-CBG Dresden; nicht veröffentlichte Daten).

Nachdem sich ein Kreuzvernetzungsprodukt von *in vitro* translatiertem photolabilem SP-C99\* mit PLA<sub>2</sub> verdauen lässt (siehe 4.1.6) und SP-C99\* *in vivo* nach 10-azi-Stearinsäure Markierung vollständig mit einem Stoffwechselprodukt des Stearinsäurederivats vernetzt wird (siehe 4.5.1 und 4.5.2), scheint es sich bei den Quervernetzungspartnern von SP-C99\* um Phosphoglycerolipide zu handeln. Dies ist nicht unerwartet, da es sich bei dieser Lipidgruppe um die Hauptkomponente der Membranlipide handelt. Gerade im *in vitro* Experiment, das in

Gegenwart von Mikrosomen durchgeführt wurde, liegt der Anteil an Phosphoglycerolipiden bei über 80%. Bei der Markierung mit <sup>3</sup>H-photo-PC konnte allerdings keine Radioaktivität mit SP-C99\* quervernetzt werden, obwohl PC das am häufigsten vorkommende Phosphoglycerolipid ist. Das bedeutet andererseits, dass SP-C99\* mit einem mengenmäßig selteneren Phosphoglycerolipid als PC interagiert, was wiederum für eine spezifische Bindung spricht.

Darüber hinaus wurde keine Interaktion mit Sphingolipiden oder Cholesterin gefunden (4.5.4; 4.6). Dies ist interessant, da PC, Sphingolipide und Cholesterin zusammen mehr als 70% der zellulären Lipide ausmachen. SP-C99\* interagiert also scheinbar mit mehreren Molekülen einer mengenmäßig kleineren Lipidgruppe, wie Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE) oder Phosphatidylinositol (PI), was die Spezifität dieser Interaktion unterstreicht.

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die von der  $\gamma$ -Sekretase vermittelte Proteolyse von C99 und die Modulation der Prozessierung in EOFAD-Mutanten von C99. Im Vergleich von C99wt mit den beiden C99 EOFAD Mutationen London und Florida, die in der Transmembrandomäne von C99 an der y-Prozessierungsstelle liegen, konnten keine Unterschiede in der in vitro Kreuzvernetzung mit einem Phosphoglycerolipid (4.1.5), in Präparationen von DRMs (4.3) in der subzellulären Lokalisation (4.4) und in der in vivo Markierung mit photolabilen (4.5.2) oder radioaktiven photolabilen (4.5.3 und 4.6) Lipidbausteinen detektiert werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die veränderte Proteolyse der EOFAD Mutanten durch eine verschobene Substraterkennung der  $\gamma$ -Sekretase und nicht durch einen allgemeineren Mechanismus, wie Protein-Lipid Interaktionen verursacht wird. Es kann allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden, dass es in den Mutanten tatsächlich zu einer schwach veränderten C99-Lipid Interaktion kommt. Da die EOFAD-Mutanten zu einer Steigerung des  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Verhältnisses von ca. 5% auf etwa 15% führen (Lichtenthaler et al., 1997), ist möglich, dass der Effekt durch sehr schwach veränderte Wechselwirkungen mit der Membranumgebung verursacht wird, die außerhalb der Nachweisgrenzen lagen.

### 5.2 γ-Sekretase

Wie bereits erwähnt, wird auch die Lokalisation der  $\gamma$ -Sekretase und die Prozessierung der vielfältigen Substrate von Lipiden reguliert. Daher wurde aus der humanen Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y, die mit radioaktiven photoaktivierbaren Lipiden gefüttert worden war, die aktive, aus fünf Untereinheiten bestehende  $\gamma$ -Sekretase unter nicht dissoziativen Bedingungen immunpräzipitiert. Mit radioaktivem photo-PC wurde keine Komponente der  $\gamma$ -Sekretase signifikant markiert, während [<sup>3</sup>H]-markiertes photo-Cholesterin ein Protein mit einer apparenten Masse von 130kDa markierte. Radioaktives 14-azi-Sphingosin wurde durch UV-Bestrahlung an zwei mit der  $\gamma$ -Sekretase koimmunpräzipitierte Proteine quervernetzt. Eines dieser Proteine hat eine apparente Masse von 34kDa, das andere läuft im SDS-Gel, wie das von Cholesterin-markierte Protein, bei ca. 130kDa (4.7).

Innerhalb der aktiven  $\gamma$ -Sekretase liegt PS endoproteolytisch verdaut als N-terminales und C-terminales Fragment vor. Da im Westernblot der nicht-dissoziativen IPs PS-CTF nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass zumindest Teilkomplexe der y-Sekretase immunpräzipitiert wurden. Die im Westernblot detektierten Mengen an PS-CTF sind jedoch in den unterschiedlichen Markierungsexpereimenten sehr verschieden. Laut einem Modell von Grimm (Grimm *et al.*, 2005) aktiviert Cholesterin die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität. Möglicherweise erfolgt diese Aktivierung über eine Regulation der Assemblierung des γ-Sekretase Komplexes, was die erhöhten Mengen an koimmunpräzipitiertem PC-CTF erklären könnte.

Das 130kDa schwere durch Sphingolipide und Cholesterin markierte Protein konnte als glykosyliertes Nct identifiziert werden (4.7). Geringe Mengen an [<sup>3</sup>H]-photo-PC konnten ebenfalls mit Nct quervernetzt werden, doch war hier keine Präferenz für die mature Form erkennbar (**Abb. 30 C**). Bei dem exklusiv durch Sphingolipide markierten 34kDa schweren Protein handelt es sich aber nicht, wie zunächst angenommen, um das N-terminale Fragment von PS. Die Identifizierung dieses Proteins steht noch aus.

Nct interagiert also in Abhängigkeit seines Glykosylierungsgrades mit Raft-Lipiden, während eine schwache Interaktion mit PC unabhängig von der Reifung des Nct ist. Dieses Ergebnis wirft mehrere Fragen auf: 1) Verändert die Glykosylierung die direkte Interaktion von Nct mit Membranlipiden? Möglicherweise verändert Nct glykosylierungsabhängig seine Konformation auf eine Weise, die zu einer veränderten Wechselwirkung mit den ungebenden Membranlipiden führt. 2) Bewirkt die Glykosylierung von Nct spezifische Bindungen zu

anderen Molekülen, die das Protein verstärkt in Rafts dirigieren? So könnten akzessorische Proteine an glykosyliertes Nct binden. Die Di- oder Oligomerisierung hätte dann unter Umständen eine verstärkte Raft-Lokalisation zur Folge, wie es schon für mehrere Rezeptorproteine gezeigt wurde (Cheng *et al.*, 2001; Janes *et al.*, 2000; Langlet *et al.*, 2000). 3) Hat Nct intrinsisch eine hohe Affinität für Raft-Lipide? Dies wäre möglich, da unreifes Nct, das nicht mit Sphingolipiden oder Cholesterin kreuzvernetzt werden konnte, hauptsächlich im ER lokalisiert ist. Da die Konzentrationen von Sphingolipiden und Cholesterin im ER sehr niedrig sind, wäre möglich, dass Nct trotz einer Affinität nicht an diese Lipide bindet. In späteren Kompartimenten, wo das Verhältnis von Sphingolipiden und Cholesterin zu Phosphoglycerolipiden immer weiter steigt, könnte die Affinität für Rafts dann zum Tragen kommen. Zur Klärung dieser Fragen müssten Zelllinien untersucht werden, in denen Nct nicht mehr das ER verlassen kann (Capell *et al.*, 2005), nicht mehr glykosyliert wird, nicht mehr in den  $\gamma$ -Sekretase Komplex eingebaut wird oder die  $\gamma$ -Sekretase selbst inaktiv ist (Bentahir *et al.*, 2006).

Unabhängig davon, welches Prinzip für die präferenzielle Markierung von glykosyliertem Nct mit Sphingolipiden und Cholesterin verantwortlich ist, stellt sich eine interessante Frage: Wie kann reifes Nct, das in der nicht dissoziativen IP mit einem Antikörper gegen PS-NTF koimmunpräzipitiert wurde, mit Raft-Lipiden interagieren, während die anderen Komponenten der  $\gamma$ -Sekretase nicht mit diesen Lipiden markiert wurden? Nct hat nur eine TMD, während die vier weiteren Untereinheiten des Komplexes 17 TMDs aufweisen. Selbst wenn einige dieser Domänen im Innern des  $\gamma$ -Sekretase Komplexes liegen, müssen andere mit der molekularen Umgebung des Komplexes in Kontakt treten können.

Es wurde gezeigt, dass Nct in einer embryonale Fibroblasten-Doppelknockout Zelllinie PS1/PS2<sup>-/-</sup> nicht mehr glykosyliert wird und im sekretorischen Weg im ER oder ER-Golgi intermediären Kompartiment (ERGIC) akkumuliert (Bentahir *et al.*, 2006; Tolia *et al.*, 2006). Zudem lässt sich im aktiven  $\gamma$ -Sekretase Komplex normalerweise nur hochglykosyliertes Nct nachweisen (Gu *et al.*, 2004). Auch in DRM-Präparationen mit 0,5% Lubrol WX wurde nur glykosyliertes Nct in DRMs gefunden, in 1% CHAPSO DRMs war reifes Nct zumindest stark in DRMs angereichert, während beide Nct Formen in 1% Triton X-100 nur in löslichen Membranbereichen detektiert werden konnten (Vetrivel *et al.*, 2005; Vetrivel *et al.*, 2004). In diesen Präparationen fanden sich allerdings auch stets die vier anderen Untereinheiten der  $\gamma$ -Sekretase in denselben löslichen Fraktionen wie Nct (**Abb. 30 C**, Seite 83).

Der Befund, dass von allen y-Sekretase Komponenten glykosyliertes Nct exklusiv Cholesterin bindet und zusammen mit nur einer weiteren Untereinheit mit Sphingolipiden interagiert, könnte darauf hinweisen, dass glykosyliertes Nct eine hohe Affinität für Raft-Lipide hat, während die übrigen Bestandteile der Protease keine Präferenz für Rafts aufweisen. Daraus könnte sich das gefundene Gleichgewicht zwischen Raft assoziierter und nicht-Raft assoziierter  $\gamma$ -Sekretase ergeben. Dennoch kann ein intakter Proteinkomplex, wie die y-Sekretase, zu einem definierten Zeitpunkt entweder mit Rafts assoziiert sein oder nicht. Wenn reifes Nct durch Raft-Lipide markiert werden kann, müssen PS-NTF, PS-CTF, Aph-1 und Pen-2 sich in derselben Mikrodomäne befinden. Nct wurde eine wichtige Rolle bei der Substraterkennung zugesprochen (Shah et al., 2005). Es besteht demnach auch die Möglichkeit, dass die Lipidumgebung von Nct die Affinität zu den verschiedenen Substraten der γ-Sekretase wie eben APP, Notch usw. moduliert. Worin die Spezifität der Interaktion von glykosyliertem Nct und Raft Lipiden begründet liegt, ob sie durch ein spezifisches Lipidbindemotiv vermittelt wird und ob dies einen Einfluss auf die Aktivität des Komplexes oder die Substraterkennung hat, kann derzeit nicht beantwortet werden. Es wurden in dieser Arbeit jedoch Bedingungen etabliert, die es ermöglichen sollten, diese Fragen in weiterführenden Studien zu beantworten.



Abb. 30: Modell der APP Prozessierung in verschiedenen Membranregionen. A) Amyloidogene APP Prozessierung in Rafts, nicht amyloidogener Abbau in löslichen Membranbereichen. B) Arbeitshypothese: Unterschiede in der  $\gamma$ -Sekretase Proteolyse in Abhängigkeit von der Membranumgebung. C) Assoziation von APP, C99 und  $\gamma$ -Sekretase Komponenten mit Rafts oder löslichen Membranbereichen und Quervernetzung der Proteine mit definierten Lipidspezies. Detaillierte Beschreibung siehe Text.

# **6 MATERIAL UND METHODEN**

# **6.1 Verwendetes Material**

# 6.1.1 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Biomol, Hamburg
Amplify Fluorographic Reagent	Amersham Biosciences, Freiburg (#NAMP100)
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
CHAPSO	Calbiochem, Läufelfingen
Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Dimethylpimelidatdihydrochlorid (DMP)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen (#8388-1G)
Doxycyclin	BD Biosciences, Clontech, Ludwigshafen
DTT	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
EDTA	Merck, Darmstadt (#1.08418.0250)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe (#9105.2)
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Methyl Cyclodextrin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen (#C-4555)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaCl	Riedel-de-Haen, Seelze (#31434)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Natrium-Deoxycholsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg (#18330.02)
Optiprep	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
ResourceQ	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Salzsäure 37%	Merck, Darmstadt

## **MATERIAL & METHODEN**

SDS	BioRad GmbH, München
Stearinsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen (#S4751)
Triethylamine für β-Imager	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen (#90340)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)methylglycin (Tricin)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen (#93355-500g)
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade	Promega GmbH, Mannheim

# 6.1.2 Radiochemikalien

[ <sup>14</sup> C] radioak	tiver Proteingrößenn	narker für kleine Proteine		Amersham Biosciences,
				Freiburg
	Carboanhydrase	30000Da		
	Trypsin Inhibitor	20100Da		
	Cytochrom C	12500Da		
	Aprotinin	6500Da		
	Insulin B Kette	3500Da		
	Insulin A Kette	2500Da		
[ <sup>14</sup> C] radioak	tiver Proteingrößenn	narker mit breitem Spektru	ım	Amersham Biosciences,
	Myosin	220kDa		Freiburg
	Phosphorylase B	97kDa		C C
	BSA	66kDa		
	Ovalbumin	45kDa		
	Carboanhydrase	30kDa		
	Lysozym	14,3kDa		
[ <sup>3</sup> H]-Methyl-	Cholinchlorid			Amersham Biosciences,
				Freiburg (#TRK593)
L-[ <sup>35</sup> S]Methi	onin, > 1000Ci/mmc	1		Amersham Biosciences,
				Freiburg (#AG1594)

# 6.1.3 Nährmedien

Medium	Rezept/Zusätze	Herkunft
Dulbecco's Modified		Sigma-Aldrich Chemie,
Eagle's Medium		Taufkirchen
(DMEM)		
	10% fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH,
	[für N2a Zellen: hitzeinaktiviert]	Linz, AU
	bzw.	
	10% delipidiertes FCS	PAN-Biotech GmbH
	[für N2a Zellen: hitzeinaktiviert]	Aidenbach
LB-Medium	1% Bacto <sup>TM</sup> Trypton	Difco, Augsburg
	0,5% Bacto <sup>™</sup> Yeast Extract	Difco, Augsburg
		(#212750)
	0,5% NaCl	Merck, Darmstadt
LB-Agar	11 LB-Medium	
	15g Bacto <sup>TM</sup> Agar	Difco, Augsburg
		(#214010)
Opti-MEM		Invitrogen, Karlsruhe
		(#31985-047)

# Medienzusätze:

Zur Herstellung von Penicillin/Streptomycin oder Ampicillin-haltigem Medium, bzw. Agar, für die Selektion von Bakterien mit erworbener Ampicillinresistenz wurde Ampicillin sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren bis zu einer Endkonzentration von jeweils 100µg/ml zugegeben. Die Agarplatten und Medien wurden bei 4°C gelagert.

# 6.1.4 Wasser/Puffer/Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in den einzelnen Abschnitten beschrieben. Unter Wasser wurde deionisiertes (VE), bidestilliertes (bidest) und Millipore-Wasser verstanden. Als wässriges Lösungsmittel wurde das Millipore-Wasser verwendet.

< 1 F	011 11	1 10	· ·
615	() liganilz laati	to und <b>S</b>	annonzioruna
$\mathbf{O}$ $\mathbf{I}$ $\mathbf{J}$	CHIPOHUKICOLI	IC UHU C	NEUUEIIZIELUIIY
····	0 11 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0		
	U U		1 0

Name	Sequenz	Funktion	T <sub>M</sub> angegeben/	Länge [bp]/
			T <sub>Annealing</sub> in PCR	MW[g/mol]
C99/C83-	GTCT <b>G</b> GA <b>T</b> CCTTT	Einführung einer BamHI	65,1°C/55°C	30/9107
BamHI rev.	CAGTTCTGCATCT	Schnittstelle hinter C99 für		
	GCTC	pE15b/C99 und pEYFP-		
		C99/pECFP-C99 Klonierung		
HindIII-C99	CCAG <i>AAGCTT</i> AGA	Einführung einer HindIII	66,9°C/55°C	32/9827
forw	TGCAGAATTCCGA	Schnittstelle vor C99 zur		
	CATGAC	Klonierung von pEYFP-		
		C99/pECFP-C99		
NdeI C99	GCGGATGCATATG	Einführung einer Ndel	69,6°C/55°C	29/8968
ohne SP	GATGCAGAATTCC	Schnittstelle vor C99 (ohne		
	GAC	Signalpeptid) für pE15b/C99		
		Klonierung		
pTHG 73 end	GCGGTCCTACTGG	Amplifizierung der Amber-	46,6°C/53°C	17/5218
3'	GATT	Suppressor-tRNA cDNA für		
		die in vitro Transkription		
pTHG 73 T7	AATTCGTAATACG	Amplifizierung der Amber-	44,7°C/53°C	24/7321
	ACTCACTATAG	Suppressor-tRNA cDNA für		
		die in vitro Transkription		
SPA4CT-	CACCATGCTGCCC	Start SP-C99; Umklonieren	71,1°C/50°C	25/7610,9
CACCATG	GGTTTGGCACTG	in pcDNA3.1		
SPA4CT-DA-	CCTGGACGGCTCG	QuikChange Umklonierung	78,9°C/55°C	42/12991
forw.	GGCGGATGCAGA	der Signalsequenz: LE→DA		
	TGCAGAATTCCGA			
	CATG			
SPA4CT-DA-	CATGTCGGAATTC	QuikChange Umklonierung	78,9°C/55°C	42/12817
rev.	TGCATCTGCATCC	der Signalsequenz: LE→DA		
	GCCCGAGCCGTCC			
	AGG			
SPA4CT-Stop	TCAGTTCTGCATC	Stop SP-C99; Umklonieren	58,4°C/50°C	22/6685
	TGCTCAAAG	in pcDNA3.1		

fett gedruckt sind Mismatches zur Templatesequenz

eingeführte Restriktionsschnittstellen sind kursiv

6.1.6 Plasmide

Plasmid	Herkunft/Referenz
pBI-CD2	Gruppe Nickel, BZH, Heidelberg (Liu et al., 2000)
pBS/SPA4CTrev	Gruppe Beyreuther, ZMBH (Tienari et al., 1996)
pcDNA3.1/SP-C99*	In dieser Arbeit kloniert mit 3 verschiedenen C99 Spezies und je 9
	Amber-Stop Mutationen
pcDNA3.1/V5-His-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pECFP-C99	In dieser Arbeit kloniert mit 3 verschiedenen C99 Spezies
pECFP-p23	Irina Majoul, University of London, UK (Majoul et al., 2001)
pET15b	Invitrogen, Karlsruhe
pET15b/C99	In dieser Arbeit kloniert mit 3 verschiedenen C99 Spezies
pEYFP-C99	In dieser Arbeit kloniert mit 3 verschiedenen C99 Spezies
pEYFP-p24	Irina Majoul, University of London, UK (Majoul et al., 2001)
pRevTRE2	BD Biosciences, Clontech, Ludwigshafen
pRT2/C99*-IRES-eGFP	In dieser Arbeit kloniert mit 3 verschiedenen C99 Spezies
pVPack-Eco	Stratagene, Heidelberg (#217569)
pVPack-GP	Stratagene, Heidelberg (#217566)

