

**Aus dem Adolf-Butenandt-Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Walter Neupert**

**Differenzielle Effekte von Presenilin-Mutationen
auf die Generierung des Amyloid- β -Peptids (A β)
und die Endoproteolyse des Notch-Rezeptors**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Luka Kulic

aus

Belgrad

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Ch. Haass
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. A. Kretzschmar Prof. Dr. M. Ackenheil
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. J. Walter
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	31.07.2003

*Meinen geliebten Eltern, Dr. med. S. Kulic
und Prof. Dr. rer. nat. M. L. Kulic*

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	S.	2
1.1.	Histopathologie der Alzheimer-Krankheit		3
1.1.1.	Neurofibrilläre Bündel und Tau		4
1.1.2.	Amyloid-Plaques		5
1.2.	Das β -Amyloid-Vorläuferprotein und die Entstehung von A β		7
1.2.1.	Das β -Amyloid-Vorläuferprotein (β APP)		7
1.2.2.	Die Prozessierung von β APP		11
1.3.	Genetik der Alzheimer-Krankheit		14
1.4.	Die Preseniline		18
1.4.1.	Struktur und Lokalisation der Preseniline		18
1.4.2.	Posttranslationale Modifikation und Endoproteolyse der Preseniline		20
1.4.3.	Biologische Funktion der Preseniline		23
1.5.	Fragestellung: Effekte von PS1-Mutationen auf die Presenilin-Funktion		30
2.	Material und Methoden		33
2.1.	Herstellung von cDNA-Konstrukten		33
2.1.1.	Herstellung von mutagenisierten DNA-Fragmenten mittels PCR		33
2.1.2.	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen		38
2.1.3.	Dephosphorylierung des restringierten Vektors		39
2.1.4.	Ligationsreaktion		39
2.1.5.	Transformation von E. coli		40
2.1.6.	Präparation von DNA in kleinem Maßstab („Minipräparation“)		41
2.1.7.	Präparation von DNA in großem Maßstab („Maxipräparation“)		42

Inhaltsverzeichnis

2.2.	Kultivierung und Passagierung von Zellen	44
2.3.	Transfektion von Kulturzellen	45
2.4.	Etablierung von Einzelzellklonen und gemischten stabilen Klonen	46
2.5.	Untersuchung von Kulturzellen auf Expression/Sekretion von Proteinen/Polypeptiden	48
2.5.1.	Herstellung von Zellysaten	48
2.5.2.	Membranpräparation	49
2.5.3.	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	49
2.5.4.	Immunpräzipitation	50
2.5.5.	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	51
2.5.6.	Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran	55
2.5.7.	Immunblot-Analyse („Western Blot“)	56
2.5.8.	Metabolische Markierung von Zellen / Pulse-Chase	57
2.5.9.	Quantifizierung mittels Phosphorimaging	58
2.6.	Radiosequenzierung	58
2.7.	Massenspektrometrische Analyse	60
2.8.	Immunzytochemische Analyse von adhärent gewachsenen Zellen	60
2.9.	Transgene Expression von PS1 L286R in <i>C. elegans</i>	61
3.	Ergebnisse	63
3.1.	Mutationen an der Stelle 286 von PS1 beeinflussen nicht die Endoproteolyse von PS1	63
3.2.	Überexpression von mutanten PS1-Derivaten führt zum Ersatz von endogenem Presenilin	65
3.3.	Effekte der PS1-L286-Mutanten auf die Produktion von A β 42/43	66
3.3.1.	Charakterisierung verschiedener A β -Spezies	67
3.3.2.	Die PS1-Mutationen in Position 286 beeinflussen das Verhältnis (A β 42/43)/(A β 42/43+A β 40) in individueller	72

	Weise	
3.4.	Die Mutanten PS1 L286E und PS1 L286R inhibieren selektiv die Endoproteolyse von Notch	74
3.5.	PS1 L286R und PS1 L286E verursachen eine Akkumulation von Notch an der Zelloberfläche und im Golgi-Apparat	76
3.6.	Transgene PS1-L286R-Expression in <i>C. elegans</i> erlaubt keine geregelte Notch-vermittelte Signalübertragung <i>in vivo</i>	78
4.	Diskussion	81
4.1.	Die biologische Funktion der Preseniline	81
4.2.	Die PS1-Endoproteolyse scheint wenig anfällig zu sein für Austausche in unmittelbarer Nähe der PS1-Prozessierungsstelle	83
4.3.	Mutagenese einer FAD-assoziierten Stelle von PS1 kann die pathologischen Effekte der Originalmutation verstärken	85
4.4.	Die Prozessierung von β APP und die Endoproteolyse von Notch können von PS1 in unterschiedlicher Weise beeinflusst werden	86
4.5.	Die Wirkung der Presenilin-Mutationen	87
4.6.	Sind Preseniline γ -Sekretasen?	89
4.7.	Ausblick	96
5.	Zusammenfassung	99
6.	Literaturverzeichnis	100
7.	Anhang	119
8.	Lebenslauf	122
9.	Danksagung	124

Abkürzungen

AB	Amyloid- β -Peptid
AB40/42/43	Amyloid- β -Peptid, das mit Aminosäure 40/42/43 endet
AK	Alzheimer-Krankheit
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
βAPP	β -Amyloid-Vorläuferprotein
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
$^{\circ}$C	Grad Celsius
ca.	circa
Ci	Curie
CIP	Alkalische Phosphatase aus Rinderdarm
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Familiäre (Form der) Alzheimer-Krankheit
FBS	Fetales Kälberserum
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HRP	Meerrettich-Peroxydase
L-Gln	L-Glutamin
L286E, L286R, ...	Aminosäureaustausche in Position 286: E statt L, R statt L, ...
MG	Molekulargewicht
NP 40	Nonidet P40
kda	Kilodalton
PAGE	Polyacrylamid
PMSF	irreversibler Serinproteasen-Inhibitor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PS	Presenilin
PS1/2	Presenilin-1/-2
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
sw	Swedish (Schwedisch)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton-X 100	Octylphenolpolyethylenglykoether
v/v	Volumen/Volumen (volume/volume)
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen (weight/volume)

1. Einleitung

Im September 1907 wurden in München 270 mikroskopische Hirnrindenpräparate einer Patientin wiederentdeckt, die gut 90 Jahre zuvor an einer „eigenartigen Erkrankung der Hirnrinde“ verstorben war (Alzheimer, 1907; Maurer et al., 1997). Auguste D. aus Frankfurt a. M. ist in die Medizingeschichte eingegangen als der weltweit erste beschriebene Fall der Alzheimer-Krankheit, so benannt nach ihrem Entdecker, dem deutschen Neurologen und Psychiater Alois Alzheimer. Dieser hatte zu Beginn des 20. Jahrhunderts erstmalig Gedächtnisausfälle, Störungen der räumlichen und zeitlichen Orientierung, Wahrnehmungsschwierigkeiten und Halluzinationen bei der damals 51jährigen Frau D. diagnostiziert und dies in Verbindung gebracht mit den von ihm post mortem beobachteten und exakt beschriebenen morphologischen Veränderungen am zentralen Nervensystem seiner Patientin: Amyloidablagerungen und neurofibrillären Bündeln sowie degenerativen Veränderungen der Hirnsubstanz (Alzheimer, 1907; Maurer et al., 1997).

Mit einem Anteil von 50-70 % ist der Morbus Alzheimer heute in den Industrienationen die mit Abstand häufigste Form aller Demenzerkrankungen. Geschätzte 20 Mio. Patienten weltweit sind, unabhängig von ihrer ethnischen Zugehörigkeit, betroffen (zur Übersicht: Ernst & Hay, 1997). Die ersten Symptome machen sich als Störungen des Kurzzeitgedächtnisses und des Orientierungsvermögens bemerkbar, später fallen auch der Verlust des Langzeitgedächtnisses, der Urteilsfähigkeit, des logischen Denkens und des Sprachvermögens auf (zur Übersicht: Geldmacher & Whitehouse, 1997; Bracco et al., 1998; Ferris & Kluger, 1997). Sowohl der progrediente Verlust der kognitiven Fähigkeiten als auch die Krankheitsdauer sind dabei von Patient zu Patient recht variabel (Reisberg et al., 1996). Ursächlich können bei der Alzheimer-Krankheit zwei Varianten unterschieden werden: die deutlich häufigere sporadische Form und die in ca. 5-10 % der Fälle auftretende genetisch (autosomal-dominant) vererbte Form, die sogenannte familiäre Alzheimer-Krankheit (FAD) (Selkoe, 1998). In der Pathologie erscheinen beide Formen als weitgehend identisch, unterscheiden sich allerdings im Zeitpunkt ihres

Auftretens und im Verlauf. Während bei der sporadischen Form („late-onset“) die ersten Krankheitssymptome erst ab einem Alter von etwa 65 Jahren auftreten, können bei der FAD ausgesprochen aggressive Mutationen in extremen Fällen bereits im Alter von unter dreißig Jahren („early-onset“) zum Tod führen (Selkoe, 1998).

1.1. Histopathologie der Alzheimer-Krankheit:

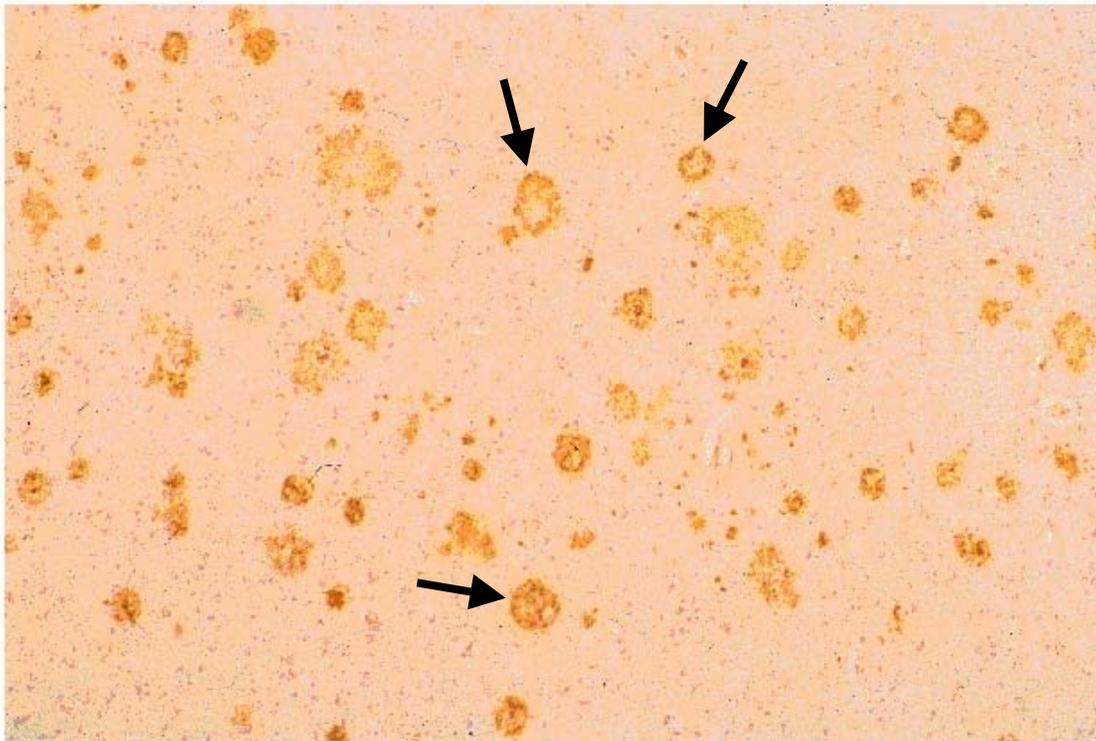


Abb. 1: Amyloid-Plaques (Pfeile) im Gehirn eines Alzheimer-Patienten (Die Abb. wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Christian Haass zur Verfügung gestellt).

Die Alzheimer-Krankheit ist histopathologisch - wie seinerzeit schon von Alois Alzheimer beschrieben (Alzheimer, 1907) - durch das gemeinsame Auftreten von Amyloid-Ablagerungen (den sogenannten „Plaques“) und neurofibrillären Bündeln („Tangles“) in bestimmten Gehirnregionen, überwiegend im Neokortex, der Hippokampus-Formation, der Amygdala, aber auch im cholinergen Ursprungskern, dem subcortikal gelegenen Nucleus basalis Meynert, gekennzeichnet (zur Übersicht: Selkoe, 1991; Braak et al., 1997). Neurofibrilläre Bündel lassen sich dabei pathologisch sowohl intra- als auch extrazellulär aufspüren, während die Amyloid-Plaques

charakteristischerweise als extrazelluläre Ablagerungen im Gehirnparenchym imponieren (siehe Abb. 1); überdies findet man Ablagerungen von Amyloid auch in den Wänden zerebraler und einiger meningealer Blutgefäße betroffener Patienten.

1.1.1. Neurofibrilläre Bündel und Tau:

Neurofibrilläre Bündel („Tangles“) entstehen zunächst intrazellulär durch Aggregation von gepaarten helikalen und geraden ~10 nm-Filamenten im somatodendritischen Kompartiment von Neuronen. Sie bestehen überwiegend aus hyperphosphorylierten Formen des ubiquitär exprimierten Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau (Guo et al., 1996; Grundke et al., 1986; Pollock et al., 1986). Nach dem Absterben der betroffenen Neuronen erscheinen diese Tangles auch als extrazelluläre Ablagerungen (Bondareff et al., 1994). Die initiale Bildung und Verbreitung der neurofibrillären Bündel im Gehirn scheint während der Pathogenese einem konstanten und vorhersagbaren Muster zu folgen (Braak & Braak, 1991). Dabei korrelieren Anzahl und Verbreitung der Neurofibrillenbündel im ZNS mit der Zunahme und dem Ausmaß der klinischen Symptome (zur Übersicht: Braak et al., 1997; Goedert et al., 1993). Unter physiologischen Bedingungen ist Tau an der Regulation des Aufbaus, der Stabilität und der Dynamik des Mikrotubuli-Zytoskeletts beteiligt, wobei der Phosphorylierungsstatus des Proteins von entscheidender Bedeutung für die Affinität von Tau zu den Mikrotubuli zu sein scheint (Friedhoff et al., 2000). *In-vitro*-Experimente konnten eindrucksvoll den Einfluß der Tau-Phosphorylierung auf die Polymerisationsgeschwindigkeit der Mikrotubuli in AK-Gehirnen zeigen, die aufgrund der Hyperphosphorylierung vermindert war, ein Effekt, der durch Phosphatase-Behandlung interessanterweise rückgängig gemacht werden konnte (Iqbal et al., 1994; Alonso et al., 1996; Garver et al., 1996). Sechs verschiedene Tau-Isoformen werden im ZNS durch alternatives Spleißen der prä-mRNA eines einzelnen Gens gebildet (Goedert et al., 1993). Durch biochemische und immunologische Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß Tau als Baustein der gepaarten helikalen Filamente in unlöslichen, hyperphosphorylierten Formen vorliegt (Grundke-Iqbal et al., 1986; Biernat et al., 1992), wobei eine Vielzahl von Serin-/Threonin-Phosphorylierungsstellen sowie mehrere Tau-phosphorylierende

Proteinkinasen beschrieben wurden (zur Übersicht: Brand & Eidenmüller, 1998; Mandelkow et al., 1995). Unklar ist zur Zeit die Frage, ob die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins für die erhöhte Aggregationsbereitschaft des Tau-Proteins bei den Alzheimer-Patienten *in vivo* verantwortlich ist, und ob diese neben einer erhöhten Proteinkinase-Aktivität auch Folge einer verminderten Phosphatase-Aktivität sein könnte (Goedert et al., 1993; Gong et al., 1995; Sontag et al., 1996).

Die neurofibrillären Bündel treten intreressanterweise nicht nur bei der Alzheimer-Krankheit auf, sondern auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen unterschiedlicher Ätiologie, so z.B. bei der subakut sklerosierenden Panenzephalitis, der Dementia Pugilistica, dem Guam-Parkinson-Demenz-Komplex, u.a. (Wisniewski et al., 1979; Eidelberg et al., 1987). Auch Tau-Mutationen mit daraus resultierender Bildung von Neurofibrillenbündeln und dem Auftreten dementieller Erkrankungen, wie der Chromosom-17-gekoppelten frontotemporalen Demenz ohne Alzheimer-typische Amyloid-Plaques, sind beschrieben worden (siehe Kap. 1.4.).

1.1.2. Amyloid-Plaques:

Amyloid-Plaques, das zweite histopathologische Charakteristikum der Alzheimer-Krankheit, stellen extrazelluläre Ablagerungen dar und bestehen hauptsächlich aus fibrillärem (8-10 nm) und nicht-fibrillärem β -Amyloid-Peptid (A β) (Glennner & Wong, 1984; Masters et al., 1985). Neben A β wurden noch weitere Proteinkomponenten, wie z.B. die Apolipoproteine A und J, α 1-Antichymotrypsin, Vitronectin und Proteoglykane, in den Plaques nachgewiesen (zur Übersicht: Dickson, 1997). Lichtmikroskopisch lassen sich neuritische Plaques und sogenannte diffuse Plaques unterscheiden, die immunhistochemisch und ultrastrukturell weiter in Subtypen unterteilt werden können (zur Übersicht: Yamaguchi, 1998). Die neuritischen Plaques sind dabei ein konstantes und charakteristisches Merkmal der Alzheimer-Krankheit (Selkoe, 1994) und zeichnen sich durch einen dichten Amyloid-Kern aus, innerhalb dessen bzw. in dessen enger Nachbarschaft dystrophe Neuriten, reaktive Astrozyten sowie aktivierte Mikrogliazellen nachgewiesen werden können (Braak et al., 1996; Wisniewski et al., 1996). Im Gegensatz dazu zeigen diffuse Plaques, die überwiegend aus amorphem, nicht-

fibrillärem A β bestehen (zur Übersicht: Yamaguchi, 1998), selten derartige pathozytologische Veränderungen (Tagliviani et al., 1988; Delaere et al., 1991), kommen vor allem im Cerebellum vor und sind nicht spezifisch für die Alzheimer-Krankheit, zumal sie auch in den Gehirnen klinisch unauffälliger, nicht dementer, alter Menschen angetroffen werden können (Katzmann et al., 1988). Wie schon erwähnt, finden sich Amyloid-Ablagerungen auch in den Gefäßwänden parenchymaler und meningealer Arteriolen und Venolen, ferner in kleinen Arterien und Kapillaren (zur Übersicht: Dickson, 1997; Yamaguchi, 1998). Als sogenannte kongophile amyloide Angiopathien stellen sie hier wichtige diagnostische Merkmale dar (Selkoe, 1991; Yamaguchi, 1998). Das aus Amyloid-Ablagerungen in neuritischen Plaques bzw. Blutgefäßen isolierte A β ist hinsichtlich seiner Länge heterogen zusammengesetzt (Glennner & Wong, 1984; Masters et al., 1985). Während ein geringer Anteil N- und C-terminal verkürzt ist, sind 40-43 Aminosäuren lange A β -Peptide (A β 40, A β 42 und A β 43) die dominierenden A β -Spezies (Mori et al., 1992; Miller et al., 1993; Roher et al., 1993). A β 40 und A β 42(43) weisen im Hinblick auf ihr biochemisches und biophysikalisches Verhalten wesentliche Unterschiede auf. Die längere Spezies A β 42(43) ist im Vergleich zu A β 40 hydrophober und zeigt eine erheblich erhöhte Aggregationsneigung *in vitro* (Yankner, 1996; Lansbury et al., 2000). Interessanterweise ist A β 42(43) unter den in Plaques gefundenen A β -Formen die Hauptspezies, und das sowohl in Fällen mit sporadischer als auch in Fällen mit familiärer Alzheimer-Krankheit, obwohl es in Zellkulturüberständen und im Plasma nur etwa 10-20 % der Gesamtmenge an sezerniertem A β -Peptid ausmacht (Selkoe, 1996). A β wirkt neurotoxisch; diese Neurotoxizität ist dabei - wie *in vitro* gezeigt werden konnte - entscheidend vom Aggregationszustand der Peptide abhängig (Busciglio et al., 1992; Pike et al., 1991; Pike et al., 1993; Mattson et al., 1993). Lösliche A β -Peptid-Monomere wiesen in Nervenzellkultur-Experimenten nur eine geringe Toxizität im Vergleich zu fibrillärem A β auf (Lorenzo & Yankner, 1994; Howlett et al., 1995; Busciglio et al., 1995). Diese Resultate stehen im Einklang mit *In-vivo*-Beobachtungen, die zeigten, daß neuropathologische Veränderungen in der Nachbarschaft neuritischer Plaques (mit fibrillärem A β) ausgeprägter sind als die Veränderungen in der Umgebung diffuser Plaques, die überwiegend amorphes, nicht-fibrilläres A β -Material enthalten (Mann & Esiri, 1989; Yamazaki et al., 1992). Wie aus A β 42(43) und A β 40 letztlich Aggregate aus

beiden A β -Spezies entstehen, ist noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Möglicherweise steht am Anfang des Prozesses die Bildung eines Aggregationskeimes aus A β 42(43), in dessen Anschluß auch die Einlagerung von A β 40 und natürlich auch von weiterem A β 42(43)-Peptid stattfindet. Diese initiale Aggregation scheint ein wichtiger, geschwindigkeitsbegrenzender Schritt bei der Bildung der neurotoxischen A β -Fibrillen zu sein (zur Übersicht: Jarret & Lansbury, 1993; Yankner, 1996; Teplow, 1998). Neuerdings wird auch A β -Monomeren und -Dimeren bzw. bestimmten Vorstufen der A β -Fibrillen, den sogenannten Protofibrillen (PF), eine im Sinne der Neurotoxizität pathogenetisch bedeutsame Rolle bei der Progression der Alzheimer-Krankheit zugeschrieben (Walsh et al., 1997; Harper et al., 1997a; Harper et al., 1997b; Harper et al., 1999; Walsh et al., 1999; Hartley et al., 1999). Während A β -Monomere und -Dimere in gemischten Nervenzellkulturen konzentrations- und zeitabhängig neurotoxisch zu wirken scheinen, führen PF zusätzlich zu meßbaren Potentialveränderungen an Nervenzellmembranen und ähneln damit in ihrer biologischen Wirkung den reifen A β -Fibrillen (Hartley et al., 1999). Dies deutet zumindest auf eine mögliche Mitbeteiligung dieser Vorstufen der A β -Fibrillogenese bei dem Prozeß der Krankheitsprogression hin (Hartley et al., 1999).

1.2. Das β -Amyloid-Vorläuferprotein und die Entstehung von A β :

1.2.1. Das β -Amyloid-Vorläuferprotein (β APP):

Mit der Klonierung einer kompletten cDNA-Sequenz durch Beyreuther und Kollegen, einem Meilenstein in der Erforschung der molekularen Grundlagen der Alzheimer-Krankheit, konnte gezeigt werden, daß das A β -Peptid Bestandteil eines größeren Typ-I-Transmembranproteins, des β -Amyloid-Vorläuferproteins (β -Amyloid Precursor Protein, β APP) ist (Kang et al., 1987) (siehe Abb. 2). Später wurden zwei weitere Gene identifiziert, die aufgrund ihrer Homologie zu β APP, die Bezeichnungen APLP(Amyloid Protein Precursor like Protein)-1 und APLP-2 erhielten (Wasco et al., 1992; Sprecher et al., 1993). Weitere Homologievergleiche führten zur Entdeckung β APP-homologer Gene auch in *D. melanogaster* (Rosen et al., 1989), *Caenorhabditis elegans* (Daigle & Li, 1993)

und anderen Organismen. Angesichts des hohen Grades der Konservierung dieser Gene im Verlauf der Evolution läßt sich davon ausgehen, daß ihren Genprodukten eine nicht unwesentliche biologische Funktion zukommen dürfte. Aber was ist die eigentliche Funktion dieser Genprodukte? Bis heute konnte diese Frage nicht hinreichend geklärt werden, allerdings gibt es eine Reihe von Anhaltspunkten für mögliche physiologische Aufgaben von β APP. Experimente mit Fruchtfliegen z.B. zeigten eine Beeinflussung der Flügelausbildung infolge Überexpression von menschlichem β APP, was auf eine Funktion von β APP bei der Ausbildung von Zellkontakten schließen läßt (Fossgreen et al., 1998). Dies wird durch Zellkulturexperimente unterstützt, in denen eine Stimulation des Neuritenwachstums und der Zelladhäsion durch sezerniertes β APP beschrieben wurde (Koo et al., 1993). Überexpression von β APP in transgenen Mäusen führte bei den untersuchten Tieren zu objektiven Störungen im Lernverhalten, wodurch auf eine Funktion von β APP bei der Gedächtnisbildung geschlossen wurde (Hsiao et al., 1995; Hsiao et al., 1996). Dagegen konnte man überraschenderweise bei Mäusen mit einer Inaktivierung beider β APP-Allele (β APP^{-/-}) deutlich weniger spektakuläre Veränderungen erzielen: Bis auf geringfügige neurologische Störungen sowie ein verglichen mit dem Wildtyp reduziertes Körpergewicht der adulten Tiere, war bei den β APP^{-/-}-Mäusen als einzige hirnpathologische Veränderung eine verstärkte Gliazell-Proliferation in jenen Arealen feststellbar, die bei Wildtyp-Tieren die höchsten Expressionsraten von β APP aufwiesen (Zheng et al., 1995). Einen ungleich dramatischeren Phänotyp erzielte man allerdings mit „Doppel-knockout“-Mäusen, bei denen entweder beide β APP- und beide APLP2-Allele (β APP^{-/-}/APLP2^{-/-}) oder jeweils die beiden Allele von APLP1 und APLP2 (APLP1^{-/-}/APLP2^{-/-}) inaktiviert worden waren. In beiden Fällen war perinatale Letalität der betroffenen Tiere die Folge, was auf eine wichtige, aber z.T. redundante Funktion der Mitglieder der β APP-Genfamilie hinweist (Müller et al., 1998; Von Koch et al., 1997).

Strukturell ähnelt β APP mit seiner großen N-terminalen Ectodomäne, der Transmembrandomäne und dem kurzen zytoplasmatischen Anteil einem Zelloberflächenrezeptor (Abb. 2). Durch alternatives prä-mRNA-Splicing können drei unterschiedliche Isoformen von β APP mit einer Länge von 695, 751 oder 770 Aminosäuren entstehen (Kang et al., 1987; Tanzi et al., 1988; Kitaguchi et al., 1988; Ponte et al., 1988;

Einleitung

DeSauvage & Octave, 1989; Golde et al., 1990; König et al., 1992), wobei in neuronalen Zellen im wesentlichen die Form β APP695 überwiegt, während man die längeren Formen β APP751 und β APP770 auch und vor allem in nicht-neuralem Gewebe antrifft. Der β APP695-Splice-Variante fehlt im Gegensatz zu den beiden anderen Isoformen die durch Exon 7 kodierte Kunitz-Protease-Inhibitor(KPI)-Domäne (Tanzi et al., 1988; Kitaguchi et al., 1988; Ponte et al., 1988), die *in vitro* verschiedene Serinproteasen hemmt (Oltersdorf et al., 1989; Van Nostrand et al., 1989), so z.B. auch den Blutgerinnungs-Faktor XIa, was eine Beteiligung von β APP an Prozessen der Hämostase möglich erscheinen läßt (Smith et al., 1990; Van Nostrand et al., 1990).

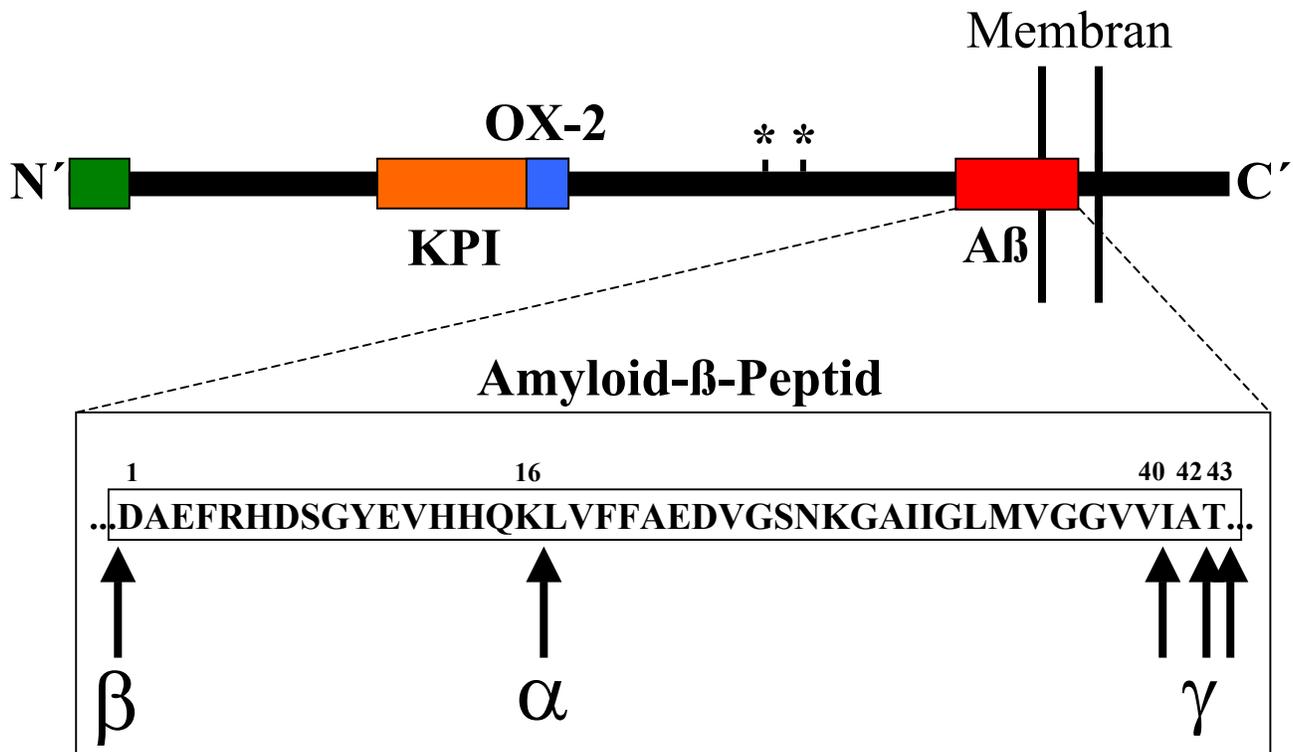


Abb. 2: Schematische Darstellung von β APP. β APP ist ein Typ-I-Membranprotein mit einer großen N-terminalen Ectodomäne, einer Transmembrandomäne und einer kleinen zytoplasmatischen Domäne. Die Zellmembran ist durch vertikale schwarze Linien symbolisiert. Die β APP770-Isoform enthält sowohl die KPI-Domäne als auch das OX-2-Antigen, ein Glykoprotein, das offenbar an Differenzierungsprozessen von Makrophagen beteiligt ist (Hoek et al., 2000). Durch alternatives Spleißen kann das OX-2-Antigen (β APP751), bzw. die KPI- und die OX-2-Domäne (β APP695) entfernt werden. N-Glykosylierungsstellen sind durch * markiert. Die Positionen der Signalsequenz am N-Terminus (grün) und der β -Amyloid(A β)-Domäne (rot) sind ebenfalls angezeigt. Die Aminosäure-Sequenz von A β (1-43) ist angegeben. Die Schnittstellen der α -, β - und γ -Sekretase(n) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Nach der Biosynthese im endoplasmatischen Retikulum (ER) wird β APP zum Golgi-Apparat transportiert, um dann weiter im sekretorischen Weg an die Zelloberfläche zu gelangen (zur Übersicht: Selkoe, 1994). Auf dem Weg vom ER zur Zelloberfläche unterliegt das Molekül dabei diversen posttranslationalen Modifikationen wie der N'- und O'-Glykosylierung, Sulfatierung und Phosphorylierung (Weidemann et al., 1989; Hung & Selkoe, 1994; Walter et al. 1997a; Walter et al., 2000). Zellbiologische Untersuchungen konnten zeigen, daß β APP überwiegend im Golgi-Apparat lokalisiert ist und nur ein Teil weiter an die Zelloberfläche transportiert wird (Haass et al., 1991; Oltersdorf et al., 1990). In Nervenzellen wurde für β APP ein transzytotischer Transport von β APP von der axonalen Zelloberfläche zu somatodendritischen Kompartimenten nachgewiesen (Koo et al., 1990; Yamazaki et al., 1995; Simons et al., 1995; zur Übersicht: Multhaup et al., 1998). Interessanterweise scheint dabei für diesen Transport innerhalb der Nervenzellen die A β -Domäne eine bedeutende Rolle zu spielen, denn kleine Deletionen innerhalb der A β -Domäne bewirken eine verstärkte Lokalisierung von β APP im somatodendritischen Kompartiment, während die Entfernung von Teilen der zytoplasmatischen β APP-Domäne oder größerer Teile der Ectodomäne keinen Einfluß auf den axonalen Transport von β APP hat (Tienari et al., 1996). Könnte die eigentliche physiologische Funktion der A β -Domäne demnach also die eines Sortierungs- bzw. Transportsignals sein? Ist die Modifikation dieses Transports letztlich auch der Grund für auch unter physiologischen Bedingungen unter Sekretase-Einwirkung entstehendes freies A β -Peptid? Eingehendere Untersuchungen hierzu sind sicherlich notwendig, zumal in der β APP-Ectodomäne weitere Sortierungssignale für polarisierten Transport sowohl bei neuronalen als auch nicht-neuronalen Zellen nachgewiesen werden konnten (Haass et al., 1995c). In neuesten Arbeiten mit transfizierten Zellkulturlinien hat interessanterweise das C-terminale Spaltprodukt des γ -Sekretase-Schnittes des β APP-Moleküls (siehe 1.2.2.) eine zunehmende Beachtung erfahren (Cao & Südhof, 2001; Sastre et al., 2001). Möglicherweise kommt dieser zytoplasmatisch ausgerichteten Domäne des β APP-Moleküls ähnlich wie dem Notch-Spaltprodukt NICD (siehe unter 1.4.3.) eine wichtige Rolle bei der nukleären Signalübertragung zu (Cao & Südhof, 2001; Sastre et al., 2001).

1.2.2. Die Prozessierung von β APP:

Die Prozessierung von β APP erfolgt auf unterschiedlichen Wegen, wobei im wesentlichen drei proteolytische Aktivitäten von Bedeutung sind, die als α -, β - und γ -Sekretase bezeichnet werden (siehe Abb. 3). Unter ihrer Einwirkung entstehen unterschiedliche Hydrolyse-Produkte von β APP, und zwar nicht nur unter pathologischen, sondern auch unter physiologischen Bedingungen; diese sind z.B. in Zellkulturüberständen von β APP exprimierenden Kulturzellen (Haass et al., 1992a; Seubert et al., 1993), aber auch im Liquor bzw. im Plasma von Kontrollpatienten (Seubert et al., 1992; Shoji et al., 1992) nachweisbar.

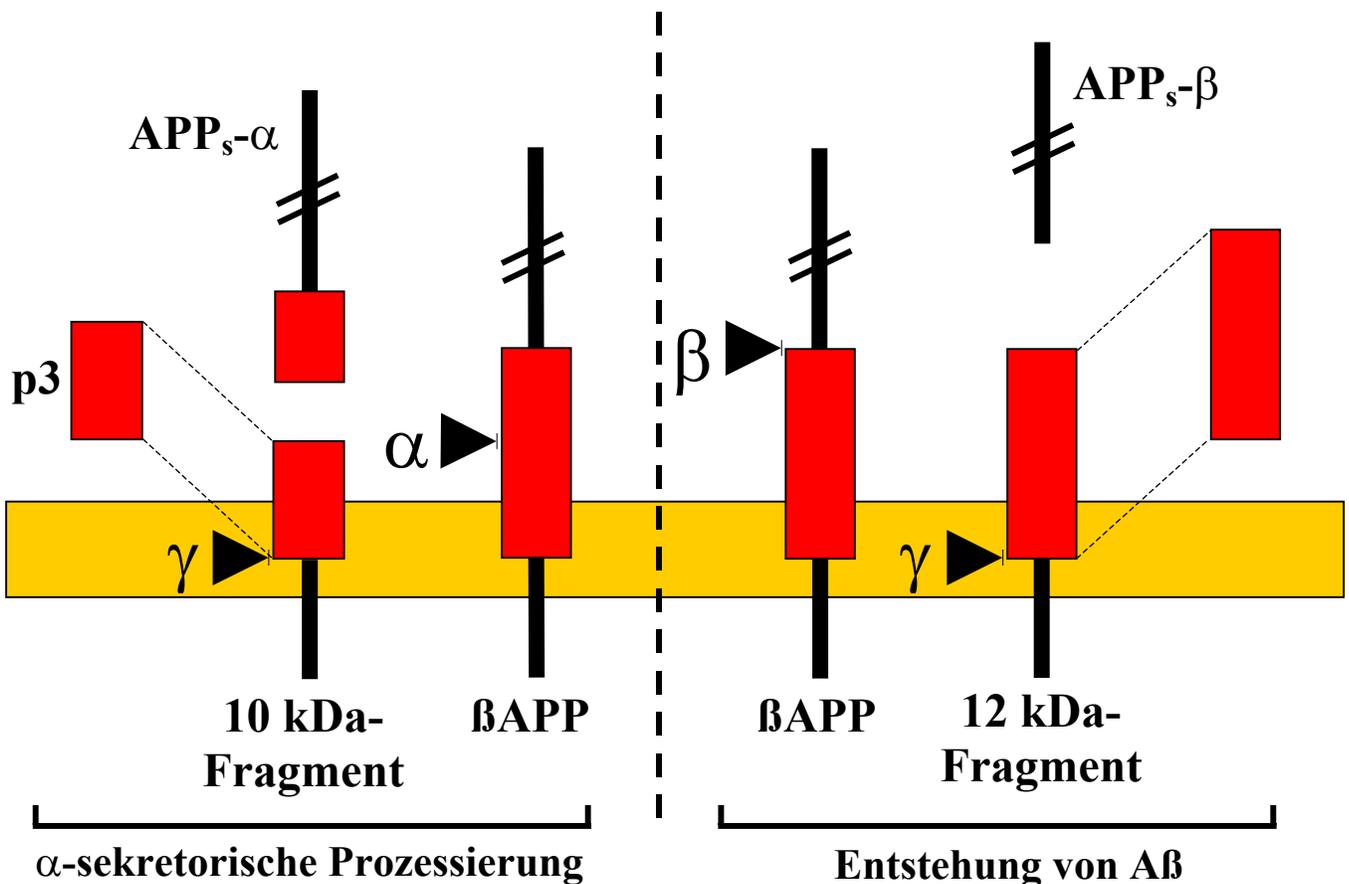


Abb. 3: Proteolytische Prozessierung von β APP. Die $A\beta$ -Domäne ist als rotes Rechteck dargestellt. Bei der Proteolyse von β APP durch die α -Sekretase bzw. die β -Sekretase werden die löslichen Formen $APP_s-\alpha$ und $APP_s-\beta$ freigesetzt. Die dabei gebildeten 10 kDa („C83“) und 12 kDa („C99“) großen Fragmente bleiben zunächst in der Membran (gelb) inseriert. Durch anschließende Prozessierung dieser Fragmente durch die γ -Sekretase(n) entstehen die Peptide p3 und $A\beta$ sowie ein weiteres ca. 7 kDa großes C-terminales Fragment.

Unterschieden werden zwei Haupt-Prozessierungswege von β APP: der α -sekretorische Weg (in erster Linie als Folge der Aktivität der α -Sekretase) und der sogenannte amyloidogene Weg (mit wesentlicher Beteiligung der β - und γ -Sekretase) (Abb. 3).

Die β APP-Prozessierung durch die α -Sekretase erfolgt innerhalb der A β -Domäne auf dem Weg *zur* (im Trans-Golgi-Netzwerk oder während des Transports durch sekretorische Vesikel) oder unmittelbar *an* der Zelloberfläche (Haass et al., 1992b; Sisodia, 1992; Sambamurti et al., 1992). Sie führt zur Freisetzung von APP_s- α , dem ca. 95 kDa großen N-terminalen Anteil von β APP, in den Extrazellulärraum. Das verbliebene 10 kDa große und 83 Aminosäuren lange C-terminale Fragment von β APP („C83“), bestehend aus der Transmembranregion und der zytoplasmatischen Domäne des β -Amyloid-Peptid-Vorläuferproteins, kann nun weiter am C-terminalen Ende der A β -Domäne proteolytisch gespalten werden durch die bislang nicht eindeutig identifizierte γ -Sekretase. Dieser heterogene Schnitt erfolgt nach Val40, Ala42 oder Thr43 und führt zur Bildung von mit der jeweiligen Aminosäure endendem p3, einem etwa 3 kDa großen Peptid (Haass et al., 1993). Die Entstehung des intakten A β wird also durch den Schnitt der α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne verhindert (Sisodia et al., 1990). Die α -Sekretase weist Eigenschaften einer Metalloprotease der ADAM(A Disintegrin And Metalloproteinase)-Familie auf. *In-vitro*- und *in-vivo*-Experimente ergaben, daß sowohl ADAM-10 als auch ADAM-17 das β APP innerhalb der A β -Domäne hydrolysieren und damit beide als α -Sekretase-Kandidaten betrachtet werden können (Buxbaum et al., 1998; Parvathy et al., 1998; Lammich et al., 1999). Die α -Sekretase scheint keine sequenzspezifische Protease zu sein. β APP wird von ihr nämlich stets in einem definierten Abstand von 12-13 Aminosäuren zur Membran geschnitten (Sisodia, 1992). Die Folge ist eine Endoproteolyse der A β -Domäne zwischen den Aminosäuren 16 und 17 von A β (Esch et al., 1990).

Ein Teil der an die Oberfläche der Zelle gelangten intakten β APP-Moleküle wird über Clathrin-vermittelte Endozytose in endosomale und lysosomale Kompartimente aufgenommen, wobei das Sequenzmotiv YENPTY in der zytoplasmatischen Domäne von β APP als Reinternalisierungssignal fungiert (Haass et al., 1993; De Strooper, 1993; Lai et al., 1995). Im Endosom erfolgt dann der Schnitt durch die erst kürzlich identifizierte β -

Sekretase BACE (Beta-site APP-Cleaving Enzyme), eine durch eine Transmembrandomäne in der Membran verankerte Aspartyl-Protease (Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999; Sinha et al., 1999; Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000). Dieser Schnitt ist stark sequenzabhängig und erfolgt (bezogen auf die β APP695-Isoform) hauptsächlich zwischen Met671 und Asp672 (=Asp1 der A β -Domäne), zu einem geringeren Prozentsatz aber auch vor den Resten Val3, Ile6 und Glu11 innerhalb der A β -Domäne (Citron et al., 1995). BACE scheint dabei in erster Linie für die Generierung der mit Asp1 und Glu11 beginnenden A β -Derivate verantwortlich zu sein, während für das Entstehen der anderen N-terminalen Variationen u.U. noch andere proteolytische Aktivitäten benötigt werden (Vassar et al., 1999). Der Hauptschnitt zwischen Met671 und Asp672 führt zunächst zur Bildung eines membranständigen 12 kDa großen und 99 Aminosäuren langen („C99“) C-terminalen Fragments von β APP (mit einer intakten A β -Domäne) sowie einer verkürzten löslichen Form von β APP, dem APP_s- β . Durch die im Anschluß an bzw. in der Nähe der Zellmembran stattfindende γ -Sekretase-vermittelte Endoproteolyse von C99 hinter Val40, Ala42 und Thr43 am C-Terminus der A β -Domäne werden schließlich die A β -Spezies A β (1-40), A β (1-42) und A β (1-43) gebildet (siehe auch Abb. 3) und zusammen mit den aus der γ -Proteolyse von C83-Molekülen (siehe oben) hervorgegangenen p3-Peptiden in das extrazelluläre Milieu freigesetzt (zur Übersicht: Steiner & Haass, 2000). Aus dem γ -Sekretase-Schnitt geht ferner auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran auch ein ca. 7 kDa großes C-terminales Spaltprodukt hervor („CTF γ “), dem neuerdings eine potentielle Bedeutung bei der nukleären Signaltransduktion beigemessen wird (Cao & Südhof, 2001; Sastre et al., 2001). Neben diesem Weg der A β -Bildung über Endozytose wurde in biochemischen, immunologischen und zellbiologischen Untersuchungen auch die Bildung von A β 42(43) im ER und von A β 40 und A β 42(43) im Golgi-Kompartiment nachgewiesen (Wild-Bode et al., 1997; Hartmann et al., 1997; Cook et al., 1997; Skovronsky et al., 1998). Diese intrazelluläre A β -Genese unterscheidet sich allerdings von der an bzw. in der Nähe der Zelloberfläche stattfindenden A β -Genese insofern, als das hierbei entstehende A β nicht sezerniert zu werden scheint (Perez, 1999).

1.3. Genetik der Alzheimer-Krankheit:

Zur Zeit kennt man im wesentlichen vier Gene, deren Mutationen bzw. Polymorphismen nachgewiesenermaßen zur Symptomatik der Alzheimer-Krankheit führen können.

In Kopplungsstudien wurde auf Chromosom 14 ein Genlocus identifiziert, der in etwa 40-50 % der Fälle mit der autosomal dominant vererbten „early-onset“-Form der Alzheimer-Krankheit in Verbindung steht (Schellenberg et al., 1992; St George-Hyslop et al., 1992; Van Broeckhoven et al., 1992). Durch positionelle Klonierung wurde das entsprechende Gen (Presenilin-1, PS1) identifiziert (Sherrington et al., 1995) und in der Folge auch ein dazu homologes Gen (Presenilin-2, PS2) auf Chromosom 1 nachgewiesen (Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995). Bislang sind über 80 verschiedene mit der familiären („early-onset“) Alzheimer-Krankheit (FAD) assoziierte Mutationen im PS1-Gen und zwei Mutationen im PS2-Gen bekannt geworden (zur Übersicht: Haass, 1997; Hardy, 1997; Fraser & St George-Hyslop, 1998; <http://molgen-www.uia.ac.be/ADMutations/>). Diese sind ungleichmäßig über das PS-Molekül verteilt und konzentrieren sich hauptsächlich in den stark konservierten Bereichen des PS-Proteins, hier vor allem in den Transmembrandomänen (z.B. der TM2) und dem konservierten Anfangsteil der großen hydrophilen Schleife zwischen den vermuteten Transmembrandomänen 6 und 7 (nach dem Acht-Transmembrandomänenmodell, siehe Abb. 4 und Tab. 3). Mit einer Ausnahme stellen alle Presenilin-Mutationen Punktmutationen dar, welche den Austausch einer Aminosäure zur Folge haben. Lediglich eine FAD-Mutation ist mit einer aberranten Spleißstelle von Exon 9 assoziiert (sogenannte Δ Exon-9-Mutante) und führt zur Deletion der Aminosäuren 291-319 von PS1 (Perez-Tur et al., 1995). Durch Rückmutation konnte allerdings gezeigt werden, daß auch bei dieser sogenannten Δ Exon-9-Mutante ausschließlich der Aminosäureaustausch (S290C), und nicht etwa die Deletion der Exon-9-Domäne, für die pathologische A β -Erhöhung verantwortlich ist (Steiner et al., 1999a).

Allen bisher untersuchten Presenilin-Mutationen ist gemeinsam, daß sie spezifisch die Bildung von A β 42(43) erhöhen, während die Menge an Gesamt-A β konstant zu bleiben scheint. Damit erhöhen die PS1- und PS2-Mutationen spezifisch die A β 42(43)/Gesamt-A β -Rate, was sowohl an transfizierten Zellen als auch an Fibroblasten von Patienten mit

PS-Mutationen gezeigt werden konnte (Scheuner et al., 1996; Citron et al., 1997). Ferner weisen betroffene Patienten erhöhte Plasma-Konzentrationen von A β 42(43) auf.

Interessanterweise sind bis heute keine natürlich vorkommenden Mutationen in den Presenilin-Genen beschrieben worden, die zu einem verkürzten Transkript oder gar zu einem vollständigen Verlust des Proteins führen würden. In Anbetracht dieser Tatsache erscheint die Vorstellung berechtigt, daß der Verlust des funktionellen Presenilins schon während der Embryogenese einen Letalfaktor darstellen könnte (Haass, 1997). Nähere Ausführungen zu den Presenilinen, ihren Mutationen und Funktionen erfolgen in Kapitel 3.5..

