

Funktionelle Charakterisierung von BACE, einer für die Alzheimer Krankheit relevanten Protease

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Dipl.-Ing. (FH) Anja Capell
geboren am 23. Dezember 1960 in Hamburg

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter-Micael Kloetzel
 2. Prof. Dr. Christian Haass
 3. Prof. Dr. Gerd Multhaup

Datum der Abgabe: 2. März 2005
Datum der Promotion: 5. Juli 2005

für Manfredo Manfredi

Die Ergebnisse der folgenden Arbeit wurden bereits teilweise in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Capell A., Meyn L., Fluhner R., Teplow D.B., Walter J., Haass C. (2002) Apical sorting of β -secretase limits amyloid β -peptide production. *J. Biol. Chem.* 277 (7); 5637-5643.

Capell A., Steiner H., Willem M., Kaiser H., Meyer C., Walter J., Lammich S., Multhaup G., Haass C. (2000) Maturation and pro-peptide cleavage of beta -secretase. *J. Biol. Chem.* 275 (40); 30849-30854.

Zusammenfassung

Die Alzheimer Krankheit ist die am häufigsten vorkommende Altersdemenz. Neben der Entstehung von neurofibrillären Bündeln ist das spezifische pathologische Merkmal der Alzheimer Krankheit die Amyloid-Ablagerung im Gehirn. Die Hauptkomponente der so genannten Amyloid-Plaques ist das Amyloid β -Peptid ($A\beta$). $A\beta$ entsteht durch sequenzielle proteolytische Spaltung aus einem membrangebundenen Vorläuferprotein, dem β APP (β -amyloid precursor protein). Die kürzlich identifizierte β -Sekretase (BACE, β -site APP-cleaving enzyme) generiert den Schnitt am N-Terminus von $A\beta$. Es entsteht ein C-terminales, membrangebundenes β APP-Fragment, das β APP-CTF. β APP-CTF ist das direkte Substrat für die γ -Sekretase, die innerhalb der Membrandomäne schneidet, wodurch $A\beta$ freigesetzt wird.

In der vorliegenden Arbeit kann erstmalig gezeigt werden, dass BACE auf dem sekretorischen Transportweg aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert wird. Auf dem Transport wird BACE durch N-Glycosylierung und Propeptidabspaltung posttranslational modifiziert. BACE wird im ER N-glycosyliert und die mannosereichen Zucker werden auf dem Transport durch den Golgi-Apparat in Endoglycosidase H resistente Zucker des komplexen Typs modifiziert. Der Umbau der Zucker bewirkt eine Zunahme im Molekulargewicht, obwohl die größere komplex glycosylierte, mature Form von BACE das Propeptid nicht mehr enthält. Die Propeptidabspaltung, durch Furin oder furinähnliche Propeptidkonvertasen, findet unmittelbar vor dem Aufbau der komplexen Zucker statt.

Ferner konnte gezeigt werden, dass der Transport von BACE die $A\beta$ -Entstehung limitieren kann. Da es in der Alzheimer Krankheit ausschließlich in dem an polarisierte Zellen angrenzenden extrazellulären Raum zur Bildung von Amyloid-Plaques kommt und da β APP polarisiert transportiert wird, wurde in dieser Arbeit der polarisierte Transport von BACE untersucht. In polarisierten Madin-Darby canine kidney (MDCK) Zellen wird BACE überwiegend zur apikalen Plasmamembran transportiert. Interessanterweise wurde im selben Modellsystem für das BACE-Substrat β APP ein Transport zur basolateralen Plasmamembran detektiert. Der gegensätzliche Transport von BACE und β APP limitiert die $A\beta$ -Entstehung. Wird der apikale Transport von β APP durch Deletion seines basolateralen Sortierungssignals erhöht, entsteht vermehrt $A\beta$. Der differenzielle Transport von BACE und β APP könnte ein Hinweis darauf sein, dass β APP nicht das physiologische Substrat von BACE ist.

Schlagworte:

Alzheimer Krankheit

β APP

BACE

Maturierung

Polarisierter Transport

Abstract

Alzheimer's disease is the most common cause of progressive cognitive decline in the aged population. Pathologically Alzheimer's disease is characterized by the invariant accumulation of senile plaques. Senile plaques are predominantly composed of the amyloid β -peptide ($A\beta$), which is derived from the membrane bound β -amyloid precursor protein (β APP) by sequential proteolytic cleavage. The recently identified β -secretase (BACE) is responsible for the cleavage at the N-terminus of the $A\beta$ domain. This cleavage generates membrane-bound β APP C-terminal fragments (β APP-CTF) which are the immediate precursor for γ -secretase cleavage and therefore for liberation of $A\beta$.

The present work shows that BACE moves along the secretory pathway, while it undergoes post-translational modifications, which can be monitored by a significant increase in the molecular mass and cleavage of its pro-peptide. BACE becomes N-glycosylated within the ER and the increase in molecular mass is caused by complex N-glycosylation. The mature form of BACE is resistant to endoglycosidase H treatment; this indicates that BACE traffics through the Golgi. Furthermore the mature form of BACE does not contain the pro-peptide anymore. Pro-BACE is predominantly located within the endoplasmic reticulum. Pro-peptide cleavage occurs immediately before full maturation by furin or a furin-like proprotein convertase.

Moreover traffic of BACE can limit $A\beta$ generation. Since polarized cells are associated with two invariant pathological features of Alzheimer's disease, namely the formation of senile plaques and the cerebral amyloid angiopathy, sorting mechanism of BACE were analyzed. In the well established model system of polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, the majority of BACE is sorted to the apical domain. Interestingly it has been shown previously that the substrate of BACE, β APP is transported to the basolateral surface of MDCK cells. Therefore, substantial amounts of BACE are targeted away from β APP to a non-amyloidogenic compartment, a cellular mechanism that limits $A\beta$ generation. Upon deletion of the basolateral sorting signal of β APP, apically missorted β APP is processed by BACE. The differential targeting of BACE and its substrate β APP suggest that β APP might not be the major physiological substrate of BACE.

Keywords:

Alzheimer's disease

β APP

β -secretase, BACE

Maturation

Polarized transport

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Epidemiologie der Alzheimer Krankheit | 1 |
| 1.2 | Das histopathologische Krankheitsbild | 2 |
| 1.3 | Molekulare und genetische Grundlagen der Alzheimer Krankheit | 4 |
| 1.3.1 | Struktur und Funktion des β -Amyloid Vorläuferproteins (β APP) | 6 |
| 1.3.2 | Die proteolytische Prozessierung von β APP und die Entstehung des A β -Peptids | 10 |
| 1.3.2.1 | Der α -Sekretase-Schnitt | 11 |
| 1.3.2.2 | Der β -Sekretase-Schnitt | 13 |
| 1.3.2.3 | Der γ -Sekretase-Schnitt | 15 |
| 1.4 | Aspartylproteasen | 19 |
| 1.5 | Die Rolle des intrazellulären Transports in der Alzheimer Krankheit | 23 |
| 1.5.1 | Polarisierter Transport in MDCK Zellen | 23 |
| 1.5.2 | Polarisierter Transport von β APP in MDCK Zellen | 24 |
| 1.6 | Zielsetzung | 26 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 27 |
| 2.1 | Geräte und Materialien | 27 |
| 2.1.1 | Allgemein | 27 |
| 2.1.2 | Molekularbiologie | 28 |
| 2.1.3 | Zellkultur | 28 |
| 2.1.4 | Proteinbiochemie und Immunocytochemie | 29 |
| 2.2 | Enzyme, Kits (Versuchssysteme), Chemikalien, | 30 |
| 2.2.1 | Allgemein | 30 |
| 2.2.2 | Molekularbiologie | 30 |
| 2.2.2.1 | Vektoren | 30 |
| 2.2.2.2 | Oligonukleotide und cDNA Konstrukte | 31 |
| 2.2.3 | Zellkultur | 31 |
| 2.2.3.1 | Transfizierte HEK 293 und MDCK Zelllinien | 32 |
| 2.2.4 | Proteinbiochemie und Immunocytochemie | 33 |
| 2.2.4.1 | Antikörper | 33 |
| 2.3 | Molekularbiologische Methoden | 35 |
| 2.3.1 | PCR (Polymerasekettenreaktion) | 35 |
| 2.3.2 | Agarose-Gelelektrophorese | 36 |
| 2.3.3 | Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 36 |
| 2.3.4 | Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen | 36 |
| 2.3.5 | Dephosphorylierung von DNA | 37 |
| 2.3.6 | Ligation von DNA | 37 |
| 2.3.7 | E. coli Kulturen | 37 |
| 2.3.8 | Herstellung kompetenter E. coli Zellen | 37 |
| 2.3.9 | Transformation von DNA-Konstrukten in kompetente Bakterien | 38 |
| 2.3.10 | Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Mini-Präp) | 38 |
| 2.3.11 | Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxi-Präp) | 39 |
| 2.3.12 | Sequenzierung der DNA-Konstrukte | 39 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.4 | Zellkultur | 39 |
| 2.4.1 | Kultivierung und Verdünnung von HEK 293 Zellen | 39 |
| 2.4.1.1 | Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung) | 40 |
| 2.4.1.2 | Transfektion von HEK 293 Zellen mit rekombinanter DNA | 40 |
| 2.4.1.3 | Beschichtung von Kulturschalen und Deckgläschen mit Poly-L-Lysin | 41 |
| 2.4.1.4 | Zählen von Zellen | 41 |
| 2.4.2 | Kultivierung der MDCK Zellen | 41 |
| 2.4.2.1 | Verdünnung, Kryokulturen und Transfektion | 41 |
| 2.4.2.2 | Wachstum von MDCK Zellen in Filterkammern | 42 |
| 2.5 | Proteinbiochemische Methoden | 42 |
| 2.5.1 | Herstellung von Zelllysaten | 42 |
| 2.5.1.1 | Gesamtproteinlysate | 42 |
| 2.5.1.2 | Membranproteinlysate | 43 |
| 2.5.2 | Proteinbestimmung | 43 |
| 2.5.3 | Nachweis von Proteinen | 44 |
| 2.5.3.1 | TCA-Fällung von Proteinen | 44 |
| 2.5.3.2 | Immunopräzipitation von Proteinen | 44 |
| 2.5.3.3 | SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 45 |
| 2.5.3.4 | Tris-Tricine-Gelelektrophorese | 46 |
| 2.5.3.5 | Western Blot Analyse | 46 |
| 2.5.3.6 | Fluorografische Analyse radioaktiv markierter Proteine | 47 |
| 2.5.3.7 | Quantifizierung radioaktiv markierter Proteine | 48 |
| 2.5.4 | Metabolische radioaktive Markierung von Proteinen | 48 |
| 2.5.4.1 | Langzeitmarkierung von HEK 293 Zellen mit [³⁵ S]Methionin/ Cystein | 48 |
| 2.5.4.2 | Langzeitmarkierung von MDCK Zellen mit [³⁵ S]Methionin/ Cystein | 49 |
| 2.5.4.3 | „Pulse/chase“-Markierung von HEK 293 Zellen | 49 |
| 2.5.4.4 | „Pulse/chase“-Markierung von MDCK Zellen | 50 |
| 2.5.4.5 | Markierung von MDCK Zellen mit [³ H]Phenylalanin und Radiosequenzierung | 50 |
| 2.5.5 | Analyse der Protein-Glycosylierung | 51 |
| 2.5.5.1 | N-Glycosidase F Behandlung | 51 |
| 2.5.5.2 | Endoglycosidase H Behandlung | 52 |
| 2.5.5.3 | Tunicamycin Behandlung | 52 |
| 2.5.6 | Analyse zellulärer Transport Mechanismen | 52 |
| 2.5.6.1 | Behandlung von HEK 293 Zellen mit Brefeldin A und Monensin | 52 |
| 2.5.6.2 | Behandlung von HEK 293 mit Furininhibitor und Calcium-Ionophor | 53 |
| 2.5.6.3 | Biotinylierung von apikalen und basolateralen Oberflächenproteinen polarisierter MDCK Zellen | 53 |
| 2.5.6.4 | Untersuchung der Endocytose und Transcytose in polarisierten MDCK Zellen | 54 |
| 2.6 | Immunocytochemische Methoden | 55 |
| 2.6.1 | Immunofluoreszenz von transfizierten, auf Deckgläschen gewachsenen HEK 293 Zellen | 55 |
| 2.6.2 | Oberflächenimmunofluoreszenz von transfizierten, in Filterkammern polarisierten MDCK Zellen | 56 |
| 2.7 | BACE in vitro Assay | 57 |
| 2.7.1 | Enzympräparationen | 57 |
| 2.7.1.1 | Aufreinigung von BACE-L(His) ₆ über Nickel-Agarose | 57 |
| 2.7.1.2 | Dialyse von konditioniertem Medium | 57 |
| 2.7.1.3 | Konzentration von konditioniertem Medium | 57 |
| 2.7.1.4 | Membranpräparation | 58 |
| 2.7.2 | BACE-L -Substrate | 58 |
| 2.7.3 | Durchführung des BACE-Assay | 60 |
| 2.7.3.1 | Bestimmung der IC ₅₀ -Werte von BACE-Inhibitoren | 60 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3 | ERGEBNISSE | 61 |
| 3.1 | Expression und Nachweis von BACE | 61 |
| 3.1.1 | Expression von BACE in HEK 293 Zellen und MDCK Zellen | 61 |
| 3.1.2 | Antikörper zum Nachweis von BACE | 62 |
| 3.1.3 | Spezifität der Antisera und Nachweis von BACE im Western Blot und in der Immunopräzipitation | 63 |
| 3.2 | Maturierung von BACE durch post-translationale Modifikationen | 65 |
| 3.2.1 | Kinetik der Maturierung von BACE | 65 |
| 3.2.2 | N-Glycosylierung von BACE | 67 |
| 3.2.3 | Analyse der Propeptidprozessierung von BACE | 70 |
| 3.2.3.1 | Zelluläre Lokalisierung der BACE-Propeptidabspaltung | 70 |
| 3.2.3.2 | Bestimmung der Schnittstelle der BACE-Propeptidkonvertase | 73 |
| 3.3 | Einfluss von BACE auf die βAPP-Prozessierung | 74 |
| 3.3.1 | Antikörper zum Nachweis des β APP und der β APP-Prozessierungsprodukte | 74 |
| 3.3.2 | Prozessierung von β APP durch BACE und die BACE-Varianten: Δ C, L, R45A | 75 |
| 3.4 | Identifizierung der Propeptidkonvertase von BACE | 77 |
| 3.5 | Polarisierter Transport von BACE | 81 |
| 3.5.1 | BACE-Prozessierung in MDCK Zellen | 81 |
| 3.5.2 | BACE-Aktivität in MDCK Zellen | 83 |
| 3.5.3 | Zelloberflächenverteilung von BACE in MDCK Zellen | 84 |
| 3.5.3.1 | Immunocytochemische Detektion von BACE an der Plasmamembran | 85 |
| 3.5.3.2 | Biochemische Detektion von BACE an der Plasmamembran | 85 |
| 3.5.4 | Einfluss der BACE-Sortierung auf die Prozessierung von β APP | 87 |
| 3.5.4.1 | Polarisierte Sezernierung von I- β APP α und I- β APP β | 88 |
| 3.5.4.2 | Polarisierte Sezernierung von A β und p3 | 91 |
| 3.5.4.3 | Polarisierte Verteilung von β APP-CTF an der Plasmamembran | 93 |
| 3.5.4.4 | Reinternalisierung und Transcytose von β APP | 93 |
| 3.5.4.5 | Deletion des basolateralen β APP-Sortierungssignals und Auswirkung auf die β APP-Prozessierung | 94 |
| 3.5.5 | Oberflächenlokalisierung der Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes in polarisierten MDCK Zellen | 96 |
| 3.6 | In vitro Charakterisierung von BACE | 98 |
| 3.6.1 | Entwicklung eines <i>in vitro</i> Assays für BACE | 98 |
| 3.6.1.1 | Enzymquelle und Enzymaufreinigung für den BACE-Assay | 98 |
| 3.6.1.2 | Substrat für den BACE-Assay | 100 |
| 3.6.1.3 | Konditioniertes Medium als Enzymquelle | 102 |
| 3.6.2 | Charakterisierung der <i>in vitro</i> Aktivität von BACE-L | 103 |
| 3.6.2.1 | Bestimmung des pH-Optimums der BACE-L-Aktivität | 103 |
| 3.6.2.2 | Die BACE-L-Aktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration | 105 |
| 3.6.2.3 | Spezifische Inhibitoren von BACE-L | 106 |
| 4 | DISKUSSION | 108 |
| 4.1 | Charakterisierung von BACE im Zellkultursystem | 108 |
| 4.1.1 | Expression von BACE in HEK 293 und MDCK Zellen | 108 |
| 4.1.2 | Maturierung und Stabilität von BACE | 109 |
| 4.1.3 | Die Glycosylierung von BACE | 111 |
| 4.1.4 | Die Prozessierung des BACE-Propeptids | 112 |
| 4.1.5 | Die β APP-Prozessierung durch BACE und BACE-Varianten | 117 |
| 4.1.6 | Polarisierter Transport von BACE | 119 |

| | | |
|------------------------------------|--|------------|
| 4.1.6.1 | Auswirkungen des polarisierten Transports von BACE auf die β APP-Prozessierung | 121 |
| 4.1.6.2 | β APP prozessierende Sekretase Aktivitäten in MDCK Zellen | 123 |
| 4.2 | Charakterisierung von BACE - in vitro | 124 |
| 4.3 | Relevanz der Ergebnisse bezüglich der Alzheimer Krankheit | 127 |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | | 129 |
| LITERATURVERZEICHNIS | | 132 |
| ANHANG | | 162 |
| | Danksagung | 162 |
| | Erklärung | 163 |
| | Lebenslauf | 164 |
| | Publikationen | 165 |

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Alzheimer Krankheit

Von einer Altersdemenz sind in Europa ca. 6,4 % der über 65 jährigen (Lobo et al., 2000) und 16,9 % bis 34,8 % (Prencipe et al., 1996; Riedel-Heller et al., 2001) der über 85 jährigen betroffen. Mit einer im Durchschnitt älter werdenden Bevölkerung steigt die Anzahl der von einer Demenz betroffenen Menschen, damit stellt die Altersdemenz nicht nur ein persönliches Schicksal dar, sondern ist von zunehmender gesellschaftspolitischer und wirtschaftlicher Bedeutung. Die medizinische und soziale Versorgung wird zukünftig eine Herausforderung für die Gesellschaft werden (Ankri und Poupard, 2003).

Die Alzheimer Krankheit ist heute weltweit die häufigste Form von Demenz (Selkoe, 2001a); die Verbreitung ist weitgehend unabhängig von ethnischer Zugehörigkeit (Selkoe, 1999), auch wenn neuere, umfangreiche Studien populationsabhängige Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der Alzheimer Krankheit und der Wahrscheinlichkeit, die Alzheimer Krankheit zu bekommen, feststellen (Chandra et al., 2001; Hendrie et al., 2001; Tang et al., 2001). Zusammenhänge sowohl zwischen ethnischer Zugehörigkeit, in den USA sind „African Americans“ und „Caribbean Hispanics“ gefährdeter als „Caucasians“ (Tang et al., 2001), als auch gesellschaftsstruktureller Entwicklung, in Industrienationen ist die Gefährdung, an Alzheimer zu erkranken größer, als in Entwicklungsländern (Chandra et al., 2001; Hendrie et al., 2001), konnten festgestellt werden. Weitere umfangreiche epidemiologische Studien könnten Hinweise auf Risikofaktoren geben, die die Entstehung der Alzheimer Krankheit begünstigen. Zurzeit leiden weltweit mehr als 12 Millionen Menschen an der Alzheimer Krankheit (Citron, 2004a).

Den größten Anteil an der Alzheimer Krankheit machen „sporadisch“ auftretende Fälle aus, nur 5-10 % sind auf genetische Risikofaktoren, wie das $\epsilon 4$ Allel des Apolipoproteingens E (Apo E), oder auf genetisch autosomal-dominant vererbte Fälle zurückzuführen (Selkoe, 1996; Selkoe, 2001a). Es gibt drei verschiedene Apo E Allele, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$, in der Gesamtpopulation überwiegend ist das $\epsilon 3$ Allel vertreten, während $\epsilon 2$ und $\epsilon 4$ weniger häufig sind. Apo E spielt eine regulierende Rolle in dem Lipidmetabolismus und der Cholesterinaufnahme und intrazellulären Freisetzung. Strittmatter und Kollegen (Saunders et al., 1993; Strittmatter et al., 1993) konnten zeigen, dass das $\epsilon 4$ Allel bei „late-onset“ Patienten der Alzheimer Krankheit überrepräsentiert ist und zu erhöhter Amyloid-Ablagerung im cerebralen Cortex führt (Rebeck et al., 1993; Schmechel et al., 1993). Für das $\epsilon 2$ Allel von Apo E konnte eine schützende Funktion festgestellt werden (Corder et al., 1994).

Mutationen in drei Genen können zur autosomal-dominanten „early-onset“ Form (Patienten < 60 Jahre), der familiären Alzheimer Krankheit (FAD, familial Alzheimer's disease), führen (Hardy, 1997a; Tilley et al., 1998). Die Pathologie der FAD-Form unterscheidet sich nicht von der sporadischen „late-onset“ Form der Alzheimer Krankheit (Selkoe, 1999). Mutationen im Gen auf Chromosom 21, kodierend für das β -Amyloid Vorläuferprotein (β APP, β -amyloid precursor protein), (Goate et al., 1991) sind nur für 2-3 % der Fälle der familiären Alzheimer Krankheit

verantwortlich. Dagegen decken Mutationen auf den Genen für Presenilin 1 (PS1) auf Chromosom 14 (Sherrington et al., 1995) 70-80 %, und Presenilin 2 (PS2) auf Chromosom 1 (Levy-Lahad et al., 1995a; Levy-Lahad et al., 1995b; Li et al., 1995; Rogaev et al., 1995) 20 % der familiären Fälle der Alzheimer Krankheit ab (Hyman und Tanzi, 1995). Die bisher bekannten FAD-Mutationen sind auf der „homepage“ <http://molgen-www.uia.ac.be/ADMutations> aufgeführt. Die ersten Symptome der Alzheimer Krankheit sind Störungen im Kurzzeitgedächtnis und im Orientierungsvermögen. Später treten Verluste des Langzeitgedächtnisses, der Urteilsfähigkeit, des logischen Denkens und des Sprachvermögens auf. Im Endstadium sind die Patienten bettlägerig, incontinent und auf permanente Hilfe angewiesen. Der Tod tritt im Mittel neun Jahre nach der Diagnose ein (Samuels und Davis, 1998).

Der klinische Verdacht stützt sich auf neuropsychologische Tests und bildgebende Verfahren wie Computer-Tomografie, Magnetresonanz-Tomografie, Positronen-Emissions-Tomografie und Photonen-Emissions-Tomografie (DeKosky und Marek, 2003; Demetriades, 2002; Fox et al., 2001). Ferner beruht die Diagnose der Alzheimer Krankheit auf dem Ausschluss anderer Demenzen (McKhann et al., 1984). Biomarker für eine frühe biochemische Diagnose, als Voraussetzung für eine frühe Behandlung, wären wünschenswert, befinden sich aber erst in der Testphase (Blennow und Hampel, 2003; Hampel et al., 2004). Es werden Möglichkeiten untersucht die für die Alzheimer Krankheit relevanten Proteine, Tau, phosphoryliertes Tau und die 42 Aminosäuren (AS) lange Form des β -Amyloid Peptids ($A\beta_{42}$) im Liquor cerebrospinalis nachzuweisen (Andreasen et al., 2003). Eine definitive Diagnose kann erst post-mortem anhand der Hirnpathologie gestellt werden (Hendriks und Van Broeckhoven, 1996).

1.2 Das histopathologische Krankheitsbild

Alois Alzheimer brachte 1907 erstmalig die klinischen Symptome der Krankheit mit der neurofibrillären Pathologie im Gehirn seiner 51-jährig verstorbenen Patientin Auguste D. in Verbindung (Abbildung 1) (Alzheimer, 1907).

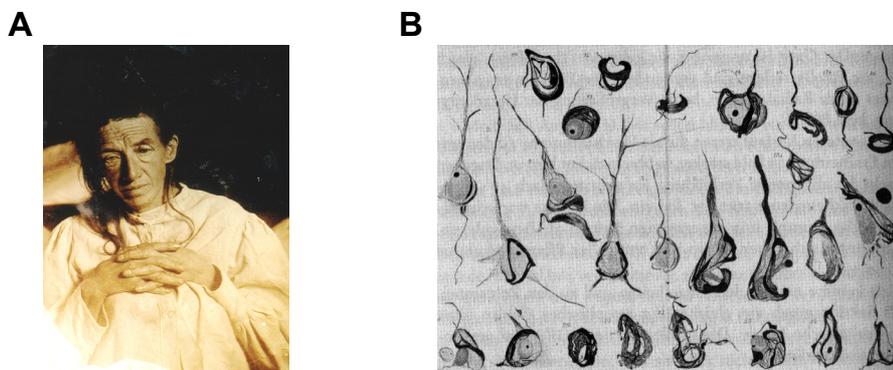


Abbildung 1: Dokumentation der neurofibrillären Pathologie nach Alois Alzheimer

A: Fotografie der „ersten“ Alzheimer Patientin, Auguste D. **B:** Neurofibrilläre Bündel, gezeichnet von Alois Alzheimer nach lichtmikroskopischer Untersuchung [Quelle: (Maurer und Maurer, 1998)].

Die beiden charakteristischen neuropathologischen Merkmale der Alzheimer Krankheit - Amyloid-Ablagerungen und neurofibrilläre Bündel - bilden auch heute noch die Grundlage für die endgültige post-mortem Diagnose der Krankheit, (Thorsett und Latimer, 2000). Amyloid-Ablagerungen und neurofibrilläre Bündel sind vorwiegend in den Gehirnregionen Neocortex und Hippocampus sowie im Limbischen System nachweisbar (Braak et al., 1996).

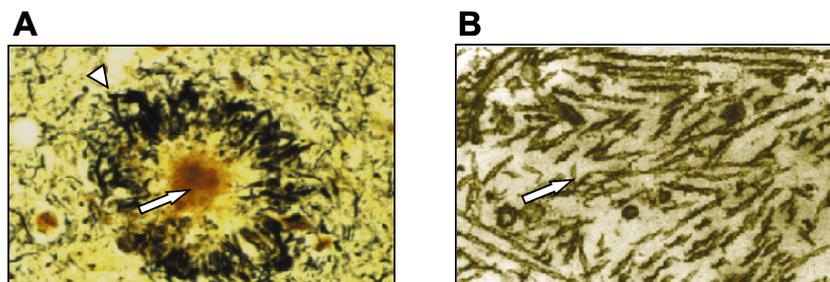


Abbildung 2: Histopathologische Charakteristika der Alzheimer Krankheit

A: Hochauflösende mikroskopische Aufnahme eines Amyloid-Plaques (Pfeil), umgeben von dystrophen Neuriten (Pfeilkopf). **B:** Elektronenmikroskopische Aufnahme neurofibrillärer Bündel, die aus gepaarten helikalen Filamenten (Pfeil) bestehen [Quelle: (Sisodia und St George-Hyslop, 2002)].

Neurofibrilläre Bündel (Abbildung 2B), oder „tangles“, entstehen ausschließlich intrazellulär in Neuronen im somato-dendritischen, aber auch im axonalen Kompartiment durch Aggregation von gepaarten helikalen Filamenten (Terry et al., 1964). Diese Filamente bestehen überwiegend aus hyperphosphorylierten Formen des Mikrotubuli assoziierten Proteins Tau (Goedert et al., 1996; Grundke-Iqbal et al., 1986), das unter physiologischen Bedingungen für die Stabilisierung der axonalen Mikrotubuli verantwortlich ist (Friedhoff et al., 2000). Die nicht physiologische Hyperphosphorylierung von Tau ist auf die Störung des Gleichgewichtes bestimmter Kinasen und Phosphatasen zurückzuführen, dessen Ursache bisher nicht vollständig erklärt werden kann (Mandelkow und Mandelkow, 1998). Die durch die „tangle“ Bildung angegriffenen Axone und Dendriten werden als „dystrophe Neuriten“ bezeichnet (Crowther und Goedert, 2000). Nach dem Absterben der betroffenen Neuronen erscheinen die neurofibrillären Bündel auch als extrazelluläre Ablagerungen (Bondareff et al., 1994). Neurofibrilläre Bündel treten auch im Zusammenhang mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Frontallappen-Demenz, auf (Joachim und Selkoe, 1992; Lee und Trojanowski, 1999; Morris et al., 2001) und sind damit nicht spezifisch für die Alzheimer Krankheit.

Das zweite charakteristische, pathologische Merkmal der Alzheimer Krankheit, die Amyloid-Ablagerungen (Abbildung 2A), oder Amyloid-Plaques, sind ausschließlich im extrazellulären Raum des Gehirns sowie im zerebralen Blutgefäßsystem nachweisbar (Selkoe, 1999). Mikroskopisch unterscheidet man zwei Subklassen von Amyloid-Plaques, die neuritischen und die diffusen Plaques. Die neuritischen Plaques sind gekennzeichnet durch einen dichten Amyloidkern, dem „amyloid-core“, der von „dystrophen Neuriten“ (Braak et al., 1996) sowie

aktivierten Microgliazellen und Astrocyten umgeben ist (Pike et al., 1994). Diese kompakten neuritischen Amyloid-Plaques sind spezifisch für die Alzheimer Krankheit, während die diffusen Amyloid-Plaques auch in Gehirnen nicht dementer, alter Menschen nachweisbar sind (Hardy und Selkoe, 2002). Diffuse Amyloid-Plaques sind hauptsächlich im Cerebellum nachweisbar und bedingen in der Regel keine bis wenige zelluläre Veränderungen (Yamaguchi et al., 1989).

1.3 Molekulare und genetische Grundlagen der Alzheimer Krankheit

Die Hyperphosphorylierung von Tau und die Entstehung neurofibrillärer Bündel sind nicht spezifisch für die Alzheimer Krankheit (Joachim und Selkoe, 1992; Morris et al., 2001). Mutationen im Tau kodierenden Gen führen nicht zur Alzheimer Krankheit, sondern zu parkinson-ähnlichen Erkrankungen (Hutton et al., 1998) oder zur Frontallappen-Demenz (Lee und Trojanowski, 1999; Morris et al., 1999). Tau Ablagerungen und Bildung neurofibrillärer Bündel bewirken eine Neurodegeneration, aber keine Entstehung von Amyloid-Plaques (Hardy et al., 1998; Lewis et al., 2000). Amyloid-Ablagerungen treten vor der Tau-Pathologie auf (Oddo et al., 2003) und können die Entstehung neurofibrillärer Bündel einleiten (Gotz et al., 2001).

Obwohl der direkte Zusammenhang zwischen den Amyloid-Plaques, der Pathologie der Alzheimer Krankheit und der neuronalen Degeneration im Zentralnervensystem bisher nicht definitiv geklärt werden konnte, nimmt die Bildung der Amyloid-Plaques eine Schlüsselposition in der Entstehung der Alzheimer Krankheit ein (Hardy und Selkoe, 2002; Huse und Doms, 2001; Selkoe, 1999). Die Hauptkomponente der Amyloid-Plaques ist ein kurzes, amphipatisches Peptid, das A β -Peptid (Amyloid β -Peptid). Zunächst konnte das A β -Peptid aus zerebralen Ablagerungen an Blutgefäßen (Glennner und Wong, 1984) und später aus Amyloid-Plaques (Masters et al., 1985a) isoliert werden. Weitere Komponenten der Plaques sind Apo E und J, α 1-Antichymotrypsin und Proteoglycane (Dickson, 1997). Das A β -Peptid entsteht durch post-translationale Proteolyse aus einem Vorläuferprotein, dem β APP (Kang et al., 1987). Die das A β -Peptid freisetzenden Proteasen werden aufgrund der durch die Proteolyse entstehenden Sezernierungsprodukte (1.3.2) auch Sekretasen genannt. Da die Sekretasen eine Variabilität in ihrer Schnittstelle zeigen, weist das entstehende A β -Peptid eine N- und C-terminale Heterogenität auf (Masters et al., 1985a; Masters et al., 1985b; Wang et al., 1996). Es haben sich jedoch zwei A β -Spezies als Hauptkomponenten der Amyloid-Plaques herauskristallisiert, deren N-Termini beginnen mit Aspartat der AS an Position 597, bezogen auf die 695 AS lange β APP-Spleißform (β APP₆₉₅), der C-Terminus endet entweder mit V636 oder mit A638, ebenfalls bezogen auf β APP₆₉₅. Die Nomenklatur der A β -Peptide bezieht sich unabhängig von der β APP-Spleißform auf die Länge des A β -Peptids selbst. Damit wird die kürzere Variante beginnend mit Asparaginsäure an Position 1 des A β -Peptids als A β ₁₋₄₀ und die zwei AS längere Variante als A β ₁₋₄₂ bezeichnet. Die längere Variante A β ₁₋₄₂ weist eine höhere Tendenz zur Aggregation auf (Barrow und Zagorski, 1991; Jarrett et al., 1993), dadurch wird

eine größere Neurotoxizität hervorgerufen (Yankner, 1996). Außerdem ist A β ₁₋₄₂ gegenüber Degradation resistenter als A β ₁₋₄₀ (Glabe, 2001), wodurch die Ablagerung im Hirn verstärkt wird (Iwatsubo et al., 1994; Selkoe, 1999). Die Entstehung und die spezifische Ablagerung von A β ₁₋₄₂ im Hirn scheint der erste pathologische Schritt für die Entstehung der Alzheimer Krankheit zu sein (Citron, 2004a; Hardy und Selkoe, 2002; Huse und Doms, 2001; Selkoe, 1999).

Einen entscheidenden Hinweis auf die Schlüsselrolle der Amyloid-Ablagerungen für die Entstehung der Alzheimer Krankheit liefern die bereits unter 1.1 erwähnten autosomal-dominanten FAD-Fälle. Es führen alle bisher bekannten FAD-Mutationen in den Genen kodierend für β APP, PS1 und PS2 entweder zu einer verstärkten Sezernierung aller A β -Peptid Formen oder, wie in den meisten Fällen, zu einer spezifischen Erhöhung der besonders amyloidogenen A β ₄₂-Spezies (Borchelt et al., 1996; Cai et al., 1993; Chartier-Harlin et al., 1991; Citron et al., 1992; Citron et al., 1997; Duff et al., 1996; Goate et al., 1991; Haass und Steiner, 2002; Murrell et al., 1991; Scheuner et al., 1996; Suzuki et al., 1994; Younkin, 1998).

Tiermodelle für die Alzheimer Krankheit belegen ebenfalls die Bedeutung der Amyloid-Ablagerungen. Wird in Mäusen mit Amyloid-Plaques durch Immunisierung, z.B. mit A β -Peptid oder Antikörpern gerichtet gegen das A β -Peptid (Bard et al., 2000; Janus et al., 2000; Morgan et al., 2000; Schenk et al., 1999), der Abbau der Plaques eingeleitet oder wird die weitere Amyloid Entstehung verhindert, z.B. durch Injektion von Proteaseinhibitoren (Chang et al., 2004; Oddo et al., 2004), kommt es zur Reduktion der Plaques und die Lernfähigkeit der Mäuse nimmt zu.

Der neurotoxische Wirkmechanismus und die Entstehung der Läsionen in der Alzheimer Krankheit sind nicht vollständig geklärt. Derzeit wird davon ausgegangen, dass die frühe Fehlfunktion der Synapsen (Masliah et al., 2001; Mucke et al., 2000; Small et al., 2001; Sze et al., 2000; Yao, 2004) durch lösliche, neurotoxische, oligomere A β ₄₂-Formen ausgelöst werden kann (Kamenetz et al., 2003; Selkoe, 2002; Walsh et al., 2002). Dafür spricht auch, dass lösliches A β -Peptid besser mit dem Krankheitsverlauf korreliert, als die Anzahl histologisch bestimmter Amyloid-Plaques (Naslund et al., 2000; Wang et al., 1999). Einwandernde Microgliazellen und Astrocyten beschleunigen die neuronale Degeneration (Lemere et al., 1996). Die zunehmende Schädigung der Neuronen bedingt eine Änderung des intrazellulären Milieus, die dabei veränderten Kinase- und Phosphataseaktivitäten führen unter anderem zur Entstehung von gepaarten helikalen Tau Filamenten und somit zum weiteren Funktionsverlust und Tod von Neuronen. Das Absterben der Neuronen wird als die unmittelbare Ursache für die Demenz angesehen (Hardy und Selkoe, 2002; Selkoe, 2001b; Sisodia und St George-Hyslop, 2002).

Ein verändertes Gleichgewicht in der A β -Peptid Entstehung, der extrazellulären Aggregation und der A β -Degradation, ausgelöst durch verschiedenste Faktoren, steht mit großer Wahrscheinlichkeit am Anfang einer Kaskade, die letztlich zum Tod der Neuronen führt (Abbildung 3) (Hardy und Selkoe, 2002).



Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung der Amyloid-Kaskade

Die Abfolge pathologischer Ereignisse führt zur Alzheimer Krankheit. Das auslösende Phänomen ist die erhöhte Entstehung von A β ₄₂. In der FAD-Form ist die pathogene Mutation auslösender Faktor für die erhöhte A β ₄₂-Bildung. In der sporadisch auftretenden Alzheimer Krankheit könnten verschiedenste Faktoren eine Rolle für die erhöhte A β ₄₂-Produktion spielen. [Quellen: (Citron, 2004b; Hardy und Allsop, 1991; Hardy und Selkoe, 2002)].