# 6.1.7 Primärantikörper

Name	Epitop/ <i>Reaktivität</i>	Spezies	Referenz/Firma/	Verdünnung
		(Isotyp)	Bestellnummer	
Monoklor	nale Antikörper			
2C8	N-terminale AS 1-16 von $A\beta$	Maus	(Vassar et al., 1999)	Keine klaren
	Humanes C99 und $A\beta$ ,	(IgG <sub>2b</sub> )	Stressgen, bezogen über	Signale in WB
	schwache Kreuzreaktivität mit		Biotrend, Köln	und IF
	Maus		#NBA-104	
9C3	Synthetisches Peptid von	Maus	(Esselens et al., 2004)	IP: 5µl/ml
	Maus Nicastrin	(IgG <sub>2b</sub> )	Gruppe Wim Annaert, VIB,	WB: 1:5000
	Säuger Nicastrin		Leuven, Belgien	
			oder	
			Chemicon International	
			#MAB5556	

22C14	C-terminale 14 AS von APP	Kaninchen	Von der Gruppe Beyreuther	WB: 1:2000
Polyklonal	e Antikörper			
			#AB 02	
			Schlieren Schweiz	
	Humanes APP, C99 und $A\beta$	$(IgG_{2a},\kappa)$	The Genetics Company,	
w02	N-terminale AS 1-16 von $A\beta$	Maus	(Ida et al., 1996)	IP: 5µg/ml
	und $A\beta$		#MMS-532R	und IF
	Humanes APP, $\alpha$ -APPs, C99	$(IgG_{2a})$	Covance	Signale in WB
NAB228	N-terminale AS 1-11 von $A\beta$	Maus	(Lee, E. B. et al., 2003)	Keine klaren
			#MAB1563	
	Humanes Presenilin-1		Chemicon International	Signale
	PS-1		(Borchelt et al., 1996)	WB: keine
MAB1563	N-terminale AS 21-80 von	Ratte	(Lah et al., 1997)	IP: 5µl/ml
			#AB 11	
	Ende von $A\beta_{42}$		Schlieren Schweiz	
	Selektiv für das C-terminale	$(IgG_1, \kappa)$	The Genetics Company,	
G2-11	C-terminale AS 35-42 von Aβ	Maus	(Ida et al., 1996)	WB: 6µg/ml
	<b>,</b>		#AB 10	
	Ende von $A\beta_{40}$		Schlieren Schweiz	
	Selektiv für das C-terminale	$(IgG_{2b}, \kappa)$	The Genetics Company,	
G2-10	C-terminale AS 33-40 von Aβ	Maus	(Ida et al., 1996)	WB: 3µg/ml
			#SPA-891	
	gekoppeltes PDI-Peptid		Stressgen	
Anti-PDI	Synthetisches, an KLH	Maus	(Walker <i>et al.</i> , 2002)	IF:1:200
(12-15)			#1525-01	111001 11100
Anti-CD2	Maus CD2	Ratte	Southern Biotech	FACS: 1:100

22C14	C-terminale 14 AS von APP	Kanınchen	Von der Gruppe Beyreuther	WB: 1:2000
	APP, C99, C83 und p6		(ZMBH) zur Verfügung	
			gestellt	
Anti-	Flotillin	Kaninchen	Gruppe Bernd Helms,	WB: 1:10000
Flotillin			Universität Utrecht,	
			Niederlande	
Anti-Rab5	Synthetisches, an KLH	Kaninchen	Stressgen	IF: 1:50
	gekoppeltes Rab5-Fragment		#KAP-GP006	
B126	Pen2	Kaninchen	Gruppe Wim Annaert, VIB,	WB: 1:1000
			Leuven, Belgien	



Abb. 31: In dieser Arbeit verwendete Antikörper gegen APP und seine Prozessierungsprodukte.

## 6.1.8 Sekundärantikörper

Reaktivität gegen	Gekoppelt an	Von/Bestellnummer	Verdünnung
Kaninchen	Alexa Fluor <sup>®</sup> 680	Molecular Probes (Invitrogen	1:10.000
		detection technologies)	
		#A21076	
Kaninchen	Meerrettichperoxidase	Dianova, Hamburg	1:5.000
		#111-007-003	
Maus	Alexa Fluor <sup>®</sup> 680	Molecular Probes (Invitrogen	1:10.000
		detection technologies)	
		#A21057	
Maus	Meerrettichperoxidase	Dianova, Hamburg	1:5.000
		#115-035-003	
Ratte	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Molecular Probes (Invitrogen	IF 1:10.000
		detection technologies)	FACS 1:500
		#A11006	

6.1.9 Prokaroyntische Zellen

# Zellen

DH5α (Escherichia coli) OneShot Top10 (Escherichia coli) BL21 Star One Shot (Escherichia coli)

# Herkunft/Referenz

Invitrogen, Karlsuhe (#18265-017) Invitrogen, Karlsuhe Invitrogen, Karlsuhe (#C6010-03)

# 6.1.10 Eukaroyntische Zellen

Zelllinie	Herkunft	Referenz
CHO (Chinese Hamster	Ovarien-Zellen des chinesischen Hamsters	(Gottlieb et al., 1975)
Ovary)		
COS7	Nieren-Epithel-Zelllinie von der grünen	(Gluzman, 1981)
	Meerkatze	
SH-SY5Y	Menschliche Neuroblastom-Zelllinie	(Ross et al., 1983)
N2a (Neuro2a)	Murine Neuroblastom-Zelllinie	(Olmsted et al., 1970)
HEK 293T (Human	Menschliche embryonale Nierenzellen, die T-	(Zur Hausen, 1967)
Embryonic Kidney)	Version exprimiert zusätzlich das "SV40	
	large T-Antigen"	
Vero	Nierenzellen der grünen Meerkatze	(Rhim & Schell, 1967)

6.1.11 Materialien für molekularbiologische Experimente

DNA Ladder (1kb)	New England Biolabs, Frankfurt
DNA Ladder (100bp)	New England Biolabs, Frankfurt
DNA Ligation Kit Ver.2	TaKaRa, bezogen über Mobitec, Göttingen
	(#6022)
Flexi <sup>TM</sup> Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega GmbH, Mannheim (#L4540)
GeneEditor <sup>TM</sup> in vitro site-directed mutagenesis system	Promega GmbH, Mannheim
Mikrosomale Membranen aus Hundepankreas	Roche Applied Science, Mannheim
	(#1108484)
Novex 10% TBE-Urea Gele	Invitrogen, Karlsruhe (#EC68752)
NucleoBond PC100 MIDI-Kit	Macherey-Nagel, Düren (#740573)

NucleoSpin <sup>®</sup> Extract Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren
pcDNA3.1 Directional TOPO Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe (#K4900-01)
PeqGOLD dNTP-Mix 'Long Range'	Peqlab, Erlangen
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pfu 10x Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
QIAquick Spin Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange <sup>TM</sup> site-directed mutagenesis kit	Stratagene, Heidelberg (#200519)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt
RNA Ladder 'low range'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (#SM0411)
T <sub>4</sub> RNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt (#M0204S)
T <sub>7</sub> -MEGAshortscript <sup>TM</sup>	Ambion, Frankfurt
T <sub>7</sub> -mMessage mMachine Kit,	Ambion, Frankfurt (#1344)
tRNA	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
	(#R5636)

# 6.1.12 Materialien für biochemische Experimente

BioMax MR Film für [ <sup>35</sup> S]	Kodak
Fuji Medical X-Ray Filme	Bezogen über Bechthold Röntgenhandel, Kelkheim
CL-4B Sepharose Beads	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen (#CL4B200-
	100ml)
Complete <sup>TM</sup> Protease Inhibitor Cocktail – EDTA	Roche Diagnostics, Mannheim (#1873580)
frei	
ECL <sup>TM</sup>	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilm <sup>™</sup>	Amersham Biosciences, Freiburg (#HP79NA)
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Mikrosomale Membranen aus Hundepankreas	Promega GmbH, Mannheim
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden (#1018240)
Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,2µM	Amersham Biosciences, Freiburg (#RPN3032D)
(300mm x 3m), Hybond <sup>TM</sup> -ECL	
NuPage Novex 10-20% TricineGele	Invitrogen, Karlsruhe (#EC66252Box)
Precision Plus Protein All Blue Standards	BioRad GmbH, München (#161-0373)

Protein A-Sepharose 4 Fast Flow

Protein G-Sepharose 4 Fast Flow PVDF – Immobilon-FL Transfer Membrane PVDF – Immobilon-P Transfer Membrane Whatman Papier 3 MM Amersham Biosciences, Freiburg (#17-5280-04) GE Healthcare Bio-Sciences GmbH, München Millipore, Schwalbach (#IPFL00010) Millipore, Schwalbach (#IPVH00010) Schleicher & Schuell, Dassel

# 6.1.13 Materialien für zellbiologische Experimente

DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Lipofectin	Invitrogen, Karlsruhe (#18292-037)
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
MBS Mammalian Transfection Kit	Stratagene, Heidelberg (#200388)
Cell Dissociation Buffer	Invitrogen, Karlsruhe (#13151-014)
Collagen R Solution	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg (#47254.01)

Für die Kultivierung der Zellen wurden Plastikwaren der Firmen Falkon und Sarstedt verwendet.

# 6.1.14 Geräte

Flüssigkeitsszintillationszähler LS6000TA	Beckmann, USA
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg (#5436/5437)
SpeedVac, Vakuum Konzentrator	Bachofer, Reutlingen
Power Supply	LKB-Pharmacia, Freiburg
Ultraschallbad Sonorex RK103H (Bandelin)	Bender und Hobein, Bruchsal
UV-Lampe SYLVANIA R 100W	Mercury Flood, USA (#H44JM-100) Bezogen
	über: UV-Labortechnik, Glashütten
Reagenzglasmixer Vortex	Neolab, Heidelberg (#7-2020)
Nanodrop, ND-1000 Spektralphotometer	Peqlab, Erlangen

### 6.2 Methoden

### 6.2.1 Molekularbiologische Methoden

6.2.1.1 Präparation von DNA

Lösungen und Material:

Medium für Übernachtkultur: LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) MIDI-Kit NucleoBond PC100 (Macherey-Nagel) NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid-Kit (Macherey-Nagel) Millipore H<sub>2</sub>O

### Durchführung:

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, wurden 100ml einer Übernachtkultur in  $LB_{Amp}$ -Medium bei 3200g<sub>av</sub> und 4°C für 15min sedimentiert und die Plasmid-DNA mit einem MIDI-Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Die durch Isopropanol gefällte DNA wurde in 200µl Millipore H<sub>2</sub>O aufgenommen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die Reinheit- und Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nanodrop Spektralphotometer.

Geringere Mengen Plasmid-DNA wurden aus 10ml Übernachtkultur mittels dem NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid-Kit gereinigt. Die Elution erfolgte in zwei Schritten: zunächst wurde mit 25µl H<sub>2</sub>O eluiert, danach erfolgte die Nachelution mit 15µl H<sub>2</sub>O.

# 6.2.1.2 Reinigung von PCR-Produkten und Umpufferung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte wurden entweder aus Agarose-Gelen (siehe 6.2.1.3) oder über das NucleoSpin<sup>®</sup> Extract-Kit (Macherey-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Auch zum Umpuffern vor salzempfindlichen Klonierungstechniken (z.B. Ligation oder Restriktion) wurde das Kit verwendet. Die Elution erfolgte mit 20-50µl H<sub>2</sub>O, je nach erwarteter DNA Menge.

### 6.2.1.3 DNA-Aufreinigung aus Agarose-Gelen

Um DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen nach Restriktionsverdau wiederzugewinnen, wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gewogen. Zu dem Gelstück wurde das dreifache Volumen (in  $\mu$ l) seines Gewichtes (in mg) an Puffer QX1 gegeben und das Gelstück durch Schütteln bei 50°C für ca. 10min gelöst. Diese Lösung wurde mit dem einfachen Volumen des Gelstück-Gewichtes an Isopropanol versetzt und das Gemisch auf eine QIAquick-Säule aufgetragen, die zuvor auf ein 2ml-Sammelgefäß gesteckt wurde. Nach einer Zentrifugation (16000g<sub>av</sub>, 1min, RT) wurden 750 $\mu$ l Waschpuffer PE auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (16000g<sub>av</sub>, 2min, RT). Reste des Waschpuffers wurden durch eine zweite Zentrifugation (16000g<sub>av</sub>, 2min, RT) der Säule entfernt. Die Säule wurde zur Elution der DNA in ein frisches Eppendorf-Gefäß transferiert, mit 30 $\mu$ l Millipore-H<sub>2</sub>O beladen, 2min bei RT inkubiert und eluiert (16000g<sub>av</sub>, 1min, RT).

### 6.2.1.4 Phenol-Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA

50µl der zu reinigenden DNA in H<sub>2</sub>O wurden zu 50µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; v/v/v) pipettiert, gut gevortext und anschließend zentrifugiert (16000g<sub>av</sub>, 5min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 350µl H<sub>2</sub>O, 40µl 3M Natriumacetat und 1ml 100% Ethanol gemischt. Die Fällung erfolgte für mindestens 3h bei  $-80^{\circ}$ C. Danach wurde die gefällte DNA sedimentiert (16000g<sub>av</sub>, 5min, 4°C) und der Überstand abgezogen. Das Pellet wurde mit 400µl 70% Ethanol nachgewaschen, zentrifugiert (16000g<sub>av</sub>, 5min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die DNA wurde in der Speed-Vac getrocknet und anschließend in 10µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 6.2.1.5 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurden am Nanodrop Spektralphotometer anhand des Absorptionsverhältnisses bei den Wellenlängen 260nm und 280nm bestimmt. 6.2.1.6 Restriktionsverdau von DNA (Sambrook et al., 1989)

Lösungen und Material:

Template DNA	(1-3µg/Reaktion)
Restriktionsendonukleasen	(5-10U/Reaktion)
Restriktionspuffer	(10x)
BSA-Lösung in H <sub>2</sub> O	(10x = 1mg/ml)

### Durchführung:

Für einen präparativen Verdau von DNA, bei dem ein bestimmtes DNA-Fragment für eine spätere Ligation aufgereinigt werden sollte, wurde je nach Größe des entsprechenden Fragments ca. 1-3µg DNA verwendet. Der Verdau erfolgte mit 5-10U der gewählten Restriktionsenzyme, 2µl des vom Hersteller der Enzyme empfohlenen Reaktionspuffer und 2µl BSA-Lösung (1mg/ml), falls dies zur Stabilisierung des entsprechenden Enzyms empfohlen wurde. Der Reaktionsansatz wurde mit Millipore-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20µl gebracht und bei der für das entsprechende Enzym optimalen Reaktionstemperatur in der Regel für mindestens 90min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung (meist: 20min, 80°C) oder die Zugabe von 2µl DNA-Probenpuffer beendet, Vektor DNA dephosphoryliert (6.2.1.7) und der Verdau auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und analysiert.

### 6.2.1.7 Dephosphorylierung überstehender DNA-Enden (Sambrook et al., 1989)

Um die Religation verdauter DNA zu verhindern wurden verdaute Plasmide mit Alkalischer Phosphatase behandelt. Die Dephosphorylierung wurde in den meisten Fällen direkt nach dem Verdau durch Zupipettieren von 2µl CIP (Alkalische Phosphatase) durchgeführt. 6.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten (Sambrook et al., 1989)

|--|

zu inserierende DNA	(verdaut mit Restriktionsendonukleasen und in $H_2O$ gelöst)
Vektor DNA	(verdaut mit Restriktionsendonukleasen, mit alkalischer
	Phosphatase behandelt und in H <sub>2</sub> O gelöst)
Solution I	(DNA Ligation Kit Ver 2., TAKARA)

## Durchführung:

0,03pmol der Vektor DNA und 0,1pmol des Inserts wurden in einem Gesamtvolumen von  $5\mu$ l gemischt. Danach wurden  $5\mu$ l Solution I zugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C (alternativ: 4h bei 16°C) inkubiert und 3µl davon in der Transformation von *E. coli* (6.2.1.9) eingesetzt.

6.2.1.9 Transformation von DH5 $\alpha$ -Zellen mit Plasmid-DNA (Hanahan, 1983)

Lösungen und Material:

Plasmid-DNA

(maximal 3µl Ligationsansatz, bzw. 0,5µg Plasmid-DNA) (30µl/Transformation)

LB-Medium ohne Antibiotika

LB-Agarplatten mit Ampicillin zur Selektion

kompetente Escherichia coli DH5α-Zellen

#### Durchführung:

30µl kompetente DH5α-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Zur DNA-Aufnahme wurden die Zellen exakt 20sec bei 37°C im Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen und anschließend für 2min auf Eis gestellt. Danach wurden 970µl LB-Medium ohne Antibiotikum zugegeben und die Zellen für 1h bei 37°C inkubiert. Zur Selektion von Bakterien, die das Ampicillin-Resistenz beinhaltende Plasmid aufgenommen hatten, wurden jeweils 50µl und 200µl der Transformationsansätze auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 750µl jedes Ansatzes wurden bei 4°C gelagert und konnten bei schlechter Ligations- bzw. Transformationseffizienz am nächsten Tag pelletiert, in 100µl LB Medium resuspendiert und auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agarplatte ausplattiert werden. Zur Präparation von DNA wurden Einzelklone gepickt und 5-10ml (Miniprep) bzw. 50-200ml (Midiprep) LB-Medium mit Ampicillin als Übernachtkulturen angeimpft.