Mutationen im β APP-Gen machen nur einen geringen Anteil (<1 %) aller vererbten Fälle aus, sind allerdings überaus informativ, was das nähere Verständnis der pathogenen Mechanismen bei der Alzheimer-Krankheit betrifft. Das β APP-Gen liegt auf dem Chromosom 21, das bei der Trisomie 21 (Down-Syndrom) in dreifacher Kopie vorliegt. Interessanterweise zeigen Down-Patienten die für die Alzheimer-Krankheit charakteristischen A β -Ablagerungen bereits in ihrer zweiten oder dritten Lebensdekade, was auf einen Dosiseffekt des β APP-Gens bei der Plaquebildung hindeutet (Wisniewski & Rabe, 1986; Rumble et al., 1989; Coyle et al., 1988; Tanzi, 1996). Durch Genanalysen in Familien mit Chromosom-21-gekoppelter familiärer Alzheimer-Krankheit konnten mehrere Mutationen innerhalb des β APP-Gens identifiziert werden (zur Übersicht: Fraser & St George-Hyslop, 1998; Mullan & Crawford, 1993). Allen gemeinsam ist, daß sie innerhalb oder eng benachbart zur A β -Domäne an den Schnittstellen der jeweiligen Sekretasen liegen (Selkoe, 1996). Eine der Mutationen (der Austausch E693Q, ausgehend vom β APP770-Isotyp) führt zur „hereditären cerebralen Hämorrhagie vom holländischen Typ“, einer der Alzheimer-Krankheit neuropathologisch betrachtet recht ähnlichen Erkrankung (Levy et al., 1990; Hendriks et al., 1992). Verschiedene Experimente konnten zeigen, daß alle untersuchten β APP-Mutationen in der einen oder anderen Form die proteolytische Prozessierung von β APP beeinflussen, indem sie entweder eine erhöhte Produktion beider A β -Spezies (A β 40 + A β 42(43)) oder eine spezifische Erhöhung von A β 42(43) allein bewirken (zur Übersicht: Fraser & St George-Hyslop, 1998; Younkin, 1998; Hardy, 1997). Insbesondere sei hier die sogenannte „Schwedische Mutation“ (Swedish (sw) mutation) erwähnt, da sie bei den Experimenten im Rahmen

dieser Arbeit eine wichtige Rolle gespielt hat (siehe Material und Methoden und Ergebnisse). Sie stellt eine doppelte Punktmutation im N-terminalen Bereich der A β -Domäne des β APP-Gens dar (Austausche K670N und M671L, ausgehend von β APP770) und ist in einer Schwedischen Familie mit („early-onset“) FAD beschrieben worden (Mullan et al., 1992). Interessanterweise führt diese Doppelmutation dazu, daß der Schnitt durch die β -Sekretase nicht erst nach Reinternalisierung über das Endosom, sondern bereits im späten Golgi-Apparat/in Golgi-Vesikeln stattfindet (Haass et al., 1995a; Haass et al., 1995b), wodurch eine Konkurrenz mit der im gleichen Kompartiment schneidenden α -Sekretase entsteht. Infolge dessen steht der γ -Sekretase mehr A β -Vorläufer (12-kDa-Fragment = C99) zur Verfügung, und es wird konsequenterweise mehr A β gebildet (Haass et al., 1995a). Offensichtlich bewirkt diese Mutation eine erhöhte Affinität von β APP zur β -Sekretase, was an einer 3- bis 6-fachen Erhöhung des Gesamt-A β ohne wesentliche Veränderung des A β 42(43)/Gesamt-A β -Verhältnisses in Zellkulturexperimenten deutlich wird (Citron et al., 1992; Cai et al., 1993; Dovey et al., 1993).

Obwohl kein unmittelbarer Zusammenhang zur Alzheimer-Krankheit besteht, ist an dieser Stelle erwähnenswert, daß auch im Gen für das Protein Tau, als Bestandteil der neurofibrillären Bündel ein wichtiges Charakteristikum der Alzheimer-Krankheit, verschiedene Mutationen beschrieben worden sind, die in Familien mit Chromosom-17-gekoppelter frontotemporaler Demenz und ähnlichen präsenilen Demenzen gefunden wurden (Hutton et al., 1998; Vogel, 1998; Hong et al., 1998; Spillantini et al., 1998). Neuropathologisches Korrelat bei diesen sogenannten Tauopathien ist das Auftreten von Neurofibrillenbündeln, aber ein Fehlen von Alzheimer-typischen Amyloid-Plaques. Demenzerkrankungen können also auch allein durch strukturelle Veränderungen von Tau hervorgerufen werden, ohne sekundär Amyloidablagerungen zu bewirken, was die Bedeutung des Proteins Tau und der Neurofibrillenbündel bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen unterstreicht.

Das ApoE4-Allel des ApoE-Gens auf dem langen Arm des Chromosoms 19 stellt einen natürlich vorkommenden Polymorphismus dar, der als genetischer Risikofaktor für die im späteren Alter auftretende „late-onset“-Alzheimer-Krankheit (im Gegensatz zur genetisch vererbten „early-onset“-Form) erkannt wurde (Roses, 1996). Drei Isoformen

des ApoE-Gens sind bekannt, die sich durch Aminosäurereste in den Positionen 112 und 158 unterscheiden, wobei Arginin-Reste in diesen Positionen das ApoE4-Allel kennzeichnen und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der Alzheimer-Krankheit signifikant erhöhen (zur Übersicht: Strittmatter & Roses, 1996; Van Gool et al., 1995). Das ApoE2-Allel dagegen, das an den Stellen 112 und 158 für zwei Cystein-Reste kodiert, scheint sich eher protektiv zu verhalten, während ApoE3 (Cystein + Arginin in den Positionen 112 und 158) bezüglich des Erkrankungsrisikos als neutral eingestuft wird (zur Übersicht: Rebeck, 1998; Roses, 1996). In primären Neuronen und neuronalen Zelllinien wurden für ApoE3 neurotrophische und neuroprotektive Wirkungen nachgewiesen, während diese Effekte bei ApoE4 nicht oder nur in geringerem Maße ausgeprägt waren (Narita et al., 1997; Fagan et al., 1996; Bellosta et al., 1995). Auf eine Beteiligung von ApoE an der Ausbildung synapto-dendritischer Verbindungen deuten Ergebnisse mit ApoE-defizienten Mäusen hin, bei denen die Ausbildung dendritischer Fortsätze gestört und die Zahl der synaptischen Verbindungen im Neokortex und Hippokampus reduziert war (Roses, 1996; Masliah et al., 1996). Der Einfluß von ApoE auf den β APP- und A β -Stoffwechsel ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. ApoE scheint die Aggregation von A β zu beeinflussen (Castano et al., 1995; Ma et al., 1994; Evans et al., 1995) und spielt auch eine Rolle beim Abbau bzw. der Aufnahme von A β durch die Zelle (Puttfarcken et al., 1997; Jordan et al., 1998). In Experimenten mit transgenen ApoE-knockout-Mäusen, die eine bestimmte Mutation von menschlichem β APP überexprimierten, konnte die Bedeutung von ApoE für die Ausbildung von Amyloid-Ablagerungen eindrucksvoll gezeigt werden (Bales et al., 1997; Bales et al., 1999). Dabei kam es zu einer drastischen Reduzierung der A β -Ablagerungen im Hippokampus und Neokortex jener Tiere, denen *ein* (ApoE^{+/-}) oder - noch deutlicher - denen *beide* Allele (ApoE^{-/-}) des ApoE-Gens fehlten (Bales et al., 1997; Bales et al., 1999). Interessanterweise wurde bei an der Alzheimer-Krankheit erkrankten Patienten mit einem oder zwei ApoE4-Allelen eine erhöhte Dichte der Amyloid-Plaques nachgewiesen (Schmechel et al., 1993), was entweder auf eine erhöhte Aggregation oder eine verringerte Abbaurate von A β als Folge des ApoE4-Einflusses zurückgeführt werden könnte.

Abschließend soll auch der kürzlich beschriebene Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus des α 2-Makroglobulins und dem erhöhten Erkrankungsrisiko für die spät einsetzende („late-onset“) Alzheimer-Krankheit erwähnt werden (Blacker et al., 1998; Liao et al., 1998). Dieser Befund wird derzeit noch kontrovers diskutiert und bedarf sicherlich größerer epidemiologischer Studien zur Abklärung der Rolle von α 2-Makroglobulin bei der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit.

1.4. Die Preseniline:

1.4.1. Struktur und Lokalisation der Preseniline:

Anhand computergestützter Sekundärstruktur-Algorithmen, durch *In-vitro*-Expression von C-terminal markierten Fusionsproteinen sowie durch *In-vivo*-Expression in *C. elegans* wurden für die Mitglieder der Presenilin-Familie verschiedene Topologie-Modelle entwickelt, denen zufolge Preseniline als polytopische Transmembranproteine zwischen 6 und 9 Transmembrandomänen aufweisen (Doan et al., 1996; De Strooper et al., 1997; Li & Greenwald, 1998; Nakai et al., 1999). In dieser Arbeit wird in den Abbildungen und Schemata durchgehend das Acht-Transmembrandomänen-Modell (Doan, 1996; Li & Greenwald, 1998; siehe Abb. 4) benutzt werden.

Die beiden beim Menschen vorkommenden Preseniline, PS1 und PS2, sind zu etwa 64 % identisch, wobei eine 95prozentige Übereinstimmung beim Vergleich der Transmembrandomänen und der C-terminalen Enden von PS1 und PS2 beobachtet werden kann. Wie oben schon geschildert, liegen FAD-assoziierte Presenilin-Mutationen praktisch ausschließlich in diesen auch zwischen humanem PS1 und PS2 hochkonservierten Bereichen (Abb. 4). Nur schwach konserviert ist dagegen das N-terminale Ende sowie der größte (C-terminale) Teil der großen hydrophilen Schleife zwischen TM6 und TM7. Sowohl die N- und die C-terminale Domäne des Presenilins als auch die große hydrophile Schleife zwischen TM6 und TM7 sind zum Zytosol hin orientiert (Doan et al., 1996; Li & Greenwald, 1996; De Strooper et al., 1997).

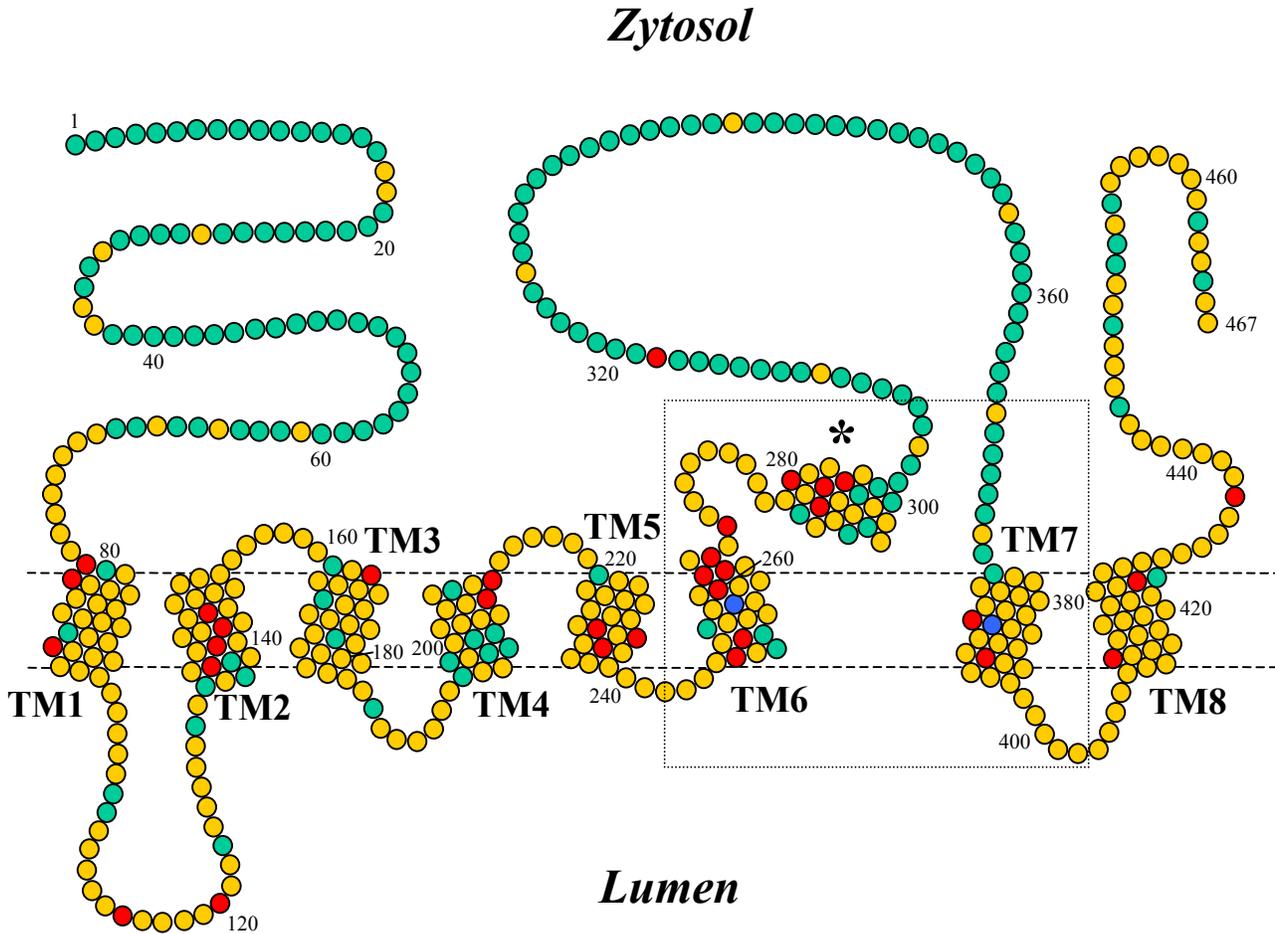


Abb. 4: Acht-Transmembrandomänen-Modell des Presenilin-(1)-Moleküls nach dem Acht-Transmembrandomänen-Modell (Doan, 1996; Li & Greenwald, 1998). Jeder Kreis entspricht einer Aminosäure, wobei die in der Evolution stark konservierten Aminosäurereste gelb und die mit der FAD assoziierten Reste rot dargestellt sind. Deutlich wird, daß die FAD-assoziierten Stellen in erster Linie in den konservierten Bereichen von PS1 liegen. Blau hervorgehoben sind die kritischen Aspartate in den vermuteten Transmembrandomänen 6 und 7. Zu beachten ist die zytosolische Orientierung der großen hydrophilen Anfangsabschnitt (*). Dieser enthält neben der PS1-Endoproteolyse-Stelle (siehe unten) auch die in dieser Arbeit untersuchte FAD-assoziierte Position 286 und ist samt TM6 und TM7 in Abb. 7 vergrößert dargestellt.

Die Preseniline sind intrazellulär überwiegend im endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat sowie einem dazwischen liegenden Kompartiment, dem sogenannten intermediären Kompartiment (IC) lokalisiert (Kovacs et al., 1996; Walter et al., 1996; Li et al., 1997; De Strooper et al., 1997). Innerhalb von primären Neuronen wurde eine polare Verteilung von ihnen beschrieben (Capell et al., 1997). Ferner konnten sie auch an den Enden der Wachstumsfortsätze von differenzierenden Neuronen nachgewiesen

werden (Capell et al., 1997). Ob PS-Proteine allerdings auch an der Zelloberfläche vorkommen, ist zur Zeit Gegenstand kontroverser Diskussionen (Ray et al., 1999; Dewji & Singer, 1997; Schwarzman et al., 1997). Letzteres ist insbesondere von Interesse bei der Beantwortung der Frage nach der Funktion der Presenilin-Moleküle (siehe unten).

PS1- und PS2-mRNA wird in einer Reihe von peripheren Geweben und im Gehirn exprimiert, wobei die Expression in embryonalem Hirngewebe am größten ist (Sherrington et al., 1995; Lee et al., 1996; Levy-Lahad et al., 1996). In Erwachsenengehirnen werden die Preseniline in vielen Neuronen-Populationen (Kovacs et al., 1996; Suzuki, 1996; Lee et al., 1996), allerdings auch in Gliazellen transkribiert (Sherrington et al., 1995; Rogaev et al., 1995; Lee et al., 1996). Bemerkenswerterweise weisen ausgerechnet jene Nervenzellpopulationen eine hohe PS- und APP-Expression auf, die von der Alzheimer-Krankheit in besonderem Maße in Mitleidenschaft gezogen werden, so z.B. Neuronen der hippocampalen CA-Felder, der medialen und corticalen Amygdala sowie des Neokortex; dagegen zeigen weniger Alzheimer-gefährdete Hirnareale eher geringere PS-Expressionsraten (Cribbs, 1996; Page et al., 1996; Lee et al., 1996).

1.4.2. Posttranslationale Modifikation und Endoproteolyse der Preseniline:

Biochemische Analysen konnten zeigen, daß PS1 und PS2 posttranslational weder sulfatiert, noch glykosyliert, noch acyliert werden (Cook et al., 1996; Walter et al., 1996; De Strooper, 1997). Es konnten jedoch im N-Terminus von PS2 (Walter et al., 1997b) und der großen hydrophilen Schleife zwischen TM6 und TM7 von PS1 und PS2 (Seeger et al., 1997; Walter et al., 1997b; De Strooper et al., 1997; Walter et al., 1998) verschiedene Serin-Reste identifiziert werden, die *in vivo* als Substrate für diverse Proteinkinasen fungieren. Die physiologische Bedeutung dieser PS-Phosphorylierung ist Gegenstand aktueller Forschung.

Nach ihrer Synthese im ER liegen die Preseniline zunächst als ca. 50 kDa große Holoproteine vor. Die Steady-state-Mengen dieser Holoproteine *in vivo* sind allerdings ausgesprochen gering, denn das 50 kDa-Polypeptid wird zum einen recht schnell und zum größten Teil abgebaut (siehe unten), zum anderen wird es allerdings auch in

geringerem Maße (bereits im ER) einer endoproteolytischen Prozessierung unterzogen, aus der zwei vergleichsweise stabile Spaltprodukte, ein ca. 30 kDa großes N-terminales (NTF) und ein etwa 20 kDa großes C-terminales Fragment (CTF) hervorgehen (Thinakaran et al., 1996) (siehe Abb. 5).

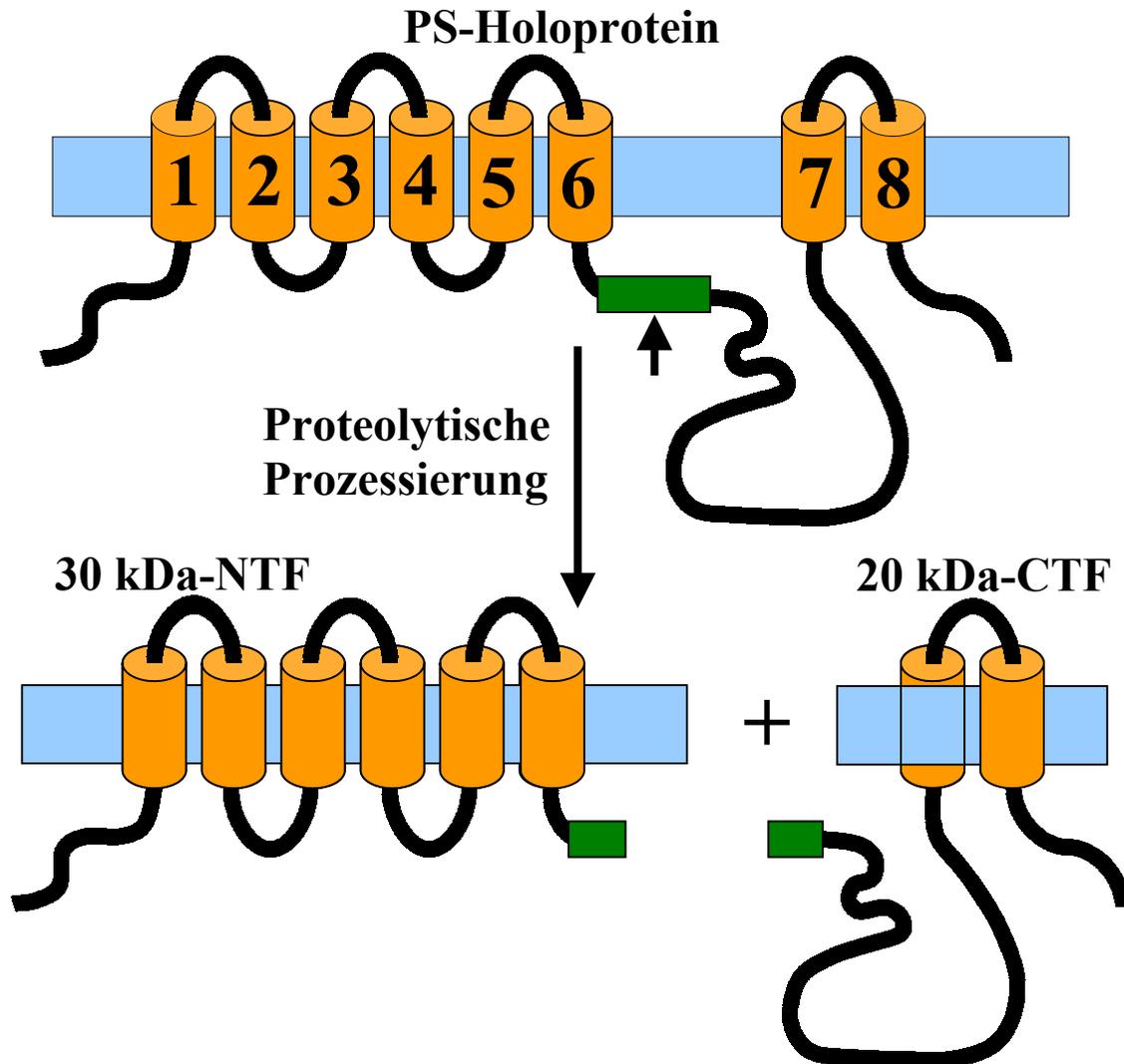


Abb. 5: Schematische Darstellung der proteolytischen Prozessierung des PS-Holoproteins. Die Endoproteolyse (Pfeil) führt zur Bildung eines ~30 kDa N-terminalen Fragments (NTF) und eines ~20 kDa C-terminalen Fragments (CTF). Sie findet innerhalb eines hydrophoben (möglicherweise α -helikalen (grünes Rechteck!)) konservierten Abschnitts der großen hydrophilen Schleife zwischen TM6 und TM7, der auch die in dieser Arbeit untersuchte FAD-Stelle 286 einschließt (vgl. auch mit Abb. 4 und Abb. 7).

Die konstitutive PS-Endoproteolyse-Stelle befindet sich in einem hydrophoben (möglicherweise α -helikalen) N-terminalen Abschnitt der großen hydrophilen Schleife zwischen TM6 und TM7 (nach dem Acht-Transmembrandomänen-Modell), bei PS1 höchstwahrscheinlich zwischen den Aminosäuren 292 und 299 (Thinakaran et al., 1996; Podlisny et al., 1997; Jacobsen et al., 1999; Steiner et al., 1999b), wobei die für die Endoproteolyse verantwortliche Protease („Presenilinase“) noch nicht identifiziert werden konnte. Im Steady-state unterliegt die Konzentration der PS-NTFs und -CTFs einer strengen Regulation, wie Experimente mit transfizierten Zelllinien und transgenen Mäusen zeigen konnten. Überexpression von PS1 führte in diesen Experimenten nämlich zu keiner Erhöhung der beiden PS-Fragmente (Thinakaran et al., 1997). Diese PS-Fragmente besitzen eine wesentlich längere Halbwertszeit als das PS-Holoprotein, das, im Überschuß synthetisiert, einem raschen, überwiegend proteasomalen Abbau unterworfen ist (Steiner et al., 1998). Nach ihrer Entstehung im ER erscheinen die PS-Fragmente in Golgi-ähnlichen Vesikeln, wo sie akkumulieren und besonders stabil sind (Zhang et al., 1998). Dabei bilden sie Heterodimere aus NTFs und CTFs und assoziieren zu höhermolekularen, etwa 100-150 kDa großen Komplexen, deren Halbwertszeit über 48 h liegt (Capell et al., 1998; Thinakaran et al., 1998; Steiner et al., 1998); diese Komplexe stellen wahrscheinlich die biologisch (und pathologisch) aktive Form der Preseniline dar (Capell et al., 1998; Steiner et al., 1998; Yu et al., 1998).

Interessant ist in diesem Zusammenhang der Fall der Δ Exon-9-Mutante (Perez-Tur et al., 1996), einer FAD-assoziierten Mutante, bei der es durch Deletion des vom Exon 9 kodierten Bereiches von PS1 zu einem Verlust der Endoproteolyse-Stelle und damit zum Ausfall der Holoprotein-Prozessierung kommt. Obwohl bei dieser Mutante offensichtlich keine Bildung der PS-Fragmente stattfindet, scheint sie dennoch mit einer regelrechten biologischen Presenilin-Funktion einherzugehen, wenn die eigentlich pathologische Punktmutation (Cystein in Position 290) korrigiert (durch Serin ersetzt wird), die Deletion aber beibehalten wird (Steiner et al., 1999a). Dies wird z.B. daran deutlich wird, daß Überexpression von PS1 Δ Exon-9 C290S in sel-12(*ar171*)-mutanten *C. elegans*, also Presenilin-defekten Nematoden (siehe unten), den mutanten Phänotyp wieder rückgängig macht (Steiner et al., 1999a). Diese Beobachtung läßt sich dadurch erklären, daß das unprozessierte Δ Exon-9-C290S-Presenilin den oben beschriebenen (biologisch aktiven)

PS-Komplex aus NTFs und CTFs in gewisser Weise imitieren kann und auf diese Weise stabilisiert und vor raschem Abbau geschützt wird (Steiner et al., 1999a). Biologisch funktionelles Presenilin setzt also nicht in jedem Fall die Bildung der PS-Fragmente voraus.

1.4.3. Biologische Funktion der Preseniline:

Die biologische Funktion der Preseniline ist eng verwoben mit der Funktion und Signalübertragung der Rezeptoren der Notch-Familie. Aus diesem Grund soll zum besseren Verständnis im folgenden kurz auf zellbiologische Aspekte der Notch-Signalübertragung eingegangen werden.

Zellbiologische Grundlagen der Notch-Signalübertragung:

Notch-Rezeptor-Gene sind bereits in einer Vielzahl von vielzelligen Organismen identifiziert worden, zu denen neben *C. elegans* mit seinen Notch-Homologen *lin-12* und *glp-1* auch *D. melanogaster* (*Notch*) und die Maus (*mNotch 1-4*) gehören (zur Übersicht: Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Greenwald, 1998). Notch-Rezeptoren sind Typ-I-Transmembranproteine, d.h. sie durchziehen - wie β APP - die Lipiddoppelschicht-Membran einmal, wobei die N-terminale Ectodomäne extrazellulär ausgerichtet ist (siehe Abb. 6).

Nach seiner Synthese im rauhen ER wird Notch zur Zellmembran transportiert, wobei der Rezeptor im Zuge seiner Maturierung zunächst von einer Furin-ähnlichen Konvertase (S1) im Golgi-Apparat bzw. Trans-Golgi-Netzwerk geschnitten wird (Logeat et al., 1998); die beiden entstehenden Fragmente bleiben dabei miteinander assoziiert und stellen wahrscheinlich die Form des Notch-Rezeptors dar, die an der Zytoplasma-Membran durch Bindung der Notch-Liganden, der von den Nachbarzellen auf ihren Oberflächen exprimierten Mitglieder der sogenannten DSL(Delta/Serrate/LAG-2)-Familie, aktiviert wird. Nach der Liganden-Bindung erfolgt - analog zur β APP-Prozessierung durch die α -Sekretase - ein zweiter proteolytischer Schritt (S2) durch das tumor necrosis factor- α (TNF α)-converting enzyme TACE, ein Mitglied aus der ADAM-

Familie (Mumm et al., 2000; Brou et al., 2000). Daraus geht das membranständige Fragment NEXT („Notch Extracellular Truncation“, Mumm et al., 2000) hervor, das in einem letzten proteolytischen Schritt (S3) durch eine noch nicht eindeutig identifizierte Protease innerhalb oder zumindest nahe an der Membran geschnitten wird (Schroeter et al., 1998; Chan & Jan, 1999).

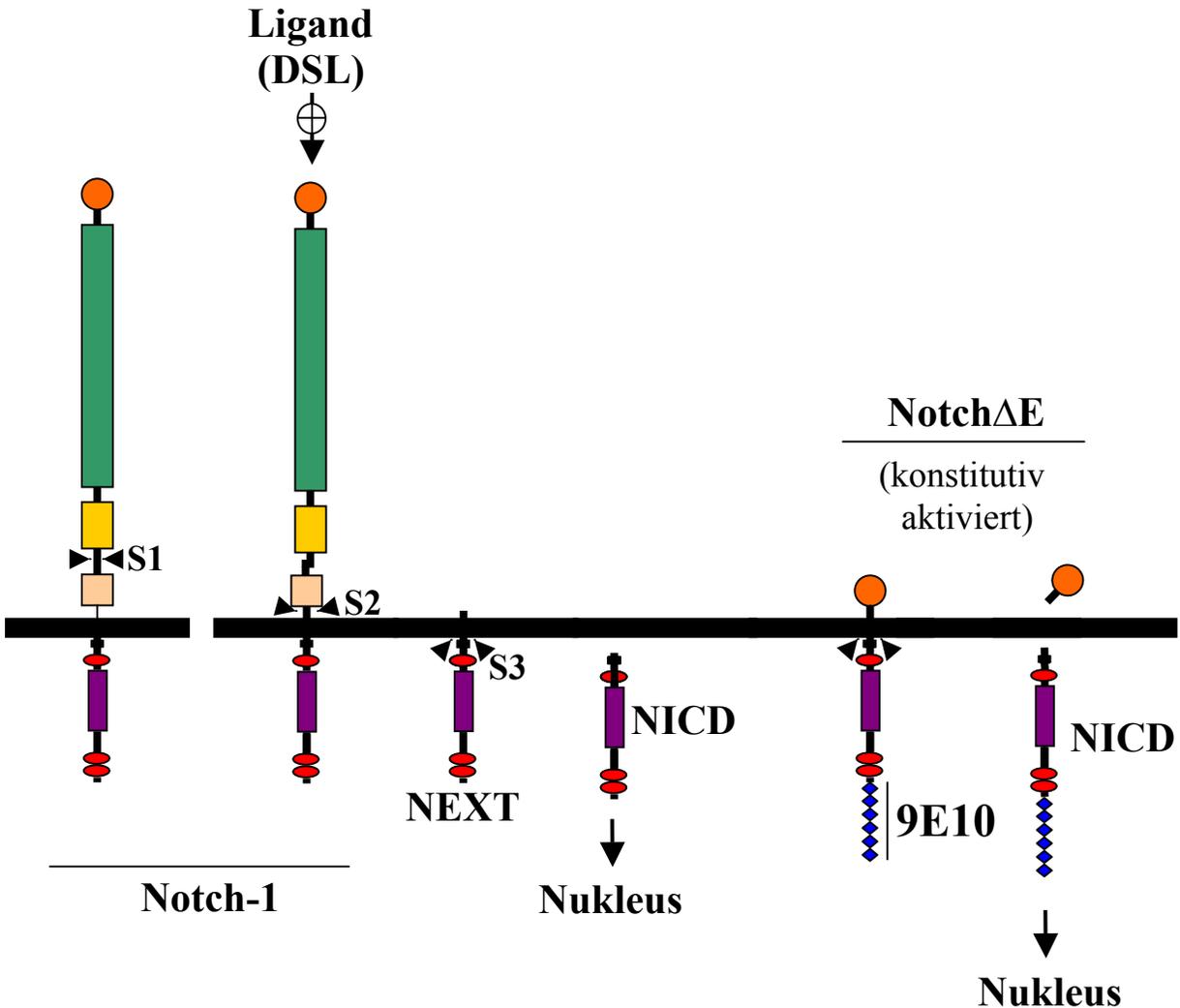


Abb. 6: Schematische Darstellung der Notch-Endoproteolyse. Auf dem Weg zur Plasmamembran wird Notch im Golgi-Apparat durch eine Furin-ähnliche Konvertase (S1) innerhalb seiner (N-terminalen) Ectodomäne geschnitten. Die extrazellulär orientierten Rezeptor-Teile bleiben miteinander assoziiert und binden an der Zytoplasma-Membran den Notch-Liganden (DSL). Durch einen zweiten Schnitt (S2) durch das tumor necrosis factor- α (TNF α)-converting enzyme TACE (Mumm et al., 2000; Brou et al., 2000) entsteht das Fragment NEXT („Notch Extracellular Truncation“, Mumm et al., 2000), das schließlich in einem weiteren (γ -Sekretase-ähnlichen) Endoproteolyse-Schritt durch eine nicht endgültig identifizierte Protease (S3) gespalten wird. Dieser S3-Schnitt setzt das C-terminale Fragment NICD frei, das daraufhin in den Zellkern wandert und dort mit Transkriptionsfaktoren interagiert. Verglichen mit Notch ist das N-terminal stark verkürzte Konstrukt Notch Δ E konstitutiv aktiviert und benötigt für den NICD-freisetzenden Endoproteolyse-Schritt keine Aktivierung durch Liganden. Außerdem ist es am C-terminus mit 6 myc-Epitopen versehen, die leicht mit dem Antikörper 9E10 detektiert werden können.

Der S3-Schnitt führt zur Freisetzung der „Notch Intracellular Cytoplasmic Domain“ (NICD), eines Protein-Fragments, das nach seiner Entstehung an der Plasmamembran in den Zellkern wandert und dort durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der CSL(CBF1/Suppressor of Hairless/LAG-1)-Familie seine biologische Wirkung entfaltet (Schroeter et al., 1998; Struhl & Adachi, 1998). Die nukleäre Translokation von NICD scheint damit eine Voraussetzung für die Notch-vermittelte Signalübertragung zu sein (Schroeter et al., 1998; Song et al., 1999).

Einen sehr wertvollen Beitrag zur Erforschung der NICD-Freisetzung in Zellkultursystemen stellt das von Schroeter et al. (1998) beschriebene mNotch-1-Konstrukt Notch Δ E dar (siehe Abb. 6). Es ist ein N-terminal deutlich verkürztes mNotch-1-Derivat, das konstitutiv aktiviert vorliegt, d.h. die NICD-Freisetzung bedarf bei Notch Δ E keiner vorher stattfindenden Aktivierung durch Bindung der Liganden der DSL-Familie, was im Hinblick auf die Arbeit mit transfizierten Zelllinien von großem Vorteil ist.

Hinweise auf die biologische Presenilin-Funktion in Modellorganismen:

Erste Hinweise auf die biologische Funktion der Preseniline lieferten Experimente mit den homologen Genen *spe-4*, *hop-1* und vor allem *sel-12* im Modellorganismus *C. elegans*.

Spe-4, das eine 24 %ige Identität mit dem menschlichen PS1 aufweist (Sherrington et al., 1995), wird in Spermatozyten von *C. elegans* exprimiert und ist in einer speziellen Organelle, der „fibrous-body membrane organelle“ (Arduengo et al., 1998), einem Golgi-Derivat, lokalisiert. Dort übernimmt es wahrscheinlich Funktionen bei der Sortierung und/oder dem Transport von Proteinen (Arduengo et al., 1998). *Spe-4*-Defektmutanten weisen zusätzlich eine Akkumulation von Tubulin in der Nähe der Plasmamembran der Spermatozyten auf, was ein Indiz für eine Störung von Transportprozessen als Folge des *spe-4*-Ausfalls ist (Arduengo et al., 1998).

Hop-1, das zweite Presenilin-Homolog, soll an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden; es entfaltet ähnliche, wenn auch nicht identische Funktionen wie *sel-12* (Li & Greenwald, 1997).

Sel-12 zeigt mit einer 47 %igen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit menschlichem PS1 eine vergleichsweise hohe Homologie zu den Wirbeltier-Presenilinen; es wurde durch Revertierung einer konstitutiv aktiven *lin-12/Notch*-Mutante identifiziert (Levitan & Greenwald, 1995) [*Lin-12 und glp-1 stellen als Notch-Homologe Typ-I-Transmembranrezeptoren dar (siehe oben), die an der Steuerung der Zelldifferenzierung und der lateralen Inhibition im Verlauf der Ontogenese von C. elegans beteiligt sind (Artavanis-Tsakonas et al., 1995). Lin-12/Notch-Funktionsverlust-Mutanten in C. elegans ähneln sehr den Mutanten, die man bei sel-12-Funktionsverlust-Mutationen vorfindet. Dieser sogenannte Notch-Phänotyp wird durch den funktionellen Ausfall der beiden PS-Homologen sel-12 und hop-1 sogar noch verstärkt (Westlund et al., 1999).*] Sel-12-defekte Nematoden zeigen einen charakteristischen Eiablagedefekt infolge einer gestörten Vulva-Entwicklung, an deren Steuerung die *lin-12/Notch*-Signalübertragung maßgeblich beteiligt ist; zudem weisen sie ein vom Wildtyp abweichendes Verhalten auf Temperaturreize auf (zur Übersicht: Baumeister & Haass, 1998). Interessanterweise wird der Eiablagedefekt-Phänotyp von *C. elegans*-*sel-12*-Mutationen wie *sel-12(ar131)* (entspricht dem Austausch C60S) durch Expression von menschlichem PS1 und PS2 revertiert, während FAD-assoziierte Mutationen von PS1 und PS2 diesbezüglich einen Funktionsverlust bewirken (Levitan et al., 1996; Baumeister et al., 1997).

Daß Preseniline die Notch-vermittelte Signalübertragung entscheidend beeinflussen, konnte auch in Experimenten mit *D. melanogaster* unter Beweis gestellt werden. Mutationen in *D. melanogaster*-PS führten - analog zu den Beobachtungen bei *C. elegans* - zu Phänotypen, die einer reduzierten Notch-Funktion recht ähnlich waren (Ye et al., 1999; Struhl & Greenwald, 1999).

Schließlich gelang es auch in Versuchen mit Mäusen, den Zusammenhang zwischen Notch-vermittelter Signalübertragung und Presenilin-Funktion aufzuzeigen. PS1^{-/-}-Mäuse sind durch schwere Störungen während ihrer Embryonalentwicklung gekennzeichnet. Sie weisen schwerwiegende Defekte in der Somitogenese sowie der Anlage des axialen Skeletts und der Rippen auf, allesamt Entwicklungsstörungen, die man auch bei Mäusen mit funktionslosem Notch beobachten kann (Shen et al., 1997; Wong et al., 1997; Zhang & Gridley, 1998). Ein doppelter knockout von PS1 und PS2 (PS1^{-/-}/PS2^{-/-}) in Mäusen führt sogar zu einem Phänotyp, der fast identisch ist mit dem Notch^{-/-}-Phänotyp

(Herreman et al., 1999; Donoviel et al., 1999). Interessant ist an dieser Stelle die Beobachtung, daß PS1^{-/-}-Mäuse embryonal ähnliche vaskuläre Veränderungen zeigen, die man auch bei der „Cerebralen Autosomal-Dominanten Arteriopathie mit Subcortikalem Infarkt und Leukoenzephalopathie“ (CADASIL), einer mit Schlaganfall und Demenz einhergehenden, mit Störungen in der Notch-Signalübertragung assoziierten Krankheit des Menschen, beobachten kann (Joutel et al., 1996; Gridley, 1996; Hennerici, 1995). Wie bei sel-12-defizienten *C. elegans* konnte auch bei PS1^{-/-}-Mäusen die Expression von menschlichem (Wildtyp-)PS1 den Notch-Phänotyp, im Falle der Mäuse also die Störungen in der Embryonalentwicklung, verhindern; im Gegensatz zu *C. elegans* funktionierte dieser „rescue“ allerdings auch bei Expression von FAD-Mutationen tragendem PS1 (Davis et al., 1998; Quian et al., 1998). Möglicherweise spielen bei Mäusen neben Notch u.U. auch andere Presenilin-abhängige Faktoren eine Rolle, so z.B. δ -Catenin, ein intrazellulärer Bestandteil von Zell-Zell-Adhäsionskomplexen und Mitglied der sogenannten Armadillo-Protein-Familie, für welches in „Yeast-two-hybrid“-Analysen und Koimmunpräzipitationsstudien (ebenso wie für β -Catenin) eine Interaktion mit PS1 gezeigt werden konnte (Zhou et al., 1997; Yu et al., 1998).

Hinweise auf die Presenilin-Funktion aus Zellkulturexperimenten:

Die beschriebenen Beobachtungen bei den Modellorganismen deuteten auf eine Rolle der Preseniline bei Notch-abhängigen Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen hin. Wie aber die Preseniline in die Notch-Signal-Übertragung eingreifen, konnte erst in neueren Untersuchungen an kultivierten Zellen geklärt werden, die zeigten, daß sowohl PS1 (De Strooper et al., 1999; Struhl & Greenwald, 1999; Ye et al., 1999, Capell et al., 2000) als auch PS2 (Steiner et al., 1999c) die Endoproteolyse des Notch-Rezeptors an der Plasmamembran und damit auch die Freisetzung von NICD steuern. Das Fehlen eines intakten PS-Genproduktes war dabei mit einer drastischen Reduktion der Entstehung und nukleären Translokation von NICD vergesellschaftet. In PS1^{-/-}-Zellen war diese allerdings nicht gänzlich supprimiert, was u.U. mit einer redundanten Wirkung von PS2 erklärt werden könnte (De Strooper et al., 1999).

Wie in 1.4. schon angeschnitten, üben die Preseniline auch auf den β APP-Stoffwechsel einen Einfluß aus, da FAD-Mutationen spezifisch die A β 42/43-Menge gegenüber der von A β 40 relativ erhöhen und damit offensichtlich den γ -Sekretase-Schnitt bei der β APP-Prozessierung beeinflussen. In kultivierten PS1-defizienten hippocampalen Neuronen (De Strooper et al., 1998) und primären Fibroblasten (Naruse et al., 1998) wurde der Einfluß auf die γ -Sekretase-Aktivität dadurch deutlich, daß in diesen PS1^{-/-}-Zellen eine starke Verminderung der A β -Produktion einerseits, und eine Akkumulation von β APP-C-terminalen Fragmenten andererseits zu verzeichnen war, was auf eine Verringerung des γ -Sekretase-Schnittes hinweist (DeStrooper et al., 1998; Naruse et al., 1998). Die Preseniline scheinen damit also einen generellen Einfluß auf die Bildung von A β zu haben und sind daher u.U. auch für die sporadische Form der AK von Bedeutung. Interessanterweise wurde in Experimenten mit PS1-knockout-Fibroblasten eine im Vergleich zu Zellen mit intaktem PS1 erhöhte Sekretion von β APP und APLP2 nachgewiesen; ebenso konnte ein veränderter Transport des membranständigen TrkB-Rezeptors an die Zelloberfläche gezeigt werden, was dafür spricht, daß den Presenilinen möglicherweise eine allgemeine Funktion beim intrazellulären Transport von Membranproteinen zukommen könnte (Naruse et al., 1998).

Neben den Studien mit β APP und Notch deuten neuere Untersuchungen darauf hin, daß es auch andere Presenilin-abhängige Typ-I-Membranproteine geben könnte, deren Transport und/oder Prozessierung auf intakte PS-Moleküle angewiesen ist, so z.B. das sogenannte „unfolded protein response“ (UPR)-Protein Ire-1, ein ER-Protein, das nach seiner proteolytischen Spaltung (ähnlich wie NICD) in den Zellkern gelangt (Niwa et al., 1999).

Wie Preseniline letztendlich genau wirken und ihre Funktion ausüben, ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Verschiedene Alternativen wären vom heutigen Standpunkt aus denkbar (siehe auch Diskussionsteil dieser Arbeit):

- Preseniline beeinflussen direkt oder indirekt den Transport von β APP, Notch, etc.
- Preseniline steuern den Transport der β APP, Notch, usw. schneidenden Protease(n)
- Preseniline sind ein wesentlicher Kofaktor der β APP, Notch, usw. schneidenden Protease(n)

- Preseniline selbst stellen Proteasen dar, die Notch, β APP, usw. prozessieren können

Insbesondere die letzte Hypothese (Wolfe et al., 1999c) erscheint überaus attraktiv und wird im Diskussionsteil dieser Arbeit ausführlich erörtert werden. An dieser Stelle soll lediglich das Prinzip kurz skizziert werden, das der sogenannten „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“ zugrundeliegt.

Die „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“:

Wie der Name schon andeutet, spielen bei dieser Hypothese zwei (hochkonservierte) Aspartat-Reste, nämlich D257 und D385 bei PS1 und die dazu homologen Reste bei PS2, eine herausragende Rolle (siehe Abb. 1.5.1.). Sie liegen innerhalb der vermuteten Transmembrandomänen 6 und 7 von PS (nach dem Acht-Transmembran-Modell, siehe oben), und ihre Mutation führt - ähnlich wie die beschriebene vollständige Ablation der Preseniline (De Strooper et al., 1998) - zu einer drastischen Reduzierung der A β 40- und A β 42/43-Produktion (Wolfe et al., 1999a; Leimer et al., 1999; Steiner et al., 1999c, Haass & De Strooper, 1999). Gleichzeitig findet sich bei den Austauschen der beiden Aspartate eine Inhibition der PS-Endoproteolyse (Wolfe et al., 1999a). Diese Beobachtungen und weitere Experimente, bei denen gezeigt werden konnte, daß sich die Aktivität der γ -Sekretase durch Aspartyl-Protease-Inhibitoren hemmen läßt (Wolfe et al., 1999b), veranlaßten Wolfe et al. die „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“ zu formulieren und für die Preseniline eine Rolle als neuartige Aspartyl-Proteasen mit innerhalb der Membran gelegenen katalytischen Zentren zu postulieren (Wolfe et al., 1999c). Nach diesem Modell werden die Preseniline zunächst durch Autoproteolyse aktiviert, wobei die daraus hervorgehenden N- und C-terminalen Fragmente (Thinakaran et al., 1996) miteinander assoziieren und einen biologisch aktiven Komplex bilden (Capell et al., 1998; Thinakaran et al., 1998; Yu et al., 1998; Seeger et al., 1997). Dieser Komplex schließlich soll dazu befähigt sein, die intramembranöse proteolytische Spaltung von β APP (genauer: von β APP-CTFs, siehe oben) zu vollziehen (Wolfe et al., 1999a; Wolfe et al., 1999c). Die Tatsache, daß nicht nur die Ablation von PS (De Strooper et al., 1999; Chan & Jan, 1999), sondern auch die Mutierung der beiden kritischen Aspartate in PS1 oder PS2 (Ray

et al., 1999) ebenfalls eine Inhibition der Notch-Endoproteolyse zur Folge hat, stellt für Anhänger der „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“ einen Anhaltspunkt dafür dar, daß die Preseniline auch an der Prozessierung des Notch-Rezeptors unmittelbar (proteolytisch) beteiligt sein könnten. Dies wird durch die Ähnlichkeit des intramembranösen γ -Sekretase-Schnittes mit dem innerhalb oder nahe an der Membran stattfindenden Notch-Prozessierungsschnitt (Schroeter et al., 1998; Chan et al., 1999) unterstützt; überdies lassen sich beide Proteolyse-Schritte durch Aspartyl-Protease-Inhibitoren hemmen (De Strooper et al., 1999), was zumindest die Möglichkeit offenläßt, daß Notch und β APP von ein und derselben (Aspartyl-)Protease geschnitten werden.

1.5. Fragestellung: Effekte von PS1-Punktmutationen auf die Presenilin-Funktion:

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eventuelle Effekte von in Aminosäureposition 286 von PS1 künstlich eingeführten Mutationen auf die Presenilin-Funktion aufzudecken (Abb. 7). Das Kodon 286 wurde ausgewählt, weil ein Austausch L286V in früheren Arbeiten als FAD-assoziierte Mutation beschrieben worden war (Sherrington et al., 1995). Darüber hinaus liegt diese Stelle in einem kritischen Bereich des PS1-Moleküls: dem N-terminalen Abschnitt der großen hydrophilen Schleife zwischen den vermuteten Transmembrandomänen Nr. 6 und Nr. 7 von PS1 (Abb. 7). Für diesen Abschnitt sind bereits zahlreiche andere FAD-Mutationen dokumentiert worden (Haass, 1997). Er ist hochkonserviert unter den PS1-Proteinen verschiedener Spezies und praktisch identisch zwischen dem PS-1 und dem PS-2 diverser Organismen (Leimer et al., 1999). Teil dieses N-terminalen Schleifen-Abschnitts ist ein von Exon 8 und Exon 9 kodierter Übergangsbereich, der sich durch eine große Anzahl hydrophober Aminosäure-Reste auszeichnet und die Stelle L286 einschließt (Abb. 7). In unmittelbarer Nähe und noch innerhalb dieser hydrophoben Domäne befindet/befinden sich die vorgeschlagene(n) Prozessierungsstelle(n) von PS1 und PS2 (Thinakaran et al., 1996; Podlisny et al., 1997; Jacobsen et al., 1999; Steiner et al., 1999b).