1.3.1 Struktur und Funktion des β -Amyloid Vorläuferproteins (β APP)

Die Erkenntnis, dass das A β -Peptid aus einem Vorläuferprotein, dem β APP (Kang et al., 1987), entsteht leitete, neben der Untersuchung der A β -Peptid Entstehungsmechanismen auch eine extensive Charakterisierung des β APP ein.

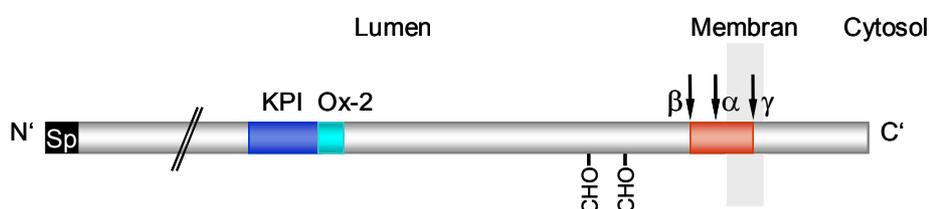


Abbildung 4: Schematische Darstellung von β APP₇₇₀

Die luminale Domäne von β APP enthält ein Signalpeptid (Sp, schwarze Box). Die KPI-Domäne der Spleißformen β APP_{770/751} ist blau, die Ox-2 Antigen-Domäne der Spleißform β APP₇₇₀ ist hellblau, die A β -Domäne ist rot und die zelluläre Membran grau dargestellt. Die ungefähren Schnittstellen der β APP prozessierenden Sekretasen und die zwei Glycosylierungsstellen sind gekennzeichnet.

β APP ist ein glycosyliertes Typ I Transmembranprotein, mit einer großen N-terminalen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen C-terminalen, cytoplasmatischen Domäne (Abbildung 4). N-terminal befindet sich ein 17 AS langes Signalpeptid, das für die Translation ins Endoplasmatische Retikulum (ER) benötigt wird (Kang et al., 1987; Tanzi et al., 1987).

β APP wird nach seiner Synthese ko-/post-translational modifiziert und von Sekretasen proteolytisch prozessiert (1.3.2). Nach der Translokation ins ER wird β APP zunächst im ER N-glycosyliert, dann auf dem sekretorischen Transportweg zur Zelloberfläche transportiert, dabei im Golgi-Apparat O-glycosyliert, sulfatiert und phosphoryliert (Hung und Selkoe, 1994; Oltersdorf et al., 1990; Walter et al., 1997; Weidemann et al., 1989).

An der Zelloberfläche können matures β APP, oder auch membrangebundene C-terminale Prozessierungsprodukte durch Clathrin-umhüllte-Vesikel endocytiert werden (Lai et al., 1995) und entweder über Endosomen und Lysosomen dem Abbau zugeführt werden (Golde et al., 1992; Haass et al., 1992a) oder ein endosomales Recycling durchlaufen (Koo und Squazzo, 1994; Koo et al., 1996; Perez et al., 1999; Yamazaki et al., 1996).

β APP wird in nahezu allen Zelltypen und Geweben exprimiert (Selkoe et al., 1988). Es werden hauptsächlich drei Isoformen des Proteins, die aus 695, 751 oder 770 AS bestehen, unterschieden (Abbildung 4). Die Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen der mRNA (Sandbrink et al., 1994; Selkoe, 1994). Die kürzeste Form, β APP₆₉₅ wird fast ausschließlich in Neuronen exprimiert, während β APP₇₅₁ die häufigste Isoform in nicht neuronalen Zellen ist (Wertkin et al., 1993). Die beiden langen Formen, β APP₇₅₁ und β APP₇₇₀, enthalten ein Insert in der Ektodomäne, das eine Homologie zum Kunitz-Protease-Inhibitor aufweist (Kitaguchi et al., 1988; Ponte et al., 1988; Tanzi et al., 1988). Alle β APP-Isoformen haben eine Cu-, Fe- sowie eine Zn-Bindungsstelle in der Ektodomäne (Bush et al., 1993). Die Zn-Bindung beeinflusst das Aggregationsverhalten des A β -Peptids *in vitro* und *in vivo* (Bush et al., 1994; Lee et al., 2002). Für Zn- und Cu-Chelatbildner wurde *in vivo* eine Reduktion der Amyloid-Aggregation und Plaque-Bildung gezeigt (Cherny et al., 2001).

Die physiologische Funktion von β APP ist nicht abschließend geklärt, auch wenn zahlreiche mögliche Funktionen in verschiedensten physiologischen Prozessen impliziert wurden (Selkoe, 1994; Selkoe, 1999). Für die längeren Isoformen β APP₇₅₁ und β APP₇₇₀ wurde für die lösliche, sezernierte Form (1.3.2), aufgrund der Kunitz-Protease-Inhibitor Domäne, *in vitro* eine Inhibition von Serinproteasen festgestellt. Da Serinproteasen unter anderem eine Rolle bei der Blutgerinnung spielen wurde für β APP₇₅₁ und β APP₇₇₀ eine gerinnungshemmende Funktion angenommen (Mahdi et al., 1995; Schmaier et al., 1993).

Ferner werden Funktionen in der Zelladhäsion, der Zell-Zell Interaktion, der Signaltransduktion und dem Zellwachstum, insbesondere dem Auswachsen von Neuriten, diskutiert (Koo, 2002; Milward et al., 1992; Nishimoto et al., 1993). Es konnte eine Kolokalisierung von β APP mit Integrinen (Yamazaki et al., 1997) und fokalen Komplexen (Storey et al., 1996) gezeigt werden.

β APP konnte mit den cytoplasmatischen Bindungspartnern Fe65 und Mena in Lamellipodien nachgewiesen werden (Sabo et al., 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die cytoplasmatische Domäne von β APP über Fe65 mit einem Proteinnetzwerk interagiert, das durch Transmembran-Signaltransduktion die corticale neuronale Migration reguliert und das Auswachsen von Axonen beeinflussen kann (Bothwell und Giniger, 2000; De Strooper und Annaert, 2000).

β APP „knock-out“ Mäuse, d.h. Mäuse, in denen beide β APP-Allele eliminiert sind, zeigten keinen ausgeprägten Phänotyp und gaben damit keine weiteren Hinweise auf die Funktion (Yankner, 1996; Zheng et al., 1995). Eine mögliche Erklärung lieferten die zwei zu β APP homologen Proteine APLP (amyloid precursor-like protein)-1 und APLP-2 (Sprecher et al., 1993; Wasco et al., 1992; Wasco et al., 1993). β APP/APLP-2 oder APLP-1/APLP-2 doppel-„knock-out“ Mäuse sind pränatal letal, ohne histologische Abnormalitäten in der Hirnentwicklung zu zeigen. β APP/APLP-1 „knock-out“ Mäuse weisen hingegen keinen auffälligen Phänotyp auf, wie auch die APLP-1 oder APLP-2 „knock-out“ Mäuse (Heber et al., 2000; Müller et al., 1998; von Koch et al., 1997). Mäuse, die defizient in allen drei APP-Genen sind, wurden generiert. Wie erwartet sind auch diese Mäuse letal, zeigen aber Abnormalitäten in der Hirnentwicklung und neuronale Migrationsdefekte (Müller und Kins, 2002). Damit scheinen die Proteine der β APP-Familie essentiell und partiell redundant zu sein. Diese Ergebnisse bestätigen die Rolle von β APP und APLP in der Adhäsion und Signaltransduktion, die die neuronale Migration und das Neuritenwachstum reguliert (Koo, 2002).

Darüber hinaus gibt es Anhaltspunkte, dass β APP als Cargo-Rezeptor für Kinesin-1 fungiert und somit am vesikulären Transport beteiligt ist (Kamal et al., 2001; Matsuda et al., 2001). β APP wird in Neuronen über den schnellen anterograden Transportmechanismus zur axonalen Oberfläche transportiert (Buxbaum et al., 1998a; Kaether et al., 2000; Koo et al., 1990; Sisodia et al., 1993) und lokalisiert in Adhäsionssegmenten und synaptischen Kompartimenten, jedoch nicht in synaptischen Vesikeln (Ikin et al., 1996). Der anterograde Transport von β APP benötigt Kinesin-1 und der C-Terminus von β APP bindet an der Kinesin-1 Untereinheit (Kamal et al., 2000).

Die Prozessierungsprodukte (1.3.2) von β APP könnten ebenfalls eine physiologische Rolle spielen. Das A β -Peptid kann während der gesamten Lebensspanne in Körperflüssigkeiten, wie Liquor und Plasma, von Gesunden nachgewiesen werden (Haass et al., 1992b; Seubert et al., 1992; Shoji et al., 1992). A β -Peptid wird von aktiven, gesunden Neuronen sezerniert und eine erhöhte synaptische Aktivität führt zu einem Anstieg der A β -Sekretion (Nitsch et al., 1993). Sekretiertes A β -Peptid hingegen reduziert die synaptische Aktivität (Kamenetz et al., 2003). Dieser vom A β -Peptid ausgelöste negative „feedback-loop“ könnte eine Rolle in der generellen Regulation der neuronalen Aktivität spielen (Esteban, 2004). Ferner wurde gezeigt, dass ein frühes Merkmal der Alzheimer Krankheit der Verlust an Synapsen und synaptischer Aktivität ist (Selkoe, 2002), und dass lösliche A β -Peptid Oligomere die Inhibition der „long-term

potentiation“ (LTP) bewirken (Walsh et al., 2002; Wang et al., 2004). LTP spielt eine kritische Rolle bei bestimmten Lern- und Erinnerungsmechanismen (Morris, 2003), damit könnte auch das A β -Peptid hier eine physiologische Rolle spielen (Esteban, 2004).

Die bei der β APP-Prozessierung (1.3.2) entstehenden C-terminalen Fragmente sind toxisch (McPhie et al., 2001; Sopher et al., 1994). β APP kann C-terminal an Position 664 von Caspasen geschnitten werden, das freier werdende 31 AS lange Peptid leitet möglicherweise den apoptotischen Zelltod ein (Gervais et al., 1999; Lu et al., 2000). Es bleibt jedoch zu zeigen in wie weit diese apoptotischen Mechanismen eine Rolle für die Neurodegeneration in der Alzheimer Krankheit spielen (Koo, 2002).

Parallelen bei der Prozessierung der Notch-Rezeptoren und β APP durch die gleichen Sekretasen (De Strooper et al., 1999) ließen auf eine ähnliche Funktion schließen. Die entwicklungsbiologisch hoch konservierten Notch-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung während der Entwicklung und im adulten Gewebe (Mumm und Kopan, 2000). Nach Ligandenbindung, wird Notch durch α - und γ -Sekretase prozessiert, dabei wird ein C-terminales Fragment frei, die so genannte Notch intrazelluläre Domäne (Notch intracellular domain, NICD). NICD wird in den Zellkern transportiert, interagiert dort mit dem transkriptionsaktivierenden Komplex CSL (C-promotor-binding factor / recombination signal-sequence binding protein JK / suppressor of Hairless / Lag1) und löst die Aktivierung verschiedener Gene aus (Kopan und Goate, 2000; Kopan und Ilagan, 2004). In Analogie zur Notch-Prozessierung entsteht auch aus dem β APP ein intrazelluläres Fragment (β APP intracellular domain, AICD). AICD ist instabil (Edbauer et al., 2002a), kann aber durch Bindung an Fe65 stabilisiert werden, was zu einer Akkumulation im Zellkern und Cytoplasma führt (Kimberly et al., 2001; Minopoli et al., 2001). Binden AICD und Fe65 an einem dritten Protein, dem Transkriptionsfaktor Tip60, entsteht ein Transkription regulierender Komplex (Cao und Südhof, 2001; Kimberly et al., 2001). Der genaue Mechanismus bleibt unklar, ein Kerntransport von AICD scheint für die Transkriptionsaktivität nicht erforderlich zu sein (Cao und Südhof, 2004).

β APP und seine Prozessierungsprodukte sind an verschiedensten physiologischen Prozessen beteiligt, es bleibt zu untersuchen, in wie weit die physiologischen Funktionen von β APP eine Rolle für die Entstehung der Alzheimer Krankheit spielen (Koo, 2002).

1.3.2 Die proteolytische Prozessierung von β APP und die Entstehung des A β -Peptids

β APP kann auf seinem sekretorischen Transportweg durch verschiedene Proteasen, der α -, β - und γ -Sekretase proteolytisch gespalten werden (Abbildung 5) (Haass, 2004).

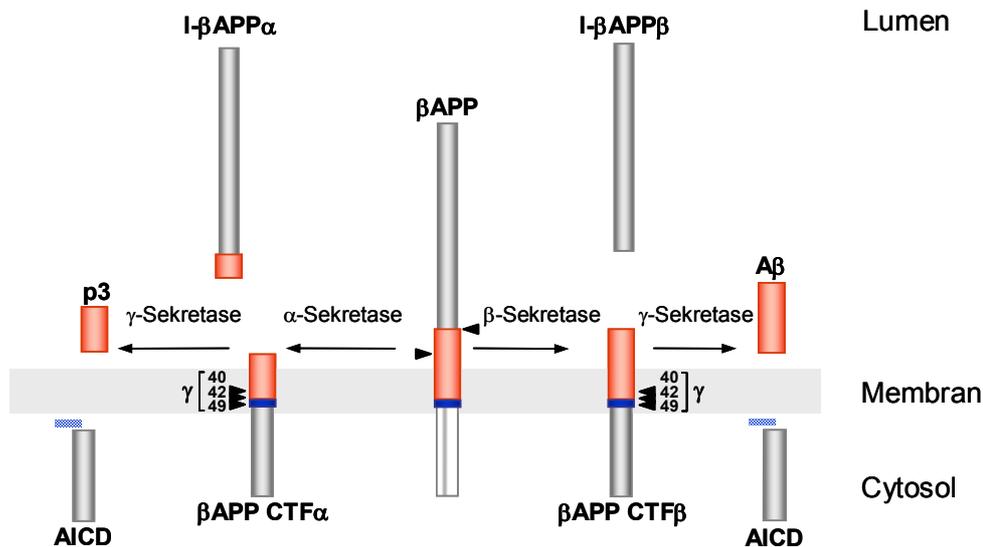


Abbildung 5: Proteolytische Prozessierung von β APP durch α -, β - und γ -Sekretase

Dargestellt ist β APP (grau) mit der A β -Domäne (rote Box) und dem Bereich der γ -Sekretase-Schnittstellen (blaue Box). Die Prozessierung durch α -/ γ -Sekretase bzw. β -/ γ -Sekretase ist dargestellt und die entstehenden Prozessierungsprodukte sind angegeben. Die blau-weiß karierte Box stellt den Teil der β APP-Sequenz dar, der weder am C-Terminus von A β /p3 noch am N-Terminus von AICD nachzuweisen ist. Die zelluläre Membran ist hellgrau dargestellt [Quelle: (Haass und Selkoe, 1993)].

Der größte Anteil von β APP wird zunächst durch die α -Sekretase prozessiert. Hierbei wird die Ektodomäne als lösliches Molekül sezerniert (I- β APP α). Der in der Membran verbleibende, 83 AS lange C-terminale Rest (β APP-CTF α) wird anschließend durch die γ -Sekretase gespalten, wobei eine intrazelluläre Domäne (AICD, β APP-intracellular domain) (Sastre et al., 2001) und ein lösliches 3 kDa großes Peptid (p3) freigesetzt werden (Haass et al., 1993a).

Wird β APP hingegen zuerst durch die β -Sekretase und anschließend durch die γ -Sekretase geschnitten, so entsteht eine kürzere lösliche Ektodomäne als nach dem α -Sekretase-Schnitt (I- β APP β). Aus dem zunächst generierten 99 AS langen C-terminalen Rest (β APP-CTF β) entstehen das A β -Peptid (Haass et al., 1992a; Shoji et al., 1992) und AICD (Abbildung 5) (Haass und Steiner, 2002; Sastre et al., 2001).

Die Prozessierung von β APP durch die α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne verhindert die Entstehung des amyloidogenen A β -Peptids. Die α - und β -Sekretase konkurrieren im sekretorischen Transportweg um dasselbe Substrat β APP (Buxbaum et al., 1998a; Haass et al., 1995a; Skovronsky et al., 2000; Thinakaran et al., 1996a). Damit beeinflussen die Aktivitäten

der Sekretasen, die Affinitäten zum Substrat und die Zugänglichkeiten zum Substrat die Menge des gebildeten A β -Peptids.

Interessanterweise liegen alle bisher bekannten FAD-Mutationen des β APP-Gens in der Nähe der Schnittstellen der α -, β - oder γ -Sekretase (Abbildung 6).

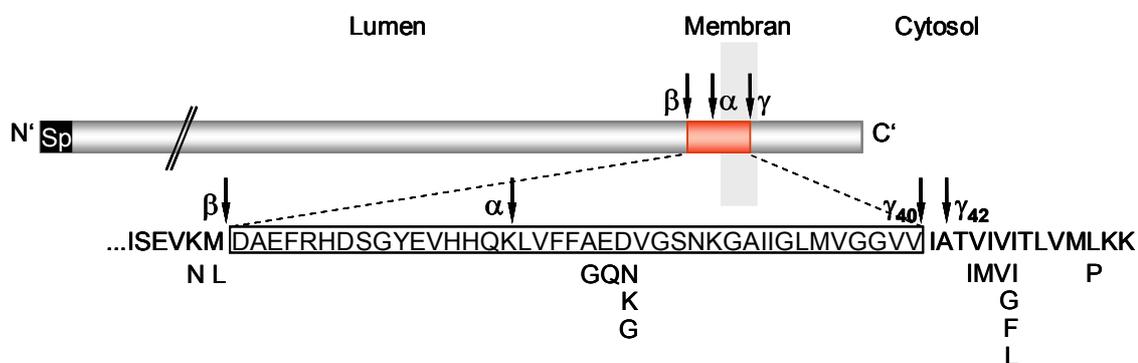


Abbildung 6: Übersicht über die FAD-Mutationen im β APP-Gen

β APP ist schematisch dargestellt. Die A β -Domäne (rot) mit Angabe der AS-Sequenz, inklusiv angrenzender AS, ist zusätzlich vergrößert dargestellt. Die jeweiligen durch die FAD-Mutationen bedingten Aminosäuresubstitutionen sind unterhalb der Sequenz angegeben.

Die angegebenen Mutationen bedingen entweder eine Erhöhung der Gesamtseznierung des A β -Peptids oder erhöhen spezifisch die Produktion des A β_{42} (Selkoe, 1996). Besonders erwähnt sei in diesem Zusammenhang die „schwedische“ Doppelmutation K595N/M596L, die in einer schwedischen Familie mit FAD nachgewiesen wurde (Mullan et al., 1992). Die schwedische Mutation in β APP (β APP^{sw}) erhöht die Affinität der β -Sekretase zu ihrem Substrat und es entsteht vermehrt A β -Peptid (Cai et al., 1993; Citron et al., 1992; Vassar et al., 1999). Mutationen im Bereich der α -Sekretase-Schnittstelle verändern vermutlich die Tertiärstruktur und reduzieren die Prozessierung durch die α -Sekretase (Hendriks et al., 1992; Levy et al., 1990), dadurch kommt es zu einer verstärkten Prozessierung durch β -Sekretase und es entstehen erhöhte Mengen des A β -Peptids (Vassar, 2002).

1.3.2.1 Der α -Sekretase-Schnitt

α -Sekretasen schneiden β APP innerhalb der A β -Domäne zwischen AS-Position 16 und 17 des A β -Peptids und verhindern so die Bildung von A β -Peptid (Esch et al., 1990; Sisodia, 1992). Die Prozessierung von β APP durch die α -Sekretase findet im sekretorischen Transportweg vom trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zur oder an der Plasmamembran statt (Chyung und Selkoe, 2003; Haass et al., 1992a; Sisodia, 1992). α -Sekretasen sind in der Regel konstitutiv aktiv, der α -Sekretase Prozessierungsweg wird aber unter anderem durch Phorbol ester (PDBu, TPA), cholinerge Agonisten und andere Neurotransmitter sowie epidermale und muscarine Wachstumsfaktoren stimuliert (Buxbaum et al., 1992; Nitsch et al., 1992). Die Stimulierung der α -Sekretase erfolgt über Proteinkinase C (PKC), Tyrosinkinasen, mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) und signal-induzierte Kinasen (Mills und Reiner, 1999). Eine verstärkte

α -Sekretase Prozessierung des β APP erfolgt zu Lasten des β -Sekretase Prozessierungswegs und führt deshalb zu einer verminderten A β -Peptid Produktion (Buxbaum et al., 1993; Gandy et al., 1993; Hung et al., 1993; Postina et al., 2004).

α -Sekretasen katalysieren die Spaltung ihrer Substrate offenbar unabhängig von einer AS-Konsensussequenz, sie spalten vielmehr in Distanz von 12-13 AS zur Membran. Eine weitere Voraussetzung für die Spaltung eines Substrates durch α -Sekretasen ist eine α -helikale Konformation des Substrates im Bereich der Spaltstelle (De Strooper et al., 1993; Sisodia, 1992).

Bisher identifizierte Enzyme, die die charakteristischen Eigenschaften einer α -Sekretase aufweisen, sind Vertreter der ADAM (a disintegrin and metalloprotease)-Familie. Es handelt sich hierbei um Typ I Membranproteine mit einer multi-Domänen Struktur, die zumeist N-terminal ein Signalpeptid und ein Propeptid enthalten; die folgende katalytische Domäne enthält ein Zink-Bindungsmotiv, es folgen eine Cystein-reiche-, eine Disintegrin-, eine EGF-ähnliche-Domäne, dann die Transmembrandomäne und eine kurze cytoplasmatische Domäne. Für zwei Enzyme der ADAM-Familie, ADAM10 (Lammich et al., 1999) und ADAM17 (auch TACE - tumor necrosis factor- α (TNF α)-converting enzyme) (Buxbaum et al., 1998b), konnte *in vivo* und *in vitro* eine α -Sekretase Aktivität nachgewiesen werden. Auch für eine weitere Metalloprotease, ADAM9, wurde α -Sekretase Aktivität gezeigt (Koike et al., 1999), allerdings schneidet ADAM9 zwischen AS-Position 14 und 15 des A β -Peptids. In neuronalen Primärkulturen wurden I- β APP-Spezies, deren C-Terminus mit der ADAM9 Schnittstelle übereinstimmt, nachgewiesen (Simons et al., 1996).

TACE (ADAM17) wurde als Protease identifiziert, die TNF α vom membrangebundenen Vorläuferprotein freisetzt (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Die Inhibition oder der „Knock-out“ von TACE bewirken eine verminderte α -Sekretase Prozessierung von β APP, die nicht mehr durch Phorbol ester stimulierbar ist (Buxbaum et al., 1998b). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein spezifischer TACE-Inhibitor die stimulierbare, aber nicht die konstitutive α -Sekretase Aktivität in Neuronen blockiert (Blacker et al., 2002). Kinetische Untersuchungen für TACE ergaben eine deutlich höhere Substrataffinität zu TNF α als zu β APP (Mohan et al., 2002). Obwohl TACE in Neuronen des Hippocampus und Cortex exprimiert wird (Skovronsky et al., 2001), kann während der Mausentwicklung keine Überlappung der β APP- und TACE-Expression nachgewiesen werden (Marcinkiewicz und Seidah, 2000). TACE „knock-out“ Mäuse sterben aufgrund gestörter Signalkaskaden zwischen Tag 17,5 des embryonalen Stadiums und Tag 17 nach der Geburt (Peschon et al., 1998).

ADAM10 wurde zunächst als Myelin degradierendes Enzym detektiert (Chantry et al., 1989), später konnte eine Rolle in der neuronalen Differenzierung, u. a. durch Prozessierung des Notch-Rezeptors, gezeigt werden (Allinson et al., 2003), bis Lammich und Kollegen eine α -Sekretase Aktivität für ADAM10 nachweisen konnten (Lammich et al., 1999). Überexpression von ADAM10 erhöht die basale und die Phorbol ester induzierbare α -Sekretase Aktivität (Lammich et al., 1999; Lopez-Perez et al., 2001), damit unterscheiden sich TACE und ADAM10 in ihrem Einfluss auf die basale Aktivität, aber nicht in ihrer Induzierbarkeit. Im Gegensatz zu

TACE zeigen *in situ* Hybridisationen für ADAM10- und β APP-Koexpression während der Mausentwicklung (Marcinkiewicz und Seidah, 2000). Mäuse, die ADAM10 defizient sind, sterben pränatal aufgrund gestörter Notch-Signaltransduktion (Hartmann et al., 2002). Isolierte Fibroblasten dieser Mäuse zeigen α -Sekretase Prozessierung von β APP, jedoch mit erheblichen, klonalen Unterschieden (Hartmann et al., 2002). Damit ist gezeigt, dass ADAM10 nicht die einzige α -Sekretase ist. Vermutlich verhalten sich die drei ADAM-Proteasen bezüglich der α -Prozessierung von β APP redundant (Allinson et al., 2003). Die Überexpression von ADAM10 in Mäusen führt zu einer erhöhten α -Sekretase Prozessierung von β APP (Postina et al., 2004). Wird diese Maus mit einer β APP transgenen Maus (Alzheimer-Maus) gekreuzt, kommt es kaum noch zur Entstehung von Amyloid-Plaques (Postina et al., 2004).

Aufgrund dieses Zusammenhangs wird die Stimulierung der α -Sekretase Aktivität als möglicher therapeutischer Ansatz für die Behandlung der Alzheimer Krankheit betrachtet (Lichtenthaler und Haass, 2004). Die geringen Substratspezifitäten der α -Sekretasen könnten sich jedoch als problematisch herausstellen (Allinson et al., 2003). So katalysieren ADAM9, ADAM10 und TACE auch die Ektodomänenabspaltung anderer Typ I Transmembranproteine, wie z.B. TNF α , Notch-Rezeptoren, p75 TNF α -Rezeptor, L-Selectin usw. (Seals und Courtneidge, 2003).

1.3.2.2 Der β -Sekretase-Schnitt

Die β -Sekretase BACE (β -site APP cleaving enzyme), auch als Asp-2 oder Memapsin-2 bezeichnet, wurde zeitgleich durch verschiedene Arbeitsgruppen mit Hilfe von Datenbankanalyse, Expressionsklonierung oder durch Enzymaufreinigung und Sequenzierung identifiziert (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). BACE ist ein Typ I Transmembranprotein mit großer Ektodomäne, die ein Signalpeptid (AS 1-21) und ein Propeptid (AS 22-45) enthält, und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne (Abbildung 7) (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Die Ektodomäne enthält zwei charakteristische Aminosäuremotive, DTGS (AS 93-96) und DSGT (AS 289–292), die dem katalytischen Zentrum einer Aspartylprotease entsprechen (Abbildung 7) (Hussain et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Die Mutation eines dieser beiden in der Evolution hoch konservierten Motive verhindert die Proteaseaktivität vollständig (Bennett et al., 2000a; Hussain et al., 1999). BACE ist damit die erste bekannte Aspartylprotease, die dem Pepsin ähnlich ist und über eine Transmembrandomäne verfügt (1.4). Des Weiteren finden sich in der Ektodomäne von BACE vier mögliche N-Glycosylierungsstellen sowie sechs Cysteinreste, die drei intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden können (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999).

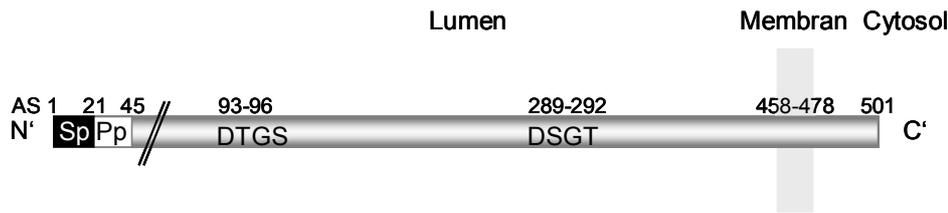


Abbildung 7: Schema der BACE-Protease

Dargestellt ist eine Schemazeichnung der BACE-Protease. Die zelluläre Membran wird durch einen grauen Kasten symbolisiert und die potentielle Lage der BACE-Membrandomäne ist angegeben. Gekennzeichnet sind das Signalpeptid (Sp, schwarz), das potentielle Propeptid (Pp, weiß) und die beiden kritischen Aspartylmotive.

BACE besitzt alle Eigenschaften der β -Sekretase, die bereits vor der Klonierung anhand der Proteolyseprodukte und der Proteolysebedingungen des β APP gut untersucht waren. β -Sekretase Aktivität konnte in allen Zell- und Gewebetypen nachgewiesen werden (Haass et al., 1992b; Seubert et al., 1993; Shoji et al., 1992). Die höchste Aktivität ist jedoch in neuronalen Zellen und Geweben nachweisbar (Haass et al., 1992b; Seubert et al., 1993). BACE ist ubiquitär exprimiert, mit einer besonders hohen Expression im Hirn (Lin et al., 2000; Vassar et al., 1999). β -Sekretase Aktivität konnte in leicht sauren Kompartimenten der Zelle, wie in TGN und Endosomen nachgewiesen werden (Haass et al., 1995b; Haass et al., 1992a; Knops et al., 1995; Koo und Squazzo, 1994; Perez et al., 1999; Thinakaran et al., 1996a). BACE ist genau in diesen Kompartimenten, dem TGN und dem endosomalen System lokalisiert worden (Huse et al., 2000; Hussain et al., 1999; Vassar et al., 1999). Im Gegensatz zur α -Sekretase ist die β -Sekretase durch eine Sequenzspezifität gekennzeichnet (Citron et al., 1995). Die Substitution von Met, an Position P1 der β -Sekretase-Schnittstelle, zu einer AS mit großem hydrophoben Rest, wie z.B. Leu (vgl. schwedischen Mutante) erhöht die Affinität der β -Sekretase zu ihrem Substrat dem β APP. Umgekehrt bedingt die Einführung kleiner hydrophober Reste, wie z.B. Val, eine Verringerung der Affinität bzw. eine Inhibition der Spaltung (Citron et al., 1995). Aufgrund des AS-Austauschs an den Positionen P1 und P2 der Schnittstelle (KM \rightarrow NL) schneidet aufgereinigtes BACE synthetisches Peptidsubstrat mit der β APP_{sw}-Sequenz mit einer deutlich höheren Affinität als Substrat mit der β APP_{wt}-Sequenz. (Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Neben der A β -Spezies beginnend mit Asp1 wird auch die Entstehung einer weiteren dominanten A β -Spezies, beginnend mit Glu11 (Gouras et al., 1998; Haass et al., 1992a), durch BACE katalysiert (Vassar et al., 1999).

BACE „knock-out“ Mäuse, zeigen in Gegenwart von humanem β APP keine nachweisbare Synthese von A β in Neuronen (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001). Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass BACE wahrscheinlich die einzige β -Sekretase in Neuronen ist (Vassar, 2002). Die Relevanz von BACE für die Alzheimer Krankheit wird dadurch bestätigt, dass bei „late-onset“ Patienten die BACE Aktivität im Hirn signifikant erhöht ist (Fukumoto et al., 2002; Holsinger et al., 2002; Yang et al., 2003). Über die physiologische Funktion von BACE ist wenig bekannt, die BACE „knock-out“ Maus zeigt keinen offensichtlichen Phänotyp (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001). Bisher sind vier weitere Substrate, die Sialyl-Transferase ST6Gal1 (Kitazume et al., 2001) und der P-Selectin

Glycoprotein Ligand-1 (Lichtenthaler et al., 2003) und die APP homologen APLP-1 und APLP-2 (Li und Sudhof, 2004; Pastorino et al., 2004) bekannt.

Neben BACE ist eine zweite membrangebundene Aspartylprotease, BACE2, identifiziert worden (Lin et al., 2000; Saunders et al., 1999; Solans et al., 2000; Yan et al., 1999; Yang et al., 1998). Die AS-Sequenzen von BACE und BACE2 sind zu 64 % homolog und die beschriebenen strukturellen Eigenschaften sind identisch (Vassar, 2002). BACE2 wird im Gegensatz zu BACE verstärkt in peripherem Gewebe exprimiert und kaum in neuronalem Gewebe (Bennett et al., 2000b; Vassar et al., 1999). BACE2 zeigt keine β -Sekretase Aktivität, sondern prozessiert β APP an alternativen Schnittstellen (Farzan et al., 2000; Fluhrer et al., 2002; Yan et al., 2001a).

Die beiden Homologe BACE und BACE2 definieren aufgrund ihrer Membranverankerung und der geringen Homologie zu anderen Aspartylproteasen der Pepsin-Familie eine völlig neue Klasse von Aspartylproteasen (1.4), die nicht durch bekannte Inhibitoren der Aspartylproteasen gehemmt wird (Citron et al., 1996).

1.3.2.3 Der γ -Sekretase-Schnitt

Die γ -Sekretase prozessiert die proteolytische Spaltung der durch die α - und β -Sekretase entstehenden β APP-CTF (1.3.2). Damit ist der γ -Sekretase-Schnitt der zweite notwendige Schnitt für die Entstehung von A β -Peptid. γ -Sekretase kann an verschiedenen Positionen schneiden, so dass A β -Peptide unterschiedlicher Länge gebildet werden. Die häufigste Spezies endet mit der 40igsten AS von A β (A β ₄₀), die um 2 AS verlängerten A β ₄₂-Spezies entsteht nur zu 5-10 %. Trotz der niedrigen Produktion scheint A β ₄₂ die pathogene, amyloidogene Spezies zu sein, es ist die Hauptkomponente der Amyloid-Plaques und die in genetisch bedingten, „early-onset“ FAD-Fällen erhöht produzierte Spezies (1.1 / 1.3) (Selkoe, 1999). Auffällig ist, dass die Spaltung von β APP durch die γ -Sekretase, nicht wie für Proteasen üblich, in wässriger Umgebung erfolgt, sondern innerhalb der Transmembrandomäne des Substrats (Wolfe et al., 1999a). Die Einführung von Mutationen hat gezeigt, dass der γ -Sekretase-Schnitt nicht sequenzspezifisch ist, sondern eine Vielzahl von Typ I Transmembranproteinen mit kurzer Ektodomäne von der γ -Sekretase prozessiert werden können (Struhl und Adachi, 2000). Für die Position des γ -Sekretase-Schnitts sind dabei offenbar Länge und Struktur der Transmembrandomäne entscheidender als die genaue Aminosäuresequenz (Esler und Wolfe, 2001; Lichtenthaler et al., 2002). So konnten, wie erwartet, weitere Substrate der γ -Sekretase identifiziert werden. Hierzu gehören die β APP homologen APLP (Walsh et al., 2003), die Notch-Rezeptoren 1-4 (De Strooper et al., 1999; Saxena et al., 2001) und die Notch-Liganden Delta und Jagged (LaVoie und Selkoe, 2003; Six et al., 2003), die Rezeptor-Tyrosin-Kinase ErbB-4 (Lee et al., 2002; Ni et al., 2001), E- und N-Cadherin (Marambaud et al., 2002; Marambaud et al., 2003), der LDL-Rezeptor (May et al., 2002), CD44 (Lammich et al., 2002; Okamoto et al., 2002) und Nectin1 α (Kim et al., 2002; Kopan und Ilagan, 2004).

Durch die γ -Sekretase Spaltung der β APP-CTF entsteht, neben der A β - bzw. p3-Spezies, auch ein lösliches cytosolisches Fragment des β APP, das AICD (1.3.2 und Abbildung 5).

Interessanterweise korrespondiert der N-Terminus des AICD nicht mit dem C-Terminus des p3-/A β -Peptids, sondern beginnt ca. 10 AS C-terminaler in der β APP-Sequenz, womit ein weiterer γ -Sekretase-Schnitt im C-terminalen Bereich der β APP-Transmembrandomäne vorliegen muss (Sastre et al., 2001; Weidemann et al., 2002; Yu et al., 2001), der die Freisetzung des AICD bewirkt. Dieses Phänomen des doppelten γ -Sekretase-Schnitts konnte auch für andere Substrate gezeigt werden (Okochi et al., 2002). Ferner wurde für einige Substrate der γ -Sekretase, wie für Notch (Selkoe und Kopan, 2003) und N-Cadherin (Marambaud et al., 2003), nachgewiesen, dass die freigesetzte intrazelluläre Domäne eine Funktion in der nuklearen Signaltransduktion hat und die Transkription von Zielgenen reguliert (Haass, 2004; Kopan und Ilagan, 2004). Der Notch-Signaltransduktionsweg ist im Laufe der Evolution hoch konserviert geblieben und spielt unter anderem in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung (Mumm und Kopan, 2000). Aber auch im erwachsenen Menschen erfüllt die Notch-Signaltransduktion noch wichtige Funktionen, z.B. bei der Differenzierung der T-Lymphozyten (Hadland et al., 2001).

Bei der katalytisch aktiven γ -Sekretase handelt es sich nicht um ein einziges Protein, sondern um einen hochmolekularen Proteinkomplex, bestehend aus einer katalytischen Untereinheit und drei weiteren Kofaktoren, Nicastrin (Edbauer et al., 2002b; Kopan und Goate, 2002; Lai, 2002; Yu et al., 2000), PEN-2 (presenilin enhancer protein 2) (Francis et al., 2002; Luo et al., 2003; Steiner et al., 2002) und APH-1 (anterior pharynx defective 1) (Francis et al., 2002; Goutte et al., 2002a; Lee et al., 2002; Luo et al., 2003).