# 6.2.1.10 Polymerase Kettenreaktion

Lösungen und Material:

MgCl <sub>2</sub>	(25mM)	
dNTPmix	(jedes Nukleotid 10m	M)
Template DNA	(10ng/µl)	
Oligonukleotide	(sense und antisense ]	Primer, je 10µM)
Pfu Turbo DNA Polymerase	(2,5U/µl).	
PCR Amplifikationspuffer (10x)	Tris/HCl	100mM; pH 8,3
	KCl	500mM

### Durchführung:

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann eine doppelsträngige DNA um das millionenfache amplifiziert werden. Prinzip der PCR ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden ("sense-Primer" und "antisense-Primer"). Die DNA-Polymerase heftet Nukleotide an die 3'-OH Primer-Enden und synthetisiert zu der zu amplifizierenden DNA komplementäre DNA-Sequenzen. Durch mehrere Wiederholungen eines Reaktionszyklus, der aus dem Aufschmelzen der entstehenden DNA-Doppelstränge (Denaturierung), der Anhybridisierung der Primer ("Annealing") und der Synthesereaktion der DNA-Polymerase (Elongation) besteht, wird der DNA-Bereich zwischen den Primern amplifiziert.

Die PCR-Reaktionen enthielten folgende Reagenzien und wurden in einem Volumen von 50µl durchgeführt (die Differenz wurde mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt):

5µl	10x PCR-Puffer Amplifikationspuffer (Pfu-Puffer)
1µl	dNTP-Mix (10mM)
1µl	"sense-Primer" (10mM)
1µl	"antisense-Primer (10mM)
1-5ng	Matrizen-DNA
0,5µl	Pfu-Polymerase (2,5U/µl)

In einer PCR-Maschine wurde folgendes Standardprogramms durchgeführt:

PCR Programm:

	2min	95°C	Denaturierung
X	1min	95°C	Denaturierung
33x(	1min	50-60°C (siehe jew. Primer)	Hybridisierung
	<b>1</b> -3min	72°C	Elongation
	10min	72°C	Elongation
	halten	4°C	

Die synthetisierte DNA wurde anschließend auf ein Agarose-Gel aufgetragen und nach der in Abschnitt 6.2.1.3 beschriebenen Methode aus dem Agarose-Gel aufgereinigt.

Wurden als PCR-Primer Oligonukleotide verwendet, die neue Restriktionsenzym-Schnittstellen besitzen, konnten die vervielfältigten Fragmente nach einem enzymatischen Verdau mit dem entsprechendem Restriktionsenzym in den Zielvektor kloniert werden. Mit dieser Methode wurden teilweise auch Mutationen über entsprechende Primer in das zu vervielfältigende PCR-Fragment eingeführt.

#### 6.2.1.11 Ortsspezifische Mutagenese

Lösungen und Material:

Template DNA (5-50ng/Reaktion) sense und antisense Primer (125ng/Reaktion) QuikChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit

### Durchführung:

Die Mutagenese erfolgte nach dem Handbuch des "QuikChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis" Kit der Firma Stratagene. Die amplifizierte DNA wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

Prinzip:

Die Methode setzt die Nutzung der PfuTurbo DNA Polymerase voraus, die sich durch ihre hohe Genauigkeit auszeichnet und nur in ca. jedem 600000bp eine Mutation einfügt. Die Mutation wird durch zwei entgegengesetzt gerichtete Primer eingeführt. Dazu werden die beiden Primer so geplant, dass sie in 5' Richtung vor der Mutation einen unveränderten Bereich von ca. sechs Nukleotiden enthalten und in Richtung 3' nach der Mutation ein Bereich von mindestens 12 (meist 14) Nukleotiden komplementär zur Template-DNA ist. Dies führt zu einer Überlappung der entgegengesetzt gerichteten Primer in einem Bereich von ca. 20bp.

Zum Abbau der nicht modifizierten parentalen Vektor-DNA, die während der Synthese in *E. coli* methyliert wurde, wird anschließend mit DpnI, einem Restriktionsenzym, das spezifisch methylierte und halbmethylierte DNA erkennt (Nelson & McClelland, 1992), bei 37°C für 1h verdaut.

Danach schließt sich eine Transformation der neu synthetisierten Plasmide mit der gewünschten Mutation in superkompetente XL1-Blue Zellen an, wo die Plasmide an den Überhängen wieder zyklisiert werden.

#### 6.2.1.12 Klonierung der verwendeten Plasmide

 A) Austausch definierter Codons in SP-C99zu Amber-Stop-Codons (durchgeführt von Liyun Zhao)

Als Ursprung der Klonierungen von Dr. Liyun Zhao diente das Plasmid pBS/SP-C99wt, sowie die Plasmide pBS/SP-C99 London und pBS/SP-C99 Florida, die uns freundlicherweise von Prof. Dr. Konrad Beyreuther (ZMBH, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden. Liyun führte in diesen Plasmiden für die Codons 19, 20, 39, 41, 43, 44, 45, 47, 60, 86 und 91 Amber-Stop-Mutationen ein.

### B) Optimierung der Signalsequenz aus dem Konstrukt SP-C99

Bei den pBS/SP-C99 Plasmiden handelte es sich um pBluescript SK+ Vektoren mit der DNA-Sequenz für das Signalpeptid (SP) von APP, an die sich das C99 Protein anschließt.

Aus dem APP-Gen wurde also die Sequenz für  $\beta$ -APPs deletiert. C99 schließt sich allerdings nicht unmittelbar dem SP an. Vielmehr befinden sich zwischen SP und C99 noch die in der Ursprungssequenz dem Signalpeptid folgenden AS Leucin und Glutaminsäure.

Die resultierende Aminosäuresequenz wird nach dem Programm SignalP V1.1 von der Signalpeptidase direkt hinter der Signalsequenz und vor den beiden zusätzlichen Aminosäuren LE gespalten. Membraninseriertes C99 und das daraus entstehende A $\beta$ -Peptid haben also am N-Terminus zwei zusätzliche AS. Die Mutation der letzten beiden AS der Signalsequenz von LE zu DA sollte laut der angewandten Software zu einem Schnitt der Signalpeptidase exakt an der  $\beta$ -Sekretase Schnittstelle führen.

Die Mutation wurde durch die Primer SPA4CT-DA-forw und SPA4CT-DA-rev mit dem QuikChange<sup>®</sup>Site-Directed Mutagenesis Kit eingeführt.

C) Wechsel des Vektorsystems von pBS SK+ zu pcDNA3.1

Von pBS Vektoren wurde auf pcDNA3.1 Vektoren gewechselt, da diese den starken CMV Promotor haben und dadurch auch in eukaryontischen Zellen einsetzbar sind. Darüber hinaus liegen pcDNA3.1 Vektoren in *E. coli* Zellen in noch höherer Kopienzahl vor, wodurch einfach und schnell große Mengen DNA präpariert werden können, wie sie für Transfektionen benötigt werden.

Der Wechsel des Vektorsystems wurde nach dem Protokoll des TOPO<sup>®</sup> Klonierungs-Kit durchgeführt. Dazu wurde SP-C99\* mit den Primern SPA4CT-CACCATG und SPA4CT-Stop amplifiziert. Der linearisierte Vektor pcDNA3.1 ist kovalent mit der Topoisomerase I von *Vaccinia* verknüpft. Die Topoisomerase bindet an spezifischen Positionen an doppelsträngige DNA und schneidet das Phosphodiester-Rückgrad nach der 5'-CCCTT Sequenz in einem Strang. Die Energie von dieser Spaltung wird in Form einer kovalenten Bindung zwischen dem 3' Phosphat des geschnittenen Strangs und einem Tyrosin der Topoisomerase I konserviert. Die Phospho-Tyrosin Bindung zwischen DNA und Enzym kann anschließend durch die 5' Hydroxylgruppe des geschnittenen Stranges (oder eines PCR-Produkts) angegriffen werden, wodurch die reverse Reaktion abläuft und die Topoisomerase freigesetzt wird. Die TOPO<sup>®</sup> Klonierung hat, obwohl auf Restriktionsendonukleasen verzichtet wird, eine Richtung, da ein 3' Ende des TOPO<sup>®</sup> beladenen pcDNA3.1 Vektors einen Überhang von 4 Nukleotiden (GTGG) hat. Das PCR-Produkt wird gerichtet in den
Vektor eingebaut, da es am 5' Ende mit CACC beginnt, was komplementär zum Überhang im TOPO<sup>®</sup> beladenen pcDNA3.1 Vektor ist.

D) Klonierung der pEYPF-C99 bzw. pECFP-C99 Vektoren.

In pEYFP-p24-, bzw. pECFP-p23-Vektoren (Majoul *et al.*, 2001) wurden die Proteine der p24-Familie durch verschiedene C99 Spezies ersetzt.

Die beiden Ursprungsvektoren (pE<sup>C</sup>/<sub>Y</sub>FP-C1) kodierten für ein Konstrukt aus dem 31 AS Signalpeptid von p23/p24, das über AgeI inseriert wurde, gefolgt von CFP/YFP und der Sequenz von p23/p24 hinter dem Signalpeptid. P23/p24 wurden über HindIII und BamHI aus dem Vektor ausgeschnitten und durch ein PCR Produkt aus der jeweiligen C99 Spezies ohne SP ersetzt. Die C99 flankierenden HindIII und BamHI Schnittstellen wurden während der PCR über Primer eingeführt. Die generierten Vektoren wurden gereinigt und sequenziert.

### E) Klonierung von pET-15b/C99 zur Expression in BL21Star

Mit pcDNA3.1/C99wt bzw. den beiden EOFAD Mutanten und den Primern "NdeI C99 ohne SP" und "C99/C83-BamHI rev." wurde eine PCR durchgeführt. Dabei wurden die beiden in den Oligonukleotidnamen erwähnten Schnittstellen eingeführt. Das PCR Produkt und der Vektor pET-15b wurden mit NdeI und BamHI verdaut und der linearisierte Vektor dephosphoryliert. Daran schloss sich eine Ligation der gereinigten DNA-Fragmente an. Die resultierenden Vektoren wurden gereinigt, über Restriktionsanalysen überprüft und über den gesamten C99 kodierenden Bereich sequenziert.

F) Klonierung von pRT2/C99\*-IRES-eGFP für die regulierbare Expression in Säugerzellen

Der pRevTRE2 Vektor wurde über BamHI und NotI linearisiert und dephosphoryliert. Aus den pcDNA3.1/SP-C99\* Vektoren wurden die verschiedenen SP-C99\* Spezies mit BamHI und NotI ausgeschnitten, auf einem 1% Agarose-Gel auftrennt und gereinigt. Aus einem dritten Vektor von Blanche Schwappach (ZMBH, Heidelberg) wurde das IRES-eGFP Fragment über einen Verdau mit XhoI und NotI freigesetzt und wie verdautes SP-C99\* gereinigt. In einer Trippelligation wurden die drei linearisierten DNA Fragmente zum pRT/C99\*-IRES-eGFP Vektor fusioniert.

#### 6.2.1.13 In Vitro Transkription

A) In vitro Transkription und Reinigung der Amber-Suppressor-tRNA(-CA)

#### Material:

pTHG 73 Plasmid	linearisiert mit FokI
	gereinigt über Phenol-Extraktion und EtOH Präzipitation
pTHG 73 T7 Primer	10pmol/µl
pTHG 73 end 3' Primer	10pmol/µl
PCR Lösungen	
T7-MEGAshortskript Kit	
QIAquick Spin Kit	
1,5ml ResourceQ Säule	
Puffer A:	50mM Tris-HCl; pH 7,5
	5mM MgCl <sub>2</sub>
	50mM NaCl
Puffer B:	50mM Tris-HCl; pH 7,5
	5mM MgCl <sub>2</sub>
	1M NaCl

#### Durchführung:

Aus dem linearisierten und gereinigten pTHG 73 Plasmid wurde mittels PCR die cDNA für die Amber-Suppressor-tRNA amplifiziert. Die Hybridisierung fand bei 53°C für 1min statt, die Elongation bei 72°C, ebenfalls für 1min. Das PCR-Produkt wurde über das "QIAquick PCR Purification Kit" Protokoll gereinigt und mit Hilfe des "T<sub>7</sub>-MEGAshortscript<sup>TM</sup>-Kit" *in vitro* transkribiert. Dabei wurden 1,2µg PCR Produkt für einen 100µl Ansatz eingesetzt und für 2h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50µl 3M NaAc (pH 4,5) und 350µl H<sub>2</sub>O gestoppt.

Nach der *in vitro* Transkription wurden die Proteine durch Phenol/Chloroform-Extraktion (6.2.1.4) abgetrennt und die Nukleinsäuren präzipitiert. Die transkribierte RNA wurde über

eine ResourceQ Säule mit einem linearen Gradient von 50 bis 1000mM NaCl von freien Nukleotiden abgetrennt. **Abb. 32** zeigt das Absorptionsdiagramm (OD<sub>260</sub>, OD<sub>280</sub>) und ein 1% Agarose-Gel der Elution. Die Amber-Suppressor-tRNA(-CA) eluiert in den Fraktionen 15-18 bei einer NaCl Konzentration von ca. 450mM. Die Ausbeute betrug etwa 0,4mg tRNA.



Abb. 32: A) Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatographie. B) Agarose-Gel Analyse der eluierten Fraktionen.

Die tRNA wurde anschließend mit der jeweiligen photoaktivierbaren AS beladen (siehe: 6.2.4.4).

B) In vitro Transkription und Reinigung von SP-C99\* mRNAs

Material:

cDNA von SPA4CT

als PCR Produkt (~ $0,5\mu g/\mu l$ ), über QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und in Millipore H<sub>2</sub>O resuspendiert

mMESSAGE mMACHINE® Kit

### Durchführung:

Je 10µl 2x NTP/CAP, 2µl 10x Reaktionspuffer mit Spermidin, 2µl Enzym Mix und 1µg PCR Produkt wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf 20µl aufgefüllt, gemischt, kurz abzentrifugiert und für 2h bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1µl DNaseI zugesetzt, um die Template-DNA zu verdauen, wieder gut durchmischt und für weitere 15min inkubiert.

Um freie Nukleotide und die meisten Proteine aus den Ansätzen zu entfernen, wurde die *in vitro* translatierte mRNA einer Lithiumchlorid-Fällung unterzogen. Dazu wurden je  $30\mu$ l Nuklease-freies Wasser und  $25\mu$ l 7,5M LiCl mit 50mM EDTA zugegeben, gut durchmischt und für 1h bei –20°C inkubiert. Die gefällte mRNA wurde sedimentiert (16000g<sub>av</sub>, 15min, 4°C) und mit 1ml 70% Ethanol gewaschen, um freie Nukleotide vollständig zu entfernen. Nach einer erneuten Zentrifugation (16000g<sub>av</sub>, 10min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und die mRNA in 30µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die Ausbeute betrug jeweils etwa 1,8mg mRNA.

#### 6.2.1.14 In Vitro Translation

Lösungen und Material:	
mRNA (1µg/µl)	(2µg/Reaktion)
Flexi <sup>TM</sup> Rabbit Reticulocyte Lysate System	(35µl/Reaktion)
[ <sup>35</sup> S]-Methionin	(30µCi/Reaktion)
Amber-Suppressor-tRNA <sup>F*</sup>	
mRNA	

Durchführung:

Die *in vitro* Translation wurde mit dem Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega) durchgeführt. Die meisten der zur Translation der mRNA nötigen Komponenten liegen hierbei in einem Lysat, das aus Kaninchen-Retikulozyten gewonnen wurde, vor. Das Retikulozytenlysat enthält z.B. Phosphokreatinkinase und Hämin, das die Initiation der Proteinbiosynthese fördert. Die DTT-, Mg<sup>2+</sup>-, K<sup>+</sup>- und Acetat-Konzentrationen sind so eingestellt, dass größtmögliche Proteinausbeute erzielt werden kann. Zum Abbau der endogenen mRNA ist das Retikulozytenlysat mit Nukleasen vorbehandelt.

Zur Translation wurde dem Retikulozytenlysat die zu translatierende mRNA und ein Aminosäuren-Gemisch zugesetzt. Die Translationsprodukte wurden radioaktiv markiert, indem ein Methionin-freies Aminosäuren-Gemisch verwendet und [<sup>35</sup>S]-Methionin zugegeben wurde. Die photolabile AS (Tmd)Phe wurde durch Zugabe von Amber-Suppressor-tRNA<sup>F\*</sup> während der Translation eingebracht. Da C99 kotranslational in Membranen inseriert werden sollte, wurden die Reaktionsansätze in Gegenwart von mikrosomalen Membranen, die aus Hundepankreas gewonnen wurden, durchgeführt.

Vor der Reaktion wurde die RNA-Lösung für 10min auf 70°C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Der *in vitro* Translationsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt und für 4h bei 30°C inkubiert:

Nuklease-behandeltes Kaninchen Retikulozytenlysat	26,25µl	52,5% (v/v)
KCl (2,5M)	1,31µl	66mM mit $K^+$ im
		Retikulozytenlysat
$Mg(OAc)_2$ (25mM)	5,4µl	3,7mM mit Mg <sup>2+</sup> im
		Retikulozytenlysat
Aminosäure-Mischung ohne Methionin	0,88µl	1,75% (v/v)
[ <sup>35</sup> S]-Methionin (1000Ci/mmol, 10mCi/ml)	1,88µl	$375\mu Ci/ml = 0,375\mu M$
mRNA (400ng/µl)	3µ1	24µg/ml
Amber-Suppressor-tRNA <sup>F*</sup> (4µg/ml)	3,67µl	0,3µg/ml
Mikrosomale Membranen (optional)	1,85µl	3,7% (v/v)
Nuklease-freies Wasser	ad 50µl	

Die *in vitro* translatierten und supprimierten Proteine wurden auf ein 0,5M Saccharosekissen sedimentiert (4°C, 100000g<sub>av</sub>, 30min) oder TCA gefällt und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Zur Sedimentation auf ein Saccharosekissen wurden 25μl der Reaktion mit 100μl 50mM HEPES/KOH, pH 7,6, 0,5M KOAc und 5mM Mg(OAc)<sub>2</sub> gemischt und auf 10μl 0,5M Saccharose pelletiert.