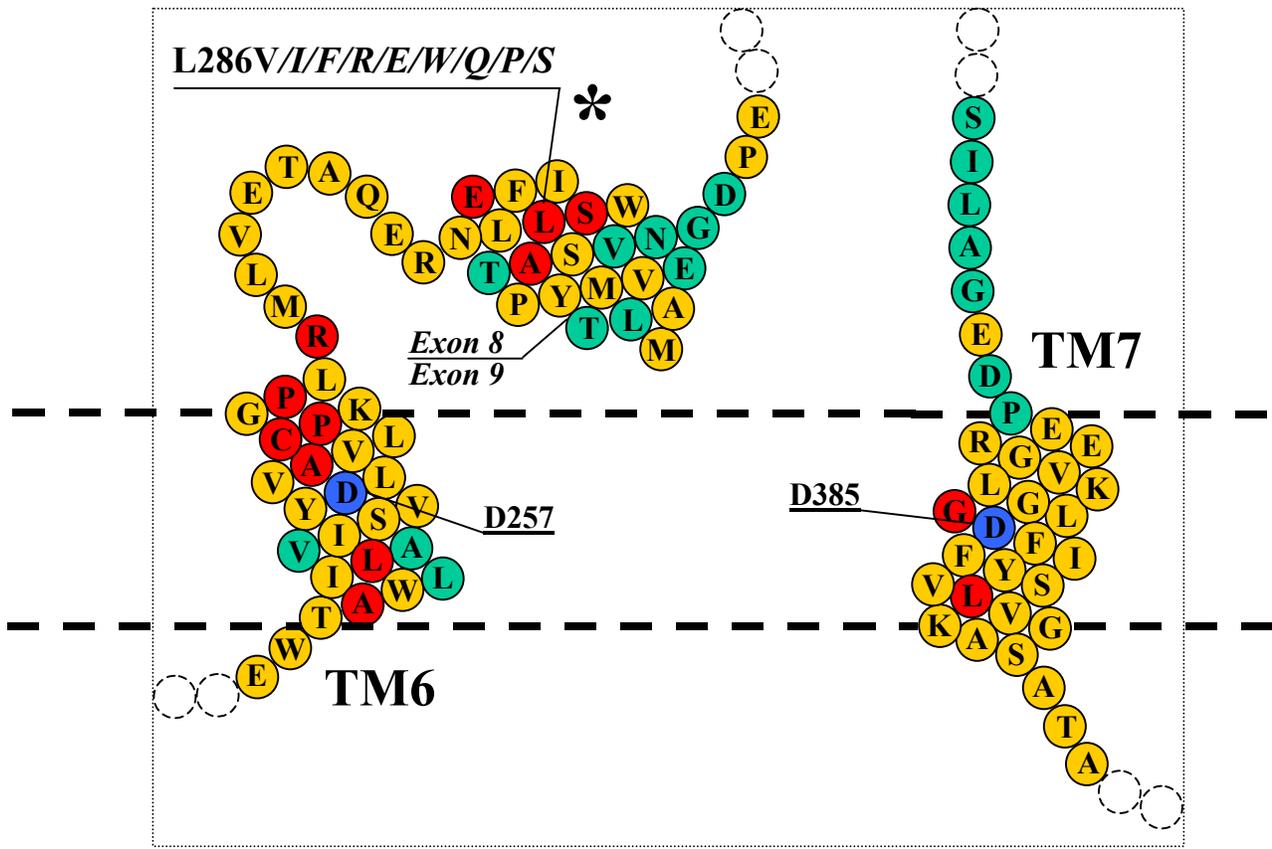


Abb. 7: Aus Abb. 4 heraus vergrößerter N-terminaler Anfangsabschnitt der großen hydrophilen Schleife zwischen den vermuteten Transmembrandomänen 6 und 7 von PS1 mit der durchmutierten FAD-assoziierten Stelle 286. Neben der Original-(FAD-)Mutation L286V sind auch die 8 artifiziellen Austausche zu sehen (kursiv gedruckt). Gelb dargestellt sind die in der Evolution hochkonservierten, rot die FAD-assoziierten Aminosäure-Positionen. Die beiden blauen Kreise in TM6 und TM7 entsprechen den für die PS1-Funktion kritischen Aspartaten D257 und D385. Zu beachten ist die Lage von L286 in dem hydrophoben (möglicherweise α -helikalen) Bereich am Übergang von Exon 8 zu Exon 9 (*). Hier findet auch die endoproteolytische Prozessierung des PS1-Moleküls statt.

Ein erstes Anliegen dieser Arbeit war die Abklärung der Frage, ob die in der Position 286 künstlich eingeführten Mutationen sowie die Original-Mutation L286V angesichts der räumlichen Nähe zu der/den beschriebenen PS-Prozessierungsstelle(n) einen eventuellen Einfluß auf die PS-1-Prozessierung ausüben oder nicht. In früheren Arbeiten konnte in Experimenten mit Zelllinien, die mit mutanten (FAD-)PS-Konstrukten transfiziert worden waren (Mercken et al., 1996; Murayama et al., 1997), und Lymphoblasten-Kulturen von Patienten mit unterschiedlichen FAD-Mutationen (Takahashi et al., 1999) eine Beeinträchtigung der PS-Prozessierung durch bestimmte PS-Mutationen beobachtet werden. Ein weiterer Schwerpunkt sollte ferner auf der Beantwortung der Frage liegen,

ob die verschiedenen in 286 eingeführten Mutationen (L286-Austausche) die Endoproteolyse von β APP gleichermaßen beeinflussen wie die von Notch. Die im Verlauf dieser Arbeit bekannt gewordenen Einzelheiten über die Effekte der Mutagenisierung der kritischen Aspartate in den vermuteten Transmembrandomänen 6 und 7 von PS1 und PS2 (Wolfe et al., 1999a; Steiner et al., 1999c) offenbarten, daß auch bestimmte Punktmutationen in den Presenilinen - und nicht nur deren vollständige Ablation - durchaus mit einem Verlust der Funktion dieser Proteine, nämlich der Inhibition der β APP- und Notch-Endoproteolyse, einhergehen können. Diese Beobachtungen haben zur Formulierung der oben geschilderten „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“ durch Wolfe et al. (1999c) geführt. Welche Effekte wären aber bei der Mutagenisierung der Stelle 286 zu erwarten gewesen, eines außerhalb des von Wolfe et al. vorgeschlagenen „aktiven Zentrums“ gelegenen PS1-Abschnittes? Die Einführung von 8 in ihren biochemischen Eigenschaften unterschiedlichen Aminosäure-Resten sollte diese Frage klären helfen. Zu den anstelle von Leucin eingeführten künstlichen Mutationen gehörten dabei Aminosäuren ganz verschiedener Gruppen, unter denen solche mit apolaren (I), polaren ungeladenen (S,Q), großen sperrigen aromatischen Seitengruppen (F,W) sowie sauren (E) und basischen (R) Resten vertreten waren. Als „Helixbrecher“ wurde ferner auch die Iminosäure Prolin (P) anstelle von L286 eingesetzt (siehe auch Abb. 7). Zum ersten Mal sollte durch diese systematische Mutagenisierung auch der Einfluß von verschiedenen Aminosäure-Austauschen an ein und derselben (FAD-assoziierten) Stelle innerhalb des PS1-Moleküls auf die pathologische A β -Produktion hin getestet werden. Die Frage, ob Mutationen in der gleichen Position des Presenilin-1-Proteins das Verhältnis A β 42(43)/Gesamt-A β gleichermaßen oder vielleicht doch in individueller Weise beeinflussen können, sollte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Herstellung von cDNA-Konstrukten:

2.1.1. Herstellung von mutagenisierten DNA-Fragmenten mittels PCR:

Die Synthese der PS1-cDNA-Konstrukte erfolgte mit Hilfe der „PCR-overlap-extension-Methode“ (Higuchi et al., 1988; Ho et al., 1989) zur in-vitro-Mutagenese ausgehend von einem Wildtyp-PS1-cDNA enthaltenden Vektor. Hierzu wurden insgesamt jeweils 2 PCR-Läufe gefahren, wobei im ersten Lauf die die jeweilige Mutation enthaltenden Vorwärts-/Rückwärts-Oligonukleotidprimer (PS1-X-F/PS1-X-R) mit dem entsprechenden außerhalb der PS1-Sequenz bindenden Rückwärts-/Vorwärtsprimer (187F/1660R) und der PS1wt-cDNA inkubiert wurden.

Eingesetzte Oligonukleotidprimer (die die jeweilige Aminosäure in Position 286 des PS1-Moleküls codierenden Triplets sind unterstrichen):

Vorwärtsprimer: (PS1-X-F)	Rückwärtsprimer: (PS1-X-R)	Kodierte Aminosäure in Position 286:
5'-CCAGCT <u>ATC</u> ATTTACTCC-3'	5'-GGAGTAAAT <u>GAT</u> AGCTGG-3'	Isoleucin
5'-CCAGCT <u>TTT</u> ATTTACTCC-3'	5'-GGAGTAAAT <u>GAA</u> AGCTGG-3'	Phenylalanin
5'-CCAGCT <u>CGC</u> ATTTACTCC-3'	5'-GGAGTAAAT <u>GCG</u> AGCTGG-3'	Arginin
5'-CCAGCT <u>GAG</u> ATTTACTCC-3'	5'-GGAGTAAAT <u>CTC</u> AGCTGG-3'	Glutamat
5'-CCAGCT <u>TGG</u> ATTTACTCC-3'	5'-GGAGTAAAT <u>CCA</u> AGCTGG-3'	Tryptophan
5'-CCAGCT <u>CAG</u> ATTTACTCC-3'	5'-GGAGTAAAT <u>CTG</u> AGCTGG-3'	Glutamin
5'-CCAGCT <u>CCC</u> ATTTACTCC-3'	5'-GGAGTAAAT <u>GGG</u> AGCTGG-3'	Prolin
5'-CCAGCT <u>TCC</u> ATTTACTCC-3'	5'-GGAGTAAAT <u>GGA</u> AGCTGG-3'	Serin

187F (Vorwärtsprimer, bindet 5' vom offenen Leserahmen von PS1):

5'-CCGAATTCAAGAAAGAACCTCAA-3' (EcoRI-Erkennungssequenz ist unterstrichen)

Material und Methoden

1660R (Rückwärtsprimer, bindet 3' vom offenen Leserahmen von PS1):

5'-CCGGATCCGCAAATATGCTAGAT-3' (BamHI-Erkennungssequenz ist unterstrichen)

Vektor:

pcDNA3.1/Zeo(-) (Invitrogen): Expressionsvektor für Mammalia-Zelllinien mit Ampicillin- und Zeocin-Resistenzen; Vektor-Karte: siehe Anhang

Verwendete Materialien:

10X PCR-Puffer (mit MgSO ₄) (Roche):	dNTP (PCR Nucleotide Mix, Roche):	Pwo-DNA-Polymerase (Roche):
100 mM Tris-HCl, pH 8,85 (20 °C) 250 mM KCl 50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM MgSO ₄	Natriumsalze von dATP, dCTP, dGTP und dTTP, jeweils 10 mM in H ₂ O (pH 8,3)	5 U/μl in entsprechendem Puffer (Roche)

1. PCR-Lauf:

Es wurden insgesamt 2X8 (a) und b)) Ansätze durchgeführt:

a) 84,5 μl H₂O

10 μl 10X PCR-Puffer (mit MgSO₄)

2 μl dNTP

1 μl PS1-X-F

1 μl 1660R

1 μl psg5 (mit PS1wt-cDNA)

0,5 μl Pwo-Polymerase

(8 Ansätze)

b) 84,5 μl H₂O

10 μl 10X PCR-Puffer (mit MgSO₄)

2 μl dNTP

1 μl PS1-X-R

1 μl 187F

1 μl psg5 (mit PS1wt-cDNA)

0,5 μl Pwo-Polymerase

(8 Ansätze)

PCR-Zyklen-Programm:

5 min. 94 °C	1 X
1 min. 94 °C	3 X
3 min. 48 °C	
1 min. 72 °C	
1 min. 94 °C	15 X
1 min. 55 °C	
1 min. 72 °C	
7 min. 72 °C	1 X

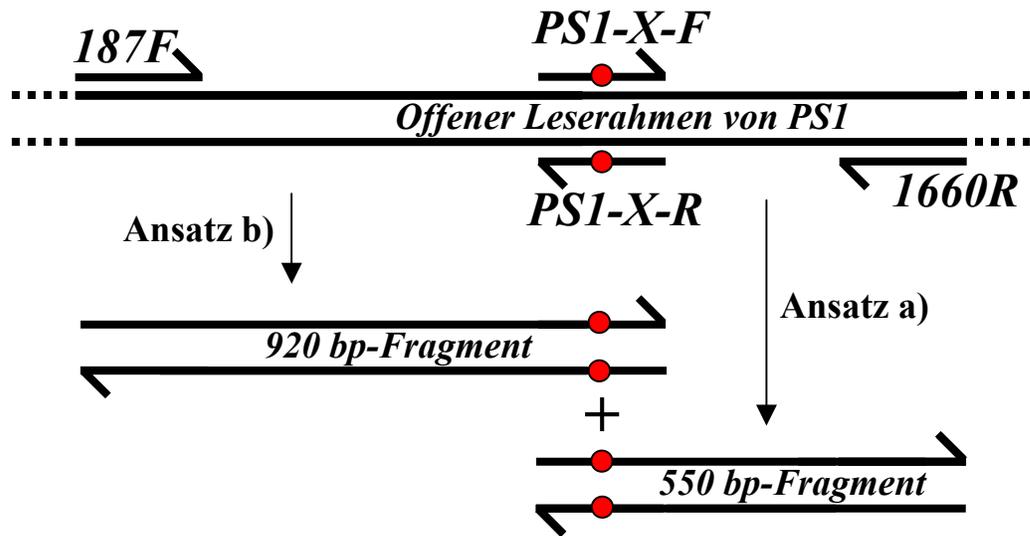


Abb. 8: Schematische Darstellung des 1. PCR-Laufs.

Den insgesamt 16 Ansätzen dieser ersten PCR-Reaktion (8 a)- und 8 b)-Ansätze) wurde nach abgelaufener Reaktion je 25 µl 5x-DNA-Probenpuffer zugesetzt; die Proben wurden dann auf einem 1% Agarose-Minigel bei 120 V aufgetrennt. Schließlich wurden die 16 Produkte des 1. PCR-Laufs mit Hilfe des im Gel enthaltenen Ethidiumbromids (2 µl/80ml Agarose) unter 302 nm UV-Licht sichtbar gemacht und aus dem Gel als ca. 550 bp lange (Ansätze a)) bzw. ca. 920 bp lange DNA-Fragmente (Ansätze b)) ausgeschnitten. Im folgenden wurden die ausgeschnittenen Gelstückchen mit den DNA-Fragmenten mit Hilfe eines Skalpell zerkleinert, mit ca. 300 µl Phenol vermischt, gevortext und im Gefrierschrank bei -80 °C übernacht verwahrt. Am folgenden Tag erfolgte die Phenol/Chloroform-Extraktion und Präzipitation der DNA-Fragmente.

Ethidiumbromid:	5X DNA-Probenpuffer:	10X TBE-Laufpuffer (der Agarosegelelektrophorese):
10 mg/ml	15 % (w/v) Glycerol 0,5 % (w/v) SDS 0,15 % (w/v) Bromphenolblau 25 mM EDTA 5 mM Tris-HCl (pH 7,5)	0,9 M Tris-Borat

Material und Methoden

Herstellung des Agarosegels:

Zur Herstellung des Agarose-Minigels wurden 0,8 g Agarose mit 1X TBE-Puffer auf 80 ml Endvolumen aufgefüllt und in der Mikrowelle bis zum Kochen der Lösung erhitzt. Nachdem sich die flüssige Agarose etwas abgekühlt hatte, wurden 2 µl Ethidiumbromid zugegeben und das Gel gegossen.

Als Gußform diente ein Minigelschlitten (owl Separation Systems) mit einem entsprechenden sechszähligen Kamm.

Phenol/Chloroform-Extraktion und DNA-Präzipitation:

Verwendete Materialien:

Phenol (pH 8,0):	Chloroform („Ready Red“):	NaOAc-Lösung:
Phenol gesättigt mit 100 mM Tris-HCl pH 8,0 und 0,1 % (w/v) Hydroxychinolin als Reduktionsmittel	Chloroform:Isoamylalkohol (Appligene)	3 M Natriumacetat in dest. H ₂ O

Ansatz:

- 10 min. Zentrifugation der Phenol-Gelstückchen-Gemische bei 14000 rpm
- Überführung der Überstände in neue Eppendorf-Gefäße mit je 200 µl Chloroform („Ready Red“)
- Nach Vortexen und 5 min. Zentrifugation (bei 5000 rpm) erneut Überführung der Überstände in neue Eppendorf-Gefäße
- Jeweils Zugabe von 1/10 Vol. 3 M NaOAc-Lösung und 0,8 Vol. Isopropanol
- Nach heftigem Vortexen: 30 min. Inkubation auf Eis
- 15 min. Zentrifugation bei 14000 rpm (Kühlzentrifuge, 4 °C)
- Waschen der DNA-Pellets mit je 500 µl 70% Ethanol
- 10 min. Zentrifugation bei 14000 rpm, 4 Grad Celsius
- Verwerfen der Überstände und Trocknen der Pellets
- Aufnahme der DNA-Pellets in je 20 µl bidest. H₂O

Nach Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Präzipitation der DNA wurden in einem erneuten PCR-Lauf jeweils die passenden Fragmente der ersten PCR-Reaktion zusammen mit den bereits eingesetzten Primern 187F und 1660R inkubiert.

2. PCR-Lauf (8 Ansätze):

75,5 µl H₂O
10 µl 10X PCR-Puffer
2 µl dNTP
1 µl 187F
1 µl 1660R
5 µl isoliertes 550 bp-Fragment
5 µl isoliertes 920 bp-Fragment
0,5 µl Pwo-Polymerase

PCR-Zyklen-Programm: siehe oben

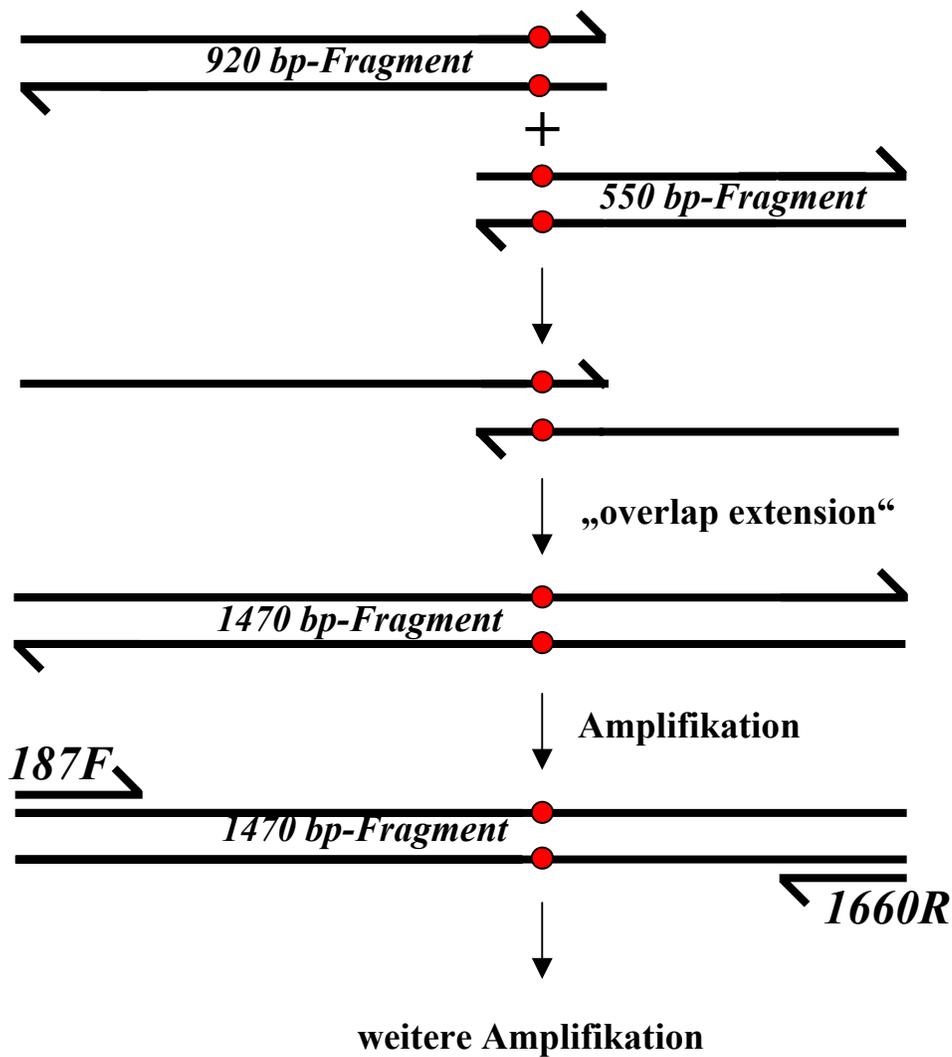


Abb. 9: Schematische Darstellung des 2. PCR-Laufs.

Material und Methoden

Die Produkte der 2. PCR-Reaktion (ca. 1470 bp lange DNA-Fragmente) wurden ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt und die DNA - wie oben bereits beschrieben - isoliert und in je 20 µl bidest. H₂O aufgenommen. Im folgenden wurde ein vierstündiger Verdau der insgesamt 8 isolierten DNA-Fragmente und des Zeocin-/Ampicillin-Resistenz-haltigen Vektors pcDNA3.1/Zeo(-) mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI durchgeführt.

2.1.2. DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen:

Verwendete Materialien:

10X Restriktionspuffer „SuRE/Cut Buffer B“, pH 8,0 (Roche):	Restriktionsendonukleasen EcoRI/BamHI (Roche):
10 mM Tris-HCl 5 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 1 mM β-Mercaptoethanol	jeweils 10 U/µl in entsprechendem Puffer (Roche)

Restriktionsansatz:

20 µl isolierte DNA
5 µl 10X Restriktionspuffer
23 µl bidest. H₂O
1 µl EcoRI
1 µl BamHI

(8 Ansätze)

Das Gemisch wurde 4 h lang bei 37 °C inkubiert. Der Verdau des Vektors pcDNA3.1/Zeo(-) erfolgte analog unter Einsatz der gleichen Restriktionsenzyme (5 µg Vektor-DNA kamen hierbei zum Einsatz). Nach erfolgtem Verdau wurde erneut eine Phenol/Chloroform-Extraktion und DNA-Präzipitation durchgeführt. Die 8 restringierten ca. 1470 bp langen Produkte des 2. PCR-Laufs (die späteren PS1-Inserts) wurden in je 20 µl H₂O aufgenommen und später zur Ligation eingesetzt; der restringierte Vektor wurde gleichermaßen behandelt, allerdings vor seinem Einsatz in der Ligationsreaktion einer Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase (Roche) unterzogen.

2.1.3. Dephosphorylierung des restringierten Vektors:

Verwendete Materialien:

10X CIP-Puffer (Roche):	CIP (Roche):
500 mM Tris-HCl (pH 8,3) 10 mM Spermidin 10 mM MgCl ₂ 1 mM ZnCl ₂	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, 1 U/μl

Dephosphorylierungsansatz (beispielhaft für 1 μg Vektor-DNA dargestellt):

1 μg Vektor-DNA
2 μl CIP-Puffer
1 μl CIP
aufgefüllt mit bidest. H₂O auf 20 μl

Nach 30 min. Inkubation bei 37 °C wurde die Dephosphorylierungsreaktion durch eine 20 min. Inkubation des Ansatzes bei 65 °C arretiert. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Präzipitation wurde die nun dephosphorylierte Vektor-DNA in 20 μl H₂O aufgenommen.

Die zusätzliche Dephosphorylierung des Vektors mit Alkalischer Phosphatase sollte eine Selbstligation des Vektors (ohne Insert) in der anschließenden Ligationsreaktion verhindern. Die Ligation wurde jeweils mit dem dephosphorylierten Vektor pcDNA3.1/Zeo(-) und den 8 mit EcoRI/BamHI restringierten Produkten des 2. PCR-Laufs (=PS1-Inserts) bei Raumtemperatur übernacht durchgeführt.

2.1.4. Ligationsreaktion:

Verwendete Materialien:

T4-DNA-Ligationspuffer (Roche):	DNA-Dilutionspuffer (Roche):	T4-DNA-Ligase:
2X konz.	5X konz.	5 U/μl in entsprechendem Puffer (Roche)

Material und Methoden

Ligationsansatz:

1 µl Vektor-DNA (dephosphoryliert)
 5 µl Insert-DNA
 4 µl 5X Puffer
 10 µl 2X Puffer
 1 µl T4-DNA-Ligase

(8 Ansätze)

(Anmerkung: Zwecks Optimierung des Ligationserfolges entsprach das molare Verhältnis Vektor : Insert in etwa 1:5)

Darüber hinaus wurde zwecks Testung des Dephosphorylierungsgrades des Vektors ein „Vektor-Test“ durchgeführt, wobei parallel zu den erwähnten Ligationsreaktionen eine Ligation des dephosphorylierten Vektors selbst (ohne Insert, H₂O statt Insert-Lösung) angesetzt wurde.

2.1.5. Transformation von E. coli:

Verwendete Materialien:

LB-Medium:	LB-Amp-Medium:	LB-Agar-Platten:	LB-Amp-Agar-Platten:	CaCl ₂ -Puffer:
10 g Bacto-Tryptone (Difco-Laboratories, Detroit, USA) 5 g Bacto-Yeast-Extrakt (Difco) 5 g NaCl mit bidest. H ₂ O auf 1 Liter aufgefüllt und zwecks Sterilisierung autoklaviert	LB-Medium mit 150 µg/ml Ampicillin	1,5 % (w/v) Bacto-Agar (Difco) in LB-Medium	1,5 % (w/v) Bacto-Agar (Difco) und 150 µg/ml Ampicillin in LB-Medium	50 mM CaCl ₂ 10 mM Tris (pH 8,0) in sterilem dest. H ₂ O

E. coli-Stamm DH5α (Gibco): eingesetzt zur Klonierung der PS1-Konstrukte; Genotyp: *endA1 hsdR17* (r_K⁻ m_K⁺) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (Nal^r) *relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR*(ϕ80 *dlacΔ(lacZ)M15*)

Eine von einer Agarplatte angepickte DH5α-Kolonie wurde in 2 ml LB-Medium bei 37 °C im Schüttler übernacht inkubiert. Am Folgetag wurden 500 µl dieser Übernachtskultur in 50 ml LB bei 37 °C für ca. 2 h geschüttelt, bis die OD(Optische Dichte)-Messung bei 600 nm in etwa Werte zwischen 0,2 und 0,3 ergab. 50 ml dieser Kultur wurden daraufhin 5 min. lang abzentrifugiert, das Zellpellet in eiskaltem 17,5 ml

Material und Methoden

CaCl₂-Puffer resuspendiert und 30 min. lang auf Eis inkubiert. Nach anschließender fünfminütiger Zentrifugation und erneuter Resuspension des Pellets in 1-1,5 ml CaCl₂-Puffer wurden die Zellen vor der Transformation nochmals für ca. 5 min. auf Eis gestellt.

Zur Transformation wurden jeweils 100 µl der DH5α-Suspension mit je 7 µl der 8 Ligationsansätze mit den mutierten PS1-Inserts und 7 µl des „Vektor-Test“-Ansatzes sowie mit 1 µl unligierter (linearer) pcDNA3.1/Zeo(-)-Vektor-DNA 30 min. lang auf Eis inkubiert. Außerdem wurden zwecks Testung des Transformationserfolges 100 µl der Bakterienzellsuspension mit 1 µg eines beliebigen Ampicillin-Resistenzgen-haltigen Vektors inkubiert (ebenfalls 30 min. auf Eis). Dann wurden die Zellsuspensionen mit den Vektor-Konstrukten für 2 min. einem „Hitze-Schock“ von 42 °C ausgesetzt, um unmittelbar danach für ca. 2-5 min. wieder auf Eis gestellt zu werden. Schließlich wurden die Bakterien abzentrifugiert, die Pellets in je 1ml LB-(„Erholungs“-)Medium resuspendiert und 1 h lang bei 37 °C geschüttelt. Nach erneuter Abzentrifugation und Resuspension (diesmal in 200 µl LB) wurden die transformierten DH5α-Zellen auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und mit Bedeckung (zur Vermeidung von Austrocknung) bei 37 °C übernacht inkubiert.

Mit dem (beliebigen) Ampicillin-Resistenzgen-haltigen Vektor transformierte Bakterien bildeten auf Ampicillin-haltigen Agarplatten zahlreiche Kolonien und bestätigten somit den generellen Transformationserfolg. Sowohl auf den Amp-Agarplatten, auf denen mit dem „Vektor-Test“-Ansatz transformierte DH5α-Zellen ausgestrichen worden waren, als auch auf den Amp-Platten mit den mit unligierter pcDNA3.1/Zeo(-)-Vektor-DNA transformierten Zellen wuchsen nur sehr wenige Kolonien an, was für eine geringe Rate von Selbstligation sprach. Nun konnte davon ausgegangen werden, daß die in ungleich höherer Zahl angewachsenen Kolonien auf den Amp-Agarplatten, auf denen die mit den 8 Ligationsansätzen (mit den mutierten PS1-Inserts) transformierten DH5α-Zellen ausgestrichen worden waren, in den meisten Fällen Bakterienkolonien waren, die den Vektor mit dem jeweiligen mutierten PS1-Insert trugen. Dies wurde durch die im Anschluß durchgeführte Minipräparation der Plasmid-DNA (je 10 angepickte Kolonien/Agarplatte), EcoRI-/BamHI-Restriktionsverdau und anschließende gelelektrophoretische Auftrennung und Sichtbarmachung der DNA-Banden bestätigt.

2.1.6. Präparation von DNA in kleinem Maßstab („Minipräparation“):

Verwendete Materialien und Lösungen:

Lösung I:	Lösung II:	Lösung III:	RNase:
50 mM Glucose 25 mM Tris (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)	0,2 N NaOH 1 % SDS	60ml 5M Kaliumacetat-Lösung 11,5 ml Eisessig mit bidest. H ₂ O auf 100 ml aufgefüllt	Ribonuclease A (Sigma) 10 µg/ml

Material und Methoden

Zur Minipräparation der DNA wurden am Vorabend pro LB-Amp-Agar-Platte jeweils 10 Bakterienkolonien gepickt und übernacht als 2 ml LB-Amp-Kultur im Schüttler bei 37 °C inkubiert.

Am Folgetag wurde mit den Flüssigkulturen wie folgt weiterverfahren:

- 30 sec. Zentrifugation von je 1,5 ml der Flüssigkulturen (14000 rpm) in Eppendorf-Gefäßen;
Entfernen der Überstände
- Resuspension der Pellets in 100 µl Lösung I
- Zugabe von 200 µl Lösung II und nach fünfmaligem Invertieren der Gefäße 5 min. Inkubation auf Eis
- Zugabe von 150 µl Lösung III und nach fünfmaligem Invertieren der Gefäße 3-5 min. Inkubation auf Eis
- 15 min. Zentrifugation bei 14000 rpm und Überführung der Überstände in frische Eppendorf-Gefäße
- Zugabe von jeweils 2 Vol. 100 % Ethanol und 10 min. Inkubation auf Eis
- 10 min. Zentrifugation bei 14000 rpm (Kühlzentrifuge, 4 °C)
- Waschen der Pellets mit 500 µl 70 % Ethanol
- Nach der Trocknung der Pellets Resuspension in je 18 µl H₂O mit 2 µl RNase (Abbau der mitgefällten RNA, die Beurteilung der DNA-Banden sonst durch eigene Interkalation von Ethidiumbromid gestört hätte)

Der im Anschluß durchgeführte Restriktionsverdau mit EcoRI/BamHI und die elektrophoretische Auftrennung entsprechend obiger Vorschrift zeigte, welche der jeweils 10 2 ml-Übernacht-Flüssigkulturen Bakterien enthielten, die bei der Transformation Plasmid mit Insert aufgenommen hatten. Mit je einem geeigneten positiven Klon wurde eine Maxipräparation angesetzt.

2.1.7. Präparation von DNA in großem Maßstab („Maxipräparation“):

Verwendete Puffer und Materialien:

Alle im folgenden aufgeführten Puffer und Materialien wurden von Macherey-Nagel bezogen.

Puffer S1, pH 8,0:	Puffer S2:	Puffer S3, pH 5,1:
50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg RNase A/ml	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS	2,80 M Kaliumacetat
Puffer N2, pH 6,3:	Puffer N5, pH 8,5:	AX500-Säulen
100 mM Tris/H ₃ PO ₄ 15 % (v/v) Ethanol 900 mM KCl	100 mM Tris/H ₃ PO ₄ 15 % (v/v) Ethanol 1000 mM KCl	

Material und Methoden

Zur Maxipräparation wurden die restlichen ca. 0,5 ml der entsprechenden Übernachtskultur in 500 ml LB-Amp-Medium bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Am Folgetag wurde die Präparation der DNA durchgeführt:

- 20 min. Zentrifugation der 500 ml-Übernachtskulturen bei 6000 rpm (Kühlung, 4 °C)
- Verwerfen der Überstände und vorsichtige Resuspension der Pellets in je 12 ml S1-Puffer
- Zugabe von 12 ml Puffer S2 und nach vorsichtigem 6-8maligen Invertieren 5 min. Inkubation bei RT
- Zugabe von 12 ml Puffer S3 und nach vorsichtigem 6-8maligen Invertieren 5 min. Inkubation auf Eis
- 45 min. Zentrifugation bei 8000 rpm (Kühlzentrifuge, 4 °C)
- Nach der Äquilibration der AX500-Säulen mit jeweils 5 ml Puffer N2: Laden der Überstände auf die Säulen
- Zweimaliges Waschen der Säulen mit je 12 ml Puffer N3
- Elution der Plasmid-DNA mit 6 ml Puffer N5
- Nach Zugabe von 0,8 ml Vol. Isopropanol: 30 min. Zentrifugation bei 10000 rpm (4 °C)
- Verwerfen der Überstände und Waschen der Pellets mit 70 % Ethanol
- Nach Trocknung der Pellets: Aufnahme der DNA in je 200 µl bidest. H₂O

Die Konzentrationen der 8 isolierten PS1-Plasmid-DNAs wurden im folgenden spektralphotometrisch bestimmt. Dazu wurde die DNA jeweils 1:100 verdünnt und die optische Dichte (OD) bei 260 nm gemessen. Eine vom Gerät automatisch durchgeführte OD-Messung bei 280 nm und die Bildung des OD₂₆₀/OD₂₈₀-Quotienten ermöglichte die Abschätzung des Reinheitsgrades der gefällten DNA. Werte zwischen 1,8 und 2,0 zeigten eine relative Reinheit der DNA an, d.h. eine nur unwesentliche Verunreinigung mit Phenol bzw. Proteinen (in diesem Falle wäre der Quotient < 1,8 gewesen).

Die korrekte Sequenz aller PS1-Konstrukte wurde durch DNA-Sequenzierung (MediGenomix, München) bestätigt. Hierbei wurde der komplette offene Leserahmen der PS1-cDNAs abgedeckt, wobei 4 verschiedene Primer hierzu eingesetzt wurden:

PS1/187F: Sequenz siehe oben

PS1/TM1F: 5'-CCGAATTCAAGCATGTGATCATGCTCTTTGTC-3'

PS1/LKPI: 5'-TAGTGGCTGTTTTGTGTCCG-3'

PS1/1455F: 5'-CCAAGCTTTGGAACACAACCATA-3'

2.2. Kultivierung und Passagierung von Zellen:

Verwendete Medien/Puffer/Lösungen:

Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) (Gibco)
Methioninfreies Modified Eagle's Medium (MEM) (Gibco)
Hitzeinaktiviertes Fetales Kälberserum (FBS) (Gibco)
Trypsin-EDTA (1X) (Gibco)
Penicillin/Streptomycin (P/S) (Sigma)
Geneticine (Neomycin, G418) (Sigma)
Zeocin (Sigma)
Hygromycin (Sigma)

PBS-Puffer:
2,7 mM KCl 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄

Verwendete Zelllinien:

Die Transfektion der diversen Konstrukte erfolgte in folgende Zelllinien:

HEK293 (Human Embryonic Kidney 293-Zellen): transformierte menschliche primäre embryonale Nierenzelllinie

269-kidney: mit pCMV β APP-Wildtyp-cDNA stabil transfizierte HEK293-Zelllinie (Oltersdorf et al., 1990)

Swedish-kidney (sw-kidney): mit pCMV sw β APP-cDNA stabil transfizierte HEK293-Zelllinie (β APP mit „Schwedischer Mutation“, siehe Einleitung und Citron et al., 1992)

Kulturbedingungen:

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen zur Subkultivierung einmal mit PBS gewaschen, dann zwecks Ablösung vom Schalenboden mit Trypsinlösung für wenige Minuten inkubiert und in geeigneter Verdünnung neu ausgesät.

Material und Methoden

Bei den Experimenten kamen Zellkulturschalen mit Durchmessern von 6 und 10 cm sowie Zellkulturschalen mit 6 bzw. 24 Vertiefungen zum Einsatz.

Das *Zellkulturmedium* setzte sich bei allen verwendeten Zelllinien folgendermaßen zusammen:

- DMEM (Gibco)
- 10% FBS (Gibco)
- Penicillin (P) 100 µg/ml (Sigma)
- Streptomycin (S) 100 µg /ml (Sigma)

In Abhängigkeit davon, mit welchem(n) Konstrukt(en) die jeweilige Zelllinie transfiziert wurde, wurden diesem Medium zusätzliche Antibiotika zugesetzt:

- 200 µg /ml G418 (Sigma) bei mit BAPP (Wildtyp oder Mutanten) transfizierten Zellen
- 200 µg /ml Zeocin (Sigma) bei mit PS1 (Wildtyp oder Mutanten) transfizierten Zellen
- 50 µg /ml Hygromycin (Sigma) bei mit NotchΔE und NICD (NICV1744) transfizierten Zellen

Das Einfriermedium:

- 90% FBS (Gibco)
- 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma)

Das Einfrieren erfolgte bei -80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff.

2.3. Transfektion von Kulturzellen:

Verwendetes Transfektionsreagenz:

„DOTAP Liposomal Transfection Reagent“ (Roche): N-[1-(-2,3-Dioleoyl-oxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat (DOTAP), kationisches liposomales Reagenz

Verwendete Lösungen:

2 mM HEPES(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])-Puffer (pH 7,4), steril in bidest. H₂O

Verwendete Transfektionsvektoren:

pcDNA3.1/Zeo(-)-Vektor mit dem jeweiligen PS1-Konstrukt (siehe oben)

pcDNA3.1/Hygro(+)-Vektor (Invitrogen, Expressionsvektor für Mammalia-Zelllinien mit Ampicillin- und Hygromycin-Resistenz; Vektor-Karte: siehe Anhang) mit den Konstrukten NotchΔE und NICV1744 (Schroeter et al., 1998; Steiner et al., 1999c). NotchΔE ist ein konstitutiv aktiviertes N-terminal verkürztes Notch-1-Konstrukt mit 6 C-terminal gekoppelten myc-Epitopen (siehe Einleitung). NICV1744 ist ein rekombinantes - wie NotchΔE mit 6 C-terminal gekoppelten myc-Epitopen versehenes - NICD-Konstrukt als Marker für die NICD-Bildung (siehe Einleitung und Ergebnisteil)

Die zu transfizierenden Zelllinien (269-kidney, sw-kidney) wurden jeweils in einer 6 cm-Zellkulturschale bis zur Subkonfluenz kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde dann durch frisches Medium ersetzt. Es wurden in der Zwischenzeit folgende Verdünnungen gemacht:

Verdünnung A: Je 5 µg der zu transfizierenden DNA wurden in 50 µl (Endvolumen) HEPES-Puffer aufgenommen.

Verdünnung B: Je 30 µl DOTAP-Reagenz wurden mit 70 µl HEPES-Puffer auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt.

Verdünnungen A und B wurden gut gemischt und 10-15 min. bei RT inkubiert. Dieser Transfektionsansatz wurde anschließend in das frische Zellkulturmedium der zu transfizierenden subkonfluenten Zellen pipettiert und 6 h lang mit den Zellen inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium wiederum durch frisches Medium (ohne Antibiotikum) ausgetauscht.

2.4. Etablierung von Einzelzellklonen und gemischten stabilen Klonen:

Verwendete Materialien, Medien und Lösungen:

6 mm-Glaszylinder (Falcon)	Trypsin (siehe oben)	Selektionsmedium (siehe oben)
----------------------------	----------------------	-------------------------------

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen in entsprechenden Selektionsmedien selektioniert. Zur Selektion wurde jeweils die doppelte Zeocin-Konzentration (bei den PS1-Konstrukten) bzw. die doppelte

Material und Methoden

Hygromycin-Konzentration (beim Notch Δ E- und NICD-Konstrukt) eingesetzt wie zur Kultivierung der entsprechenden Zellen (vergleiche mit obigen Angaben).

Die Zellen (in den 6 cm-Schalen) wurden im Verhältnis 1:7, 1:13 und 1:20 verdünnt und im Selektionsmedium jeweils in 10 cm-Schalen neu ausgesät. Das Medium wurde ca. einmal pro Woche erneuert, um alle nicht stabil transfizierten Zellen zu entfernen. Schließlich blieben nur noch einzelne Zellen übrig, die die Zeocin-/Hygromycin-Resistenz stabil exprimierten und daher auch mit großer Wahrscheinlichkeit mit dem jeweiligen Konstrukt transfiziert worden waren. Die Zellen wurden weiterkultiviert, bis sie im Durchmesser etwa 5 mm große Einzelkolonien bildeten.

Nach Erreichen eines Durchmessers von ca. 5 mm waren die Einzelzellkolonien groß genug zum Umsetzen. In jeder Schale wurden maximal 10 Kolonien ausgewählt. Nach Absaugen des Mediums wurden kleine Glaszylinder, die zum Abdichten am unteren Rand mit Vaseline eingefettet waren, über die Kolonien gestülpt. In die Glaszylinder wurde 100 μ l Trypsinlösung pipettiert und die Zellen zur Ablösung vom Schalenboden in der Trypsinlösung 5 min. bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator inkubiert. Nach Ablösung wurden die Zellen resuspendiert und je eine Kolonie in eine Vertiefung einer Zellkulturschale mit 24 Vertiefungen überführt, die mit Selektionsmedium gefüllt wurden. Sowie die Zellen hier konfluent wurden, wurden sie in entsprechend größere Kulturschalen überführt und im Medien mit einfacher Antibiotikum-Konzentration weiterkultiviert.

Von mindestens einer 10 cm-Schale, auf der Zellkolonien besonders dicht angewachsen waren, die aus der Transfektion mit einem bestimmten PS1-/Notch-Konstrukt hervorgegangen waren, wurden gemischte stabile Klone etabliert. Hierzu wurde wie bei der Isolierung der Einzelzellklone das Medium in der Schale vollständig abgesaugt, die Zellkolonien diesmal allerdings mit je 3 ml Trypsinlösung überschichtet und 5 min. im Inkubator inkubiert. Nach ihrer vollständigen Ablösung wurden die trypsinisierten Zellen dann in Falcon-Gefäße mit gleichem Volumen (3 ml) Medium pipettiert und 5 min. lang schonend (bei 1000 rpm) abzentrifugiert. Nach dem Absaugen des überständigen Mediums wurde das Zellpellet in einem kleinen Volumen (1 ml) Medium vorsichtig resuspendiert und in eine 6 cm-Schale mit Zeocin-haltigem Medium (200 μ g/ml) überführt. In dieser Schale wuchs nun ein Gemisch von Zellen heran, die von vielen verschiedenen stabilen Einzelzellklonen, die in der 10 cm-Schale angewachsen waren, abstammten (gemischte stabile Klone). Die gemischten stabilen Klone bildeten somit auch einen Querschnitt bezüglich der noch zu testenden Expression der verschiedenen mutierten PS1-Proteine.

2.5. Untersuchung von Kulturzellen auf Expression/Sekretion von Proteinen/ Polypeptiden:

Im Falle von PS1 erfolgte zunächst eine Immunpräzipitation „kalter“ (d.h. nicht nach metabolischer Markierung von Zellen gewonnener) Zellysate (siehe 2.5.4.), die dann, wie unter 2.5.5. beschrieben, auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens (siehe 2.5.6. und 2.5.7.).

Die Expression von PS2 wurde nach Auftrennung von Membran-Präparationen (siehe unter 2.5.2.) auf einem SDS-Polyacrylamidgel (2.5.5.) und anschließendem Western Blot analysiert (siehe 2.5.6. und 2.5.7.).

Um die Aß-Sekretion zu untersuchen, wurden die entsprechenden Zellen zunächst in einem 2h/2h-Pulse-Chase metabolisch markiert (siehe 2.5.8.). Die gewonnenen Überstände wurden entsprechend den Beschreibungen unter 2.5.4. immunpräzipitiert und auf einem speziellen Tris-bicine-Gel (2.5.5.) aufgetrennt. Die Analyse erfolgte nach Western Transfer auf eine PVDF-Membran durch Exposition der Membran auf Filme/Phosphorimager (siehe 2.5.6. und 2.5.9.).

Im Falle der Notch-Derivate wurden spezielle Pulse-Chase-Ansätze durchgeführt (siehe 2.5.8.). Die Analyse erfolgte nach SDS-gelelektrophoretischer Auftrennung der immunpräzipitierten Zellysate (2.5.5.) und Exposition der getrockneten Gele auf Filme/Phosphorimager (siehe 2.5.9.).

2.5.1. Herstellung von Zellysaten:

Um die Konstrukt-Expression der jeweiligen transfizierten Einzelzellklone und gemischten stabilen Klone zu überprüfen, wurden die Zellen in 6 cm-Kulturschalen in gleicher Dichte ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Abnehmen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit ca. 2 ml 1X PBS gewaschen und in 1 ml 1X PBS mit einem Zellschaber vom Gefäßboden abgenommen. Danach wurden die Zellen durch Abzentrifugieren (Eppendorf-Zentrifuge, 5 min., 1000 rpm) pelletiert und die Überstände verworfen. Die Zellpellets wurden nach Zugabe von je 500 µl STEN-Lysis-Puffer resuspendiert und auf Eis gestellt (für ca. 20 min.). Danach erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation der Lysate bei 10000 rpm. Die Überstände wurden abgesammelt.

STEN-Lysis-Puffer:
50 mM Tris, pH 7,6
150 mM NaCl
2 mM EDTA (Sigma)
1 % NP40 (Sigma)
20 mM PMSF (Sigma)
5 µg/ml Leupeptin (Sigma)

2.5.2. Membranpräparation:

Verwendete Puffer:

Hypoton-Puffer:
10 mM Tris 1 mM EDTA 1 mM EGTA in dest. H ₂ O

Wie unter 2.5.1. dargestellt, wurden auch hier die Zellen, nachdem sie in etwa gleich dicht ausgesät worden waren, nach Erreichen der Konfluenz abgeschabt und für 5 min. bei 1000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 700 µl Hypoton-Puffer resuspendiert und für 15 min. auf Eis gestellt. Nun wurde das Gemisch mit den mittlerweile geplatzen Zellen mit Hilfe einer 1 ml-Spritze (0,6 mm-Kanüle) zwanzigmal auf- und abgezogen. Es folgte eine 5 min. Zentrifugation bei 5000 rpm. Die erhaltenen Überstände wurden in neue Eppendorf-Gefäße überführt und 45 min. lang bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die Zellpellets enthielten nun die gewünschte Membranfraktion mit den zu detektierenden Proteinen. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe 2.5.3.) und Zugabe eines entsprechenden Volumens harnstoffhaltigen 2X Probenpuffers (2.5.5.) wurden die Membranpräparationen für 10-15 min. bei 65 °C erhitzt und, wie unter 2.5.5. dargestellt, gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.5.3. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford:

Um die Zellysate/Membranpräparationen einzelner Klone miteinander vergleichen zu können wurden Proteinkonzentrationsbestimmungen nach Bradford durchgeführt. Zur Erstellung von Eichkurven wurden verschiedene Volumina von BSA (Rinderserumalbumin) bekannter Konzentration (2 µl, 4 µl, ... , 20 µl) und 200 µl Bradford-Reagenz (Sigma) mit bidest. H₂O auf 1 ml aufgefüllt. Bei der Lysatbestimmung wurden je 1 µl Lysat und 200 µl Bradfordreagenz mit bidest. H₂O auf 1 ml aufgefüllt. Nach gutem Mischen der Ansätze und 5 min. Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen. Der Referenzwert wurde der Extinktion von H₂O (800 µl H₂O + 200 µl Bradford-Reagenz) gleichgesetzt.