Die katalytische Untereinheit der γ -Sekretase ist das Presenilin 1 (PS1) oder das Presenilin 2 (PS2). PS1 und PS2 wurden aufgrund von genetischen Untersuchungen mit der Alzheimer Krankheit in Verbindung gebracht, da zahlreiche FAD-Mutationen auf dem PS1 Gen (Abbildung 8) und zu einem geringeren Anteil auf dem PS2 Gen lokalisiert wurden (1.1) (Levy-Lahad et al., 1995a; Levy-Lahad et al., 1995b; RogaeV et al., 1995; Sherrington et al., 1995). Alle untersuchten FAD-Mutationen innerhalb der PS-Gene erhöhen die Bildung des A β ₄₂-Peptids (1.3) (Haass und Steiner, 2002; Hardy, 1997b).

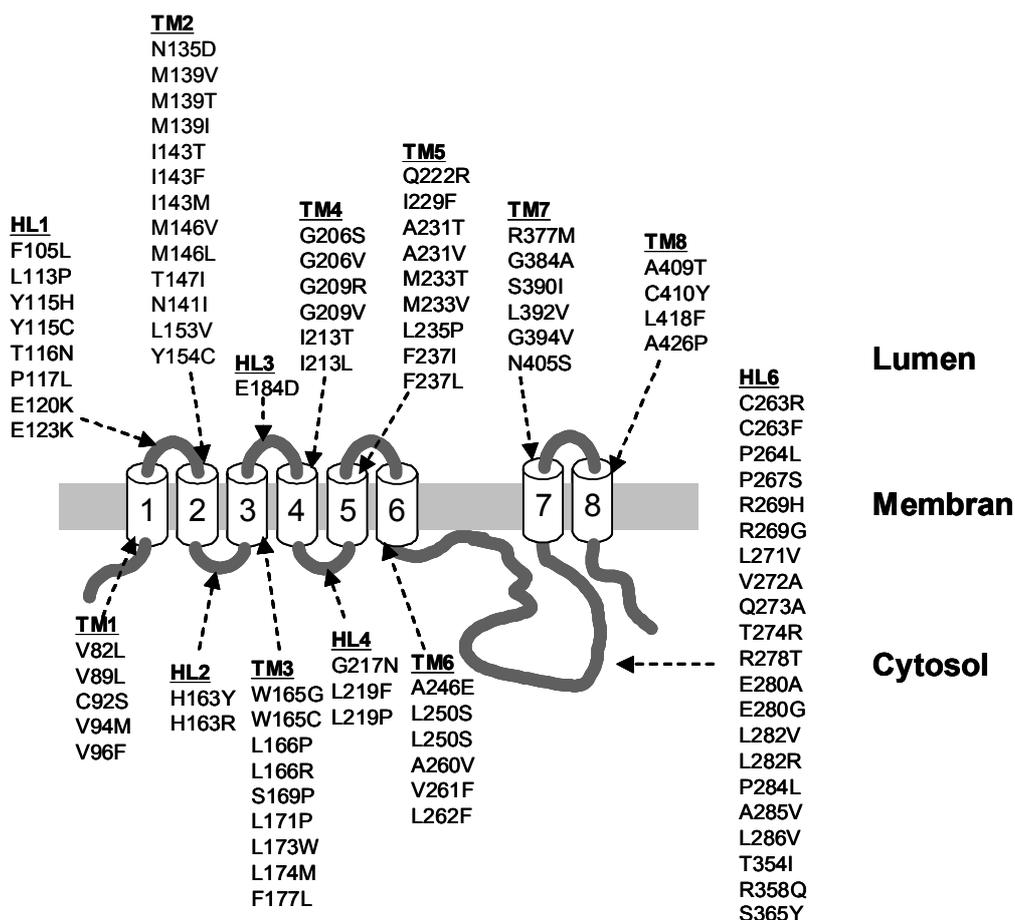


Abbildung 8: Struktur von PS1 und Lokalisation der FAD-Mutationen

Die Abbildung veranschaulicht die Struktur der PS. Gezeigt ist das gängigste Topologiemodell, mit 8 Transmembrandomänen. Die Pfeile kennzeichnen Bereiche gehäufeter FAD-Mutationen. Einige der FAD-assoziierten Mutationen sind angegeben. TM: Transmembrandomäne; HL: Hydrophiler Loop. [Quelle: <http://molgen-www.uia.ac.be/ADMutations>]

PS1 und PS2 sind homologe, polytope Transmembranproteine (Levy-Lahad et al., 1995b; Sherrington et al., 1995). Die meisten Strukturmodelle favorisieren ein acht Transmembrandomänen Modell mit cytoplasmatischer Orientierung von N- und C-Terminus (De Strooper et al., 1997; Doan et al., 1996; Haass, 2004; Li und Greenwald, 1998). Zwischen Transmembrandomäne 6 und 7 ist ein relativ großer, cytoplasmatisch orientierter AS-Loop, innerhalb dieses Loops wird das Holoprotein endoproteolytisch gespalten. Die daraus resultierenden N- und C-terminalen Fragmente assoziieren zu einem Heterodimer und stellen die in der Zelle stabilisierte Form der PS dar (Capell et al., 1998; Ratovitski et al., 1997; Thinakaran et al., 1996b; Thinakaran et al., 1997). Die PS-Heterodimere konnten in hochmolekularen Komplexen nachgewiesen werden (Capell et al., 1998; Yu et al., 1998). Die Integration von PS in einem Proteinkomplex erklärt, dass eine Überexpression von PS alleine nicht zu einer Erhöhung der Heterodimere, sondern nur zur Akkumulation des instabilen Holo Proteins führt, und gleichzeitig zu einer Verdrängung des endogenen PS, einem Phänomen, das als „Replacement“ bezeichnet wird. Es konnte auch kein Anstieg an

γ -Sekretase Aktivität durch Überexpression von PS beobachtet werden. (Capell et al., 1998; Thinakaran et al., 1997). Erst die Überexpression aller Komplexkomponenten führt zur gesteigerten Formierung aktiver γ -Sekretase Komplexe (Kimberly et al., 2003; Takasugi et al., 2003).

Es gab zahlreiche Hinweise auf die Beteiligung von PS an der γ -Sekretase Aktivität. Neuronen von PS1 „knock-out“ Mäusen zeigten eine stark reduzierte A β -Produktion und eine Akkumulation von β APP-CTF (De Strooper et al., 1998; Naruse et al., 1998). In Zellen von PS1 und PS2 defizienten Mäusen war keine A β -Produktion nachweisbar (Herreman et al., 2000; Zhang et al., 2000). Ferner führte die Mutagenese einer der beiden hoch konservierten Aspartylreste in Transmembrandomäne 6 und 7 zu einer stark reduzierten A β -Bildung und der Akkumulation der β APP-CTF (Kimberly et al., 2000; Steiner et al., 1999a; Wolfe et al., 1999b). Auffällig war, dass auch die Endoproteolyse von PS blockiert war und es zur Akkumulation des Holoпротеins kam (1.4) (Kimberly et al., Wolfe et al., 1999b). Darüber hinaus zeigten Immunopräzipitate von PS, unter Komplex erhaltenden Bedingungen, γ -Sekretase Aktivität (Li et al., 2000a; Xia et al., 2000) und es konnten spezifische Inhibitoren, gerichtet gegen das aktive Zentrum der γ -Sekretase, an PS-Heterodimere binden (Esler et al., 2000; Li et al., 2000b; Shearman et al., 2000).

Der Aspartylrest in Transmembrandomäne 7 von PS1/2 liegt innerhalb eines im Laufe der Evolution hoch konservierten Motivs, dem GXGD-Motiv (Haass und Steiner, 2002), das für eine klassische Aspartylprotease zwar untypisch ist, aber in anderen polytopen Aspartylproteasen, wie z.B. den Typ 4 Prepilin-Peptidasen (TFPPs) in Prokaryonten (LaPointe und Taylor, 2000), oder den Signalpeptid Peptidasen (SPPs) und den signalpeptid-ähnlichen Peptidasen (SPPL, signal peptide peptidases like) in höheren Lebewesen (Ponting et al., 2002; Weihofen et al., 2002), hoch konserviert ist. Damit wurde, wie bei der β -Sekretase (1.3.2.2) auch mit der γ -Sekretase eine besondere Form von Aspartylproteasen identifiziert. Zeitgleich zu dieser Aspartylprotease-Familie wurden andere Proteasefamilien, die Metalloprotease S2P- und die Rhomboid-Familie, identifiziert, die ebenfalls zur regulierten Intermembran-Proteolyse (RIP) in der Lage sind (Kopan und Ilagan, 2004; Weihofen und Martoglio, 2003). Die RIP kann durch Freisetzung cytoplasmatischer Fragmente eine generelle Rolle in der Signal Transduktion spielen oder einfach dem Abbau von Transmembrandomänen dienen (Ebinu und Yankner, 2002; Weihofen und Martoglio, 2003; Xia und Wolfe, 2003).

Für γ -Sekretase Aktivität sind neben dem PS als katalytische Untereinheit drei weitere Komponenten notwendig (Francis et al., 2002) und ausreichend (Edbauer et al., 2003; Fraering et al., 2004; Hayashi et al., 2004; Kimberly et al., 2003; Periz und Fortini, 2004). Eine weitere γ -Sekretase Komponente, Nicastrin, wurde durch biochemische Aufreinigung des Komplexes identifiziert. Nicastrin ist ein glycosyliertes Typ I Transmembranprotein (Yu et al., 2000). Die zwei Komponenten APH-1 und PEN-2 wurden in genetischen Analysen gefunden, bei diesen beiden Proteinen handelt es sich um polytopische Transmembranproteine (De Strooper, 2003;

Francis et al., 2002; Goutte, 2002b). Die einzelnen Komplexkomponenten beeinflussen sich gegenseitig in ihrer zellulären Expression, überexprimierte Einzelkomponenten sind nicht stabil (PEN-2, PS) oder maturieren nicht, wie im Falle von Nicastrin (De Strooper, 2003). Die Komplexbildung und die Funktionen der einzelnen Komponenten sind noch weitgehend ungeklärt. Es konnte ein Präkomplex, bestehend aus AHP-1 und Nicastrin gezeigt werden, die vermutlich über die Nicastrin Transmembrandomäne interagieren (Capell et al., 2003; LaVoie et al., 2003; Morais et al., 2003). PEN-2 spielt möglicherweise eine Rolle für die Endoproteolyse von PS, da die Abwesenheit von PEN-2 das PS-Holoprotein stabilisiert (Hu und Fortini, 2003; Laemmli, 1970; Luo et al., 2003; Prokop et al., 2004; Takasugi et al., 2003). Wahrscheinlich sind mit den vier beschriebenen Komponenten alle Bestandteile des γ -Sekretase Komplexes identifiziert, und die PS bilden das proteolytische Zentrum der γ -Sekretase (Haass, 2004).

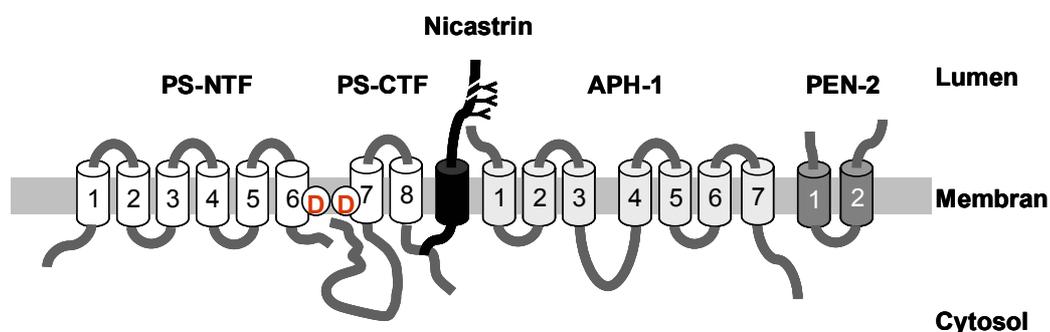


Abbildung 9: Schematische Darstellung des γ -Sekretase Komplexes

Gezeigt sind die Modellzeichnungen der einzelnen Proteine des γ -Sekretase Komplexes und ihre Orientierung in der zellulären Membran (grauer Kasten). Die Position der Aspartate im vermuteten katalytischen Zentrum der γ -Sekretase sind angegeben (D). [Quelle: (Haass und Steiner, 2002)].

1.4 Aspartylproteasen

Aspartylproteasen spielen im Rahmen der Alzheimer Krankheit für die A β -Peptid Entstehung eine entscheidende Rolle. Deshalb werden im Folgenden die wichtigsten Charakteristika dieser Proteaseklasse beschrieben. Die Aspartylproteasen sind eine weit verbreitete Proteaseklasse, die in einer Vielzahl von Organismen, wie Säugetieren, Fischen, Retroviren, Pflanzen, Pilzen und Protozoen vorkommt. Wird die Sequenzabfolge -DT/(S)G- als Bedingung für Aspartylproteasen definiert, so unterscheidet man 8 Aspartylprotease-Familien, von denen die pepsin-ähnlichen mit 282 Mitgliedern und die retroviralen Proteasen mit 93 Mitgliedern die größten Familien darstellen (Dunn, 2002).

Zur Gruppe der retroviralen Proteasen gehören die HIV-Proteasen. Die virale Protease HIV-1 ist für die Replikation des menschlichen Immunschwächevirus (HIV, human immunodeficiency virus) verantwortlich. Die HIV-1 Protease ist mit 11 kDa im Vergleich zu eukaryotischen Proteasen sehr klein und wird autokatalytisch aus einem Vorläuferprotein freigesetzt, das zusätzlich zur Protease weitere virale Proteine enthält. Strukturell ist auch die HIV-1 Protease,

besonders in der Umgebung des aktiven Zentrums, dem Pepsin sehr ähnlich (Lapatto et al., 1989; Mager, 2001; Seelmeier et al., 1988). Eine detaillierte Klassifizierung der Aspartylprotease ist auf der „homepage“ www.Merops.co.uk zu finden.

BACE und BACE2 gehören zu den pepsin-ähnlichen Proteasen, der am besten charakterisierten Familie (Abbildung 10) (Hong et al., 2000). Alle Vertreter dieser Familie, wie auch BACE, besitzen im katalytisch aktiven Zentrum zwei hoch konservierte Aspartylmotive der Sequenz -DT/SG- und schneiden vorzugsweise zwischen hydrophoben AS. BACE und BACE2 unterscheiden sich durch ihre Membranverankerung von den anderen pepsin-ähnlichen Proteasen. Auch das Disulfidbrückenmuster von BACE und BACE2 ist untypisch für pepsin-ähnliche Proteasen. Normalerweise werden in pepsin-ähnlichen Proteasen Disulfidbrücken zwischen benachbarten Cysteinen ausgebildet, bei BACE liegen bis zu 200 AS zwischen den Disulfidbrücken ausbildenden Cysteinen (C216-C420, C278-C443, C330-C380).

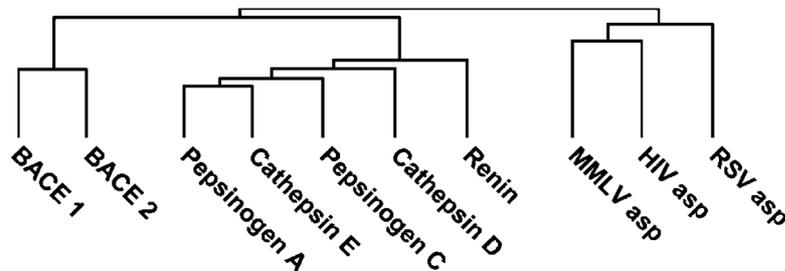


Abbildung 10: Evolutionäre Verwandtschaft von BACE zu anderen Aspartylproteasen

BACE und BACE2 bilden eine neue Familie membrangebundener Aspartylproteasen, mit größter Homologie zu der Pepsin Familie und entfernter Verwandtschaft zu den retroviralen Aspartylproteasen [Quelle: (Citron, 2004a)]

Proteasen, auch pepsin-ähnliche Aspartylproteasen werden in der Regel in Form einer proteolytisch inaktiven Vorstufe, dem sog. Zymogen oder Proenzym, synthetisiert. Die Aktivierung des Enzyms erfolgt meist durch Abspaltung eines Propeptids am N-Terminus des Enzyms. Diese erfolgt entweder durch intra- oder intermolekulare Autokatalyse oder aber mittels proteolytischer Spaltung durch andere Proteasen.

Pepsinogen, die inaktive Vorstufe des Pepsins, wird beispielsweise bei niedrigem pH-Wert durch intramolekulare Abspaltung des Propeptids aktiviert. Das Propeptid selbst, dessen Sekundärstruktur aus einem β -Faltblatt und drei α -Helizes besteht, interagiert im Falle des Pepsinogens direkt mit dem katalytisch aktiven Zentrum und verhindert somit die Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes (Koelsch et al., 1994; Sielecki et al., 1990).

Neben der Regulation der Enzymaktivität erfüllen Propeptide häufig wichtige Funktionen im Zusammenhang mit der korrekten Faltung des Proteins und mit dem Transport in entsprechende Zielkompartimente (Baxter et al., 1991; Harrison et al., 1989; Norman et al., 1992). Für BACE wurde die mögliche Existenz eines kurzen Propeptids postuliert (Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999).

Die räumliche Struktur der pepsin-ähnlichen Proteasen besteht aus einer wechselnden Abfolge von α -Helizes und β -Faltblattstrukturen, die innerhalb der Familien unterschiedlich stark konserviert ist und die endgültige Gesamtstruktur des Proteins bestimmt. N- und C-terminale Domäne verhalten sich dabei meist spiegelbildlich (Dunn, 2002).

In unmittelbarer Nachbarschaft zum aktiven Zentrum befindet sich die Deckelregion („flap-region“), eine nahezu ausschließlich aus β -Faltblattstrukturen bestehenden Domäne, die meist von Glycinresten umrahmt wird und somit beweglich ist. Die „flap-region“ schließt nach Substratbindung und öffnet sich nach erfolgter Katalyse. Das Substrat selbst interagiert dabei häufig über Wasserstoffbrückenbindungen mit der Deckelregion. Wird die Bewegungsfreiheit der „flap-region“ durch bindende Komponenten eingeengt, kommt es in der Regel zur Inhibition der Enzymaktivität (Andreeva et al., 1995; Okoniewska et al., 1999; Okoniewska et al., 2000).

Für die katalytische Aktivität der Aspartylproteasen muss eine der beiden Carboxylgruppen in undissoziierter Form und die andere in ionisierter Form vorliegen. Nachfolgend ist der für die Katalyse postulierte Mechanismus beschrieben.

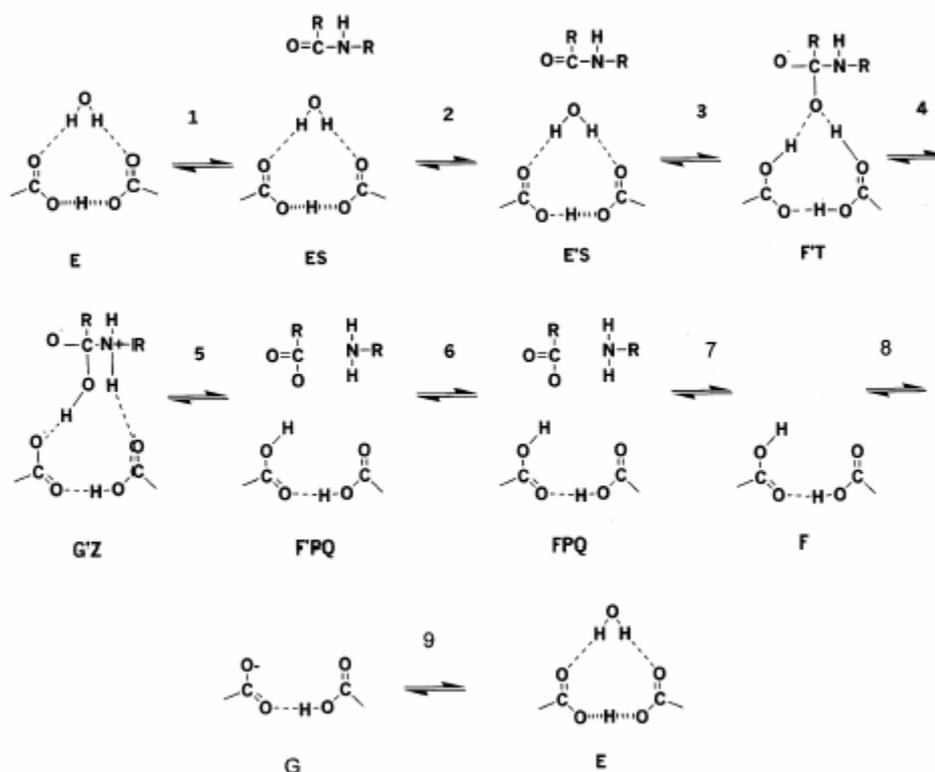


Abbildung 11: Mechanismus der Peptidspaltung durch Aspartylproteasen

Zunächst bindet das freie Enzym an sein Substrat (1). Es entsteht ein Enzym-Substrat-Komplex (ES). (2) Durch Schließen der Deckelregion wird der ES-Komplex neu arrangiert (E'S). (3) Die Katalyse beginnt mit der Entfernung eines Protons vom gebundenen H₂O und der Stimulierung des Carbonylrestes (F'T). (4) Es folgt ein Proton-Transfer zum Stickstoff der Peptidbindung (G'Z). (5) Die Peptidbindung wird getrennt, (6) die Deckelregion öffnet sich (FPQ) und (7) die Produkte werden freigesetzt (F). (8) Ein Proton wird abgegeben (G) und (9) eine neue Wasserstoffbrückenbindung zum H₂O ausgebildet (E). [Quelle: (Dunn, 2002)]

Die beiden Aspartylreste im aktiven Zentrum der Protease aktivieren einerseits das für die Spaltung der Peptidbindung nötige Wassermolekül und agieren zum anderen als Protonenakzeptoren und -donatoren. Auf diese Weise wird die für den Ablauf der chemischen Reaktion benötigte Aktivierungsenergie herabgesetzt und der energiereiche Übergangszustand stabilisiert.

Fast alle Aspartylproteasen werden durch Pepstatin, ein Peptidgemisch aus verschiedenen Streptomyceten, sehr effizient gehemmt. Pepstatin fungiert dabei aufgrund einer tetraedrischen Hydroxymethylengruppe als Übergangszustandsanalogon (Bott et al., 1982; James et al., 1982; Rich et al., 1985). Darüber hinaus sind zahlreiche weitere Protein- und Peptidinhibitoren bekannt, die bestimmte Aspartylproteasen teilweise hochspezifisch inhibieren. Die Inhibition erfolgt in diesem Fall beispielsweise durch die Ausbildung charakteristischer Sekundärstrukturen, die das aktive Zentrum räumlich blockieren (Fraser et al., 1992; Li et al., 2000; Phylip et al., 2001), oder durch zum substratähnliche Peptide, die an das katalytische Zentrum binden, aber durch Einführung von Statinen nicht gespalten werden können (Bursavich et al., 2001). Durch Wechselwirkung des Inhibitors mit Domänen, die dem aktiven Zentrum benachbart sind, die aber innerhalb der Familien weniger gut konserviert sind, wird die Spezifität weiter erhöht (Ng et al., 2000). So wird die Kreuzreaktivität mit anderen homologen Proteasen reduziert.

Neben BACE handelt sich auch bei PS, der anderen an der A β -Peptid Freisetzung beteiligten Protease im weiteren Sinne um eine Aspartylprotease. PS besitzen nicht die typische Sequenz -DT/(S)G- und auch nicht die charakteristische Struktur von Aspartylproteasen. Trotzdem bilden vermutlich zwei Aspartylreste in hoch konservierten Membranstrukturen, von denen ein Aspartylrest in das Sequenzmotiv -GXGD- eingebettet ist, das katalytische Zentrum; X steht hierbei für eine beliebige, vorzugsweise hydrophobe Aminosäure, (1.3.2.3) (Steiner et al., 2000; Wolfe et al., 1999b).

Damit wird eine völlig neuartige Gruppe polytopischer transmembrangebundener Aspartylproteasen durch Presenilin und presenilin-ähnliche Enzyme definiert. Die beiden kritischen Aspartylreste befinden sich innerhalb oder am Rande zweier unabhängiger Transmembrandomänen und katalysieren die Spaltung membrangebundener Proteine innerhalb ihrer Transmembrandomäne (1.3.2.3) (Weihofen und Martoglio, 2003). Die beiden wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind die Preseniline (Haass und Steiner, 2002) und die Signalpeptid Peptidasen (Weihofen et al., 2002).

1.5 Die Rolle des intrazellulären Transports in der Alzheimer Krankheit

In der Alzheimer Krankheit kommt es ausschließlich in dem an polarisierten Zellen angrenzenden extrazellulären Raum zur Bildung von Amyloid-Plaques. A β -Peptid Ablagerungen entstehen an Neuriten und zerebralen Blutgefäßen, damit an polarisierten Neuronen oder Endothelzellen. Dies und die Tatsache, dass β APP polarisiert transportiert wird (De Strooper et al., 1995a; Haass et al., 1995c; Haass et al., 1994a; Lo et al., 1994; Tienari et al., 1996; Yamazaki et al., 1996; Yamazaki et al., 1995), könnte ein Hinweis darauf sein, dass polarisierte Transportmechanismen eine Rolle in der Produktion und Ablagerung von A β -Peptid spielen.

1.5.1 Polarisierte Transport in MDCK Zellen

Ein Modellsystem zur Untersuchung von polarisierten Transportmechanismen sind die Madin-Darby canine Nierenzellen (MDCK). MDCK Zellen sind Epithelzellen, die ein vollständig polarisiertes Epithel ausbilden, wenn sie in Filterkammern wachsen und dadurch apikal und basal Zugang zu Nährmedium haben. Polarisierung bedeutet für die MDCK Zelle, dass sich die apikale Membran von der basolateralen Membran in ihrer Funktion und Zusammensetzung unterscheidet. Membranproteine, sekretorische Proteine und Lipide werden gerichtet zur jeweiligen Membran transportiert und die verschiedenen Membransysteme sind voneinander getrennt. In MDCK Zellen trennen „tight junctions“ die apikale, zum Lumen gerichtete Oberfläche von der basolateralen, zu anderen Zellen und zur extrazellulären Matrix Kontakt herstellenden Membran (Abbildung 12).

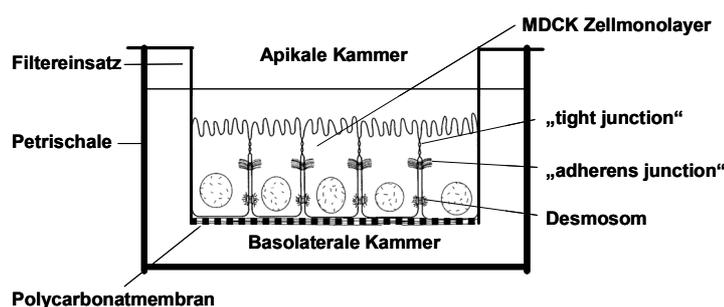


Abbildung 12: MDCK Zellmonolayer in einer Transwell-Filterkammer

Die polarisierte Verteilung von apikalen und basolateralen Komponenten ist das Ergebnis von drei verschiedenen Mechanismen. Erstens, neu synthetisierte Proteine werden in das raue ER transloziert und über den Golgi-Apparat zum TGN transportiert. Im TGN werden sie durch spezifische Transportvesikel zur apikalen oder basolateralen Membran transportiert (Jacob und Naim, 2001; Kreitzer et al., 2003) Zweitens, Proteine werden spezifisch an einer Membran zurückgehalten und stabilisiert, dadurch bildet sich eine differenzielle Verteilung aus (Harris und

Lim, 2001). Drittens, Proteine, die die Plasmamembran erreichen, werden direkt wieder aufgenommen, zu frühen Endosomen transportiert, von dort können sie zurück zur Oberfläche, zu späten Endosomen oder zur anderen, „gegenüber liegenden“ Oberfläche transportiert werden. Dieser Vorgang wird Transcytose genannt und spielt eine erhebliche Rolle für die polarisierte Verteilung von Proteinen. So können MDCK Zellen 50 % ihrer Zelloberfläche in einer Stunde endocytieren (Mostov et al., 2003).

Für den spezifischen polarisierten Transport von Proteinen sind Erkennungsmerkmale erforderlich. Basolateral sortierte Proteine haben meist als Signal ein kurzes Sequenzmotiv in ihrer cytoplasmatischen Domäne. Die Deletion dieses Motivs führt zu einer apikalen Fehlsortierung oder zur gleichmäßigen apikalen und basolateralen Sortierung. Die Adaptor-Proteine AP-1B und AP-4 binden an basolaterale Signale und regulieren den basolateralen Transport (Gan et al., 2002; Simmen et al., 2002).

Die apikalen Transportmechanismen sind weniger gut verstanden. Apikaler Transport kann durch Membransegmente bestimmter Lipidzusammensetzung, den „lipid rafts“, katalysiert werden (Fullekrug und Simons, 2004; Schuck und Simons, 2004; Verkade et al., 2000). „Lipid rafts“ entstehen im Golgi-Apparat und Vesikel, die einen hohen Anteil an „lipid rafts“ enthalten, werden apikal transportiert. Proteine, die aufgrund ihrer Transmembrandomäne oder eines Glycosylphosphatidylinositol-Lipidankers „raft“-assoziiert sind, werden überwiegend apikal transportiert. Es gibt jedoch auch „raft“-unabhängigen, apikalen Transport, der durch apikale Sortierungssignale reguliert wird. Die Glycosylierung ist häufig als apikales Signal beschrieben (Benting et al., 1999; Potter et al., 2004), aber auch in cytoplasmatischen und luminalen Domänen sind Signale für den apikalen Transport detektiert worden (Nelson und Yeaman, 2001).

Die Maschinerie für den polarisierten Transport ist von der Hefe bis zum Menschen konserviert (Mostov et al., 2003).

1.5.2 Polarisierter Transport von β APP in MDCK Zellen

In MDCK Zellen wurde bereits der polarisierte Transport von β APP untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das β APP-Holoprotein basolateral transportiert wird (De Strooper et al., 1995a; Haass et al., 1994a; Lo et al., 1994). Das Sortierungssignal mit Tyr653 in der cytoplasmatischen Domäne von β APP wurde identifiziert (Haass et al., 1995c). Auch die Prozessierungsprodukte von β APP, I- β APP, p3- und A β -Peptid werden basolateral sezerniert (Abbildung 13) (Haass et al., 1995c; Haass et al., 1994a). Die Deletion des basolateralen Sortierungssignals (β APP Δ C) führt zu einer gleichmäßig apikalen und basolateralen Oberflächenverteilung des β APP-Holoproteins und zu einem Anstieg der apikalen Sezernierung des A β -Peptids. Die durch die α -Sekretase geschnittene, lösliche Form I- β APP α , wird jedoch weiterhin ausschließlich basolateral sezerniert (Abbildung 13) (Haass et al., 1994a). Dieses Paradox, dass das Vorläuferprotein β APP Δ C nicht polarisiert transportiert wird, die Prozessierungsprodukte jedoch weiterhin polarisiert sezerniert werden, hat seinerzeit zu der

Annahme geführt, dass in der I- β APP-Domäne ein weiteres basolaterales Sortierungssignal lokalisiert ist (De Strooper et al., 1995a; Haass et al., 1994a; Lo et al., 1994). Wird β APPsw, eine FAD-Mutante, die die Prozessierung von β APP durch BACE erhöht (1.3.2), in MDCK Zellen exprimiert, kann eine apikale Sezernierung von I- β APP β festgestellt werden. Der überwiegende Anteil von I- β APP und das A β -Peptid werden jedoch weiterhin basolateral sezerniert (De Strooper et al., 1995a; Lo et al., 1994). Für β APPsw konnte keine BACE-Prozessierung an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Lo et al., 1994), stattdessen konnte gezeigt werden, dass β APPsw auf dem sekretorischen Transportweg von BACE geschnitten wird (Haass et al., 1995a).

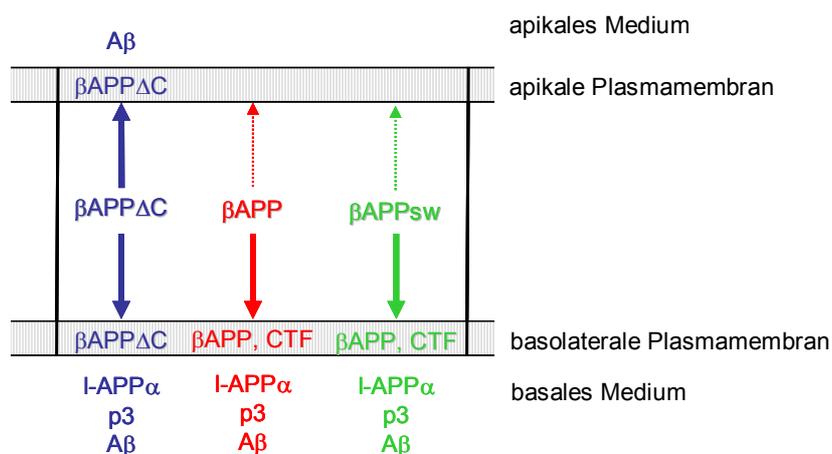


Abbildung 13: Polarisierte Sortierung von β APP

Die Oberflächenverteilung von β APP (rot), β APPsw (grün) und β APP Δ C (blau) und die Verteilung der entsprechenden Prozessierungsprodukte sind dargestellt.

1.6 Zielsetzung

Zu Beginn dieser Arbeit war die β -Sekretase, BACE, kloniert (Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Aufgrund der Sequenzanalyse wurde angenommen, dass BACE ein Typ I Transmembranprotein mit Signalsequenz und Propeptid ist. BACE-Aktivität konnte in Membranpräparationen nachgewiesen werden (Sinha et al., 1999). Ferner ergab die AS-Sequenzanalyse für BACE vier potentielle N-Glycosylierungsstellen und sechs luminale Cysteinreste, die drei Disulfidbrücken ausbilden könnten (1.3.2.2).

In dieser Arbeit soll BACE zunächst hinsichtlich post-translationaler Modifizierungen und endoproteolytischer Maturierung experimentell charakterisiert werden. Ferner soll die subzelluläre Lokalisierung und der zelluläre Transport von BACE in Zusammenhang mit der Maturierung und der proteolytischen Aktivität untersucht werden. Es soll geklärt werden in welchen Zellkompartimenten die Protease BACE und das Substrat β APP zusammen treffen. BACE stellt zusammen mit BACE2 eine völlig neuartige Gruppe von membrangebundenen Aspartylproteasen dar (1.3.2.2 / 1.4). Es soll daher untersucht werden inwieweit die Membrandomäne und die cytoplasmatische Domäne eine Bedeutung für die katalytische Aktivität sowie den zellulären Transport und die Lokalisierung von BACE haben. Damit wird die Relevanz dieser Domänen für die A β -Entstehung analysiert.

Darüber hinaus wird der Einfluss des Transports von BACE auf die Prozessierung von β APP in einem polarisierten Zellsystem, den MDCK Zellen, untersucht. Da ADAM-Proteasen und BACE um das gleiche Substrat β APP konkurrieren, soll untersucht werden, ob der Transport der Proteasen den Zugang zum Substrat und damit die Prozessierung des Substrats beeinflusst. Für β APP wurde ein polarisierter, basolateraler Transport beschrieben (1.5.2) (Haass et al., 1994a), ob aber die β APP prozessierenden Proteasen polarisiert transportiert werden, ist unbekannt.