## 6.2.2 Elektrophoretische Methoden

## 6.2.2.1 Agarose-Gel Elektrophorese

Lösungen und Material:

l)	
er oder 1kb DNA-Leit	er)
Tris/Acetat	2M; pH 8,0
EDTA	50mM
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Glycerol	30% (w/v)
in 10x TAE-Puffer	
	ll) er oder 1kb DNA-Leit Tris/Acetat EDTA Bromphenolblau Glycerol in 10x TAE-Puffer

### Durchführung:

Zur Herstellung des Agarose-Gels wurden 3g Agarose in 300ml 1x TAE-Puffer durch Erwärmen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5µg/ml zugesetzt, gerührt und das Gel in einer Dicke von etwa 5mm gegossen. Die Proben wurden mit Probenpuffer (Endkonzentration: 1x) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in den 1% Agarose-Gelen bei konstanter Spannung von 150Volt in 1x TAE-Puffer. Die Elektrophorese lief solange, bis der Farbstoff 3/5 der gesamten Gel-Länge zurückgelegt hat.

Die Fluoreszenz von in die DNA interkaliertem Ethidiumbromid wurde bei einer Wellenlänge von 302nm sichtbar gemacht und photographiert. Zur Kontrolle der Fragmentgrößen und DNA-Mengen wurden jeweils 1µg DNA-Größenmarker (100bp DNA-Leiter oder 1kb DNA-Leiter) auf das Gel aufgetragen. 6.2.2.2 Invitrogen 10-20% Tris/Tricine Gele

Lösungen und Material:

10x Schägger Kathoden-Puffer:	1M	Tris
	1M	Tricine
	1% (w/v)	SDS

3x Probenpuffer:

Novex 10-20% Tris/Tricin Gele

## Durchführung:

Für alle Crosslinkexperimente und radioaktiven Proteinmarkierungen wurden 10-20% Tris/Tricine Gele von Invitrogen verwendet. Als Laufpuffer diente 1x Schägger Kathoden-Puffer. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 90min bei 125V (Start: ~80mA, Ende: ~40mA).

## 6.2.2.3 TBE-Harnstoff Gele

Die Beladung von tRNA (-CA) mit (Tmd)Phe-pdCpA wurde mit Novex<sup>®</sup> 10% TBE-Harnstoffgelen (Invitrogen) analysiert. Die Gele liefen bei konstant 180Volt für 60min und wurden für 90min bei RT mit 5µg/ml Ethidiumbromid gefärbt.

6.2.3 Immunologische Methoden

6.2.3.1 Western Blotting

<b>Blot-Puffer:</b>	25mM	Tris
	192mM	Glycin
	10%	Methanol

Durch einen Western-Blot werden Proteine aus einem SDS-Gel, durch Anlegen einer Stromspannung auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran transferiert. Durch das im Laufpuffer vorhandene SDS sind alle Proteine negativ geladenen, so dass sie bei Stromspannung in Richtung positiver Ladung (Anode) wandern, wobei sie von einer Nitrozellulose- oder PVDF-Membran aufgefangen werden.

PVDF Membranen wurden kurz mit MeOH benetzt (Nitrozellulosemembranen kurz in H<sub>2</sub>O getaucht) und in den Blot-Puffer überführt. Zwei Schaumstoffkissen, vier Whatman-Filterpapiere (10 x 7,5cm) und das Gel wurden ebenfalls in Blot-Puffer getränkt und mit der jeweiligen Blotmembran und wie in **Abb. 33** zusammengebaut. Eventuell zwischen den einzelnen Lagen des Blots befindliche Luftblasen wurden jeweils entfernt. Der so aufgebaute "Sandwich" wurde in eine Nass-Blot Apparatur der Firma Biorad gespannt. Der Transfer erfolgte für 1h bei 100V.





Anode (+)

#### Abb. 33: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Western-Blots

PBS(-T):	35,7mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	14,3mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	136mM	NaCl
	3mM	KCl
	(0,05% (v/v)	Tween)
ECL:	100mg	Luminol
	124µl	$H_2O_2$

20ml 1M Tris, pH 8,5 (0,1M) (mit H<sub>2</sub>O auf 200ml auffüllen) **Enhancer:** 

11mg p-Coumaric-Säure

in 10ml DMSO

Nach dem Transfer der durch SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine Membran wurde diese wie folgt analysiert:

Die Membranen wurden zum Teil mit PonceauS (100mg PonceauS, 100ml H<sub>2</sub>O, 1ml Eisessig) gefärbt. Die so sichtbar gewordenen Banden des verwendeten Protein-Markers wurden mit Kugelschreiber markiert. Anschließend wurde die Membran mit H<sub>2</sub>O entfärbt. Alle folgenden Inkubationen erfolgten auf einem Wippschüttler. Zur Immundetektion wurde die Membran für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 5% Milchpulver in PBS-T blockiert. Die Membran wurde 2-mal je 5min mit PBS-T gewaschen und anschließend für 60min mit dem ersten Antikörper (verdünnt in PBS-T mit 1% BSA) inkubiert. Danach wurde die Membran 3-mal für 10min mit PBS-T gewaschen und für 45min mit dem jeweiligen Zweit-Antikörper, der an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, inkubiert (verdünnt in PBS-T mit 1% Milchpulver). Anschließend wurde die Membran 3-mal für jeweils 10min mit PBS-T gewaschen und das Signal mit Hilfe des ECL-Systems detektiert. Hierzu wurden zu 8ml ECL 2ml H<sub>2</sub>O sowie 20µl Enhancer gegeben und die PVDF Membran darin kurz (1min) inkubiert. Die Membran wurde in eine lichtundurchlässige Filmkassette gelegt, mit einer Folie luftblasenfrei abgedeckt und im Fotolabor die durch die Aktivität der Meerrettichperoxidase entstehenden Lichtblitze einem ECL-Hyperfilm kurz (1s bis 5min) exponiert und sofort entwickelt. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurden Fuji Medical X-Ray Filme verwendet.

Zur Detektion von Proteinen mit Hilfe des LICOR Systems wurde wie folgt verfahren: Als Marker diente ein *prestained* Protein-Marker. Zunächst erfolgte die Inkubation der Membran in 5% Milchpulver in PBS (1h, RT). Danach wurde die Membran 3-mal mit PBS-T gewaschen und mit dem entsprechenden Primärantikörper für 1h bei RT inkubiert. Nach Waschen der Membran mit PBS-T (3-mal für 10min) folgte deren Inkubation mit einem mit Alexa markierten Sekundärantikörper (30min, RT). Dieser wurde in PBS-T mit einer Konzentration von 0,01% SDS gelöst. Anschließend wurde noch 4-mal mit PBS-T gewaschen (je 5min) und noch 2-mal mit PBS (je 5min). Anschließend erfolgte die Erfassung der Signale mittels dem LICOR-System und deren Auswertung mit der zugehörigen Quantifizierungs-Software.

6.2.3.2 Immunpräzipitation

Lyse-Puffer:	20mM	Hepes/KOH pH 7.4
	100mM	NaCl
	5mM	EDTA
	1%	Triton X-100
	0,5%	Natrium Desoxycholat
	Protein Inhil	pitor Cocktail Tablette (PIC)
Lyse-Puffer II:	50mM	Tris pH7,6
	150mM	NaCl
	1mM	CaCl <sub>2</sub>
	1mM	MgCl <sub>2</sub>
	1% CHAPSO	
	PIC	
Borat-Puffer:	0,2M	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> /H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> pH 9
	Herstellung	von 100ml Borat-Puffer:
	7,63g (0,021	mol) Natriumtetraborat-10-hydrat wurden bei 37°C unter
	Rühren in	75ml H <sub>2</sub> O gelöst. Durch Zugabe von 1,47g Borsäure
	erfolgte die	Einstellung des pH-Werts (pH 9 bei 25°C). Dazu wurde
	der Puffer	erwärmt und zur Überprüfung des pH-Wertes auf RT
	abgekühlt.	Der Puffer wurde auf 100ml aufgefüllt und bei RT
	gelagert.	
Kopplungs-Puffer:	Borat-Puffer	mit 20mM Dimethylpimelidatdihydrochlorid (DMP)
	M(DMP) = 2	259,2g/mol
	5,184mg DN	/IP/ml Borat-Puffer
Ethanolamin-Puffer	: 0,2M Ethano	plamin/HCl pH8
	M(Ethanola	$\min) = 61,08 \text{g/mol}$
	d(Ethanolan	nin) = 1,015g/ml
	1,20ml Etha	nolamin auf 100ml

2ml Protein A- bzw. Protein G-Sepharose, sowie 2ml CL4B-Sepharose wurden gemischt und in 20% Ethanol bei 4°C gelagert (Volumen: 12ml). Die Verwendung von Protein A- bzw. G-Sepharose erfolgte nach der unten aufgeführten Tabelle.

20µl Protein A- bzw. Protein G-Sepharose (1:1 Gemisch mit CL4B) wurden 3-mal mit 1ml Lyse-Puffer gewaschen. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation pelletiert (16000gav, 1min, 4°C - dies gilt auch für die folgenden Schritte). Das Entfernen des Überstandes erfolgte durch Absaugen mit einer Kapillarspitze. Um zu vermeiden, dass nach Wasch- bzw. Inkubationsschritten ungewollt Sepharose mit abgenommen wurde, blieben jeweils ca. 10-20µl der Lösungen über der Sepharose stehen. Es folgte die Zugabe des Antikörperserums zur Protein A/G-Sepharose in 500µl Lyse-Puffer. Anschließend wurde für 90min bzw. über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Um ein Ausfallen des Borat- Puffers zu vermeiden, erfolgten die weiteren Schritte bei RT. Sepharose-Beads wurden pelletiert und 2-mal mit 1ml 0,2M Natriumboratlösung gewaschen. Kovalentes Vernetzen von Antikörpern mit Protein A/G-Sepharose wurde mit 1ml Kopplungs-Puffer (unmittelbar vor Gebrauch ansetzten) für 30min bei RT durchgeführt. Anschließend wurde die Kopplungsreaktion gestoppt. Hierzu wurde 2-mal mit je 1ml einer 0,2M Ethanolaminlösung (pH 8) gewaschen und anschließend, nach Zugabe von 1ml 0,2M Ethanolaminlösung (pH 8), für weitere 2h bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Zuvor gelegentlich ausgefallener Boratpuffer konnte dabei wieder in Lösung gebracht werden.

Die Sepharose wurde einmal mit 1ml 0,1M Tris pH 8 (4°C) gewaschen (16000g<sub>av</sub>, 3min, 4°C) wobei sich das Volumen der Sepharose reduzierte. Durch das darauf folgende Waschen mit Lyse-Puffer vergrößerte sich das Volumen der Sepharose jedoch wieder. Nach dem Waschen der Sepharose mit 1ml Lyse-Puffer (3-mal, 4°C) wurden diese in Lyse-Puffer bei 4°C gelagert. Bei längerer Lagerung wurde diesem 0,02% (w/v) Natriumazid zugesetzt.

Für die IP wurden 100µl bzw. 200µl Lysat (s. 1.8) zu den Beads gegeben und für 90min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Um ein Pelletieren von nicht aufgeschlossenem Zellmaterial zu verhindern, wurde im Folgenden bei 600g<sub>av</sub> für 3min bei 4°C zentrifugiert. Die Sepharose Beads wurden abzentrifugiert und der Überstand zur Ermittlung der IP-Effizienz abgenommen. Anschließend wurde die Sepharose 5-mal mit Lyse-Puffer gewaschen

(bei radioaktiven Proben wurden die Waschlösungen ausgezählt). Die Elution der an die Sepharose gebundenen Proteine erfolgte mit 30µl 3xProteinprobenpuffer für 5min bei 95°C.

Polyklonale	Antikörper:		
		ProteinA	ProteinG
Meerschwei	inchen	•	
Maus			•
Kaninchen		•	
Ratte			•
Monoklona	le Antikörper:		
	Isotyp	ProteinA	ProteinG
Maus	IgG1		•
	IgG2 <sub>a</sub>	•	
	IgG2 <sub>b</sub>	•	
	IgG3	•	
Ratte	alle		•

#### 6.2.3.3 Immunfluoreszenz

5x IF-PBS:	рН 7,2	рН 7,2			
	$Na_2HPO_4 * 2 H_2O$	80,98g	(455,1mM)		
	$NaH_2PO_4 * 1 H_2O$	6,21g	(45mM)		
	NaCl	43,8g	(750mM)		
	KCl	0,93g	(12,5mM)		
	mit H <sub>2</sub> O auf 11 auffi	illen			

Zellen ohne Antikörperfärbung mit CFP, YFP, GFP oder einem Fusionsprotein mit einem dieser fluoreszierenden Proteine wurden wie folgt aufgearbeitet:

Die an Deckgläschen angewachsenen Zellen wurden 3-mal mit PBS gewaschen, für 20min mit 3% PFA in IF-PBS fixiert, 3-mal für jeweils 10min mit IF-PBS gewaschen, kurz in H<sub>2</sub>O getaucht und mit 7µl Mowiol eingedeckelt.

Zum Färben mit Antikörpern wurden die Zellen auf den Deckgläschen 3-mal mit PBS gewaschen und anschließend für 20min mit 3% PFA in IF-PBS fixiert. Das PFA wurde mit 0,1M Glycin in IF-PBS für 5min gequencht. Danach schloss sich für 10min eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,5% Triton X-100 in IF-PBS an, um intrazelluläre Strukturen für die Antikörper zugänglich zu machen. Um unspezifischen Hintergrund der

Färbungen zu minimieren, folgte für 1h bei RT ein Blockierungsschritt mit 1% BSA und 0,5% Triton in IF-PBS (= Blockierungspuffer). Die Zellen wurden für 5min mit IF-PBS-Puffer gewaschen und danach für 1h bei 37°C mit dem Erstantikörper in Blockierungspuffer inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschritte für je 5min mit IF-PBS und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in Blockierungspuffer für 45min bei 37°C. Die Zellen wurden 3mal mit IF-PBS Puffer gewaschen, danach in H<sub>2</sub>O getaucht und in Mowiol eingedeckelt.

6.2.4 Biochemische Methoden

### 6.2.4.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Diese Methode der Proteinbestimmung hat gegenüber anderen Methoden den Vorteil, dass störende Agenzien wie Imidazol und Triton X-100 durch eine TCA-Fällung entfernt werden.

Lowry A:	7mM	KNa-Tartrat (M=282,22g/mol; 0,2g auf 100ml)
	0,94M	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (M=105,99g/mol; 10g auf 100ml)
	50ml	1N NaOH-Lösung
Lowry B:	7mM	KNa-Tartrat
	40mM	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O (M=249,69g/mol; 1g auf 100ml)
	10ml	1N NaOH -Lösung

Lowry C: Folin-Ciocalteu-Reagenz 1:12,5 mit H<sub>2</sub>O verdünnen (erst kurz vor Zugabe zusetzen)

Als Standard diente eine BSA-Lösung (0,5mg/ml). Dabei kamen 2,5-30µg BSA zum Einsatz. Zu den Proben wurden 20µl 0,1% DOC zugegeben. Die Proben wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100µl aufgefüllt, und es folgte die Zugabe von 100µl einer 20%igen TCA-Lösung. Die Proben wurden für 20min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (16000g<sub>av</sub>, 20min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Eppendorfgefäß zum Trocknen verkehrt herum auf ein Tuch gestellt. Anschließend wurde das Eppendorfgefäß für 10min bei 37°C geschüttelt. Es folgte die Zugabe von 225µl Lowry A sowie 2,25µl einer 20%igen SDS (w/v)-Lösung. Es wurde für 10min bei 50°C unter Schütteln inkubiert, bis sich

das Pellet gelöst hat. Die Proben wurden auf RT abgekühlt und 25µl Lowry B zugeben. Der Ansatz wurde erneut für 15min bei RT unter Schütteln inkubiert und schließlich 750µl Lowry C zugeben. Die Proben wurden direkt nach Zugabe von Lowry C gevortext und anschließend für 10min bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf RT (etwa 20min) erfolgte die Messung der Absorption bei 620nm.

#### 6.2.4.2 Isolierung von Detergens resistenten Membranbereichen (DRMs)

<b>TXNE-Puffer:</b>	50mM	Tris/HCl (pH 7,4)
	150mM	NaCl
	5mM	EDTA
	1mM	DTT
	1%	Triton X-100

Zellen von zwei 10cm-Schalen (ca.  $10^7$  Zellen) wurden in PBS (je 800µl) mittels Zellschaber abgelöst und pelletiert (16000g<sub>av</sub>, 10min, 4°C). Die Zellpellets wurden vereinigt, sofort in 350µl TXNE-Lysepuffer resuspendiert und anschließend für 15min auf Eis inkubiert. 300µl davon wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 600µl Optiprep (60%) versetzt, durch auf- und abpipettieren gemischt und schließlich in ein SW60 Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurde mit 2,5ml 28% Optiprep in TXNE-Puffer und 0,6ml TXNE-Puffer überschichtet und anschließend bei 35000rpm, bei 4°C für 3h zentrifugiert (SW60-Rotor). Es wurden von oben je 500µl Fraktionen gezapft. Die Detektion der Raft-Fraktionen erfolgte über SDS-PAGE und WB mit einem Antikörper gegen Flotillin.



6.2.4.3 Herstellung von Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin-komplexiertem [<sup>3</sup>H]-photo-Cholesterin

Abb. 34: [3H]-photo-Cholesterin MβCD Komplex.

Zu 700µl einer 1% (w/v) Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD) Lösung in H<sub>2</sub>O wurden 200µl einer ethanolischen Lösung von [<sup>3</sup>H]-photo-Cholesterin (8,2µCi/µl, 82nmol, spez. Aktivität 20Ci/mmol) gegeben. Die Lösung wurde für 10min bei 40°C im Ultraschallbad inkubiert und anschließend zentrifugiert (16000g<sub>av</sub>, 15min, RT). Der Überstand wurde abgenommen und in der Speed-Vac getrocknet. Der Rückstand wurde in 400µl PBS aufgenommen und bei –20°C gelagert. Die Endkonzentration betrug etwa 4µCi/µl. M $\beta$ CD-komplexiertes [<sup>3</sup>H]-photo-Cholesterin wurde bei –20°C gelagert.