2.5.4. Immunpräzipitation (IP):

Verwendete Antikörper:

<p><u>3027</u>: Polyklonales Kaninchen-Serum, gegen ein synthetisches Peptid gerichtet, das den Aminosäuren 263-407 von PS1 entspricht (Walter et al., 1997)</p> <p><u>3926</u>: polyklonales Antiserum gegen Aβ(1-40) (Wild-Bode et al., 1997)</p> <p><u>FCA3340</u>: polyklonales Antiserum gegen das Peptid Cys-GLMVGGVV, entsprechend dem C-Terminus von Aβ40 (Barelli et al., 1997)</p> <p><u>FCA3342</u>: polyklonales Antiserum gegen das Peptid Cys-MVGGVVIA, entsprechend dem C-Terminus von Aβ42 (Barelli et al., 1997)</p> <p><u>9E10</u>: monoklonaler (Maus-)Anti-myc-Antikörper gegen das myc-Epitop des NotchΔE-/NICV1744-Konstrukts, erhalten von der Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, Department of Biological Sciences)</p> <p><u>Anti-mouse-IgG (Sigma)</u>: „Brückenantikörper“ gegen Maus-IgG, entwickelt im Kaninchen</p> <p><u>FCA18</u>: polyklonales Antiserum gegen das Peptid DAEFRHDS-Cys, entsprechend dem N-Terminus von Aβ40 bzw. Aβ42/43 (Barelli et al., 1997)</p>
--

Verwendete Puffer und Materialien:

STEN-Puffer:	NaCl-STEN-Puffer (Hochsalz-STEN):
50 mM Tris, pH 7,6 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0,2 % NP40 in bidest. H ₂ O	500 mM NaCl 20 mM PMSF in STEN-Puffer
SDS-STEN-Puffer:	Protein A-Sepharose (CL-4B - Sigma PAS):
0,1 % SDS 20 mM PMSF in STEN-Puffer	100 mg/100 ml STEN-Puffer (Lagerung bei -20 Grad Celsius)

IP von PS1: Da im Falle von PS1 ein „kaltes“ Screening unter Einsatz zweier PS1-spezifischer Antikörper (3027 und BI.3D7 (siehe unten)) durchgeführt wurde, wurde hier auf eine Vorpräzipitation der Lysate mit PAS („preclearing“, zwecks Entfernung unspezifisch bindender Proteine) verzichtet. Die Inkubation der Lysate mit dem Antikörper 3027 (1:300) und je 25 µl PAS erfolgte für 2 h bei 4 °C im Schüttler. Die Antigen-Antikörper-PAS-Komplexe wurden daraufhin bei 6000 rpm 5 min. lang abzentrifugiert, die Überstände verworfen, und die Pellets jeweils für 20 min. mit je 500 µl NaCl-STEN-, SDS-STEN- und STEN-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Komplexe abzentrifugiert und die Überstände so vollständig wie möglich entfernt. Die Proben wurden in entsprechendem Volumen 2X Probenpuffer (ohne Harnstoff, siehe 2.5.5.) aufgenommen und für ca. 10-15 min. bei 65 °C erhitzt. Nicht

gelöstes Material wurde durch kurze Zentrifugation bei 14000 rpm abgetrennt und die Proben in die Taschen des entsprechenden Gels eingebracht.

IP von Aß: Die IP wurde analog der obigen Beschreibung für die PS1-IP durchgeführt, wobei nach dem 2h/2h-Pulse-Chase (siehe 2.5.8.) die jeweiligen Antikörper den Zellkulturüberständen in einer 1:200-Verdünnung beigemischt wurden, und die Inkubation von Überständen, PAS und Antiserum übernacht bei 4 °C auf einem Schüttler erfolgte. Nach 5 min. Abzentrifugation der Antigen-Antikörper-PAS-Komplexe wurden diese, nach Verwerfen der Überstände, viermal mit je 500 µl STEN-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Überstände wiederum so vollständig wie möglich entfernt und die Pellets mit dem speziellen 2X Probenpuffer (siehe 2.5.5.) versetzt. Die Proben wurden dann 15 min. bei 95 °C gekocht, abzentrifugiert und auf das Tris-Bicine-Gel (siehe unten) aufgetragen.

IP von NotchΔE/NICV1744: Die aus den Pulse-Chase-Ansätzen (2.5.8.) stammenden Lysate wurden zunächst 15 min. lang bei 13000 rpm in der Kühlzentrifuge (4 °C) abzentrifugiert, die Überstände abgenommen und daraufhin einem preclearing mit 25 µl PAS/Überstand unterzogen (1 h Schütteln bei 4 °C). Nach dem preclearing wurde erneut eine 15 min. Zentrifugation bei 13000 rpm durchgeführt, die Überstände in neue Eppendorf-Gefäße überführt und mit je 1 µl 9E10 (Anti-myc-Antikörper) übernacht inkubiert (Schüttler, 4 °C). Gleichzeitig wurden pro Überstand 5 µl Anti-mouse-IgG („Brückenantikörper“) mit 25 µl PAS und 800 µl STEN übernacht bei 4 °C geschüttelt, am folgenden Tag die PAS mit den gebundenen Brückenantikörpern abzentrifugiert, 4-5X mit jeweils 500 µl STEN-Puffer gewaschen (Abzentrifugation, Resuspension in STEN, Abzentrifugation) und in einem entsprechenden Volumen der Übernacht-IP mit 9E10 zugesetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei 4 °C im Schüttler wurden die Antigen-Antikörper-Brückenantikörper-PAS-Komplexe - wie für die PS1-IP beschrieben - mit NaCl-STEN-, SDS-STEN- und STEN-Puffer gewaschen, mit einem entsprechenden Volumen 2X Probenpuffer (ohne Harnstoff, 2.5.5.) pro Eppendorf-Gefäß versetzt, 10-15 min. gekocht und abzentrifugiert. Die Proben wurden dann auf das entsprechende Gel aufgetragen.

2.5.5. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE):

Die eindimensionale Auftrennung der verschiedenen Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe unterschiedlicher diskontinuierlicher Gelsysteme, die im folgenden beschrieben sind. Zur Auftrennung von PS1, PS2 und Notch-Derivaten wurden jeweils aus einem Sammel- und einem Trenngel bestehende SDS-Polyacrylamidgele eingesetzt (PS1/PS2: 12 % Trenngel, harnstoffhaltig; Notch-Derivate: 8 % Trenngel, ohne Harnstoff), während die Auftrennung der Aß-Peptide mit Hilfe eines speziellen Tris-bicine-Gelsystems durchgeführt wurde, das neben dem Sammel- und Trenngel zusätzlich ein zwischengeschaltetes „Spacergel“ aufwies.

Material und Methoden

Verwendete Lösungen und Reagenzien bei der Auftrennung von PSI, PS2 und Notch-Derivaten:

30 % Acrylamid-Lösung:	4X Trenngel-Puffer:	4X Sammelgel-Puffer:
30 g Acrylamid 0,8 g Bisacrylamid mit H ₂ O auf 100 ml aufgefüllt	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 (w/v) SDS	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
APS:	TEMED:	Elektrophorese-Puffer:
10 % (w/v) Ammoniumperoxo- disulfat in H ₂ O	N,N,N',N'-tetramethylethylendi- amin	23 mM Tris-HCl, pH 8,8 0,19 M Glycin 0,2 % (w/v) SDS
2X Proben-Puffer (mit Harnstoff):	2X Proben-Puffer (ohne Harnst.):	Coomassie-brilliant-blue-Lösung:
40% (v/v) Glycerin 6 % (w/v) SDS 6 % (v/v) β-Mercaptoethanol 4 M Harnstoff Spatelspitze Bromphenolblau in dest. H ₂ O	40% (v/v) Glycerin 6 % (w/v) SDS 6 % (v/v) β-Mercaptoethanol Spatelspitze Bromphenolblau in dest. H ₂ O	0,2 % (w/v) Coomassie brilliant blue R250 in dest. H ₂ O
		Entfärbelösung:
		50 % (v/v) Methanol 18 % (v/v) Eisessig in dest. H ₂ O

Zusammensetzung der Gellösungen bei der Auftrennung von PSI, PS2 und Notch-Derivaten:

Sammelgel:	12 % Trenngel/harnstoffhaltig:	8 % Trenngel/ohne Harnstoff:
0,65 ml 30 % Acrylamid 1,25ml 4X Sammelgelpuffer (pH 6,8) 2,5 ml 8 M Harnstofflsg. / H ₂ O 0,75 ml H ₂ O 15 µl TEMED 15 µl APS	3 ml 30 % Acrylamid 1,875 ml 4X Trenngelpuffer 2,625 ml 8 M Harnstofflösung 15 µl TEMED 15 µl APS	2,1 ml 30 % Acrylamid 3,9 ml 4X Trenngel-Puffer 2 ml dest. H ₂ O 15 µl TEMED 15 µl 10 % (w/v) APS

Zusammensetzung der Lösungen und Reagenzien bei der Auftrennung von Aβ mit Hilfe des Tris-bicine-Gel-Systems:

40 % Acrylamid (19:1, 5 % C):	Sammelgel-Puffer:	Spacergel-Puffer:
Biorad	0,72 M Bis-Tris 0,32 M Bicine in dest. H ₂ O	0,2 M H ₂ SO ₄ 0,8 M Bis-Tris in dest. H ₂ O
Trenngel-Puffer:	Anoden-Puffer:	Kathoden-Puffer:
1,6 M Tris 0,4 M H ₂ SO ₄ in dest. H ₂ O	0,2 M Tris 0,05 M H ₂ SO ₄ in dest. H ₂ O	0,2 M Bicine 0,25 % (w/v) SDS 0,1 M NaOH in dest. H ₂ O

Material und Methoden

Slot-(Taschen-)Puffer:	2X Probenpuffer:	Molekulargewichtsstandard:
0,36 M Bis-Tris 0,16 M Bicine 0,1 % (w/v) SDS in dest. H ₂ O	0,72 M Bis-Tris 0,32 M Bicine 2 % (w/v) SDS 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 30 % (w/v) Saccharose Spatelspitze Bromphenolblau in dest. H ₂ O	„Prestained Protein Molecular Weight Standard“ (2850-43000 MG) (Gibco); Der MG-Standard wurde entsprechend den Empfehlungen des Herstellers behandelt vor dem Auftragen mit einem entsprechenden Volumen 2X Probenpuffer (siehe unten) vermischt.

Zusammensetzung der Gellösungen des Tris-bicine-Gelsystems:

Sammelgel:	Spacergel:	Trenngel:
6,75 ml Sammelgel-Puffer 2,535 ml 40 % Acrylamid 135 µl 10 % (w/v) SDS 3,945 ml H ₂ O 108 µl 10 % (w/v) APS 13,5 µl TEMED	4,5 ml Spacergel-Puffer 1350 µl 40 % Acrylamid 90 µl 10 % (w/v) SDS 3,15 ml H ₂ O 36 µl 10 % (w/v) APS 9 µl TEMED	13,5 ml Trenngel-Puffer 20,28 ml 40 % Acrylamid 25,92 g Harnstoff 540 µl 10 % (w/v) SDS 180 µl 10 % (w/v) APS 54 µl TEMED

SDS-PAGE-Verfahren bei der Auftrennung von PS1, PS2 und Notch-Derivaten:

Nach dem Reinigen der Glasplatten, Einsetzen der Abstandhalter (sogenannte „spacer“) und dem Befestigen im Halterahmen wurde die Trenngellösung gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde die Geloberfläche mehrmals mit H₂O gespült, das Wasser dekantiert und der über dem Trenngel befindliche Raum mit einem saugfähigen Papier getrocknet. In den verbliebenen Hohlraum über dem Trenngel wurde Sammelgellösung gegossen und unter Vermeidung von Luftblasen ein Teflon-„Kamm“ eingeführt, so daß der Abstand zwischen dem Taschenboden und dem Anfang des Trenngels ca. 5 mm betrug. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wurde der „Kamm“ vorsichtig herausgezogen und das Gel samt Halterahmen in die Trennkammer eingesetzt. Sowohl die obere als auch die untere Kammer wurde mit Elektrophorese-Puffer gefüllt, und die Taschen des Sammelgels wurden mehrmals mit Elektrophorese-Puffer gespült. Nach dem Einbringen der Proben in die Taschen des Sammelgels wurde die obere Kammer mit der Kathode und die untere Kammer mit der Anode verbunden. Die Elektrophorese erfolgte bei konstantem Strom mit 20 mA im Sammelgel und 40 mA im Trenngel und wurde nach Erreichen des Trenngel-Endes durch die Bromphenolblau-Front gestoppt (im Falle der Notch-Derivate 30 min. nach Auslaufen der Bromphenolblau-Front).

Während im Falle von PS1 und PS2 im Anschluß ein Elektrotransfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen erfolgte (siehe 2.5.6.), wurde das Gel im Falle der Notch-Derivate zunächst in 0,2 %iger Coomassie-brilliant-blue-Lösung 30 min. lang geschüttelt. Danach wurde es 1 h lang in Entfärbelösung

fixiert und entfärbt, um schließlich für 30 min. in 6 M Salicylat-Lösung (6 M Salicylat gelöst in H₂O) geschüttelt zu werden. Nach ca. 1,5stündiger Vakuum-Trocknung („Slab gel dryer“, Savant) wurde das Gel auf Filme/Phosphorimager exponiert.

Besonderheiten des SDS-PAGE-Verfahrens bei der Auftrennung von A β :

Die Auftrennung der Immunpräzipitate erfolgte eindimensional und denaturierend in einem diskontinuierlichen harnstoffhaltigen Tris-Bicine-Gelsystem, bestehend aus einem Sammel-, Zwischen- („Spacer“-) und Trenngel (Klafki et al., 1996; Steiner et al., 1999a). Für die Anoden- und Kathodenkammer wurden jeweils verschiedene Puffer (siehe oben) benutzt.

Verwendete Elektrophorese-Apparatur zur Auftrennung von A β :

DESAPHOR VA 150 (Desaga): bestehend aus einem oberen (für Kathoden-Puffer) und einem unteren Puffertrog (für Anoden-Puffer). Auf dem Boden des unteren Puffertrogs liegt ein großflächiger Wärmeaustauscher in Form einer mehrfach gewendelten Kühlschlange, die an ein Kühlaggregat (MultiTempIII, Pharmacia Biotech) angeschlossen wurde. Eine eingebaute Umwälzpumpe saugt den gekühlten Puffer an und stößt ihn entlang der Trennzelle wieder aus. Auf diese Weise können auch höhere Leistungen (bis zu 200 W) für viele Trennungen ohne thermische Überlastung des Gerätes eingesetzt werden. Die eingesetzte Trennzelle, bestehend aus zwei Glasplatten, Spacern, Dichtungen und Klemmen hatte eine Länge (Höhe) von 150 mm.

Die Glasplatten und die Elektrophorese-Apparatur wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (Desaga) montiert. Das Gießen der Gele erfolgte analog den obigen Beschreibungen, wobei zuerst das Trenngel, dann das Spacergel und schließlich das Sammelgel gegossen wurde. Die jeweilige Länge betrug für das

- Trenngel ca. 12 cm
- Spacergel ca. 1 cm
- Sammelgel ca. 2 cm

Vor dem Start wurden die Taschen („slots“) zunächst mehrmals mit Kathoden-Puffer gespült und dann jeweils mit ausreichend Slot-Puffer gefüllt. Daraufhin wurden die Proben und der MG-Standard aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte bei konstantem Strom von 40 mA für das Sammel- und Spacergel und 100-120 mA für das Trenngel. Ein eventuelles Erhitzen des Gels wurde durch Konstanthalten der Temperatur (15 °C) des Anoden-Puffer-Reservoirs (in das die Trennzellen hineintauchten) mit Hilfe der oben

beschriebenen Kühlvorrichtung verhindert. Die Elektrophorese wurde gestoppt, als sich die Markerbande mit dem geringsten Molekulargewicht (ca. 3 kD) etwa 2-3 cm vor dem Ende der Trenngelstrecke befand.

2.5.6. Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF/Nitrocellulose-Membran:

Verwendete Materialien und Lösungen:

1X Transfer-Puffer:	Ponceau-S-Lösung:	Membran:
25 mM Tris 192 mM Glycin in dest. H ₂ O	2 % Ponceau S (Sigma) 30 % Trichloressigsäure 30 % Sulfosalicylsäure in dest. H ₂ O	Hybond-P (PVDF, Amersham Pharmacia Biotech)

Nach der Auftrennung in der SDS-PAGE wurden die Proteine in einer Horizontal-Transferkammer mit Glas/Kohlenstoff-Elektroden bei einem konstanten Strom von 1 mA/cm² für eine Stunde auf eine PVDF/Nitrocellulose-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wurde vorher zwecks Benetzung zunächst kurz in Isopropanol getaucht, anschließend gründlich mit dest. H₂O gewaschen und für ca. 30 min. in Transfer-Puffer äquilibriert. Im Falle der A β -Peptide wurde zur Optimierung des Transfers dem Transfer-Puffer zusätzlich 20 % (v/v) Methanol beigemischt.

Transfer-Aufbau:

- Glas/Kohlenstoff-Anodenplatte
- poröser Schwamm
- zwei Lagen Whatman-Papier (in Transfer-Puffer äquilibriert)
- äquilibrierte PVDF-Membran / Nitrocellulose-Membran
- SDS-Polyacrylamidgel
- zwei Lagen Whatman-Papier (in Transfer-Puffer äquilibriert)
- poröser Schwamm
- Glas(Kohlenstoff-Kathodenplatte)

Nach erfolgtem Transfer wurden die Proteine auf der Nitrocellulose-Membran (PS1, PS2), die im Western Blot analysiert werden sollten, durch Inkubation in Ponceau-S-Lösung für ca. 5 min. bei RT unter Schütteln gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde mit H₂O unter vorsichtigem Schwenken wieder entfernt und die Banden des Proteingrößenstandards sowie die Position der Trennsuren mit einem Kugelschreiber markiert. Die Membran wurde dann direkt im Western Blot weiterverwendet.

2.5.7. Immunblot-Analyse („Western Blot“):

Verwendete Lösungen und Reagenzien:

1X TBST-Puffer:	Blockierungslösung:	Chemilumineszenz-Reagenz:
10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl 1 % (v/v) Tween 20 in dest. H ₂ O	5 % (w/v) Magermilchpulver in 1X TBST-Puffer	ECL-Lösung 1+2 (Amersham)

Verwendete Antikörper:

Verwendete 1. Antikörper:
BI.3D7 (Steiner et al., 1999a), monoklonaler Maus-Antikörper gegen den C-terminalen Abschnitt der hydrophilen Schleife zwischen den PS1-Transmembrandomänen 6 und 7
BI.HF5c (Steiner et al., 1999a), monoklonaler Maus-Antikörper gegen den C-terminalen Abschnitt der hydrophilen Schleife zwischen den PS2-Transmembrandomänen 6 und 7

Verwendeter 2. Antikörper:
Anti-Mouse IgG HRP Conjugate (Promega), Antikörper-Konjugat (gekoppelt an Merettichperoxidase (HRP)) gegen Maus-IgG, hergestellt im Ziegenbock (erkennt BI.3D7 und BI.HF5c)

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die PVDF/Nitrocellulose-Membran mit den darauf transferierten Proteinen mit 20 ml Blockierungslösung bei 4 °C auf einem Schüttler übernacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Blockierungslösung dekantiert und neue Blockierungslösung mit dem 1. Antikörper zugegeben (Verdünnungen: BI.3D7 + BI.H5c je 1:200) (2-3 h Inkubation auf einem Schüttler). Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran 4-5mal für je 10-15 min. mit ausreichend TBST-Puffer gewaschen. Es folgte eine ca. 45 min. Inkubation der Membran in Blockierungslösung mit dem 2. Antikörper (1:10000). Nach erneuten 4-5 Waschschritten in TBST-Puffer erfolgte die Detektion der PS1-Proteine durch enzymatisch katalysierte Chemilumineszenz-Reaktion. Hierzu wurde die feuchte Membran entsprechend den Anweisungen des Herstellers für ca. 1 min. mit ECL-Reagenz 1+2 (Substratlösung) überschichtet. Nach Entfernen der überschüssigen ECL-Lösung wurde die PVDF-Membran schließlich auf Filme (Kodak Scientific Imaging Film) so lange exponiert, bis die Signalstärke zufriedenstellend war.

2.5.8. Metabolische Markierung von Zellen / Pulse-Chase:

Verwendete Lösungen und Materialien:

Methionin-freies Aushungerungsmedium:
MEM (Methionin-frei, siehe oben) (Gibco) Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 100 µg/ml L-Gln 2mM (Gibco)
Radioaktiv markiertes (³⁵ S-)Methionin/Cystein (Promix):
>1000 Ci/mmol, 7,15 mCi/500 µl (Amersham)
Fetales Kälberserum (FBS):
siehe oben

Es wurden jeweils Dreifachansätze (im Falle der Notch-Derivate Sechsfachansätze: 3 für Chase-Zeit=0min., 3 für Chase-Zeit=60 min.) in 6 cm-Kulturschalen durchgeführt. In gleicher Dichte ausgesäte Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde dann vollständig abgesaugt und der Zellrasen anschließend einmal mit Aushungerungsmedium gewaschen. Eine einstündige Aushungerungsphase nach Zugabe von je 2 ml Aushungerungsmedium schloß sich an. Nun wurde das Medium erneut abgenommen, die Zellen wurden mit frischem Aushungerungsmedium (je 1,5 ml) überschichtet. Gleichzeitig wurde den Medien diesmal je 700 µCi Promix zugesetzt (Markierung, „Pulse“), und die Zellkulturschalen wurden unter Kulturbedingungen (siehe 2.2.) inkubiert (im Falle der Aß-Sekretionsanalysen für 2 h; im Falle der Experimente mit den Notch-Derivaten für genau 15 min.). Nach dieser Zeit wurde unterschiedlich weiterverfahren. In den Experimenten mit Aß wurde den Medien nach 2 h FBS (Endkonzentration 10 %) zugegeben und die Zellen für 2 weitere Stunden inkubiert („Chase“). Auf diese Weise sollte eine möglichst hohe Ausbeute an radioaktiv markiertem (sezernierten) Aß in den Medien erzielt werden. Die Medien wurden vor der Immunpräzipitation (siehe 2.5.4.) kurz abzentrifugiert, um sie von eventuellen Zell(rest)en zu befreien. In den Ansätzen mit den Notch-Derivaten wurden die Zellen nach dem 15 min.-Pulse zunächst mit je etwa 2 ml warmem Methionin im Überschuß enthaltenden Medium gewaschen. Drei Schalen eines bestimmten Klons wurde daraufhin ca. 2 ml eiskaltes 1X PBS zugegeben und die Schalen zwecks Unterbrechung der enzymatischen Aktivitäten auf Eis gestellt (Chase=0 min.). Die anderen drei 6 cm-Schalen des gleichen Klons wurden jeweils mit 1,5 ml warmem Methionin im Überschuß enthaltenden Medium versetzt und 60 min. lang im Inkubator inkubiert (Chase=60 min.). Danach wurden diese mit eiskaltem PBS gewaschen, das PBS bei allen Schalen abgesaugt, allen Schalen je 800 µl STEN-Lysis-Puffer zugegeben und die Schalen ca. eine halbe Stunde lang auf Eis gestellt. Nach dieser Zeit wurde mit den Lysaten wie unter 2.5.4. beschrieben weiterverfahren.

2.5.9. Quantifizierung mittels Phosphorimaging:

Nach erfolgtem Elektrotransfer der im Tris-bicine-Gel aufgetrennten A β -Peptide auf eine PVDF-Membran (siehe 2.5.6.) wurde diese getrocknet und mehrere Tage lang auf einen Phosphorimager-Schirm (Molecular Dynamics) exponiert. Die erhaltenen Signalstärken auf dem Phosphorimager wurden mit Hilfe der Image Quant Software (Molecular Dynamics) quantitativ ausgewertet. Jede Peptid-Bande, die der jeweiligen immunpräzipitierten A β -Spezies entsprach, wurde separat quantifiziert (in Pixels). Nach Abzug der Pixel-Zahl des Hintergrunds wurden die Verhältnisse (A β 42/43)/(A β 42/43+A β 40) ausgerechnet und die Mittelwerte und Standardabweichungen der Verhältnisse der Dreifachbestimmungen gebildet.

Analog wurde bei der Analyse der Notch Δ E-Prozessierung verfahren, wobei hier jedoch das getrocknete Gel selbst auf den Phosphorimager-Schirm exponiert wurde. Nach Abzug der Hintergrunds-Pixel-Zahl wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Verhältnisse (NICD nach 60 min.)/(NICD nach 60 min. + Notch Δ E nach 60 min.) der Dreifachbestimmungen gebildet.

2.6. Radiosequenzierung:

Zur Bestimmung des N-Terminus der aufgetrennten A β -Spezies wurde in Kooperation mit Prof. David B. Teplow (Center for Neurologic Diseases, Harvard Medical School) eine Sequenzierung der auf eine PVDF-Membran transferierten im Tris-Bicine-Gel aufgetrennten A β -Spezies vorgenommen. Hierzu wurden Zellen in je zwei 6 cm-Schalen und einer 10 cm-Schale in gleicher Dichte ausgesät, wovon die zwei 6 cm-Schalen wie oben beschrieben mit Promix (Amersham), die 10 cm-Schale dagegen mit Tritium-markiertem Phenylalanin (L-[2,3,4,5,6-³H]Phenylalanin, Amersham) metabolisch markiert wurde. Die Immunpräzipitation der abgesammelten Überstände erfolgte in allen Fällen mit dem Antikörper 3926 (siehe oben).

Anzumerken ist, daß alle im Zusammenhang mit der Sequenzierung verwendeten Materialien und Lösungen aufgrund der Anfälligkeit des Sequenzierverfahrens für Verunreinigungen einen besonders hohen Reinheitsgrad („ultrareine“ Substanzen) besaßen.

Metabolische Markierung der Zellen mit L-[2,3,4,5,6-³H]Phenylalanin:

Verwendete Lösungen und Reagenzien:

Tritium(³ H)-markiertes Phenylalanin:
L-[2,3,4,5,6- ³ H]Phenylalanin (Amersham): 1 mCi/ml, 100-140 Ci/mmol, wässrige Lösung mit 2 % Ethanol

Material und Methoden

2X Phenylalanin-freies Aushungerungsmedium:

Das 2X Phenylalanin-freie Aushungerungsmedium wurde entsprechend den Vorschriften des Herstellers (Life Technologies, Select-Amine Kit) hergestellt. Hierbei wurde ein Medium hergestellt, dem 10X MEM (siehe oben), 12 verschiedene Aminosäure-Lösungen (außer Phenylalanin), Vitamine, Natriumbicarbonat, P/S (siehe oben) und bidest. H₂O zugesetzt wurde. Der pH des Mediums wurde mit Hilfe von 1 N HCl bzw. 1 N NaOH auf einen physiologischen Wert eingestellt, was man an der Farbe des Indikators ablesen konnte. Das Medium wurde vor dem Gebrauch steril filtriert (Bakterien-dichter Filter).

Die metabolische Markierung mit ³H-Phe erfolgte analog der oben geschilderten Markierung der Zellen mit ³⁵S (Promix). Die 10 cm-Schalen wurden zunächst 1 h lang mit ca. 4 ml 1X Phe-freiem Aushungerungsmedium inkubiert, danach wurde dieses Medium entfernt und die Zellen für 2 h mit 1X Phe-freiem Medium, das pro 10 cm-Schale 1,5 mCi ³H-Phe enthielt, markiert („Pulse“). Mit der Zugabe von FBS (siehe oben) schloß sich wiederum eine zweistündige Chase-Phase an. Danach wurden die Überstände, wie oben schon geschildert, mit dem Antikörper 3926 immunpräzipitiert und zusammen mit den Immunpräzipitaten aus der ³⁵S-Markierung auf dem Tris-Bicine-Gel aufgetrennt. Der Auftrag auf das Gel erfolgte nach dem Schema:

Klon A (³⁵S-IP) - Klon A (³H-IP) - Klon A (³⁵S-IP) - Klon B (³⁵S-IP) - Klon B (³H-IP) - Klon B (³⁵S-IP) - usw.

Die Flankierung der „³H-Spur“ durch 2 „³⁵S-Spuren“ des gleichen Klons sollte das spätere Ausschneiden der auf eine PVDF-Membran transferierten Peptide erleichtern, denn für den schwachenergetischen β -Strahler ³H war nach mehrtägiger Exposition auf einen Film bestenfalls nur mit einem schwachen Signal zu rechnen.

Der Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran wurde, wie oben geschildert, durchgeführt. Nach Trocknung der Membran wurden auf der Membran zur späteren Orientierung Markierungen mit radioaktiver Tinte angebracht. So konnten nach mehrtägiger Exposition auf einen Film die transferierten Tritium-markierten Peptidbanden in der Spur zwischen den deutlich sichtbaren „³⁵S-Banden“ ausgeschnitten werden.

Die Sequenzierung der Peptide selbst wurde nach dem Edman-Prinzip von Prof. David B. Teplow und Mitarbeitern am Center for Neurologic Diseases der Harvard Medical School in Boston durchgeführt.

2.7. Massenspektrometrische Analyse:

Zur massenspektrometrischen Analyse der einzelnen A β -Spezies wurden die Zellen folgender Zelllinien in gleicher Dichte in 10 cm-Schalen ausgesät:

- sw-kidney
- sw-kidney/PS1 L286R (gemischte stabile Klone)
- sw-kidney/PS1 L286E (gemischte stabile Klone)

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Medium (4ml/10 cm-Schale) ersetzt. Die Zellen wurden dann übernacht inkubiert, um möglichst viel sezerniertes A β im Überstand zu sammeln. Am nächsten Tag wurde eine Immunpräzipitation mit dem Antikörper 3926 wie unter 2.5.4. beschrieben durchgeführt. Die Antigen-Antikörper-PAS-Komplexe wurden analog viermal mit STEN-Puffer gewaschen und der Puffer nach dem letzten Waschschrift so vollständig wie möglich abgesaugt. Die Pellets wurden bei -80 °C verwahrt.

Die Extraktion der immunpräzipitierten A β -Spezies und anschließende massenspektrometrische Analyse erfolgte in Kooperation mit Dr. Gerd Multhaupt am Zentrum für Molekulare Biologie in Heidelberg (ZMBH).

2.8. Immunzytochemische Analyse von adhärent gewachsenen Zellen:

Verwendete Lösungen und Materialien:

Deckgläschen (neoLab):	Beschichtungslösung:	Blockierungs-Lösung:
12 mm im Durchmesser	1 mg/ml Poly-L-Lysin (Sigma)	5 % BSA in PBS
Antikörper-Verdünnungspuffer:	Fixier-Lösung:	„Quench-Lösung“:
1 % BSA in PBS	4 % Paraformaldehyd 0,2 % Triton X-100 in PBS	50 mM NH ₄ Cl in PBS
Einbettmittel:		
15 % (w/v) Moviol (Hoechst) 50mg/ml Diazobicyclo(2,2,2) octan (Sigma)		

Verwendete Antikörper:

- | |
|--|
| 1. Antikörper: 9E10 (siehe oben) |
| 2. Antikörper: Rhodamine-konjugierter Anti-Maus-Antikörper (Roche), hergestellt im Schaf |

Zunächst wurden die Deckgläschen übernacht in 70 % Ethanol sterilisiert und am Folgetag dreimal je 10 min. lang mit sterilem dest. Wasser gewaschen. Daraufhin wurden die Deckgläschen wiederum übernacht mit Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet und am nächsten Tag 5 X 20 min. lang mit 1X PBS gewaschen. Von nun an wurden die Deckgläschen bis zu ihrer Verwendung in PBS aufbewahrt.

Die jeweiligen Zelllinien wurden relativ dünn auf die Deckgläschen in entsprechendem Medium ausgesät. Nach etwa 1-2 Tagen erreichten sie die für die Immunfloreszenz gewünschte Subkonfluenz und wurden nach Absaugen des Mediums und zweimaliger Waschung mit PBS 20 min. in der Fixier-Lösung fixiert. Zum Nachweis intrazellulärer Proteine wurde der Fixierlösung 0,2 % Triton X-100 zugesetzt, um die Plasmamembran zu permeabilisieren. Der Fixierung schloß sich nach 3 5min.-Waschschritten mit PBS eine einmalige 10 min. Inkubation der Deckgläschen in 50 mM Triton-haltigen NH₄Cl-Lösung („Quench-Lösung“) an. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Zellen in PBS wurden diese bis zu 48 h lang bei 4 °C in PBS gelagert.

Die folgenden Schritte wurden jeweils mit 200 µl der entsprechenden Lösung bei Raumtemperatur in einer feuchten, lichtgeschützten (wichtig nach Inkubation mit 2. Antikörper) Kammer durchgeführt. Die Deckgläschen lagen jeweils mit der Zellseite nach oben auf Parafilm.

Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen zunächst ca. 1 h lang in Blockierlösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Bindung des 1:500 verdünnten Antikörpers für 2 h bei RT. Nach mindestens fünfmaligem Waschen der Zellen mit PBS für je 3 min. wurden die Deckgläschen mit dem Fluorochrom-(Rhodamine-)gekoppelten 2. Antikörper (1:10 verdünnt) inkubiert. Durch erneutes (mindestens fünfmaliges) Waschen der Zellen mit PBS wurde der überschüssige 2. Antikörper schließlich entfernt. Zum Aufbringen der Deckgläschen auf den Objektträger wurden auf den Objektträger einige µl Einbettmittel aufgetropft und die Deckgläschen mit den Zellseiten nach unten auf diesen aufgelegt.

Die Analyse erfolgte bei geeigneter Wellenlänge unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica).

2.9. Transgene Expression von PS1 L286R in *C. elegans*:

Diese Experimente wurden im Rahmen einer Kooperation von Dr. Ralf Baumeister und Dr. Lisa Grim am Genzentrum (LMU München) durchgeführt.

Hierzu wurde die cDNA PS1 L286R (menschliches PS1!) in ein für die transgene Expression in *C. elegans* geeignetes Expressionsplasmid (unter Kontrolle des *C. elegans*-sel-12-Promotors) kloniert und durch Mikroinjektion in *C. elegans*-Keimzellen eingeführt (Baumeister, 1997). Mit Hilfe geeigneter Kreuzungen

Material und Methoden

wurde geprüft, ob die PS1-L286R-Expression in Tieren mit der Mutation *sel-12(ar131)* (entspricht dem Austausch C60S und bewirkt charakteristischen Eiablage-Defekt) den mutanten Phänotyp beseitigen konnte („rescue“) oder nicht (kein „rescue“). Als Kontrollen dienten *sel-12(ar131)*-Tiere ohne Transgen bzw. Wildtyp-Nematoden (N2), bei denen die Eiablage regelrecht vonstatten ging. Insgesamt wurden 5 Linien mit je 10 Tieren auf ihre Eierproduktion hin untersucht, darunter 3 Linien (*sel-12(ar131)*-Tiere!), die das Konstrukt PS1 L286R transgen exprimierten (BR1817, BR1818 und BR1819), sowie eine Wildtyp-(N2) und eine *sel-12(ar131)*-Linie ohne Transgen (*ar131*). Die Tiere wurden im Entwicklungs-Stadium L4 (vor ihrer Eiablage) isoliert und die Eiablage unter geeigneten Bedingungen 6 Tage lang verfolgt. Danach wurde bei jedem Tier die in diesem Zeitraum gelegte Zahl der Eier bestimmt; die Tiere wurden daraufhin gemäß dieser Zahl in entsprechende Gruppen eingeteilt (siehe Ergebnisse).

3. Ergebnisse

3.1. Mutationen an der Stelle 286 von PS1 beeinflussen nicht die Endoproteolyse von PS1:

Wildtyp- β APP und sw β APP exprimierende HEK 293-Zellen wurden mit den mutanten PS1-cDNA-Konstrukten L286I, L286F, L286R, L286E, L286W, L286Q, L286P, L286S und L286V stabil transfiziert. Dabei wurden sowohl Einzelzellklone als auch gemischte stabile Klone etabliert und auf ihre PS1-Expression hin untersucht (Abb. 10+11). Der Einsatz von sw β APP exprimierenden Zellen (Citron et al., 1992) erfolgte in erster Linie im Hinblick auf die in 3.3. beschriebenen Experimente mit A β , bei denen die 5-6mal höhere A β -Produktion dieser Zellen ausgenutzt wurde (Citron et al., 1992; Cai et al., 1993). Ihre Eignung für die Analyse der PS1-Funktion wurde bereits in zahlreichen Arbeiten gezeigt (Yu et al., 1998; Thinakaran et al., 1998; Podlisny et al., 1997; Steiner et al., 1998; Steiner et al., 1999a; Steiner et al., 1999b; Steiner et al., 1999c; Citron et al., 1998; Citron et al., 1997; Capell et al., 2000).

Zur Untersuchung der Zellen auf PS1-Expression wurden die jeweiligen PS1-Derivate zunächst mit dem polyklonalen Antikörper 3027 (Walter et al., 1997) immunpräzipitiert und anschließend nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Western Blotting unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers PS1 BI.3D7 (Steiner et al., 1999a) detektiert. Im Vergleich zur untransfizierten (Wildtyp-)PS-1 exprimierenden Kontrolle kam es bei keinem Aminosäureaustausch an der Stelle 286 zu einer meßbaren Verminderung der aus der PS1-Prozessierung resultierenden C-terminalen Fragmente (PS1-CTFs), was für eine reguläre Prozessierung des Holoproteins sprach, eine Beobachtung, die im Zuge der Expressionsanalysen sowohl bei gemischten stabilen Klonen als auch bei Einzelzellklonen gemacht werden konnte (Abb. 10+11).

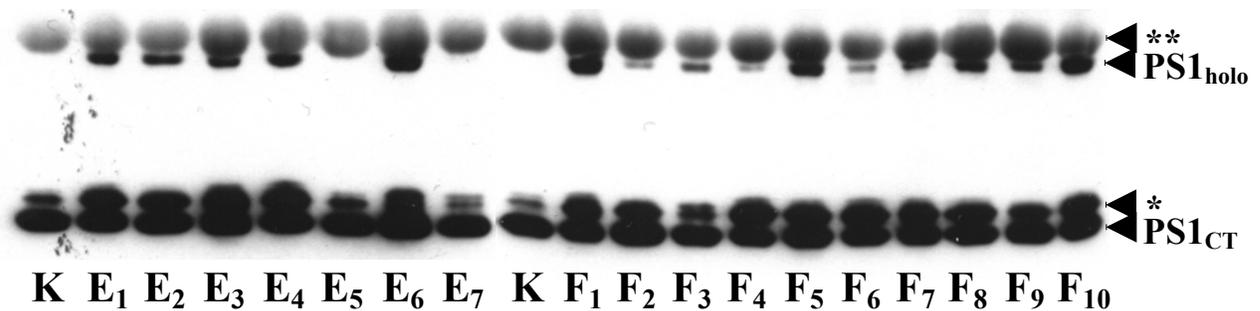


Abb. 10: Analyse der PS1-Expression bei verschiedenen Einzelzellklonen, beispielhaft gezeigt für PS1 L286E (E₁₋₇) und PS1 L286F (F₁₋₁₀). Zellysate wurden mit dem Antikörper 3027 immunpräzipitiert und mit dem monoklonalen Antikörper BI.3D7 detektiert. * = phosphoryliertes PS1_{CTF}. ** = IgG-Schwerketten-Bande. K = untransfizierte (endogenes PS1 exprimierende) Kontrolle. Zu beachten ist, daß die Endoproteolyse bei allen untersuchten Einzelzellklonen stattfindet. Ferner ist bei den meisten Klonen eine PS1-Holoprotein-Bande (PS1_{holo}) feststellbar (Ausnahme: E₅ + E₇ und die Kontrollen), die als Maßstab für die Expressionstärke des jeweiligen Klons herangezogen werden kann.

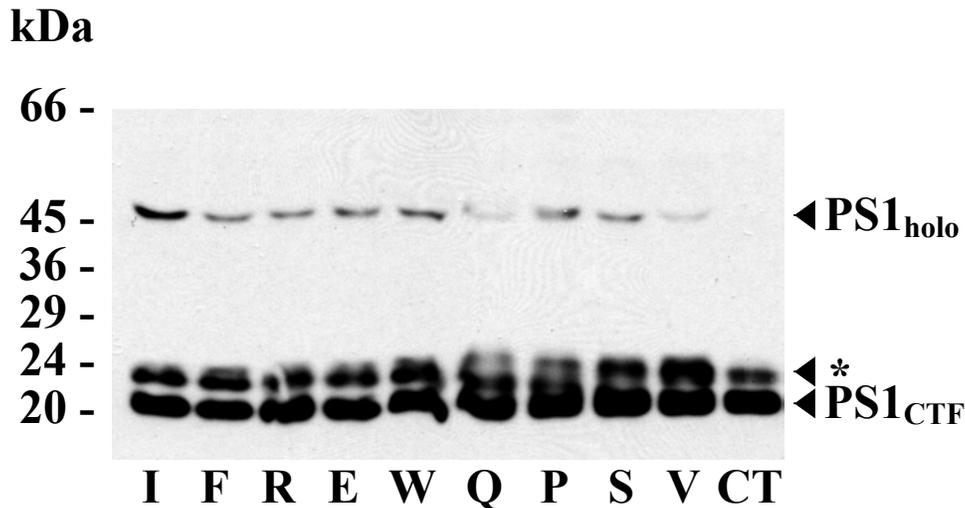


Abb. 11: In Analogie zu Abb. 10 durchgeführte PS1-Expressionsanalyse bei den die verschiedenen PS1 L286-Mutationen exprimierenden gemischten stabilen Klonen. * = phosphoryliertes PS1_{CTF}. CT = untransfizierte Kontrolle. PS1_{holo} = PS1-Holoprotein-Bande.

In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (Thinakaran et al., 1996) konnte bei untransfizierten (endogenes PS1 exprimierenden) Zellen weder bei den „Screening“-Ansätzen mit isolierten Einzelzellklonen (Abb. 10) noch bei der Expressionsanalyse von gemischten stabilen Klonen (Abb. 11) PS1-Holoprotein detektiert werden. Dagegen

zeigten erfolgreich transfizierte, exogenes PS1 überexprimierende Zellen, eine deutliche Akkumulation des Holoproteins. Diese wurde bei den isolierten Einzelzellklonen (Abb. 10) als Maßstab für die Expressionsstärke des jeweiligen Klons herangezogen. Hoch exprimierende Einzelzellklone (z.B. E₁₋₄, E₆, F₁, F₅, F₇₋₁₀) mit deutlich sichtbaren Holoprotein-Banden von vergleichbarer Intensität wurden in weiteren Experimenten eingesetzt.

3.2. Überexpression von mutanten PS1-Derivaten führt zum Ersatz von endogenem Presenilin:

Die Expressionsanalysen zeigten bei keinem der untersuchten Klone eine Erhöhung der Expression der PS1-CTFs (Abb. 10+11), obwohl die Holoprotein-Akkumulation als Folge der Überexpression der mutanten PS1-Konstrukte deutlich feststellbar war. Diese Beobachtung ist zum einen darauf zurückzuführen, daß die Presenilin-CTF-Expression einer strengen Kontrolle unterliegt (Thinakaran et al., 1997); zum anderen kommt es jedoch auch zu einem als „displacement“ bezeichneten Phänomen, demzufolge endogen synthetisierte CTFs durch die exogenen überexprimierten CTFs ersetzt werden (Thinakaran et al., 1997).

Um die Effekte dieses Phänomens im Zusammenhang mit den überexprimierten PS1-L286-Derivaten zu verdeutlichen, wurden Membranpräparationen von bereits auf ihre PS1-Expression hin untersuchten Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Western Blotting und Detektion mit dem monoklonalen Antikörper BI.HF5c (Steiner et al., 1999a) wurde dann die endogene PS2-Expression dieser Zellen (Steiner et al., 1999c) untersucht. Bei allen Zellen, die PS1 überexprimierten, war eine deutliche Verminderung der PS2-CTFs zu beobachten (Abb. 12.), was den Ersatz („displacement“) endogenen Presenilins durch das überexprimierte exogene besonders anschaulich machte.

Dieser Ersatz ist ein Indiz für die stabile Expression von exogenem Presenilin. PS-Derivate, die nicht in der Lage sind, endogen exprimierte Fragmente zu ersetzen, zeichnen sich durch Instabilität aus und werden aus diesem Grund relativ rasch abgebaut (Steiner et al., 1998; Thinakaran et al., 1997; Thinakaran et al., 1998).

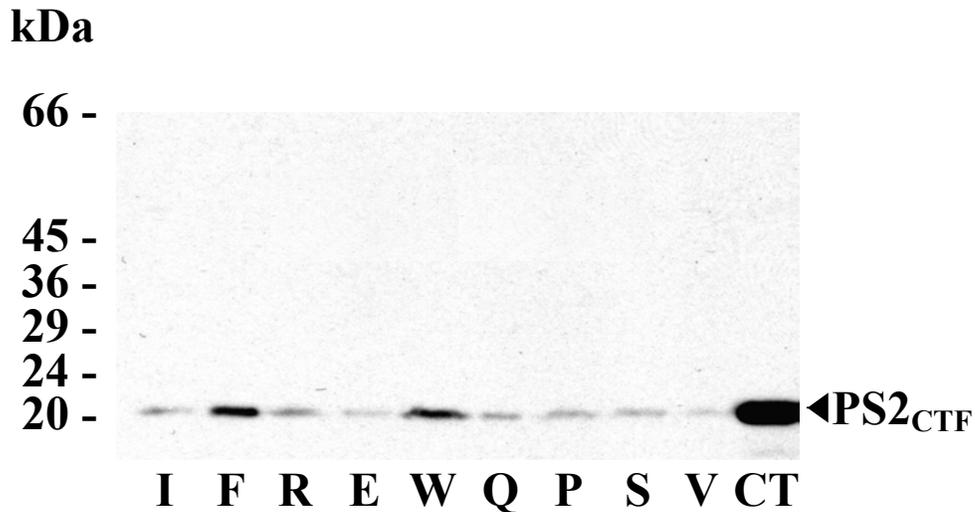


Abb. 12: Effekte der Überexpression der jeweiligen PS1-Konstrukte auf die endogene PS2-Expression. Nach Membranpräparation, gelelektrophoretischer Auftrennung und Western Transfer wurde PS2 mit dem monoklonalen Antikörper BI.HF5c detektiert. Die mutanten PS1-Konstrukte führen zu einem Ersatz der endogenen PS2-C-terminalen Fragmente (PS2_{CTF}), was an der deutlichen Reduktion dieser im Vergleich zur untransfizierten Kontroll-Linie (CT) zu erkennen ist.

3.3. Effekte der PS1-L286-Mutanten auf die Produktion von A β 42/43:

Ein Kennzeichen von FAK-assoziierten Punktmutationen in den Presenilin-Genen ist die Verschiebung des Verhältnisses (A β 42/43)/(Gesamt-A β) zugunsten der längeren, stärker amyloidogenen A β -Formen A β 42 und A β 43 (Scheuner et al., 1996; Borchelt et al., 1996; Citron et al., 1997; Duff et al., 1996). Um den Einfluß der an der Stelle 286 eingeführten Mutationen sowie der Originalmutante L286V auf die relative A β 42/43-Produktion quantitativ zu untersuchen, wurden die Überstände von sw β APP exprimierenden (siehe oben) gemischten stabilen PS1-L286-Klonen mit entsprechenden Antikörpern immunpräzipitiert und mit Hilfe eines bereits beschriebenen diskontinuierlichen Tris-Bicine-Gelsystems (Klafki et al., 1996; Steiner et al., 1999a) aufgetrennt.

3.3.1. Charakterisierung verschiedener A β -Spezies:

Zur eindeutigen Feststellung der Identität der aufgetrennten A β -Peptid-Spezies wurden im Vorfeld aller Untersuchungen und Quantifizierungen verschiedene Experimente unternommen.

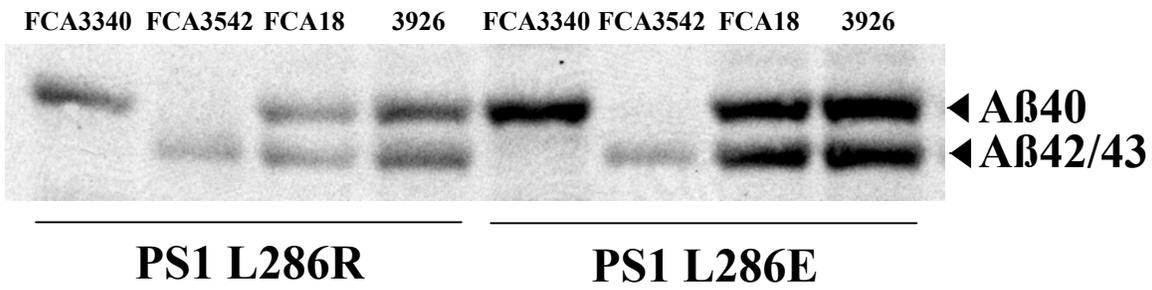


Abb. 13: Am Beispiel von PS1 L286R und PS1 L286E exprimierenden (sw-kidney) Klonen dargestellte Charakterisierung der im Tris-bicine-Gelsystem aufgetrennten Banden. Die Zellkulturüberstände wurden nach einem 2h/2h-Pulse-Chase mit dem jeweiligen Antikörper immunpräzipitiert (Antikörper-Spezifitäten: FCA3340: gegen den C-Terminus von A β 40; FCA3542: gegen den C-Terminus von A β 42; FCA18: gegen den N-Terminus von A β (1-X); 3926: gegen komplette Sequenz von A β (1-40)). Nach der Auftrennung im Tris-bicine-Gel und Western Transfer auf eine PVDF-Membran wurde die Membran getrocknet und auf Filme exponiert. Erkennbar ist die Zuordnung der schneller migrierenden Bande zum A β 42 und der langsameren (oberen) Bande zum A β 40. Die Immunpräzipitationen mit FCA18 und 3926 liefern vergleichbare Ergebnisse bezüglich des Intensitätsverhältnisses zwischen oberer und unterer Bande, was dafür spricht, daß der N-Terminus in beiden Fällen einheitlich mit dem Aspartat Nr.1 (Asp1) anfängt.