Zur weiteren Charakterisierung von BACE außerhalb des zellulären Systems soll ein *in vitro* Assay entwickelt werden. Dieser Assay kann auch zur Untersuchung von verschiedenen BACE-Konstrukten auf enzymatische Aktivität und zur Identifizierung von BACE-Inhibitoren eingesetzt werden. Dazu soll der Assay auch im „high-throughput“ Verfahren einsetzbar sein und industriell genutzt werden können. Eine Inhibition von BACE wird als viel versprechender, therapeutischer Ansatz für die Alzheimer Krankheit diskutiert (Citron, 2004b; Vassar, 2002). Eine Inhibition von BACE würde genauso wie eine Inhibition der γ -Sekretase die Entstehung des Amyloid-Peptids, auch der A β_{42} -Spezies, verhindern. Im Gegensatz zur γ -Sekretase, für die eine Vielzahl von Substraten identifiziert wurde und die multiple, essentielle Funktionen in der Zelldifferenzierung, der embryonalen Entwicklung, der Signaltransduktion (1.3.2.3) (Haass, 2004) und dem Erinnerungsvermögen (Saura et al., 2004) übernimmt, konnten für BACE bisher keine essentiellen Funktionen nachgewiesen werden. BACE defiziente Maus sind fertil und zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001), damit lässt die Inhibition von BACE weniger Nebenwirkungen erwarten als die Inhibition der γ -Sekretase.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

2.1.1 Allgemein

| | |
|--|-----------------------|
| Schüttler (KM2) | Edmund Buhler |
| Überkopf-Schüttler (Roto-shake Genie) | Scientific Industries |
| Thermoschüttler (Thermomixer compact) | Eppendorf |
| Magnetrührer (IKAMAG RCT basic) | IKA Labortechnik |
| Vortex (Vortex Genie 2) | Scientific Industries |
| Wasserbad mit Schüttelvorrichtung (1083) | GFL |
| Mikrowelle | Bosch |
| Heizblöcke | Liebisch |
| Zentrifuge für Eppendorfreaktionsgefäße (Biofuge pico) | Heraeus, Kendro |
| Kühlzentrifuge für Eppendorfreaktionsgefäße (Biofuge fresco) | Heraeus, Kendro |
| Vakuumpzentrifuge (Speed Vac Concentrator) | Savant |
| Kühlzentrifuge (Megafuge 1.0R) | Heraeus, Kendro |
| Kühlzentrifuge (J2-21) | Beckman |
| Rotoren: Type JA10, Type JA 20 | Beckman |
| Ultrazentrifuge (L7-55) | Beckman |
| Rotoren: Ti 60, TH-641, | Beckman, Sorvall |
| Tischultrazentrifuge (Optima Ultracentrifuge) | Beckman |
| Rotoren: TLA-55, MLA-80, TLA-110 | Beckman |
| pH-Elektrode (Blueline 23 pH) | Schott |
| pH-Meter (Inolab pH Level 1) | WTW |
| Analysenwaage (Analytical+ 200 g - 0,0001 g) | Ohaus |
| Feinwaage (Standard 2000 g - 0,01 g) | Ohaus |
| Fotometer (SmartSpec™ 3000) | Bio-Rad |
| Einwegküvetten (10 x 11x 45 mm) | Sarstedt |
| Quarzküvetten (10 x 10 x 45 mm) | Hellma |
| Wärmeschrank 37°C (Function line) | Heraeus |
| Wärmeschrank 56°C | Heraeus |
| Gefrierschrank -20°C | Elektrolux |
| Kühlschrank 4°C | Elektrolux |

| | |
|--|------------|
| Autoklav (Tuttnauer 3850 EL) | Systemec |
| Wasseraufbereitungsanlage (Ionenaustauscher, Milli-Q academic) | Millipore |
| Pipettierhilfe (Accu-Jet) | Brand |
| Einwegauslaufpipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml) | Sarstedt |
| Pipettenspitzen (1 ml, 200 µl, 20 µl, 2 µl) | Sarstedt |
| Reaktionsgefäße (50 ml, 15 ml, 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml) | Sarstedt |
| Centricon YM-10 -Konzentratoren | Millipore |
| Dialyseschlauch („cut-off“ 12-14 kDa, 28 mm Durchmesser) | Spectrapor |

2.1.2 Molekularbiologie

| | |
|--|---------------------|
| PCR-Maschine (Mastercycler personal) | Eppendorf |
| Schüttelinkubator (Certomat BS-1) | B. Braun Biotech |
| Elektrophoresekammern (Modell: B1; Modell: B2) | Owl Separation Sys. |
| Agarosegeldokumentationseinheit | MS Laborgeräte |
| UV-Lampe (White/Ultraviolet Transilluminator) | |
| Kamera (CCD Video Camera Module) | |
| Dokumentation (Quickstore plus II) | |
| Drucker (p91), Mitsubishi | |

2.1.3 Zellkultur

| | |
|---|------------------|
| Sterilwerkbank (Hera Safe HS12) | Heraeus, Kendro |
| CO ₂ -Inkubator (Hera cell) | Heraeus, Kendro |
| Bunsenbrenner (Vulcan) | Heraeus, Kendro |
| Zentrifuge (Megafuge 1,0) | Heraeus, Kendro |
| Wasserbad (Typ 1002 ; Typ 1003) | GFL |
| Mikroskop (Wiloverts 10x 4/10/20) | Hund |
| N ₂ -Tank (Chronos) | Messer Griesheim |
| Gefrierschrank -80°C (HFU 80) | Heraeus, Kendro |
| Klonierungszyylinder (8x8 mm) | Bellco |
| Einfriergefäße (Qualifreeze) | Qualilab |
| Einwegpipetten, steril (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) | Sarstedt |
| Einweg-PP-Röhrchen, steril (15 ml, 50 ml) | Sarstedt |
| Pasteurpipetten | Sarstedt |
| Zelllifter | Corning Costar |
| Zellkulturschalen (60 x 15 mm, 100 x 17 mm, 24 well, 12 well) | Nunc |
| Filterkammern (Transwell, Polycarbonatmembran 3,0 µm) | Corning Costar |
| Durchmesser je Filter 12 mm (12-well Platte) | |
| Durchmesser je Filter 24 mm (6-well Platte) | |
| Sterilfiltereinheiten (250 ml, 500 ml) | Nalgene |

2.1.4 Proteinbiochemie und Immunocytochemie

Elektrophoresekammern

| | |
|--|------------------------|
| Mini-PROTEAN 3 electrophoresis cell | Bio-Rad |
| X Cell Sure Lock™ Mini Cell | Novex, Invitrogen |
| 10-20% Tris-Tricine Fertiggele | Novex, Invitrogen |
| Transferkammer: Mini Trans-Blot transfer cell | Bio-Rad |
| Gel Transfer Filterpapier | Schleicher&Schuell |
| Immobilon-P (PVDF Transfer Membran) | Millipore |
| Protran (Nitrozellulose Transfer Membran) | Schleicher&Schuell |
| Spannungsquelle (Power Pac 300) | Bio-Rad |
| Geltrockner (Slab Gel Dryer 2000) | Savant |
| Phosphor-Imager (Storm 840) | Molekular Dynamics |
| Image Quant™ V4.2 (Software) | Molekular Dynamics |
| Scanner: Umax Astra 1220S | |
| Filmentwicklungsgerät (Curix 60) | Agfa |
| Röntgenfilme Kodak-X-Omat DS | Kodak |
| BioMax TMMR | Kodak |
| Fluorimeter (Fluoroscans Ascent FL) | Labsystems |
| Filtersystem: Excitation 530nm / Emission 590 nm | |
| Mikrotiterplatten (96-well, schwarz) | Nunc |
| Sonifier (Cell Disruptor B 15) | Branson |
| Fluoreszenzmikroskop DMRB | Leica |
| 100fach/1.3 Immersionsölobjektiv | |
| Standard FITC und TRITC Fluoreszenzfiltersets | |
| Kamera: RT Monochrome Spot Camera | Diagnostic Instruments |
| Software: MetaView Imaging Software | |
| Konfokales Laser-Mikroskop TCS SP | Leica |
| 100fach/1.4 Immersionsölobjektiv plan-apochromatisch | |
| Argonlaser: Excitationswellenlänge 488 nm, Emmissionsfilter 490-530 nm | |
| Bilder wurden mit 512 x 512 Pixel Auflösung aufgenommen | |
| Photoshop 5.5, Universal Imaging Corporation Adobe | |

2.2 Enzyme, Kits (Versuchssysteme), Chemikalien,

2.2.1 Allgemein

Nicht spezifisch aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, Serva oder Sigma bezogen. Sind keine anderen Angaben gemacht, so wurden die Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p.a. eingesetzt.

Alle Lösungen wurden mit voll entsalztem H₂O angesetzt, das mit einer Milli-Q Anlage zur bidest. Qualität aufgereinigt wurde und einen elektrischen Widerstand >18.2 MΩ cm bei 25°C hat.

Bei Prozentangaben handelt es sich um Volumenprozent, soweit keine anderen Angaben gemacht wurden.

2.2.2 Molekularbiologie

| | |
|---|-------------------|
| Agarose (Electrophoresis Grade) | Gibco, Invitrogen |
| Bacto-Agar | Becton, Dickinson |
| Bacto-Trypton | Becton, Dickinson |
| Hefe-Extrakt | Becton, Dickinson |
| Restriktionsendonukleasen | Gibco, Invitrogen |
| DNA-Molekulargewichts Marker (0,07–12,2 kb) | Gibco, Invitrogen |
| Alkaline Phosphatase (Shrimp) | Roche Biochem. |
| RNAse A | Sigma |
| T4-Ligase | Roche Biochem. |
| DNA-Ligations Kit (Rapid Ligation Kit) | Roche Biochem. |
| PCR-Kits | |
| GC-rich PCR-System | Roche Biochem. |
| Pwo PCR-System | Roche Biochem. |
| NucleoSpin Extract | Macherey Nagel |
| PCR-Produkt Aufreinigungs Kit (PCR Clean-up) | |
| DNA-Elution aus dem Gel | |
| NucleoSpin Plasmid DNA-Aufreinigungs Kit | Macherey Nagel |
| DNA-Aufreinigung im großen Maßstab (AX500 Nucleobond) | Macherey Nagel |
| E. coli - K12 Stamm: DH5α | |

2.2.2.1 Vektoren

| | |
|-----------------------------------|------------|
| Eukaryotische Expressionsvektoren | Invitrogen |
| pcDNA3.1 Zeo+ | |
| pcDNA4/myc-His Zeo | |

2.2.2.2 Oligonukleotide und cDNA Konstrukte

| Konstrukt | Oligonukleotide | Vektor | Restriktions-schnittstellen |
|--------------------------------|---|------------------|-----------------------------|
| BACE-wt | 5'-cgcgaattcggggcccaccagtgcccaagccctgccctgg-3' 5'-cgcctcgagcttcagcagggagatgcatc-3' | pcDNA4/myc-His A | EcoRI/XhoI |
| BACE-ΔC | 5'-cgcgaattcggggcccaccagtgcccaagccctgccctgg-3' 5'-cgcctcgagcaccatgaggcagagtgggcag-3' | pcDNA4/myc-His A | EcoRI/XhoI |
| BACE-L | 5'-cgcgaattcggggcccaccagtgcccaagccctgccctgg-3' 5'-cgcctcgaggggtgactcatctgtctgtgg-3' | pcDNA4/myc-His A | EcoRI/XhoI |
| BACE R45A | 5'-cgcgaattcggggcccaccagtgcccaagccctgccctgg-3' 5'-ctttctcgtcgtctctcgcgggcagccgagccc-3' R 5'-gggctcgcgctcctccgagagaccgacgaagag-3' F 5'-cgcctcgagcttcagcagggagatgcatc-3' | pcDNA4/myc-His A | EcoRI/XhoI |
| BACE | 5'-cgcgaattcggggcccaccagtgcccaagccctgccctgg-3' 5'-cgcctcgagtcacttcagcagggagatgcatc-3' | pcDNA3.1 Zeo+ | EcoRI/XhoI |
| BACE STOP₄₉₄ | 5'-cgcgaattcggggcccaccagtgcccaagccctgccctgg-3' 5'-cgcctcgagtcaagcaagtcatcatgctggcg-3' | pcDNA3.1 Zeo+ | EcoRI/XhoI |
| PS1 | 5'-cgcggatccatgacagagttacctg-3' 5'-cgcctcgagctagatataaaattgatg-3' | pcDNA3.1 Zeo+ | BamHI/XhoI |

Tabelle 1: Oligonukleotide für die PCR

Aufgeführt sind die für die PCR-Ansätze der verschiedenen cDNA-Konstrukte verwendeten Oligonukleotide, jeweils vom 5'- zum 3'-Ende, die Klonierungsvektoren und die zur Klonierung benutzten Restriktionsschnittstellen.

2.2.3 Zellkultur

DMEM (mit Glucose, L-Glutamin, ohne Na-Pyruvate)

Optimem1 (mit Glutamax-I)

MEM (ohne Methionin, mit L-Glutamin)

MEM Select Amine Kit

FKS

FKS (dialysiert)

Trypsin-EDTA (in HBSS)

L-Glutamin (100x, 200mM)

n-Buttersäure (Na-Salz)

DMSO

PAA

Gibco, Invitrogen

Sigma

Gibco, Invitrogen

PAA

Gibco, Invitrogen

Gibco, Invitrogen

Gibco, Invitrogen

Sigma

Merck

Antibiotika

| | |
|---|-------------------|
| Penicillin/Streptomycin (5000 U/ml / 5 mg/ml) | Gibco, Invitrogen |
| G418 (Geneticin) | Gibco, Invitrogen |
| Zeocin™ (100 mg/ml) | Gibco, Invitrogen |
| Transfektionsreagenz FuGENE™, | Roche Biochem. |
| Poly-L-Lysin (MW 111000) | Sigma |
| HEK 293 (human embryonic kidney 293) Zellen | ATTC |
| MDCK strain II (Madin-Darby canine kidney) Zellen | ATTC |

2.2.3.1 Transfizierte HEK 293 und MDCK Zelllinien

| Name | Zelllinie | überexprimierte Proteine | Resistenz | Zitat (für nicht selbst hergestellte Linien) |
|--------------------------------|----------------|--|-----------------|---|
| βAPPwt | HEK 293 | βAPP ₆₉₅ wt | G 418 | (Haass et al., 1992a) |
| βAPPsw | HEK 293 | βAPP ₆₉₅ sw | G 418 | (Citron et al., 1992) |
| BACE-wt | HEK 293/βAPPwt | βAPP ₆₉₅ wt BACE | G 418 Zeocin | |
| BACE-ΔC | HEK 293/βAPPwt | βAPP ₆₉₅ wt BACE-ΔC | G 418 Zeocin | |
| BACE-L | HEK 293/βAPPwt | βAPP ₆₉₅ wt BACE-L | G 418 Zeocin | |
| BACE R45A | HEK 293/βAPPwt | βAPP ₆₉₅ wt BACE R45A | G 418 Zeocin | |
| βAPP | MDCK | βAPP ₆₉₅ wt | G418 | (Haass et al., 1994a) |
| βAPPΔC | MDCK | βAPP ₆₉₅ ΔC | G418 | (Haass et al., 1995c) |
| βAPP BACE | MDCK/βAPPwt | βAPP ₆₉₅ wt BACE | G 418 Zeocin | |
| BACE STOP₄₉₄ | MDCK/βAPPwt | βAPP ₆₉₅ wt BACE STOP ₄₉₄ | G 418 Zeocin | |
| βAPPΔC BACE | MDCK/βAPPΔC | βAPP ₆₉₅ ΔC BACE | G 418 Zeocin | |
| PS1wt | MDCK/βAPPwt | βAPP ₆₉₅ wt PS1wt | G 418 Zeocin | |

Tabelle 2: Bezeichnung und exogene Proteinexpression der benutzten Zelllinien

Aufgeführt sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, genetisch veränderten Zelllinien. Angegeben ist der Name der jeweiligen Ursprungszelllinie, alle exogen exprimierten Proteine und die entsprechenden Resistenzen zur Selektion der Einzelzellklone. Für nicht selbst erstellte Zelllinien ist die entsprechende Referenz angegeben.

2.2.4 Proteinbiochemie und Immunocytochemie

| | |
|---|----------------------|
| Pro-Mix L-[³⁵ S] Cell Labelling Mix (530 MBq/ml, 37 TBq/mmol) | Amersham Biosciences |
| L-[2,3,4,5,6- ³ H] Phenylalanin (37 MBq/ml, 4,85 TBq/mmol) | Amersham Biosciences |
| N-Glycosidase F | Roche Biochem. |
| Endoglycosidase H | Roche Biochem. |
| Tunicamycin | Sigma |
| Monensin (Na-Salz) | Sigma |
| Brefeldin A | Sigma |
| EZ-Link TM -Sulfo-NHS-LC-Biotin | KMF-Laborchemie |
| Protein Assay (nach Bradford) | Bio-Rad |
| Rinderserum Albumin (BSA, Fraktion V) | Sigma |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Merck |
| Acrylamid-Lösung 40 % (Acrylamid - Bis-Acrylamid 37,5:1) | Q BioGene |
| Molekulargewichtsmarker | |
| Low-Range Marker (2,3-43 kDa) | Gibco, Invitrogen |
| Full-Range Rainbow Marker (10-250 kDa) | Amersham Biosciences |
| Protein-A Sepharose CL-4B (PAS) | Sigma |
| ECL Western Blotting Kit | Amersham Biosciences |
| ECL-Plus Western Blotting Kit | Amersham Biosciences |
| Silberfärbe-Kit (Silver Stain Plus) | Bio-Rad |
| Amplify Fluorografie Reagenz | Amersham Biosciences |
| Protease Inhibitor Cocktail (for Mammalian Cell Extracts) | Sigma |
| Ni-NTA-Agarose | Qiagen |
| Mowiol 4-88 (Höchst) | Kremer-Pigmente |
| Immersionsöl N518 | Zeiss |

2.2.4.1 Antikörper

Bei den in der Maus hergestellten Antikörpern (AK) handelt es sich ausnahmslos um monoklonale AK. Für die Herstellung der polyklonalen AK gegen BACE wurden synthetische Peptide einer potentiell antigenen Region des Proteins an KLH (keyhole limpet hemocyanin) gekoppelt und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die Synthese und Kopplung der Peptide, sowie die Immunisierung der Kaninchen und die Gewinnung der Antiseren wurden von der Firma Eurogentec durchgeführt.

| Bezeichnung | Antigen (AS) | Wirt | IP | WB | IF | Bezugsquelle |
|-----------------|---|-----------|-------|--------|---------|---|
| AK anti-Giantin | human Giantin | Maus | --- | --- | 1:10000 | Dr. H.-P. Hauri, Basel (Linstedt und Hauri, 1993) |
| AK 9E10 | c-myc (AS 410-419) | Maus | 1:500 | 1:5000 | 1:500 | Hybridomabank, University of Iowa |
| AK GM190 | BACE (AS 22-45) | Kaninchen | 1:200 | 1:500 | 1:200 | Dr. Gerd Multhaup, Berlin |
| AK 7523 | BACE (AS 46-60) | Kaninchen | 1:300 | 1:1000 | 1:300 | |
| AK 7520 | BACE (AS 482-501) | Kaninchen | 1:300 | 1:1000 | --- | |
| AK 6687 | β APP ₆₉₅ (AS 676-695) | Kaninchen | 1:300 | 1:600 | --- | (Capell et al., 2000) |
| AK 5313 | β APP ₆₉₅ (AS 444-592) | Kaninchen | 1:300 | 1:600 | --- | (Steiner et al., 1999a) |
| AK 1736 | β APP ₆₉₅ (AS 595-611) | Kaninchen | 1:300 | 1:600 | --- | Dr. D.J. Selkoe, USA (Haass et al., 1992b) |
| AK 3926 | A β (AS 1-40) | Kaninchen | 1:300 | 1:1000 | --- | (Wild-Bode et al., 1997) |
| AK 3027 | PS1 (AS 263-407) | Kaninchen | 1:300 | 1:2000 | --- | (Capell et al., 1998) |
| AK PS1-NT | PS1 (AS 2-80) | Maus | --- | 1:2000 | --- | Dr. Ralph A. Nixon, USA (Capell et al., 1997) |
| AK NCT-CT | NCT (AS693-709) | Kaninchen | 1:500 | 1:5000 | --- | Sigma |

Tabelle 3: Übersicht der Primär-Antikörper

Angegeben ist die Bezeichnung des Antikörpers (AK), das zur Immunisierung eingesetzte Antigen und die benutzten Verdünnungen in der Immunopräzipitation (IP), im Western Blot (WB) und in der Immunofluoreszenz (IF). Wurde der AK bereits in anderen Arbeiten eingesetzt ist das entsprechende Zitat angegeben. Bei kommerziell erworbenen oder von anderen Arbeitsgruppen freundlicherweise zur Verfügung gestellten AK ist die Bezugsquelle angegeben.

| Bezeichnung | Antigen | Wirt | Applikation | Verdünnung | Firma |
|-----------------------------------|---------------|-------|-------------|------------|------------------|
| anti-Kaninchen-HRP | Kaninchen IgG | Ziege | WB | 1:20000 | Promega |
| anti-Maus-HRP | Maus IgG | Ziege | WB | 1:10000 | Promega |
| anti-Kaninchen- ¹²⁵ I] | Kaninchen IgG | Esel | WB | 1:10 | Amersham |
| Alexa Fluor 488 (grün) | Kaninchen IgG | Ziege | IF | 1:250 | Molecular Probes |
| Alexa Fluor 594 (rot) | Kaninchen IgG | Ziege | IF | 1:500 | Molecular Probes |
| Alexa Fluor 488 (grün) | Maus IgG | Ziege | IF | 1:250 | Molecular Probes |
| Alexa Fluor 594 (rot) | Maus IgG | Ziege | IF | 1:500 | Molecular Probes |

Tabelle 4: Übersicht der Sekundär-Antikörper

Angegeben sind die Bezeichnungen der AK, die Antigene, gegen die die AK gerichtet sind, die Spezies in denen die AK generiert wurden, die Applikationen und eingesetzten Verdünnungen der AK, sowie die Bezugsquellen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die BACE cDNA wurde aus einer humanen cDNA Genbank isoliert und freundlicherweise von Dr. Steiner zur Verfügung gestellt. Für die Umklonierung von humanem BACE und zur Generierung der Stoppkonstrukte wurde die PCR mit dem „Pwo-DNA-Polymerase Kit“ oder dem „GC-rich Kit“ durchgeführt.

Reaktionsansatz:

0,5 µl cDNA Template (ca. 1 µg/µl)
 0,5 µl 3'-Oligonukleotid (100 µM)
 0,5 µl 5'-Oligonukleotid (100 µM)
 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
 2 µl Pwo-DNA-Polymerase (1 U/µl)
 5 µl Reaktionspuffer komplett (10x)
 mit H₂O bidest. auf 50 µl Endvolumen

Die entsprechenden Reaktionsansätze wurden gemischt und in der PCR-Maschine mit folgendem Programm prozessiert:

| | |
|--------------------------|----------------|
| Denaturierung: | 94°C, 2min |
| 10Zyklen: | |
| Denaturierung : | 94°C, 30 s |
| Annealing : | 50°C, 30 s |
| Elongation: | 72°C, 2 min |
| 20 Zyklen: | |
| Denaturierung : | 94°C, 30 s |
| Annealing : | 50°C, 30 s |
| Elongation: | 72°C, 2 min |
| Elongationsverlängerung: | 20 s je Zyklus |
| Verlängerte Elongation: | 72°C, 5 min |

Die Produkte der jeweiligen PCR wurden in 1 % (w/v) Agarosegelen aufgetrennt (2.3.2), die amplifizierten DNA-Fragmente wurden aus dem Gel eluiert und anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nachgeschnitten (2.3.4). Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden in den Expressionsvektor subkloniert (2.3.6).

2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

TBE-Puffer (Stocklösung 10fach):

900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 20 mM EDTA, in dH₂O, pH 8,0

DNA-Ladepuffer (Stocklösung 6fach):

30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylen Cyanol FF in dH₂O

Ethidiumbromid (Stocklösung 50000fach):

10 mg/ml in dH₂O

Zur elektrophoretischen Trennung und Analyse von linearisierten DNA-Fragmenten, superhelikaler Plasmid-DNA sowie zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurden 0,8-2 % (w/v) Agarosegele eingesetzt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in der Mikrowelle in TBE-Puffer gelöst, nach Abkühlung wurde Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zur Agarosegellösung gegeben. Nach Mischung wurde die Gellösung in die Gelkammer gegossen und der gewünschte Probenastkamm eingesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen 6fach DNA-Ladepuffers versetzt. Als Größenstandard diente eine 1 kbp DNA-Leiter. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung 80-120 V (je nach Größe des Gels) mit TBE-Puffer in Agarose-Gelkammern durchgeführt.

2.3.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschte DNA-Bande wurde mit Hilfe eines UV-Lichtschirms lokalisiert, mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des „Nucleo Spin Extract Kits“ entsprechend der Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

Nach enzymatischen DNA-Modifikationen wurde der Reaktionsansatz ohne Auftrennung im Agarosegel mit dem „Nucleo Spin Extract Kit“ entsprechend der Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

2.3.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für analytische Ansätze nach Plasmidpräparationen wurde 1 µg Plasmid-DNA, in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer, mit 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme, in einem Endvolumen von 20 µl für 3-4 h bei 37°C inkubiert. Die Analyse der Restriktion erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.3.2).

Für präparative Ansätze im Rahmen der Klonierung wurden 2-5 µg Plasmid-DNA oder das entsprechenden PCR-Produkt, in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer, mit 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme (2.3.4) in einem Endvolumen von 40 µl für 6-8 h bei 37°C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend isoliert und aufgereinigt (2.3.3).

2.3.5 Dephosphorylierung von DNA

Vor einer Ligation (2.3.6) wurden die 5'-Phosphatgruppen des linearisierten Vektors (2.3.4) mit Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP) entfernt, um intramolekulare Selbstligation zu verhindern (Sambrook und Russel, 2001). Dazu wurden 5-10 µg linearisierte Plasmid-DNA mit 1 U SAP in dem Reaktionspuffer des Herstellers, in einem Gesamtvolumen von 200 µl, 1-2 h bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend unter Verwendung des „Nucleo Spin Extract Kits“ gereinigt (2.3.3).

2.3.6 Ligation von DNA

Die Insertion des mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragments in den zuvor linearisierten und dephosphorylierten Plasmid Vektor erfolgte mit Hilfe der T4 DNA-Ligase. 200-300 ng Vektor, 0,5-1 µg des entsprechenden DNA-Fragmentes, 1µl (5 U) T4 Ligase im Ligationspuffer des Herstellers wurden in einem Endvolumen von 20 µl, 1 h bei RT inkubiert. Parallel wurde zur Kontrolle der Relegationsfähigkeit des Vektors der Vektor ohne Insert sowie mit und ohne Ligase inkubiert.

Alternativ wurde der „Rapid DNA Ligation Kit“ entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt. 10 µl des Ligationansatzes wurden zur Transformation in kompetente E. coli verwendet (2.3.8).

2.3.7 E. coli Kulturen

LB-Medium (Low Salt Luria-Bertani Medium):

1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5 % (w/v) NaCl in dH₂O pH 7,0 mit NaOH eingestellt; autoklaviert (120°C; 1,2 bar, 20 min). Vor Benutzung wurden Selektionsantibiotika zugesetzt (Ampicillin 100 µg/ml).

LB-Agar-Platten (1,5 % (w/v)):

15 g/l Bacto-Agar in LB-Medium, autoklaviert (120°C; 1,2 bar 20 min). Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden die entsprechenden Selektionsantibiotika zusetzen (Ampicillin 100 µg/ml) und Platten (sterile Bakterienschalen, 10 cm Durchmesser) gegossen.

Ampicillin (Stocklösung 1000fach):

100 mg/ml in dH₂O, steril filtriert. Aliquote wurden bei -20°C gelagert.

E. coli Bakterien (DH5α) wurden, soweit nicht anders angegeben, über Nacht bei 37°C, im Schüttelinkubator mit 200 UpM im gewünschten Volumen LB-Medium kultiviert.

Zur Separierung von Einzelklonen wurden Kulturen auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

Ampicillin wurde bei Bedarf als Selektionsantibiotikum zugesetzt.

2.3.8 Herstellung kompetenter E. coli Zellen

CaCl₂-Puffer:

50 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 8,0 in dH₂O

Eine DH5α-Übernachtskultur einer einzelnen Kolonie wurde 1:100 in LB-Medium verdünnt und im Schüttelinkubator bei 37°C / 200 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (3500 g, 10 min, 4°C) und in 1/2 Ausgangs-Kulturvolumen, eiskaltem CaCl₂-Puffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut,

wie oben beschrieben, pelletiert und in 1/20 Kulturvolumen eiskaltem CaCl_2 -Puffer resuspendiert. Die so hergestellten kompetenten Zellen wurden entweder direkt für die Transformation verwendet oder in 20 % Glycerol/ CaCl_2 -Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.9 Transformation von DNA-Konstrukten in kompetente Bakterien

100 μl kompetente, evtl. auf Eis aufgetaute, DH5 α -Suspension (2.3.8) wurde mit 10 μl Ligationsansatz bzw. Kontrollansätzen (2.3.6) oder 0,2 μg Plasmid DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Um eine Aufnahme der DNA in die Zelle zu ermöglichen, wurden die Zellen für 2 min bei 42°C (Hitzeschock) und weitere 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C / 800 UpM in einem Thermoschüttler inkubiert. Die Zellen wurden 20 s bei 16000 g abzentrifugiert, in 200 μl LB-Medium resuspendiert und auf Ampicillin enthaltende LB-Agar-Platten ausplattiert. Nach 16-24 h Inkubation bei 37°C wurden Klone von der Ligations-Platte gepickt und auf Einbau des gewünschten DNA-Fragments untersucht (2.3.10).

2.3.10 Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Mini-Präp)

Mini-Präp-Lösung:

10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA, 0,1 N NaOH, 0,5 % (w/v) SDS in dH_2O

Na-Acetat-Lösung:

3,0 M Na-Acetat, pH 5,2

RNAse (DNAse-frei):

10 mg/ml Ribonuklease A (RNAse) in Tris-Puffer (10 mM Tris, pH 7,5; 10 mM NaCl), 15 min bei 100°C erhitzen, langsam auf RT abkühlen. Aliquote bei -20°C lagern.

Zur Identifizierung rekombinanter E. coli Klone wurden kleine Mengen Plasmid-DNA nach einer veränderten Version (Zhou et al., 1990) der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) isoliert. 1 ml einer 2 ml E. coli Übernachtskultur wurde im Eppendorfreaktionsgefäß zentrifugiert (16000 g, 15 s, RT). Der Überstand wurde teilweise dekantiert, wobei ca. 100 μl im Reaktionsgefäß verblieben. Das Sediment wurde durch vortexen resuspendiert und mit 300 μl Mini-Präp-Lösung versetzt und vorsichtig gemischt. Nach ca. 5 min Inkubation bei RT wurden zur Neutralisation 150 μl Na-Acetat-Lösung zugegeben und invertierend gemischt. Die unlöslichen Bestandteile (chromosomale DNA und Zellbruchstücke) wurden durch Zentrifugation (16000 g, 10 min, 4°C) abgetrennt, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 1 ml -20°C kaltem Ethanol (100 %) aus dem Überstand gefällt. Nach 10 min Inkubation wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation präzipitiert (16000 g, 15 min, 4°C) und mit 500 μl eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und das DNA-Pellet bei 37°C bis zur Ethanolfreiheit getrocknet. Das DNA-Pellet wurde anschließend in 30 μl RNAse/ dH_2O -Lösung (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) resuspendiert und 15 min bei 37°C inkubiert. 5 μl der so erhaltenen Plasmid-

DNA wurden zur Kontrolle der DNA-Fragment-Integration im analytischen Maßstab mit Restriktionsendonukleasen verdaut (2.3.4).

Alternativ wurden DNA Mini-Präparationen mit dem „Nucleo Spin Plasmid DNA-Reinigungs Kit“ entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die so aufgereinigte DNA konnte direkt zur Sequenzierung und Transfektion eingesetzt werden.

2.3.11 Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxi-Präp)

300 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum wurden mit der Vorkultur des gewünschten E. coli Klons angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (800 UpM) inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (8000 g, 20 min, 4°C). Die Lyse des Bakterien-Pellets und die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem „Nucleobond AX 500 Kit“ nach den Anweisungen des Herstellers. Die von der Säule eluierte Plasmid-DNA wurde mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (10000 g, 45 min, 4°C) pelletiert, nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol wurde das DNA-Pellet in 300 µl dH₂O aufgenommen. Die DNA Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die DNA wurde 1:100 verdünnt und die Absorption gegen H₂O gemessen. Die Konzentration berechnet sich aus: $A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 \text{ µg/ml}$ (molarer Extinktionskoeffizient). Zur Überprüfung der DNA auf Fragmenteinbau wurde 1 µg DNA im analytischen Maßstab mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut (2.3.4) und im Agarosegel aufgetrennt (2.3.2).

2.3.12 Sequenzierung der DNA-Konstrukte

Alle hergestellten DNA-Konstrukte wurden zur Verifizierung sequenziert. Die Sequenzierung der DNA wurde von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Die ermittelte Sequenz wurde mit der gewünschten Sequenz im Programm „HUSAR ProfAlign“ des Bioinformatik Services der DKFZ (Heidelberg) verglichen.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kultivierung und Verdünnung von HEK 293 Zellen

PBS-Puffer (steril):

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄ in dH₂O, pH 7,4 mit HCl eingestellt, autoklaviert (120°C, 1,2 bar, 20 min)

Kulturmedium (Grundmedium):

10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin (Stocklösung (100fach) Endkonzentration: 50 U/ml / 50 µg/ml) in DMEM (mit Glucose, L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat)

Die Kultivierung der HEK 293 Zellen erfolgte, nach Standardprotokollen (Kruse and Patterson, 1973), bei 37°C, 5 % CO₂ und Feuchtigkeitssättigung, im CO₂-Inkubator. Die Zellen wachsen adherent. Sie wurden bei Konfluenz mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Für eine Petrischale mit einem Durchmesser von 10 cm wurde 1,5 ml Trypsin-

EDTA-Lösung eingesetzt. Die abgelösten Zellen wurden sofort in 6 ml Kulturmedium aufgenommen, um den Trypsinierungsvorgang zu stoppen, und in sterile 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (400 g, 5 min, RT), in Kulturmedium resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:4 bis 1:8 wieder ausgesät. Die Verdopplungsrate beträgt ca. 24-36 Stunden.

2.4.1.1 Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)

Einfriermedium:

90 % FKS, 10 % DMSO

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden konfluente Zellmonolayer einer 10 cm Petrischale wie unter 2.4.1 beschrieben pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium (4°C) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kulturen wurden in Einfrierboxen, die eine langsame, definierte Abkühlung gewährleisten, bei -80°C eingefroren und zur Dauerlagerung nach ca. 1 Woche in den flüssigen Stickstofftank überführt. Die Zellkonzentration im Einfriermedium beträgt ca. 5×10^6 Zellen /ml.

2.4.1.2 Transfektion von HEK 293 Zellen mit rekombinanter DNA

Selektionsmedien:

Die gewünschten Selektionsantibiotika wurden in der angegebenen Konzentration zu dem Grundmedium zugegeben: G418 (Geneticin) Stocklösung (100 mg/ml), Endkonzentration 400 µg/ml, Zeocin™ Stocklösung (100 mg/ml), Endkonzentration 200 µg/ml.

Die entsprechenden Zellen wurden in einer 10 cm Schale bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert und mittels FuGENE™ gemäß den Anweisungen des Herstellers mit der gewünschten Plasmid-DNA transfiziert. Im Falle einer transienten Transfektion wurden die Zellen 24-48 h nach der Transfektion für das entsprechende Experiment eingesetzt. Zur Selektion stabiler Einzelzellklone wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion in verschiedenen Verdünnungen (1:50-1:400) in das entsprechende Selektionsmedium umgesetzt. Je nach Antibiotikum benötigte eine vollständige Selektion 1-3 Wochen. Untransfizierte Zellen waren abgestorben und stabile Einzelzellklone waren zu Zellhaufen herangewachsen. Die Einzelzellklone wurden von der geeigneten Verdünnungsplatte unter Verwendung steriler Klonierungszylinder isoliert, mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und in 12-well-Platten transferiert.

Die Zellen wurden anschließend weiter vermehrt, je Zellklon wurden zwei 6 cm Schalen angelegt, die Zellen einer Schale wurden als Dauerkultur eingefroren, die der anderen Schale wurden lysiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt (2.5.3.3) und auf Expression des exogenen Proteins im Western Blot analysiert (2.5.3.5).

2.4.1.3 Beschichtung von Kulturschalen und Deckgläschen mit Poly-L-Lysin

Poly-L-Lysin (Stocklösung 100fach für Deckgläschen, 1000fach für Kulturschalen):

10 mg/ml Poly-L-Lysin in sterilem dH₂O

PBS-Puffer:

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄ in dH₂O, pH 7,4; autoklaviert

Für einige Experimente mussten Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin beschichtet werden, um eine bessere Haftung der HEK 293 Zellen zu erreichen. Hierzu wurden Kulturschalen für 1-2 h bei 37°C mit einer Poly-L-Lysin-Lösung (10 µg/ml) im CO₂-Inkubator inkubiert und anschließend 5-mal mit sterilem dH₂O gewaschen. Sollten die Schalen sofort benutzt werden, wurden sie 1-mal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen, andernfalls wurden die Schalen in der Sterilbank getrocknet, steril verpackt und bei 4°C gelagert.

Glasdeckgläschen müssen, um ein Zellwachstum zu ermöglichen, immer beschichtet werden. Deckgläschen wurden über Nacht in 70 % Ethanol sterilisiert oder zur Sterilisation autoklaviert (120 °C, 1,2 bar, 20 min). Nach der Sterilisation wurden sie vollständig mit Poly-L-Lysin-Lösung (100 µg/ml) bedeckt und 2 h bei 37°C oder über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen 5-mal mit sterilem dH₂O gewaschen und in sterilem dH₂O gelagert.

2.4.1.4 Zählen von Zellen

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.4.2 Kultivierung der MDCK Zellen

2.4.2.1 Verdünnung, Kryokulturen und Transfektion

Selektionsmedien:

Die gewünschten Selektionsantibiotika wurden in der angegebenen Konzentration zu dem Grundmedium zugegeben: G418 (Geneticin) Stocklösung (100 mg/ml), Endkonzentration 800 µg/ml, Zeocin™ Stocklösung (100 mg/ml), Endkonzentration 400 µg/ml

Die Kultivierung der MDCK Zellen erfolgte analog zu der von HEK 293 Zellen (2.4.1). Unterschiede ergaben sich nur bei der Transfektion. Da MDCK Zellen sehr schlecht zu transfizieren sind, konnten transiente Transfektionen nicht durchgeführt werden, und um stabile Einzellklone zu erhalten, wurden die Zellen 24 h nach Transfektion in einer Verdünnungen von 1:5 in das entsprechende Selektionsmedium umgesetzt. Die Konzentration der Selektionsantibiotika ist bei MDCK Zellen höher als bei HEK 293 Zellen (2.4.1.2). Je nach Antibiotikum benötigte eine vollständige Selektion 3-4 Wochen. Um 1-2 hoch exprimierende Klone zu erhalten, mussten ca. 20 Einzellklone isoliert werden.

2.4.2.2 Wachstum von MDCK Zellen in Filterkammern

Medium für auf Filtern wachsende MDCK Zellen:

20 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin in DMEM (mit Glucose, L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat)

Medium mit Na-Butyrat:

10 mM Na-Butyrat (Stocklösung (100fach): 1 M Na-Butyrat in sterilem dH₂O) in Grundmedium oder in Filtermedium

MDCK Zellen wurden zur Ausbildung eines polarisierten „Monolayers“ auf Transwell™-Filter ausgesät und 5-6 Tage bei täglichem Mediumwechsel kultiviert. Die FKS Konzentration des Grundmediums wurde auf 20 % erhöht.