#### 6.2.4.4 Herstellung einer chemisch (Tmd)Phe-aminoacylierten Amber-Suppressor-tRNA

Das Dinukleotid pdCpA wurde mit der photolabilen AS (Tmd)Phe acyliert. Das resultierende Aminoacyl-pdCpA kann dann enzymatisch mit der tRNA(-CA), deren 3'- terminales Ende fehlt, ligiert werden. Die Ligationsreaktion von (Tmd)Phe-pdCpA mit der Amber-Suppressor-tRNA(-CA) wurde bei pH 7,5 durchgeführt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz sofort mit Natriumacetat auf pH 4,5 eingestellt. Proteinkomponenten wurden durch saure Phenolextraktion entfernt. Die tRNA wurde anschließend präzipitiert und in Kaliumacetat Puffer (pH 4,5) aufgenommen.



Abb. 35: Auftrennung von Amber-Suppressor-tRNA(-CA) und Amber-Suppressor-(Tmd)Phe-tRNA durch ein Harnstoff-Polyacrylamidgel. Amber-Suppressor-tRNA(-CA) und Ligationsprodukt wurden in tRNA Probenpuffer aufgenommen, in einem denaturierten Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend photographiert. Spur 1: Amber-Suppressor-tRNA(-CA) Spur 2: Ligationsprodukt

Das Ligationsprodukt wurde mittels eines denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgels analysiert. Die Trennung von Amber-Suppressor-tRNA(-CA) und Amber-Suppressor-(Tmd)Phe-tRNA ist in **Abb. 35** dargestellt. Die Ligationseffizienz betrug fast 100%.

6.2.4.5 Phospholipase A2 Verdau

PLA<sub>2</sub>-Puffer

Tris/HCl, pH 7,4	100mM
CaCl <sub>2</sub>	5mM
Triton X-100	1% (v/v)

25µl der *in vitro* translatierten Proben wurden pelletiert und mit 100µl PLA<sub>2</sub>-Puffer gemischt. Anschließend wurden die Ansätze bei 41°C für 2min mit 2U PLA<sub>2</sub> verdaut, TCA präzipitiert und über SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

6.2.5 Zellbiologische Methoden

#### 6.2.5.1 Kultur von Zellen

Die unter Abschnitt 6.1.10 genannten Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Heraeus-Brutschrank kultiviert. Hatten die Zellen eine Konfluenz

von 90-100% erreicht, so wurden sie vereinzelt. Hierzu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 2ml 1xTrypsin/EDTA-Lösung gewaschen und anschließend mit 1,5ml 1x Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale abgelöst hatten. Die abgelösten Zellen wurden in 9ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Es wurden 0,2ml bis 1ml der Zellsuspension in eine neue Zellkulturschale gegeben, in die kurz zuvor 12ml frisches Nährmedium gegeben worden war. Dies entspricht ungefähr einer Verdünnung von 1:50 bzw. 1:10. Anschließend wurden die Zellen erneut bei den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert.

Für die photochemische Markierung von Zellen mit photoaktivierbaren Lipidvorläufern wurden delipidierte Medien verwendet.

### 6.2.5.2 Transfektion von COS7-Zellen (Invitrogen, Lipofectin Manual)

In zwei getrennten Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden 20µg cDNA bzw. 100µl Lipofectin-Lösung (1mg/ml) mit je 1ml FCS und Antibiotika-freiem Opti-MEM-Medium versetzt und 30-45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Lösungen vereinigt und das Gemisch für 15min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die zu einer Konfluenz von 60-80% gewachsenen Zellen 3-mal mit serumfreiem Medium (DMEM) gewaschen, um restliches FCS zu entfernen. Die Lipofectin/Plasmid-Lösung wurde mit 8ml serumfreiem Medium (DMEM) versetzt und auf die zu transfizierenden Zellen gegeben. Nach 5-stündiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium entfernt und gegen Wachstums-Medium (mit Serum, ohne Antibiotika) ersetzt.

#### 6.2.5.3 Transfektion von Vero-Zellen (Elektroporation)

IM Puffer:

K-Glutamat	100mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10mM
EGTA	2mM
MgCl <sub>2</sub>	5mM
HEPES	25mM
CaCl <sub>2</sub>	0,15mM
ATP (frisch dazu)	2mM

Die Elektroporation wurde nach einem Standardprotokoll (Majoul *et al.*) durchgeführt. Vero Zellen auf einer konfluent gewachsenen 10cm Petrischale wurden trypsiniert, 3x mit PBS gewaschen und in 300µl IM-Puffer aufgenommen. Ca. 15µg DNA wurden in eine Elektroporationsküvette vorgelegt, die Zellen zugegeben und durch leichtes "Antippen" mit dem Finger gemischt. Die Elektroporation wurde durch Anlegen einer elektrischen Spannung (600V, 50µF) für 1,8-2,2msec erzielt. Anschließend ruhten die Zellen für 10min bei RT und wurden dann in eine 10cm Petrischale mit Deckgläschen überführt. Typischerweise überlebten 70-80% der Zellen diese Behandlung, die Effizienz der Protein-Expression lag bei etwa 20-60%.

#### 6.2.5.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

#### Lösungen:

Lösung A: 30% (v/v) FCS in DMEM Lösung B: 30% (v/v) FCS, 20% (v/v) DMSO in DMEM

Das Zellkulturmedium der zu einer Konfluenz von 80% gewachsenen Zellen wurden verworfen und die Zellen 1-mal mit 1ml 1xTrypsin/EDTA-Lösung gewaschen und anschließend mit 1,5ml 1xTryspin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale abgelöst hatten. Die abgelösten Zellen wurden in 5ml Zellkulturmedium resuspendiert und in ein 15ml Falcon-Gefäß überführt. Die Zellen wurden für 5min bei 1000rpm, RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellsediment wurde zunächst in 2ml der Einfrierlösung A resuspendiert. Anschließend wurde 2ml der Lösung B hinzugegeben und die Zellsuspension auf zwei Cryoröhrchen verteilt. Die Zellen wurden nun 1h auf Eis, anschließend für 2h bei -20°C und ÜN bei -80°C gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigem Stickstoff (-190°C) aufbewahrt.

Um die eingefrorenen Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Einfrierröhrchen bei 37°C im Wasserbad erwärmt und die Zellsuspension in ein 15ml Falcon-Gefäß überführt. Es wurde 5ml Zellkulturmedium hinzugegeben und 5min bei 1000rpm, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die abzentrifugierten Zellen in 5ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Zellkulturschale, in die zuvor 10ml Zellkulturmedium vorgelegt worden waren, gegeben und die Zellen wie unter 7.4.2 angegeben kultiviert.

### 6.2.5.6 Virusproduktion

Die Virusproduktion wurde in HEK-293T Zellen als "Verpackungszelllinie" nach dem Standardprotokoll des "Transfection MBS Mammalian Transfection Kit" und den Vektoren pVPack-GP, pVPack-Eco und pBI-CD2 bzw. einem der drei pRT/C99\*-IRES-eGFP Vektoren durchgeführt.

## 6.2.5.7 Transduktion

N2a Wildtyp Zellen wurden transduziert mit retroviralen Partikeln, die in HEK-293T Zellen produziert worden waren, wodurch in einem ersten Schritt ein bicistronisches Konstrukt aus dem Dox-sensitiven Transaktivator rtTA2-M2 und einer verkürzten Version von CD2 (Liu et al., 2000) unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors ins N2a Genom integriert wurde. Nach 3d wurden 50.000 CD2-positive Zellen durch FACS Sortierung mit einem monoklonalen anti-CD2 Antikörper aus Maus und einem sekundären Alexa488 gekoppelten Antikörper gegen Maus IgG isoliert. Dieser Zellpool wurde N2a<sub>Tam2/CD2</sub> genannt. Nach 9d Inkubation bei 37°C wurden N2a<sub>Tam2/CD2</sub> Zellen einer zweiten Transduktion mit retroviralen Partikeln unterzogen, die ein weiteres bicistronisches Konstrukt, bestehend aus C99 Wildtyp, London oder Florida und eGFP unter einem Dox-Transaktivator regulierten Promotor ins N2a<sub>Tam2/CD2</sub> Genom inserierten. 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub>d nach der retroviralen Transduktion wurden die Zellen für 18h mit 1µg/ml Dox induziert. 50.000 Zellen von jeder C99 Variante wurden auf Grundlage ihrer eGFP vermittelten Fluoreszenz durch FACS Sortierung isoliert. Die drei Zellpools wurden für weitere 9d bei 37°C in Abwesenheit von Dox inkubiert und je 50.000 Zellen isoliert, die keine eGFP-Fluoreszenz aufwiesen. In einer dritten Sortierungsrunde wurde nach weiteren 9d Inkubation und 18h Induktion mit Dox anhand der eGFP-Fluoreszenz je ein weiterer Zellpool durch FACS Sortierung isoliert. Diese 3-fach sortierten Zellen wurden wiederum für 9d inkubiert, 18h induziert und anhand der eGFP-Fluoreszenz je 48 Einzelklone sortiert. 30 Einzelklone pro Zelllinie wurden mit und ohne Induktion durch FACS-Analyse analysiert. Die am stärksten schaltbaren Zellklone wurden in Kultur genommen und mehrere Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die drei Klone wurden als N2a<sub>SP-C99\*wt</sub> (C99wt), N2a<sub>SP-C99\*L</sub> (C99L) und N2a<sub>SP-C99\*F</sub> (C99F) bezeichnet.

6.2.5.8 FACS-Sortierungen

Sorting Medium:

DMEM-Medium	
Cell Dissociation Buffer	5%
FKS	0,2%

2d vor FACS-Analyse oder -Sortierung wurden N2a Zellen 1:5 verdünnt und auf zwei 10cm Petrischalen umgesetzt. 18h vor der FACS-Sortierung wurde eine der beiden Schalen mit 1µg/ml Dox induziert.

Vor der FACS Analyse wurden Zellen kurz mit PBS gewaschen, 1ml "Cell Dissociation Buffer" zugegeben und für 10-20min bei 37°C inkubiert. Dabei lösen sich die Zellen von der Schale. Die Zellen wurden resuspendiert, in Eppendorf Tubes überführt und bei 200g<sub>av</sub> für 2min bei 4°C sedimentiert. Alle folgenden Sedimentationen wurden unter diesen Bedingungen durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen.

N2a, die mit dem bicistronischen Konstrukt rtTA2-M2-IRES-CD2 transduziert worden waren, wurden wie folgt mit Antikörpern gefärbt. Die Zellen wurden 1h bei 4°C mit einem polyklonalen anti-CD2 Antikörper aus Ratte (1:100) in 300µl Vollmedium auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen sedimentiert und mit 300µl Vollmedium gewaschen. Darauf folgte eine Inkubation mit Alexa488 gekoppeltem anti-Maus Antikörper (1:500) in 300µl Vollmedium für 30min bei 4°C ebenfalls im Über-Kopf-Schüttler. Die Zellen wurden sedimentiert, mit 300µl Vollmedium gewaschen und in 500µl Sorting-Medium resuspendiert. Danach wurden 0,5µl Propidium-Iodid zugegeben, um tote Zellen zu markieren. Die Probe wurde durch ein "Cell strainer cap" in ein FACS-Röhrchen überführt, um Zellklumpen zu vermeiden und gemessen.

6.2.5.9 Photochemische in vivo Markierung von N2a Zellen mit Lipidvorläufern

Lyse-Puffer:	20mM	Hepes/KOH pH 7.4
	100mM	NaCl
	5mM	EDTA
	1%	Triton X-100
	0,5%	Natrium Desoxycholat
	Protein Inhibitor Cocktail Tablette (PIC)	

Photoaffinitätsmarkierungen erfolgten, sofern nicht anders angegeben, in 10cm-Petrischalen. Alle Lipid-Markierungen erfolgten in einem lipidfreien Medium.

Das Medium wurde vorgelegt und 10-azi-Stearinsäure oder 14-azi-Sphingosin zur Markierung zugegeben. Nach Waschen der Zellen mit 10ml PBS erfolgte die Zugabe von 10ml Medium. Die Markierung mit dem Sphingosinderivat wurde für 6h durchgeführt, da längere Inkubationszeiten von den Zellen nicht toleriert wurden. Mit 10-azi-Stearinsäure wurde zwischen 3h und 18h markiert, wobei bei Markierungszeiten über 9h die "Crosslink"-Produkte nicht mehr als scharfe Banden liefen.

Nach der Markierung wurden die Schalen auf Eis überführt. Alle folgenden Schritte erfolgten bei 4°C: Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit je 5ml PBS gewaschen und anschließend mit 5ml PBS überschichtet. Wenn angegeben, wurde die Schale für 10min mit UV-Licht bestrahlt. Dabei betrug der Abstand der UV-Lampe zur Schale 10cm. Nach Bestrahlung wurde das PBS entfernt, die Zellen in 800µl PBS mittels Zellschaber geerntet und pelletiert (16000g<sub>av</sub>, 5min, 4°C). Die Zelllyse erfolgte in 100µl Lyse-Puffer (mit Protease Inhibitor Cocktail) bei 4°C für 1h. Kerne und nicht aufgeschlossene Zellen wurden abgetrennt (3000g<sub>av</sub>, 8min, 4°C), der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei – 20°C aufbewahrt.

6.2.5.10 Photochemische in vivo Markierung von Zellen mit radioaktiven Lipidvorläufern

Lyse-Puffer:	20mM	Hepes/KOH pH 7.4
	100mM	NaCl
	5mM	EDTA
	1%	Triton X-100
	0,5%	Natrium Desoxycholat
	Protein Inhibitor Cocktail Tablette (PIC	
Lyse-Puffer II:	50mM	Tris pH7,6
	150mM	NaCl
	1mM	CaCl <sub>2</sub>
	1mM	MgCl <sub>2</sub>
	1% CHAPSO	
	PIC	

Photoaffinitätsmarkierungen erfolgten, sofern nicht anders angegeben, in 10cm-Petrischalen. Alle Lipid-Markierungen erfolgten in einem lipidfreien Medium. Im Fall von [<sup>3</sup>H]-Cholin-Markierungen wurde, sofern nicht anders angegeben, ein Lipid- und Cholindefizientes Medium verwendet.

Für Photoaffinitätsmarkierung kamen 200µCi des jeweiligen Lipidvorläufers zum Einsatz. Das Lösungsmittel ethanolischer [<sup>3</sup>H]-Cholin- sowie [<sup>3</sup>H]-photoSphingosin-Lösung wurde einen Tag zuvor in der SpeedVac entfernt, der Rückstand in absolutem Ethanol aufgenommen und bei -20°C gelagert (200µCi/50µl Ethanol). Das Medium wurde vorgelegt und die zur Markierung verwendeten Lipidvorstufen zugegeben (10-ASA/[<sup>3</sup>H]-Cholin, MβCDkomplexiertes [<sup>3</sup>H]- photoCholesterin bzw. [<sup>3</sup>H]-photoSphingosin). Nach Waschen der Zellen mit 10ml PBS erfolgte die Zugabe von 10ml Medium. Die Endkonzentration von Ethanol im Medium betrug 0,5%. Die Dauer der Markierung erfolgte wie im einzelnen angegeben.

Nach der Markierung wurden die Schalen auf Eis überführt. Alle folgenden Schritte erfolgten bei 4°C: Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit je 10ml PBS gewaschen und anschließend mit 5ml PBS überschichtet. Wenn angegeben, wurde die Schale für 15min mit UV-Licht bestrahlt. Der Abstand der UV-Lampe zur Schale betrug 10cm. Dabei wurde die Schale auf einen mit H<sub>2</sub>O benetzten Metallblock im Eisbad positioniert. Nach der Bestrahlung wurde das PBS entfernt, die Zellen in 800µl PBS mittels Zellschaber geerntet und pelletiert (16000g<sub>av</sub>, 5min, 4°C). Die Zelllyse erfolgte in 100µl oder 200µl Lyse-Puffer (mit Protease Inhibitor Cocktail) bei 4°C für 1h. Kerne und nicht aufgeschlossene Zellen wurden abgetrennt (3000g<sub>av</sub>, 8min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C aufbewahrt.

Für SH-SY5Y Markierungen wurden, wegen des langsameren Metabolismus der Zelllinie, die Ansätze jeweils verdoppelt. Demnach wurden 15cm-Petrischalen, 20ml Medium und 400 $\mu$ Ci Radioaktivität pro Markierung eingesetzt. Auch die Lyse und die Waschschritte wurden mit doppelten Volumina durchgeführt, die Inkubationszeiten blieben aber gleich. Um den  $\gamma$ -Sekretase Komplex zu dissoziieren wurde Standard-Lysepuffer verwendet, für nichtdissoziative Bedingungen fand der Lyse-Puffer II (1% CHAPSO) Anwendung.

# 7 LITERATURVERZEICHNIS

Abad-Rodriguez, J., Ledesma, M. D., Craessaerts, K., Perga, S., Medina, M., Delacourte, A., Dingwall, C., De Strooper, B. and Dotti, C. G. (2004). "Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation." J Cell Biol **167**(5): 953-60.

Abrami, L., Fivaz, M., Kobayashi, T., Kinoshita, T., Parton, R. G. and van der Goot, F. G. (2001). "Cross-talk between caveolae and glycosylphosphatidylinositol-rich domains." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **276**(33): 30729-36.

Aguzzi, A. and Haass, C. (2003). "Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease." <u>Science</u> **302**(5646): 814-8.

Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J. and Hooper, N. M. (2003). "ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases." J Neurosci Res 74(3): 342-52.

Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." <u>Allg Z Psychiatrie</u> <u>Psychisch-Gerichtl Med</u> **64**: 146-148.

Anderson, J. P., Esch, F. S., Keim, P. S., Sambamurti, K., Lieberburg, I. and Robakis, N. K. (1991). "Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells." <u>Neurosci Lett</u> **128**(1): 126-8.

Anderson, R. G. and Jacobson, K. (2002). "A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains." <u>Science</u> **296**(5574): 1821-5.

Annaert, W. G. and De Strooper, B. (2002). "A cell biological perspective on Alzheimer's disease." <u>Annu Rev Cell Dev Biol</u> **18**: 25-51.

Annaert, W. G., Esselens, C., Baert, V., Boeve, C., Snellings, G., Cupers, P., Craessaerts, K. and De Strooper, B. (2001). "Interaction with telencephalin and the amyloid precursor protein predicts a ring structure for presenilins." <u>Neuron</u> **32**(4): 579-89.

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). "Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons." J Cell Biol 147(2): 277-94.