Von besonderem Interesse war dabei die einwandfreie Klärung der (N- und C-) terminalen Enden der aufgetrennten Peptide, um eine eventuelle Komigration (N- oder C-)terminal verlängerter oder verkürzter A β -Varianten, die die Aussage der Versuche verfälschen würde, auszuschließen. Eine erste Charakterisierung gelang durch Immunpräzipitation der konditionierten Medien (siehe oben) mit polyklonalen neoepitopspezifischen Antikörpern, die einerseits gegen die C-terminalen Enden von A β 40 (FCA3340, Barelli et al., 1997) und A β 42 (FCA3342, Barelli et al., 1997), andererseits gegen den N-Terminus von A β (FCA18, Barelli et al., 1997) gerichtet waren. Zusätzlich wurden Immunpräzipitate mit dem Antikörper 3926 (Wild-Bode et al., 1997; 3926 erkennt das ganze Peptid A β (1-40)) auf das Tris-Bicine-Gel aufgetragen (Abb. 13). Die am Beispiel der Mutanten L286R und L286E dargestellte Charakterisierung zeigte erwartungsgemäß (Klafki et al., 1996; Steiner et al., 1999a), daß von den zwei deutlich zu identifizierenden Banden im Tris-Bicine-Gel die langsamer migrierende Bande C-

Ergebnisse

terminal dem A β 40 entsprach, während die schneller migrierende unter anderem C-terminal mit 42 endendes A β enthielt (FCA3342 erkennt spezifisch den C-Terminus von A β 42, jedoch nicht den C-Terminus von A β 43; daher konnte zunächst keine Aussage über A β 43 gemacht werden.). Die weitgehende Übereinstimmung des Intensitäts-Verhältnisses zwischen „oberer“ und „unterer“ Bande im Falle der IP mit FCA18 und der IP mit 3926 deutete bereits darauf hin, daß der N-Terminus bei beiden Banden mit Asp1 (der N-terminal ersten Aminosäure der A β -Spezies) anfängt. Gewißheit über den N-Terminus brachte allerdings erst die Sequenzierung dieser Banden, die von Prof. David B. Teplow und Mitarbeitern am Center for Neurologic Diseases in Boston durchgeführt wurde (Abb. 14+15).

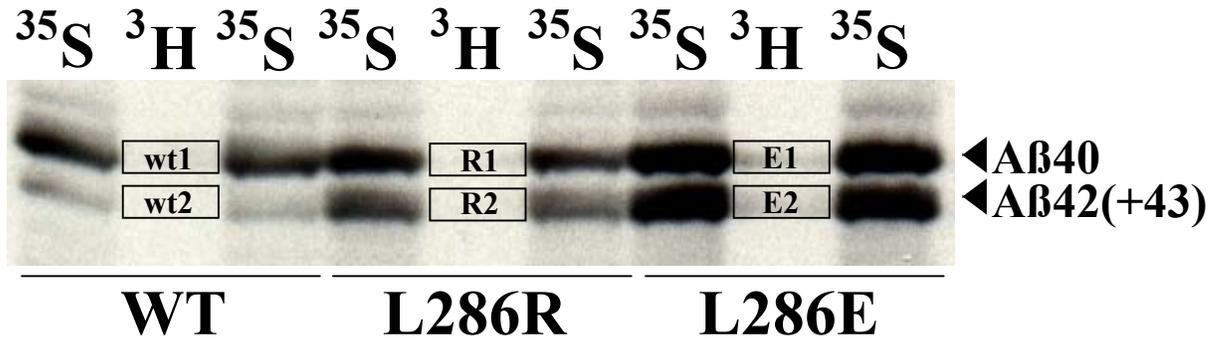


Abb. 14: Darstellung des Ansatzes zur Radiosequenzierung der im Tris-bicine-Gel aufgetrennten A β -Spezies. Es wurden 2h/2h-Pulse-Chase-Experimente durchgeführt, wobei von dem jeweiligen gemischten stabilen Klon (wt (= untransfiziert), L286R und L286E (jeweils in sw-kidney-Zellen)) je zwei Schalen mit ^{35}S -Promix und eine mit ^3H -Phe metabolisch markiert wurde. Nach Immunpräzipitation der Überstände mit dem Antikörper 3926 wurden die gewaschenen IPs so auf das Tris-bicine-Gel aufgetragen, daß eine ^3H -Spur jeweils von zwei ^{35}S -Spuren des jeweiligen Klons flankiert wurde. Dies sollte die spätere Lokalisation der ^3H -markierten aufgetrennten Banden erleichtern. Nach Western Transfer auf eine PVDF-Membran, wurde diese getrocknet, mit radioaktiven Markierungen versehen (zwecks späterer korrekter Orientierung von Membran und Film) und auf Filme exponiert. Die ^3H -Banden wurden dann exakt zwischen den jeweiligen ^{35}S -Banden (wt1, wt2, ...) entsprechend den dargestellten Rechtecken ausgeschnitten (Anmerkung: aufgrund der schwachen Energie des β -Strahlers ^3H waren die ^3H -Banden auch nach mehrtägiger Exposition kaum sichtbar).

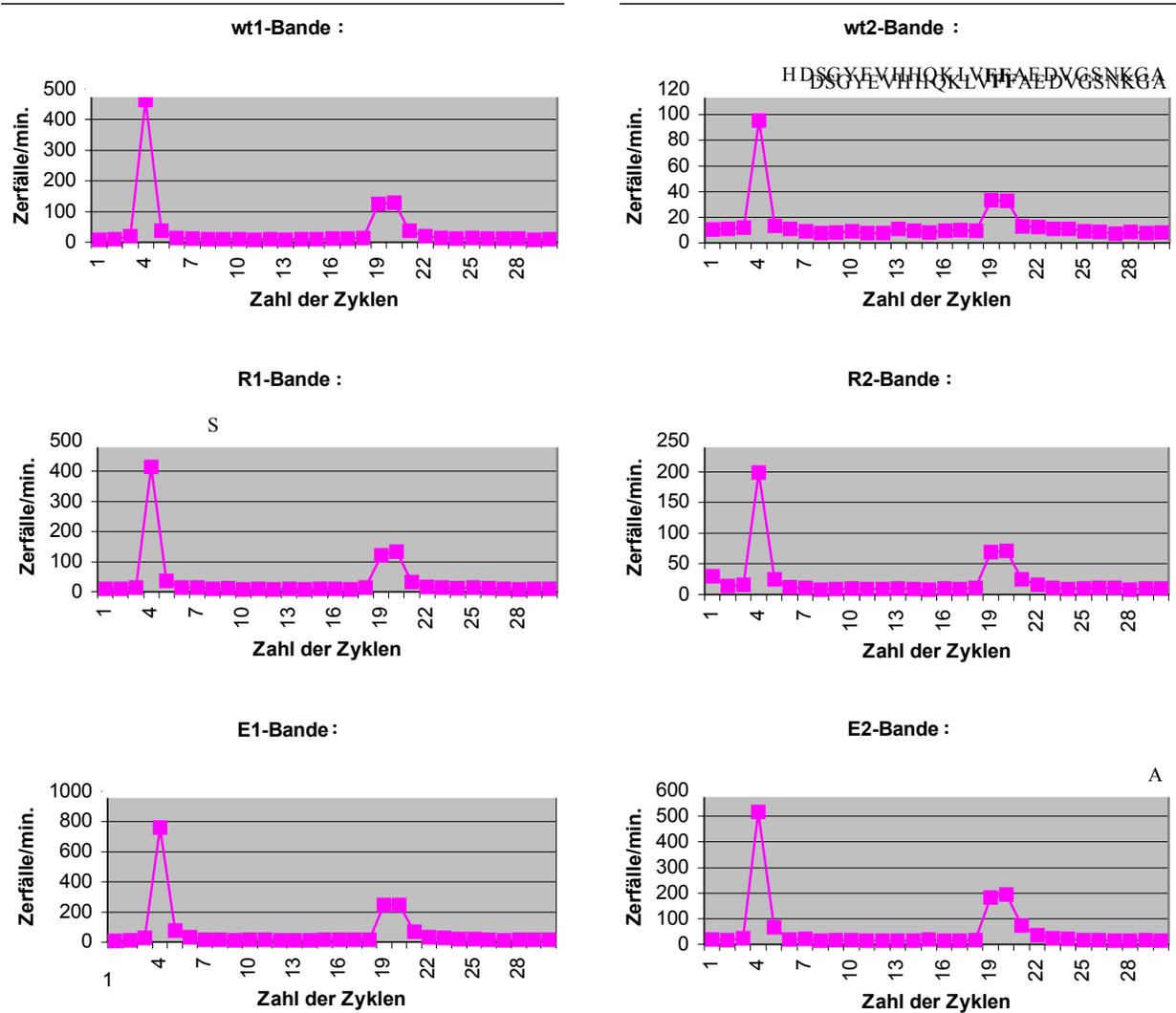


Abb. 15: Radiosequenzierung der in Abb. 14 dargestellten ^3H -Phe-markierten Banden nach dem Edman-Prinzip. Jeweils 30 Zyklen wurden durchgeführt, wobei auf die eindeutigen ^3H -Phe-Signale nach dem 4., 19. und 20. Zyklus zu achten ist. Die korrespondierenden Aminosäurereste innerhalb des A β -Peptids sind über dem jeweiligen Diagramm angezeigt. In allen Fällen wird deutlich, daß sowohl die untere als auch die obere der beiden Banden im Tris-bicine-Gel (vgl. Abb. 14) ausschließlich mit Asp1, der N-terminal ersten Aminosäure von A β beginnt. Damit können N-terminale Varianten als eventuell komigrierende Banden innerhalb der beiden betrachteten Peptid-Banden des Tris-bicine-Gelssystems ausgeschlossen werden.

Nach Abklärung des N-Terminus stellte sich die Frage nach dem C-Terminus der im Tris-Bicine-Gel aufgetrennten A β -Spezies. Bereits in früheren Arbeiten (Klafki et al.,

1996; Wiltfang et al., 1997) wurde das Wanderungsverhalten der A β -Peptide A β 40, A β 42 und A β 43 eingehend beschrieben. Danach nimmt die Migrationsgeschwindigkeit v der A β -Spezies im Tris-Bicine-Gel in folgender Reihenfolge zu: $v(\text{A}\beta 40) < v(\text{A}\beta 42) < v(\text{A}\beta 43)$. Da in den durchgeführten Experimenten (Abb. 13) zwar eine klare Trennung von A β 40 von A β 42, jedoch keine eindeutige Trennung von A β 42 von A β 43 zu erzielen war, mußte zumindest davon ausgegangen werden, daß die schneller wandernde der beiden im Gel beobachteten Banden neben A β 42 eventuell auch A β 43 enthalten könnte. Diese Vermutung wurde insbesondere durch die Beobachtung gestützt, daß sw-kidney-Zellen, die PS1 L286R und PS1 L286E transfiziert exprimierten, nach Immunpräzipitation ihrer Überstände mit unterschiedlichen Antikörpern und Auftrennung der Immunpräzipitate im Tris-Bicine-Gel deutlich verschiedene Intensitätsverhältnisse aufwiesen beim Vergleich von „oberer“ Bande mit „unterer“ Bande in Abhängigkeit davon, mit welchem(n) Antikörper(n) die Immunpräzipitation der Medien erfolgte (siehe Abb. 16; Dieses Experiment wurde von Dr. Markus Kostka (Boehringer Ingelheim) durchgeführt und ist nicht im Methoden-Teil angeführt).

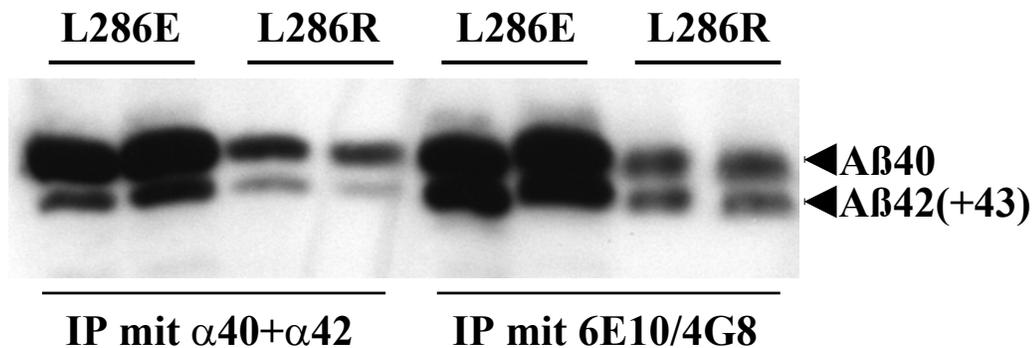


Abb. 16: Unterschiedliche Intensitätsverhältnisse zwischen „oberer“ und „unterer“ Bande im Tris-bicine-Gel in Abhängigkeit vom in der IP verwendeten Antikörper bei den Klonen PS1 L286R und PS1 L286E (in sw-kidney). Übernacht gesammelte Zellkulturüberstände wurden entweder mit A β -C-terminal spezifischen Antikörpern β A4-6B10 und β A4-6F1 (spezifisch gegen 40- (α 40) und 42-Ende (α 42) von A β) oder mit dem Antikörper-Gemisch 6E10/4G8 immunpräzipitiert (6E10/4G8 erkennt weite Teile der A β -Sequenz, siehe unten). Nach der Auftrennung im Tris-bicine-Gel und Western Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion mit dem Antikörper-Gemisch 6E10/4G8. Zu beachten ist das deutliche schwächere Signal der unteren Bande bei den beiden Mutanten unter Einsatz der C-terminal spezifischen Antikörper für die IP im Vergleich zu den Ergebnissen der IP mit 6E10/4G8. Diese Diskrepanz läßt sich höchstwahrscheinlich dadurch erklären, daß der C-terminal spezifische A β -Antikörper nicht dazu in der Lage ist, neben A β 42 auch A β 43 zu erkennen. Dies impliziert, daß L286R- und L286E-Zellen neben A β 42 auch bedeutende Mengen von A β 43 sezernieren (siehe Tab. 1).

Wurden die IPs der übernacht gesammelten Überstände mit einem Antikörper-Gemisch aus spezifisch mit dem C-Terminus von A β 40 und A β 42 (und nicht mit dem C-Terminus von A β 43) reagierenden monoklonalen Antikörpern β A4-6B10/ β A4-6F1 (Boehringer Ingelheim; Antikörper gegen C-Terminus von A β 40 bzw. A β 42) durchgeführt und die Peptide nach Auftrennung und Western Blotting mit dem monoklonalen Antikörper-Gemisch 6E10/4G8 (Senetek; gegen weite Teile des A β -Peptids gerichtetes Antikörper-Gemisch; 6E10: gegen Aminosäurereste 1-16 von A β ; 4G8: gegen Aminosäurereste 17-24 von A β) detektiert, konnte man sowohl bei L286R als auch und vor allem bei L286E deutlich schwächere „untere“ Banden beobachten als nach analoger Immunpräzipitation der Überstände mit 6E10/4G8 und entsprechender Detektion mit den gleichnamigen Antikörpern (Abb. 16). Eine Erklärung hierfür konnte angesichts obiger Ausführungen nur lauten, daß zumindest im Falle der Mutanten L286R und L286E neben A β 42 auch erhebliche Mengen von A β 43 innerhalb der „unteren“ Bande enthalten sein mußten. Diese Feststellung wurde durch die massenspektrometrische Analyse von immunpräzipitierten Überständen der Mutanten L286R und L286E bestätigt (Tab. 1). Die Massenspektrometrie wurde in Kooperation mit Dr. Gerd Multhaup am ZMBH in Heidelberg durchgeführt.

Klon	Aβ40	Aβ42	Aβ43
wt	<i>100 %</i>	<i>40 %</i>	<i>0 %</i>
PS1 L286R	<i>100 %</i>	<i>61 %</i>	<i>45 %</i>
PS1 L286E	<i>100 %</i>	<i>22 %</i>	<i>37 %</i>

Tab. 1: Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse von Zellkulturüberständen bei PS1 L286R, PS1 L286E und endogenes PS1 (wt) exprimierenden gemischten stabilen (sw-kidney-)Klonen. Die Peak-Höhen von A β 40 wurden jeweils 100 % gleichgesetzt und die Peak-Höhen der übrigen A β -Spezies (A β 42 und A β 43) relativ dazu in Beziehung gesetzt. Zu beachten sind die sehr hohen relativen Mengen von A β 43 bei PS1 L286R und insbesondere bei PS1 L286E exprimierenden Klonen. Diese pathologische A β -Spezies konnte beim untransfizierten Wildtyp nicht detektiert werden, dafür jedoch verstärkt verkürzte A β -Formen wie A β (1-37), A β (1-38) und A β (1-39) (keine Prozentangaben).

Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse in Tab. 1 läßt sicherlich keine absolut verlässlichen quantitativen Aussagen zu, zeigt allerdings gewisse Trends auf.

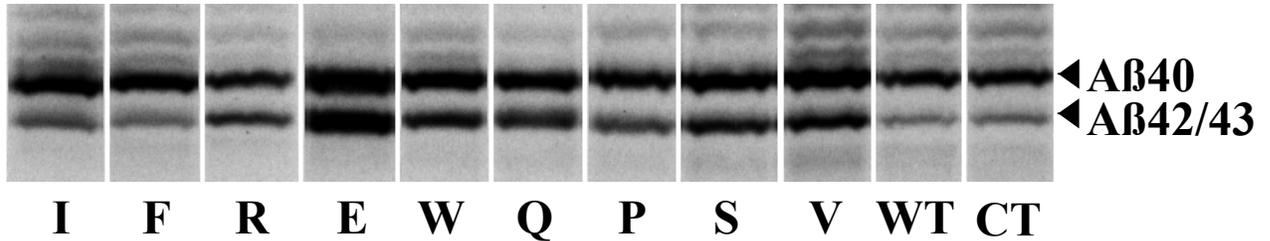
Danach ist bei L286E-exprimierenden Zellen überraschenderweise A β 43 (und nicht A β 42) unter den hochamyloidogenen C-terminal verlängerten A β -Spezies die Hauptspezies, und selbst bei L286R ist A β 43 in (relativ gesehen) großen Mengen in den gesammelten Überständen zu finden. Interessanterweise konnte die Spezies A β 43 nicht im Medium der untransfizierten (endogenes PS1 exprimierenden) sw-kidney-Kontrolle detektiert werden, dafür jedoch verstärkt verkürzte A β -Formen wie A β (1-37), A β (1-38) und A β (1-39) (keine Prozentangaben).

Die massenspektrometrische Analyse (Tab. 1), die im Falle der beiden Mutanten L286R und L286E besonders hohe A β 43-Mengen ergab, zeigte also, daß bei der Quantifizierung der Banden im Tris-Bicine-Gel auf alle Fälle zu berücksichtigen war, daß die schneller migrierende Bande der Summe der Intensitäten zweier verschiedener A β -Spezies, nämlich A β 42 und A β 43 entsprach.

3.3.2. Die PS1-Mutationen in Position 286 beeinflussen das Verhältnis (A β 42/43)/(A β 42/43+A β 40) in individueller Weise:

Um den Einfluß der verschiedenen PS1-L286-Mutationen auf das Verhältnis (A β 42/43)/(A β 42/43+A β 40=A β total) quantitativ zu untersuchen, wurden, wie oben schon geschildert, 2h/2h-Pulse/Chase-Dreifachansätze durchgeführt und die konditionierten Medien der metabolisch markierten Zellen mit dem Antikörper 3926 immunpräzipitiert. Nach Auftrennung der Immunpräzipitate im Tris-Bicine-Gel und Western-Transfer auf eine PVDF-Membran, wurde die Membran auf Filme exponiert (Abb. 17a). Nach Exposition der PVDF-Membran mit den transferierten A β -Spezies erfolgte die quantitative Auswertung auf einem Phosphorimager (Abb. 17b).

a



b

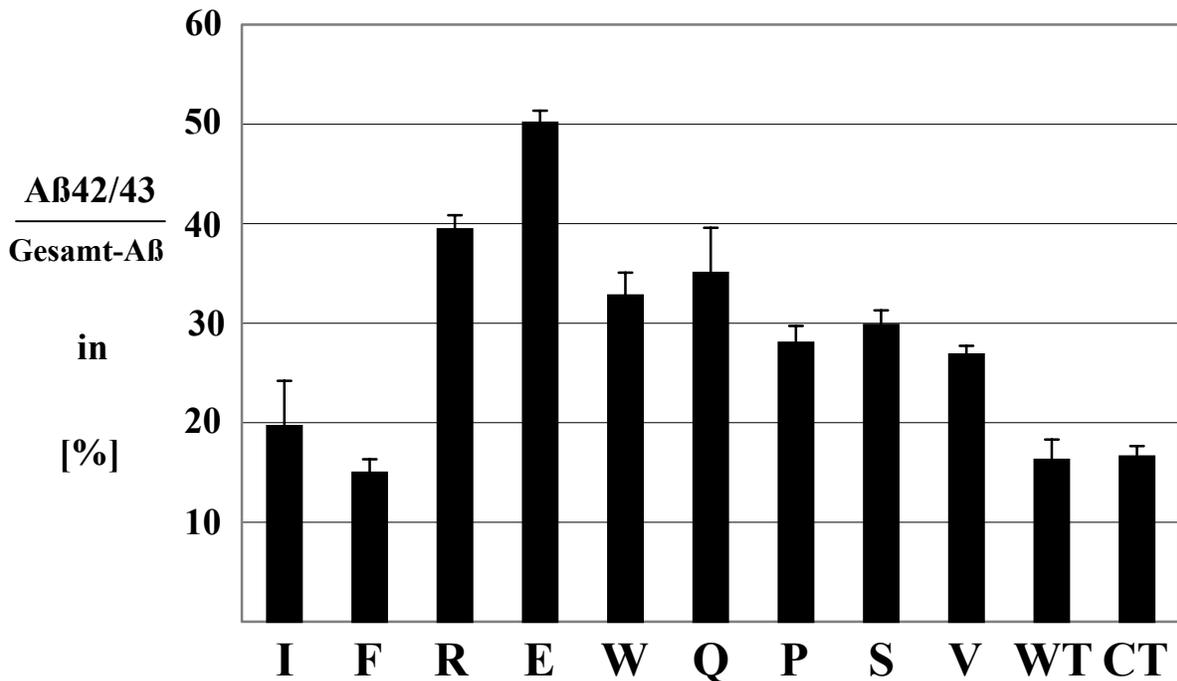


Abb. 17a+b: Effekte der mutanten PS1-Derivate auf die Aβ-Produktion. Die verschiedenen Aβ-Spezies wurden aus den Zellkulturüberständen von nach dem 2 h/2 h-Pulse-Chase-Paradigma (siehe oben) metabolisch markierten gemischten stabilen Klonen mit dem Antikörper 3926 immunpräzipitiert, mit Hilfe des Tris-bicine-Gelsystems aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zu sehen ist ein Autoradiogramm der Membran. Zu beachten ist insbesondere die im Vergleich zu den beiden Kontrollen starke relative Produktion von Aβ42/43 bei PS1 L286E (E) und PS1 L286R (R) exprimierenden Klonen. Die untere Abbildung zeigt das Ergebnis der quantitativen Auswertung des (Aβ42/43)/(Aβ42/43+Aβ40)-Verhältnisses bei den verschiedenen PS1 L286 exprimierenden Klonen auf einem Phosphorimager. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind in Form von Fehlerbalken eingetragen. WT = mit Wildtyp-PS1 transfizierte Kontroll-Linie; CT = untransfizierte Kontroll-Linie.

Wie zu erwarten war (Scheuner et al., 1996; Borchelt et al., 1996; Citron et al., 1997) kam es bei Zellen, die das Konstrukt PS1 L286V überexprimierten (V), zu einer relativ stärkeren Sekretion von A β 42/43 im Vergleich zu den Zellen, die mit dem Wildtyp-PS1 (WT) transfiziert worden waren oder lediglich endogenes PS1 (CT) synthetisierten (Abb. 17a+b). Die 8 artifiziellen Mutationen an der Stelle 286 wiesen interessanterweise individuelle und charakteristische Effekte auf die A β -Produktion auf. Während es bei PS1 L286I (I) und PS1 L286F (F) zu keiner signifikanten Erhöhung des Verhältnisses (A β 42/43)/(A β total) kam, verstärkten die anderen 6 Mutationen die relative A β 42/43-Produktion in einem Ausmaß, das bei L286P (P) und L286S (S) in etwa dem von L286V entsprach, bei L286W (W) und L286Q (Q) die relative A β 42/43-Sekretion von L286V übertraf und im Falle von L286R (R) und L286E (E) über das bei der Originalmutation beobachtete Verhältnis (A β 42/43)/(A β total) sogar deutlich hinausging (Abb. 17a+b). L286E-transfizierte Zellen zeigten den höchsten relativen Anstieg von A β 42/43 und führten zu einem Verhältnis (A β 42/43)/(A β total) von ca. 50 %. Damit übertrafen sie die Werte von L286V überexprimierenden Zellen um fast das Doppelte (Abb. 17b). Auch L286R-transfizierte Zellen wiesen eine relativ hohe A β 42/43-Produktion auf (Abb. 17a+b).

Die in der Abb. 17a+b gezeigten individuellen Effekte der verschiedenen Mutationen in Position 286 von PS1 waren unabhängig von der PS1-Expressionsrate (vergleiche hierzu die in den jeweiligen gemischten stabilen Zelllinien in Abb. 11 beobachtete Menge des Holoproteins mit den Effekten auf das Verhältnis (A β 42/43)/(A β total), die man bei den gleichen Zellen beobachten konnte (Abb.17a+b)).

3.4. Die Mutanten PS1 L286E und PS1 L286R inhibieren selektiv die Endoproteolyse von Notch:

Die Endoproteolyse von Notch im Zuge der Aktivierung des Notch-Rezeptors durch Liganden der DSL-Familie (Schroeter et al., 1998; Struhl & Adachi., 1998; Lecourtois & Schweisguth, 1998) führt auf der zytoplasmatischen Seite des Moleküls zur Freisetzung eines als „Notch intracellular cytoplasmic domain“ (NICD) bezeichneten Protein-

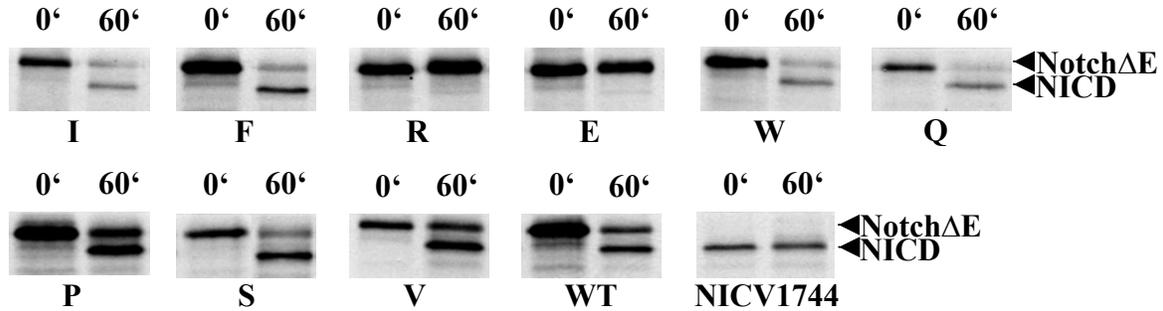
Fragments, das nach seiner Abspaltung an der Plasmamembran in den Zellkern wandert, wo es als Regulator bestimmter Transkriptionsfaktoren agiert (Schroeter et al., 1998).

Um den Einfluß der artifiziellen Mutationen an der Stelle 286 auf die Endoproteolyse von Notch zu untersuchen, wurde das jeweilige PS1-L286-Konstrukt stabil in Notch Δ E exprimierenden Zellen exprimiert. Die Eignung von ähnlichen Zelllinien mit Überexpression der drei Transgene β APP, PS1/PS2 und Notch Δ E für die Analyse der Notch-Prozessierung *in vitro* war bereits in früheren Arbeiten gezeigt worden (Steiner et al., 1999c; Capell et al., 2000).

Die NICD-Freisetzung in den das jeweilige PS1-L286-Konstrukt exprimierenden Zelllinien wurde zunächst im Rahmen von Pulse-Chase-Experimenten verfolgt (Abb. 18a). Nach der im Anschluß an die Chase-Phase durchgeführten Immunpräzipitation der Notch-Derivate mit dem Antikörper 9E10 (Steiner et al., 1999c; Schroeter et al., 1998) wurden die Immunpräzipitate auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die aufgetrennten Proteine zur Auswertung auf Filme und Phosphorimager exponiert. (Abb. 18b).

Wie erwartet (Steiner et al., 1999c) konnte im Falle der Zellen, die Wildtyp-PS1 überexprimierten, eine deutliche NICD-Freisetzung nach 60 min. beobachtet werden (Abb. 18a). Ähnliche Ergebnisse brachte die Analyse der NICD-Freisetzung bei PS1-Mutanten, die an der Stelle 286 ungeladene Aminosäurereste aufwiesen (Abb. 18a). In diesen Fällen ergab die Quantifizierung von jeweils drei unabhängigen Experimenten mit Hilfe der Image Quant Software für das Verhältnis (NICD)/(NICD+Notch Δ E) (nach 60 min.) Mittelwerte, die in etwa 60 % betragen und damit den Werten für die Wildtyp-PS1-transfizierten Zellen ungefähr gleichkamen (Abb. 18b). In krassem Gegensatz dazu war bei den Zellen mit den geladenen Mutationen in Position 286 von PS1 (L286R und L286E) die Freisetzung von NICD erheblich reduziert (Abb. 3.4.1.a+b), was für eine deutliche Inhibition der Notch Δ E-Prozessierung sprach. Interessanterweise war das Ausmaß der Inhibition bei den beiden Mutanten L286R und L286E sehr ähnlich (Abb. 18a+b). Intermediäre Effekte auf das Verhältnis (NICD)/(NICD+Notch Δ E), die zwischen den Werten für die beiden geladenen Mutanten und denen für die restlichen Mutanten sowie die Wildtyp-PS1-exprimierenden Zellen lagen, wurden nicht beobachtet (Abb. 18a+b).

a



b

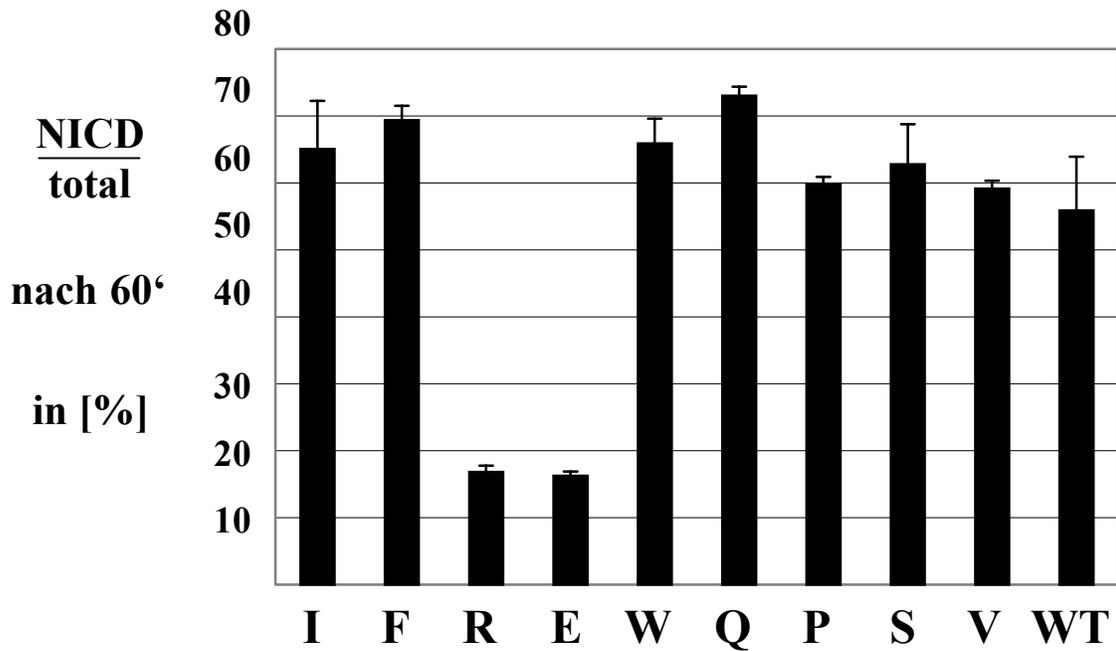


Abb. 18a+b: Effekte der mutanten PS1-Derivate auf die Endoproteolyse von Notch. Das NotchΔE-Konstrukt und das jeweilige PS1-L286-Konstrukt überexprimierende Zelllinien wurden in Pulse-Chase-Experimenten hinsichtlich ihrer NICD-Produktion analysiert (15' „Pulse“, „Chase“-Zeiten: 0' und 60'). Zu sehen ist ein Autoradiogramm des Gels, in dem die Notch-Derivate aufgetrennt wurden. Deutlich auffällig ist die starke Inhibition der NotchΔE-Endoproteolyse durch die beiden Mutanten PS1 L286R (R) und PS1 L286E (E). Dagegen zeigen alle anderen PS1-L286-Derivate, die Originalmutation L286V eingeschlossen, eine normale NICD-Bildung nach 60 min. und unterscheiden sich darin nicht von der Wildtyp-PS1 exprimierenden Kontrolle (WT). NICV1744 = rekombinantes NICD-Konstrukt als Marker für die NICD-Bildung (Schroeter et al., 1998; Steiner et al., 1999c). Die untere Abbildung (b) zeigt das Ergebnis der quantitativen Auswertung des (NICD)/(NotchΔE+NICD)-Verhältnisses zum Chase-Zeitpunkt 60' bei den verschiedenen PS1-L286-Derivaten auf dem Phosphorimager. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente. Die Standardabweichungen sind in Form von Fehlerbalken eingetragen. WT = Wildtyp-PS1 exprimierende Kontroll-Linie.

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse im Gegensatz zu den individuellen Effekten, die die L286-Mutationen auf die relative A β 42/43-Produktion gezeigt haben (Abb. 17a+b), für ein „Alles-oder-nichts“-Phänomen der betreffenden Mutationen in Bezug auf die Endoproteolyse von Notch.

3.5. PS1 L286R und PS1 L286E verursachen eine Akkumulation von Notch an der Zelloberfläche und im Golgi-Apparat:

Um die Ergebnisse der Pulse-Chase-Experimente (siehe oben) zu untermauern und die Verteilung der Notch-Derivate innerhalb der Zelle zu studieren, wurden immunzytochemische Experimente mit Notch Δ E-transfizierten Zellen durchgeführt, die Wildtyp-PS1, die Originalmutation L286V sowie die artifiziellen Mutationen L286E, L286R und L286I überexprimierten. Hierzu wurden die Zellen permeabilisiert und die Notch-Abkömmlinge Notch Δ E und NICD mit dem gegen die myc-Epitope gerichteten Antikörper 9E10 (siehe oben) detektiert.

Entsprechend den Erwartungen zeigten Zellen, die Wildtyp-PS1, die Originalmutation L286V sowie die künstliche Mutation L286I überexprimierten, eine deutliche Färbung des Nukleus, was ein Beleg für den effizienten Transfer von NICD in den Zellkern dieser Zellen war (Abb. 19).

Dieses Resultat steht im Einklang mit den Beobachtungen in Abb. 18a, wonach die entsprechenden Zellen in den Pulse-Chase-Experimenten eine deutliche NICD-Produktion zeigten. Im Falle der PS1-286-Mutanten mit den geladenen Aminosäuren R und E, die in Pulse-Chase-Versuchen bereits eine starke Inhibition der Notch Δ E-Prozessierung und damit der NICD-Freisetzung aufwiesen, war dagegen eine prominente Färbung der Plasmamembran zu beobachten (Abb. 19), was auf eine Akkumulation von unprozessiertem Notch Δ E an der Zelloberfläche hindeutete. Als offensichtliche Folge dieser Akkumulation an der Zellmembran („Rückstau“-Effekt) läßt sich auch die deutliche Golgi-Färbung in den PS1-L286R und PS1-L286E exprimierenden Zellen sehen (Capell, 2000; Abb. 19).

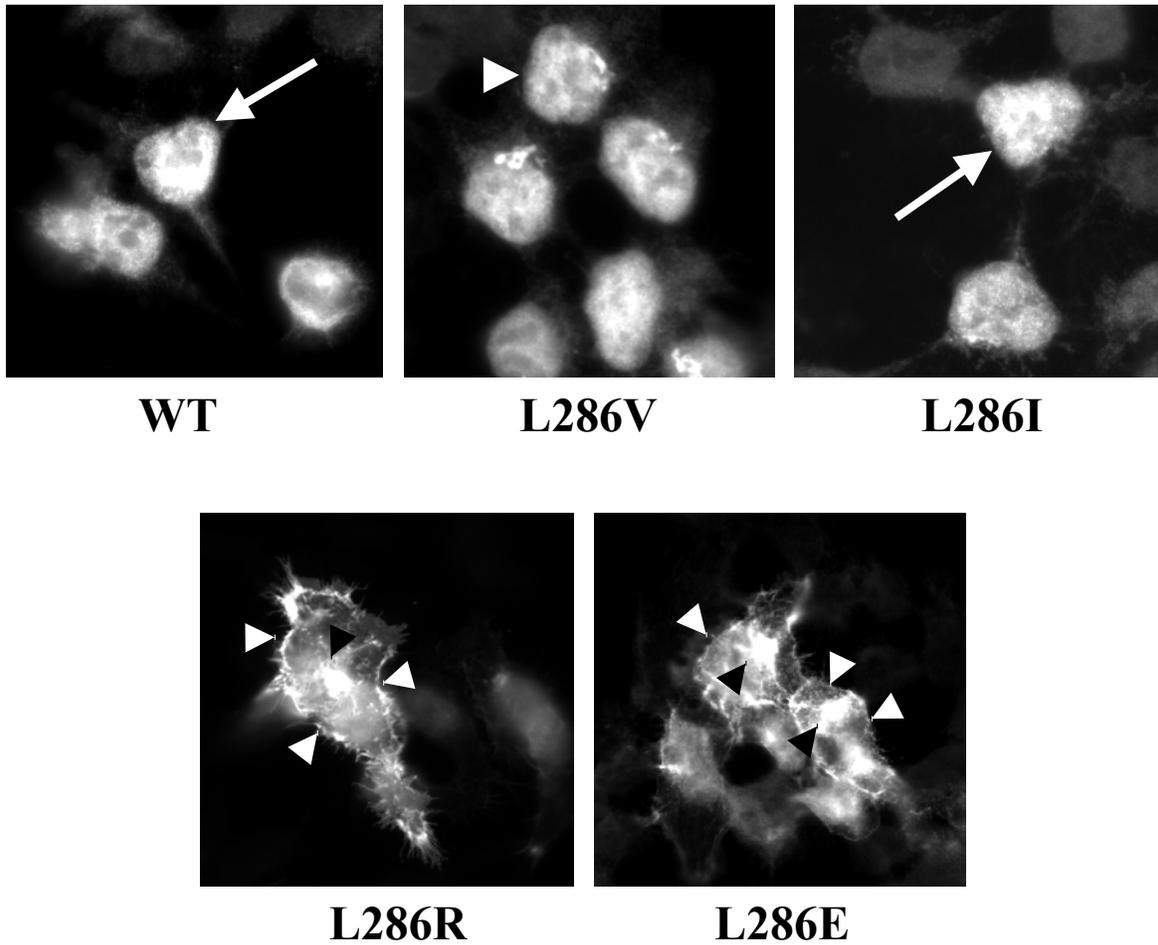


Abb. 19: Zelluläre Verteilung von Notch in Wildtyp-PS1 (WT), PS1 L286V, PS1 L286R, PS1 L286E und PS1 L286I exprimierenden Zellen. Nach der Fixierung in Paraformaldehyd wurden die Zellen permeabilisiert und mit dem gegen die 6 myc-Epitope des Notch Δ E-Konstrukts gerichteten Antikörper 9E10 inkubiert. Wie früher schon berichtet (Song et al., 1999), zeigen Wildtyp-PS1 exprimierende Zellen eine Akkumulation von Notch (höchstwahrscheinlich NICD) innerhalb des Zellkerns. Darin unterscheiden sie sich nicht von den PS1 L286V (FAK-Originalmutation) und PS1 L286I exprimierenden Zellen, die in Pulse-Chase-Experimenten bereits eine normale NICD-Bildung gezeigt haben (Abb. 18a+b). PS1 L286R und PS1 L286E dagegen bewirken eine Akkumulation von Notch an der Zytoplasmamembran (weiße Pfeilspitzen) und innerhalb des Golgi-Apparates (schwarze Pfeilspitzen, Capell, 2000)

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß im Falle eines Austauschs von L286 durch die geladenen Aminosäuren Arginin und Glutamat Notch Δ E an der Zelloberfläche und im Golgi-Apparat akkumuliert und im Unterschied zu den ungeladenen Mutationen an der Stelle 286 NICD nicht freigesetzt wird und konsequenterweise auch nicht in den Nukleus gelangt.

3.6. Transgene PS1-L286R-Expression in *C. elegans* erlaubt keine geregelte Notch-vermittelte Signalübertragung *in vivo*:

Um den Effekt der Mutation L286R auf die Notch-Signalübertragung *in vivo* zu testen, wurde in Kooperation mit Dr. Ralf Baumeister und Dr. Lisa Grim (Genzentrum, LMU München) das Konstrukt PS1 L286R unter dem Einfluß des sel-12-Promotors in einem geeigneten Expressionsvektor in *C. elegans* mit dem Genotyp sel-12(*ar131*) transgen exprimiert. Das Allel *ar131* stellt eine Punktmutation (C60S) dar, die bei *C. elegans* zu einem charakteristischen Defekt bei der Eiablage führt. Im Gegensatz zu Wildtyp-Nematoden ist die Zahl der gelegten Eier bei sel-12(*ar131*)-Tieren deutlich vermindert. Bei je 10 im Entwicklungsstadium L4 (noch keine Eiablage) isolierten Tieren dreier transgener Linien (PS1 L286R in sel-12(*ar131*)-Nematoden) wurde 6 Tage lang die Eiablage verfolgt und mit als Kontrolle dienenden Wildtyp-*C. elegans* (Linie N2) sowie einer sel-12(*ar131*)-Linie (*ar131*) verglichen.

Linie	Transgen	Genotyp	+++	++	+	-
N2	-	Wildtyp	10	0	0	0
<i>ar131</i>	-	sel-12(<i>ar131</i>)	0	0	0	10
BR1817	PS1 L286R	sel-12(<i>ar131</i>)	0	0	0	10
BR1818	PS1 L286R	sel-12(<i>ar131</i>)	0	0	2	8
BR1819	PS1 L286R	sel-12(<i>ar131</i>)	0	0	0	10

Tab. 2: Transgene PS1-L286R-Expression kann den sel-12-Phänotyp in *C. elegans* nicht revertieren. Je 10 Tiere einer Linie wurden im Entwicklungsstadium L4 (noch keine Eiablage) isoliert. Nach 6 Tagen wurde die Summe der in dieser Zeit insgesamt von jedem Tier gelegten Eier gebildet. Die Tiere wurden daraufhin entsprechend der jeweiligen Gesamtzahl der gelegten Eier in folgende Gruppen eingeteilt: +++ = >30 Eier/Tier; ++ = 16-30 Eier/Tier; + = 6-15 Eier/Tier; - = 0-5 Eier/Tier. N2 = Wildtyp; *ar131* = sel-12-*C. elegans* mit Genotyp sel-12(*ar131*); BR1817, BR1818, BR1819 = unterschiedliche PS1 L286R transgen exprimierende Linien von sel-12(*ar131*)-*C. elegans*.

Aus Tab. 2 geht deutlich hervor, daß die transgene Expression von PS1 L286R in sel-12(*ar131*)-*C. elegans* den mutanten Phänotyp dieser Tiere nicht revertieren kann. Die Zahl der nach 6 Tagen insgesamt gelegten Eier bei den transgenen Linien BR1817, BR1818 und BR1819 ist im Vergleich zum *C. elegans*-Wildtyp (N2) minimal und unterscheidet sich nicht wesentlich von den bei den sel-12(*ar131*)-Tieren (*ar131*, ohne

Transgen) beobachteten Werten. Damit führt PS1 L286R also auch *in vivo* zu einer Inhibition der Notch-vermittelten Signalübertragung und damit zu einem Verlust der PS-Funktion.

4. Diskussion

4.1. Die biologische Funktion der Preseniline:

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von acht an einer hochkonservierten FAD-assoziierten Stelle eingeführten Mutationen auf die Presenilin-1-Funktion untersucht. Die Entschlüsselung der Presenilin-Funktion zählt zu den drängendsten und aktuellsten Fragen der gegenwärtigen Erforschung der molekularen Grundlagen der Alzheimer-Krankheit. Die Anwesenheit von funktionellen Presenilinen ist nämlich für die Aktivität der γ -Sekretase, der letzten noch nicht eindeutig identifizierten der drei an der β APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen, wesentlich, und auch die Endoproteolyse des Notch-Rezeptors scheint nur im Beisein von intakten PS-Molekülen zu erfolgen (siehe Einleitung). In Anbetracht der Tatsache, daß Preseniline sowohl für die Prozessierung von β APP als auch für die Prozessierung von Notch innerhalb oder in unmittelbarer Nähe ihrer jeweiligen vermuteten Transmembrandomänen benötigt werden, sind verschiedene Varianten für ihre im einzelnen noch ungeklärte Funktion denkbar. Erstens könnten Preseniline den Transport von Notch und β APP zu dem(n) Kompartiment(en) ihrer jeweiligen Protease(n) steuern. Zweitens könnten sie aber auch an der Synthese bzw. dem Transport der γ -Sekretase/Notch-Protease beteiligt sein. Ferner wäre es möglich, daß Preseniline wesentliche Kofaktoren der γ -Sekretase/Notch-Protease darstellen. Und schließlich könnten sie Wolfe et al. (1999c) zufolge auch selbst proteolytische Aktivität besitzen. Nach der letzten überaus interessanten Hypothese wären die Preseniline mit ihren hochkonservierten Aspartat-Resten in den vermuteten Transmembrandomänen 6 und 7 womöglich Mitglieder einer neuen Klasse von Aspartyl-Proteasen mit innerhalb der Membran gelegenen katalytischen Zentren, und zu ihren Substraten würden sowohl β APP als auch Notch zählen (Wolfe et al., 1999c). Diese Hypothese wird durch verschiedene Argumente gestützt. Die beiden Aspartate D257 und D385, die in der Evolution sehr gut konserviert sind (Leimer et al., 1999), scheinen zunächst essentiell zu sein für die Endoproteolyse von β APP, denn ihre Substitution führt zu einer deutlichen

Reduktion von A β und p3 (Wolfe et al., 1999a) und bewirkt eine Akkumulation der β APP-C-terminalen Fragmente (β APP-CTFs) C99 und C83, die beide Substrate der γ -Sekretase(n) und Vorläufer von A β und p3 sind (Wolfe et al., 1999a; Capell et al., 2000). Diese und folgende weitere Beobachtungen veranlaßten Wolfe et al. (1999c) die Hypothese aufzustellen, die Preseniline als potentielle neuartige Aspartyl-Proteasen seien selbst γ -Sekretasen:

- Der Austausch D257E, bei dem die negative Ladung beibehalten wird, führt zu einer Akkumulation von β APP-CTFs, was die spezifische Bedeutung des Aspartats und nicht einfach nur der Ladung in Position 257 veranschaulicht (Wolfe et al., 1999a).
- In Studien mit Difluorketon-Protease-Inhibitoren konnte gezeigt werden, daß γ -Sekretasen Eigenschaften von Aspartyl-Proteasen aufweisen (Wolfe et al., 1999b). Zudem scheint die Topologie von D257 und D385, ausgehend vom Acht-Transmembrandomänen-Modell, mit der Topologie der γ -Sekretasen-Schnittstelle(n) zu korrespondieren (Wolfe et al., 1999c).
- Bei den „PS1-Aspartat-Mutanten“ konnte nach Gradientenfractionierung der Gesamt-Mikrosomen-Fraktion keine Veränderung der subzellulären Verteilung von β APP-CTFs C83 und C99 beobachtet werden, was eine Transportstörung als Ursache für die A β -Reduktion und β APP-CTF-Akkumulation weniger wahrscheinlich macht (Wolfe et al., 1999a). Auch konnte in diesen Experimenten kein Unterschied in der subzellulären Verteilung von Wildtyp-PS1 und PS1 D385A gezeigt werden (Wolfe et al., 1999a).
- In zellfreien Systemen konnte eine de-novo-Entstehung von A β aus C99 unter leicht sauren Bedingungen in Anwesenheit von Wildtyp-PS1 beobachtet werden, während dies in Ansätzen mit PS1 D385A nicht der Fall war (Wolfe et al., 1999a). Aspartyl-Proteasen haben charakteristischerweise im leicht sauren Milieu ihr pH-Optimum. Außerdem benötigen Aspartyl-Proteasen für ihre Funktion 2 Aspartyl-Reste, denen Wolfe et al. (1999a, 1999c) zufolge bei PS1 die beiden Reste D257 und D385 entsprechen könnten.

- Die Tatsache, daß die Notch-Endoproteolyse in PS1-ablatierten Zellen und PS-„Aspartat-Mutanten“ exprimierenden Zellen deutlich reduziert ist und sich zudem auch mit γ -Sekretasen-Inhibitoren hemmen läßt (De Strooper et al., 1999; Ray et al., 1999b; Steiner et al., 1999c; Mumm et al., 2000) unterstützt die Vorstellung, daß neben β APP auch der Notch-Rezeptor zu den Substraten der Preseniline zählen könnte (Wolfe et al., 1999c). Menschliche PS1/2-Moleküle mit mutierten TM6/TM7-Aspartaten vermögen darüber hinaus nicht, den sel-12-Eiablage-Defekt in *C. elegans* zu revertieren, was für eine Inhibition der Notch-Endoproteolyse *in vivo* spricht (Brockhaus et al., 1998; Steiner et al., 1999c).