Für biochemische Experimente wurden Filter mit einem Durchmesser von 24 mm eingesetzt, das apikale Medienvolumen betrug 1,5 ml, das basolaterale 2,6 ml. Es wurden ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen auf einen 24 mm Filter ausgesät.

Für cytochemische Untersuchungen wurden Filter mit einem Durchmesser von 12 mm eingesetzt, das apikale Medienvolumen betrug 0,5 ml, das basolaterale 1,5 ml. Es wurden ca. 6×10^5 Zellen auf einen 12 mm Filter ausgesät.

Zur Erhöhung der Expression der exogen exprimierten Proteine wurden die MDCK Zelllinien über Nacht, d.h. 15-18 h, mit 10 mM Na-Butyrat behandelt (Gottlieb et al., 1986).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Herstellung von Zelllysaten

2.5.1.1 Gesamtproteinlysat

PBS-Puffer:

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄ in dH₂O, pH 7,4; autoklaviert

STEN-Lysepuffer mit BSA:

50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % NP-40, 2 mg/ml BSA in dH₂O

STEN-Lysepuffer ohne BSA:

50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % NP-40 in dH₂O

Konfluente Monolayer von HEK 293 oder MDCK Zellen wurden auf Eis 2-mal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml PBS-Puffer abgeschabt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1000 g, 5 min) pelletiert, in STEN-Lysepuffer Puffer resuspendiert (800 µl pro 10 cm Schale, 400 µl pro 6 cm Schale) und 15 min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile, wie Cytoskelett und Zellkerne, wurden durch Zentrifugation (16000 g, 20 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Sollten die Zelllysate direkt in der SDS-PAGE aufgetrennt werden, wurde STEN-Lysepuffer ohne BSA eingesetzt, sollte jedoch das Zelllysate zur Immunopräzipitation eingesetzt werden, wurde STEN-Lysepuffer mit BSA benutzt. Zur Lagerung wurden Lysate bei -20°C eingefroren.

2.5.1.2 Membranproteinlysat

PBS-Puffer:

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄ in dH₂O, pH 7,4; autoklaviert

Hypotoner-Puffer:

10 mM Tris pH 7,6; 10 mM KCl, 1,5 mM Mg-Acetat in dH₂O

STEN-Lysepuffer ohne BSA:

50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % NP-40 in dH₂O

Konfluente Monolayer einer 10 cm Schale von HEK 293 oder MDCK Zellen wurden auf Eis 2-mal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml PBS-Puffer abgeschabt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (400 g, 5 min) pelletiert, in 1 ml kaltem hypotonen Puffer resuspendiert und zum Schwellen 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch 15-maliges Aufziehen der Suspension mit einer 2 ml Spritze durch eine 0,6 mm Injektionskanüle geöffnet. Zellkerne und Cytoskelett wurden durch Zentrifugation (3000 g, 10 min, 4°C) abgetrennt und die Membranen anschließend durch Ultrazentrifugation (100000 g, 1 h, 4°C) aus dem Überstand pelletiert. Das Membranpellet wurde entweder direkt in 30-60 µl SDS-Probenpuffer (2.5.3.1) bei 37°C im Schüttelinkubator gelöst, oder in 50-100 µl STEN-Lysepuffer ohne BSA resuspendiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (16000 g, 20 min, 4°C), aus dem STEN-Membranlysat wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

2.5.2 Proteinbestimmung

BSA-Standard Lösung

2 mg/ml BSA

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Gesamt- oder Membranproteinlysaten erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay Kit und basiert auf der Methode nach Bradford (Bradford, 1976).

1-2 µl der zu messenden Probe wurden in einer 1 cm Einwegküvette vorgelegt, mit 1 ml der 1:5 verdünnten Bio-Rad Protein Assay Reagenzlösung versetzt, nach mindestens 5 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm fotometrisch ermittelt. Parallel wurde eine Kalibrierkurve mit 2-10 µg BSA angesetzt. Alle Proben und die Kalibrierstandards wurden als 3fache Bestimmung angesetzt. Die Funktion der Kalibrierkurve wurde durch lineare Regression ermittelt, und aus der Funktion der Kalibrierkurve wurde die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

2.5.3 Nachweis von Proteinen

2.5.3.1 TCA-Fällung von Proteinen

20 % Trichloressigsäure (TCA)

Aceton

SDS-Probenpuffer (2fach)

20 % Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 5 % β -Mercaptoethanol, 125 mM Tris pH 6,8; 0,005 % Bromphenol blau

Die Proben wurden mit einem Volumen 20 %iger-TCA-Lösung versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (16000 g, 30 min, 4°C). Das Proteinpellet wurde 1-mal mit Aceton gewaschen, kurz bei 37°C getrocknet und in Probenpuffer aufgenommen.

2.5.3.2 Immunopräzipitation von Proteinen

STEN-Puffer:

50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,2 % NP-40 in dH₂O

STEN-NaCl-Puffer:

50 mM Tris pH 7,6; 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,2 % NP-40 in dH₂O

STEN-SDS-Puffer:

50 mM Tris pH 7,6; 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,2 % NP-40, 0,1 % (w/v) SDS in dH₂O

Protein-A-Sepharose Suspension (PAS):

100 mg/ml Protein-A gebunden an Sepharose CL-4B und 2 mg/ml BSA in STEN-Puffer

SDS-Probenpuffer (2fach):

20 % Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 5 % β -Mercaptoethanol, 125 mM Tris pH 6,8; 0,005 % Bromphenol blau

Gesamtproteinlysate oder Membranproteinlysate wurden nach der Abzentrifugation unlöslicher Bestandteile (2.5.1.1) zur Vorreinigung mit 25 μ l Protein-A Sepharose (PAS) versetzt und 30 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die PAS und unspezifisch gebundene Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (16000 g, 20 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem entsprechenden AK in der unter 2.2.4.1 angegebenen Konzentration und 25 μ l PAS für 3-4 h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Konditionierte Medien wurden nicht vorgereinigt, sondern direkt mit AK und PAS über Nacht inkubiert. Das Immunopräzipitat wurde durch Zentrifugation (4000 g, 5 min, 4°C) sedimentiert und der Überstand wurde aspiriert. Nacheinander wurde das Immunopräzipitat je 15 min, mit je 1ml STEN-NaCl-Puffer, STEN-SDS-Puffer und STEN-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschritt wurde, wie oben beschrieben, zentrifugiert und die Überstände wurden aspiriert.

Die Pellets wurden anschließend mit 15 μ l 2fach SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (2.5.3.3) und Western Blot (2.5.3.5) oder Fluorografie (2.5.3.6) analysiert.

2.5.3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Polyacrylamid Gele :

Trenngel-Puffer (4fach „lower Tris“):

1,5 M Tris pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS in dH₂O

Sammelgel-Puffer (4fach „upper Tris“):

0,5 M Tris pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS in dH₂O

Acrylamid-Lösung:

40 % (w/v) Acrylamid-BIS-Acrylamid 37,5:1 in dH₂O

Ammoniumpersulfat Lösung (APS):

10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in dH₂O

Zusammensetzung der Gel-Lösungen für 2 Minigelte (0,75 mm)

| | 8 %- Trenngel | 10 %- Trenngel | 12 %- Trenngel | Sammelgel |
|--------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------|
| Trenngel- /Sammelgel-Puffer | 4,0 ml | 4,0 ml | 4,0 ml | 2,5 ml |
| Acrylamid-Lsg. | 3,2 ml | 4,0 ml | 4,8 ml | 0,9 ml |
| dH ₂ O | 8,8 ml | 8,0 ml | 7,2 ml | 6,5 ml |
| 10 % APS-Lsg. | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl |
| TEMED | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl |

SDS-Probenpuffer (4fach):

40 % Glycerin, 8 % (w/v) SDS, 10 % β-Mercaptoethanol, 250 mM Tris pH 6,8; 0,01 % Bromphenol blau

SDS-Probenpuffer (2fach):

20 % Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 5 % β-Mercaptoethanol, 125 mM Tris pH 6,8; 0,005 % Bromphenol blau

Elektrophoresepuffer ohne SDS (10fach):

250 mM Tris, 1,92 M Glycin in dH₂O

Elektrophoresepuffer (1fach):

25 mM Tris, 0,2 M Glycin und 0,1 % (w/v) SDS in dH₂O

Die eindimensionale Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem (Laemmli, 1970). Proteine werden entsprechend ihrer apparenten molekularen Masse aufgetrennt.

Zur SDS-PAGE wurde ein Minigelsystem mit einer Sammelgelstrecke von 0,5-1 cm und einer Trenngelstrecke von ca. 7 cm verwendet. SDS-Gele mit 10 Probenaschen und einer Dicke von 0,75 mm oder 15 Probenaschen und einer Dicke von 1,5 mm wurden eingesetzt. Der Anteil des Polyacrylamids ist entscheidend für die Vernetzung der Gele und damit für die Trennfähigkeit. Je höher der Anteil des Acrylamids, angegeben in Prozent, desto kleinere Proteine können aufgetrennt werden; 10 %ige SDS-Gele trennen Proteine bis zu einem Molekulargewicht von 20 kDa. Die Prozentigkeit der SDS-Gele ist bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

Die Glasplatten wurden vor der Verwendung mit Seifenlösung und Isopropanol von Proteinen und Gelrückständen befreit, entsprechend der Herstellerbeschreibung zusammengebaut und in Gießständer eingesetzt. Das Trenngel wurde bis zu einer Höhe von ca. 2 cm unterhalb des oberen Glasplattenrandes gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurde das Isopropanol dekantiert und Reste mit Filterpapier entfernt. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und ein Probenaschenkamm eingefügt. Nach der vollständigen Polymerisierung des Sammelgels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Trennkammer eingesetzt. Elektrophoresepuffer wurde in die Anoden- und Kathodenkammer gefüllt. Die Probenaschen wurden vor dem Laden der Proben mit Elektrophoresepuffer gespült.

Die in Probenpuffer aufgenommenen Proben wurden vor dem Einbringen in die Probenaschen 5 min bei 95°C erhitzt. Nicht gelöstes Material wurde durch Zentrifugation (16000 g, 2 min) abgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurden 10 µl „Rainbowmarker“ geladen. Anode und Kathode wurden mit der Spannungsquelle verbunden. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V.

2.5.3.4 Tris-Tricine-Gelelektrophorese

Elektrophoresepuffer für Tris-Tricine-Gele mit SDS (10fach):

1 M Tris, 1M Tricine und 1 % (w/v) SDS in dH₂O

Zur Auftrennung von niedermolekularen Proteinen wurde das Tris-Tricine-Gelsystem der Firma Novex/Invitrogen nach Schägger und von Jagow (Schägger und von Jagow, 1987) unter Verwendung von 10-20 %igen Tris-Tricine-Fertiggelen entsprechend der Anweisung des Herstellers eingesetzt.

Als Anoden- und Kathodenpuffer wurde Tris-Tricine-Elektrophoresepuffer eingesetzt, die Proben wurden in SDS-PAGE Probenpuffer (2.5.3.3) aufgenommen und 5 min bei 95°C erhitzt. Als Molekulargewichtsstandard wurden 10 µl „Low-Range Molekulargewichtsmarker“ eingesetzt. Die Elektrophorese wurde wie unter 2.5.3.3 beschrieben durchgeführt.

2.5.3.5 Western Blot Analyse

Transferpuffer (1fach):

25 mM Tris, 0,2 M Glycin in dH₂O

TBST-Puffer:

0,3 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,3 % Triton X-100 in dH₂O

Blockierungspuffer:

5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST-Puffer oder 50 % Pferdeserum in TBST-Puffer

Nach der Proteinauftrennung im SDS-Gel mittels Elektrophorese wurden die Proteine in einer Transferkammer aus dem Gel auf eine PVDF- oder Nitrozellulose-Membran übertragen.

Transferaufbau:

Anodenplatte
poröser Schwamm in Transferpuffer äquilibriert
zwei Lagen Gel-Transferpapier in Transferpuffer äquilibriert
Membran in Transferpuffer äquilibriert
SDS-Gel
zwei Lagen Gel-Transferpapier in Transferpuffer äquilibriert
poröser Schwamm in Transferpuffer äquilibriert
Kathodenplatte

Der Transfer wurde bei konstantem Stromfluss von 400 mA für 1 h bei 4°C durchgeführt. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen 1 h bei RT in Blockierungspuffer geschüttelt. Die so vorbehandelte Membran wurde anschließend 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit primärem AK, verdünnt in Blockierungspuffer (2.2.4.1), auf einem Schüttler inkubiert. Überschüssiger oder unspezifisch gebundener AK wurde durch 4-mal 15 min Waschen der Membran mit TBST-Puffer entfernt. Der entsprechende HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper (2.2.4.1) wurde ebenfalls in Blockierungspuffer verdünnt und 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Schließlich wurde erneut 4-mal je 15 min mit TBST-Puffer gewaschen und kurz mit dH₂O nachgespült. Die Detektion der mit den Antikörpern gekoppelten Proteine erfolgte mit Hilfe der ECL Technik nach Angaben des Herstellers. Zum Nachweis schwacher Signale wurde der sensitive „ECL-Plus Western Blotting Kit“ verwendet. Die Chemilumineszenzsignale wurden mit Kodak-X-Omat DS Röntgenfilmen detektiert.

2.5.3.6 Fluorografische Analyse radioaktiv markierter Proteine

Fixierlösung

25 % Isopropanol und 10 % Essigsäure in dH₂O

Die zur radioaktiven Markierung eingesetzten Isotope [³⁵S] und [³H] sind niederenergetische Strahler, ein direkter autoradiografischer Nachweis ist kaum möglich, durch Einsatz eines Szintillators können die Signale von [³H] 1000fach und die von [³⁵S] 10fach erhöht werden.

Radioaktiv markierte, immunopräzipitierte Proteine wurden in der SDS-PAGE oder im Tris-Tricine-Gelsystem aufgetrennt. Die Proteine wurden, durch 30 min Inkubation der Gele in der Fixierlösung, im Gel fixiert. Zur Verstärkung der radioaktiven Signale, durch Umwandlung der radioaktiven Strahlung in Lichtsignale wurden die Gele 30 min in AmplifyTM-Lösung inkubiert und auf Transfer Papier im Gelrockner bei 80°C 1h getrocknet. Der fluorografische Nachweis der radioaktiven Proteine erfolgte mit Hilfe von Röntgenfilmen. Die Röntgenfilme wurden auf die getrockneten Gele aufgelegt und in Filmkassetten bei -80°C inkubiert, nach gewünschter Inkubationszeit wurden die Filme entwickelt. Die Exposition bei -80°C erhöht die Sensitivität des Films für schwache Lichtsignale.

2.5.3.7 Quantifizierung radioaktiv markierter Proteine

Radioaktiv markierte Proteine wurden nach der SDS-PAGE, der Fixierung im Gel, der Verstärkung der Signale und dem Trocknen des Gels, mit Hilfe des Phosphor-Imagers quantifiziert. Die getrockneten Gele wurden in Phosphor-Imager Kassetten mit einer radioaktivitätssensitiven Folie inkubiert. Auf der Folie wurden die radioaktiven Signale gespeichert und im Phosphor-Imager konnten die Intensitäten der Signale gemessen werden. Die Banden der zu quantifizierenden Proteine wurden markiert und die Intensitäten berechnet. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Verhältnisse von verschiedenen Proteinen quantifiziert, so konnte auf eine Normierung auf einen externen Standard verzichtet werden.

Für alle Quantifizierungen wurden 3fach Bestimmungen angesetzt, Mittelwerte und Standardabweichungen wurden angegeben.

2.5.4 Metabolische radioaktive Markierung von Proteinen

2.5.4.1 Langzeitmarkierung von HEK 293 Zellen mit [³⁵S]Methionin/Cystein

Medium für radioaktive Markierungen („pulse“-Medium):

1 % Penicillin/Streptomycin in MEM (ohne Methionin, mit Glucose, L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat)

Medium für radioaktive Langzeitmarkierungen:

5 % dialysiertes FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin in MEM (ohne Methionin, mit Glucose, L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat)

Die entsprechenden HEK 293 Zelllinien wurden in 6 cm Schalen bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Das Kulturmedium wurde aspiriert und durch 2 ml methioninfreies „pulse“-Medium ersetzt, die Zellen wurden 1 h bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert. Das „pulse“-Medium wurde anschließend vollständig entfernt und durch 1,5 ml methioninfreies Medium für radioaktive Langzeitmarkierungen, mit 5 % dialysiertem Serum, ersetzt. 20 µl Promix wurden je Kulturschale zugesetzt, damit ergibt sich eine Konzentration von 7 MBq [³⁵S]Methionin/Cystein /ml. Nach 4 h Inkubation bei 37°C im CO₂-Inkubator wurde das konditionierte Medium abgenommen und nach Zentrifugation (16000 g, 20 min, 4°C) direkt zur Immunopräzipitation (2.5.3.2) eingesetzt oder bei -20°C eingefroren. Bei Bedarf wurden die Zellen mit STEN-Lysepuffer lysiert (2.5.1.1) und die zu untersuchenden Proteine ebenfalls immunopräzipitiert. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (2.5.3.3) und Fluorografie des Gels (2.5.3.6).

2.5.4.2 Langzeitmarkierung von MDCK Zellen mit [³⁵S]Methionin/Cystein

Medium für radioaktive Markierungen („pulse“-Medium):

1 % Penicillin/Streptomycin in MEM (ohne Methionin, mit Glucose, L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat)

Medium für radioaktive Langzeitmarkierungen:

5 % dialysiertes FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin in MEM (ohne Methionin, mit Glucose, L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat)

Die entsprechenden MDCK Zelllinien wurden in Filterkammern mit 24 mm Durchmesser polarisiert, zur radioaktiven Markierung wurde das Kulturmedium aspiriert und durch methioninfreies „pulse“-Medium ersetzt (apikal 1,5 ml, basolateral 2,6 ml), die Zellen wurden 45 min bei 37°C im CO₂-Inkubator vorinkubiert. Das „pulse“-Medium wurde anschließend vollständig entfernt und apikal durch 1,5 ml methioninfreies Medium für radioaktive Langzeitmarkierungen, mit 5 % dialysiertem Serum, ersetzt. Für das basolaterale Medium wurden 4 MBq [³⁵S]Methionin/Cystein /ml zu dem Medium für radioaktive Langzeitmarkierungen zugesetzt und 2,6 ml je Filterkammer eingesetzt. Polarisierte MDCK Zellen nehmen Aminosäuren fast ausschließlich basolateral auf. Nach 4 h Inkubation bei 37°C im CO₂-Inkubator wurde das konditionierte apikale und basolaterale Medium getrennt abgenommen und nach Zentrifugation (16000 g, 20 min, 4°C) direkt zur Immunopräzipitation (2.5.3.2) eingesetzt bzw. bei -20°C eingefroren. Für die Amyloid-Bestimmung mussten apikale und basolaterale Medien von 3 Filtern vereinigt werden. Bei Bedarf wurden die Zellen mit STEN-Lysepuffer lysiert (2.5.1.1).

2.5.4.3 „Pulse/chase“-Markierung von HEK 293 Zellen

Medium für radioaktive Markierungen („pulse“-Medium):

1 % Penicillin/Streptomycin in MEM (ohne Methionin, mit Glucose, L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat)

Medium für radioaktive Markierungen („chase“-Medium):

Grundmedium mit 5fach erhöhter Methioninkonzentration (1 mM)

PBS-Puffer:

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄ in dH₂O, pH 7,4; autoklaviert

Die entsprechenden HEK 293 Zelllinien wurden in 6 cm Schalen bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Nach Entfernung des Kulturmediums, wurden die Zellen 1 h mit 2 ml „pulse“-Medium bei 37°C im CO₂-Inkubator vorinkubiert. Das „pulse“-Medium wurde durch 7 MBq [³⁵S]Methionin/Cystein /ml haltigem „pulse“-Medium ersetzt. Nach 10-15 min Inkubation bei 37°C im CO₂-Inkubator, wurde das radioaktive Medium sofort abgenommen, die Zellen mit 2 ml „chase“-Medium gewaschen und 1,5 ml frisches „chase“-Medium zugegeben. Zu den angegebenen „chase“-Zeitpunkten wurde der Zellrasen sofort mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und mit STEN-Lysepuffer lysiert (2.5.1.1). Die Lysate wurden direkt für die Immunopräzipitation (2.5.3.2) verwendet und die zu den verschiedenen „chase“-Zeitpunkten

gesammelten Medien wurden bei Bedarf ebenfalls immunopräzipitiert. Die Analyse der Proteine erfolgte in der SDS-PAGE (2.5.3.3) und Fluorografie (2.5.3.6).

2.5.4.4 „Pulse/chase“-Markierung von MDCK Zellen

Medium für radioaktive Markierungen („pulse“-Medium):

1 % Penicillin/Streptomycin in MEM (ohne Methionin, mit Glucose, L-Glutamin, ohne Na-Pyrovate)

Medium für radioaktive Markierungen („chase“-Medium):

Grundmedium mit 5fach erhöhter Methioninkonzentration (1 mM)

PBS-Puffer:

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄ in dH₂O, pH 7,4; autoklaviert

Die entsprechenden MDCK Zelllinien wurden in Filterkammern mit 24 mm Durchmesser polarisiert, zur radioaktiven Markierung wurde das Kulturmedium aspiriert und durch methioninfreies „pulse“-Medium ersetzt (apikal 1,5 ml, basolateral 2,6 ml). Die Zellen wurden 45 min bei 37°C im CO₂-Inkubator vorinkubiert. Das „pulse“-Medium wurde anschließend vollständig entfernt und die Filter wurden nach kurzer Trocknung auf Filterpapier in eine 10 cm Kulturschale je auf einen 50 µl Tropfen, bestehend aus 20 µl Promix und 30 µl „pulse“-Medium (10,6 MBq [³⁵S]Methionin/Cystein), überführt. Apikal wurden 150 µl „pulse“-Medium auf den Zellmonolayer pipettiert, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Die Filter wurden 10 min bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert, nach der „pulse“-Inkubation wurden die Filter in ihre Kulturschale zurückgesetzt und mit „chase“-Medium gewaschen. Für den „chase“-Zeitpunkt „0 min“ wurde der Filter sofort mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und lysiert. Für jeden gewünschten „chase“-Zeitpunkt wurde ein Filter eingesetzt. Die verschiedenen Ansätze wurden entsprechend der jeweiligen „chase“-Zeit bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert, anschließend wurde das konditionierte Medium abgenommen, der Zellmonolayer sofort mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und die Zellen mit STEN-Lysepuffer lysiert. Medien und STEN-Lysate wurden immunopräzipitiert, in der SDS-PAGE (2.5.3.3) und Fluorografie (2.5.3.6) analysiert.

2.5.4.5 Markierung von MDCK Zellen mit [³H]Phenylalanin und Radiosequenzierung

Medium ohne Phenylalanin (2fach Stocklösung):

Die Herstellung erfolgte unter Verwendung des MEM Select-Amine Kit nach den Anweisungen des Herstellers.

Die entsprechende MDCK Zelllinie wurde in Filterkammern mit 24 mm Durchmesser polarisiert, zur radioaktiven Markierung wurde das Kulturmedium aspiriert und durch phenylalaninfreies Medium ersetzt (apikal 1,5 ml, basolateral 2,6 ml), die Zellen wurden 45 min bei 37°C im CO₂-Inkubator vorinkubiert. Das Medium wurde anschließend vollständig entfernt und apikal durch 1,5 ml phenylalaninfreies Medium mit 5 % dialysiertem Serum ersetzt. Für die basolaterale radioaktive Markierung wurde phenylalaninfreies, 2fach Medium mit 5 % dialysiertem FKS und 1:1 mit [³H]Phenylalanin (37 MBq/ml) supplementiert, eingesetzt. Nach 4 h Inkubation bei 37°C im CO₂-Inkubator wurde das konditionierte basolaterale Medium abgenommen und nach Zentrifugation (16000 g, 20 min, 4°C) direkt zur Immunopräzipitation

mit AK 3926 eingesetzt (2.2.4.1). Das Immunopräzipitat wurde im Tris-Tricine Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert (2.5.3.5). Parallel wurde eine Markierung mit [³⁵S]Methionin/Cystein (2.5.4.2) durchgeführt und die [³⁵S]-markierten Immunopräzipitate wurden neben der [³H]-markierten Probe im Tris-Tricine-Gel geladen, um die [³H]-markierten Proteine auf der Membran besser lokalisieren zu können. Zum Nachweis der radioaktiven Proteine wurden sensitive Röntgenfilme (BioMax TMMR) verwendet. Die Exposition erfolgte bei -80°C.

Radiosequenzierung:

Die [³H]-markierten Protein-Banden wurden mit einem Skalpell aus der PVDF Membran ausgeschnitten. Die an die Membran gebundenen Proteine wurden einem automatisierten Edman-Abbau (Applied Biosystems, Sequenzierer Model 475) unterzogen. Die erhaltenen Aminosäure-Thiohydantoin wurden mit n-Butylchlorid extrahiert und in 6 ml Szintillationsgefäße überführt. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte unter Zusatz von 5 ml Szintillationscocktail im Szintillationszähler. Die Radiosequenzierung wurde von Dr. David Teplow (Harvard Medical School, Brigham and Women`s Hospital, Boston) durchgeführt.

2.5.5 Analyse der Protein-Glycosylierung

2.5.5.1 N-Glycosidase F Behandlung

N-Glycosidase F-Puffer:

100 mM Natrium-Phosphat, pH 8,0; 25 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100, 2,5 mM PMSF in dH₂O

„Beads“-Elutionspuffer:

100 mM Tris pH 7,5; 1 % (w/v) SDS, 1 % β-Mercaptoethanol

HEK 293 Zelllinien oder MDCK Zelllinien wurden im „pulse/chase“-Experiment mit [³⁵S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert (2.5.4.3 / 2.5.4.4). Die „pulse“ und „chase“ Zeiten sind bei den jeweiligen Experimenten angegeben. Gesamtproteinlysate wurden hergestellt (2.5.1.1) und die zu deglycosylierenden Proteine wurden durch Immunopräzipitation mit dem entsprechenden AK (2.5.3.2) isoliert. Mit 20 µl „beads“-Elutionspuffer bei 10 min Erhitzung auf 95°C wurden die präzipitierten Proteine von der PAS abgetrennt. Die PAS wurde durch Zentrifugation pelletiert (16000 g, 5 min), und je 10 µl des Eluats wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Reaktions- und Kontrollansatz wurden 90 µl N-Glycosidase F-Puffer und zum Reaktionsansatz zusätzlich 1µl N-Glycosidase F (1 U/µl) pipettiert. Reaktions- und Kontrollansätze wurden 16 h bei 37°C, 700 UpM auf einem Thermoschüttler inkubiert, anschließend wurde die Reaktion durch TCA-Fällung gestoppt (2.5.3.1). Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Fluorografie (2.5.3.6).

2.5.5.2 Endoglycosidase H Behandlung

Endoglycosidase H-Puffer:

200 mM Natriumcitrat pH 5,8; 2,5 mM PMSF in dH₂O

„Beads“-Elutionspuffer:

100 mM Tris pH 7,5; 1 % (w/v) SDS, 1 % β-Mercaptoethanol

Die Proteine wurden wie unter 2.5.5.1 beschrieben radioaktiv markiert und isoliert. Je 10 µl des Eluats für den Reaktions- und den Kontrollansatz wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu beiden Ansätzen wurden 90 µl Endoglycosidase H-Puffer, 1 µl 1M PMSF und zum Reaktionsansatz zusätzlich 1 µl Endoglycosidase H (5 U/ml) pipettiert. Reaktions- und Kontrollansätze wurden 16 h bei 37°C, 700 UpM auf einem Thermoschüttler inkubiert, anschließend wurde die Reaktion durch TCA-Fällung gestoppt (2.5.3.1). Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Fluorografie (2.5.3.6).

2.5.5.3 Tunicamycin Behandlung

Tunicamycin (Stocklösung 1000fach):

10 mg/ml in DMSO

HEK 293 Zelllinien wurden im „pulse/chase“-Experiment in Gegenwart von 10 µg/ml Tunicamycin mit [³⁵S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert (2.5.4.3). Sowohl die Präinkubation in methioninfreiem Medium, als auch „pulse“ und „chase“ wurden in Gegenwart von Tunicamycin durchgeführt. Zu den angegebenen „chase“-Zeitpunkten wurden Gesamtproteinlysate hergestellt (2.5.1.1) und die fraglichen Proteine wurden immunopräzipitiert (2.5.3.2). Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (2.5.3.3) und Fluorografie (2.5.3.6).

2.5.6 Analyse zellulärer Transport Mechanismen

2.5.6.1 Behandlung von HEK 293 Zellen mit Brefeldin A und Monensin

Brefeldin A (BFA), (Stocklösung 500fach):

5 mg/ml BFA in EtOH

Monensin (Stocklösung 1000fach):

10 mM Monensin in EtOH

HEK 293 Zelllinien wurden im „pulse/chase“-Experiment mit [³⁵S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert (2.5.4.3). Während der auf 2 h verlängerten Präinkubation mit methioninfreiem Medium wurden bereits BFA (10 µg/ml) bzw. Monensin (10 µM) zugesetzt. Auch der 15 min „pulse“ und der „chase“ entsprechend der angegebenen „chase“-Zeiten wurde in Gegenwart von BFA bzw. Monensin durchgeführt. Gesamtproteinlysate wurden mit STEN-Lysepuffer hergestellt (2.5.1.1)

und die zu untersuchenden Proteine wurden mit den im Experiment angegebenen AK immunopräzipitiert (2.5.3.2). Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (2.5.3.3) und Fluorografie (2.5.3.6).

2.5.6.2 Behandlung von HEK 293 mit Furininhibitor und Calcium-Ionophor

Furininhibitor (Stocklösung 200-1000fach):

10 mM Furin-Inhibitor „Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketon“ in MeOH

Calcium-Ionophor A23187 (Stocklösung 1000fach):

5 mM Calcium-Ionophor in DMSO

Calciumfreies Medium:

5 % dialysiertes FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin in DMEM (mit Glucose und Na-Pyruvat, ohne L-Glutamin und CaCl₂)

Medium für radioaktive Markierungen („pulse“-Medium):

1 % Penicillin/Streptomycin in MEM (ohne Methionin, mit Glucose, L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat)

HEK 293 Zelllinien wurden vor der Durchführung des „pulse/chase“-Experiments für 10 h mit 10 µM und 50 µM Furin-Inhibitor bzw. 5 µM Calcium-Ionophor behandelt. Die Behandlung mit Calcium-Ionophor erfolgte in calciumfreiem Medium. Während der Präinkubation in methioninfreiem Medium, der 15 min „pulse“-Zeit und der „chase“-Zeit wurden die Inhibitoren zugesetzt. Für die Präinkubation in methioninfreiem Medium und für die „pulse“ Markierung konnte in der Calcium-Ionophor Behandlung kein calciumfreies Medium eingesetzt werden, für die „chase“-Inkubation wurde hingegen calciumfreies Medium eingesetzt. Die jeweiligen „chase“-Zeiten sind im Experiment angegeben. Gesamtproteinlysate wurden mit STEN-Lysepuffer hergestellt (2.5.1.1) und die zu untersuchenden Proteine wurden mit den im Experiment angegebenen AK immunopräzipitiert (2.5.3.2). Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (2.5.3.3) und Fluorografie (2.5.3.6).

2.5.6.3 Biotinylierung von apikalen und basolateralen Oberflächenproteinen polarisierter MDCK Zellen.

PBS-Puffer:

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄ in dH₂O, pH 7,4; autoklaviert

PBS/Ca/Mg-Puffer:

1mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂ in PBS-Puffer

Biotin-Lösung:

1 mg/ml sulfo-NHS-LC-biotin in PBS/Ca/Mg-Puffer

BSA-Lösung:

1 % (w/v) BSA in PBS/Ca/Mg-Puffer

Glycin/BSA-Lösung:

10 mM Glycin, 1 % (w/v) BSA in PBS/Ca/Mg-Puffer

Die entsprechenden MDCK Zelllinien wurden in Filterkammern mit 24 mm Durchmesser polarisiert, zur Biotinylierung wurde das Kulturmedium aspiriert und der Zellmonolayer apikal und basolateral 3-mal mit eiskaltem PBS/Ca/Mg-Puffer gewaschen. Der Zellmonolayer wurde anschließend entweder apikal mit 1,5 ml oder basolateral mit 2,6 ml frisch hergestellter Biotin-Lösung 1 h auf Eis inkubiert. Auf die jeweils nicht zu biotinylierende Seite wurde BSA-Lösung gegeben. Nach der Inkubation wurde der Zellmonolayer apikal und basolateral 3-mal mit eiskaltem PBS/Ca/Mg-Puffer gewaschen und dann, zur Absättigung vom ungebundenen Biotin, 30 min mit Glycin/BSA-Lösung inkubiert. Nach zwei weiteren Waschzyklen mit PBS/Ca/Mg-Puffer wurden die Zellen in 1 ml PBS/Ca/Mg-Puffer mechanisch vom Filter abgelöst, pelletiert (1000 g, 5 min) und mit STEN-Lysepuffer lysiert (2.5.1.1). Zur Isolierung der biotinylierten Proteine wurde das Zelllysats mit 25 µl Streptavidin-Sepharose für 2 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Das Streptavidin-Sepharose Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10000 g, 5 min, 4°C) abgetrennt und wie unter 2.5.3.2 beschrieben mit den Waschpuffern der Immunopräzipitation gewaschen. Die so erhaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE (2.5.3.3) getrennt und im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert (2.5.3.5). Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde ein Aliquot des biotinylierten Zelllysats direkt in der SDS-PAGE aufgetrennt.

2.5.6.4 Untersuchung der Endocytose und Transcytose in polarisierten MDCK Zellen

Apikale oder basolaterale Oberflächenproteine polarisierter MDCK Zellen wurden wie unter 2.5.6.3 beschrieben biotinyliert. Zum Nachweis der Sezernierung nach Reinternalisierung und Recycling zur apikalen oder basolateralen Oberfläche wurde der Zellmonolayer in den Filterkammern nach der Biotinylierung mit vorgewärmtem Medium bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurden die konditionierten apikalen und basolateralen Medien getrennt gesammelt und mit Hilfe von Streptavidin-Sepharose Präzipitation (2.5.6.3), SDS-PAGE (2.5.3.3) und Western Blot (2.5.3.5) auf sezerniertes, biotinyliertes I-βAPP untersucht.

2.6 Immunocytochemische Methoden

2.6.1 Immunofluoreszenz von transfizierten, auf Deckgläschen gewachsenen HEK 293 Zellen

PBS-Puffer:

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄ in dH₂O, pH 7,4; autoklaviert

Fixierlösung:

4 % Paraformaldehyd in PBS

NH₄Cl-Lösung:

50 mM NH₄Cl in PBS, mit/ohne 0,2 % Triton X-100

Blocklösung:

5 % (w/v) BSA in PBS

AK-Verdünnungslösung:

1 % (w/v) BSA in PBS

Eindeckellösung

15 % (w/v) Mowiol, 50 mg/ml DABCO in PBS

Die entsprechenden HEK 293 Zellen wurden in einer Verdünnung von 1:4 auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen (2.4.1.3) ausgesät und nach 24-48 h fixiert. Zur Fixierung wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen 2-mal mit PBS-Puffer gewaschen und mit Fixierlösung für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Zellrasen 3-mal mit PBS-Puffer gewaschen und für 10 min mit NH₄Cl-Lösung inkubiert. Zum Öffnen der Zellen wurde NH₄Cl-Lösung mit 0,2 % Triton X-100 eingesetzt. Der Zellrasen wurde erneut 2-mal mit PBS-Puffer gewaschen und 1 h mit Blocklösung bei RT inkubiert. Die Deckgläschen wurden dann auf Parafilm in eine so genannte Feuchtkammer (s.u.) überführt und mit 100 µl der primären AK-Lösung in entsprechender Verdünnung (2.2.4.1) für 1-3 h bei RT inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation mit dem primären AK wurden die Deckgläschen 5-mal mit PBS-Puffer gewaschen und 1 h bei RT mit der sekundären AK-Lösung inkubiert (2.2.4.1). Der sekundäre AK ist gegen die IgG-Spezies des primären AK gerichtet und mit einem Fluorochrom konjugiert. Vor dem Eindeckeln wurden die Deckgläschen erneut 3-mal mit PBS-Puffer und 1-mal mit dH₂O gewaschen, um dann schließlich mit dem Zellrasen nach unten, mit einem Tropfen Eindeckellösung, auf einen Objektträger montiert zu werden.

Bei der Feuchtkammer handelt es sich um eine Petrischale mit 15 cm Durchmesser, die mit Aluminiumfolie abgedunkelt und mit Filterpapier ausgelegt wurde. Vor der Benutzung wird das Filterpapier mit dH₂O befeuchtet und ein ausreichendes Areal für die Inkubation der Deckgläschen mit Parafilm abgedeckt.

Die Fluoreszenzpräparate wurden nach dem Aushärten im Leica DMRB Fluoreszenzmikroskop mit einem 100/1.3 Immersionöl-Objektiv analysiert. Aufnahmen wurden mit einer digitalen Kamera unter Benutzung der MetaView Imaging Software gemacht.