Araki, Y., Miyagi, N., Kato, N., Yoshida, T., Wada, S., Nishimura, M., Komano, H., Yamamoto, T., De Strooper, B., Yamamoto, K. and Suzuki, T. (2004). "Coordinated metabolism of Alcadein and amyloid beta-protein precursor regulates FE65-dependent gene transactivation." J Biol Chem **279**(23): 24343-54.

Ariga, T., Kobayashi, K., Hasegawa, A., Kiso, M., Ishida, H. and Miyatake, T. (2001). "Characterization of high-affinity binding between gangliosides and amyloid beta-protein." <u>Arch Biochem Biophys</u> **388**(2): 225-30. Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. and Simons, K. (2000). "Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast." <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci U S A</u> **97**(7): 3254-9.

Barnham, K. J., McKinstry, W. J., Multhaup, G., Galatis, D., Morton, C. J., Curtain, C. C., Williamson, N. A., White, A. R., Hinds, M. G., Norton, R. S., Beyreuther, K., Masters, C. L., Parker, M. W. and Cappai, R. (2003). "Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. A regulator of neuronal copper homeostasis." J Biol Chem **278**(19): 17401-7.

Baulac, S., LaVoie, M. J., Kimberly, W. T., Strahle, J., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J. and Xia, W. (2003). "Functional gamma-secretase complex assembly in Golgi/trans-Golgi network: interactions among presenilin, nicastrin, Aph1, Pen-2, and gamma-secretase substrates." <u>Neurobiol Dis</u> **14**(2): 194-204.

Bell, K. F., Zheng, L., Fahrenholz, F. and Cuello, A. C. (2006). "ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis." <u>Neurobiol Aging</u>.

Benjannet, S., Elagoz, A., Wickham, L., Mamarbachi, M., Munzer, J. S., Basak, A., Lazure, C., Cromlish, J. A., Sisodia, S., Checler, F., Chretien, M. and Seidah, N. G. (2001). "Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production." J Biol Chem **276**(14): 10879-87.

Bennett, B. D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D. B., Kahn, S., Louis, J. C., Citron, M. and Vassar, R. (2000). "A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase." J Biol Chem **275**(48): 37712-7.

Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horre, K., Wiltfang, J., Esselmann, H. and De Strooper, B. (2006). "Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms." J Neurochem **96**(3): 732-42.

Bjorkhem, I., Lutjohann, D., Diczfalusy, U., Stahle, L., Ahlborg, G. and Wahren, J. (1998). "Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation." J Lipid Res **39**(8): 1594-600.

Blacker, M., Noe, M. C., Carty, T. J., Goodyer, C. G. and LeBlanc, A. C. (2002). "Effect of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) and metalloprotease inhibitor on amyloid precursor protein metabolism in human neurons." J Neurochem **83**(6): 1349-57.

Bodovitz, S. and Klein, W. L. (1996). "Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein." J Biol Chem **271**(8): 4436-40.

Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C. M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H. H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A. I., Gandy, S. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L., Younkin, S. G. and Sisodia, S. S. (1996). "Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo." <u>Neuron</u> **17**(5): 1005-13.

Borg, J. P., Ooi, J., Levy, E. and Margolis, B. (1996). "The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein." <u>Mol Cell Biol</u> **16**(11): 6229-41.

Botelho, M. G., Gralle, M., Oliveira, C. L., Torriani, I. and Ferreira, S. T. (2003). "Folding and stability of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **278**(36): 34259-67.

Bouillot, C., Prochiantz, A., Rougon, G. and Allinquant, B. (1996). "Axonal amyloid precursor protein expressed by neurons in vitro is present in a membrane fraction with caveolae-like properties." J Biol Chem **271**(13): 7640-4.

Braak, H., Del Tredici, K., Schultz, C. and Braak, E. (2000). "Vulnerability of select neuronal types to Alzheimer's disease." <u>Ann N Y Acad Sci</u> 924: 53-61.

Brown, D. A. and London, E. (1998). "Functions of lipid rafts in biological membranes." <u>Annu Rev Cell Dev Biol</u> 14: 111-36.

Brown, D. A. and Rose, J. K. (1992). "Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipidenriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface." <u>Cell</u> **68**(3): 533-44.

Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B. and Goldstein, J. L. (2000). "Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans." <u>Cell</u> **100**(4): 391-8.

Burns, M., Gaynor, K., Olm, V., Mercken, M., LaFrancois, J., Wang, L., Mathews, P. M., Noble, W., Matsuoka, Y. and Duff, K. (2003). "Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances beta-amyloid production in vivo." <u>J Neurosci</u> 23(13): 5645-9.

Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P. and Black, R. A. (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." J Biol Chem 273(43): 27765-7.

Capell, A., Beher, D., Prokop, S., Steiner, H., Kaether, C., Shearman, M. S. and Haass, C. (2005). "Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **280**(8): 6471-8.

Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D. J. and Haass, C. (1998). "The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex." J Biol Chem **273**(6): 3205-11.

Capell, A., Meyn, L., Fluhrer, R., Teplow, D. B., Walter, J. and Haass, C. (2002). "Apical sorting of beta-secretase limits amyloid beta-peptide production." <u>J Biol Chem</u> **277**(7): 5637-43.

Caporaso, G. L., Takei, K., Gandy, S. E., Matteoli, M., Mundigl, O., Greengard, P. and De Camilli, P. (1994). "Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein." J Neurosci 14(5 Pt 2): 3122-38.

Chamberlain, L. H. (2004). "Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts." <u>FEBS Lett</u> **559**(1-3): 1-5.

Chauhan, N. B. (2003). "Membrane dynamics, cholesterol homeostasis, and Alzheimer's disease." J Lipid Res 44(11): 2019-29.

Cheng, P. C., Cherukuri, A., Dykstra, M., Malapati, S., Sproul, T., Chen, M. R. and Pierce, S. K. (2001). "Floating the raft hypothesis: the roles of lipid rafts in B cell antigen receptor function." <u>Semin Immunol</u> **13**(2): 107-14.

Chung, H. M. and Struhl, G. (2001). "Nicastrin is required for Presenilin-mediated transmembrane cleavage in Drosophila." <u>Nat Cell Biol</u> **3**(12): 1129-32.

Chyung, J. H., Raper, D. M. and Selkoe, D. J. (2005). "Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage." J Biol Chem **280**(6): 4383-92.

Creemers, J. W., Ines Dominguez, D., Plets, E., Serneels, L., Taylor, N. A., Multhaup, G., Craessaerts, K., Annaert, W. and De Strooper, B. (2001). "Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family." J Biol Chem **276**(6): 4211-7.

Cruts, M., Dermaut, B., Rademakers, R., Roks, G., Van den Broeck, M., Munteanu, G., van Duijn, C. M. and Van Broeckhoven, C. (2001). "Amyloid beta secretase gene (BACE) is neither mutated in nor associated with early-onset Alzheimer's disease." <u>Neurosci Lett</u> **313**(1-2): 105-7.

Cummings, B. J. and Cotman, C. W. (1995). "Image analysis of beta-amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity." <u>Lancet</u> **346**(8989): 1524-8.

Cupers, P., Bentahir, M., Craessaerts, K., Orlans, I., Vanderstichele, H., Saftig, P., De Strooper, B. and Annaert, W. (2001). "The discrepancy between presenilin subcellular localization and gamma-secretase processing of amyloid precursor protein." J Cell Biol **154**(4): 731-40.

Daigle, I. and Li, C. (1993). "apl-1, a Caenorhabditis elegans gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **90**(24): 12045-9.

Davey, R. A., Hamson, C. A., Healey, J. J. and Cunningham, J. M. (1997). "In vitro binding of purified murine ecotropic retrovirus envelope surface protein to its receptor, MCAT-1."  $\underline{J}$  <u>Virol</u> **71**(11): 8096-102.

De Strooper, B. (2003). "Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex." <u>Neuron</u> **38**(1): 9-12.

De Strooper, B. and Annaert, W. (2000). "Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein." <u>J Cell Sci</u> **113** (**Pt 11**): 1857-70.

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). "Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins." J Biol Chem 272(6): 3590-8.

De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K. and Van Leuven, F. (1998). "Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein." <u>Nature</u> **391**(6665): 387-90.

Dickson, D. W. (1997). "The pathogenesis of senile plaques." <u>J Neuropathol Exp Neurol</u> **56**(4): 321-39.

Dietschy, J. M. and Turley, S. D. (2001). "Cholesterol metabolism in the brain." <u>Curr Opin</u> <u>Lipidol</u> **12**(2): 105-12.

Divry, P. and Florkin, M. (1927). "Sur les propriétés optiques de l'amyloide." <u>C R Soc Biol</u> (Paris) **97**: 1808-1810.

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). "Protein topology of presenilin 1." <u>Neuron</u> **17**(5): 1023-30.

Donoviel, D. B., Hadjantonakis, A. K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P. S. and Bernstein, A. (1999). "Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects." <u>Genes Dev</u> **13**(21): 2801-10.

Dyrks, T., Dyrks, E., Monning, U., Urmoneit, B., Turner, J. and Beyreuther, K. (1993). "Generation of beta A4 from the amyloid protein precursor and fragments thereof." <u>FEBS</u> <u>Lett</u> **335**(1): 89-93.

Eckman, C. B., Mehta, N. D., Crook, R., Perez-tur, J., Prihar, G., Pfeiffer, E., Graff-Radford, N., Hinder, P., Yager, D., Zenk, B., Refolo, L. M., Prada, C. M., Younkin, S. G., Hutton, M. and Hardy, J. (1997). "A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43)." <u>Hum Mol Genet</u> **6**(12): 2087-9.

Edbauer, D., Winkler, E., Haass, C. and Steiner, H. (2002). "Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **99**(13): 8666-71.

Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H. and Haass, C. (2003). "Reconstitution of gamma-secretase activity." <u>Nat Cell Biol</u> **5**(5): 486-8.

Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. and Simons, K. (2003). "Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts." <u>J Cell</u> <u>Biol</u> **160**(1): 113-23.

Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D. and Ward, P. J. (1990). "Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor." <u>Science</u> **248**(4959): 1122-4.

Esselens, C., Oorschot, V., Baert, V., Raemaekers, T., Spittaels, K., Serneels, L., Zheng, H., Saftig, P., De Strooper, B., Klumperman, J. and Annaert, W. (2004). "Presenilin 1 mediates the turnover of telencephalin in hippocampal neurons via an autophagic degradative pathway." J Cell Biol **166**(7): 1041-54.

Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., Myers, R. H., Pericak-Vance, M. A., Risch, N. and van Duijn, C. M. (1997). "Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium." Jama 278(16): 1349-56.

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). "Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **98**(10): 5856-61.

Fielding, C. J. and Fielding, P. E. (1997). "Intracellular cholesterol transport." <u>J Lipid Res</u> **38**(8): 1503-21.

Fiore, F., Zambrano, N., Minopoli, G., Donini, V., Duilio, A. and Russo, T. (1995). "The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein." J Biol Chem **270**(52): 30853-6.

Fivaz, M., Abrami, L. and van der Goot, F. G. (1999). "Landing on lipid rafts." <u>Trends Cell</u> <u>Biol</u> **9**(6): 212-3.

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). "aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation." <u>Dev Cell</u> **3**(1): 85-97.

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). "Presenilin structure, function and role in Alzheimer disease." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1502**(1): 1-15.

Frears, E. R., Stephens, D. J., Walters, C. E., Davies, H. and Austen, B. M. (1999). "The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid." <u>Neuroreport</u> **10**(8): 1699-705.

Fukuyama, R., Mizuno, T., Mori, S., Nakajima, K., Fushiki, S. and Yanagisawa, K. (2000). "Age-dependent change in the levels of Abeta40 and Abeta42 in cerebrospinal fluid from control subjects, and a decrease in the ratio of Abeta42 to Abeta40 level in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients." <u>Eur Neurol</u> **43**(3): 155-60.

Glenner, G. G. and Wong, C. W. (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." <u>Biochem</u> <u>Biophys Res Commun</u> **120**(3): 885-90.

Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." <u>Cell **23**(1)</u>: 175-82.

Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L. and et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." <u>Nature</u> **349**(6311): 704-6.

Golde, T. E. (2003). "Alzheimer disease therapy: can the amyloid cascade be halted?" <u>J Clin</u> <u>Invest</u> **111**(1): 11-8.

Goo, J. H. and Park, W. J. (2004). "Elucidation of the interactions between C99, presenilin, and nicastrin by the split-ubiquitin assay." <u>DNA Cell Biol</u> **23**(1): 59-65.

Gottlieb, C., Baenziger, J. and Kornfeld, S. (1975). "Deficient uridine diphosphate-N-acetylglucosamine:glycoprotein N-acetylglucosaminyltransferase activity in a clone of Chinese hamster ovary cells with altered surface glycoproteins." J Biol Chem **250**(9): 3303-9.

Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V. A. and Priess, J. R. (2002). "APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in Caenorhabditis elegans embryos." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **99**(2): 775-9.

Grimm, M. O., Grimm, H. S., Patzold, A. J., Zinser, E. G., Halonen, R., Duering, M., Tschape, J. A., De Strooper, B., Muller, U., Shen, J. and Hartmann, T. (2005). "Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin." <u>Nat Cell Biol</u> 7(11): 1118-23.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S. and Wisniewski, H. M. (1986). "Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments." J Biol Chem **261**(13): 6084-9.

Grziwa, B., Grimm, M. O., Masters, C. L., Beyreuther, K., Hartmann, T. and Lichtenthaler, S. F. (2003). "The transmembrane domain of the amyloid precursor protein in microsomal membranes is on both sides shorter than predicted." J Biol Chem **278**(9): 6803-8.

Gu, Y., Chen, F., Sanjo, N., Kawarai, T., Hasegawa, H., Duthie, M., Li, W., Ruan, X., Luthra, A., Mount, H. T., Tandon, A., Fraser, P. E. and St George-Hyslop, P. (2003). "APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes." J Biol Chem **278**(9): 7374-80.

Gu, Y., Sanjo, N., Chen, F., Hasegawa, H., Petit, A., Ruan, X., Li, W., Shier, C., Kawarai, T., Schmitt-Ulms, G., Westaway, D., St George-Hyslop, P. and Fraser, P. E. (2004). "The presenilin proteins are components of multiple membrane-bound complexes that have different biological activities." J Biol Chem **279**(30): 31329-36.

Gunawardena, S. and Goldstein, L. S. (2001). "Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in Drosophila." <u>Neuron</u> **32**(3): 389-401.

Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B. and Selkoe, D. J. (1993). "beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **268**(5): 3021-4.

Haass, C., Koo, E. H., Mellon, A., Hung, A. Y. and Selkoe, D. J. (1992a). "Targeting of cellsurface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloidbearing fragments." <u>Nature</u> **357**(6378): 500-3.

Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L. and Selkoe, D. J. (1995). "The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway." <u>Nat Med</u> **1**(12): 1291-6.

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. (1992b). "Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism." <u>Nature</u> **359**(6393): 322-5.

Haass, C. and Steiner, H. (2002). "Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases." <u>Trends Cell Biol</u> **12**(12): 556-62.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." <u>J Mol</u> <u>Biol</u> **166**(4): 557-80.

Hardy, J. (1997). "The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis?" Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2095-7.

He, X., Cooley, K., Chung, C. H., Dashti, N. and Tang, J. (2007). "Apolipoprotein receptor 2 and X11 alpha/beta mediate apolipoprotein E-induced endocytosis of amyloid-beta precursor protein and beta-secretase, leading to amyloid-beta production." J Neurosci 27(15): 4052-60.

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). "Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 96(21): 11872-7.

Higaki, J., Quon, D., Zhong, Z. and Cordell, B. (1995). "Inhibition of beta-amyloid formation identifies proteolytic precursors and subcellular site of catabolism." <u>Neuron</u> 14(3): 651-9.

Hung, A. Y. and Selkoe, D. J. (1994). "Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein." <u>Embo J</u> **13**(3): 534-42.

Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M. and Doms, R. W. (2000). "Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase." J Biol Chem **275**(43): 33729-37.

Hussain, I., Christie, G., Schneider, K., Moore, S. and Dingwall, C. (2001). "Prodomain processing of Asp1 (BACE2) is autocatalytic." J Biol Chem **276**(26): 23322-8.

Hussain, I., Powell, D., Howlett, D. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., Gloger, I. S., Murphy, K. E., Southan, C. D., Ryan, D. M., Smith, T. S., Simmons, D. L., Walsh, F. S., Dingwall, C. and Christie, G. (1999). "Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase." <u>Mol Cell Neurosci</u> 14(6): 419-27.

Hutter-Paier, B., Huttunen, H. J., Puglielli, L., Eckman, C. B., Kim, D. Y., Hofmeister, A., Moir, R. D., Domnitz, S. B., Frosch, M. P., Windisch, M. and Kovacs, D. M. (2004). "The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease." <u>Neuron</u> 44(2): 227-38.

Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schroder, J., Zerfass, R., Forstl, H., Sandbrink, R., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1996). "Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay." J Biol Chem 271(37): 22908-14.

Ikonen, E. and Parton, R. G. (2000). "Caveolins and cellular cholesterol balance." <u>Traffic</u> 1(3): 212-7.

Iwatsubo, T. (2004). "The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis." <u>Curr Opin Neurobiol</u> **14**(3): 379-83.

Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N. and Ihara, Y. (1994). "Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)." <u>Neuron</u> **13**(1): 45-53.

Janes, P. W., Ley, S. C., Magee, A. I. and Kabouridis, P. S. (2000). "The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling." <u>Semin Immunol</u> **12**(1): 23-34.

Jarrett, J. T., Berger, E. P. and Lansbury, P. T., Jr. (1993a). "The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis." <u>Ann N Y Acad Sci</u> **695**: 144-8.

Jarrett, J. T., Berger, E. P. and Lansbury, P. T., Jr. (1993b). "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." <u>Biochemistry</u> **32**(18): 4693-7.

Kabara, J. J. (1973). "A critical review of brain cholesterol metabolism." <u>Prog Brain Res</u> **40**(0): 363-82.

Kaether, C. and Haass, C. (2004). "A lipid boundary separates APP and secretases and limits amyloid beta-peptide generation." <u>J Cell Biol</u> **167**(5): 809-12.

Kaether, C., Schmitt, S., Willem, M. and Haass, C. (2006). "Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated after transport of their precursors to the cell surface." <u>Traffic</u> 7(4): 408-15.