Interessanterweise führen Mutationen der beiden Aspartate D257 und D385 (die sog. „Aspartat-Mutanten“) zu einer Inhibition der PS1-Endoproteolyse (Wolfe et al., 1999a). Diese Beobachtung veranlaßte Wolfe et al. zu der weiteren Hypothese, die PS-Endoproteolyse könnte Folge einer von Presenilin selbst vermittelten Autoproteolyse sein (Wolfe et al., 1999a, 1999c). Inwieweit diese und andere der oben angeführten Argumente für die „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“ einer konträren Argumentation auch im Hinblick auf die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten standhalten, wird zum Schluß dieses Kapitels diskutiert werden. Zunächst allerdings soll die Interpretation der wesentlichen in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse erfolgen.

4.2. Die PS1-Endoproteolyse scheint wenig anfällig zu sein für Austausche in unmittelbarer Nähe der PS1-Prozessierungsstelle:

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten gelang es zunächst zu zeigen, daß die Mutierung der Stelle 286 von PS1 keinen Einfluß auf die Endoproteolyse des Holoproteins hatte, unabhängig davon, ob die anstelle von Leucin eingeführte Aminosäure einen geladenen, ungeladen polaren oder ungeladen apolaren Rest besaß. Auch der „Helixbrecher“ Prolin führte offensichtlich zu keiner so gravierenden Veränderung der Struktur, daß die Prozessierung des Holoproteins beeinträchtigt gewesen wäre. Dies wäre u.U. für manche der eingeführten Aminosäuren angesichts der

räumlichen Nähe der PS1-Prozessierungsstelle(n) zur Stelle 286 (Thinakaran et al., 1996; Podlisny et al., 1997; Jacobsen et al., 1999; Steiner et al., 1999) zumindest denkbar gewesen. Auch deuteten die Ergebnisse früherer Arbeiten mit transfizierten Zellkulturlinien (Mercken et al., 1996; Murayama et al., 1997) und Lymphoblasten von Patienten mit bestimmten FAD-Mutationen (Takahashi et al., 1999) darauf hin, daß manche PS-Mutationen, so z.B. M146V und A246E (Mercken et al., 1996), A260V und G384A (Takahashi et al., 1999) sowie C410Y (Murayama et al., 1997), zu einer Beeinträchtigung der PS-Endoproteolyse führen könnten. Im Gegensatz zu den Austauschen in Position 286 von PS1 liegt allerdings keine der beschriebenen Mutationen in unmittelbarer Nähe der PS-Prozessierungsstelle(n).

Offensichtlich ist der Prozessierungsschritt, der zur Bildung der beiden N- und C-terminalen Fragmente von PS1 führt, ein gegenüber Aminosäureaustauschen in der Nähe der Prozessierungsstelle(n) relativ unempfindlicher Vorgang. Steiner et al. (1999b) konnten zeigen, daß die Endoproteolyse von PS1 nach den Austauschen M292D/V293A inhibiert wurde, während die Austausche M298E/A299P keinen Effekt auf die Prozessierung hatten. Andererseits war in der Vergangenheit bereits gezeigt worden, daß das C-terminale Endoproteolyse-Produkt von PS1 (PS1-CTF) hauptsächlich mit der Aminosäure um oder in Position 299 (Podlisny et al., 1997; Wisniewski et al., 1997; Shirotani et al., 1999) beginnt, eine Beobachtung, für die es zwei verschiedene Erklärungsmöglichkeiten gibt: zum einen könnte die Position 292 (oder eine in unmittelbarer Nähe gelegene Stelle) eine Art sequenzspezifische Bindungsstelle für die noch nicht identifizierte Presenilin-schneidende Protease („Presenilinase“) darstellen. Der Schnitt würde nach erfolgter Bindung allerdings weiter C-terminal im Bereich um die Aminosäure 299 (diesmal sequenzspezifisch) erfolgen, was letztlich auch das hauptsächlichliche Auftreten von mit Aminosäure 299 oder benachbarten Aminosäuren beginnenden PS1-CTFs erklären würde. Diese Erklärung scheint weniger wahrscheinlich, wenn man in Betracht zieht, daß auch C-terminale Endoproteolyse-Produkte beobachtet wurden, die mit den Aminosäuren 292 und 293 beginnen (Podlisny et al., 1997). Am wahrscheinlichsten ist daher die Erklärung, daß das PS-1-Holoprotein zunächst in oder um Position 292 geschnitten wird, und erst dann der zweite Schnitt nach Aminosäure 298 erfolgt, bzw. eine Exopeptidase das PS1-CTF nach dem 292/293-Schnitt vom N-

Terminus her bis zur Stelle 299 abbaut. Dieses Modell wird auch durch analoge Ergebnisse mit PS2 gestützt (Jacobsen et al., 1999). Alles in allem unterstützen die Beobachtungen bei den PS1-L286-Mutanten Steiners et al. (1999b) Ergebnisse, wonach lediglich die unmittelbare Veränderung der Sequenz in Position 292/293 zur Inhibition der PS1-Endoproteolyse führt. Die C-terminal von Stelle 292/293 eingeführten deutlichen Austausche M298E und A299P vermochten ebensowenig wie sämtliche Austausche an der Stelle 286 (also N-terminal von der wahrscheinlichen Prozessierungsstelle gelegene Austausche) die Endoproteolyse des PS1-Holoproteins zu inhibieren.

4.3. Mutagenese einer FAD-assoziierten Stelle von PS1 kann die pathologischen Effekte der Originalmutation verstärken:

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Einführung artifizieller Mutationen am FAD-assoziierten Codon 286 von PS1 die pathogene Aktivität der natürlich vorkommenden (Original-)Mutation L286V verstärken kann, d.h. das Verhältnis $(A\beta_{42}/43)/(A\beta_{42}/43+A\beta_{40})$ über das Niveau der Originalmutation anheben kann. Der Austausch L286V gehört biochemisch gesehen – wie die meisten FAD-assoziierten PS1-Mutationen – zu den eher konservativen Austauschen (siehe Tab. 3 im Anhang). Sie führt zu keiner Ladungsveränderung an der mutierten Stelle und auch sonst ähneln sich die Reste von L und V deutlich. Interessanterweise vermochte die Einführung der beiden unpolaren Aminosäuren I und F das Verhältnis $(A\beta_{42}/43)/(A\beta_{42}/43+A\beta_{40})$ im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen nicht signifikant zu erhöhen. Im Gegensatz dazu führten alle anderen Mutationen an der Stelle 286 zu einer deutlichen Erhöhung dieses Verhältnisses, wobei die stärksten Effekte bei dem Austausch L286E zu verzeichnen waren. Aber auch die Einführung einer positiven Ladung (L286R) erhöhte die A $\beta_{42}/43$ -Produktion im Vergleich zu der von A β_{40} in einem beträchtlichen Ausmaß. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die Einführung von Ladungen im hochkonservierten N-terminalen Bereich der großen hydrophilen Schleife zwischen den Transmembrandomänen 6 und 7 von PS1 die pathologische Funktion des PS1-Moleküls am stärksten zu beeinflussen vermag. Interessant ist zudem,

daß auch ausgerechnet die Einführung geladener Aminosäuren (E und R) an der Stelle 286 zu einer Inhibition der Notch-Endoproteolyse führte, während bei allen anderen Mutationen die Freisetzung von NICD „normal“ vonstatten ging.

Wären extreme Austausche wie L286R und L286E überhaupt mit dem Überleben betroffener Individuen vereinbar? Wären sie mit einem noch aggressiveren, eventuell noch früher einsetzenden Krankheitsbild der FAD vergesellschaftet? Natürlich kann über diese Fragen nur spekuliert werden. Durchaus denkbar erscheint die Möglichkeit, daß die PS1-Mutationen L286R und L286E bereits im embryonalen Stadium der Entwicklung einen lethalen Phänotyp aufgrund fehlender/verminderter NICD-Freisetzung zeigen würden, ähnlich wie ihn Notch-defiziente Mäuse (siehe Einleitung) bzw. transgene Mäuse mit nicht-prozessierbaren (mutierten) Notch-Rezeptoren (Huppert et al., 2000) aufweisen. Was die Aggressivität bzw. das Manifestationsalter der FAD betrifft, läßt sich nach Murayama et al. (1999), die das Manifestationsalter bei 28 verschiedenen PS1-Mutationen in Beziehung zu dem jeweiligen Verhältnis $(A\beta_{42})/(A\beta_{42}+A\beta_{40})$ gesetzt haben, keine gesicherte statistische Korrelation herstellen zwischen dem FAD-Erkrankungsalter und der relativen $A\beta_{42}$ -Produktion. Daher bleiben Überlegungen zur Schwere eines theoretischen, durch die Austausche L286R und L286E bedingten Krankheitsbildes rein spekulativ, zumal, wie oben bereits ausgeführt, die Vereinbarkeit dieser Mutationen mit postnatalem Leben eher unwahrscheinlich erscheint.

4.4. Die Prozessierung von β APP und die Endoproteolyse von Notch können von PS1 in unterschiedlicher Weise beeinflusst werden:

Bei der Gegenüberstellung der Effekte der PS1-L286-Mutanten auf die β APP- und Notch-Prozessierung fällt zunächst auf, daß im Falle von $A\beta$ jede der 8 im Codon 286 eingeführten Mutationen das Verhältnis $(A\beta_{42/43})/(A\beta_{42/43}+A\beta_{40})$ in charakteristischer und individueller Weise beeinflusst, wobei die stärksten Effekte von den beiden geladenen Aminosäuren E und R ausgehen. Die Betrachtung der Notch-Prozessierung dagegen ergibt ein anderes Bild, das im Gegensatz zu den Beobachtungen bei $A\beta$ nicht durch abgestufte Effekte, sondern eher durch eine Art „Alles-oder-nichts-Effekt“ charakterisiert

ist: Das Verhältnis (NICD)/(Notch Δ E+NICD) nach 60 min. ist bis auf die beiden geladenen Austausch L286R und L286E bei allen anderen L286-Mutationen ähnlich und entspricht in etwa dem Wert der Wildtyp-Kontrolle. Intermediäre Effekte, wie sie verschiedene der L286-Mutanten auf das Verhältnis (A β 42/43)/(A β 42/43+ A β 40) gezeigt haben, konnten nicht beobachtet werden. Dafür ähnelte die fast vollständige Inhibition der Notch-Endoproteolyse bei PS1 L286R und PS1 L286E stark den Effekten, die man bei den Mutationen der beiden konservierten Aspartate D257 und D385 für PS1 und PS2 beobachten konnte (Steiner et al., 1999c; Ray et al., 1999b). Die beiden Mutanten PS1 L286R und PS1 L286E verhalten sich daher hinsichtlich des Verlustes der biologischen Funktion des Presenilins, die Notch-Endoproteolyse zu ermöglichen, wie die beiden „PS1-Aspartat-Mutanten“. Für PS1 L286R konnte dies auch *in vivo* in *C. elegans* gezeigt werden, wo durch Überexpression des mutierten (menschlichen) PS1 der Eiablage-Defekt der sel-12-Nematoden nicht beseitigt werden konnte. Gleichzeitig allerdings korreliert dieser Verlust der Funktion in Bezug auf Notch mit dem Erwerb einer Fehlfunktion in Bezug auf A β : die relative A β 42/43-Produktion ist bei den Mutanten PS1 L286R und PS1 L286E gegenüber dem Wildtyp oder der Originalmutation L286V stark gesteigert, ohne daß die Produktion von Gesamt-A β reduziert wäre. Damit zeigen diese beiden PS1-Mutanten im konservierten N-terminalen Bereich der großen zytoplasmatischen Schleife einen Verlust der Presenilin-1-Funktion lediglich im Hinblick auf die Notch-Prozessierung und nicht auch im Hinblick auf die β APP-Prozessierung wie die PS1-knock-out-Zellen (De Strooper et al., 1998) oder die TM6/TM7-„Aspartat-Mutanten“ (Wolfe et al., 1999a; Steiner et al., 1999c; Leimer et al., 1999).

4.5. Die Wirkung der Presenilin-Mutationen:

Eine immer noch strittige und in 4.4. bereits angeschnittene Frage in der aktuellen Presenilin-Forschung ist die Frage nach der Wirkung der Presenilin-Mutationen. Sind Presenilin-Mutationen, die für einen Großteil der vererbten Alzheimer-Krankheit-Fälle verantwortlich sind (siehe Einleitung), letztendlich durch einen Verlust der Funktion oder durch den Erwerb einer Fehlfunktion des Presenilin-Moleküls gekennzeichnet?

Interessanterweise vermochte keine der bis dato untersuchten FAD-assoziierten Mutationen in menschlichem PS1 den Phänotyp von sel-12-defizienten *C. elegans*-Spezies bei entsprechender Überexpression des jeweiligen humanen Konstrukts im Nematoden vollständig rückgängig zu machen (Levitan et al., 1996; Baumeister et al., 1997; Steiner et al., 1999c). Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, stellt das Allel *ar131* von sel-12 eine Punktmutation (C60S) dar, die in einem in der Evolution stark konservierten Abschnitt des *C. elegans*-Presenilins vorkommt (Levitan et al., 1995). Diese Mutation zeichnet sich durch eine reduzierte Notch-vermittelte Signalübertragung (Levitan et al., 1995) aus. Bestechenderweise bergen ausgerechnet stark konservierte Abschnitte des Presenilins die meisten FAD-assoziierten Mutationen (Haass, 1997; siehe auch Abb. 4+7 der Einleitung). Song et al. (1999) konnten zeigen, daß einige FAD-assoziierte PS1-Mutationen die Inhibition der NICD-Freisetzung in PS1-ablatierten embryonalen Mäusefibroblasten nicht aufzuheben vermögen, was für den Verlust der Funktion des mutierten Presenilins spricht. In offenbarem Widerspruch zu dieser Beobachtung stehen allerdings Experimente, die zeigen konnten, daß FAD-assoziierte PS1-Mutationen sehr wohl dazu in der Lage sind, die Entwicklungsstörungen von PS1-knock-out-Mäusen zu verhindern (Davis et al., 1998; Quian et al., 1998). Letzteres ist vereinbar mit den Beobachtungen bei der Originalmutation L286V, denn diese hatte offensichtlich keinen Einfluß auf die Endoproteolyse von Notch. Allerdings sollte erwähnt werden, daß diese Experimente damit Songs Ergebnisse (Song et al., 1999) nicht vollständig ausschließen, da diese im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen in PS1-ablatierten Zellen erzielt wurden. Eindeutige Verhältnisse finden sich bei den Mutanten PS1 L286R und PS1 L286E, den beiden geladenen Austausch, die beide die Notch-Endoproteolyse inhibieren und damit, wie es scheint, einen klaren Verlust der Presenilin-Funktion widerspiegeln. Wie bereits in 4.4. ausgeführt, wird die γ -Sekretase-vermittelte β APP-Prozessierung in Zellen mit diesen PS1-Mutationen zwar nicht inhibiert, aber angesichts gesteigerter relativer A β 42/43-Produktion in pathologischer Weise modifiziert. Diese Beobachtung impliziert den Erwerb einer Fehlfunktion und verdeutlicht entsprechend den Ausführungen in 4.4. die differenzielle Wirkung von PS in Bezug auf Notch und A β . Im Sinne dieser differenziellen Wirkung sollte vielleicht auch die Frage nach den Effekten von

Presenilin-Mutationen, zumindest im Falle der analysierten Austausche, betrachtet werden: Mutationen, die bezüglich der Notch-Endoproteolyse zum völligen Funktionsverlust führen, können eine Modulation der PS-Funktion bei der β APP-Prozessierung im Sinne des Erwerbs einer Fehlfunktion bewirken.

4.6. Sind Preseniline γ -Sekretasen?

Die unterschiedliche Wirkung von Presenilin bezüglich der Endoproteolyse von Notch und der β APP-Prozessierung spielt natürlich eine große Rolle bei der Beantwortung der Frage, ob die Preseniline selbst eventuell identisch sein könnten mit der(n) γ -Sekretase(n) (Wolfe et al., 1999a; Wolfe et al., 1999c). Wenn dem so wäre, würde man zunächst erwarten, daß eine Protease, die sowohl den intramembranösen Schnitt bei β APP als auch den bei Notch vermittelt, bei einer Mutation, die zum Verlust der einen Funktion führt (im Falle von PS1 L286R und PS1 L286E der Freisetzung von NICD), auch den Ausfall der anderen Funktion zeigen sollte. Die Prozessierung von β APP ist aber - wie bereits mehrfach geschildert - anders als bei den „Aspartat-Mutanten“ in TM6 und TM7 von PS1 und PS2 (Wolfe et al., 1999a; Steiner et al., 1999c; Leimer et al., 1999) oder dem PS1-knock-out (De Strooper et al., 1998) offensichtlich weder bei L286R noch bei L286E reduziert, sondern nur in der Spezifität verändert. Die relative Produktion von A β 42/43 übertrifft die der Original-Mutante dabei bei weitem. Capell et al. (2000) konnten in ihren Experimenten ebenfalls einen differenziellen Effekt von PS1 auf die Notch- und β APP-Prozessierung beobachten. Bei der Mutierung des Aspartats D257 in der vermuteten TM6 von PS1 konnten sie - anders als bei der Mutierung von D385 in TM7 - zwar eine Inhibition der Notch-Endoproteolyse und Akkumulation der β APP-C-terminalen Fragmente, aber keine signifikante Reduktion der A β -Produktion feststellen (Capell et al., 2000). Diese Ergebnisse stehen in deutlichem Gegensatz zu Wolfes et al. Resultaten, die gerade D257 als Teil eines möglichen aktiven proteolytischen Zentrums des Presenilins vorsehen (Wolfe et al., 1999c). Überdies konnten Capell et al. (2000) im Unterschied zu Wolfe et al. (1999a) eine veränderte Verteilung von β APP-C-terminalen Fragmenten in mit den TM6/TM7-„Aspartat-Mutanten“ transfizierten Zellen feststellen, was eine Beteiligung des Presenilins an der Regulierung von intrazellulären Transport-

Prozessen durchaus möglich erscheinen läßt. Immunzytochemische Verfahren ergaben hierbei eine Akkumulation von β APP-CTFs an der Zellmembran im Gegensatz zu Wildtyp-transfizierten Zellen, die eine Kolokalisation von β APP und Golgi-Markern zeigten (Capell et al., 2000). Interessanterweise fanden Capell et al. (2000), daß unter den akkumulierten β APP-CTFs bei den „Aspartat-Mutanten“ das Produkt der α -Sekretase-Prozessierung, C83, unverhältnismäßig stark vertreten war, was in keiner Weise mit der beobachteten geringen Menge von p3 und der relativ großen A β -Produktion korrelierte (Capell et al., 2000). Zusammen mit den obigen Resultaten legt diese Beobachtung nahe, daß der Zusammenhang zwischen der A β - und β APP-CTF-Produktion wesentlich komplexer ist, als es eine einfache Enzym-Substrat-Beziehung im Sinne der „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“ nahelegen würde.

Welche Schlußfolgerungen lassen sich nun angesichts dieser komplexen Zusammenhänge bezüglich der Presenilin-Funktion ziehen? Zunächst scheinen die bei den Mutanten L286E und L286R beobachteten differenziellen Effekte auf die Presenilin-Funktion auf eine eher indirekte als direkte Rolle des Presenilins im β APP- und Notch-Stoffwechsel hinzudeuten, bei der u.U. davon ausgegangen werden müßte, daß mindestens zwei von Presenilin in differenzieller Weise gesteuerte proteolytische Aktivitäten (und nicht eine einzige) die Notch- und β APP-Prozessierung vermitteln. Dafür spricht in erster Linie die Tatsache, daß die intrazelluläre Verteilung der Preseniline hauptsächlich auf das endoplasmatische Retikulum (ER) und das „intermediate compartment“ (IC) beschränkt ist (Kovacs et al., 1996; Walter et al., 1996; Li et al., 1997; De Strooper et al., 1997), während die Endoproteolyse von Notch bekanntermaßen an der Plasmamembran stattfindet (Schroeter et al., 1998), und auch die Produktion von sezerniertem A β 40 und A β 42/43 auf dem Weg zur oder auch an der Membran bzw. nach Reinternalisierung erfolgt (Perez et al., 1999). Dieses räumliche Paradoxon läßt sich unter der Annahme einer direkten proteolytischen Presenilin-Wirkung auf Notch und β APP nur schwer erklären, allerdings wurde in neueren Arbeiten auch von einer zumindest teilweisen Lokalisation von PS an der Zelloberfläche berichtet (Ray et al., 1999b, siehe unten). Die Möglichkeit einer indirekt vermittelten Presenilin-Funktion wird ferner durch die Beobachtung gestützt, daß in PS1^{-/-}-Mäusen zwar eine drastische Verminderung der A β -Produktion zu verzeichnen ist (De Strooper et al.,

1998), dafür aber auch intrazellulär der Transport von β APP, APLP und TrkB verändert ist (Naruse et al., 1998). Letzteres kann als Argument für die indirekte Wirkung des Presenilins, z.B. als möglichem Regulator von Transportprozessen innerhalb der Zelle, angesehen werden. Eine Existenz von (mindestens zwei) verschiedenen Proteasen im Notch- und β APP-Stoffwechsel wird ferner auch durch die Beobachtung unterstützt, daß die Erkennung der Substrate Notch und β APP durch ihre jeweilige(n) Protease(n) unterschiedlich zu sein scheint. Während die γ -Proteolyse von β APP innerhalb der Membran stattfindet, erfolgt der Schnitt, der in der NICD-Freisetzung mündet in der Nähe oder direkt an der Membran (Schroeter et al., 1998; Struhl & Adachi., 1998; Kang et al., 1987; Chan & Jan., 1999). Darüber hinaus führt die Mutagenese der Notch-Endoproteolyse-Stelle zu einer Inhibition der Freisetzung von NICD (Huppert et al., 2000), während die Mutierung der γ -Sekretase-Schnittstelle noch mit einer Produktion von A β vereinbar ist (Lichtenthaler et al., 1999). Interessanterweise stellt auch die endoproteolytische Spaltung von PS – ähnlich wie die Notch-Prozessierung – einen sequenzspezifischen Vorgang dar, der im Gegensatz zur γ -Sekretasen-vermittelten β APP-Prozessierung (Tischer & Cordell., 1996; Murphy et al., 1999, Lichtenthaler et al., 1999) von der Primärstruktur der Schnittstelle abhängig zu sein scheint (Steiner et al., 1999b). Auch diese Beobachtung stellt die Annahme einer einzigen für Notch-, β APP- und PS-Endoproteolyse verantwortlichen Protease im Sinne der „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“ (Wolfe et al., 1999c) in Frage. In neueren Arbeiten gelang es schließlich zu zeigen, daß die γ -Sekretase-Aktivität selbst nicht einheitlich zu sein scheint, wobei mit γ -Sekretase-Inhibitoren nachgewiesen werden konnte, daß PS1 multiple pharmakologisch unterschiedliche γ -Sekretase-Aktivitäten reguliert (Murphy et al., 2000), was unter der Annahme der Gültigkeit der „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“ nur dadurch zu erklären wäre, daß PS1 entweder unterschiedliche aktive Zentren aufweist oder aber in verschiedenen katalytisch aktiven Formen vorliegt.

Unmittelbare Unterstützung findet die „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“ in zahlreichen neueren Arbeiten, die auf eine direkte Rolle von Presenilinen bei der Prozessierung von β APP und Notch hindeuten. So gelang es Li et al. (2000a) in Experimenten mit photoaktivierten γ -Sekretase-Inhibitoren PS-Moleküle kovalent zu markieren. Interessanterweise wurden durch die gegen das aktive Zentrum von Aspartyl-Proteasen

gerichteten Inhibitor-Moleküle keine PS-Holoproteine markiert, was ein Hinweis dafür sein könnte, daß das Holoprotein ein Aspartyl-Proteasen-Zymogen darstellt. Eine direkte Bindung von γ -Sekretase-Inhibitoren an PS1 konnte auch von Seiffert et al. (2000) und Esler et al. (2000) gezeigt werden. Eine partielle Charakterisierung der PS1-assoziierten γ -Sekretase-Aktivität wurde von Li et al. (2000b) beschrieben. Hierbei wurde unter Verwendung eines speziellen Detergens γ -Sekretase in katalytisch aktiver Form gewonnen und mit rekombinantem β APP-CTF-Substrat versetzt. Die Aktivität der gelösten γ -Sekretase wurde durch Messung von neu gebildetem A β 40/42 bestimmt und durch Pepstatin und neuere Aspartyl-Proteasen-Inhibitoren gehemmt (Li et al., 2000b). Gelchromatographisch konnte eine Koelution von PS1 und γ -Sekretase-Aktivität durchgeführt werden; mit Anti-PS1-Antikörpern gelang schließlich eine Immunpräzipitation der γ -Sekretase-Aktivität (Li et al., 2000b). Mit einem Molekulargewicht von schätzungsweise $2.0 \cdot 10^6$ übertraf das Molekulargewicht (MG) der eluierten γ -Sekretase-Aktivität dabei das MG von PS1-Dimeren bei weitem, was die Möglichkeit nahelegt, daß neben PS1 auch andere Proteine Bestandteile eines makromolekularen γ -Sekretase-Komplexes sein könnten (Li et al., 2000b). Xia et al. (2000) gelang schließlich die Koimmunpräzipitation von C83 und C99, den beiden γ -Sekretase-Substraten und A β -Vorstufen, sowohl mit PS1 als auch mit PS2. Interessanterweise konnten dabei PS1/C83- und PS1/C99-Komplexe ausgerechnet in jenen subzellulären Kompartimenten (Golgi-reichen und Trans-Golgi-Netzwerk-reichen Vesikel-Fractionen) nachgewiesen werden, in denen auch die höchsten Mengen von intrazellulärem A β gefunden wurden (Xia et al., 2000). Im Gegensatz dazu wurden Komplexe von PS1 und β APP-Holoprotein, das kein unmittelbares γ -Sekretase-Substrat darstellt, v.a. in früheren subzellulären Kompartimenten (ER-reichen Vesikel-Fractionen) beobachtet (Xia et al., 2000). Zudem konnte eine Akkumulation von PS1/C83- und PS1/C99-Komplexen bei pharmakologischer Inaktivierung der γ -Sekretase oder bei Vorliegen von TM6/TM7-„Aspartat-Mutanten“ exprimierenden Zellen gezeigt werden (Xia et al., 2000). Anhalt für eine unmittelbare Interaktion von PS1 und Notch gaben – analog zu den beschriebenen Versuchen mit β APP-CTFs – Koimmunpräzipitationsstudien, die von Ray et al. (1999a) durchgeführt wurden. In weiteren Arbeiten wurde

anhand von Pulse-Chase- und Biotinylierungsexperimenten eine PS1/Notch-Komplexbildung an der Plasmamembran beschrieben (Ray et al., 1999b). Dabei wurde von einer frühen Assoziation von PS1 und Notch innerhalb des ER/Golgi sowie dem Kotransport des PS1/Notch-Komplexes zur Plasmamembran berichtet (Ray et al., 1999b). Da die PS-abhängige Notch-Endoproteolyse an bzw. in der Nähe der Plasmamembran stattfindet (Schroeter et al., 1998; Chan & Jan, 1999) decken sich auch diese Beobachtungen mit der „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“ (Wolfe et al. 1999c).

Wie lassen sich nun die bei den PS1-Mutanten L286R und L286E beobachteten differenziellen Effekte in Einklang bringen mit der Vorstellung, die Preseniline selbst seien β APP und Notch schneidende Aspartyl-Proteasen? Eine an der Zelloberfläche stattfindende Interaktion von PS und Notch - die Voraussetzung einer eventuellen PS-vermittelten Notch-Endoproteolyse - wurde, wie oben erwähnt, von Ray et al. (1999b) beschrieben, obwohl Einvernehmen darüber zu bestehen scheint, daß der Hauptlokalisationsort der Preseniline nicht die Plasmamembran ist (siehe Einleitung). Dennoch wäre es theoretisch denkbar, daß die beiden Mutationen PS1 L286R und PS1 L286E spezifisch die Verteilung von PS1 innerhalb der Zelle in der Weise beeinflussen, daß sie zu einer vollständigen Retention des Presenilins innerhalb eines frühen zellulären Kompartiments führen. Die Folge wäre in einem solchen Fall die Akkumulation von unprozessiertem Notch an der Zelloberfläche, wie sie in den Experimenten für L286R und L286E zu beobachten war. Gleichzeitig könnte eine PS-Retention in einem frühen Kompartiment, wie z.B. dem ER oder dem IC, im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit u.U. auch die verstärkte Produktion von A β 42/43 bewirken, die früher im Zusammenhang mit der Entstehung von intrazellulärem A β mit der β APP-Prozessierung innerhalb des ER oder des IC in Verbindung gebracht wurde (Wild-Bode et al., 1997; Hartmann et al., 1997; Cook et al., 1997; Skovronsky et al., 1998). Dagegen spricht allerdings die Tatsache, daß die Entstehung von sezerniertem A β 40 und A β 42/43 auf den Transport zur Zelloberfläche und die Reinternalisierung von β APP angewiesen ist (Perez et al., 1999). Daher erscheint die Möglichkeit einer spezifischen PS-Retention als Folge der beiden geladenen Austausche in Position 286 von PS1 und Ursache der beobachteten Effekte eher unwahrscheinlich (wenn auch nicht unmöglich), ganz abgesehen von der Tatsache, daß der Großteil von PS1 ohnehin schon innerhalb früher intrazellulärer

Kompartimente zu finden ist (Kovacs et al., 1996; Walter et al., 1996; Li et al., 1997; De Strooper et al., 1997). Eine zweite mögliche Erklärung für die Resultate bei L286R und L286E bezieht sich auf die Sequenzspezifität der von PS1 potentiell ausgeübten proteolytischen Aktivität. Diese könnte nämlich durch die beiden Austausche z.B. so verändert worden sein, daß es zu einer verstärkten alternativen Endoproteolyse von β APP hinter Aminosäure 42 bzw. 43 von A β käme. Gleichzeitig allerdings müßte davon ausgegangen werden, daß der korrespondierende alternative Schnitt bei Notch nicht möglich wäre. Auch diese Hypothese erscheint wenig wahrscheinlich, da man sowohl bei der Mutante L286R als auch bei L286E noch beträchtliche Mengen von A β 40 feststellen kann, und angesichts dieser Beobachtung wiederum eine viel deutlichere NICD-Produktion zu erwarten wäre, als man sie tatsächlich vorfindet.

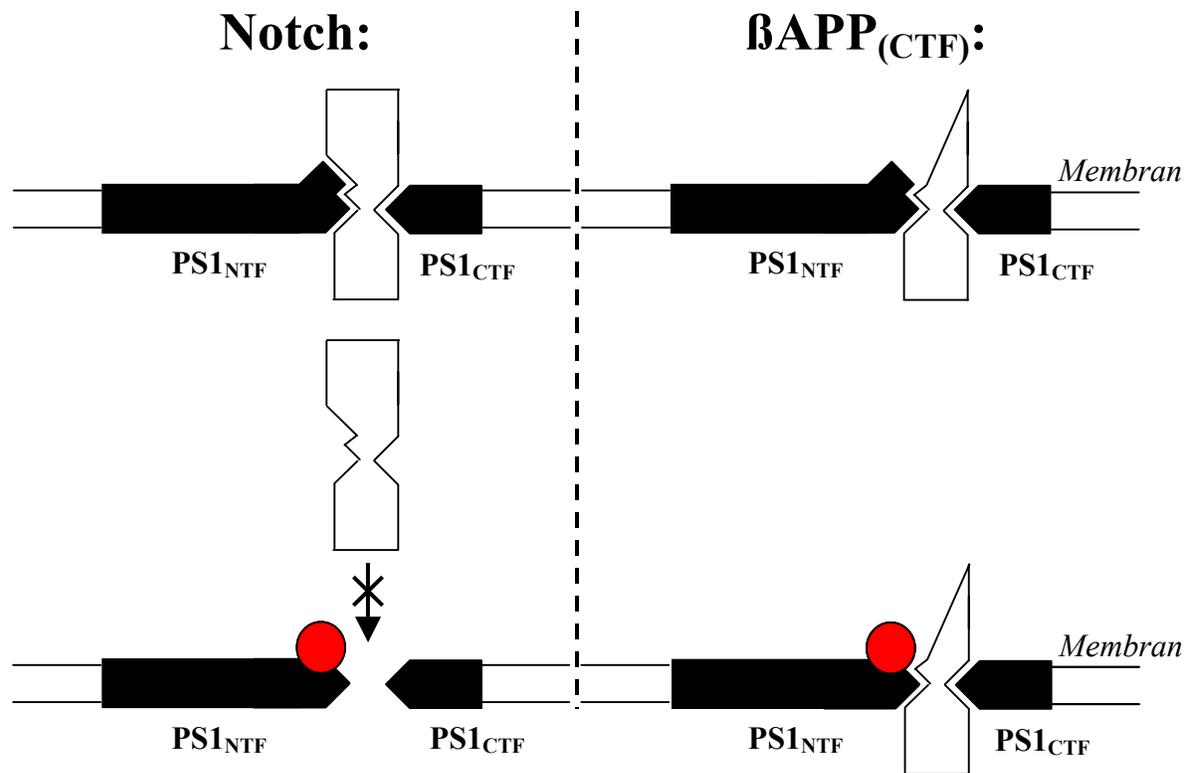


Abb. 20: Stark vereinfachtes Modell, das die bei den Mutanten PS1 L286R und PS1 L286E beobachteten differenziellen Effekte auf die Endoproteolyse von Notch und β APP unter der Annahme der Richtigkeit der „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“ (Wolfe et al., 1999c) erklären könnte. Danach würden die beiden geladenen Austausche (symbolisiert durch den roten Kreis ●) zwar mit der (hypothetischen) Notch/PS1-Bindungsstelle, nicht jedoch mit der β APP_(CTF)/PS1-Bindungsstelle interferieren. Die Folge wäre die beobachtete Inhibition der Notch-Prozessierung bei nicht wesentlich veränderter A β -Produktion.

Eine recht plausible Erklärung für die bei L286R und L286E beobachtete unterschiedliche Wirkung von Presenilin bei der β APP-Prozessierung und der Endoproteolyse von Notch wäre unter der Annahme der Gültigkeit der „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“ die Möglichkeit, daß die beiden geladenen Austausch an der Stelle 286 die PS-Konformation auf eine Weise verändern könnten, die zwar die Interaktion des Presenilins mit β APP(-CTF) noch erlauben würde, aber nicht die Interaktion von PS mit Notch. Somit würden die beiden Mutationen einerseits zwar mit der Notch/PS1-Bindungsstelle interferieren, andererseits aber nicht mit der β APP(-CTF)/PS1-Bindungsstelle (siehe Abb. 20).

Abgesehen von der in Abb. 22 dargestellten Möglichkeit einer unmittelbaren Wechselwirkung der die Stelle L286 umfassenden PS1-Domäne mit den Substraten Notch/ β APP(-CTF) wäre es auch denkbar, daß die beiden Austausch L286R und L286E die Beschaffenheit bzw. die Stabilität eines potentiellen hochmolekularen Presenilin-Proteasen-Komplexes selbst beeinflussen, indem sie z.B. die Wechselwirkung von PS1-CTFs und -NTFs untereinander oder die Interaktion dieser Fragmente mit anderen (für die proteolytische Aktivität) essentiellen Bestandteilen des hypothetischen Molekül-Komplexes stören bzw. modifizieren. Unter diesen Annahmen wäre es vorstellbar, daß bei der Prozessierung von Notch und β APP(-CTFs) unterschiedlich zusammengesetzte hochmolekulare PS-Protein-Komplexe eine Rolle spielen, wobei im Falle der beiden geladenen Austausch in Position 286 von PS1 der Notch-prozessierende Komplex aufgrund gestörter Notch-Komplex-spezifischer Wechselwirkungen seine Funktion einbüßen würde. Der β APP(-CTF) schneidende Komplex wäre dagegen weniger von den Austauschen betroffen und könnte seine enzymatische Aktivität noch entfalten, allerdings wäre diese angesichts erhöhter relativer A β 42/43-Mengen pathologisch verändert.

Natürlich wäre es schließlich auch durchaus denkbar, daß die Mutationen PS1 L286R und/oder PS1 L286E sowohl die Interaktion eines hochmolekularen PS-Protein-Komplexes mit seinen potentiellen Substraten Notch und β APP(-CTF), als auch die Wechselwirkungen unter den jeweiligen Komponenten des proteolytischen Komplexes selbst beeinflussen könnten.

4.7. Ausblick:

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Presenilin in Bezug auf den β APP-Metabolismus und die Endoproteolyse des Notch-Rezeptors differenzielle Wirkungen entfalten kann. Wesentlich für das Verständnis der Presenilin-Funktion bzw. die Beantwortung der Frage, ob die Preseniline eventuell selbst Proteasen darstellen im Sinne der „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“ (Wolfe et al., 1999c), wird aller Wahrscheinlichkeit nach die Aufklärung des makromolekularen Komplexes sein, an dessen Aufbau sie beteiligt sind. Wie oben schon erwähnt, wurde von Li et al. (2000b) kürzlich ein PS1-assoziiertes makromolekularer Komplex mit γ -Sekretase-Aktivität beschrieben, dessen Molekulargewicht von $2.0 \cdot 10^6$ zumindest die Möglichkeit offenläßt, daß an seinem Aufbau neben PS1 auch andere Proteine beteiligt sind, deren Funktion und Wechselwirken mit den PS-Fragmenten und weiteren Bestandteilen von entscheidender Bedeutung sein könnte. Erst kürzlich wurde Nicastrin, ein Transmembran-Glykoprotein, identifiziert, das mit PS1 und PS2 hochmolekulare Komplexe bildet (Yu et al., 2000b). Eine Suppression der Nicastrin-Expression in *C. elegans* führt zu sel-12-ähnlichen Phänotypen (Yu et al., 2000b). Überdies konnte eine Bindung von Nicastrin an β APP-CTFs und ein direkter Einfluß von Nicastrin-Punkt- und Deletionsmutationen auf die A β -Produktion beobachtet werden (Yu et al., 2000b). Hier ergeben sich hochinteressante Ansatzpunkte für künftige Experimente. Die Klärung der Frage, wie und ob die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten L286-Austausche, insbesondere L286R und L286E, einen Einfluß auf die Stabilität oder die Zusammensetzung von PS/Nicastrin-Komplexen ausüben, könnte aufregende Einblicke in den möglichen funktionellen Aufbau dieser hochmolekularen Komplexe liefern. Möglicherweise spielen neben Nicastrin auch andere Proteine eine Rolle.

Daß Preseniline ihre biologische Aktivität in größeren Molekülkomplexen entfalten, die aus PS-NTFs und -CTFs bestehen, wurde bereits in der Einleitung (1.4.2.) erwähnt. Dabei kommt es zunächst im rauhen ER zur Bildung kleinerer unreifer Komplexe aus PS-Holoprotein, die im glatten ER und Golgi-Apparat einen Maturierungsprozess durchlaufen und schließlich einen sogenannten Hochmolekulargewichts(Hoch-MG-)komplex aus PS-NTFs und -CTFs formieren (Yu et al, 1998; Capell et al., 1998; Yu et

al., 2000a). Interessanterweise verhindern Mutationen der beiden kritischen Aspartate in TM6 und TM7 von PS1 und PS2 den Maturierungsprozess von kleineren PS-Komplexen zu Hoch-MG-Komplexen (Yu et al., 2000a). Wie bereits ausgeführt, bewirken „Aspartat-Mutanten“ sowohl eine Inhibition der Notch-Endoproteolyse als auch eine Akkumulation von β APP-CTFs sowie eine Reduzierung der A β -Produktion (wie oben schon dargestellt, ist Letzteres für D257 umstritten (Capell et al., 2000)). Da L286R und L286E in mancherlei Hinsicht den „Aspartat-Mutanten“ ähneln, wäre es denkbar, daß auch sie den Aufbau dieses Komplexes stören. Die TM6-„Aspartat-Mutante“ z.B., die Capell et al. (2000) zufolge keine reduzierte A β -Synthese zeigt, weist - abgesehen von der aufgehobenen PS-Endoproteolyse - eindeutige Parallelen zu den Mutanten L286R und L286E auf: in beiden Fällen ist die Notch-Endoproteolyse inhibiert, die Gesamt-A β -Produktion aber nicht signifikant reduziert. Die Endoproteolyse ist dabei für den Einschluß in Hoch-MG-Komplexe aller Wahrscheinlichkeit nach weniger ausschlaggebend als räumlich-strukturelle Aspekte, was die Tatsache unterstreicht, daß PS1 Δ Exon-9-Moleküle trotz fehlender Endoproteolyse Hoch-MG-Komplexe bilden können, PS1 Δ Exon-9-Proteine mit mutierten kritischen Aspartaten aber nicht (Yu et al., 2000a). Weitere Experimente werden zeigen müssen, welche Auswirkungen L286R und L286E auch auf die intrazelluläre Bildung/Akkumulation von β APP-CTFs haben. Möglicherweise könnten sich auch hier Parallelen zu den „Aspartat-Mutanten“ im Sinne einer β APP-CTF-Akkumulation auf tun, was wiederum neue interessante Fragestellungen aufwerfen würde.

Die Untersuchung der Komplexbildung bei den jeweiligen L286-Mutanten könnte vielleicht auch dazu beitragen, entscheidende Zusammenhänge zwischen Funktion bzw. Funktionsverlust einerseits und der Bildung von Hoch-MG-Komplexen andererseits aufzudecken. Das Verständnis dieser Zusammenhänge dürfte unser Wissen über den Aufbau von makromolekularen PS-Protein-Komplexen und deren potentielle Unterschiede in Abhängigkeit von der jeweiligen Funktion deutlich erweitern. Gerade diese potentiellen Unterschiede könnten auch im Hinblick eines therapeutischen medikamentösen Eingreifens große Bedeutung erlangen. Ausgehend von der „Aspartyl-Proteasen-Hypothese“ würde eine medikamentöse Inhibition der „Presenilin- γ -Sekretase“ zwar zu einer Reduktion von toxischem A β 40/42(43) führen, gleichzeitig wahrscheinlich

aber auch eine unerwünschte Inhibition der Notch-Endoproteolyse nach sich ziehen, die sich neuesten Arbeiten zufolge auch im ausdifferenzierten Organismus nachteilig bemerkbar machen könnte (Wittenburg et al., 2000). Unter der Annahme der strukturellen Verschiedenheit von β APP- und Notch-prozessierenden hochmolekularen Komplexen wäre dagegen eine spezifische, mit weniger Nebenwirkungen verbundene Therapie vorstellbar. Diese dürfte allerdings ein wesentlich tieferes Verständnis über den Aufbau und die Funktion der Presenilin enthaltenden makromolekularen Komplexe voraussetzen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden an der FAD-assoziierten Stelle 286 von Presenilin-1 (PS1) 8 biochemisch unterschiedliche artifizielle Mutationen eingeführt und deren Wirkung auf die PS1-Endoproteolyse, die A β 40/A β 42(43)-Produktion sowie die Endoproteolyse des Notch-Rezeptors im Zellkultursystem untersucht. Die beobachteten Effekte wurden mit den Effekten der natürlich vorkommenden Originalmutation L286V und der Wildtyp-Kontrolle verglichen. Bei allen untersuchten L286-Mutationen war trotz der Nähe des Codons 286 zu(r) beschriebenen PS1-Prozessierungsstelle(n) eine im Vergleich zum Wildtyp unveränderte PS1-Endoproteolyse zu beobachten. Bei der Betrachtung ihres Einflusses auf sezerniertes A β 40 bzw. A β 42(43) wiesen die einzelnen Mutationen individuelle Effekte auf: während bei einigen Aminosäure-Austauschen (L286I und L286F) das Verhältnis A β 42(43)/(A β 40+A β 42(43)) in etwa dem der Wildtyp-Kontrolle entsprach, zeigten alle anderen Mutationen erhöhte Ratios, die entweder mit den bei der Originalmutation beobachteten Werten vergleichbar waren oder diese - wie im Falle von L286E und L286R - bei weitem übertrafen. Interessanterweise konnte ausgerechnet bei den beiden Mutationen mit den deutlichsten Effekten auf die relative A β 42(43)-Produktion, L286R und L286E, eine Inhibition der Notch-Endoproteolyse und eine verminderte Freisetzung von NICD beobachtet werden, während sich alle anderen untersuchten Mutationen (L286V eingeschlossen) in Bezug auf die NICD-Freisetzung nicht vom Wildtyp unterschieden. Damit konnten differenzielle Effekte von Presenilin-1 auf die β APP-Prozessierung und die Endoproteolyse des Notch-Rezeptors gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, daß für die jeweiligen Funktionen von PS1 unterschiedliche Domänen/Wechselwirkungen ausschlaggebend sind. Den im Rahmen dieser Arbeit analysierten PS1 L286-Mutanten, insbesondere L286R und L286E, könnte in Zukunft eine wichtige Rolle für das Verständnis des Aufbaus und der Funktion von makromolekularen PS-Protein-Komplexen zukommen.

6. Literaturverzeichnis

- Alonso, C. A., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5562-5566.
- Alzheimer, A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtl. Med.* 64, 146-148.
- Arduengo, P.M., Appleberry, O.K., Chuang, P., L'Hernault, S.W. (1998) The presenilin protein family member SPE-4 localizes to an ER/Golgi derived organelle and is required for proper cytoplasmic partitioning during *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis. *J. Cell Sci.* 111, 3645-3654.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., Fortini, M.E. (1995) Notch signaling. *Science* 268, 225-232.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., Lake, R.J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776.
- Barelli, H., Lebeau, A., Vizzavona, J., Delaere, P., Chevallier, N., Drouot, C., Marambaud, P., Ancolio, K., Buxbaum, J.D., Khorkova, O., Heroux, J., Sahasrabudhe, S., Martinez, J., Warter, J.M., Mohr, M., Checler, F. (1997) Characterization of new polyclonal antibodies specific for 40 and 42 amino acid-long amyloid beta peptides: their use to examine the cell biology of presenilins and the immunohistochemistry of sporadic Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy cases. *Mol. Med.* 10, 695-707.
- Baumeister, R., Leimer, U., Zweckbronner, I., Jakubek, C., Grünberg, J. & Haass, C. (1997) Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate *Caenorhabditis elegans* Notch signalling independently of proteolytic processing. *Genes Funct.* 1, 149-159.
- Baumeister, R. & Haass, C. (1998) Presenilin proteins and their roles in development and Notch signaling. In *Molecular Biology of Alzheimer's Disease* (ed. Haass, C.) Harwood Academic Publishers, 219-234.
- Bellosta, S., Nathan, B.P., Orth, M., Dong, L.-M., Mahley, R.W. & Pitas, R.E. (1995) Stable expression and secretion of apolipoproteins E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produces differential effects on neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 270, 27063-27071.
- Biernat, J., Mandelkow, E.-M., Schröter, C., Lichtenberg-Kraag, B., Steiner, B., Berkling, B., Meyer, H., Mercken, M., Vandermeeren, A., Goedert, M. & Mandelkow, E. (1992) The switch of tau protein to Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *EMBO J.* 11, 1593-1597.
- Blacker, D., Wilcox, M.A., Lairs, N.M., Rodes, L., Horvath, S.M., Go, R.C.P., Perry, R., Watson, B., Bassett, S.S., McInnis, M.G., Albert, M.S., Hyman, B.T. & Tanzi, R.E. (1998) Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 19, 357-360.
- Bondareff, W., Harrington, C., Wischik, C.M., Hauser, D.L. & Roth, M. (1994) Immunohistochemical staging of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 158-164

- 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., Sisodia, S.S. (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17, 1005-1013.
- Braak, H. & Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239-259.
- Braak, H., Braak, E., Bohl J. & Reintjes R. (1996) Age, neurofibrillary changes, A-beta amyloid and the onset of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 210, 87-90.
- Braak, H., Griffing, K. & Braak, E. (1997) Neuroanatomy of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res.* 3, 235-247.
- Bracco, L., Piccini, C. & Amaducci, L. (1998) Rate of progression of mental decline in Alzheimer's disease: Summary of European studies. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 12, 347-355.
- Brandt, R. & Eidenmüller, J. (1998) The Tau proteins in Alzheimer's disease (1998) In *Molecular Biology of Alzheimer's Disease* (ed. Haass, C.) Harwood Academic Publishers, 17-43.
- Brockhaus, M., Grunberg, J., Rohrig, S., Loetscher, H., Wittenburg, N., Baumeister, R., Jacobsen, H., Haass, C. (1998) Caspase-mediated cleavage is not required for the activity of presenilins in amyloidogenesis and NOTCH signaling. *Neuroreport* 9, 1481-1486.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A., Israel, A. (2000) A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell* 5, 207-216.
- Busciglio, J., Lorenzo, A. & Yankner, B.A. (1992) Methodological variables in the assessment of β -amyloid neurotoxicity. *Neurobiol. Aging* 13, 609-612.
- Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J. & Yankner, B.A. (1995) β -amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14, 879-888.
- 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. & Black, R.A. (1998) Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated γ -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* 273, 27765-27767.
- Cai, X., Golde, T.E. & Younkin, S.G. (1993) Release of excess amyloid β -protein from a mutant amyloid β precursor. *Science* 259, 514-516.
- Cao, X. & Südhof, T.C. (2001) A Transcriptionally Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-120.
- Capell, A., Saffrich, R., Olivo, J.-C., Meyn, L., Walter, J., Grünberg, J., Dotti, C. & Haass, C. (1997) Cellular expression and proteolytic processing of Presenilin is developmentally regulated during neuronal differentiation. *J. Neurochem.* 69, 2432-2440.
- Capell, A., Grünberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D.J. & 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, 3205-3211.