2.6.2 Oberflächenimmunofluoreszenz von transfizierten, in Filterkammern polarisierten MDCK Zellen

PBS-Puffer:

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄ in dH₂O, pH 7,4; autoklaviert

PBS/Ca/Mg-Puffer:

1mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂ in PBS-Puffer

BSA-Lösung:

0,2 % (w/v) BSA in PBS/Ca/Mg-Puffer

Fixierlösung:

4 % Paraformaldehyd in PBS/Ca/Mg-Puffer

NH₄Cl-Lösung:

50 mM NH₄Cl in PBS/Ca/Mg-Puffer

Eindeckellösung

15 % (w/v) Mowiol, 50 mg/ml DABCO in PBS

Die entsprechenden MDCK Zelllinien wurden in Filterkammern mit 12 mm Durchmesser polarisiert. Zur Oberflächenmarkierung wurde der Zellmonolayer 2-mal mit kaltem PBS/Ca/Mg-Puffer gewaschen und apikal oder basolateral bei 4°C, 30 min mit dem gewünschten AK inkubiert. Der zu benutzende AK wurde entsprechend den Angaben in 2.2.4.1 verdünnt. Zur basolateralen Markierung wurden je Filter 50 µl AK-Lösung auf den Parafilm in der Feuchtkammer pipettiert und der Filter auf den AK-Tropfen gesetzt, apikal wurden 150 µl BSA-Lösung auf den Zellmonolayer pipettiert. Zur apikalen Markierung wurde der Filter auf BSA-Lösung gesetzt und apikal wurde die AK-Lösung auf die Zellen pipettiert. Nach der Inkubation mit den primären AK wurden die Filter zurück in die Kulturschale gesetzt, extensiv mit PBS/Ca/Mg-Puffer gewaschen und 30 min bei RT mit Fixierlösung behandelt (apikal 0,25 ml, basolateral 0,75 ml). Anschließend wurden die Filter 2-mal mit PBS/Ca/Mg-Puffer gewaschen, 10 min in NH₄Cl-Lösung inkubiert, erneut 2-mal mit PBS/Ca/Mg-Puffer gewaschen, und 1 h mit BSA-Lösung blockiert. Die Inkubation mit dem sekundären AK erfolgte wie oben beschrieben (2.6.1) in der Feuchtkammer für 45 min bei 37°C. Zum anschließenden Waschen wurden die Filter zurück in die Kulturschale gesetzt und 3-mal mit PBS/Ca/Mg-Puffer gewaschen, danach wurden die Filter mit einem Skalpell aus den Filterkammern herausgeschnitten, kurz in dH₂O gespült, auf Papier getrocknet und mit dem Zellrasen nach oben auf einen Objektträger gebracht. Zum Eindecken wurden 2 Tropfen Eindeckellösung auf den Zellmonolayer gegeben, der mit einem Deckgläschen (18 x 18 mm) abgedeckt wurde.

Aufnahmen wurden mit dem Leica TCS SP Konfokal Laser Mikroskop unter Benutzung eines Plan-Apochromat 100/1.4 Immersionöl-Objektivs gemacht. Für das Fluorochrom Alexa 488 wurden ein Argon Laser mit einer Excitationswellenlänge von 488 nm und ein Emissionsfilter von 490-530 nm eingesetzt. Aufnahmen mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixel wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm Photoshop Version 5.5 weiter prozessiert.

2.7 BACE in vitro Assay

2.7.1 Enzympräparationen

2.7.1.1 Aufreinigung von BACE-L(His)₆ über Nickel-Agarose

PBS-Puffer:

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄ in dH₂O, pH 7,4; autoklaviert

Waschpuffer

20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 6,0 in dH₂O

Elutionspuffer

250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 6,0 in dH₂O

HEK 293 Zellen, die stabil BACE-L(His)₆ exprimieren, wurden in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser kultiviert (2.4.1). Bei einer Konfluenz von 60-80% wurde der Zellrasen mit PBS-Puffer gewaschen und mit 4 ml Optimem/Glutamax-1 für 16-24 h bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde das konditionierte Medium abgenommen, Zellbruchteile wurden abzentrifugiert (5000 g, 20 min, 4°C) und der Überstand mit Ni-Agarose bei 4°C für 1-2 h im Überkopf-Schüttler inkubiert. Je 10 ml konditionierten Mediums wurden 100 µl Ni-Agarose eingesetzt. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Ni-Agarose abzentrifugiert (2500 g, 10 min, 4°C) und im „batch“-Verfahren 3-mal gewaschen. BACE-L wurde anschließend eluiert. Dazu wurden 100 µl Elutionspuffer je 10 ml konditionierten Mediums für 15 min bei RT unter Schütteln mit dem Ni-Agarose Pellet inkubiert. Nach Zentrifugation (10000 g, 5 min, 4°C) wurde der BACE-L enthaltende Überstand abgenommen und auf Eis gelagert.

2.7.1.2 Dialyse von konditioniertem Medium

Na-Acetat-Puffer:

20 mM Na-Acetat pH 4,5

Konditioniertes Medium von HEK 293 Zellen, die stabil BACE-L(His)₆ exprimieren wurde, wie unter 2.7.1.1 beschrieben, gesammelt. Zellbruchteile wurden abzentrifugiert und der Überstand in einem Dialyseschlauch, mit einer Durchlässigkeit < 10 kDa gegen ein 200faches Volumen Na-Acetat-Puffer für 16 h dialysiert.

2.7.1.3 Konzentration von konditioniertem Medium

Konditioniertes Medium von HEK 293 Zellen, die stabil BACE-L(His)₆ exprimieren, wurde, wie unter 2.7.1.1 beschrieben, gesammelt. Zellbruchteile wurden abzentrifugiert und der Überstand in einem Centricon-Konzentrator, mit einer Durchlässigkeit < 10 kDa, ca. 4fach konzentriert.

2.7.1.4 Membranpräparation

MES-Puffer:

1 % Triton X-100, 20 mM MES pH 6,0; incl. Protease-Inhibitor Mix

Membranen wurden wie unter 2.5.1.2 beschrieben hergestellt, das Membranpellet, wurde mit MES-Puffer extrahiert. 2 µl des Membranextrakts wurden für einen Assaysatz eingesetzt.

2.7.2 BACE-L -Substrate

Es wurde bereits gezeigt, dass BACE in der Lage ist Peptidsubstrate zu schneiden (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999). Da die Affinität von BACE zu β APPsw größer ist als zu β APPwt (Citron et al., 1995; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999) wurde als Substrat ein Peptid mit der β APPsw Sequenz gewählt, das die AS von P5-P4' enthält. Das Substrat wurde mit einer fluoreszierenden CyTM3- und einer quenchenden Cy5Q-Gruppe konjugiert. Die quenchende Gruppe hat ein Absorptionsspektrum, das überlappt mit dem Emissionsmaximum der fluoreszierenden Gruppe. Liegen die beiden Gruppen nahe beieinander (< 10 Å), z.B. in einem Molekül oder an den beiden Enden eines Substratpeptids, so wird die Fluoreszenz quenched. Durch Hydrolyse des Peptides wird die fluoreszierende Gruppe von der quenchenden getrennt und die Fluoreszenz wird messbar.

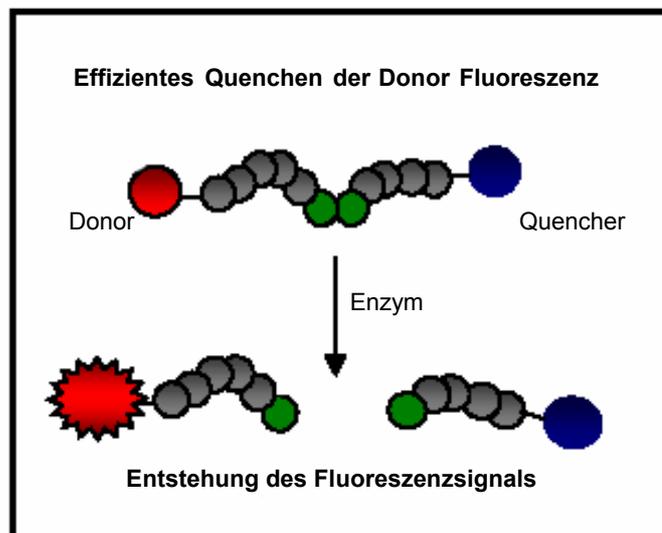


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Entstehung des Fluoreszenzsignals durch Protease Aktivität

Abbildung teilweise entnommen aus dem Amersham Biosciences Poster „Homogeneous Imaging Assay for Measuring Aspartic Proteinase Activity“

Das CyDyeTM Donor-Akzeptor-System hat sich bei Enzym Aktivitäts-Assays und high-throughput Assays bewährt, die Fluorochrome sind bei pH-Werten von 3-10 stabil, wasserlöslich und DMSO tolerant (Osborn, 2002).

2.7.3 Durchführung des BACE-Assay

Der Assay wurde in schwarzen 96-well Mikrotiterplatten angesetzt, und im Fluorometer wurde mit einer Excitation von 530 nm, die Emission bei 570 nm gemessen.

Reaktionsansatz (je „well“):

Enzym: 2,5-10 μ l

Substrat: 100-400 nM

Puffer: 20 mM Na-Acetat, pH 4,5

Messbedingungen:

Methode: Fluorometrie

Typ: Kinetik

Integrationszeit: 20 ms

Messintervall: 30 s (bis 60 min) dann 1 min (bis 120 min)

Messzeit: 30 min, 60 min, 120 min

Filtersatz: Excitation 530 nm, Emission: 570 nm

Die genauen Enzym- und Substratkonzentrationen wurden bei den jeweiligen Experimenten im Ergebnisteil angegeben.

Alle Messreihen wurden im Triplikat angesetzt, in den Auswertungen wurden jeweils die Mittelwerte angegeben. Wahlweise wurden alle Messpunkte (30 s bzw. 60 s Intervall) ohne Standardabweichung oder jeder fünfte Messpunkt (2,5 min bzw. 5 min Intervall) mit Standardabweichung dargestellt.

2.7.3.1 Bestimmung der IC₅₀-Werte von BACE-Inhibitoren

Eine Größe für die Messung der inhibitorischen Wirkung eines Stoffes ist der so genannte IC₅₀-Wert. Dieser Wert gibt die Hemmstoffkonzentration an, bei der die ursprüngliche Enzymaktivität auf 50 % reduziert ist. Für die folgenden Peptidinhibitoren wurden im *in vitro* Assay die IC₅₀-Werte ermittelt.

| Name | Peptidsequenz | MW | Reinheit | Stocklösung in DMSO |
|-------|--|--------|----------|---------------------|
| GL189 | H-EVNstainVAEF-NH ₂ x TFA | 1077,1 | 83 % | 50 mM |
| GL190 | H-EEISEVNstainVAEF-NH ₂ x TFA | 1535,6 | 85 % | 50 mM |

Tabelle 7: Peptidinhibitoren für BACE

Als Kontrolle für die Spezifität der Inhibitoren wurde folgender Proteaseinhibitor-Mix (PI-Mix) eingesetzt, angegeben ist die Endkonzentration im Assay:

| | |
|--------------|-------------|
| Aprotinin | 0,5 μ M |
| Bestatin | 100 μ M |
| E 64 | 5 μ M |
| EDTA | 500 μ M |
| Leupeptin | 5 μ M |
| Pepstatin A | 5 μ M |
| Phospoamidon | 100 μ M |
| PMSF | 1 mM |

| Fluorochrom | Absorption [nm] | Emission [nm] | Extinktionskoeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹] | MW |
|----------------|-----------------|---------------|---|-------|
| Cy3 (Akzeptor) | 550 | 570 | 150000 | 765,9 |
| Cy5Q (Donor) | 644 | --- | --- | 907 |

Tabelle 5: Eigenschaften der eingesetzten Fluorochrome

Die folgenden Peptide mit gleicher β APPsw AS Sequenz aber unterschiedlicher Kettenlänge wurden von der Fa. Amersham generiert. Ferner wurde ein nicht durch BACE schneidbares Peptid (Citron et al., 1995; Vassar et al., 1999) mit einem AS Austausch an Position P1 von Leu zu Val als Kontrollpeptid, für die Spezifität der Reaktion generiert.

| Name | Peptidsequenz | MW | Reinheit | Stocklösung in DMSO |
|-----------|---|------|----------|----------------------|
| Cy3 | Cy3-S-E-V-N-L-D-A-E-F-K(Cy5Q)-NH ₂ | 2556 | 93,9 % | 1mg/ml 367,4 μ M |
| Cy3 R | Cy3-R-S-E-V-N-L-D-A-E-F-K(Cy5Q)-R-OH | 2911 | 99,7 % | 1mg/ml 342,5 μ M |
| Cy3 RR | Cy3-S-E-V-N-L-D-A-E-F-R-K(Cy5Q)-R-R-OH | 3025 | 99,1 % | 1mg/ml 327,6 μ M |
| Cy3Kontr. | Cy3-S-E-V-K-V-D-A-E-F-K(Cy5Q)-NH ₂ | 2556 | 99,5 % | 1mg/ml 389,3 μ M |

Tabelle 6: CyDye-Peptid-Substrate für den BACE *in vitro* Assay

Die β APP-Sequenz ist blau, die β APPsw-Sequenz grün und der AS-Austausch zum nicht schneidbaren Kontrollpeptid rot dargestellt.

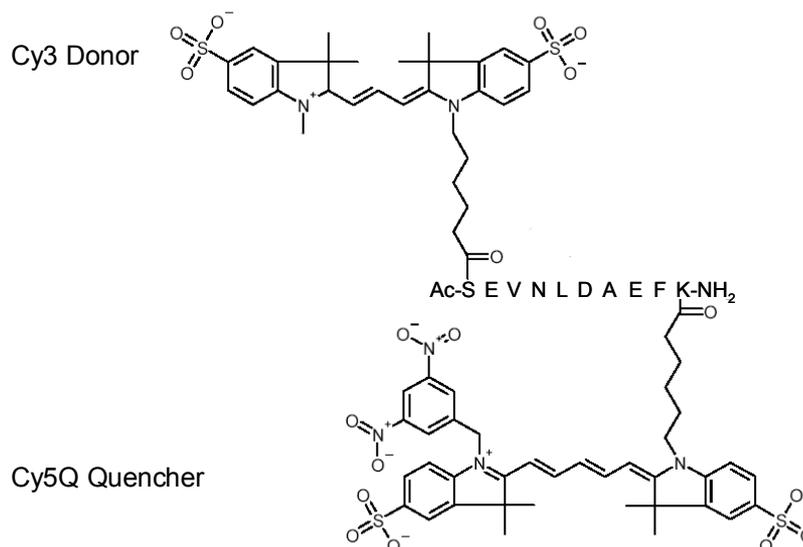


Abbildung 15: Schema der BACE-CyDye-Substrate

Abbildung teilweise entnommen aus dem Amersham Biosciences Poster „Improving MMP Protease Assay using a CyDye Peptide Substrate“.

3 Ergebnisse

3.1 Expression und Nachweis von BACE

3.1.1 Expression von BACE in HEK 293 Zellen und MDCK Zellen

Für die Charakterisierung der Aspartylprotease BACE, durch die Analyse der sekundären Modifikationen im Hinblick auf Aktivität, subzelluläre Lokalisierung und intrazellulären Transport, musste ein geeignetes Modellsystem für die Expression von BACE ausgewählt werden. In zahlreichen vorangegangenen Arbeiten konnte für das Substrat von BACE, β APP, gezeigt werden, dass in Zellkulturen die Prozessierung sehr ähnlich mit der *in vivo* Prozessierung ist. Dies ist unabhängig davon ob β APP endogen vorliegt oder exogen überexprimiert wird (Busciglio et al., 1993; Haass et al., 1992b; Koo und Squazzo, 1994; Shoji et al., 1992). Ebenso ist die prinzipielle Prozessierung von β APP in Zellen unterschiedlicher Gewebe identisch (Haass et al., 1992b).

Für viele Studien wurden und werden humane, embryonale Nierenzellen (HEK 293, human embryonic kidney) zur Untersuchung der proteolytischen Prozessierung von β APP eingesetzt (Citron et al., 1992; Haass et al., 1992b; Seubert et al., 1993; Shoji et al., 1992; Vassar et al., 1999). So wurden die α -, β -Sekretase und der γ -Sekretase-Komplex in HEK 293 Zellen charakterisiert (Capell et al., 1998; Citron et al., 1992; Citron et al., 1995; Haass et al., 1995a; Lammich et al., 1999; Steiner et al., 2002), und BACE wurde unter anderem mit Hilfe dieses Zellsystems kloniert (Vassar et al., 1999).

Damit wird die HEK 293 Zelllinie hier als geeignetes Modellsystem zur Charakterisierung von BACE eingesetzt. BACE ist in HEK 293 Zellen endogen nur sehr schwach exprimiert (Lin et al., 2000; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999) und mit den üblichen proteinbiochemischen Methoden schwer nachweisbar, deshalb wurde BACE cDNA und die in der folgenden Arbeit genannten BACE cDNA-Konstrukte stabil transfiziert.

Um die Analyse der β APP-Prozessierung zu erleichtern, wurden die BACE cDNA-Konstrukte in eine HEK 293 Zelllinie transfiziert, die bereits stabil die neuronale Isoform β APP₆₉₅ überexprimiert (1.3.1) (Haass et al., 1992b). Durch die Überproduktion des exogenen β APP₆₉₅ ist der Nachweis der β APP-Prozessierungsprodukte und damit die Überprüfung der Aktivität der BACE-Varianten erleichtert. Ferner lässt sich die exogene Isoform β APP₆₉₅, aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts, leicht von der endogenen Hauptsplicevariante β APP₇₅₁ unterscheiden.

Für die Untersuchung des polarisierten Transports von BACE wurde auf ein bewährtes, einfaches Modellsystem zurückgegriffen, die in Filterkammern gewachsenen, polarisierten MDCK Zellen (1.5.1). Auch dieses Modellsystem wurde bereits für die Untersuchung des polarisierten β APP-Transports eingesetzt (De Strooper et al., 1995a; Haass et al., 1995c; Haass et al., 1994a; Lo et al., 1994). BACE wurde stabil in MDCK Zellen exprimiert, die bereits mit β APP₆₉₅ oder β APP₆₉₅ Δ C (der C-Terminus von β APP ist deletiert) cDNA stabil transfiziert waren

(Haass et al., 1995c; Haass et al., 1994a), um den Einfluss von BACE auf die Prozessierung von β APP besser analysieren zu können. Zusätzlich konnte der Einfluss des β APP Transports auf die Prozessierung durch BACE untersucht werden.

Der Vorteil des MDCK Modellsystems gegenüber polarisierten, primären, neuronalen Kulturen besteht darin, dass stabile mit gewünschten cDNA-Konstrukten transfizierte Zelllinien hergestellt werden können. Stabile Zelllinien mit moderater Expression des gewünschten Proteins gewährleisten, dass die Sortiermaschinerie der Zelle kein limitierender Faktor für den gerichteten Transport wird. Ein weiterer Vorteil ist die räumliche Trennung der polarisierten Plasmamembranen in apikale und basolaterale Plasmamembran und die daraus resultierende Trennung der extrazellulären Räume. Aufgrund dessen ist neben einer immunocytochemischen Analyse des BACE-Transports, wie sie auch in Neuronen möglich wäre, zusätzlich eine biochemische Analyse möglich. Außerdem kann aufgrund der getrennten extrazellulären Räume die polarisierte β APP-Prozessierung genau untersucht werden, die apikalen und basolateralen Kulturüberstände können auf sezernierte β APP-Prozessierungsprodukte analysiert werden. Nachteile des MDCK Modellsystems sind, dass die Sortierungsmechanismen der Epithelzellen denen der neuronalen Zellen ähnlich (Dotti und Simons, 1990) aber nicht mit ihnen identisch sind (Winckler und Mellman, 1999) und dass die relevanten Zellen für die Entstehung der Alzheimer Krankheit Neuronen sind.

3.1.2 Antikörper zum Nachweis von BACE

In der folgenden Arbeit wurden unter anderem BACE cDNA-Konstrukte eingesetzt, die mit einer bekannten für den C-Terminus des Myc-Proteins kodierenden Sequenz und der Sequenz für sechs Histidine konjugiert sind. BACE wurde mit dem Myc-Epitop konjugiert, um kommerziell erhältliche Anti-myc-Antikörper, wie den monoklonalen AK 9E10, gegen das Fusionsprotein einsetzen zu können (2.2.4.1). Die 6 Histidine wurden zur Aufreinigung des löslichen BACE (BACE-L) über Nickel-Säulenmaterial benötigt (2.7.1.1 / 3.6.1.1). Für die Transfektion von MDCK Zellen werden nicht konjugierte BACE cDNA-Konstrukte eingesetzt, um mögliche Interferenzen des Myc-His-Konjugats mit dem BACE-Transport auszuschließen.

Für den Nachweis des unkonjugierten BACE wurden drei polyklonale Antikörper eingesetzt (Abbildung 16 / 2.2.4.1). AK GM190 gegen das Propeptid (AS₂₂₋₄₅), AK 7523 gegen den Bereich der Ektodomäne, der unmittelbar an das Propeptid angrenzt (AS₄₆₋₆₀), und AK 7520 gegen die cytoplasmatische Domäne (AS₄₈₂₋₅₀₁).

Ergebnisse

ca.70 kDa und eine schwächere Bande bei 65 kDa. In Lysaten untransfizierter HEK 293 Kontrollzellen erkennt kein AK endogenes BACE, es sind aber auch keine nennenswerten Kreuzreaktionen sind zu beobachten (Abbildung 17).

Die Antikörper wurden zusätzlich in der Immunopräzipitation von BACE aus Zelllysaten transfizierter und nicht transfizierter HEK 293 Zellen getestet. Zur Detektion im Western Blot wurde der monoklonale AK 9E10 eingesetzt.

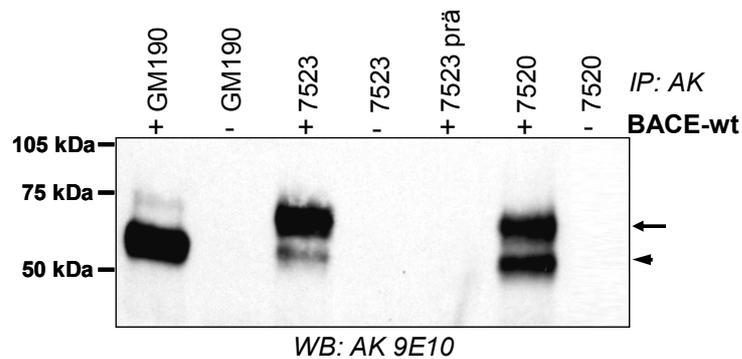


Abbildung 18: Nachweis von BACE in der Immunopräzipitation

Zelllysate von untransfizierten (-) und BACE-wt (myc-His) transfizierten (+) HEK 293 Zellen wurden mit dem jeweils angegebenen AK immunopräzipitiert und für AK 7523 wurde zusätzlich das Präimmenserum eingesetzt (prä). Die Präzipitate wurden in der SDS-PAGE getrennt und der BACE-Nachweis erfolgte im Western Blot mit AK 9E10. Der Pfeil kennzeichnet die 70 kDa Bande, der Pfeilkopf die 65 kDa Bande.

Auch in der Immunopräzipitation reagiert der AK GM190 fast ausschließlich mit der kleineren BACE-Form, während der AK 7523 präferentiell mit der größeren 70 kDa BACE-Form reagiert. Der AK 7520 präzipitiert beide Formen gleich gut (Abbildung 18).

Berechnet ist für BACE ein theoretisches Molekulargewicht von 50 kDa. Die Migration in der SDS-PAGE bei 65 kDa und 70 kDa deutet auf eine sekundäre Modifikation hin. Die Möglichkeit einer Molekulargewichtszunahme durch Konjugation und Maturierung von Zuckern wird später untersucht (3.2.2).

Auffallend ist, dass die kleine Form präferentiell von dem gegen das Propeptid gerichtet AK GM190 erkannt wird, dieses Propeptid scheint in der größeren Form nicht mehr oder kaum noch vorhanden zu sein. AK 7523 gegen die an das Propeptid angrenzende N-terminale Domäne, erkennt besonders gut die größere BACE-Form, das AK Epitop scheint ohne Propeptid besser zugänglich zu sein.

Die Entstehung der größeren BACE-Form und die Differenz aus berechnetem und tatsächlichem Molekulargewicht weisen auf mögliche sekundäre Modifikationen hin.

3.2 Maturierung von BACE durch post-translationale Modifikationen

3.2.1 Kinetik der Maturierung von BACE

Es wurde zunächst untersucht, ob zwischen der Entstehung der BACE-Migrationsformen bei 65 kDa und 70 kDa eine zeitliche Abfolge besteht. Ein Übergang der 65 kDa Form in die 70 kDa Form wäre ein Hinweis auf eine post-translationale Modifikation von BACE. Um die Funktion der BACE-Domänen bezüglich ihrer Rolle für den Transport und evtl. der transportabhängigen Enzymaktivität zu analysieren, wurde ferner untersucht, ob die cytoplasmatische Domäne bzw. die Membranverankerung von BACE für die mögliche Maturierung benötigt werden. Dazu wurden die cDNA-Konstrukte BACE-wt, BACE- Δ C und BACE-L (Abbildung 19) stabil in HEK 293/ β APPwt transfiziert.

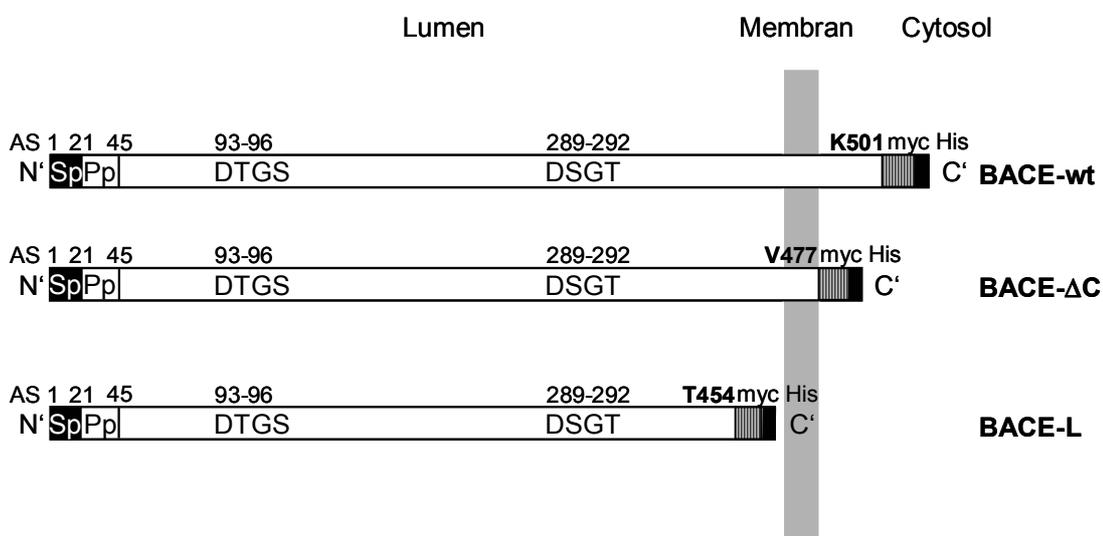


Abbildung 19: Darstellung der eingesetzten BACE-Konstrukte

Alle Konstrukte sind mit der Sequenz für „myc“ und „His“ konjugiert. BACE- Δ C enthält die Transmembrandomäne, nicht aber die cytoplasmatische Domäne von BACE, die BACE-Sequenz endet mit V477. BACE-L enthält weder die Transmembrandomäne, noch die cytoplasmatische Domäne und endet kurz vor der potentiellen Transmembrandomäne mit T454. Signalpeptid, Propeptid und die aktiven Zentren sind gekennzeichnet.

Die Maturierung von BACE wurde in „pulse/chase“-Experimenten analysiert (Abbildung 20 / 2.5.4.3). Eine kleine Population von neu synthetisiertem BACE wurde radioaktiv markiert (pulse) und diese Population wurde zeitlich in ihrer Maturierung verfolgt (chase). Zu den angegebenen „chase“-Zeitpunkten wurden Zelllysate hergestellt und mit AK 9E10 immunpräzipitiert. Zusätzlich wurde das konditionierte Medium von der BACE-L exprimierenden Zelllinie gesammelt und ebenfalls immunpräzipitiert, da erwartet werden konnte, dass die lösliche Variante von BACE in das Medium sezerniert wurde.

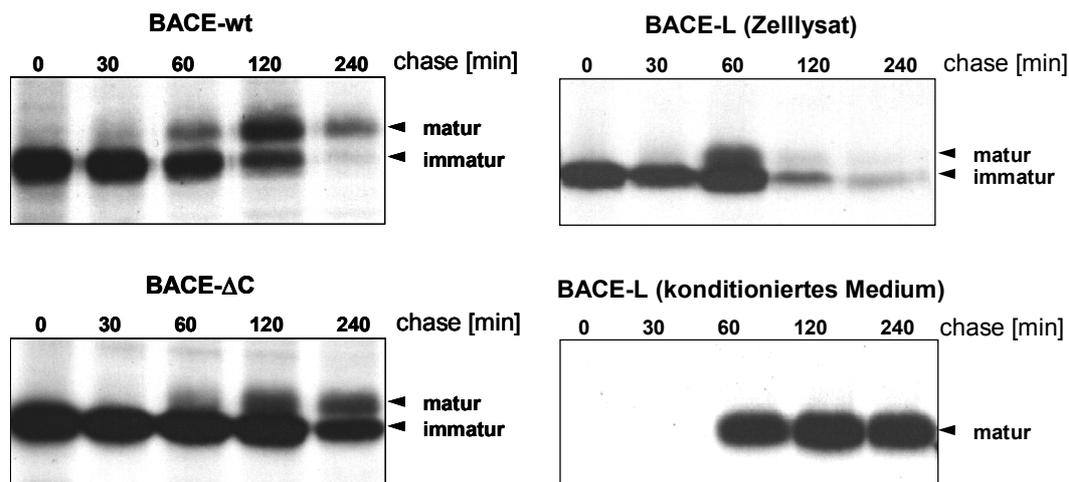


Abbildung 20: Maturierung von BACE-wt, BACE-ΔC und BACE-L analysiert im „pulse/chase“-Experiment

HEK 293 Zellen mit stabiler Überexpression von BACE-wt, BACE-ΔC oder BACE-L wurden 10 min mit [³⁵S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert (pulse), gefolgt von einer Inkubation mit nicht radioaktivem Medium (chase). Zu den angegebenen „chase“-Zeitpunkten wurden Zelllysate hergestellt, bzw. für BACE-L wurde zusätzlich konditioniertes Medium gesammelt. Die Lysate und das konditionierte Medium wurden mit AK 9E10 immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden im 10%-SDS-Gel aufgetrennt. Gezeigt sind die Autoradiografien der Gele. Matures und immatures BACE ist gekennzeichnet.

Das zum „chase“-Zeitpunkt „0 min“ hergestellte Zelllysat zeigt für alle BACE-Varianten ausschließlich eine Bande bei ca. 65 kDa, es handelt sich hierbei um die Ausgangspopulation, die während des „pulse“ radioaktiv markiert wurde. Beim „chase“-Zeitpunkt „60 min“ ist für BACE-wt und BACE-L eine zweite, mature Bande bei ca. 70 kDa zu erkennen. Zusätzlich ist für BACE-L die mature Form deutlich im Medium detektierbar und nach 120 min ist fast die gesamte radioaktiv markierte BACE-L-Population sezerniert. Die mature Form ist für BACE-ΔC erst zum nach 120 min erkennbar. Die Quantifizierung der Maturierung von BACE-wt, BACE-ΔC und BACE-L zeigt, dass die lösliche Form effizient und am schnellsten maturiert, während BACE-ΔC am langsamsten maturiert (Abbildung 21A). Wird hingegen die Stabilität der maturen Form betrachtet, so ist matures BACE-ΔC am stabilsten und matures BACE-wt wird am schnellsten abgebaut (Abbildung 21B). Da matures BACE-L sezerniert wird kommt es nach 60 min „chase“ zur dramatischen Abnahme von maturem BACE-L im Zelllysat. Auch im Medium wird sezerniertes BACE-L abgebaut, der Abbau ist jedoch langsamer als der von BACE-wt im Lysat.

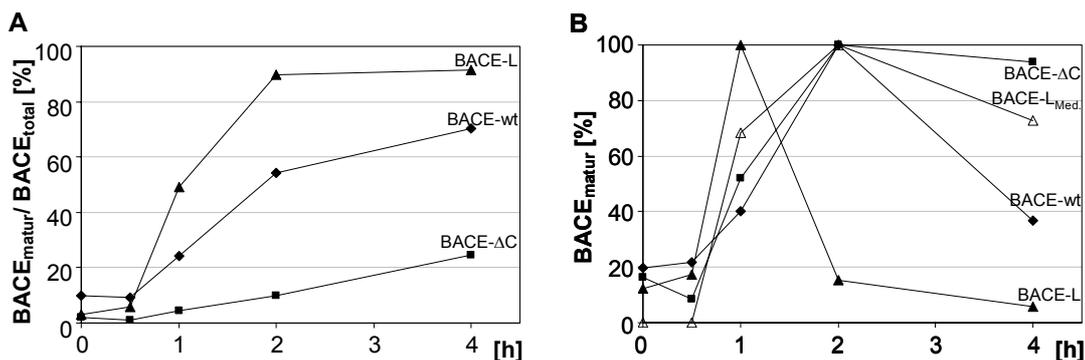


Abbildung 21: Quantifizierung der Maturierung und des Abbaus von BACE-wt, BACE-ΔC und BACE-L

A: Für jeden „chase“-Zeitpunkt wurde der prozentuale Anteil des muren BACE an der Gesamtpopulation berechnet. Für BACE-L wurde das mature, sezernierte BACE-L mit berücksichtigt. Die Maturierung für BACE-L verläuft am schnellsten, die von BACE-ΔC am langsamsten. **B:** Die Stabilität des muren BACE wird ermittelt, indem die maximal erreichte Menge von muren BACE als 100 % gesetzt wird, die BACE Menge der anderen „chase“-Zeitpunkte wird als Prozent der maximalen Menge ausgedrückt. Für BACE-L wurden das Lysat und das konditionierte Medium getrennt betrachtet.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass BACE eine zeitabhängige Vergrößerung seines Molekulargewichts erfährt. Für diese Maturierung sind die cytoplasmatische Domäne und die Membranverankerung nicht erforderlich. Für membrangebundenes BACE erhöht die cytoplasmatische Domäne die Effizienz der Maturierung, allerdings auch die Degradation.

3.2.2 N-Glycosylierung von BACE

Viele der im ER synthetisierten Proteine werden durch kovalente Bindung von Zuckern am Amidstickstoff des Asparagin glycosyliert. Die Übertragung der Oligosaccharide erfolgt im ER direkt während der Peptidsynthese durch eine membrangebundene Glycosyltransferase. Die Glycosyltransferase erkennt die Konsensus-Sequenz -N(X)[S/T]-, wobei X jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann. BACE enthält vier mögliche N-Glycosylierungsstellen.

Die im ER auf das Protein übertragenen „core“-Oligosaccharide sind Pentasaccharide, bestehend aus zwei β -glycosidisch verknüpften N-Acetyl-Glucosamineinheiten verbunden mit einer β -glycosidisch gebundenen Mannose, mit der wiederum zwei α -glycosidisch verbundene Mannoseeinheiten verknüpft sind. Zunächst werden die „core“-Oligosaccharide im ER getrimmt, um dann im Golgi-Apparat zu komplexen, proteinspezifischen Zuckerresten aufgebaut zu werden.

Neben der N-Glycosylierung an Asparagin können auch Oligosaccharide kovalent an das Sauerstoffatom des Serins oder Threonins gebunden werden, diese häufig vorkommende Bindung wird als O-Glycosylierung bezeichnet und erfolgt ausschließlich im Golgi-Apparat.

Zucker abspaltende Enzyme, Glycosidasen, spalten spezifisch bestimmte Zuckerverbindungen und können zur Analyse der Glycosylierung von Proteinen eingesetzt werden. Alle N-glycosylierten Zuckerreste können durch N-Glycosidase F abgespalten werden, O-glycosylierte Zucker werden nicht abgespalten (Tarentino et al., 1985). Endoglycosidase H (Endo H) spaltet

mannosereiche und keine komplexen N-glycosylierten Zuckerketten. Da Komplex-Zucker erst im Golgi-Apparat aufgebaut werden, weist eine Endo H Stabilität der Zucker auf eine Lokalisierung im Golgi-Apparat oder späteren Zellkompartimenten hin (Tarentino und Maley, 1974).

Um zu untersuchen, ob BACE N-glycosyliert wird, wurden BACE exprimierende Zellen im „pulse/chase“-Experiment radioaktiv markiert und nach einer „chase“-Zeit von 120 Minuten lysiert. Zu diesem „chase“-Zeitpunkt liegen ungefähr gleiche Mengen immatures und matures BACE vor (Abbildung 20). Zelllysate wurden mit AK 9E10 immunopräzipitiert und mit N-Glycosidase F oder mit dem entsprechenden Puffer inkubiert. Nach Auftrennung der Proben in der SDS-PAGE wurde BACE in der Autoradiografie detektiert (Abbildung 22). In der unbehandelten Kontrollspur kann immatures und matures BACE bei ca. 65 und 70 kDa nachgewiesen werden. In der behandelten Spur ist im Wesentlichen eine Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa nachweisbar. Hierbei handelt es sich um die vollständig deglycosylierte Form des Proteins. Das Molekulargewicht von 50 kDa entspricht der kalkulierten Masse von BACE.

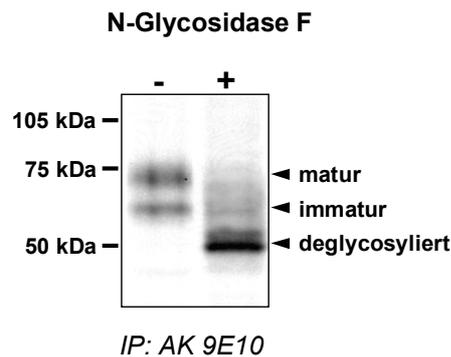


Abbildung 22: N-Glycosidase F Behandlung von BACE

BACE-wt transfizierte HEK 293 Zellen wurden im „pulse/chase“-Experiment radioaktiv markiert, zum „chase“-Zeitpunkt „120“ min wurden Zelllysate hergestellt und mit AK 9E10 immunopräzipitiert. Ein Immunopräzipitat wurde mit N-Glycosidase F inkubiert (+), ein weiteres zur Kontrolle nur mit dem Inkubationspuffer (-). Die Proben wurden im 8%-SDS-Gel getrennt. Abgebildet ist eine Autoradiografie des Gels.