Kakio, A., Nishimoto, S. I., Yanagisawa, K., Kozutsumi, Y. and Matsuzaki, K. (2001). "Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid." J Biol Chem **276**(27): 24985-90.

Kalvodova, L., Kahya, N., Schwille, P., Ehehalt, R., Verkade, P., Drechsel, D. and Simons, K. (2005). "Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro." J Biol Chem **280**(44): 36815-23.

Kamal, A., Almenar-Queralt, A., LeBlanc, J. F., Roberts, E. A. and Goldstein, L. S. (2001). "Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP." <u>Nature</u> **414**(6864): 643-8.

Kasahara, K., Watanabe, K., Takeuchi, K., Kaneko, H., Oohira, A., Yamamoto, T. and Sanai, Y. (2000). "Involvement of gangliosides in glycosylphosphatidylinositol-anchored neuronal cell adhesion molecule TAG-1 signaling in lipid rafts." J Biol Chem **275**(44): 34701-9.

Katzman, R. (1986). "Alzheimer's disease." N Engl J Med 314(15): 964-73.

Katzman, R., Hill, L. R., Yu, E. S., Wang, Z. Y., Booth, A., Salmon, D. P., Liu, W. T., Qu, G. Y. and Zhang, M. (1994). "The malignancy of dementia. Predictors of mortality in clinically diagnosed dementia in a population survey of Shanghai, China." <u>Arch Neurol</u> **51**(12): 1220-5.

Kim, T. W., Pettingell, W. H., Hallmark, O. G., Moir, R. D., Wasco, W. and Tanzi, R. E. (1997). "Endoproteolytic cleavage and proteasomal degradation of presenilin 2 in transfected cells." J Biol Chem **272**(17): 11006-10.

Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S. and Selkoe, D. J. (2003). "Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **100**(11): 6382-7.

Kimberly, W. T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M. S. and Selkoe, D. J. (2000). "The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation." J Biol Chem **275**(5): 3173-8.

Kimberly, W. T., Zheng, J. B., Guenette, S. Y. and Selkoe, D. J. (2001). "The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner." J Biol Chem **276**(43): 40288-92.

Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S. and Ito, H. (1988). "Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity." <u>Nature</u> **331**(6156): 530-2.

Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K. and Ishiura, S. (1999). "Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein." <u>Biochem J</u> **343 Pt 2**: 371-5.

Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W. and Fahrenholz, F. (2001). "Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **98**(10): 5815-20.

Kopan, R. and Ilagan, M. X. (2004). "Gamma-secretase: proteasome of the membrane?" <u>Nat</u> <u>Rev Mol Cell Biol</u> **5**(6): 499-504.

Kosik, K. S., Kowall, N. W. and McKee, A. (1989). "Along the way to a neurofibrillary tangle: a look at the structure of tau." <u>Ann Med</u> **21**(2): 109-12.

Kraepelin, E. (1910). <u>Psychiatrie - Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte</u>. Leipzig, Barth: Pages.

Lah, J. J., Heilman, C. J., Nash, N. R., Rees, H. D., Yi, H., Counts, S. E. and Levey, A. I. (1997). "Light and electron microscopic localization of presenilin-1 in primate brain." <u>J</u> <u>Neurosci</u> **17**(6): 1971-80.

Lalowski, M., Golabek, A., Lemere, C. A., Selkoe, D. J., Wisniewski, H. M., Beavis, R. C., Frangione, B. and Wisniewski, T. (1996). "The "nonamyloidogenic" p3 fragment (amyloid beta17-42) is a major constituent of Down's syndrome cerebellar preamyloid." J Biol Chem **271**(52): 33623-31.

Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. and Fahrenholz, F. (1999). "Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **96**(7): 3922-7.

Lang, J., Nishimoto, I., Okamoto, T., Regazzi, R., Kiraly, C., Weller, U. and Wollheim, C. B. (1995). "Direct control of exocytosis by receptor-mediated activation of the heterotrimeric GTPases Gi and G(o) or by the expression of their active G alpha subunits." <u>Embo J</u> 14(15): 3635-44.

Langlet, C., Bernard, A. M., Drevot, P. and He, H. T. (2000). "Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors." <u>Curr Opin Immunol</u> **12**(3): 250-5.

Lassmann, H., Fischer, P. and Jellinger, K. (1993). "Synaptic pathology of Alzheimer's disease." <u>Ann N Y Acad Sci</u> 695: 59-64.

LaVoie, M. J., Fraering, P. C., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Kimberly, W. T., Wolfe, M. S. and Selkoe, D. J. (2003). "Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin." J Biol Chem **278**(39): 37213-22.

Lazarov, O., Lee, M., Peterson, D. A. and Sisodia, S. S. (2002). "Evidence that synaptically released beta-amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice." J Neurosci 22(22): 9785-93.

Lazarov, O., Morfini, G. A., Lee, E. B., Farah, M. H., Szodorai, A., DeBoer, S. R., Koliatsos, V. E., Kins, S., Lee, V. M., Wong, P. C., Price, D. L., Brady, S. T. and Sisodia, S. S. (2005). "Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus: revisited." J Neurosci **25**(9): 2386-95.

Lazarov, V. K., Fraering, P. C., Ye, W., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J. and Li, H. (2006). "Electron microscopic structure of purified, active gamma-secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **103**(18): 6889-94.

Lee, E. B., Skovronsky, D. M., Abtahian, F., Doms, R. W. and Lee, V. M. (2003). "Secretion and intracellular generation of truncated Abeta in beta-site amyloid-beta precursor proteincleaving enzyme expressing human neurons." J Biol Chem **278**(7): 4458-66.

Lee, S. F., Shah, S., Li, H., Yu, C., Han, W. and Yu, G. (2002). "Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch." J Biol Chem 277(47): 45013-9.

Lee, S. J., Liyanage, U., Bickel, P. E., Xia, W., Lansbury, P. T., Jr. and Kosik, K. S. (1998). "A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo." <u>Nat Med</u> 4(6): 730-4.

Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., Yu, C. E., Jondro, P. D., Schmidt, S. D., Wang, K. and et al. (1995). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." <u>Science</u> **269**(5226): 973-7.

Li, X. and Greenwald, I. (1998). "Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for Caenorhabditis elegans and human presenilins." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u>**95**(12): 7109-14.

Lichtenthaler, S. F., Ida, N., Multhaup, G., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1997). "Mutations in the transmembrane domain of APP altering gamma-secretase specificity." <u>Biochemistry</u> **36**(49): 15396-403.

Lichtenthaler, S. F., Wang, R., Grimm, H., Uljon, S. N., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1999). "Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer's disease gamma-secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **96**(6): 3053-8.

Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A. and Tang, J. (2000). "Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> 97(4): 1456-60.

Liu, X., Constantinescu, S. N., Sun, Y., Bogan, J. S., Hirsch, D., Weinberg, R. A. and Lodish, H. F. (2000). "Generation of mammalian cells stably expressing multiple genes at predetermined levels." <u>Anal Biochem</u> **280**(1): 20-8.

Lopez-Perez, E., Zhang, Y., Frank, S. J., Creemers, J., Seidah, N. and Checler, F. (2001). "Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furindeficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10." J Neurochem **76**(5): 1532-9.

Luo, L., Tully, T. and White, K. (1992). "Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for Appl gene." <u>Neuron</u> **9**(4): 595-605.

Luo, W. J., Wang, H., Li, H., Kim, B. S., Shah, S., Lee, H. J., Thinakaran, G., Kim, T. W., Yu, G. and Xu, H. (2003). "PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1." J Biol Chem **278**(10): 7850-4.

Mahfoud, R., Garmy, N., Maresca, M., Yahi, N., Puigserver, A. and Fantini, J. (2002). "Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins." J Biol Chem **277**(13): 11292-6.

Majoul, I., Jia, Y. and Duden, R. <u>Practical fluorescence resonance energy transfer or</u> molecular nanobioscopy of living cells, Spektrum: Pages.

Majoul, I., Straub, M., Hell, S. W., Duden, R. and Soling, H. D. (2001). "KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET." <u>Dev Cell</u> 1(1): 139-53.

Maltese, W. A., Wilson, S., Tan, Y., Suomensaari, S., Sinha, S., Barbour, R. and McConlogue, L. (2001). "Retention of the Alzheimer's amyloid precursor fragment C99 in the endoplasmic reticulum prevents formation of amyloid beta-peptide." J Biol Chem 276(23): 20267-79.

Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (1998). "Tau in Alzheimer's disease." <u>Trends Cell Biol</u> **8**(11): 425-7.

Maruyama, K., Kametani, F., Usami, M., Yamao-Harigaya, W. and Tanaka, K. (1991). ""Secretase," Alzheimer amyloid protein precursor secreting enzyme is not sequencespecific." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **179**(3): 1670-6.

Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L. and Beyreuther, K. (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> **82**(12): 4245-9.

Mattson, M. P. (1997). "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives." <u>Physiol Rev</u> 77(4): 1081-132.

Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." <u>Nature</u> **430**(7000): 631-9.

Maurer, K., Volk, S. and Gerbaldo, H. (1997). "Auguste D and Alzheimer's disease." Lancet **349**(9064): 1546-9.

McLaurin, J. and Chakrabartty, A. (1996). "Membrane disruption by Alzheimer beta-amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides. Implications for neurotoxicity." J Biol Chem **271**(43): 26482-9.

Medina, M. and Dotti, C. G. (2003). "RIPped out by presenilin-dependent gamma-secretase." <u>Cell Signal</u> **15**(9): 829-41.

Merlini, G. and Bellotti, V. (2003). "Molecular mechanisms of amyloidosis." <u>N Engl J Med</u> **349**(6): 583-96.

Mills, J. and Reiner, P. B. (1999). "Regulation of amyloid precursor protein cleavage." J Neurochem 72(2): 443-60.

Mintun, M. A., Larossa, G. N., Sheline, Y. I., Dence, C. S., Lee, S. Y., Mach, R. H., Klunk, W. E., Mathis, C. A., DeKosky, S. T. and Morris, J. C. (2006). "[11C]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease." <u>Neurology</u> **67**(3): 446-52.

Mizuno, T., Nakata, M., Naiki, H., Michikawa, M., Wang, R., Haass, C. and Yanagisawa, K. (1999). "Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid beta-protein in cell culture." J Biol Chem **274**(21): 15110-4.

Morell, P. and Jurevics, H. (1996). "Origin of cholesterol in myelin." <u>Neurochem Res</u> **21**(4): 463-70.

Morishima-Kawashima, M. and Ihara, Y. (1998). "The presence of amyloid beta-protein in the detergent-insoluble membrane compartment of human neuroblastoma cells." <u>Biochemistry</u> **37**(44): 15247-53.

Muller-Hill, B. and Beyreuther, K. (1989). "Molecular biology of Alzheimer's disease." <u>Annu</u> <u>Rev Biochem</u> **58**: 287-307.

Myers, A. J. and Goate, A. M. (2001). "The genetics of late-onset Alzheimer's disease." <u>Curr</u> <u>Opin Neurol</u> **14**(4): 433-40.

Naslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, A. D., Tjernberg, L. O., Silberring, J., Gandy, S. E., Winblad, B., Greengard, P. and et al. (1994). "Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **91**(18): 8378-82.

Nelson, M. and McClelland, M. (1992). "Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes." <u>Methods Enzymol</u> **216**: 279-303.

Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y. and Ogata, E. (1993). "Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o)." <u>Nature</u> **362**(6415): 75-9.

Nitsch, R. M., Deng, M., Growdon, J. H. and Wurtman, R. J. (1996). "Serotonin 5-HT2a and 5-HT2c receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion." J Biol Chem **271**(8): 4188-94.

Nitsch, R. M., Slack, B. E., Wurtman, R. J. and Growdon, J. H. (1992). "Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors." <u>Science</u> **258**(5080): 304-7.

Norstedt, C., Lannfelt, L. and Winblad, B. (1994). "Alzheimer's disease: a molecular perspective." J Intern Med **235**(3): 195-8.

Nyborg, A. C., Ladd, T. B., Zwizinski, C. W., Lah, J. J. and Golde, T. E. (2006). "Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates." <u>Mol Neurodegener</u> 1: 3.

Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E. and Nishimoto, I. (1995). "Liganddependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor." J Biol Chem **270**(9): 4205-8.

Olmsted, J. B., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F. and Rosenbaum, J. (1970). "Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **65**(1): 129-36.

Ott, A., Breteler, M. M., van Harskamp, F., Claus, J. J., van der Cammen, T. J., Grobbee, D. E. and Hofman, A. (1995). "Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study." <u>Bmj</u> **310**(6985): 970-3.

Parkin, E. T., Turner, A. J. and Hooper, N. M. (1999). "Amyloid precursor protein, although partially detergent-insoluble in mouse cerebral cortex, behaves as an atypical lipid raft protein." <u>Biochem J</u> **344 Pt 1**: 23-30.

Peraus, G. C., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1997). "Late compartments of amyloid precursor protein transport in SY5Y cells are involved in beta-amyloid secretion." J Neurosci 17(20): 7714-24.

Perez, R. G., Soriano, S., Hayes, J. D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D. J., Chen, X., Stokin, G. B. and Koo, E. H. (1999). "Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42." J Biol Chem 274(27): 18851-6.

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). "Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue." Neurobiol Dis **3**(4): 325-37.

Ponte, P., Gonzalez-DeWhitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I. and Fuller, F. (1988). "A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors." <u>Nature</u> **331**(6156): 525-7.
Puglielli, L., Ellis, B. C., Saunders, A. J. and Kovacs, D. M. (2003). "Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis." J Biol Chem **278**(22): 19777-83.

Puglielli, L., Konopka, G., Pack-Chung, E., Ingano, L. A., Berezovska, O., Hyman, B. T., Chang, T. Y., Tanzi, R. E. and Kovacs, D. M. (2001). "Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid beta-peptide." <u>Nat Cell Biol</u> **3**(10): 905-12.

Racchi, M., Baetta, R., Salvietti, N., Ianna, P., Franceschini, G., Paoletti, R., Fumagalli, R., Govoni, S., Trabucchi, M. and Soma, M. (1997). "Secretory processing of amyloid precursor protein is inhibited by increase in cellular cholesterol content." <u>Biochem J</u> **322 ( Pt 3)**: 893-8.

Refolo, L. M., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G. S., Sambamurti, K., Duff, K. and Pappolla, M. A. (2000). "Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model." <u>Neurobiol Dis</u> 7(4): 321-31.

Reinhard, C., Hebert, S. S. and De Strooper, B. (2005). "The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function." Embo J **24**(23): 3996-4006.

Rhim, J. S. and Schell, K. (1967). "Cytopathic and plaque assay of rubella virus in a line of African green monkey kiency cells (Vero)." <u>Proc Soc Exp Biol Med</u> **125**(2): 602-6.

Riddell, D. R., Christie, G., Hussain, I. and Dingwall, C. (2001). "Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts." <u>Curr Biol</u> **11**(16): 1288-93.

Rocca, W. A., Hofman, A., Brayne, C., Breteler, M. M., Clarke, M., Copeland, J. R., Dartigues, J. F., Engedal, K., Hagnell, O., Heeren, T. J. and et al. (1991). "Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group." <u>Ann Neurol</u> **30**(3): 381-90.

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). "Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene." <u>Nature</u> **376**(6543): 775-8.

Roghani, M., Becherer, J. D., Moss, M. L., Atherton, R. E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R. K., Weskamp, G., Tempst, P. and Blobel, C. P. (1999). "Metalloproteasedisintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity." <u>J Biol Chem</u> **274**(6): 3531-40.

Roher, A. E., Lowenson, J. D., Clarke, S., Woods, A. S., Cotter, R. J., Gowing, E. and Ball, M. J. (1993). "beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **90**(22): 10836-40.

Ross, R. A., Spengler, B. A. and Biedler, J. L. (1983). "Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells." J Natl Cancer Inst **71**(4): 741-7.

Roush, W. (1996). "Live long and prosper?" Science 273(5271): 42-6.

Runz, H., Rietdorf, J., Tomic, I., de Bernard, M., Beyreuther, K., Pepperkok, R. and Hartmann, T. (2002). "Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells." J Neurosci **22**(5): 1679-89.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). <u>Molecular cloning: A laboratory Manual</u>. New York: Pages.

Sandbrink, R., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1994). "Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons." J Biol Chem **269**(2): 1510-7.

Sankaram, M. B. and Thompson, T. E. (1990). "Modulation of phospholipid acyl chain order by cholesterol. A solid-state 2H nuclear magnetic resonance study." <u>Biochemistry</u> **29**(47): 10676-84.

Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., Rosi, B. L., Gusella, J. F., Crapper-MacLachlan, D. R., Alberts, M. J. and et al. (1993). "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease." <u>Neurology</u> **43**(8): 1467-72.

Savage, M. J., Trusko, S. P., Howland, D. S., Pinsker, L. R., Mistretta, S., Reaume, A. G., Greenberg, B. D., Siman, R. and Scott, R. W. (1998). "Turnover of amyloid beta-protein in mouse brain and acute reduction of its level by phorbol ester." J Neurosci 18(5): 1743-52.

Sawamura, N., Ko, M., Yu, W., Zou, K., Hanada, K., Suzuki, T., Gong, J. S., Yanagisawa, K. and Michikawa, M. (2004). "Modulation of amyloid precursor protein cleavage by cellular sphingolipids." J Biol Chem **279**(12): 11984-91.

Schagger, H. and von Jagow, G. (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." <u>Anal Biochem</u> **166**(2): 368-79.

Scheiffele, P., Roth, M. G. and Simons, K. (1997). "Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain." <u>Embo J</u> **16**(18): 5501-8.

Scheuermann, S., Hambsch, B., Hesse, L., Stumm, J., Schmidt, C., Beher, D., Bayer, T. A., Beyreuther, K. and Multhaup, G. (2001). "Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease." J Biol Chem **276**(36): 33923-9.

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. and Younkin, S. (1996). "Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease." <u>Nat Med</u> **2**(8): 864-70.

Schlegel, A., Pestell, R. G. and Lisanti, M. P. (2000). "Caveolins in cholesterol trafficking and signal transduction: implications for human disease." <u>Front Biosci</u> **5**: D929-37.

Schnitzer, J. E., McIntosh, D. P., Dvorak, A. M., Liu, J. and Oh, P. (1995). "Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins." <u>Science</u> **269**(5229): 1435-9.

Selkoe, D. J. (1998). "The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease." <u>Trends Cell Biol</u> **8**(11): 447-53.

Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." <u>Physiol Rev</u> **81**(2): 741-66.