- Capell, A., Steiner, H., Romig, H., Keck, S., Baader, M., Grim, M.G., Baumeister, R., Haass, C. (2000) Presenilin-1 differentially facilitates endoproteolysis of the beta-amyloid precursor protein and Notch. *Nat. Cell. Biol.* 2, 205-211.
- Castano, E.M., Prelli, F., Wisniewski, T., Golabek, A., Kumar, R.A., Soto, C. & Frangione, B. (1995) Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid β peptides and apolipoprotein E. *Biochem. J.* 306, 599-604.
- Checler, F. (1995) Processing of the β -amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 65, 1431-1444.
- Chan, Y.M. & Jan, Y.N. (1999) Presenilins, processing of beta-amyloid precursor protein, and notch signaling. *Neuron* 23, 201-204.
- Citron, M., Olersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I. & Selkoe, D.J. (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-674.
- Citron, M., Teplow, D.B., Selkoe, D.J. (1995) Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* 14, 661-670.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P., Selkoe, D.J. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* 3, 67-72.
- Citron, M., Eckman, C.B., Diehl, T.S., Corcoran, C., Ostaszewski, B.L., Xia, W., Levesque, G., St George Hyslop, P., Younkin, S.G., Selkoe, D.J. (1998) Additive effects of PS1 and APP mutations on secretion of the 42-residue amyloid beta-protein. *Neurobiol. Dis.* 5, 107-116.
- Cook, D.G., Sung, J.C., Golde, T.E., Feldenstein, K.M., Wojczyk, B.S., Tanzi, R.E., Trojanowski, J.Q., Lee, V. M.-Y. & Doms, R.W. (1996) Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: Localization in cell bodies and dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 9223-9228.
- Cook, D.G., Forman, M.S., Sung, J.C., Leight, S., Kolson, D.L., Iwatsubo, T., Lee, V. M.-Y. & Doms, R.W. (1997) Alzheimer's A β (1-42) is generated in the endoplasmic reticulum / intermediate compartment of NT2N cells. *Nat. Med.* 3, 1021-1023.
- Coyle, J.T., Oster-Granite, M.L., Reeves, R.H. & Gearhart, J.D. (1988) Down syndrome, Alzheimer's disease and the trisomy 16 mouse. *Trends Neurosci.* 11, 390-394.
- Cribbs, D.H., Chen, L.S., Bende, S.M., LaFerla, F.M. (1996) Widespread neuronal expression of the presenilin-1 early-onset Alzheimer's disease gene in the murine brain. *Am. J. Pathol.* 148, 1797-1806.
- Davis, J.A., Naruse, S., Chen, H., Eckman, C., Younkin, S., Price, D.L., Borchelt, D.R., Sisodia, S.S., Wong, P.C. (1998) An Alzheimer's disease-linked PS1 variant rescues the developmental abnormalities of PS1-deficient embryos. *Neuron* 20, 603-609.
- De Sauvage, F., & Octave, J.N. (1989) A novel mRNA of the A4 amyloid precursor gene coding for a possible secreted protein. *Science* 245, 651-653.
- De Strooper, B., Umans L., Van Leuven F., Van Den Berghe H. (1993) Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway. *J. Cell Biol.* 295-304.

- De Strooper, B., Beullens, M., Contreras, B., Levesque, L., Craessaerts, K., Cordell, B., Moechars, D., Bollen, M., Fraser, P., St. George-Hyslop, P.E. & van Leuven, F. (1997) Phosphorylation, subcellular localization and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *J. Biol. Chem.* 272, 3590-3598.
- De Strooper, B. & Van Leuven, F. (1998) The cell biology of amyloid precursor protein. In *Molecular Biology of Alzheimer's Disease* (ed. Haass, C.) Harwood Academic Publishers, 133-151.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K. & Van Leuven, F. (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387-390.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craesserts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., Goate, A. & Kopan, R. (1999) A presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.
- Delaere, P., Duyckaerts, C., He, Y., Piette, F. & Hauw, J.J. (1991) Subtypes and differential laminar distributions of beta A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol.* 81, 328-335.
- Dewji, N.N. & Singer, S.J. (1997) The seven-transmembrane spanning topography of the Alzheimer's disease-related presenilin proteins in the plasma membranes of cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14025-14030.
- Dickson, D.W. (1997) The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 321-339.
- 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. & Sisodia, S.S. (1996) Protein topology of presenilin 1. *Neuron* 17, 1023-1030.
- Donoviel, D.B., Hadjantonakis, A.K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P.S., Bernstein, A. (1999) Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev.* 13, 2801-2810.
- Dovey, H.F., Suomensari-Chrysler, S., Lieberburg, I., Sinha, S & Keim, P.S. (1993) Cells with a familial Alzheimer's disease mutation produce authentic β -peptide. *Neurochemistry* 4, 1039-1042.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M.N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J., Younkin, S. (1996) Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383, 710-713.
- Eidelberg, D., Sotrel, A., Joachim, C., Selkoe, D.J., Forman, A., Pendlebury, W.W., Perl, D.P. (1987) Adult onset Hallervorden-Spatz disease with neurofibrillary pathology. A discrete clinicopathological entity. *Brain* 110, 993-1013.
- Ernst, R.L. & Hay, J.W. (1997) Economic research on Alzheimer disease: A review of the literature. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 11, 135-145.
- Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D. & Ward, P.J. (1990) Cleavage of amyloid β -peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.

- Esler, W.P., Kimberly, W.T., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Moore, C.L., Tsai, J.Y., Rahmati, T., Xia, W., Selkoe, D.J., Wolfe, M.S. (2000) Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1. *Nat. Cell Biol.* 2, 428-434.
- Evans, K.C., Berger, E.P., Cho, C.-G., Weisgerber, K.H. & Lansbury, P.T. (1995) Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 763-767.
- Fagan, A.M., Bu, G., Sun, Y., Daugherty, A. & Holtzman, D.M. (1996) Apolipoprotein E-containing high density lipoprotein promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 271, 30121-30125.
- Ferris, S.H. & Kluger, A. (1997) Assessing cognition in Alzheimer disease research. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 6, 45-49.
- Fossgrén, A., Brückner, B., Czech, C., Masters, C.L., Beyreuther, K. & Paro, R. (1998) Transgenic Drosophila expressing human amyloid precursor protein show γ -secretase activity and a blistered-wing phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13703-13708.
- Fraser, P.E. & St George-Hyslop, P.H. (1998) Mutations in three genes are associated with early onset Alzheimer's disease. In *Molecular Biology of Alzheimer's Disease* (ed. Haass, C.) Harwood Academic Publishers, 47-73.
- Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. (2000) Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim. Biophys. Acta* 1502(1), 122-132.
- Garver, T.D., Lehmann, R.A. & Billingsley, M.L. (1996) Microtubule assembly competence analysis of freshly-biopsied human tau, dephosphorylated tau and Alzheimer tau. *J. Neurosci. Res.* 44, 12-20.
- Geldmacher, D.S. & Whitehouse, P.J.Jr. (1997) Differential diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology* 48, S2-9.
- Glenner, G.G. & Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885-890.
- Goedert, M. (1993) Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 16, 460-465.
- Golde, T.E., Estus, S., Usiak, M., Younkin, L.H. & Younkin, S.G. (1990) Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron* 4, 253-267.
- Gong, C.-X., Shaikh, S., Wang, J.-Z., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1995) Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: Decrease in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* 65, 732-738
- Greenwald, I. (1998) LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.* 12, 1751-1762.
- Gridley, T. (1996) Notch, stroke and dementia. *Nature* 383, 673.
- Grundke, I.I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., & Binder, L.I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4913-4917.

- Gu, Y., Oyama, F. & Ihara, Y. (1996). Tau is widely expressed in rat tissues. *J. Neurochem.* 67, 1235-1244.
- Haass, C., Hung, A.Y. & Selkoe, D.J. (1991) Processing of β -amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J. Neurosci.* 11, 3783-3793.
- 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. & Selkoe, D.J. (1992a). Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-325.
- Haass, C., Koo, E., Mellon, A., Hung, A.Y. & Selkoe, D.J. (1992b) Targeting of cell-surface β -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357, 500-503.
- Haass, C. & Selkoe, D.J. (1993) Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide. *Cell* 75, 1039-1042.
- Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Teplow, D.B. & Selkoe, D.J. (1993) β amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J. Biol. Chem.* 268, 3021-3024.
- Haass, C., Lemere, C.A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L. & Selkoe, D.J. (1995a) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Med.* 1, 1291-1296.
- Haass, C., Capell, A., Citron, M., Teplow, D.B. & Selkoe, D.J. (1995b) The vacuolar H^+ -ATPase Inhibitor Bafilomycin A1 differently affects proteolytic processing of mutant and wild-type β -amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 270, 6186-6192.
- Haass, C., Koo, E.H., Capell, A., Teplow, D.B., Selkoe, D.J. (1995c) Polarized sorting of beta-amyloid precursor protein and its proteolytic products in MDCK cells is regulated by two independent signals. *J. Cell Biol.* 128, 537-547.
- Haass, C. (1997) Presenilins: Genes for life and death. *Neuron* 18, 687-690.
- Haass, C. & De Strooper, B. (1999). The presenilins in Alzheimer's disease - proteolysis holds the key. *Science* 286, 916-919.
- Hardy, J. (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 20, 154-159.
- Harper J.D., Wong S.S., Lieber C.M., Lansbury P.T. Jr. (1997a) Observation of metastable A β amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem. Biol.* 4, 119-125.
- Harper J.D., Lieber C.M., Lansbury P.T. Jr. (1997b) Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid- β protein. *Chem. Biol.* 4, 951-959.
- Harper J.D., Wong S.S., Lieber C.M., Lansbury P.T. Jr. (1999) Assembly of A beta amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 38, 8972-8980.
- Hartmann, T., Bieger, S.C., Brühl, B., Tienari, P.J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G.W., Masters, C.L., Dotti, C.G., Unsicker, K. & Beyreuther, K. (1997) Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A β 40/42 amyloid peptides. *Nat. Med.* 3, 1016-1020.

- Hartley D.M., Walsh D.M., Ye C.P., Diehl T., Vasquez S., Vassilev P.M., Teplow D.B., Selkoe D.J. (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J. Neurosci.* 19, 8876-8884.
- Hendriks, L. van Duijn, C.M., Cras, P., Cruts, M., van Hul, W., van Harskamp, F., Warren, A., McInnis, M.G., Antonarakis, S.E., Martin, J.J., Hofman, A. & van Broekhoven, C. (1992) Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nat. Genet.* 1, 218-221.
- Hennerici, M. (1995) Vascular dementia: a changing concept. *Arzneimittelforschung* 45, 366-370
- Herreman, A., Hartmann, D., Annaert, W., Saftig, P., Craessaerts, K., Serneels, L., Umans, L., Schrijvers, V., Vanderstichele, H., Baekelandt, V., Dressel, R., Cupers, P., Huylebroeck, D., Zwijsen, A., Van Leuven, F., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11872-11877.
- Higuchi, R., Krummel, B., Saiki, R.K. (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16, 7351-7367.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.
- Hoek, R.M., Ruuls, S.R., Murphy, C.A., Wright, G.J., Goddard, R., Zurawski, S.M., Blom, B., Homola, M.E., Streit, W.J., Brown, M.H., Barclay, A.N., Sedgwick, J.D. (2001) Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290, 1768-1771.
- Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B.I., Geschwind, D.H., Bird, T.D., McKeel, D., Goate, A., Morris, J.C., Wilhelmsen, K.C., Schellenberg, G.D., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M.-Y. (1998) Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 282, 1914-1917.
- Howlett, D.R., Jennings, K.H., Lee, D.C., Clark, M.S., Brown, F., Wetzell, R., Wood, S.J., Camilleri, P. & Roberts, G.W. (1995) Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. *Neurodegeneration* 4, 23-32.
- Hsiao, K.K., Borchelt, D.R., Olson, K., Johannsdottir, R., Kitt, C., Yunis, W., Xu, S., Eckman, C., Younkin, S., Price, D., Iadecola, C., Clark, H.B. & Carlson, G. (1995) Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron* 15, 1203-1218.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F. & Cole, G. (1996) Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99-102.
- Hung A.Y., Selkoe D.J. (1994) Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J.* 13, 534-542.
- Huppert, S.S., Le, A., Schroeter, E.H., Mumm, J.S., Saxena, M.T., Milner, L.A., Kopan, R. (2000) Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1. *Nature* 405, 966-970.

- 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., Christie G. (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell Neurosci.* 14, 419-427.
- Hutton, M., Lendon, C., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Jooisse, M., Kwon, J.M., Nowotny, P., Che, L.K., Norton, J., Morris, J.C., Reed, L.A., Trojanowski, J., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P.R., Hayward, N., Kwok, J.B.J., Schofield, P.R., Andreadis, A., Snowden J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Ostra, B.A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T. & Heutink, P. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-705.
- Jacobsen, H., Reinhardt, D., Brockhaus, M., Bur, D., Kocyba, C., Kurt, H., Grim, M.G., Baumeister, R., Loetscher, H. (1999) The influence of endoproteolytic processing of familial Alzheimer's disease presenilin 2 on abeta42 amyloid peptide formation. *J. Biol. Chem.* 274, 35233-35239.
- Jarrett, J.T. & Lansbury, P.T. Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055-1058.
- Jordan, J., Galindo, M.F., Miller, R.J., Reardon, C.A., Getz, G.S. & LaDu, M.J. (1998) Isoform-specific effect of apolipoprotein E on cell survival and β -amyloid-induced toxicity in rat hippocampal pyramidal neuronal cultures. *J. Neurosci.* 18, 195-204.
- Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cécillion, M., Maréchal, E., Maciazek, J., Vayssière, C., Cruaudt, C., Cabanis, E.-A., Rouchaux, M.M., Weissenbach, J., Bach, J.F., Bousser, G.G. & Tournier-Lasserre, E. (1996) Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383, 707-710.
- Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, M.J., Masters, C.L., Grzeschik, K.-H., Multhaup, G., Beyreuther, K. & Müller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. (1995) Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Katzman, R., Terry, R., DeTeresa, R., Brown, T., Davies, P., Fuld, P., Renbing, X., Peck, A. (1988) Clinical, pathological and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann. Neurol.* 23, 138-144.
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S. & Ito, H. (1988) Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331, 530-532.
- Klafki, H.W., Wiltfang, J., Staufenbiel, M. (1996) Electrophoretic separation of betaA4 peptides (1-40) and (1-42). *Anal. Biochem.* 237, 24-29.
- König, G., Monning, U., Czech, C., Prior, R., Banati, R., Schreiter Gasser, U., Bauer, J., Mastes, C. & Beyreuther, K. (1992) Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the β A4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leucocytes and brain microglial cells. *J. Biol. Chem.* 267, 10804-10809.

- Koo, E.H., Sisodia, S.S., Archer, D.R., Martin, L.J., Weidemann, A., Beyreuther, K., Fischer, F., Masters, C.L. & Price, D.L. (1990) Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1561-1565.
- Koo, E.H., Park, L. & Selkoe, D.J. (1993) Amyloid β -protein as substrate interacts with extracellular matrix to promote neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4748-4752.
- Kovacs, D.M., Fausett, H.J., Page, K.J., Kim, T.-W., Moir, R.D., Merriam D.E.; Hoillister, R.D., Hallmark, O.G., Mancini, R., Felsenstein, K.M., Hyman, B.T., Tanzi, R.E. & Wasco, W. (1996) Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: Neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat. Med.* 2, 224-229.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M, Haass, C. & Fahrenholz, F. (1999) Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3922-3927.
- Lansbury, P.T. Jr, Kosik, K.S. (2000) Neurodegeneration: new clues on inclusions. *Chem Biol* 7(1), R9-R12.
- Lecourtois, M., Schweisguth, F. (1998) Indirect evidence for Delta-dependent intracellular processing of notch in *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* 8, 771-774.
- Lee, M.K., Slunt, H.H., Martin, L.J., Thinakaran, G., Kim, G., Gansy, S.E., Seeger, M., Koo, E., Price, D.L. & Sisodia, S.S. (1996). Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J. Neurosci.* 16, 7513-7525.
- Leimer, U., Lun, K., Romig, H., Walter, J., Grunberg, J., Brand, M., Haass, C. (1999) Zebrafish (*Danio rerio*) presenilin promotes aberrant amyloid beta-peptide production and requires a critical aspartate residue for its function in amyloidogenesis. *Biochemistry* 38, 13602-13609.
- Levitan, D. & Greenwald, I. (1995) Facilitation of lin-12-mediated signalling by *sel-12*, a *Caenorhabditis elegans* *S182* Alzheimer's disease gene. *Nature* 377, 351-354.
- Levitan, D., Doyle, T.G., Brousseau, D., Lee, M.K., Thinakaran, G., Slunt, H.H., Sisodia, S.S. & Greenwald, I. (1996) Assessment of normal and mutant human presenilin function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14940-14944.
- Levy, E., Carman, M.D., Fernandez-Madrid, I.J., Power, M.D., Lieberburg, I., Sjoerd, G., vanDuinen, S.G., Bots, G., Luyendijk, W. & Frangione, B. (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage-Dutch typ. *Science* 269, 970-973.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., Crowley, A.C., Fu, Y.-H., Guenette, S.Y., Galas, D., Nemens, E., Wijsman, E.M., Bird, T.D., Schellenberg, G.D. & Tanzi, R.E. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973-977.
- Levy-Lahad, E., Poorkaj P., Wang K., Fu Y.H., Oshima J., Mulligan J., Schellenberg G.D. (1996). Genomic structure and expression of STM2, the chromosome 1 familial Alzheimer disease gene. *Genomics* 34, 198-204.
- Li, J., Xu, M., Zhou, H., Ma, J. & Potter, H. (1997) Alzheimer presenilins in the nuclear membrane, interphase kinetochores, and centrosomes suggest a role in chromosome segregation. *Cell* 90, 917-927.

- Li, X. & Greenwald, I. (1997) HOP-1, a *Caenorhabditis elegans* presenilin, appears to be functionally redundant with SEL-12 presenilin and to facilitate LIN-12 and GLP-1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12204-12209.
- Li, X. & Greenwald, I. (1998) Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for *Caenorhabditis elegans* and human presenilins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7109-7114.
- Li, Y.M., Xu, M., Lai, M.T., Huang, Q., Castro, J.L., DiMuzio-Mower, J., Harrison, T., Lellis, C., Nadin, A., Neduveilil, J.G., Register, R.B., Sardana, M.K., Shearman, M.S., Smith, A.L., Shi, X.P., Yin, K.C., Shafer, J.A., Gardell, S.J. (2000a) Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature* 405, 689-694.
- Li, Y.M., Lai, M.T., Xu, M., Huang, Q., DiMuzio-Mower, J., Sardana, M.K., Shi, X.P., Yin, K.C., Shafer, J.A., Gardell, S.J. (2000b) Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6138-6143.
- Liao, A., Nitsch R.M., Greenberg, S.M., Finckh, U., Blacker, D., Albert, M., Rebeck, G.W., Gomez-Isla, T., Clatworthy, A., Binetti, G., Hock, C., Mueller-Thomsen, T., Mann, U., Zuchowski, K., Beisiegel, ., Staehlin, H., Growdon, J.H. Tanzi, R.E. & Hyman, B.T. (1998) Genetic association of an alpha2-macroglobulin (Val1000Ile) polymorphism and Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1953-1956.
- Lichtenthaler, S.F., Wang, R., Grimm, H., Uljon, S.N., Masters, C.L., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3053-3058.
- Lin X., Koelsch G., Wu S., Downs D., Dashti A., Tang J. (2000) Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1456-1460.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., Israel, A. (1998) The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8108-8112.
- Lorenzo, A. & Yankner, B.A. (1994) Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12243-12247.
- Ma, J., Yee, A., Brewer Jr., A.Y.H., Das, S. & Potter, H. (1994) Amyloid-associated proteins α 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer β -protein into filaments. *Nature* 372, 92-94.
- Mandelkow, E.-M., Biernat, J., Drewes, G., Gustke, N., Trincek, B. & Mandelkow, E. (1995) Tau domains, phosphorylation, and interaction with microtubules. *Neurobiol. Aging* 16, 355-362.
- Mann, D.M. & Esiri, M.M. (1989) The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J. Neurol. Sci.* 89, 169-179.
- Masliah, E., Mallory, M., Ge, N., Alfort, M., Veinbergs, I. & Roses, A.D. (1995) Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *J. Neurosci.* 136, 107-122.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinmann, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L. & Beyreuther, K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4245-4249.

- Mattson, M.P., Barger, S.W., Cheng, B., Lieberburg, I., Smith-Swintosky, V.L. & Rydel, R.E. (1993). β -amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca^{2+} homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends in Neurosci.* 16, 409-414.
- Maurer, K., Volk, S., Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349 (9064), 1546-1549.
- Mercken M, Takahashi H, Honda T, Sato K, Murayama M, Nakazato Y, Noguchi K, Imahori K, Takashima A. (1996). Characterization of human presenilin 1 using N-terminal specific monoclonal antibodies: Evidence that Alzheimer mutations affect proteolytic processing. *FEBS Lett.* 389, 297-303.
- Miller, D.L., Papayannopoulos, I.A., Styles, J., Bobin, S.A., Lin, Y.Y., Biemann, K. & Iqbal K. (1993) Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 301, 41-52.
- Mori, H., Takio, K., Ogawara, M. & Selkoe, D.J.. (1992) Mass spectrometry of purified amyloid β protein in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 267, 17082-17086.
- Mullan, M. & Crawford, F. (1993) Genetic and molecular advances in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 16, 398-414.
- Müller, U., Gajic, V., Steinbach, J., Aguzzi, A., Herms, J., Tremml, P., Sisodia, S.S., Wolfer, D.P. & Lipp, H.-P. (1998) Single and combined gene deficiencies of APP/APLP-family members. *Neurobiol. Aging* 16, 1174.
- Multhaup, G., Masters, C.L., Beyreuther, K. & Cappai, R. (1998) The biological activities and function of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. In *Molecular Biology of Alzheimer's Disease* (ed. Haass, C.) Harwood Academic Publishers, 75-94.
- Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D.J., Ray, W.J., Kopan, R. (2000) A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol. Cell* 5, 197-206.
- Murayama, O., Honda, T., Mercken, M., Murayama, M., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Nakazato, Y., Michel, G., Song, S., Sato, K., Takahashi, H., Takashima, A. (1997) Different effects of Alzheimer-associated mutations of presenilin 1 on its processing. *Neurosci. Lett.* 229, 61-64.
- Murayama, O., Tomita, T., Nihonmatsu, N., Murayama, M., Sun, X., Honda, T., Iwatsubo, T., Takashima, A. (1999) Enhancement of amyloid beta 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 265, 61-63.
- Murphy, M.P., Hickman, L.J., Eckman, C.B., Uljon, S.N., Wang, R., Golde, T.E. (1999) gamma-Secretase, evidence for multiple proteolytic activities and influence of membrane positioning of substrate on generation of amyloid beta peptides of varying length. *J. Biol. Chem.* 274, 11914-11923.
- Murphy, M.P., Uljon, S.N., Fraser, P.E., Fauq, A., Lookingbill, H.A., Findlay, K.A., Smith, T.E., Lewis, P.A., McLendon, D.C., Wang, R., Golde, T.E. (2000) Presenilin 1 regulates pharmacologically distinct gamma-secretase activities. Implications for the role of presenilin in gamma-secretase cleavage. *J. Biol. Chem.* 275, 26277-26784.
- Nakai T., Yamasaki A., Sakaguchi M., Kosaka K., Mihara K., Amaya Y., Miura S. (1999) Membrane topology of Alzheimer's disease-related presenilin 1. Evidence for the existence of a molecular species with a seven membrane-spanning and one membrane-embedded structure. *J. Biol. Chem.* 274, 23647-23658.

- Narita, M., Bu, G., Holtzman, D.M. & Schwartz, A.L. (1997) The low-density lipoprotein receptor-related protein, a multifunctional apolipoprotein E receptor, modulates hippocampal neurite development. *J. Neurochem.* 68, 587-595.
- Naruse, S., Thinakaran, G., Luo, J.-J., Kusiak, J.W., Tomita, T., Iwatsubo, T., Qian, X., Ginty, D.D., Price, D.L., Borchelt, D.R., Wong, P.C. & Sisodia, S.S. (1998) Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* 21, 1213-1221.
- Niwa, M., Sidrauski, C., Kaufman, R.J., Walter, P. (1999) A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded protein response. *Cell* 99, 691-702.
- Oltersdorf, T., Fritz, L.D., Schenk, D.B., Lieberburg, I., Johnson-Wood, K.L., Beattie, E.C., Ward, P.J., Blacher, R.W., Dovey, H.F. & Sinha, S. (1989) The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II. *Nature* 341, 144-147.
- Oltersdorf, T., Ward, P.J., Henriksson, T., Beattie, E.C., Neve, R., Lieberburg, I. & Fritz, L.C. (1990) The Alzheimer amyloid precursor protein: identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J. Biol. Chem.* 265, 4492-4497.
- Page, K., Hollister, R., Tanzi, R.E., Hyman, B.T. (1996). In situ hybridization analysis of presenilin 1 mRNA in Alzheimer disease and in lesioned rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 14020-14024.
- Parvathy, S., Karran, E.H., Turner, A.J. & Hooper, N.M. (1998) The secretases that cleave angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein are distinct from tumour necrosis factor- α convertase. *FEBS Lett.* 431, 63-65.
- Perez, R.G., Soriano, S., Hayes, J.D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D.J., Chen, X., Stokin, G.B., Koo, E.H. (1999) Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including A β 42. *J. Biol. Chem.* 274, 18851-18856.
- Perez-Tur, J., Froelich, S., Prihar, G., Crook, R., Baker, M., Duff, K., Wragg, M., Busfield, F., Lendon, C., Clark, R.F., Roques, P., Fuldner, R.A., Johnston, J., Cowburn, R., Forssell, C., Houlden, H., Karran, E., Hardy, J., Lannfelt, L. & Hutton, M. (1995) A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene. *Neuroreport* 7, 297-301.
- Pike, C.J., Walencewicz, A.J., Glabe C.G. & Cotman, C.W. (1991) In vitro aging of β -amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* 563, 311-314.
- Pike, C.J., Burdick, D., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G. & Cotman, C.W. (1993) Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides in vitro: The role of peptide assembly state. *J. Neurochem.* 13, 1676-1687.
- Podlisny, M.B., Citron, M., Amarante, P., Sherrington, R., Xia, W., Zhang, J., Diehl, T., Levesque, G., Fraser, P., Haass, C., Koo, E.H.M., Seubert, P., St. George-Hyslop, P., Teplow, D.B. & Selkoe, D.J. (1997) Presenilins 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, 325-337.
- Pollock, N.J., Mirra, S.S., Binder, L.I., Hansen, L.A. & Wood, J.G. (1986) Filamentous aggregates in Pick's disease, progressive supranuclear palsy, and Alzheimer's disease show antigenic determinants with microtubule-associated protein tau. *Lancet* 2, 1211.

- Ponte, P., Gonzalez-De Whitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I., Fuller, F. & Cordell, B. (1988). A new A 4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 331, 525-527.
- Qian, S., Jiang, P., Guan, X.M., Singh, G., Trumbauer, M.E., Yu, H., Chen, H.Y., Van de Ploeg, L.H., Zheng, H. (1998) Mutant human presenilin 1 protects presenilin 1 null mouse against embryonic lethality and elevates Abeta1-42/43 expression. *Neuron* 20, 611-617.
- Ray, W.J., Yao, M., Nowotny, P., Mumm, J., Zhang, W., Wu, J.Y., Kopan, R., Goate, A.M. (1999a) Evidence for a physical interaction between presenilin and Notch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3263-3268.
- Ray, W.J., Yao, M., Mumm, J., Schroeter, E.H., Saftig, P., Wolfe, M., Selkoe, D.J., Kopan, R., Goate, A.M. (1999b) Cell surface presenilin-1 participates in the gamma-secretase-like proteolysis of Notch. *J. Biol. Chem.* 51, 36801-36807.
- Rebeck, G.W. (1998) ApoE and its role in late onset alzheimer's disease. In *Molecular Biology of Alzheimer's Disease* (ed. Haass, C.) Harwood Academic Publishers, 291-307.
- Reisberg, B. (1996) Alzheimer's disease. In: Sadavoy, J., Lazarus, L.W., Jarvik, L.F. et al. (eds) Comprehensive review of geriatric psychiatry-II. *Am. Assoc. Geriatric Psych. Am. Psych. Press*, 345-369.
- Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holamn, K., Tsuda, T., Mar, L., Sorbi, S., Nacmias, B., Piacentini, S., Amaducci, L., Chumakkov, I., Cohen, D., Lannfelt, L., Fraser, P.E., Rommens, J.M. & St. George-Hyslop, P.H. (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775-778.
- Roher, A.E., Gowing, E., Woods, A.S. Cotter, R.J., Chaney, M., Little, L.P. & Ball, M.J. (1993) Chemical characterization of A β 17-42 peptide: A component of the diffuse amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10836-10840,
- Rosen, D.R., Martin-Morris, L., Luo, L. & White, K. (1989) A Drosophila gene encoding a protein resembling the human β -amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2478-2482.
- Roses, A.D. (1996) Apolipoprotein E in neurology. *Curr. Opin. Neurol.* 9, 265-270.
- Rumble, B., Retallack, R. & Hilbich, C. (1989) Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *N. Eng. J. Med.* 320, 1446-1452.
- Sambamurti, K., Shioi, J., Anderson, J.P., Pappolla, M.A. & Robakis, N.K. (1992) Evidence for intracellular cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 33, 319-329.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M.M., Teplow, D.B., Haass, C. (2001) Presenilin-dependent {gamma}-secretase processing of {beta}-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2(9), 835-841.
- 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.J., 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. *Nat. Med.* 2, 864-870.

- Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A. & Kopan, R. (1998) Notch-1 signaling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393, 382-386.
- Schmechel, D.E., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Crain, B., Hulette, C., Joo, S.H., Pericak-Vance, M.A., Goldgaber, D. & Roses, A.D. (1993) Increased amyloid β -peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset alzheimers disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9649-9653.
- Schwarzman, A.L., Singh, N., Tsiper, M., Gregori, L., Dranovsky, A., Vitek, M.P., Glabe, C.G., St George-Hyslop, P.H. & Goldgaber, D. (1999) Endogeneous presenilin 1 redistributes to the surface of lamellipodia upon adhesion of Jurkat cells to collagen matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7932-7937.
- Seeger, M., Nordstedt, C., Petanceska, S., Kovacs, D.M., Gouras, G.K., Hahne, S., Fraser, P., Levesque, L., Czernik, A.J., St. George-Hyslop, P., Sisodia, S.S., Thinakaran, G., Tanzi, R.E., Greengard, P., and Gandy, S. (1997) Evidence for phosphorylation and oligomeric assembly of presenilin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5090-5094.
- Seiffert, D., Bradley, J.D., Rominger, C.M., Rominger, D.H., Yang, F., Meredith, J.E. Jr, Wang, Q., Roach, A.H., Thompson, L.A., Spitz, S.M., Higaki, J.N., Prakash, S.R., Combs, A.P., Copeland, R.A., Arneric, S.P., Hartig, P.R., Robertson, D.W., Cordell, B., Stern, A.M., Olson, R.E., Zaczek, R. (2000) Presenilin-1 and -2 Are Molecular Targets for gamma-Secretase Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 275, 34086-34091.
- Selkoe, D.J. (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6; 487-498.
- Selkoe, D.J. (1994) Cell biology of the amyloid β -protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10, 373-403.
- Selkoe, D.J. (1996) Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 271, 18295-18298.
- Selkoe, D.J. (1997) Alzheimer's disease: genotypes, phenotype, and treatments. *Science* 275, 630-631.
- Selkoe, D.J. (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell. Biol.* 8, 447-453.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D.L., Sinha, S., Schlossmacher, M.G., Whaley, J., Swidleyhurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D.J., Lieberburg, I. & Schenk, D.B. (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature* 359, 325-327.
- Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M.G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D.L., Bryant, K., Fritz, L.C., Galasko, D., Thal, L.J., Lieberburg, I. & Schenk, D.B. (1993) Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the β -amyloid peptide. *Nature* 361, 260-263.
- Shen, J., Bronson, R.T., Chen, D.F., Xia, W., Selkoe, D.J. & Tonegawa, S. (1997) Skeletal and CNS defects in presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89, 629-639.
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J.-F., Bruni, A.C., Montesi, M.P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R.J., Wasco, W., da Silva, H.A.R., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Tanzi, R.E., Roses, A.D., Fraser, P.E., Rommens, J.M. & St. George-Hyslop, P.H. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.

- Shirotani, K., Takahashi, K., Tabira, T. (1999) Effects of presenilin N-terminal fragments on production of amyloid beta peptide and accumulation of endogenous presenilins. *Neurosci. Lett* 262, 37-40.
- Shoji, M., Golde, T.E., Ghiso, J., Cheung, T.T., Estus, S., Shaffer, L.M., Cai, X.D., McKay, D.M., Tintner, R., Frangione, B. & Younkin, S.G. (1992) Production of the Alzheimer amyloid β protein by normal proteolytic processing. *Science* 258, 126-129.
- Simons, M., De Strooper, B., Multhaup, G., Tienari, P.J., Dotti, C.G. & Beyreuther, K. (1996) Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 16, 899-908.
- Sinha S., Anderson J.P., Barbour R., Basl 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., Suomensaaari S.M., Wang S., Walker D., John V., et al. (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537-540.
- Sisodia, S.S., Koo, E.H., Beyreuther, K., Unterbeck, A. & Price, D.L. (1990) Evidence that β -amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248, 492-495.
- Sisodia, S.S. (1992) β -amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6075-6079.
- Skovronsky, D.M., Doms, R.W. & Lee, M.-Y. (1998) Detection of a novel intraneuronal pool of insoluble amyloid β protein that accumulates with time in culture. *J. Cell Biol.* 141, 1031-1039.
- Smith, R.P., Higuchi, D.A. & Broze (1990) Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* 248, 1126-1128.
- Song, W., Nadeau, P., Yuan, M., Yang, X., Shen, J., Yankner, B.A. (1999) Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6559-6963.
- Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., Lee, G., Bloom, G.S. & Mumby, M.C. (1996) Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of tau by protein phosphatase 2A. *Neuron* 17, 1201-1207.
- Spillantini, M.G., Murrell, J.R., Goedert, M., Farlow, M.R., Klug, A. & Ghetti, B. (1998) Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7737-7741.
- Sprecher, C.A., Grant, F.J., Grimm, G., O'Hara, P.J., Norris, F., Norris, K. & Foster D.C. (1993) Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry* 32, 4481-4486.
- Steiner, H., Capell, A., Pesold, B., Citron, M., Kloetzel, P.M., Selkoe, D.J., Romig, H., Mendla, K. & Haass, C. (1998) Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. *J. Biol. Chem.* 273, 32322-32331.
- Steiner, H., Romig, H., Grim, M.G., Philipp, U., Pesold, B., Citron, M., Baumeitser, R. & Haass, C. (1999a) The biological and pathological function of the presenilin-1 Δ exon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 274, 7615-7618.
- Steiner, H., Romig, H., Pesold, B., Philipp, U., Baader, M., Citron, M., Loetscher, H., Jacobsen, H., Haass, C. (1999b) Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis. *Biochemistry* 38, 14600-14605.

- Steiner, H., Duff, K., Capell, A., Romig, H., Grim, M.G., Lincoln, S., Hardy, J., Yu, X., Picciano, M., Fichteler, K., Citron, M., Kopan, R., Pesold, B., Keck, S., Baader, M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Baumeister, R., Haass, C. (1999c) A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 28669-28673.
- Steiner, H. & Haass, C. (2000) Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 217-224.
- Strittmatter, W.J. & Roses, A.D. (1996) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Ann. Rev. Neurosci.* 19, 53-77.
- Struhl, G. & Adachi. (1998) Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* 93, 649-660.
- Struhl, G. & Greenwald, I. (1999) Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398, 522-525.
- Suzuki, T., Nishiyama K., Murayama S., Yamamoto A., Sato S., Kanazawa I., Sakaki Y. (1996). Regional and cellular presenilin 1 gene expression in human and rat tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 708-713.
- Tagliviani, F., Giaccone, G., Frangione, B. & Bugiani, S. (1998) Pre-amyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and non-demented individuals. *Neurosci. Lett.* 93, 191-196.
- Takahashi, H., Mercken, M., Honda, T., Saito, Y., Murayama, M., Song, S., Takashima, A. (1999) Impaired proteolytic processing of presenilin-1 in chromosome 14-linked familial Alzheimer's disease patient lymphocytes. *Neurosci. Lett.* 260, 121-124.
- Tanzi, R.E., McClatchey, A.I., Lamperti, E.D., Villa, K.L., Gusella, J.F. & Neve, R. (1988) Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331, 528-530.
- Tanzi, R.E. (1996) Neuropathology in the Down's syndrome brain. *Nat. Med.* 2, 31-32.
- Teplow, D.B. (1998) The biosynthesis of amyloid β -protein fibrillogenesis. In *Molecular Biology of Alzheimer's Disease* (ed. Haass, C.) Harwood Academic Publishers, 163-191.
- 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. & Sisodia, S.S. (1996) Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives *in vivo*. *Neuron* 17, 181-190.
- Thinakaran, G., Harris, C.L., Ratovitski, T., Davenport, F., Slunt, H.H., Price, D.L., Borchelt, D.R. & Sisodia, S.S. (1997) Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *J. Biol. Chem.* 272, 28415-28422.
- Thinakaran, G., Regard, J.B., Bouton, C.M.L., Harris, C.L. Sabo, S., Price, D.L., Borchelt, D.R. & Sisodia, S.S. (1998) Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP. *Neurobiol. Dis.* 4, 438-453.
- Tienari, P., 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. & Dotti, C.G. (1996) The β -amyloid domain is essential for axonal sorting of amyloid precursor protein. *EMBO J.* 15, 5218-5229.
- Tischer, E., Cordell, B. (1999) Beta-amyloid precursor protein. Location of transmembrane domain and specificity of gamma-secretase cleavage. *J. Biol. Chem.* 271, 21914-21919.

- Van Broeckhoven, C., Backhovens, H., Cruts, M., De Winter, G., Bruyland, M., Cras, P. & Martin, J.-J. (1992) Mapping of a gene predisposing to early onset Alzheimer's disease on chromosome 14q24.3. *Nature Genet.* 2, 335-339.
- Van Gool, W.A., Evenhuis, H.M. & van Duijn, C.M. (1995) A case-control study of apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's disease associated with Doen's syndrome. *Ann. Neurol.* 38, 225-230.
- Van Nostrand, W.E., Wagner S.L., Suzuki M., Choi B.H., Farrow J.S., Geddes J.W., Cotman C.W. & Cunningham, D.D. (1989) Protease nexin-II, a potent antichymotrypsin, shows identity to amyloid beta-protein precursor. *Nature* 341, 546-549.
- Van Nostrand, W.E., Schmaier, A.H., Farrow, J.S. & Cunningham, D.D. (1990) Protease nexin-II (amyloid β -protein precursor): A platelet α -granule protein. *Science* 248, 745-748.
- 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., Citron, M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.
- Vogel, G. (1998) Tau protein mutations confirmed as neuron killers. *Science* 280, 1524-1525.
- Von Koch, C.S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L.H.T., Price, D.L. & Sisodia, S.S. (1997) Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging* 18, 661-669.
- Walsh D.M., Lomakin A., Benedek G.B., Condron M.M., Teplow D.B. (1997) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem.* 272, 22364-22372.
- Walsh D.M., Hartley D.M., Kusumoto Y., Fezoui Y., Condron M.M., Lomakin A., Benedek G.B., Selkoe D.J., Teplow D.B. (1999) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J. Biol. Chem.* 274, 25945-25952.
- Walter, J., Capell, A., Grünberg, J., Pesold, B., Schindzielorz, A., Prior, R., Podlisny, M.B., Fraser, P., St. George-Hyslop, P., Selkoe, D.J. & Haass, C. (1996) The Alzheimer's disease-associated presenilins are differentially phosphorylated proteins located predominantly within the endoplasmic reticulum. *Mol. Med.* 2, 673-691.
- Walter J., Capell A., Hung A.Y., Langen H., Schnolzer M., Thinakaran G., Sisodia S.S., Selkoe D.J., Haass C. (1997a) Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J. Biol. Chem.* 272, 1896-1903.
- Walter, J., Grünberg, J., Capell, A., Pesold, B., Schindzielorz, A., Citron, M., Mendla, K., St. George-Hyslop, P., Multhaup, G., Selkoe, D.J. & Haass, C. (1997b) Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an *in vivo* substrate for protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5349-5354.
- Walter J., Schindzielorz A., Hartung B., Haass C. (2000) Phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein at the cell surface by ectocasein kinases 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 275, 23523-23529.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J.F., Tanzi, R.E. & Solomon, F. (1992) Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer's disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10758-10762.

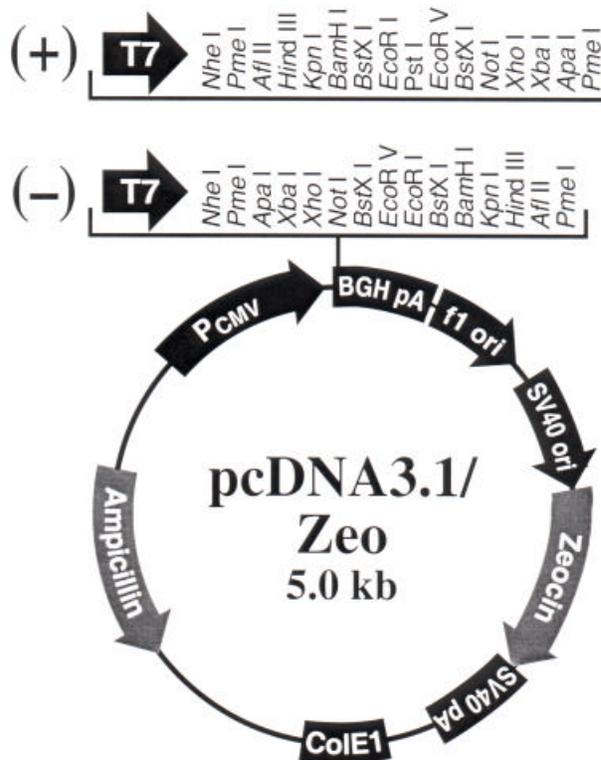
- Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J.M., Masters, C.L. & Beyreuther, K. (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57, 115-126.
- Westlund, B., Parry, D., Clover, R., Basson, M., Johnson, C.D. (1999) Reverse genetic analysis of *Caenorhabditis elegans* presenilins reveals redundant but unequal roles for sel-12 and hop-1 in Notch-pathway signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2497-2502.
- Wild-Bode, C., Yamazaki, T., Capell, A., Leimer, U., Steiner, H., Ihara, Y. & Haass, C. (1997) Intracellular generation and accumulation of amyloid β -peptide terminating at amino acid 42. *J. Biol. Chem.* 272, 16085-16088.
- Wiltfang, J., Smirnov, A., Schnierstein, B., Kelemen, G., Matthies, U., Klafki, H.W., Staufenbiel, M., Huther, G., Ruther, E., Kornhuber, J. (1997) Improved electrophoretic separation and immunoblotting of beta-amyloid (A β) peptides 1-40, 1-42, and 1-43. *Electrophoresis* 18, 527-532.
- Wisniewski, K., Jarvis, G.A., Moretz, R.C. & Wisniewski, H.M. (1979) Alzheimer neurofibrillary tangles in diseases other than senile and presenile dementia. *Ann. Neurol.* 5, 288-294.
- Wisniewski, H.M. & Rabe, A. (1986) Discrepancy between Alzheimer type neuropathology and dementia in person with Down's syndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 477, 247-260.
- Wisniewski, H.M., Wegiel, J. & Kotula, L. (1996) Some neuropathological aspects of Alzheimer's disease and its relevance to other disciplines. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 22, 3-11.
- Wisniewski, T., Dowjat, W.K., Permanne, B., Palha, J., Kumar, A., Gallo, G., Frangione, B. (1997) Presenilin-1 is associated with Alzheimer's disease amyloid. *Am. J. Pathol.* 151, 601-610.
- Wittenburg, N., Eimer, S., Lakowski, B., Rohrig, S., Rudolph, C., Baumeister, R. (2000) Presenilin is required for proper morphology and function of neurons in *C. elegans*. *Nature* 406, 306-309.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberely, W.T. & Selkoe, D.J. (1999a) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature* 398, 518-522.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Moore, C.L., Leatherwood, D.D., Ostaszewski, B., Rahmati, T., Donkor, I.O., Selkoe, D.J. (1999b) Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry* 38, 4720-4727.
- Wolfe, M.S., De Los Angeles, J., Miller, D.D., Xia, W., Selkoe, D.J. (1999c) Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 38, 11223-11230.
- Wong, P.C., Zheng, H., Chen H., Becher, M.W., Sirinathsinghji, D.J.S., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., Price, D.L., Van der Ploeg, L.H.T. & Sisodia, S.S. (1997) Presenilin 1 is required for Notch1 and D/1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 387, 288-292.
- Xia, W., Ray, W.J., Ostaszewski, B.L., Rahmati, T., Kimberely, W.T., Wolfe, M.S., Zhang, J., Goate, A.M., Selkoe, D.J. (2000) Presenilin complexes with the C-terminal fragments of amyloid precursor protein at the sites of amyloid beta-protein generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9299-9304.
- Yamaguchi, H. (1998) Amyloid morphology and pathology of Alzheimer's disease. In *Molecular Biology of Alzheimer's Disease* (ed. Haass, C.) Harwood Academic Publishers, 3-14.

- Yamazaki, T., Yamaguchi, H., Nakazato, Y., Ishiguro, K., Kawarabayashi, T., Hirai, S. (1992) Ultrastructural characterization of cerebellar diffuse plaques in Alzheimer's disease. *J. Neuropath. & Exp. Neurol.* 51, 281-286.
- Yamazaki, T., Selkoe, D.J. & Koo, E.H. (1995) Trafficking of cell surface β -amyloid precursor protein: Retrograde and transcytotic transport in cultured neurons. *J. Cell Biol.* 129, 431-442.
- 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., Gurney M.E. (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533-537.
- Yankner, B.A. (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's Disease. *Neuron* 16, 921-932.
- Ye, Y., Lukinova, N. & Fortini, M.E. (1999) Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila* presenilin mutants. *Nature* 398, 525-529.
- Younkin, S.G. (1998) The role of amyloid β -peptide terminating at amino acid 42 in early onset alzheimer's disease. In *Molecular Biology of Alzheimer's Disease* (ed. Haass, C.) Harwood Academic Publishers, 153-162.
- Yu, G., Chen, F., Levesque, G., Nishimura, M., Zhang, D.-M., Levesque, L., Rogaeva, E., Xu, D., Liang, Y., Duthie, M., St. George-Hyslop, P. & Fraser, P.E (1998) The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains β -catenin. *J. Biol. Chem.* 273, 16470-16476.
- Yu, G., Chen, F., Nishimura, M., Steiner, H., Tandon, A., Kawarai, T., Arawaka, S., Supala, A., Song, Y.Q., Rogaeva, E., Holmes, E., Zhang, D.M., Milman, P., Fraser, P.E., Haass, C., George-Hyslop, P.S. (2000a) Mutation of conserved aspartates affects maturation of both aspartate mutant and endogenous presenilin 1 and presenilin 2 complexes. *J. Biol. Chem.* 275, 27348-27353.
- 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., St George-Hyslop, P, (2000b) Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407, 48-54.
- Zhang, N. & Gridley, T. (1998) Defects in somite formation in lunatic fringe deficient mice. *Nature* 394, 374-377.
- Zheng, J., Jiang, M.H., Trumbauer, M.E., Sirinathsingji, D.J., Hopkins, R., Smith, D.W., Heavens, R.P., Dawson, G.R., Boyce, S., Conner, M.W. et al. (1995) Beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525-531.
- Zheng, H., Kang D.E., Xia W., Okochi M., Mori H., Selkoe D.J., Koo E.H. (1998) Subcellular distribution and turnover of presenilins in transfected cells. *J. Biol. Chem.* 273, 12436-12442.
- Zhou, J., Liyanage, U., Medina, M., Ho, C., Simmons, A.D., Lovett, M. & Kosik, K.S. (1997) Presenilin 1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family. *Neuroreport* 8, 1489-1494.