Ein weiterer Nachweis für eine N-Glycosylierung von BACE wurde durch eine Behandlung mit dem Antibiotikum Tunicamycin erbracht. Tunicamycin kann aufgrund seiner Analogie zum UDP-N-Acteylglucosamin die Bildung des „core“-Oligosaccharids verhindern. Dadurch werden N-Glycosylierungen vollständig unterbunden (Leavitt et al., 1977; McDowell und Schwarz, 1988).

BACE exprimierende Zellen wurden mit Tunicamycin vorbehandelt und in Anwesenheit von Tunicamycin wurde ein „pulse/chase“-Experiment durchgeführt. Zelllysate zum „chase“-Zeitpunkt „0“ und „120“ Minuten wurden mit AK GM190 und AK 9E10 immunopräzipitiert (Abbildung 23).

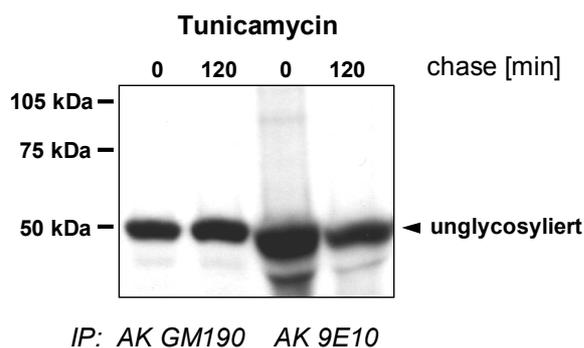


Abbildung 23: Tunicamycin Behandlung BACE exprimierender Zellen

BACE-wt transfizierte HEK 293 Zellen wurden nach Tunicamycin Vorbehandlung, in Anwesenheit von Tunicamycin im „pulse/chase“-Experiment radioaktiv markiert. Zu den „chase“-Zeitpunkten „0 min“ und „120 min“ wurden Zelllysate hergestellt und mit AK GM190 und AK 9E10 immunopräzipitiert. Die Proben wurden im 8%-SDS-Gel getrennt. Abgebildet ist eine Autoradiografie des Gels.

In Gegenwart von Tunicamycin erhält man ausschließlich eine Bande von 50 kDa, entsprechend dem Molekulargewicht von deglycosyliertem BACE (Abbildung 22). Auch beim „chase“-Zeitpunkt „120 min“ ist keine Glycosylierung von BACE nachweisbar. Die Behandlung mit Tunicamycin verhindert nicht nur die Glycosylierung von BACE, sondern vermutlich auch die Abspaltung des Propeptides. Der AK GM190 präzipitiert zum „chase“-Zeitpunkt „120 min“ unvermindert die unglycosylierte BACE-Form (Abbildung 23). In „pulse/chase“-Experimenten, ohne Tunicamycin Behandlung wird zu diesem Zeitpunkt mit dem AK GM190 kaum noch radioaktiv markiertes BACE präzipitiert (Abbildung 25).

Um zu klären, ob die mature Form von BACE den Golgi-Apparat und das TGN erreicht, wurde untersucht, inwieweit die mature Form komplex glycosyliert und damit Endo H resistent ist.

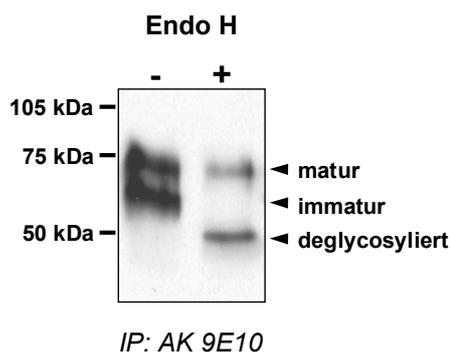


Abbildung 24: Endoglycosidase H Behandlung von BACE

BACE-wt transfizierte HEK 293 Zellen wurden im „pulse/chase“-Experiment radioaktiv markiert. Zum „chase“-Zeitpunkt „120 min“ wurden Zelllysate hergestellt und mit AK 9E10 immunopräzipitiert. Ein Immunopräzipitat wurde mit Endo H inkubiert (+), ein weiteres zur Kontrolle mit dem Inkubationspuffer (-). Die Proben wurden im 8%-SDS-Gel getrennt. Abgebildet ist eine Autoradiografie des Gels.

Durch Endo H Behandlung ändert die mature Form von BACE ihr Migrationsverhalten in der SDS-PAGE nicht, sie ist Endo H stabil und muss daher komplex glycosyliert sein (Abbildung

24). Immatures BACE wird durch Endo H deglycosyliert und migriert im SDS-Gel bei 50 kDa (Abbildung 24), dem Molekulargewicht des nicht glycosylierten BACE.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass BACE im ER N-glycosyliert wird. Beim Transport vom ER über den Golgi-Apparat zum TGN werden die Zucker zu einer Endo H resistenten, komplexen Form modifiziert, dadurch kommt es zu einer Zunahme des Molekulargewichts um ca. 5 kDa, von 65 kDa zu 70 kDa.

3.2.3 Analyse der Propeptidprozessierung von BACE

Propeptidkonvertasen (PK) oder auch Propeptidpeptidasen genannt, hydrolysieren die Abspaltung eines Propetides vom Proprotein, dadurch entsteht ein aktiviertes, matures Protein (Nakayama, 1997; Thomas, 2002). Dieser Mechanismus spielt eine große Rolle in der Aktivierung von Proteinen, Enzymen und Hormonen im sekretorischen Transportweg (Nakayama, 1997; Thomas, 2002). PK sind in Vertebraten und vielen Invertebraten ubiquitär exprimiert. Sie gehören zur Subtilisin Proteinfamilie. Ihr katalytisches Zentrum, bestehend aus den Aminosäuren Asp, His, Ser, ist homolog zu dem bakterieller Serin-Endoproteasen und zu dem der Hefe-Endoprotease Kex2p. In Säugern wurden bisher sieben PK mit einer 50-70 % identischen katalytischen Domäne identifiziert. Furin ist die am besten analysierte PK, mit einem breiten pH-Wert Optimum von pH 5-8 und einer strikten Calciumabhängigkeit, für maximale Aktivität wird eine 1 mM Calciumkonzentration benötigt. Furin-Aktivität konnte in verschiedenen Zellkompartimenten nachgewiesen werden (Bresnahan et al., 1990; Hatsuzawa et al., 1992; Molloy et al., 1992). Die Konsensussequenz von Furin ist -RX(K/R)R- (Hosaka et al., 1991), an Position P2 ist eine basische Aminosäure ausreichend (Krysan et al., 1999; Molloy et al., 1992). Der Schnitt findet hinter dem C-terminalen Argenin statt. Eine entsprechende minimale Konsensussequenz mit -RLPR- ist auch in BACE vorhanden.

3.2.3.1 Zelluläre Lokalisierung der BACE-Propeptidabspaltung

Wie in anderen Arbeiten postuliert wurde (Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999), wird BACE als Proenzym, mit einem relativ kurzen Propeptid von 24 AS, exprimiert. Die Propeptidabspaltung von BACE wurde in „pulse/chase“-Experimenten untersucht und die subzelluläre Lokalisierung von Propeptid enthaltendem BACE (Pro-BACE) wurde in Immunfluoreszenzen analysiert (Abbildung 25).

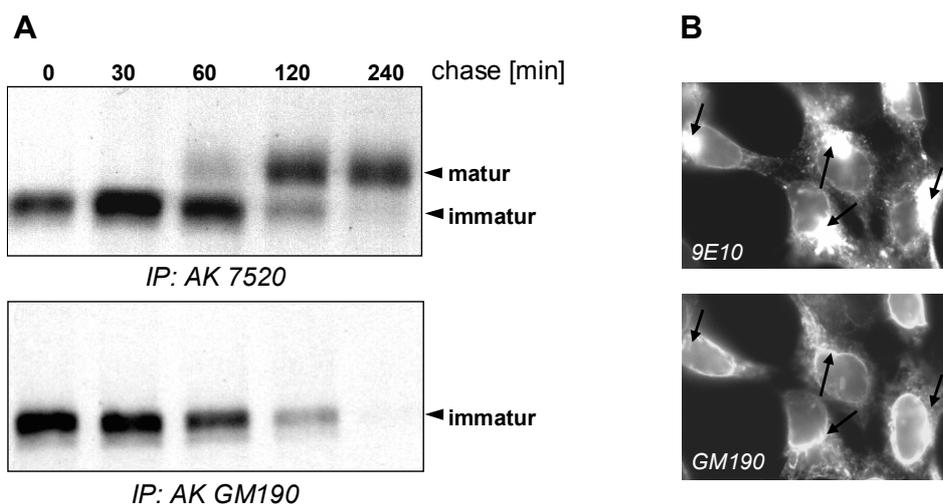


Abbildung 25: Propeptidabspaltung von BACE, analysiert im „pulse/chase“-Experiment und in der Immunofluoreszenz

A: HEK 293 Zellen mit stabiler Überexpression von BACE-wt wurden 10 min mit [³⁵S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert, gefolgt von einer Inkubation mit nicht radioaktivem Medium. Zu den angegebenen „chase“-Zeitpunkten wurden Zelllysate hergestellt. Lysate wurden mit AK 7520 und AK GM190 immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden im 10%-SDS-Gel aufgetrennt, gezeigt sind die Autoradiografien der Gele. Matures und immatures BACE sind gekennzeichnet. **B:** Auf Deckgläschen gewachsene HEK 293 Zellen mit stabiler Überexpression von BACE-wt wurden fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. BACE und Pro-BACE wurden mit AK 9E10, AK GM190 und fluoreszierendem 2. AK nachgewiesen. Pfeile weisen auf die typischen Fluoreszenzsignale hin.

Im „pulse/chase“-Experiment ist zu erkennen, dass Pro-BACE nicht maturiert. Der gegen das Propeptid gerichtete AK GM190 immunopräzipitiert ausschließlich immatures BACE. Immatures BACE und Pro-BACE nehmen während der „chase“-Zeit vergleichbar ab, parallel kommt es zur Zunahme von maturem BACE (Abbildung 25A). Die Propeptidabspaltung scheint unmittelbar vor der komplexen Glycosylierung von BACE stattzufinden und damit vor dem Erreichen des TGN. Die Immunofluoreszenzen bestätigen eine unterschiedliche Lokalisierung von Pro-BACE und BACE. Pro-BACE ist überwiegend in der Kernhülle und in ER-ähnlichen Strukturen lokalisiert, kann aber kaum im Golgi-Apparat nachgewiesen werden (Abbildung 25B). Dahingegen zeigt AK 9E10, der Pro-BACE und BACE erkennt, eine starke Fluoreszenz in Strukturen, die an einer Seite des Zellkerns lokalisiert sind und wahrscheinlich dem Golgi-Apparat entsprechen (Abbildung 25).

Die „pulse/chase“-Experimente und die subzelluläre Lokalisierung von BACE weisen daraufhin, dass die Propeptidabspaltung auf dem zellulären Transportweg vom ER zum Golgi-Apparat, im ER, „intermediate“ Kompartiment oder cis-Golgi-Apparat, stattfindet.

Durch die gezielte Blockierung zellulärer Transportvorgänge können bestimmte Mechanismen oder enzymatische Aktivitäten subzellulären Kompartimenten zugeordnet werden. Brefeldin A (BFA) inhibiert den Vorwärtstransport vom ER zum Golgi-Apparat (Dinter und Berger, 1998; Klausner et al., 1992). Da der Rücktransport nicht blockiert wird, kommt es vermutlich zur Fusion des ER und Golgi-Apparats (Alberts et al., 2002; Haass und Selkoe, 1993). Der Transportweg von cis- und medialen-Golgi-Zisternen zum TGN kann durch Monensin blockiert

werden, wobei ER und Golgi-Apparat nicht verschmelzen (Rosa et al., 1992; Wild-Bode et al., 1997).

Zur weiteren Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Propeptidabspaltung von BACE wurden „pulse/chase“-Experimente in Anwesenheit von BFA oder Monensin durchgeführt. Zelllysate wurden mit AK GM190 gegen das Propeptid und zur Kontrolle mit AK 7520 oder AK 9E10 immunopräzipitiert.

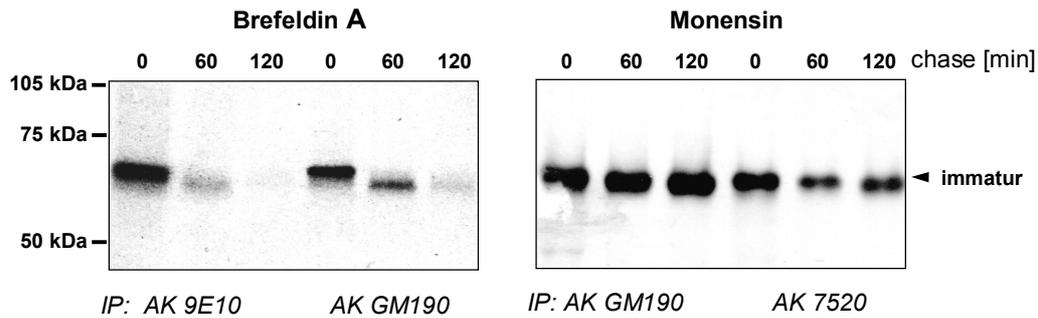


Abbildung 26: BFA- und Monensin Behandlung BACE exprimierender Zellen

BACE-wt transfizierte HEK 293 Zellen wurden nach BFA bzw. Monensin Vorbehandlung, in Anwesenheit von BFA bzw. Monensin im „pulse/chase“-Experiment radioaktiv markiert. Zum „chase“-Zeitpunkt „0“, „60“ und „120“ min wurden Zelllysate hergestellt und mit AK GM190 und AK 9E10 oder AK 7520 immunopräzipitiert. Die Proben wurden im 8%-SDS-Gel getrennt, abgebildet ist eine Autoradiografie des Gels.

In Zelllysaten BFA oder Monensin behandelter Zellen ist nur die immature BACE-Variante nachzuweisen, der Umbau der N-glycosylierten Zucker zu komplexen Strukturen findet nicht mehr statt (Abbildung 26).

Bei BFA Behandlung kommt es zu einer leichten Reduktion des Molekulargewichts, wahrscheinlich aufgrund des Trimmens der Zucker. Die immature BACE-Form ist instabil und zum „chase“-Zeitpunkt „60 min“ ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und zur Monensin Behandlung eine deutliche Reduktion zu beobachten (Abbildung 26, vgl. Abbildung 20). In der Immunopräzipitation von BACE mit AK GM190 und AK 9E10 ist kein wesentlicher Unterschied zu erkennen. Dies weist daraufhin, dass das Propeptid bei BFA-Behandlung nicht abgespalten wird.

Monensin erhöht die Stabilität von BACE (Abbildung 26). Bei der Präzipitation von BACE mit AK GM190 ist beim „chase“-Zeitpunkt „120 min“ kaum eine Reduktion des immaturationen BACE festzustellen, dies zeigt, dass auch bei Monensin Behandlung das Propeptid nicht abgespalten wird (Abbildung 26, vgl. Abbildung 25).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Propeptidabspaltung von BACE nicht im ER stattfindet, sondern später im sekretorischen Transportweg, jedoch bevor es zum Aufbau von komplexen Zuckern kommt. BFA und Monensin blockieren den Transport von BACE vom ER zum Golgi-Apparat bzw. vom Golgi-Apparat zum TGN, und damit ist auch die Propeptidabspaltung und die Maturierung von BACE blockiert.

3.2.3.2 Bestimmung der Schnittstelle der BACE-Propeptidkonvertase

Aufgrund der in BACE vorhandenen PK-Konsensussequenz wird angenommen, dass die BACE prozessierende PK nach der minimalen Furin Konsensussequenz -RLPR-[↓] schneidet. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde die Konsensussequenz durch eine Mutation von Arg zu Ala an Position 45 in -RLPA- verändert, sodass sie nicht mehr von Furin oder einer furinähnlichen PK erkannt werden konnte (Krysan et al., 1999; Molloy et al., 1992).

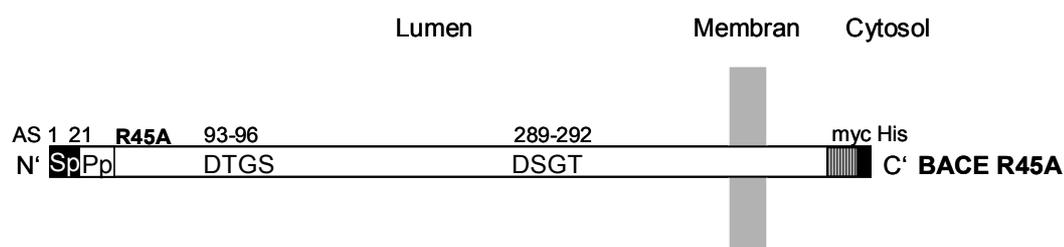


Abbildung 27: Darstellung des BACE R45A Konstruktes

Das BACE R45A Konstrukt ist mit der Sequenz für „myc“ und „His“ konjugiert und entspricht, abgesehen von dem AS Austausch Arg → Ala an Position 45, der Sequenz von BACE-wt.

BACE mit der Mutation R45A wurde stabil in HEK 293/βAPPwt Zellen exprimiert. In „pulse/chase“-Experimenten wurde die Maturierung dieser BACE-Mutante und der Einfluss der Mutation auf die Propeptidabspaltung untersucht.

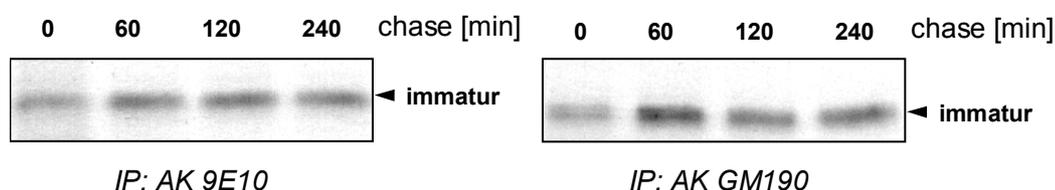


Abbildung 28: BACE R45A analysiert im „pulse/chase“-Experiment

HEK 293 Zellen mit stabiler Überexpression von BACE R45A wurden 10 min mit [³⁵S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert, gefolgt von einer Inkubation mit nicht radioaktivem Medium. Zu den angegebenen „chase“-Zeitpunkten wurden Zelllysate hergestellt. Die Lysate wurden mit AK 9E10 und AK GM190 immunopräzipitiert und im 10%-SDS-Gel aufgetrennt. Immatures BACE ist gekennzeichnet.

Zelllysate der entsprechenden „chase“-Zeitpunkte wurden zur Untersuchung der Maturierung mit AK 9E10 immunopräzipitiert. Obwohl AK 9E10 die immature und mature Form von BACE mit gleicher Affinität immunopräzipitiert, ist eine Maturierung von BACE R45A nicht zu detektieren (Abbildung 28). Für BACE-wt ist die mature Form nach 60 min nachweisbar und nach 120 min liegt überwiegend matures BACE vor (Abbildung 20 / Abbildung 25). Die immature BACE R45A Form ist stabil und wird während des „chase“-Zeitraums von 240 Minuten kaum abgebaut (Abbildung 28). Im Gegensatz dazu ist für BACE-wt nach 240 min kein immatures BACE zu detektieren (Abbildung 25). Die Immunopräzipitation der Zelllysate mit AK GM190 zeigt, dass das Propeptid während der „chase“-Periode nicht abgespalten wird. Die

Vermutung, dass es sich bei der Sequenzabfolge -RLPR- um die Erkennungssequenz der BACE schneidenden PK handelt, hat sich bestätigt.

3.3 Einfluss von BACE auf die β APP-Prozessierung

BACE schneidet β APP N-terminal des A β -Peptids und leitet damit die Freisetzung von A β ein. Nachdem die Maturierung und von BACE in Abhängigkeit von der cytoplasmatischen Domäne und der Transmembrandomäne untersucht wurde, wurde der Einfluss dieser Domänen auf die Aktivität untersucht. Es wurde ferner anhand der BACE R45A Mutante untersucht, ob eine Propeptidabspaltung und Maturierung von BACE für die enzymatische Aktivität, d.h. für die Freisetzung von A β notwendig ist.

3.3.1 Antikörper zum Nachweis des β APP und der β APP-Prozessierungsprodukte

β APP gehört zur Gruppe der N- und O-glycosylierten Transmembranproteine vom Typ I. Während des Transports auf dem sekretorischen Weg vom ER über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche und der folgenden Reinternalisierung kann β APP, zunächst von α - oder β -Sekretase, dann von der γ -Sekretase, proteolytisch prozessiert werden (1.3.2). Die zum Nachweis von β APP und seinen proteolytischen Fragmenten benutzten Antikörper sind in Abbildung 29 dargestellt. Der Ektodomänen AK 5313 (Steiner et al., 1999b; Steiner et al., 1999c; Walter et al., 2000) detektiert alle lösliche Formen von β APP (I- β APP) sowie das Holoprotein, während AK 6687 das Holoprotein und alle membrangebundenen, C-terminalen Fragmente erkennt (Capell et al., 2000a). Zum Nachweis von I- β APP α wurde der neoepitopspezifische AK 1736 eingesetzt, der ausschließlich mit der an der α -Schnittstelle endenden β APP-Spezies reagiert (Haass et al., 1992b). Zur A β -Präzipitation wurde der alle A β -Spezies erkennende AK 3926 (Wild-Bode et al., 1997) eingesetzt.

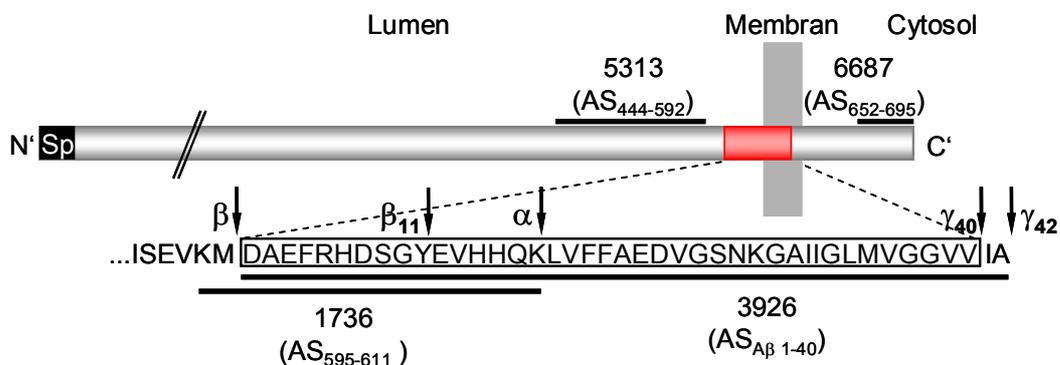


Abbildung 29: Schematische Darstellung von β APP₆₉₅ mit Angabe der Antikörper

Die luminal Domäne von β APP enthält ein Signalpeptid (Sp, schwarze Box), die zelluläre Membran ist grau dargestellt. Die A β Domäne (rote Box) ist zusätzlich vergrößert, unter Angabe der AS-Sequenz im Einbuchstabencode dargestellt. Die potentiellen Schnittstellen der α -, β -, und γ -Sekretase sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Antikörper und die AS der als Antigen eingesetzten Peptide sind angegeben und durch schwarze Balken gekennzeichnet.

3.3.2 Prozessierung von β APP durch BACE und die BACE-Varianten: Δ C, L, R45A

Die BACE-Konstrukte wurden stabil in HEK 293 Zellen transfiziert, die bereits β APPwt exogen exprimieren. Alle Zelllinien exprimieren ähnliche Mengen β APPwt, da die gleiche Ausgangszelllinie zur Transfektion der BACE-Konstrukte benutzt wurde. Die BACE-Expression ist ebenfalls vergleichbar, nur die Zelllinie BACE R45A hat eine niedrigere Expression (Abbildung 28). Für diese Zelllinie konnten keine hoch exprimierenden Klone gefunden werden. Zur Analyse der β APP-Prozessierung wurden die Zelllinien BACE-wt, BACE- Δ C, BACE-L, BACE R45A, und zur Kontrolle die β APPwt und β APPsw exprimierenden Zelllinien, 4 h mit [35 S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert. Die sezernierten Prozessierungsprodukte I- β APP $_{\alpha}$, I- β APP $_{total}$ sowie die A β - und p3-Spezies wurden aus den konditionierten Medien immunopräzipitiert (Abbildung 30).

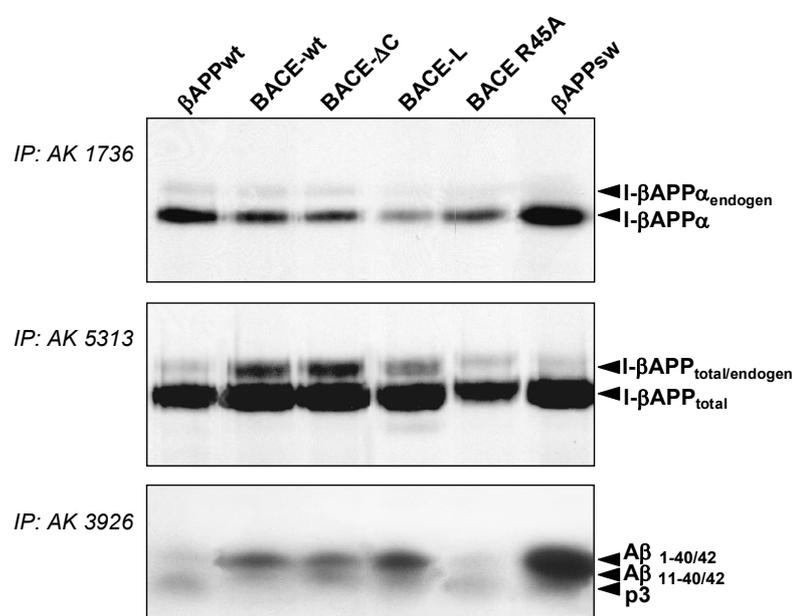


Abbildung 30: β APP-Prozessierung in Abhängigkeit von BACE und BACE-Varianten

Die angegebenen Zelllinien wurden 4 h mit [35 S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert, konditionierte Medien wurden gesammelt und Aliquote zur Immunopräzipitation von I- β APP $_{\alpha}$ (10 %), I- β APP $_{total}$ (10 %) und A β (80 %), mit den AK 1736, AK 5313 und AK 3926 eingesetzt. Die Immunopräzipitate von I- β APP wurden im 8%-SDS-Gel aufgetrennt, die von A β im Tris-Tricine-Gel. Abgebildet sind Autoradiografien der getrockneten Gele.

Zur Beurteilung der BACE-Aktivität ist es notwendig, die Sezernierung von I- β APP $_{\alpha}$ im Verhältnis zur Sezernierung von I- β APP $_{total}$ zu betrachten, da die Gesamtsezernierung der verschiedenen Zelllinien unterschiedlich ist. Die Autoradiografie der A β - und p3-Spezies gibt jedoch einen direkten Hinweis auf die BACE-Aktivität. Die Zelllinien BACE-wt, BACE- Δ C und BACE-L zeigen im Vergleich zur Kontrollzelllinie β APPwt eine erhöhte A β - und deutlich verminderte p3-Produktion. Es entsteht neben der A β -Spezies, deren N-Terminus mit Asp1 beginnt (A $\beta_{(1-40/42)}$ oder A β_{Asp1}) eine weitere mit Glu11 beginnende A β -Spezies (A $\beta_{(11-40/42)}$).

$A\beta_{Glu11}$) (1.3.2.2). BACE schneidet β APP mit grösster Affinität zwischen M595 und D596, aber katalysiert auch den Schnitt zwischen Y605 und E606 (1.3.2.2) (Vassar et al., 1999). Die Positionsangaben sind bezogen auf die Spleißform β APP₆₉₅. Die Zelllinie BACE R45A zeigt keine erhöhte $A\beta$ -Produktion. β APPsw wird, wie aufgrund der erhöhten Affinität von BACE zum β APPsw-Substrat zu erwarten war, hauptsächlich von BACE geschnitten und es entsteht überwiegend $A\beta_{(1-40/42)}$ (1.3.2.2) (Citron et al., 1992; Lin et al., 2000; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999).

Die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten bestätigt für die Zelllinien BACE-wt, BACE- Δ C und BACE-L eine reduzierte α -Sekretase Prozessierung von β APP. Die I- β APP α - und p3-Sezernierung sind deutlich vermindert. Hingegen zeigt BACE R45A keine Veränderung der $A\beta$ -Sezernierung im Vergleich zur Kontrollzelllinie β APPwt (Abbildung 31A/B).

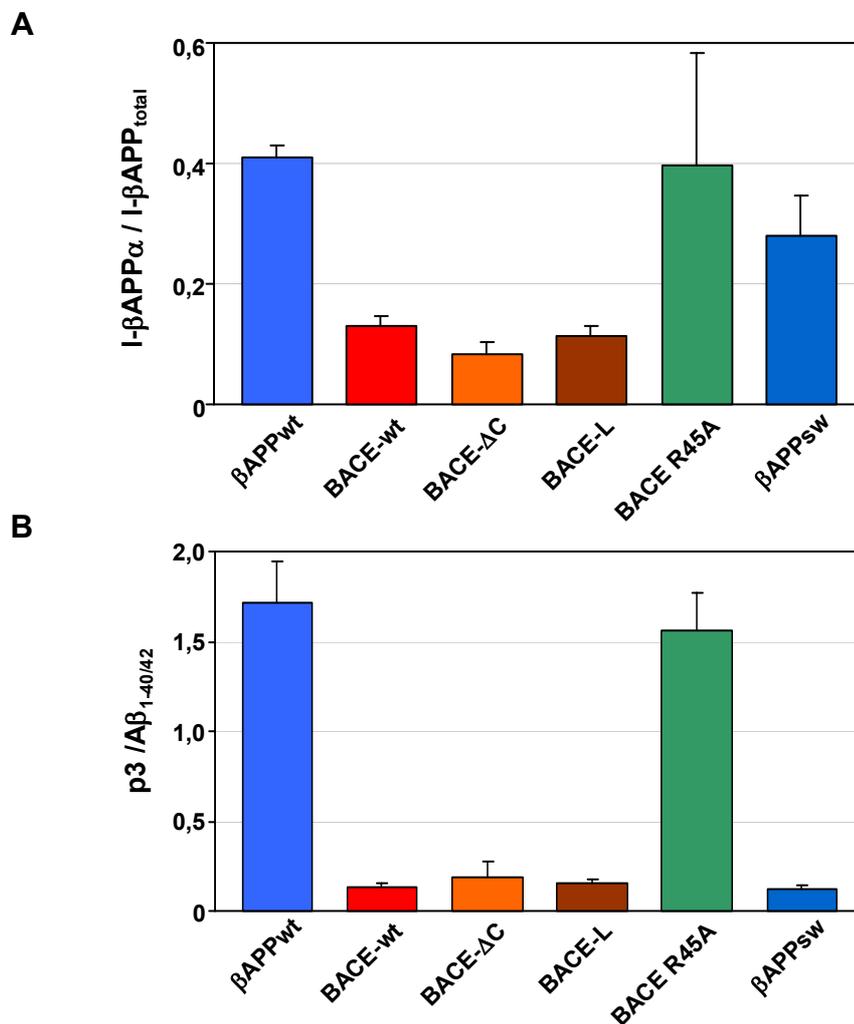


Abbildung 31: Quantitative Auswertung der I- β APP- und $A\beta$ -Sezernierung

Quantifizierung der radioaktiven Immunpräzipitate von I- β APP α , I- β APP_{total} und $A\beta$ bzw. p3 mittels Phosphor-Imager, Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten. Der Anteil der α -Sekretase Prozessierung an der Gesamtprozessierung von β APP wird im Verhältnis der Sekretion von I- β APP α zu I- β APP_{total} (A), oder im Verhältnis von p3 zu $A\beta_{sp1}$ (B) ausgedrückt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass BACE-wt, BACE- Δ C und BACE-L β -Sekretase Aktivität zeigen und in transfizierten Zellen kaum Unterschiede in der Aktivität zu erkennen sind. Damit wäre BACE-L eine mögliche Enzymquelle für ein *in vitro* Assay System.

Eine genaue Betrachtung der entstehenden $A\beta$ -Spezies für BACE-wt, BACE- Δ C und BACE-L lässt Unterschiede im $A\beta_{Glu11}$ und $A\beta_{Asp1}$ Verhältnis erkennen (Abbildung 30). Eine Quantifizierung der $A\beta$ -Spezies aus drei unabhängigen Experimenten bestätigt diesen Eindruck (Abbildung 32).

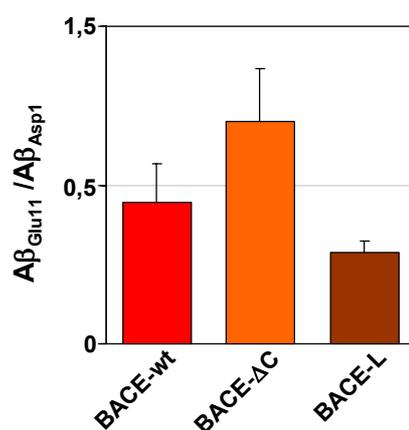


Abbildung 32: Sezernierung von $A\beta_{Asp1}$ und $A\beta_{Glu11}$ in Abhängigkeit von der BACE-Variante

Quantifizierung der radioaktiven Immunpräzipitate $A\beta_{Asp1}$ und $A\beta_{Glu11}$ mittels Phosphor-Imager. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten. Der Anteil der $A\beta_{Glu11}$ -Spezies zu der $A\beta_{Asp1}$ -Spezies ist dargestellt.

BACE- Δ C transfizierte Zellen produzieren die größte Menge der $A\beta_{Glu11}$ -Spezies, BACE-L transfizierte Zellen die geringste. Möglicherweise liegt eine Korrelation zwischen Geschwindigkeit der Maturierung und der Entstehung der $A\beta_{Glu11}$ -Spezies vor, BACE- Δ C maturiert am langsamsten und BACE-L am schnellsten (Abbildung 20 / Abbildung 21). Dieser Zusammenhang könnte daraufhin deuten, dass der Ort der Entstehung von $A\beta_{Asp1}$ und $A\beta_{Glu11}$ in der Zelle ein anderer ist.

3.4 Identifizierung der Propeptidkonvertase von BACE

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Aminosäureabfolge -RLPR-¹ die Konsensussequenz für die BACE prozessierende PK ist und eine Mutation an dieser Schnittstelle sowohl die Maturierung (Abbildung 28), als auch die Aktivierung von BACE (Abbildung 30 / Abbildung 31) verhindert, wurde die BACE schneidende PK und die Bedeutung der BACE-Prodomäne auf die enzymatische Aktivität weiter untersucht. Es ist notwendig von der BACE-Mutation unabhängige Methoden zur Untersuchung der BACE-PK einzusetzen, da es auch möglich wäre, dass die blockierte Maturierung von BACE R45A nicht direkt durch die verhinderte Propeptidabspaltung

bedingt ist, sondern die Mutation eine falsche Faltung induziert. Daraufhin könnte BACE R45A kaum das ER verlassen, sondern würde verstärkt dem proteasomalen Abbau falsch gefalteter Proteine zugeführt werden (Bonifacino und Lippincott-Schwartz, 1991; Tsai et al., 2002). Ein verstärkter Abbau von BACE R45A könnte auch die niedrige Expression erklären, und ein verminderter Export aus dem ER könnte die Ursache für die Blockierung der Maturierung und der Aktivität sein. Die Effekte der Mutation R45A auf BACE-Maturierung und -Aktivität wären unspezifisch auf die falsche Faltung zurückzuführen. Zur weiteren Klärung der Rolle des BACE-Propeptids wurde die endoproteolytische Spaltung von BACE spezifisch inhibiert.

Die bekannten Bedingungen des Furin-Schnitts wurden genutzt, um funktionelle Peptidinhibitoren zu generieren. Ein solcher Inhibitor ist das Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketon (Garten et al., 1994; Hallenberger et al., 1992; Jean et al., 1995). Im Folgenden wurde der Einfluss des Inhibitors auf den Propeptidschnitt und die Maturierung von BACE untersucht, dazu wurden „pulse/chase“-Experimente in Anwesenheit des Inhibitors durchgeführt (2.5.6.2).