Selkoe, D. J. (2003). "Folding proteins in fatal ways." Nature 426(6968): 900-4.

Selkoe, D. J. (2004). "Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases." <u>Nat Cell Biol</u> **6**(11): 1054-61.

Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C. and et al. (1992). "Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids." <u>Nature</u> **359**(6393): 325-7.

Shah, S., Lee, S. F., Tabuchi, K., Hao, Y. H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C. E., 3rd, Sudhof, T. and Yu, G. (2005). "Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor." <u>Cell</u> **122**(3): 435-47.

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). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." <u>Nature</u> **375**(6534): 754-60.

Simons, K. and Ehehalt, R. (2002). "Cholesterol, lipid rafts, and disease." J Clin Invest **110**(5): 597-603.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997). "Functional rafts in cell membranes." <u>Nature</u> **387**(6633): 569-72.

Simons, K. and van Meer, G. (1988). "Lipid sorting in epithelial cells." <u>Biochemistry</u> **27**(17): 6197-202.

Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G. and Simons, K. (1998). "Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> **95**(11): 6460-4.

Simons, M., Keller, P., Dichgans, J. and Schulz, J. B. (2001). "Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link?" <u>Neurology</u> **57**(6): 1089-93.

Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." <u>Science</u> **175**(23): 720-31.

Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L. and John, V. (1999). "Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain." Nature **402**(6761): 537-40.

Sisodia, S. S. (1992). "Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **89**(13): 6075-9.

Sisodia, S. S., Koo, E. H., Beyreuther, K., Unterbeck, A. and Price, D. L. (1990). "Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing." <u>Science</u> **248**(4954): 492-5.

Spasic, D., Tolia, A., Dillen, K., Baert, V., De Strooper, B., Vrijens, S. and Annaert, W. (2006). "Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway." J Biol Chem **281**(36): 26569-77.

Sprecher, C. A., Grant, F. J., Grimm, G., O'Hara, P. J., Norris, F., Norris, K. and Foster, D. C. (1993). "Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family." <u>Biochemistry</u> **32**(17): 4481-6.

St George-Hyslop, P. (2000). "Alzheimer's Disease." Neurobiology of Disease 7: 546-548.

Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M. and Haass, C. (2002). "PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin." J Biol Chem 277(42): 39062-5.

Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S. and Roses, A. D. (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **90**(5): 1977-81.

Suzuki, T., Oishi, M., Marshak, D. R., Czernik, A. J., Nairn, A. C. and Greengard, P. (1994). "Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein." <u>Embo J</u> **13**(5): 1114-22.

Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G. and Iwatsubo, T. (2003). "The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex." <u>Nature</u> **422**(6930): 438-41.

Tamaoka, A., Kondo, T., Odaka, A., Sahara, N., Sawamura, N., Ozawa, K., Suzuki, N., Shoji, S. and Mori, H. (1994). "Biochemical evidence for the long-tail form (A beta 1-42/43) of amyloid beta protein as a seed molecule in cerebral deposits of Alzheimer's disease." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **205**(1): 834-42.

Tanzi, R. E., McClatchey, A. I., Lamperti, E. D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J. F. and Neve, R. L. (1988). "Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease." <u>Nature</u> **331**(6156): 528-30.

Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A. and Katzman, R. (1991). "Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment." <u>Ann Neurol</u> **30**(4): 572-80.

Thiele, C., Hannah, M. J., Fahrenholz, F. and Huttner, W. B. (2000). "Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles." <u>Nat Cell Biol</u> **2**(1): 42-9.

Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., Hardy, J., Levey, A. I., Gandy, S. E., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L. and Sisodia, S. S. (1996). "Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo." <u>Neuron</u> **17**(1): 181-90.

Thinakaran, G., Harris, C. L., Ratovitski, T., Davenport, F., Slunt, H. H., Price, D. L., Borchelt, D. R. and Sisodia, S. S. (1997). "Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors." <u>J Biol Chem</u> **272**(45): 28415-22.

Tienari, P. J., De Strooper, B., Ikonen, E., Simons, M., Weidemann, A., Czech, C., Hartmann, T., Ida, N., Multhaup, G., Masters, C. L., Van Leuven, F., Beyreuther, K. and Dotti, C. G. (1996). "The beta-amyloid domain is essential for axonal sorting of amyloid precursor protein." <u>Embo J</u> **15**(19): 5218-29.

Tolia, A., Chavez-Gutierrez, L. and De Strooper, B. (2006). "Contribution of presenilin transmembrane domains 6 and 7 to a water-containing cavity in the gamma-secretase complex." J Biol Chem **281**(37): 27633-42.

Torroja, L., Luo, L. and White, K. (1996). "APPL, the Drosophila member of the APP-family, exhibits differential trafficking and processing in CNS neurons." <u>J Neurosci</u> 16(15): 4638-50.

Turner, R. S., Suzuki, N., Chyung, A. S., Younkin, S. G. and Lee, V. M. (1996). "Amyloids beta40 and beta42 are generated intracellularly in cultured human neurons and their secretion increases with maturation." J Biol Chem **271**(15): 8966-70.

Urano, Y., Hayashi, I., Isoo, N., Reid, P. C., Shibasaki, Y., Noguchi, N., Tomita, T., Iwatsubo, T., Hamakubo, T. and Kodama, T. (2005). "Association of active gamma-secretase complex with lipid rafts." J Lipid Res **46**(5): 904-12.

Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H. and Hillen, W. (2000). "Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **97**(14): 7963-8.

van Meer, G. (1989). "Lipid traffic in animal cells." Annu Rev Cell Biol 5: 247-75.

Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. and Citron, M. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." <u>Science</u> **286**(5440): 735-41.

Vetrivel, K. S., Cheng, H., Kim, S. H., Chen, Y., Barnes, N. Y., Parent, A. T., Sisodia, S. S. and Thinakaran, G. (2005). "Spatial segregation of gamma-secretase and substrates in distinct membrane domains." J Biol Chem **280**(27): 25892-900.

Vetrivel, K. S., Cheng, H., Lin, W., Sakurai, T., Li, T., Nukina, N., Wong, P. C., Xu, H. and Thinakaran, G. (2004). "Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes." J Biol Chem **279**(43): 44945-54.

Virchow, R. (1853). "Über eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaktion der Cellulose." <u>Virchows Arch Path Anat</u> **6**: 135-138.

Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A. C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Younkin, S. G. and Golde, T. E. (2002). "Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains." <u>Neurobiol Dis</u> **9**(1): 11-23.

Walker, R. H., Brin, M. F., Sandu, D., Good, P. F. and Shashidharan, P. (2002). "TorsinA immunoreactivity in brains of patients with DYT1 and non-DYT1 dystonia." <u>Neurology</u> **58**(1): 120-4.

Walsh, D. M. and Selkoe, D. J. (2004). "Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease." <u>Neuron</u> 44(1): 181-93.

Walter, J., Capell, A., Hung, A. Y., Langen, H., Schnolzer, M., Thinakaran, G., Sisodia, S. S., Selkoe, D. J. and Haass, C. (1997). "Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations." J Biol Chem **272**(3): 1896-903.

Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G. and Haass, C. (2001). "Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase." J Biol Chem **276**(18): 14634-41.

Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E. and Solomon, F. (1992). "Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **89**(22): 10758-62.

Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M. D., Romano, D. M., Sisodia, S. S., Hyman, B. T., Neve, R. L. and Tanzi, R. E. (1993). "Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor." <u>Nat Genet</u> **5**(1): 95-100.

Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1989). "Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein." <u>Cell</u> **57**(1): 115-26.

Werb, Z. and Yan, Y. (1998). "A cellular striptease act." Science 282(5392): 1279-80.

Westmeyer, G. G., Willem, M., Lichtenthaler, S. F., Lurman, G., Multhaup, G., Assfalg-Machleidt, I., Reiss, K., Saftig, P. and Haass, C. (2004). "Dimerization of beta-site betaamyloid precursor protein-cleaving enzyme." J Biol Chem **279**(51): 53205-12.

Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C. and Haass, C. (2006). "Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1." <u>Science</u> **314**(5799): 664-6.

Wolfe, M. S. and Kopan, R. (2004). "Intramembrane proteolysis: theme and variations." <u>Science</u> **305**(5687): 1119-23.

Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T. and Selkoe, D. J. (1999). "Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity." <u>Nature</u> **398**(6727): 513-7.

Yamamoto, N., Fukata, Y., Fukata, M. and Yanagisawa, K. (2007). "GM1-gangliosideinduced Abeta assembly on synaptic membranes of cultured neurons." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1768**(5): 1128-37.

Yamazaki, T., Chang, T. Y., Haass, C. and Ihara, Y. (2001). "Accumulation and aggregation of amyloid beta-protein in late endosomes of Niemann-pick type C cells." J Biol Chem **276**(6): 4454-60.

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). "Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity." <u>Nature</u> **402**(6761): 533-7.

Yanagisawa, K., Odaka, A., Suzuki, N. and Ihara, Y. (1995). "GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A beta): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease." <u>Nat Med</u> **1**(10): 1062-6.

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). "Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing." <u>Nature</u> **407**(6800): 48-54.

Zagorski, M. G. and Barrow, C. J. (1992). "NMR studies of amyloid beta-peptides: proton assignments, secondary structure, and mechanism of an alpha-helix----beta-sheet conversion for a homologous, 28-residue, N-terminal fragment." <u>Biochemistry</u> **31**(24): 5621-31.

Zhao, G., Cui, M. Z., Mao, G., Dong, Y., Tan, J., Sun, L. and Xu, X. (2005). "gamma-Cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain." J Biol Chem **280**(45): 37689-97.

Zhao, G., Mao, G., Tan, J., Dong, Y., Cui, M. Z., Kim, S. H. and Xu, X. (2004). "Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein." J Biol Chem **279**(49): 50647-50.

Zhao, G., Tan, J., Mao, G., Cui, M. Z. and Xu, X. (2007). "The same gamma-secretase accounts for the multiple intramembrane cleavages of APP." J Neurochem 100(5): 1234-46.

Zhong, Z., Quon, D., Higgins, L. S., Higaki, J. and Cordell, B. (1994). "Increased amyloid production from aberrant beta-amyloid precursor proteins." J Biol Chem **269**(16): 12179-84.

Zur Hausen, H. (1967). "Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells." <u>J Virol</u> 1(6): 1174-85.

# 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

#### Aminosäuren

Alanin	Ala	А
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	Ν
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	С
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	Е
Glycin	Gly	G
Histidin	His	Н
Isoleucin	Ile	Ι
Leucin	Leu	L
Leucin Lysin	Leu Lys	L K
Leucin Lysin Methionin	Leu Lys Met	L K M
Leucin Lysin Methionin Phenylalanin	Leu Lys Met Phe	L K M F
Leucin Lysin Methionin Phenylalanin Prolin	Leu Lys Met Phe Pro	L K M F P
Leucin Lysin Methionin Phenylalanin Prolin Serin	Leu Lys Met Phe Pro Ser	L K M F P S
Leucin Lysin Methionin Phenylalanin Prolin Serin Threonin	Leu Lys Met Phe Pro Ser Thr	L K M F P S T
Leucin Lysin Methionin Phenylalanin Prolin Serin Threonin Tryptophan	Leu Lys Met Phe Pro Ser Thr Trp	L M F P S T W
Leucin Lysin Methionin Phenylalanin Prolin Serin Threonin Tryptophan Tyrosin	Leu Lys Met Phe Pro Ser Thr Trp Tyr	L M F S T W Y

#### Nukleobasen

Adenin	Α
Cytosin	С
Guanin	G
Thymin	Т

### Sonstige Abkürzungen

(Tmd)Phe	Trifluoromethyldiazirinyl-	AICD	"APP intracellular domain"
	phenylalanin	Aph-1	"anterior pharynx defective"
Á	Ángström	APL	"amyloid protein-like"
Αβ	Amyloid-β Peptid der Alzheimer	APLP	"amyloid precursor like proteins"
	Krankheit	АроЕ	Apolipoprotein E
$A\beta_{40}$	Aβ-Peptide, die mit der Aminosäure	APP	"Amyloid Precursor Protein"
	40 von C99 enden		= Amyloid-Vorläuferprotein
$A\beta_{42}$	Aβ-Peptide, die mit der Aminosäure	APPL	"amyloid precursor protein like"
	42 von C99 enden	APPs	"APP soluble", lösliche luminale/
Abb.	Abbildung		extrazelluläre APP-Domäne nach
AD	"Alzheimer's Disease"		initiierendem Prozessierungsschnitt
	= Alzheimer Krankheit	AS	Aminosäure
ADAM	"a disintegrin and metalloprotease"		

BACE	" $\beta$ -site APP cleaving enzyme" = $\beta$ -
	Sekretase
bp	Basenpaare
BZH	Biochemie-Zentrum der Universität
	Heidelberg
bzw.	beziehungsweise
C83	C-terminale 83 AS von APP; Produkt
	der $\alpha$ -Sekretase Proteolyse von APP
C99	C-terminale 99 AS von APP; Produkt
	der $\beta$ -Sekretase Proteolyse von APP,
	bzw. durch die Aktivität der
	Signalpeptidase aus dem Konstrukt
	SP-C99* freigesetzt
ca.	circa
cDNA	Komplementäre DNA
CFP	"cyan fluorescent protein"
CGN	Cis-Golgi Netzwerk
Ci	Curie
CIP	Alkalische Phosphatase
cpm	"counts per minute"
C-terminal	carboxyterminal
CTF	C-terminales Fragment
d	Tage
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DRMs	Detergens resistente Membranen =
	"detergent resistent membranes"
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	"Enhanced green fluorescent protein"
EOFAD	"early onset familial Alzheimer's
	Disease"
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F*	Photoaktivierbares
	Phenylalaninderivat
FACS	"Fluorescence activated cell sorting"
FAD	"familial Alzheimer's Disease"
g <sub>av</sub>	Erdbeschleunigung
GFP	"green fluorescent protein"
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunden

IC	"intermediate compartment"
ICD	"intracellular domain"
IRES	"internal ribosomal entry site"
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KPI	Kunitz Typ II
	Proteaseinhibitordomäne
LOAD	"late onset Alzheimer's Disease"
М	molar
MβCD	Methyl- B-Cyclodextrin
mDAB	"mammalian Disabled"
MEM	"minimal essential medium"
min	Minuten
MPI-CBG	Max Planck Institut für molekulare
	Zellbiologie und Genetik, Dresden
mRNA	messenger RNA
Nct	Nicastrin
N-terminal	aminoterminal
OX2	MRC-OX 2 Thymocyten-
	Oberflächenantigen
p3	AS 17 - 40 bzw. 17 - 42 von Aβ;
	entsteht durch $\alpha$ - und $\gamma$ -
	Sekretaseschnitt aus APP
p3 <sub>40</sub>	p3-Peptide, die mit AS 40 von C99
	enden
p3 <sub>42</sub>	p3-Peptide, die mit AS 42 von C99
	enden
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte physiologische
	Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Protein Disulfid Isomerase
Pen-2	"presenilin enhancer"
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIB	Pittsburg Compound B
РКС	Protein Kinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A2
PS	Presenilin
RIP	regulierte intramembranöse
	Proteolyse

#### ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

RNA	Ribonukleinsäure	TGF-α	"transforming growth factor- $\alpha$ "
rpm	Umdrehungen pro Minute	TGN	Trans-Golgi Netzwerk
sec	Sekunden	TMD	Transmembrandomäne
SP	Signalpeptid	TNF-α	"tumor necrose factor- $\alpha$ "
SP-C99	C99 mit N-terminalem Signalpeptid	tRNA	transfer RNA
	([APP-]Signalpeptid – Leu – Glu –	U	Unit
	C99)	UV	Ultraviolett
SP-C99*	C99 mit N-terminalem Signalpeptid	VIB	"Flanders Institute for
	([APP-]Signalpeptid – C99)		Biotechnology"
Tab.	Tabelle	YFP	"yellow fluorescent protein"
TACE	"tumor necrose factor- $\alpha$ converting	ZMBH	Zentrum für Molekulare Biologie
	enzyme"		Heidelberg
Tet	Tetrazyklin		

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Felix Wieland und PD Dr. Britta Brügger für die Überlassung des überaus spannenden Themas, die stetige Diskussionsbereitschaft, sowie für das Vertrauen, die Arbeit mit großen wissenschaftlichen Freiräumen anfertigen zu können.

Ich danke Dr. Liyun Zhao für die Unterstützung bei der *in vitro* Transkription/Translation und für die Überlassung der SP-C99 cDNAs mit einklonierten Amber-Stop-Codons. Prof. Dr. Wim Annaert und Prof. Dr. Dr. h.c. Konrad Beyreuther danke ich für die Bereitstellung von Antikörpern und der pBS/SP-C99 Plasmide. Bei Dr. Per Haberkant möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung der photoaktivierbaren Lipidvorstufen bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gebührt Leonie Waanders und Stefan Hanke aus der Arbeitsgruppe von Matthias Mann (MPI für Biochemie, Martinsried) für die exzellente Kooperation bei den gemeinsamen Bemühungen, die TMD von APP massenspektrometrisch zu untersuchen.

Dr. Constanze Reinhard und Dr. Heiko Runz danke ich für den Austausch, ihr Interesse an meiner Arbeit, anregende fachliche Diskussionen und die große Hilfsbereitschaft bei allen "Alzheimer"-relevanten Fragen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Wieland danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft. Besonderer Dank gilt Iris Leibrecht für die Unterstützung bei der Kultivierung der monoklonalen Zelllinien, der Klonierung, der Aufreinigung von rekombinantem C99 und bei Markierungsexperimenten. Ich danke Britta Brügger, Constanze Reinhard und Emily Stoops für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt auch meinen Laborkollegen Sandra Zitzler, Christoph Rutz, André Engling und Per Haberkant für die unzähligen lustigen Momente während der gesamten Doktorarbeit, aber auch für das gemeinsame Zähneknirschen nach missglückten Experimenten.

Ein besonderer Dank gilt Britta Brügger für die herzliche Betreuung, ihr anhaltendes Interesse, ihr allzeit offenes Ohr und ihre freundschaftliche Unterstützung, während meiner Zeit am BZH.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre einzigartige Unterstützung während meines gesamten Biologiestudiums – und darüber hinaus – bedanken.

Das größte Dankeschön gilt meiner Familie. Dafür, dass ich unabhängig vom Erfolg im Labor abends immer wieder lachen kann, danke ich Melanie, Fynn und Noa.