7. Anhang

1. Vektoren:

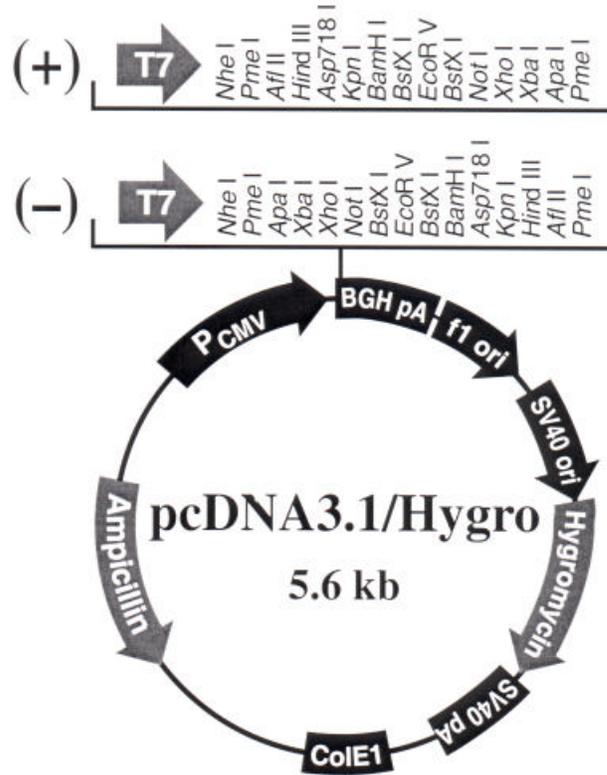
1.1. pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen):



Comments for pcDNA3.1/Zeo (+) 5015 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863
T7 promoter priming site: bases 863-882
Multiple cloning site: bases 895-1010
pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039
BGH polyadenylation signal: bases 1021-1235
f1 origin: bases 1298-1711
SV40 promoter and origin: bases 1776-2101
Zeocin™ resistance gene: bases 2184-2558
SV40 polyadenylation: bases 2688-2817
ColE1 origin: bases 3201-3874
Ampicillin resistance gene: bases 4019-4879

1.2. pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen):



Comments for pcDNA3.1/Hygro (+):
5601 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863
T7 promoter priming site: bases 863-882
Multiple cloning site: bases 895-1010
pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039
BGH polyadenylation signal: bases 1021-1235
f1 origin: bases 1298-1711
SV40 promoter and origin: bases 1776-2101
Hygromycin resistance gene: bases 2119-3142
SV40 polyadenylation signal: bases 3155-3527
ColE1 origin: bases 3787-4460
Ampicillin resistance gene: bases 4605-5465

2. Tabellen:

Codon-Nr.:	Lokalisation:	Mutation:	Durchschnittl. Erkrankungsalter:
79	N-Terminus	A→?	64
82	TM1	V→L	55
96	TM1	V→F	
115	TM1/TM2-Schleife	Y→H	37
120	TM1/TM2-Schleife	E→D	48
139	TM2	M→T	49
139	TM2	M→V	40
143	TM2	I→T	35
146	TM2	M→L	45
146	TM2	M→V	38
146	TM2	M→I	40
163	TM3	H→R	50
163	TM3	H→Y	47
171	TM3	L→P	40
209	TM4	G→V	
213	TM4	I→T	
231	TM5	A→T	52
233	TM5	M→T	35
235	TM5	L→P	32
246	TM6	A→E	55
260	TM6	A→V	40
263	TM6/TM7-Schleife	C→R	47
264	TM6/TM7-Schleife	P→L	45
267	TM6/TM7-Schleife	P→S	35
280	TM6/TM7-Schleife	E→A	47
280	TM6/TM7-Schleife	E→G	42
285	TM6/TM7-Schleife	A→V	50
286	TM6/TM7-Schleife	L→V	50
del291-319	TM6/TM7-Schleife	verkürzte TM6/TM7-Schleife	
384	TM7	G→A	35
392	TM7	L→V	25-40
410	TM8	C→Y	48

Tab. 3: Auswahl von FAD-assoziierten PS1-Mutationen mit Angabe von Codon-Nr., Lokalisierung, Aminosäure-Austausch und durchschnittlichem Erkrankungsalter (Quelle: Younkin et al., Presenilins and Alzheimer's Disease, Springer-Verlag, 1998).

8. Lebenslauf

Personalien

Name und Vorname:	Kulic Luka
Geburtsdatum:	21.03.1977
Geburtsort:	Belgrad
Familienstand:	Ledig
Vater:	Prof. Dr. Kulic Miodrag, Physiker
Mutter:	Dr. Kulic Stojadinka, Ärztin

Schulischer Werdegang

1983-1986:	Grundschule, Belgrad
1986-1989:	Alt-Schmargendorf-Grundschule, W-Berlin
1989-1991:	Von-Müller-Gymnasium, Regensburg
1991-1993:	Albrecht-Dürer-Gymnasium, Berlin
1993-1996:	Fanny-Leicht-Gymnasium, Stuttgart
Juni 1996:	Abitur

Universitärer Werdegang

WS 1996/1997-SS 1998:	Studium der Medizin an der Universität Tübingen
August 1998:	Ärztliche Vorprüfung
WS 1998/1999-WS 1999/2000:	Studium der Medizin an der Universität Heidelberg
Seit März 1999:	Doktorarbeit in den Labors von Prof. Dr. Ch. Haass am Zentralinstitut für Seelische Gesundheit in Mannheim (Universität Heidelberg) und am Adolf- Butenandt-Institut in München (LMU München)
März 2000:	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
SS 2000-WS 2002/2003:	Studium der Medizin an der Universität München

Lebenslauf

August 2000-Oktober 2000:	Famulatur in der Gedächtnisambulanz der psychiatrischen Universitätsklinik der LMU München
Februar 2001-April 2001:	Famulatur in der Neurologie am Massachusetts General Hospital in Boston
März 2002:	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2002-November 2002:	Praktisches Jahr in Innerer Medizin und Chirurgie am Zentralklinikum Augsburg
November 2002-März 2003:	Praktisches Jahr in der Neurologie am Klinikum Grosshadern und am Massachusetts General Hospital in Boston
Mai 2003:	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

9. Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Christian Haass, der es mir ermöglichte, diese Arbeit in seinen Labors in Mannheim und München anzufertigen. Ich danke ihm für seine Großzügigkeit, seine vorbildliche Betreuung und dafür, daß er trotz eines vollen Terminkalenders jederzeit dazu bereit gewesen ist, auf mich und meine Fragen einzugehen. Vor allem aber bin ich ihm für seinen unerschütterlichen Enthusiasmus dankbar, der für mich eine unschätzbare Motivationsquelle gewesen ist.

Für eine hervorragende Kooperation bedanke ich mich bei Prof. David B. Teplow und Mitarbeitern von der Harvard University, Prof. Ralf Baumeister und Mitarbeitern vom Genzentrum, Dr. Gerd Multhaup und Mitarbeitern vom ZMBH und Dr. Helmut Romig von Boehringer Ingelheim.

Besonderer Dank gebührt Dr. Jochen Walter, der mich in die Methodik der Zellbiologie einführte und stets als Diskussions- und Ansprechpartner in allen Fragen bereit stand. Seine ruhige und verständnisvolle Art und seine Kollegialität haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke den Kollegen Anja Capell und Dr. Harald Steiner, deren Erfahrung auf dem Gebiet der Presenilin-Forschung für meine praktische Arbeit und das Verständnis der komplexen Zusammenhänge der Presenilin-Biologie ungemein wertvoll gewesen ist.

Ein Dankeschön geht ferner auch an Dr. Uwe Leimer, Dr. Makayasu Okochi und Dr. Philipp Kahle für unzählige interessante Diskussionen, ihre Kollegialität und ihren Humor.

Danke an Alice, Brigitte, Simone, Marion, Veronika, Hartmut und all diejenigen, die ich hier vergessen habe! Ohne Euch wäre der Laboralltag nie so angenehm menschlich und lebendig geworden, wie er es während meiner Doktorandenzeit gewesen ist!

Schließlich möchte ich meiner schrecklich netten Familie, dem moralischen Unterstützer dieser Arbeit, danken, die, seit ich denken kann, immer für mich da gewesen ist und alles mitgetragen hat, wovon ich geglaubt habe, es würde mich glücklich machen.

Danksagung

Teile dieser Arbeit sind bereits in der Publikation Kulic et al. (2000) in dem Journal *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* veröffentlicht, die am Ende dieser Arbeit beigefügt wurde.

Separation of presenilin function in amyloid β -peptide generation and endoproteolysis of Notch

Luka Kulic*, Jochen Walter*, Gerd Multhaup[†], David B. Teplow[‡], Ralf Baumeister[§], Helmut Romig[¶], Anja Capell*, Harald Steiner*, and Christian Haass*^{||}

*Adolf-Butenandt-Institute, Department of Biochemistry, Laboratory for Alzheimer's Disease Research, Ludwig Maximilians University, 80336 Munich, Germany; [†]Center for Molecular Biology–Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg, University of Heidelberg, 69120 Heidelberg, Germany; [‡]Harvard Medical School, Center for Neurologic Diseases, Boston, MA 02115; [§]Gene Center, Ludwig Maximilians University, 81377 Munich, Germany; and [¶]Boehringer Ingelheim K.G., CNS Research, 55216 Ingelheim, Germany

Edited by Kai Simons, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany, and approved March 15, 2000 (received for review February 3, 2000)

Most of the genetically inherited Alzheimer's disease cases are caused by mutations in the presenilin genes, PS1 and PS2. PS mutations result in the enhanced production of the highly amyloidogenic 42/43 amino acid variant of amyloid β -peptide ($A\beta$). We have introduced arbitrary mutations at position 286 of PS1, where a naturally occurring PS1 mutation has been described (L286V). Introduction of charged amino acids (L286E or L286R) resulted in an increase of $A\beta$ 42/43 production, which reached almost twice the level of the naturally occurring PS1 mutation. Although pathological $A\beta$ production was increased, endoproteolysis of Notch and nuclear transport of its cytoplasmic domain was significantly inhibited. These results demonstrate that the biological function of PS proteins in the endoproteolysis of β -amyloid precursor protein and Notch can be separated.

Alzheimer's disease | γ -secretase

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of senile dementia. Pathologically, AD is closely associated with the invariant accumulation of senile plaques (1), which are predominantly composed of amyloid β -peptide ($A\beta$). $A\beta$ is generated from the β -amyloid precursor protein (β APP) through the consecutive activity of two proteases called β - and γ -secretase (2). Two predominant species of $A\beta$ are generated, terminating at either amino acid 40 ($A\beta$ 40) or amino acids 42/43 ($A\beta$ 42/43) (1). The less common $A\beta$ 42/43 species is specifically involved in AD pathogenesis, because it preferentially accumulates in senile plaques and its production is significantly enhanced by familial AD (FAD)-associated mutations in the β APP gene as well as to the two homologous presenilin genes, PS1 and PS2 (1).

PS proteins not only are involved in FAD but also play a pivotal role in the physiological metabolism of β APP, since ablation of PS1 results in a significant reduction of $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42/43 generation (3). Mutagenesis of two critical aspartates (see Fig. 1A) within transmembrane domains (TM) 6 and/or 7 of PS1 (4, 5), or in TM7 of PS2 (6), also inhibits formation of $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42/43 (2). Furthermore, reduced $A\beta$ generation appeared to correlate with the concomitant failure of the mutant PS1 variant to undergo endoproteolysis (4). Together with the finding that γ -secretase activity can be reduced by aspartyl protease inhibitors (7), this observation led Wolfe *et al.* (8) to the intriguing hypothesis that PS proteins may be unusual aspartyl proteases having a catalytically active center located within two adjacent TM domains. According to this hypothesis, PS proteins are activated by autoprolysis. The resulting N- and C-terminal fragments (9) bind to each other, forming a biologically active PS complex (10–13), which subsequently catalyzes the intramembranous cleavage of β APP (4, 8). However, recent evidence demonstrates that endoproteolysis of PS1 and PS2 may not be an absolute prerequisite for the function of presenilins in β APP endoproteolysis (14, 15).

An endoproteolytic function of presenilins may further be supported by the finding that a PS1 knock-out (16, 17), as well as the aspartate mutations of PS1 or PS2 (6, 18), block the endoproteolytic cleavage of Notch. This cleavage appears to be very similar to the intramembranous cleavage of β APP by γ -secretase because it occurs close to or within the membrane (17, 19). Endoproteolysis of Notch can also be blocked by aspartyl protease inhibitors similar to the γ -secretase cleavage of β APP (16). Moreover, mutations in the *Drosophila* PS homolog also lead to a Notch-like phenotype and alter its endoproteolysis (20, 21). Endoproteolytic cleavage of Notch is required to liberate the Notch intracellular cytoplasmic domain (NICD), which translocates to the nucleus where it acts as a regulator of selected transcription factors (19). Nuclear translocation of NICD appears to be required for Notch signaling (19, 22), although recent findings suggest that alternative pathways, which are independent of endoproteolysis of Notch, may exist as well (23). A functional role of presenilins in Notch signaling is also strongly supported by the findings that a PS1 knock-out results in a phenotype that resembles a Notch knock-out to some extent (24, 25). Moreover, a double knock-out of both PS1 and PS2 results in a phenotype that is almost identical to the phenotype caused by the knock-out of Notch (26, 27). In *Caenorhabditis elegans*, artificial mutations of its PS homologue, sel-12 (28), also cause a Notch phenotype, and this phenotype can be functionally rescued by human PS1 or PS2 (29, 30). Moreover, a functional deficit of both sel-12 and its homologue hop-1 further enhance the Notch phenotype of mutant sel-12 alleles in the worm (31). Although all FAD-associated PS mutations analyzed so far failed to fully rescue the sel-12 mutant phenotype in *C. elegans*, FAD mutations of PS1 appear to rescue the PS1^{-/-} phenotype in mice (32, 33). Based on the latter results, it appears that PS mutations cause a gain of malfunction and are not due to a loss of function (32, 33).

We now wanted to investigate whether point mutations in PS1 equally affect endoproteolysis of β APP and Notch. To do so, we mutagenized a previously identified FAD mutation of PS1 and monitored the functional consequences on $A\beta$ production and NICD formation. We identified point mutations that inhibited

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: $A\beta$, amyloid β -peptide; AD, Alzheimer's disease; β APP, β -amyloid precursor protein; PS, presenilin; CTF, C-terminal fragment; NICD, Notch intracellular domain; TM, transmembrane domain; wt, wild type; FAD, familial AD.

^{||}To whom reprint requests should be addressed. E-mail: chaass@pbm.med.uni-muenchen.de.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Article published online before print: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10.1073/pnas.100049897. Article and publication date are at www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.100049897

NICD formation but caused increased production of the pathologically relevant A β 42/43. This indicates that PS mutations could simultaneously cause a loss of function in Notch signaling but a gain of pathological dysfunction in A β production.

Materials and Methods

cDNA Constructs. The cDNAs encoding PS1 L286I, PS1 L286F, PS1 L286R, PS1 L286E, PS1 L286W, PS1 L286Q, PS1 L286P, and PS1 L286S were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis using PCR. The respective PCR products were cloned into *EcoRI/BamHI* restriction sites of the expression vector pcDNA3.1 containing a zeocin resistance gene (Invitrogen) and sequenced to verify successful mutagenesis. The expression plasmid containing the Notch Δ E cDNA was described before (6).

Cell Culture and Cell Lines. HEK 293 cells stably expressing wild-type (wt) β APP or Swedish mutant β APP (34) were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 200 μ g·ml⁻¹ G418. These cells were transfected with the respective cDNAs encoding wt or mutant PS1 using *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methylsulfate (DOTAP; Roche Molecular Biochemicals) according to the manufacturer's instructions and selected in 200 μ g·ml⁻¹ zeocin. To analyze proteolytic processing of Notch, cell clones stably expressing the indicated PS1 derivatives were transfected with the cDNA encoding Notch Δ E and selected in the above described medium containing 50 μ g·ml⁻¹ hygromycin.

Amino Acid Sequencing. Radiosequencing was performed as described (35).

Mass Spectrometry. Immunoprecipitated A β was extracted twice with 500 μ l of 50% acetic acid from the Sepharose beads and dried under vacuum using a Speed-Vac centrifuge. The protein was redissolved in 20 μ l of 50% formic acid and diluted 1:10 in 10% formic acid. Approximately 0.5 μ l of the antibody/A β -peptide solution was mixed with 0.5 μ l of a saturated solution of sinapinic acid in a 1:1 acetonitrile/water solvent containing 0.5% trifluoroacetic acid on a target sample plate. Alternatively, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid was used as the matrix. As external mass calibrants insulin, CLIP (corticotropin-like intermediate lobe peptide, ACTH-18–39) and CIP (corticotropin-inhibiting peptide, the 7–38 fragment of human ACTH-1–39) were used. After drying in air for several minutes, the target was placed in a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (Voyager-DE STR, Perkin-Elmer) and then analyzed.

Antibodies. The polyclonal and monoclonal antibodies against PS1 [3027 (36), BI.3D7 (37)] and PS2 [BI.HF5c (37)], as well as the anti-A β antibody 3926 (38), were described previously. The monoclonal anti-myc antibody 9E10 developed by J. Michael Bishop (University of California, San Francisco) was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank maintained by the University of Iowa, Department of Biological Science (Iowa City, IA).

Metabolic Labeling and Immunoprecipitations. To analyze proteolytic processing of β APP, HEK 293 cells were starved for 1 h in methionine- and serum-free MEM and subsequently metabolically labeled for 2 h with 700 μ Ci (1 μ Ci = 37 kBq) of [³⁵S]methionine (Promix; Amersham Pharmacia) in methionine- and serum-free MEM. Cells were chased in the presence of excess amounts of unlabeled methionine for 2 h. To monitor NICD formation, cells were pulse labeled for 15 min and chased for 60 min.

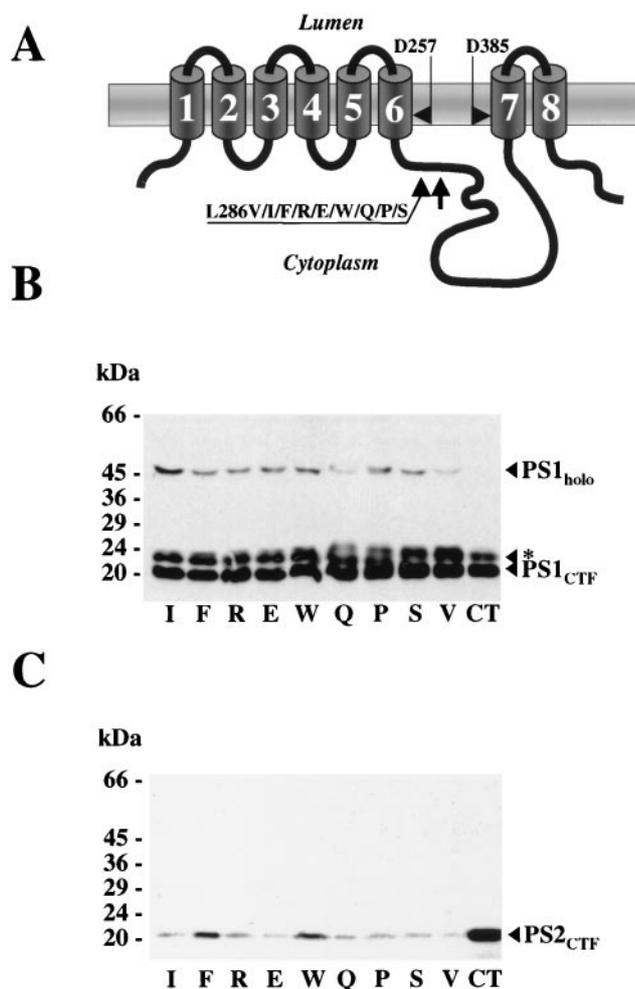


Fig. 1. (A) Schematic representation of PS1. The critical aspartates in TM 6 and 7 as well as the endoproteolytic cleavage site(s) (arrow) and the mutations introduced at codon 286 are indicated. (B) Expression and endoproteolytic processing of the mutant PS1 derivatives (CT, untransfected control expressing endogenous PS). Cell lysates were immunoprecipitated with antibody 3027, and precipitated PS1 derivatives (CTFs and holoprotein) were visualized by immunoblotting using antibody BI.3D7. *, Phosphorylated PS1 CTF (13, 36). Note that endoproteolysis of PS1 occurs in all cell lines investigated. (C) Overexpressed mutant PS1 derivatives displace endogenous PS2 CTFs. Cell lysates were immunoblotted with the monoclonal antibody BI.HF5c.

Combined Immunoprecipitation/Western Blotting. Extracts from HEK 293 cells were prepared and subjected to immunoprecipitation using the polyclonal antibody 3027 to PS1 (36). After gel electrophoresis, immunoprecipitated PS1 proteins were identified by immunoblotting using the monoclonal antibody BI.3D7 (37). PS2 C-terminal fragments (CTFs) were identified by immunoblotting using antibody BI.HF5c (6). Notch Δ E was immunoprecipitated as described (6). NICD generation was monitored by phosphorimaging.

Immunocytochemistry. Immunocytochemistry was carried out as described (39).

Transgenic Lines of *C. elegans* and Rescue Assays. These experiments were carried out as described (6, 30, 37).

Results

Point mutations were inserted at codon 286 of PS1 (Fig. 1A). This codon was chosen because a FAD-associated mutation has

been mapped previously to this position (40). Moreover, codon 286 is located within a critical domain of presenilins, to which many other FAD-associated mutations have been mapped (41). This domain is highly conserved in all PS species identified so far (5). Finally, the site(s) of endoproteolysis of PS1 and PS2 have also been located close to this mutation (9, 14, 15, 42).

Mutagenesis at Amino Acid 286 of PS1 Does Not Interfere with Endoproteolysis. The FAD-associated leucine to valine exchange appears to be an apparent conservative mutation. Additional mutants were made to substitute leucine with conservative and more nonconservative mutations, i.e., amino acids with nonpolar side chains (I), polar side chains (S, Q), large bulky aromatic side groups (F, W), acidic (E) and basic side chains (R), and the imino acid proline to create a fixed kink in the polypeptide chain (Fig. 1A). These mutations, as well as wt PS1 and the FAD-associated PS1 L286V mutation, were stably transfected into human kidney 293 (HEK 293) cells expressing Swedish mutant β APP (34). HEK 293 cells coexpressing PS derivatives, together with Swedish mutant β APP, are suitable for the analysis of PS function as demonstrated previously (6, 11, 12, 14, 37, 42–46). Pooled cell clones were first analyzed for PS1 expression and endoproteolysis. Cell lysates were immunoprecipitated with antibody 3027 (36). Immunoprecipitated PS1 derivatives were then visualized by immunoblotting using the monoclonal antibody PS1 BI.3D7 (37). Consistent with previous results (9), no PS1 holoprotein could be identified in cells expressing endogenous PS1 (Fig. 1B). However, in all cell lines overexpressing exogenous PS1, the holoprotein accumulated (Fig. 1B). In these cell lines, formation of the PS1 CTF was observed, which demonstrates that endoproteolysis was not inhibited by any of the mutations introduced (Fig. 1B). As observed previously (9), no increased expression of the PS1 CTFs was obtained on overexpression, which is due to the fact that PS expression is tightly controlled and that overexpressed PS fragments displace endogenous fragments (47). To demonstrate that the overexpressed PS1 derivatives shown in Fig. 1B replace their endogenous counterparts, we analyzed the same extracts for the expression of the PS2 CTF. PS2 CTFs were identified by immunoblotting using the monoclonal antibody BI.HF5c (37). As reported previously, HEK 293 cells endogenously express PS2 CTFs (6) (Fig. 1C). Expression of the PS2 CTFs was reduced in all cell lines overexpressing PS1 derivatives (Fig. 1C). Displacement of endogenous presenilins is a prerequisite for stable expression of exogenous PS because PS derivatives not displacing endogenously expressed fragments are unstable and are rapidly degraded (11, 43, 47). The results in Fig. 1B and C therefore demonstrate that the overexpressed mutant PS1 derivatives undergo endoproteolysis and displace endogenous PS.

Effects of Mutations at Codon 286 on A β 42/43 Production. To analyze a potential pathological function of the introduced PS mutations, we investigated the production of A β 40 and A β 42/43. Cells were metabolically labeled with [35 S]methionine for 2 h and subsequently chased for an additional 2 h in the presence of excess amounts of unlabeled methionine. Conditioned media were immunoprecipitated with antibody 3926 (38) to isolate all species of A β . Immunoprecipitated A β species were separated on a previously described gel system, which allows the specific identification and quantification of A β 40 and A β 42/43 (37, 48). As expected (45, 49, 50), cells overexpressing the L286V mutation increased the relative secretion of A β 42/43 as compared with cells overexpressing wt PS1 or the endogenous PS genes (Fig. 2A). The introduced mutations showed individual and characteristic effects on A β production. PS1 L286F and PS1 L286I did not enhance A β 42/43 production to pathological levels (Fig. 2A and B). All other mutations significantly increased A β 42/43 production to levels similar (L286S, L286P,

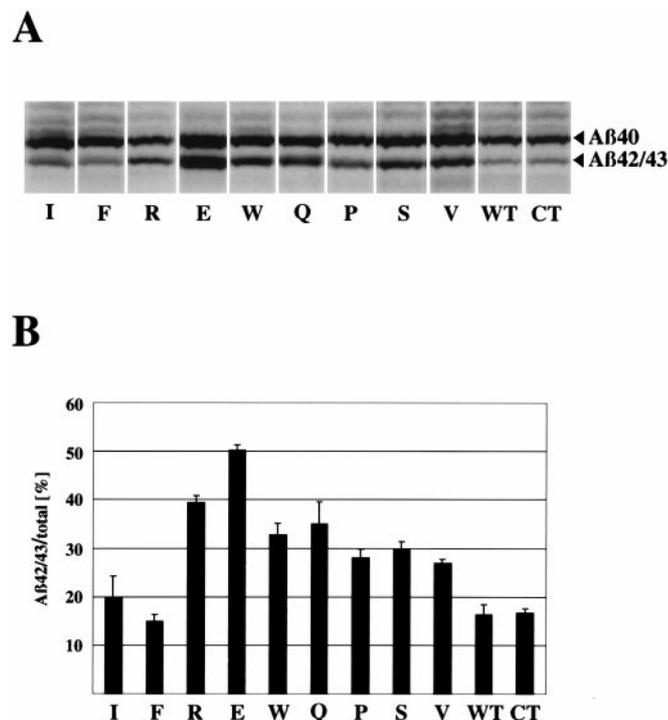


Fig. 2. Effects of the mutant PS1 derivatives on A β production. (A) A β species were immunoprecipitated from conditioned media of metabolically labeled cells with antibody 3926. Isolated A β species were separated on a previously described gel system, which allows the specific identification of A β 40 and A β 42/43 (37, 48). The identity of the observed A β species produced from cells expressing the charged amino acids, as well as wt PS1, was confirmed by amino acid sequencing (data not shown). Mass spectrometry revealed A β 40 and A β 42 but no A β 43 in cells expressing wt PS1. In cells expressing the PS1 mutants L286E and L286R, a significantly increased production of A β 43 was observed (data not shown) (WT, control transfected with wt PS1; CT, untransfected control). (B) Quantification of the (A β 42/43)/(A β total) ratio by phosphorimaging. Bars represent the mean \pm SE of three independent experiments.

L286Q, L286W) or even above (L286E, L286R) the A β 42 concentrations observed in cells expressing the originally described FAD-associated L286V mutation (Fig. 2A and B). Interestingly, on expression of the L286E mutation, the A β 42/43 level reached about 50% of total A β produced (Fig. 2A and B), whereas the A β (42/43):A β total ratio in cells expressing the natural-occurring L286V mutation was below 30% (Fig. 2A and B). High levels of A β 42/43 production were also obtained by the expression of L286R (Fig. 2B). As reported for several FAD-associated PS mutations (44, 45), effects were independent of the expression levels of PS1 (compare the amount of the PS1 holoprotein identified in Fig. 1B to the effects on A β 42/43 production).

PS1 L286E and PS1 L286R Selectively Inhibit Endoproteolysis of Notch.

To investigate whether the artificial PS1 mutants affect endoproteolysis of Notch, we transfected the above described cell lines with the Notch Δ E cDNA (19). Similar cell lines overexpressing multiple transgenes, including β APP, PS1/PS2, and Notch Δ E, have been used previously to analyze Notch endoproteolysis (6, 46). The N-terminal truncated version of Notch has been used previously to monitor NICD generation in transfected cells lines (6, 18, 19). NICD formation was then followed in pulse–chase experiments. Cells were metabolically labeled with [35 S]methionine for 15 min and chased for 60 min in the presence of excess amounts of unlabeled methionine. We specifically

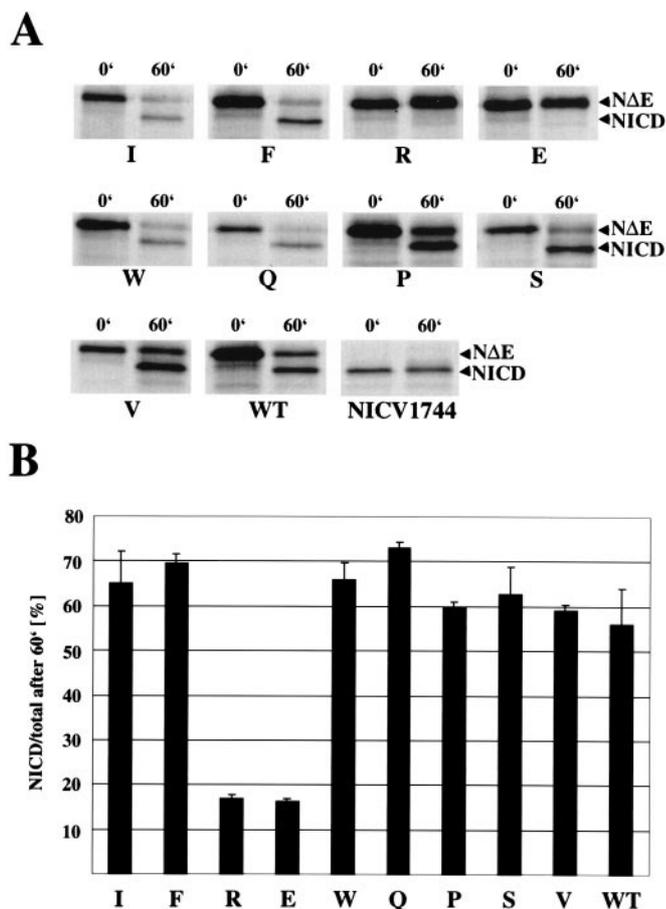


Fig. 3. Effects of the mutant PS1 derivatives on endoproteolysis of Notch. (A) Mutant cell lines were transfected with the Notch Δ E cDNA (19). NICD formation was analyzed in pulse–chase experiments as described (6). Note that PS1 L286E and PS1 L286R inhibit NICD formation. All other PS1 derivatives, including the naturally occurring PS1 L286V mutation, allow normal NICD formation. NICV1744 represents recombinant NICD, which was used as a marker to monitor NICD production (6, 19). (B) Quantification of the experiments shown in A by phosphorimaging. Bars represent the mean \pm SE of three independent experiments.

chose a 60-min chase time because we have demonstrated previously that maximum NICD formation occurred at this time point (6). Cell lysates were prepared, and Notch derivatives were immunoprecipitated with an antibody to the myc epitope fused to C terminus of Notch Δ E (6, 19). As reported before (6), robust levels of NICD were generated after 60 min in cells expressing wt PS1 (Fig. 3A). Similar results were obtained with cells expressing PS1 mutations (including the naturally occurring L286V), which contain uncharged amino acids at codon 286 (Fig. 3A). In contrast, PS1 L286R and PS1 L286E significantly inhibited NICD formation (Fig. 3A). Quantitation of independent experiments fully confirmed the inhibitory effects of the PS1 L286R and L286E mutations on Notch endoproteolysis (Fig. 3B). Moreover, transgenic expression of PS1 L286R in sel-12 mutant *C. elegans* completely failed to rescue the egg-laying phenotype (data not shown). This demonstrates the functional inactivity in the facilitation of Notch signaling of a PS1 variant with a charged amino acid artificially inserted at codon 286.

Accumulation of Notch on the Cell Surface. To further confirm these results, we followed the cellular transport of Notch in immunocytochemical experiments. Cells expressing wt PS1, the naturally occurring PS1 L286V mutation or the artificial PS1 L286E,

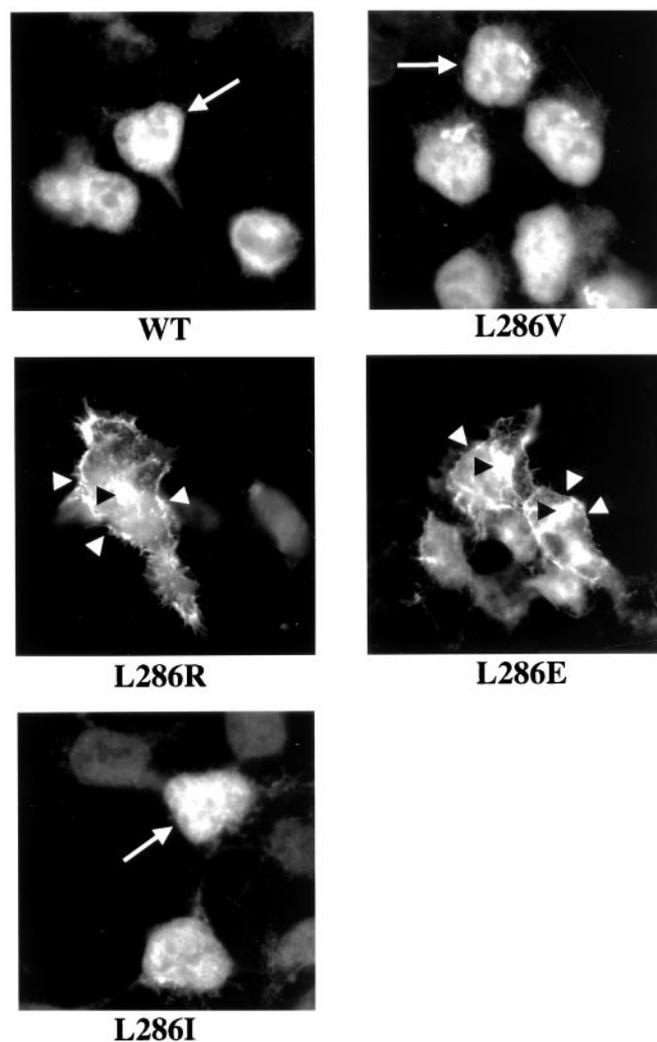


Fig. 4. Cellular distribution of Notch in cells expressing the indicated PS1 derivatives. After fixation in paraformaldehyde, cells were permeabilized and stained with antibody 9E10 to the cytoplasmic myc tail of Notch Δ E. As observed before (22), cells expressing wt PS1 show an accumulation of Notch epitopes (most likely NICD) within the nucleus (arrows). In contrast, cells expressing PS1 L286E or PS1 L286R accumulate Notch epitopes at the plasma membrane (white arrowheads) and within the Golgi (46) (black arrowheads).

L286R, and L286I mutations were permeabilized and stained with an antibody to the myc tail of the recombinant Notch. Cells expressing wt PS1, L286V, or L286I showed a prominent nuclear staining (Fig. 4). Together with the results in Fig. 3, this demonstrates efficient nuclear transfer of NICD. In contrast, cells expressing PS1 L286R or L286E showed very little, if any, nuclear staining of Notch epitopes (Fig. 4). In these cells Notch epitopes accumulated on the plasma membrane (Fig. 4, white arrowheads). Together with the above described inhibition of NICD formation (Fig. 3), these results demonstrate that the uncleaved Notch Δ E precursor accumulates at the cell surface, whereas NICD is not produced and consequently not transported to the nucleus.

Discussion

The above described experiments demonstrate that mutagenesis of a FAD-associated codon of PS1 can result in a further increase in the pathological activity of the original mutation. Of eight mutations introduced, only two had no pathological activity in

regard of A β 42/43 production. In contrast, the remaining six mutations substantially increased A β 42/43 production. The highest A β 42/43 level was reached when the leucine at amino acid 286 was exchanged to a glutamate. Interestingly, introduction of a positively charged amino acid (arginine) also significantly increased the pathological potential of the resulting PS variant. Insertion of charged amino acids (R and E) therefore appears to have the most prominent effects on the pathological function of PS1. In that regard, it is interesting to note that only those PS1 derivatives that contained charged amino acids at position 286 affected endoproteolysis of Notch. These mutations inhibited NICD formation and its nuclear translocation to a very similar extent as the previously described aspartate mutations within the potentially catalytic center of PS1 or PS2 (6, 18). Therefore, PS1 L286E and PS1 L286R behave like the aspartate mutations blocking almost completely the biological function of PS1 in the facilitation of Notch endoproteolysis. Furthermore, this indicates that a very severe effect of PS1 mutations on A β 42/43 production may be correlated with a loss of function in at least one of the biological activities of PS1. In contrast to the PS1 knock-out (3) or the active site mutations in TM6 or TM7 (4–6), the mutations in the large cytoplasmic loop result in a selective loss of function exclusively in endoproteolysis of Notch.

Interestingly, all FAD-associated human PS1 mutations analyzed so far failed to fully rescue the sel-12 mutant phenotype (29, 30, 37). The *ar131* allele of sel-12 is a point mutation (C60S) that occurs at a position that is highly conserved during evolution (28). Interestingly, this point mutation results in reduced Notch activity (28), and, at such conserved positions, FAD-associated mutations are usually observed (41). Moreover, Song *et al.* (22) demonstrated that some FAD-associated PS1 mutations also failed to rescue the lack of NICD production in cells derived from PS1 knock-out mice. However, FAD-associated PS1 mutations were able to rescue embryonic development of PS1 knock-out mice (32, 33). The latter is consistent with our finding that the naturally occurring L286V mutation did not affect Notch endoproteolysis. In contrast, insertion of the two charged amino acids results in a PS1 derivative, which does not functionally support Notch endoproteolysis. This may indicate that the mutations L286R and L286E cause a loss of function of PS1 in Notch endoproteolysis. On the other hand, γ -secretase cleavage of β APP is not inhibited but pathologically modified (by increasing A β 42/43), suggesting a gain of misfunction. Therefore, separation of the PS1 function in endoproteolysis of β APP and Notch has implications for the hypothesis that presenilins are identical with the γ -secretase (4, 8). If PS1 were identical with the protease mediating the γ -secretase cleavage of β APP as well as the endoproteolytic production of NICD, one would expect that a loss of function mutation affects both cleavages equally. However, the two mutations, which block NICD production and its nuclear translocation, do not inhibit A β generation like the

aspartate mutations in TM6 or TM7 of PS1 and PS2 (4–6) or the PS1 knock-out (3). In clear contrast to the aspartate mutations in TM6 and/or TM7, the mutations described here even caused an opposite phenotype by increasing the pathological production of A β 42/43 to an extent, which is way above that of the naturally occurring mutation. Although these data may in fact challenge Wolfe's hypothesis (8), we cannot exclude that the mutations described here may selectively affect cellular trafficking of Notch and β APP. Retention of β APP transport may promote A β 42/43 production within an early cellular compartment, such as the endoplasmic reticulum (ER) and the intermediate compartment, locations, which overlap with the expression of the majority of PS1 (51–53). However, only the production of intracellular A β 42/43 was associated with β APP processing within the ER or the intermediate compartment (38, 54). In contrast, generation of secreted A β 40 and A β 42/43 requires cell-surface transport and reinternalization of β APP (55). Therefore, a specific retention of β APP by mutant PS derivatives within the ER appears to be unlikely. A second possibility would be that the mutations inserted at amino acid 286 affect the sequence specificity of the proteolytic activity potentially exhibited by PS1. In that case, β APP is cleaved preferentially at the alternative position (after amino acid 42/43 of A β), whereas Notch could not be cleaved at the corresponding site. This also appears to be unlikely because substantial amounts of A β 40 are still produced (Fig. 2) and one would consequently expect significant NICD production. Finally, and most likely, the two mutations may affect the conformation of PS1 in a way which would specifically allow PS1 interaction with β APP CTFs but not with Notch. In that regard, one may argue that the two mutations interfere with the Notch/PS1 binding site, whereas the potentially distinct site of β APP/PS1 interaction is not affected. This may be indirectly supported by the previous finding that PS-mediated Notch endoproteolysis occurs closer to the cytoplasmic face of the membrane than does the cleavage of the β APP CTFs (19). Therefore, our data do not exclude the interesting possibility that PS proteins are identical with the γ -secretase (4, 8), but rather indicate that different domains of PS1 are required for distinct functions.

Similar to the previously identified dominant-negative mutations within TM6 and TM7 of PS1 (4, 5, 18) or PS2 (6), the mutations located in the cytoplasmic loop domain of PS1 provide tools to understand the complicated functions of presenilins in endoproteolysis of its target proteins.

We thank Dr. R. Kopan for the Notch Δ E cDNA construct, Dr. F. Checler for providing A β antibodies, Dr. Martin Citron for the PS1 L286V cDNA, Dr. D. Waidelich, PE Biosystems, for help with mass spectrometry analysis, and M. Kostka for technical advice. This work was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (HA1737/7-1), the Boehringer Ingelheim K.G., and the European Community.

- Selkoe, D. J. (1999) *Nature (London)* **399**, A23–A31.
- Haass, C. & De Strooper, B. (1999) *Science* **286**, 916–919.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K. & Van Leuven, F. (1998) *Nature (London)* **391**, 387–390.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T. & Selkoe, D. J. (1999) *Nature (London)* **398**, 513–517.
- Leimer, U., Lun, K., Romig, H., Walter, J., Grunberg, J., Brand, M. & Haass, C. (1999) *Biochemistry* **38**, 13602–13609.
- Steiner, H., Duff, K., Capell, A., Romig, H., Grim, M. G., Lincoln, S., Hardy, J., Yu, X., Picciano, M., Fichteler, K., *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 28669–28673.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Moore, C. L., Leatherwood, D. D., Ostaszewski, B., Rahmati, T., Donkor, I. O. & Selkoe, D. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 4720–4727.
- Wolfe, M. S., De Los Angeles, J., Miller, D. D., Xia, W. & Selkoe, D. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 11223–11230.
- Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., *et al.* (1996) *Neuron* **17**, 181–190.
- Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D. J. & Haass, C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 3205–3211.
- Thinakaran, G., Regard, J. B., Bouton, C. M., Harris, C. L., Price, D. L., Borchelt, D. R. & Sisodia, S. S. (1998) *Neurobiol. Dis.* **4**, 438–453.
- Yu, G., Chen, F., Levesque, G., Nishimura, M., Zhang, D. M., Levesque, L., Rogava, E., Xu, D., Liang, Y., Duthie, M., *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 16470–16475.
- Seeger, M., Nordstedt, C., Petanceska, S., Kovacs, D. M., Gouras, G. K., Hahne, S., Fraser, P., Levesque, L., Czernik, A. J., George-Hyslop, P. S., *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5090–5094.
- Steiner, H., Romig, H., Pesold, B., Philipp, U., Baader, M., Citron, M., Loetscher, H., Jacobsen, H. & Haass, C. (1999) *Biochemistry* **38**, 14600–14605.
- Jacobsen, H., Reinhardt, D., Brockhaus, M., Bur, D., Kocyba, C., Kurt, H.,

- Grim, M. G., Baumeister, R. & Loetscher, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 35233–35239.
16. De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., *et al.* (1999) *Nature (London)* **398**, 518–522.
 17. Chan, Y. M. & Jan, Y. N. (1999) *Neuron* **23**, 201–204.
 18. Ray, W. J., Yao, M., Mumm, J., Schroeter, E. H., Saftig, P., Wolfe, M., Selkoe, D. J., Kopan, R. & Goate, A. M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 36801–36807.
 19. Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A. & Kopan, R. (1998) *Nature (London)* **393**, 382–386.
 20. Ye, Y., Lukinova, N. & Fortini, M. E. (1999) *Nature (London)* **398**, 525–529.
 21. Struhl, G. & Greenwald, I. (1999) *Nature (London)* **398**, 522–525.
 22. Song, W., Nadeau, P., Yuan, M., Yang, X., Shen, J. & Yankner, B. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6959–6963.
 23. Berechid, B. E., Thinakaran, G., Wong, P. C., Sisodia, S. S. & Nye, J. S. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 1493–1496.
 24. Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J. & Tonegawa, S. (1997) *Cell* **89**, 629–639.
 25. Wong, P. C., Zheng, H., Chen, H., Becher, M. W., Sirinathsingji, D. J., Trumbauer, M. E., Chen, H. Y., Price, D. L., Van der Ploeg, L. H. & Sisodia, S. S. (1997) *Nature (London)* **387**, 288–292.
 26. Herreman, A., Hartmann, D., Annaert, W., Saftig, P., Craessaerts, K., Serneels, L., Umans, L., Schrijvers, V., Checler, F., Vanderstichele, H., *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11872–11877.
 27. Donoviel, D. B., Hadjantonakis, A. K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P. S. & Bernstein, A. (1999) *Genes Dev.* **13**, 2801–2810.
 28. Levitan, D. & Greenwald, I. (1995) *Nature (London)* **377**, 351–354.
 29. Levitan, D., Doyle, T. G., Brousseau, D., Lee, M. K., Thinakaran, G., Slunt, H. H., Sisodia, S. S. & Greenwald, I. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14940–14944.
 30. Baumeister, R., Leimer, U., Zweckbronner, I., Jakubek, C., Grunberg, J. & Haass, C. (1997) *Genes Funct.* **1**, 149–159.
 31. Westlund, B., Parry, D., Clover, R., Basson, M. & Johnson, C. D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2497–2502.
 32. Davis, J. A., Naruse, S., Chen, H., Eckman, C., Younkin, S., Price, D. L., Borchelt, D. R., Sisodia, S. S. & Wong, P. C. (1998) *Neuron* **20**, 603–609.
 33. Qian, S., Jiang, P., Guan, X. M., Singh, G., Trumbauer, M. E., Yu, H., Chen, H. Y., Van de Ploeg, L. H. & Zheng, H. (1998) *Neuron* **20**, 611–617.
 34. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I. & Selkoe, D. J. (1992) *Nature (London)* **360**, 672–674.
 35. 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., *et al.* (1992) *Nature (London)* **359**, 322–325.
 36. Walter, J., Grunberg, J., Capell, A., Pesold, B., Schindzielorz, A., Citron, M., Mendla, K., George-Hyslop, P. S., Multhaup, G., Selkoe, D. J. & Haass, C. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5349–5354.
 37. Steiner, H., Romig, H., Grim, M. G., Philipp, U., Pesold, B., Citron, M., Baumeister, R. & Haass, C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7615–7618.
 38. Wild-Bode, C., Yamazaki, T., Capell, A., Leimer, U., Steiner, H., Ihara, Y. & Haass, C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16085–16088.
 39. Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L. & Selkoe, D. J. (1995) *Nat. Med.* **1**, 1291–1296.
 40. Sherrington, R., Rogaeve, E. I., Liang, Y., Rogaeve, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., *et al.* (1995) *Nature (London)* **375**, 754–760.
 41. Haass, C. (1997) *Neuron* **18**, 687–690.
 42. Podlisny, M. B., Citron, M., Amarante, P., Sherrington, R., Xia, W., Zhang, J., Diehl, T., Levesque, G., Fraser, P., Haass, C., *et al.* (1997) *Neurobiol. Dis.* **3**, 325–337.
 43. Steiner, H., Capell, A., Pesold, B., Citron, M., Kloetzel, P. M., Selkoe, D. J., Romig, H., Mendla, K. & Haass, C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32322–32331.
 44. Citron, M., Eckman, C. B., Diehl, T. S., Corcoran, C., Ostaszewski, B. L., Xia, W., Levesque, G., St. George Hyslop, P., Younkin, S. G. & Selkoe, D. J. (1998) *Neurobiol. Dis.* **5**, 107–116.
 45. Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., *et al.* (1997) *Nat. Med.* **3**, 67–72.
 46. Capell, A., Steiner, H., Romig, H., Keck, S., Baader, M., Grim, M. G., Baumeister, R. & Haass, C. (2000) *Nat. Cell. Biol.* **2**, 205–211.
 47. Thinakaran, G., Harris, C. L., Ratovitski, T., Davenport, F., Slunt, H. H., Price, D. L., Borchelt, D. R. & Sisodia, S. S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28415–28422.
 48. Klafki, H. W., Wiltfang, J. & Staufienbiel, M. (1996) *Anal. Biochem.* **237**, 24–29.
 49. Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., *et al.* (1996) *Nat. Med.* **2**, 864–870.
 50. Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C. M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., *et al.* (1996) *Neuron* **17**, 1005–1013.
 51. Kovacs, D. M., Fausett, H. J., Page, K. J., Kim, T. W., Moir, R. D., Merriam, D. E., Hollister, R. D., Hallmark, O. G., Mancini, R., Felsenstein, K. M., *et al.* (1996) *Nat. Med.* **2**, 224–229.
 52. Annaert, W. G., Levesque, L., Craessaerts, K., Dierinck, I., Snellings, G., Westaway, D., George-Hyslop, P. S., Cordell, B., Fraser, P. & De Strooper, B. (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 277–294.
 53. Walter, J., Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Schindzielorz, A., Prior, R., Podlisny, M. B., Fraser, P., Hyslop, P. S., Selkoe, D. J. & Haass, C. (1996) *Mol. Med.* **2**, 673–691.
 54. Skovronsky, D. M., Doms, R. W. & Lee, V. M. (1998) *J. Cell Biol.* **141**, 1031–1039.
 55. Perez, R. G., Soriano, S., Hayes, J. D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D. J., Chen, X., Stokin, G. B. & Koo, E. H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 18851–18856.