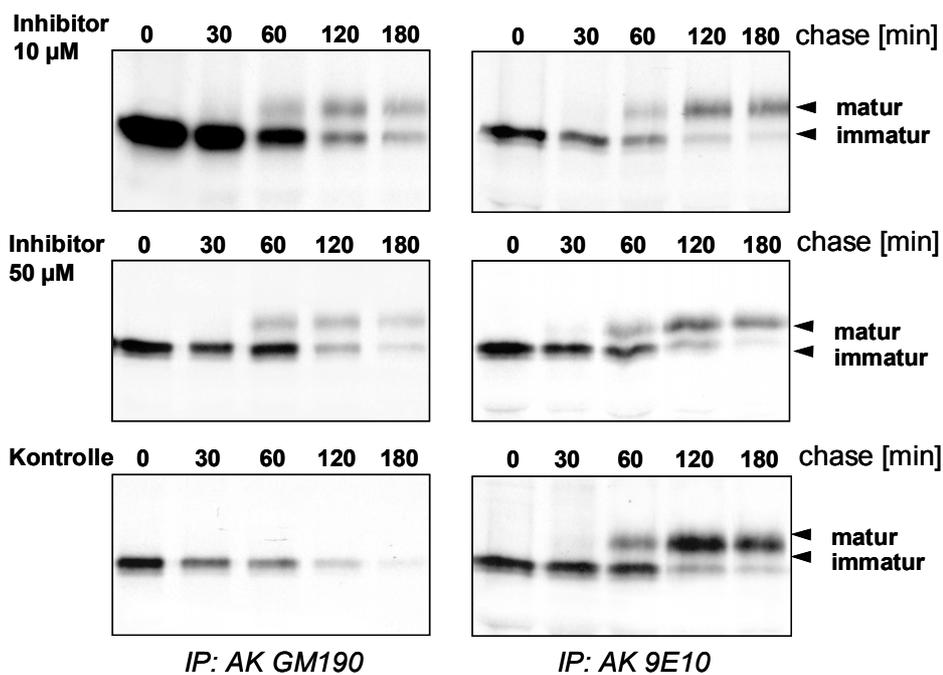


Abbildung 33: Einfluss eines Furin-Inhibitors auf BACE-wt Maturierung, analysiert im „pulse/chase“-Experiment

BACE-wt transfizierte HEK 293 Zellen wurden nach Inhibitor bzw. Lösungsmittel Vorbehandlung, in Anwesenheit von Inhibitor/Lösungsmittel 10 min mit [³⁵S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert, gefolgt von einer Inkubation mit nicht radioaktivem Medium. Zu den angegebenen „chase“-Zeitpunkten wurden Zelllysate hergestellt und die Lysate wurden mit AK GM190 und AK 9E10 immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden im 10%-SDS-Gel aufgetrennt. Gezeigt sind die Autoradiografien der Gele. Matures und immatures BACE sind gekennzeichnet.

Die Anwesenheit des Inhibitors verhindert nicht die Maturierung von BACE (Abbildung 33, IP: AK 9E10). Auffallend ist jedoch, dass das Propeptid in Anwesenheit des Inhibitors nicht mehr effizient abgetrennt wird, so entsteht eine komplex-glycosylierte Form von BACE die das

Propeptid enthält (Abbildung 33, IP: AK GM190). In dem Kontrollexperiment, ohne Einsatz von Inhibitor, entsteht ausschließlich matures BACE, das kein Propeptid enthält. Das Propeptid wird vollständig vor der Maturierung von BACE abgetrennt. Trotzdem ist die Abtrennung des Propeptids nicht Voraussetzung für die komplexe Glycosylierung von BACE, wie der Einsatz des Inhibitors zeigt.

Inwieweit in Anwesenheit des Inhibitors die Propeptidabspaltung vor der komplexen Glycosylierung stattfindet, ist schwer abzuschätzen, da Immunopräzipitationen mit verschiedenen AK miteinander verglichen werden müssen. Bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μM musste für die Autoradiografie der Immunopräzipitation mit dem AK GM190 eine lange Expositionszeit gewählt werden, um die geringe Menge von komplex-glycosyliertem, Propeptid enthaltendem BACE zu detektieren („chase“-Zeitpunkt „120 min“), im Vergleich ist die radioaktiv markierte Ausgangsmenge von immatorem BACE sehr hoch („chase“-Zeitpunkt „0 min“). Die Immunopräzipitation mit AK 9E10 zeigt im Vergleich zum Ausgangsmaterial („chase“-Zeitpunkt „0 min“) größere Mengen von maturem BACE („chase“-Zeitpunkt „120 min“). Ähnlich sind die Verhältnisse bei einer Inhibitorkonzentration von 50 μM . Der AK 9E10 präzipitiert, bei gleichen Mengen von immatorem BACE zum „chase“-Zeitpunkt „0 min“, größere Mengen von maturem BACE als der AK GM190 („chase“-Zeitpunkt „120 min“). Es ist damit davon auszugehen, dass auch bei einer Inhibitorkonzentration von 50 μM eine Propeptidabspaltung noch teilweise stattfindet und matures BACE mit und ohne Propeptid vorliegt.

Obwohl nur ein geringer Effekt des Peptidinhibitors auf die BACE-Maturierung festgestellt werden konnte, wurde ein möglicher Einfluss auf die BACE-Aktivität untersucht (Abbildung 34). BACE-wt und βAPP wt koexprimierende HEK 293 Zellen wurden in Anwesenheit des Inhibitors 4 h mit [^{35}S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert. Die sezernierten Prozessierungsprodukte $\text{A}\beta$ und p3 wurden aus den konditionierten Medien immunopräzipitiert.

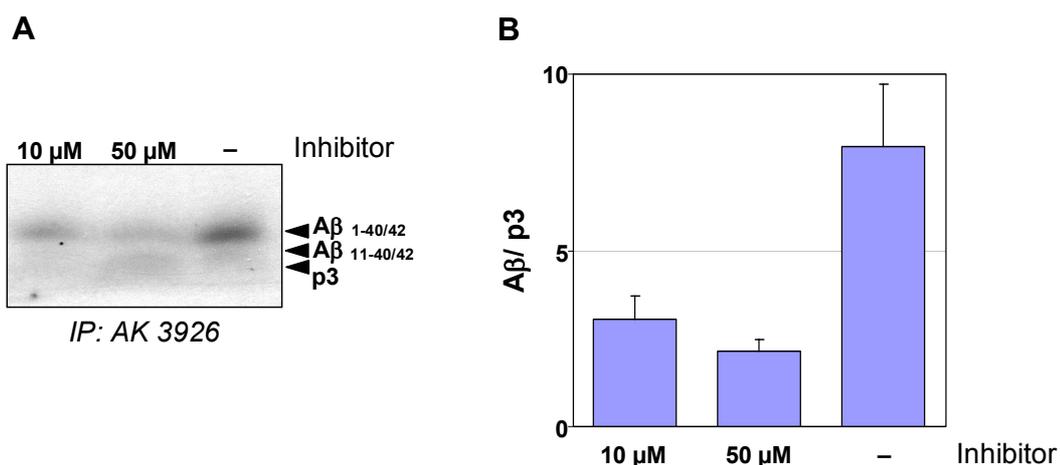


Abbildung 34: Einfluss des Furin-Inhibitors auf die BACE-Prozessierung von βAPP

BACE-wt transfizierte HEK 293 Zellen wurden nach Inhibitor (10, 50 μM) bzw. Lösungsmittel (-) Vorbehandlung, in Anwesenheit von Inhibitor (10, 50 μM)/Lösungsmittel (-) 4 h mit [^{35}S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert, konditionierte Medien wurden gesammelt, mit AK 3926 immunopräzipitiert und in der Tris-Tricine-PAGE aufgetrennt. Abgebildet ist die Autoradiografie (A). Eine Quantifizierung von $\text{A}\beta$ - im Verhältnis zur p3-Sezernierung ist in (B) dargestellt.

Die Autoradiografie zeigt abhängig von der Inhibitorkonzentration eine schwächere A β -Bande und einen Anstieg der p3-Bande. Im Vergleich zeigt die unbehandelte Kontrolle kaum p3, sondern fast ausschließlich die beiden A β -Spezies (A $\beta_{1-40/42}$; A $\beta_{11-40/42}$) (Abbildung 34A). Die Quantifizierung bestätigt den Eindruck, die A β -Produktion geht mit steigender Inhibitorkonzentration zugunsten der p3-Produktion zurück (Abbildung 34B). Die Effekte des Inhibitors auf die A β -Produktion sind deutlich und nur geringfügig abhängig von der Inhibitorkonzentration. Aufgrund des geringen Einflusses des Inhibitors auf die Propeptidabspaltung und Maturierung von BACE waren so offensichtliche Einflüsse auf die A β -Produktion nicht zu erwarten.

Einen weiteren Hinweis auf Furin oder einer furinähnlichen PK als BACE schneidende PK könnte die Untersuchung der Calciumabhängigkeit des Propeptidschnitts geben, da für Furin und furinähnliche Endoproteasen eine Calciumabhängigkeit bekannt ist (Bresnahan et al., 1990; Hatsuzawa et al., 1992; Molloy et al., 1992). Die Endoprotease Furin wird zunächst als Pro-Furin exprimiert und die Aktivierung durch Abspaltung des Propeptids ist calciumabhängig (Vey et al., 1994). Die Calcium Homeostase einer Zelle kann durch Calcium-Ionophor A23187 Behandlung beeinflusst werden. Durch Calcium-Ionophor werden die Calciumkanäle der Plasmamembran geöffnet, dadurch kann Calcium ungehindert in die Zelle hinein- oder herausströmen. Des Weiteren wird Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Parallel zur Calcium-Ionophor Behandlung eingesetztes calciumfreies Medium führt zu einer Calciumreduktion innerhalb der Zelle.

Im „pulse/chase“-Experiment wurde der Calcium Einfluss auf die Maturierung und den Propeptidschnitt von BACE untersucht (2.5.6.2).

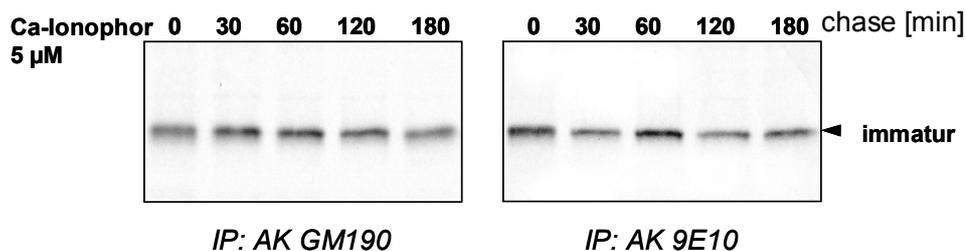


Abbildung 35: Einfluss von Calcium-Ionophor A23187 auf BACE-wt Maturierung, analysiert im „pulse/chase“-Experiment

BACE-wt transfizierte HEK 293 Zellen wurden nach Calcium-Ionophor Vorbehandlung in Ca²⁺-freiem Medium (10 h), in Anwesenheit von Calcium-Ionophor 10 min mit [³⁵S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert, gefolgt von einer Inkubation mit nicht radioaktivem Medium. Zu den angegebenen „chase“-Zeitpunkten wurden Zellysate hergestellt und mit AK GM190 und AK 9E10 immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden im 10%-SDS-Gel aufgetrennt, gezeigt sind die Autoradiografien der Gele. Immatures BACE ist gekennzeichnet. Kontrollexperiment mit unbehandelten Zellen s. Abbildung 33.

Eine Calcium Depletion durch 5 µM Calcium-Ionophor Behandlung in calciumfreiem Medium blockiert den Propeptidschnitt und die Maturierung von BACE vollständig (Abbildung 35).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Propeptid von BACE durch Furin oder einer furinähnlichen Propeptidkonvertase abgespalten wird. Da Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketon auch alle furinähnlichen Proteinkonvertasen mit niedrigen, nanomolaren K_i -Werten inhibiert ist eine Differenzierung zwischen Furin und furinähnlichen Proteinkonvertasen ist nicht möglich (Jean et al., 1998). Parallel zu dieser Arbeit identifizierten andere Arbeitsgruppen Furin und furinähnliche Propeptidkonvertasen als BACE konvertierende Proteasen (4.1.4) (Bennett et al., 2000a; Creemers et al., 2001).

Die Behandlung mit dem Furin-Inhibitor zeigt, dass BACE auch mit dem Propeptid komplex-glycosyliert werden kann. Die Propeptidabspaltung ist nicht Bedingung für eine komplexe Glycosylierung und für den Transport auf dem sekretorischen Weg. Dass das Propeptid die BACE-Aktivität deutlich inhibiert, zeigt die verminderte A β -Produktion nach Inkubation mit dem Furin-Inhibitor. Ob Pro-BACE inaktiv ist kann nicht eindeutig geklärt werden, da die Propeptidabspaltung nicht vollständig blockiert werden kann und für die verbleibende BACE-Aktivität entweder Pro-BACE oder die reduzierte Menge an vollständig prozessiertem BACE verantwortlich ist.

Die Nicht-Maturierung der Mutante BACE R45A kann nicht alleine auf die blockierte Abspaltung des Propeptids zurückgeführt werden, da Pro-BACE, wie die Experimente mit dem Furin-Inhibitor zeigen im geringen Maße komplex-glycosyliert werden kann. Die niedrige Expression von BACE R45A und die fehlende Maturierung sind Hinweise auf eine verstärkte Degradation.

3.5 Polarisierter Transport von BACE

Im Folgenden wurde untersucht, ob BACE polar transportiert wird und ob der Transport von BACE die β APP-Prozessierung beeinflusst. Als Modellsystem wurden MDCK Zellen gewählt, die bereits für die Untersuchungen des gerichteten Transports von β APP eingesetzt wurden (1.5.2 / 3.1.1) (De Strooper et al., 1995a; Haass et al., 1995c; Haass et al., 1994a; Lo et al., 1994).

3.5.1 BACE-Prozessierung in MDCK Zellen

In MDCK Zellen, wie auch in HEK 293 Zellen (Vassar et al., 1999), ist die endogene BACE-Expression sehr niedrig. Zum besseren Nachweis wurden MDCK Zellen, die bereits β APP₆₉₅Wt stabil exprimieren (Haass et al., 1994a), mit einer BACE-cDNA stabil cotransfiziert. BACE war nicht mit dem Myc-Epitop konjugiert, damit wurde von vornherein ein möglicher Einfluss des Myc-Epitopes auf den Transport ausgeschlossen.

Es wurde zunächst überprüft, ob die Maturierung von BACE in MDCK Zellen mit der in HEK 293 Zellen identisch ist. In „pulse/chase“-Experimenten wurde die Maturierung von BACE analysiert (2.5.4.4). Wie in HEK 293 Zellen kommt es zu einer Maturierung von BACE in MDCK Zellen (Abbildung 36 vgl. Abbildung 20).

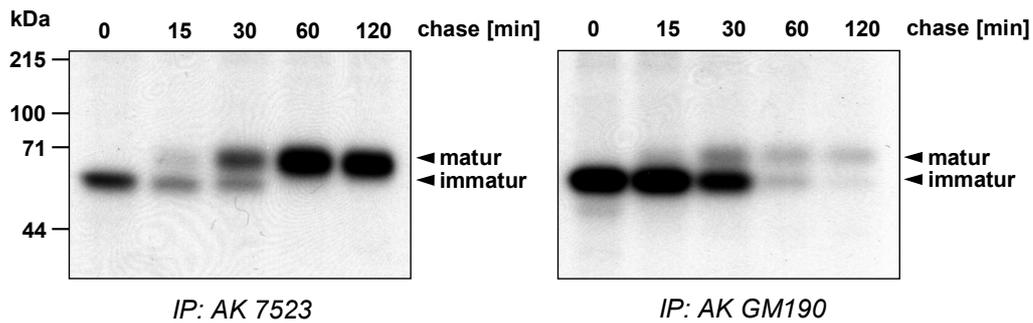


Abbildung 36: Maturierung von BACE in MDCK Zellen analysiert im „pulse/chase“-Experiment

Auf Filtern gewachsene MDCK Zellen mit stabiler Überexpression von BACE-wt, wurden basolateral 10 min mit [³⁵S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert, gefolgt von einer Inkubation mit nicht radioaktivem Medium. Zu den angegebenen „chase“-Zeitpunkten wurden Zelllysate hergestellt. Die Lysate wurden mit AK 7523 und AK GM190 immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden in der 10%-SDS-PAGE aufgetrennt, gezeigt sind die Autoradiografien der Gele. Matures und immatures BACE sind gekennzeichnet.

Bei der Immunopräzipitation der zu den verschiedenen Zeitpunkten hergestellten Zelllysaten mit AK 7523 ist ein Molekulargewichtsanstieg von ca. 65 kDa auf 70 kDa bei dem „chase“-Zeitpunkt „30 min“ detektierbar. Zu beachten ist, dass der AK 7523 präferentiell matures BACE erkennt (Abbildung 36 / Abbildung 18), dadurch wird der Eindruck erweckt, dass mehr matures BACE entsteht als immatures BACE zu den „chase“-Zeitpunkten „0 min“ und „15 min“ vorlag. Parallel zum Molekulargewichtsanstieg findet eine Abspaltung des Propeptids statt, wie die Immunopräzipitation mit AK GM190 zeigt. Bei dem „chase“-Zeitpunkt „60 min“ liegt kaum immatures BACE mehr vor, und das Propeptid wurde fast vollständig abgespalten (Abbildung 36). Die Maturierung von BACE in MDCK Zellen ist effizienter und schneller als in HEK 293 Zellen, wo erst bei dem „chase“-Zeitpunkt „120 min“ das Propeptid fast vollständig abgespalten ist und kaum immatures BACE mehr zu detektieren ist (Abbildung 20 / Abbildung 25). Die langsamere Maturierung von BACE in HEK 293 Zellen muss nicht in der Zelllinie begründet liegen sondern könnte seine Ursache auch in dem in HEK 293 Zellen eingesetzten, konjugierten BACE-myc-His Konstrukt haben.

Um zu zeigen, dass der Molekulargewichtsanstieg während der „chase“-Zeit durch komplexe Glycosylierung der Zucker hervorgerufen wird und dass matures BACE in MDCK Zellen Endo H resistent ist, wie auch in HEK 293 Zellen (Abbildung 24), wurden Deglycosylierungsexperimente durchgeführt. Radioaktiv markiertes BACE wurde zu den „chase“-Zeitpunkten „0 min“ und „120 min“ aus den Zelllysaten mit AK 7523 immunopräzipitiert und mit N-Glycosidase F und Endo H behandelt (Abbildung 37).

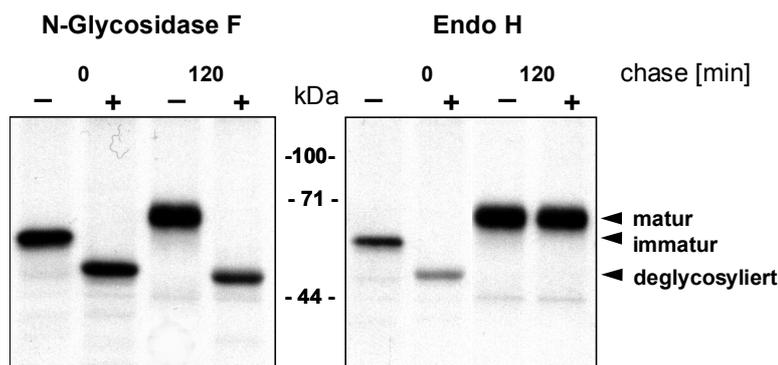


Abbildung 37: Analyse der Glycosylierung von BACE in MDCK Zellen

BACE-wt transfizierte MDCK Zellen wurden im „pulse/chase“-Experiment radioaktiv markiert. Zu den „chase“-Zeitpunkten „0 min“ und „120“ min wurden Zelllysate hergestellt und mit AK 7523 immunopräzipitiert. Die Immunopräzipitate wurden von der Matrix eluiert und aufgeteilt für die N-Glycosidase F und Endo H Behandlung (+). Für jede Inkubation wurde eine Kontrolle (-), im entsprechenden Puffer, ohne Enzym angesetzt. Die Proben wurden im 8%-SDS-Gel getrennt. Abgebildet ist eine Autoradiografie des Gels.

Die immature und auch die mature Form von BACE sind durch N-Glycosidase F Behandlung in die deglycosylierte Form mit einem Molekulargewicht von 50 kDa überführbar (Abbildung 37). Wie die Endo H Behandlung zeigt, ist die mature Form von BACE komplex glycosyliert und vollständig Endo H resistent (Abbildung 37). Damit konnte gezeigt werden, dass die Maturierung von BACE in MDCK Zellen mit der in HEK 293 Zellen vergleichbar ist (Abbildung 24).

3.5.2 BACE-Aktivität in MDCK Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass BACE in MDCK Zellen normal maturiert, wurde nun untersucht, ob exogen exprimiertes BACE in MDCK Zellen enzymatische Aktivität besitzt (Abbildung 38). Hierzu wurde der unter Kapitel 3.6 beschriebene, für BACE-L entwickelte Fluoreszenz Assay eingesetzt. In MDCK Zellen wurde membrangebundenes BACE-wt und nicht die lösliche Variante BACE-L exprimiert. Somit konnte als Enzymquelle nicht, wie für die Entwicklung des *in vitro* Assays, konditioniertes Medium eingesetzt werden (3.6.1.1), sondern BACE-wt musste aus Membranen isoliert werden. Dazu wurden von stabil mit BACE-wt transfizierten und zur Kontrolle von untransfizierten MDCK Zellen, Membranen präpariert. Die Membranen wurden mit 1 % Triton X-100 in MES Puffer extrahiert, und die lösliche Fraktion wurde im *in vitro* Assay eingesetzt (2.7.1.4). Als weitere Kontrollen wurden Membranextrakte von BACE transfizierten MDCK Zellen unter Zusatz des spezifischen BACE-Inhibitors GL189 mit dem Substratpeptid (Abbildung 58) oder mit einem nicht schneidbaren Kontrollpeptid inkubiert (2.7.2 / Abbildung 53) (Citron et al., 1995; Vassar et al., 1999).

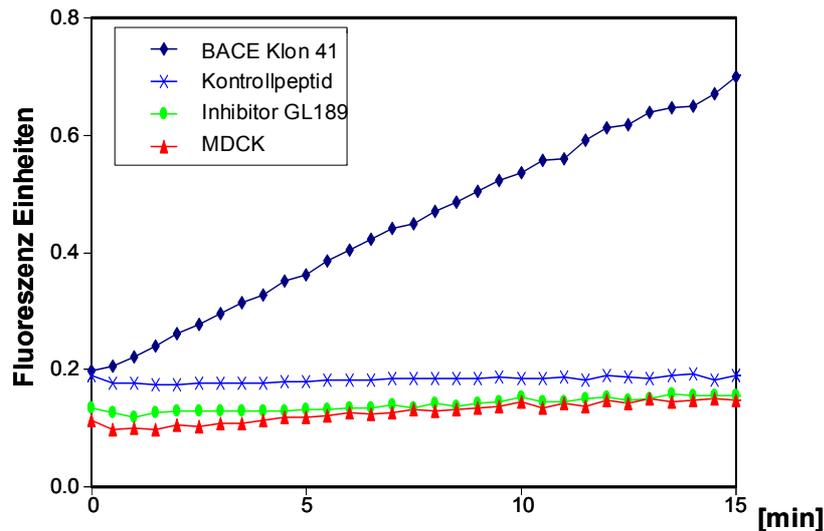


Abbildung 38: Enzymatische Aktivität von BACE, exprimiert in MDCK Zellen

Je Reaktion wurden 2 μl eines Membranextraktes (Proteinkonzentration: 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) von BACE transfizierten und untransfizierten MDCK Zellen im Assay bei einer Substratkonzentration von 400 nM eingesetzt. Extrakte von BACE transfizierten Membranen wurden zusätzlich, als Kontrolle für die Spezifität der Reaktion mit dem Inhibitor GL189 in einer Konzentration von 5 μM oder einem nicht von BACE schneidbaren Substrat inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messpunkte aus drei Ansätzen, gemessen wurde die Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit von der Zeit.

Membranextrakte von MDCK Zellen die nur endogenes BACE exprimieren zeigen im *in vitro* Assay kaum Aktivität, wohingegen Membranextrakte von BACE transfizierten MDCK Zellen eine deutliche BACE-Aktivität im Assay zeigen. Dass diese Aktivität BACE spezifisch ist wird durch den Einsatz des BACE-Inhibitors GL189 demonstriert, der den Schnitt des Substratpeptids komplett verhindert. Ebenso wird das Kontrollpeptid nicht durch Membranextrakte von BACE transfizierten Zellen prozessiert (Abbildung 38).

Damit konnte gezeigt werden, dass zum einen auch Membranextrakte im *in vitro* Assay eingesetzt werden können, ohne dass es zu unspezifischen Aktivitäten kommt und zum anderen dass exogenes BACE in MDCK Zellen aktiv ist.

3.5.3 Zelloberflächenverteilung von BACE in MDCK Zellen

Für BACE konnte in HEK 293 Zellen ein Transport über den sekretorischen Prozessierungsweg zur Zelloberfläche (3.2) und ein Recycling über endosomale Kompartimente gezeigt werden (Huse et al., 2000; Walter et al., 2001). In polarisierten Zellen ist ein gerichteter sekretorischer Transport von BACE wahrscheinlich, da auch das BACE-Substrat βAPP polarisiert transportiert wird. Die Oberflächenlokalisierung von BACE in MDCK Zellen gibt Aufschluss darüber, welchen Sortierungsweg BACE im TGN einschlägt, den der apikalen oder den der basolateralen Sortierungsvesikel. Der Transport von BACE gibt Hinweise darauf, wo es zur Interaktion von BACE und βAPP kommen könnte. Ferner könnte die Prozessierung von βAPP durch BACE auch direkt an der Zelloberfläche stattfinden, wie bereits für die α -Sekretase Prozessierung von βAPP gezeigt wurde (De Strooper et al., 1993; Haass et al., 1992a; Sisodia, 1992).

Zur Untersuchung des polarisierten Transports von BACE werden MDCK Zellen eingesetzt, die auf einer permeablen Membran in Filterkammern wachsen. Unter diesen Wachstumsbedingungen bilden MDCK Zellen ein polarisiertes Epithel aus, mit räumlich und funktionell getrennten, apikalen und basolateralen Plasmamembranen (1.5.1).

3.5.3.1 Immunocytochemische Detektion von BACE an der Plasmamembran

BACE überexprimierende, in Filterkammern polarisierte MDCK Zellen wurden apikal oder basolateral bei 4°C mit AK 7523 gegen die BACE-Ektodomäne inkubiert und nach intensivem Waschen fixiert. An den AK 7523 gebundener fluoreszierender Anti-Kaninchen AK wurde mit geeigneten Filtern im konfokalen Mikroskop detektiert (2.6.2).

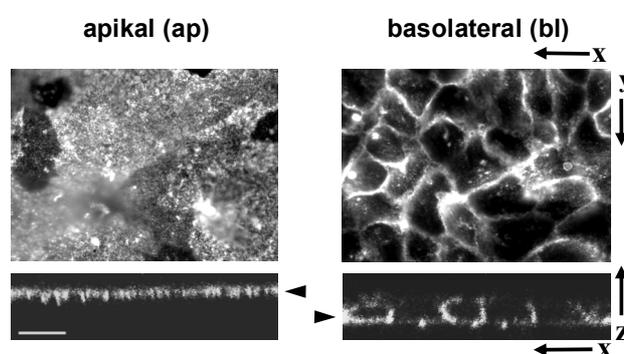


Abbildung 39: Immunofluoreszenz von BACE an der Zelloberfläche von polarisierten MDCK Zellen

Auf Filtern gewachsene, polarisierte, BACE-wt transfizierte MDCK Zellen wurden bei 4°C mit AK 7523 auf der apikalen oder basolateralen Oberfläche inkubiert, gebundener AK 7523 wurde nach Fixierung des Monolayers, mit fluoreszierendem 2. Antikörper (α -Kaninchen IgG Alexa488) detektiert. Dargestellt sind die apikale und basolaterale Oberfläche in der Aufsicht (x-y-Ebene) und im Querschnitt (z-Ebene). Die Pfeilspitzen weisen auf die apikale bzw. basale Plasmamembran hin.

BACE kann sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Oberfläche von MDCK Zellen nachgewiesen werden, dies wird auch in der Fluoreszenz des Querschnitts des Epithels bestätigt (Abbildung 39). Es ist die Fluoreszenz von BACE an der relativ ebenen apikalen Membran erkennbar und die typische, becherförmige Fluoreszenz an der lateralen und basalen Membran.

3.5.3.2 Biochemische Detektion von BACE an der Plasmamembran

Eine weitere Methode zum Nachweis der Oberflächenlokalisierung von Proteinen ist die Biotinylierung aller Oberflächenproteine, gefolgt von einem spezifischen, immunobiologischen Nachweis des zu untersuchenden Proteins. Dabei wird ein nicht zellgängiges Biotinderivat mittels einer N-hydroxysulfosuccinimidester-Gruppe kovalent an freie Aminogruppen der Oberflächenproteine gebunden (Green et al., 1971). Die spezifische Bindung von Biotin an Streptavidin wird zur Präzipitation der biotinylierten Proteine mit Streptavidin konjugierter Sepharose genutzt (Chaiet und Wolf, 1964; Wilcheck und Bayer, 1990).

Drei MDCK Zellklone mit verschieden starker BACE-Expression, zwei hoch exprimierende Klone (8, 41), ein niedrig exprimierender Klon (14), wurden zur apikalen und basolateralen Oberflächenbiotinylierung eingesetzt. Die apikale und basolaterale Oberflächenexpression von BACE wurde für jeden Klon in drei unabhängigen Experimenten quantifiziert.

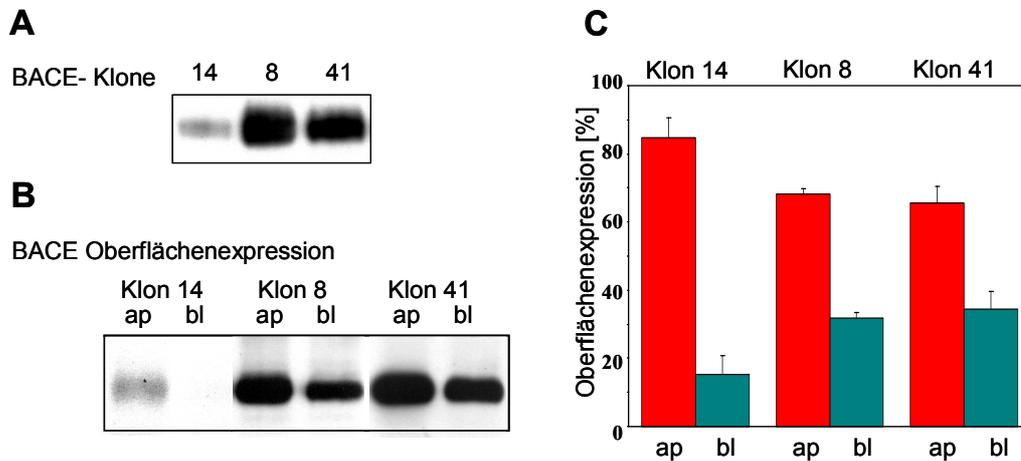


Abbildung 40: Biotinylierung von BACE an der Zelloberfläche von polarisierten MDCK Zellen

A: BACE-Expression der Klone 14, 8 und 41. Zellysate (40 µg Protein/Spur) wurden in der 8%-SDS-PAGE aufgetrennt und BACE wurde im Western Blot mit AK 7523 detektiert. **B:** Die MDCK Klone mit unterschiedlicher BACE-Expression wurden auf Filtern polarisiert und die Oberfläche des Zellmonolayers wurde entweder apikal (ap) oder basolateral (bl) biotinyliert. Zellysate wurden hergestellt, biotinylierte Proteine mit Strepavidin-Sepharose präzipitiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt. BACE wurde mit AK 7523 im Western Blot nachgewiesen. **C:** Für die Quantifizierung mittels Phosphor-Imagers wurde zur Detektion im Western Blot ein jodierter 2. Antikörper eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten. Die prozentualen apikalen bzw. basolateralen Verteilungen im Verhältnis zur Gesamtoberflächenexpression sind angegeben.

Im Western Blot von BACE aus MDCK Zellysaten und in der Oberflächenbiotinylierung kann ausschließlich matures BACE nachgewiesen werden (Abbildung 40A/B). Die Oberflächenbiotinylierung zeigt ferner, dass BACE verstärkt an der apikalen Membran lokalisiert ist, besonders der niedrig exprimierende Klon 14 zeigt eine stark ausgeprägte apikale Lokalisierung von BACE (Abbildung 40B/C). Die Nivellierung der apikalen Lokalisierung bei den beiden hoch exprimierenden Klonen mag seine Ursache in einer möglichen Sättigung der Sortierungsmaschinerie haben. Die Quantifizierung bestätigt diesen Eindruck, der niedrig exprimierende Klon 14 zeigt über 80 % von BACE an der apikalen Membran, während die hoch exprimierenden Klone 8 und 41 nur 60-70 % BACE apikal zeigen.

Interessant ist, dass BACE damit in MDCK Zellen überwiegend entgegengesetzt zu seinem basolateral sortierten Substrat β APP transportiert wird (1.5.2) (De Strooper et al., 1995a; Haass et al., 1994a; Lo et al., 1994).

Neben wenigen von der Sequenz abhängigen apikalen Sortierungssignalen (Mostov et al., 2003) sind überwiegend N-Glycosylierungen oder GPI-Anker für die apikale Sortierung verantwortlich (1.5.1). Da in der cytoplasmatischen Domäne von BACE, an Position 498-500 mit der Sequenzabfolge -SLL-, ein Transportsignal für den Rücktransport aus frühen Endosomen in späte Endosomen und ins TGN nachgewiesen werden konnte (Huse et al., 2000;

Pastorino et al., 2002; Walter et al., 2001), wurde untersucht, ob dieses Signal auch eine Rolle für die apikale Sortierung von BACE in MDCK Zellen spielt.

Es wurde eine stabile MDCK Zelllinie generiert, die ein BACE-Stoppkonstrukt, das mit AS 494 endet, exprimiert (BACE-STOP₄₉₄). Die Oberflächenlokalisierung der BACE-STOP₄₉₄ Mutante wurde durch Biotinylierung ermittelt.

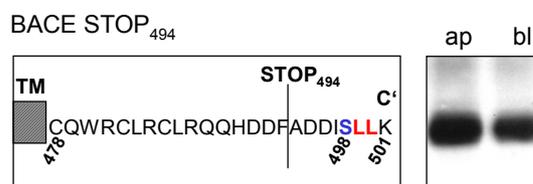


Abbildung 41: Biotinylierung von BACE-STOP₄₉₄ an der Zelloberfläche von polarisierten MDCK Zellen

A: Schematische Darstellung der BACE-STOP₄₉₄ Mutante und Kennzeichnung des Sortierungsmotivs. **B:** Biotinylierung von BACE-STOP₄₉₄ exprimierenden, auf Filtern polarisierten MDCK Zellen. Die Oberfläche des Zellmonolayers wurde entweder apikal oder basolateral biotinyliert. Zellysate wurden hergestellt und biotinylierte Proteine mit Strepavidin-Sepharose präzipitiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt. BACE wurde mit AK 7523 im Western Blot nachgewiesen.

BACE-STOP₄₉₄ ist überwiegend an der apikalen Zelloberfläche lokalisiert und zeigt damit keinen generellen Unterschied zur Verteilung von BACE-wt (Abbildung 41). Das SLLK-Motiv spielt somit keine Rolle für den gerichteten Transport zur apikalen Plasmamembran.

3.5.4 Einfluss der BACE-Sortierung auf die Prozessierung von β APP

Bei den bisherigen Untersuchungen der β APP-Prozessierung in MDCK Zellen wurden nur teilweise die unterschiedlichen I- β APP-Spezies, I- β APP β generiert durch BACE und I- β APP α generiert durch die α -Sekretase, berücksichtigt (De Strooper et al., 1995a; Haass et al., 1995c; Haass et al., 1994a; Lo et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass das Holoprotein β APP zur basolateralen Plasmamembran transportiert wird und die löslichen Prozessierungsprodukte I- β APP, A β und p3 basolateral sezerniert werden (De Strooper et al., 1995a; Haass et al., 1995c; Haass et al., 1994a; Lo et al., 1994). Es blieben jedoch einige Unklarheiten bestehen. So hatte eine Deletion des cytoplasmatischen Sortierungssignals von β APP zwar zu einer gleichmäßigen apikalen und basolateralen Oberflächenverteilung von β APP geführt, jedoch die Sezernierung von A β und I- β APP nicht wesentlich verändert (Haass et al., 1995c). Die Expression der schwedischen Mutante von β APP (β APP^{sw}), die die BACE-Prozessierung von β APP erhöht (Haass et al., 1995c; Thinakaran et al., 1996a), führt in MDCK Zellen unerklärlicher Weise zu einer erhöhten apikalen Sezernierung von I- β APP (1.5.2) (De Strooper et al., 1995a; Lo et al., 1994).

Unter Berücksichtigung der Kenntnis der apikalen Lokalisierung von BACE wurden daher erneut die Prozessierung von β APP und die Sezernierung seiner proteolytischen Prozessierungsprodukte in MDCK Zellen analysiert. Es wurde geklärt inwieweit der gerichtete Transport von BACE die Prozessierung von β APP beeinflussen kann.

3.5.4.1 Polarisierte Sezernierung von I- β APP α und I- β APP β

Zunächst wurde der Einfluss der BACE-Expression in polarisierten Zellen auf intrazelluläres β APP-Holoprotein und β APP-CTF Generierung analysiert. Dazu wurden stabil nur mit β APP oder mit β APP und BACE transfizierte MDCK Zellen auf Filtern polarisiert und mit [35 S]Methionin/Cystein metabolisch markiert. Zellysate wurden hergestellt und mit AK 6687 gerichtet gegen den C-Terminus von β APP immunopräzipitiert.

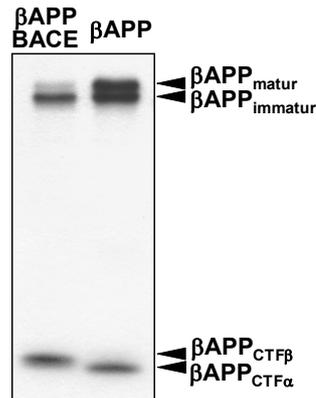


Abbildung 42: Einfluss von BACE auf β APP-Prozessierung in MDCK Zellen

β APP transfizierte oder BACE und β APP transfizierte MDCK Zellen wurden in Filterkammern polarisiert und 4 h mit [35 S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert. Die Zellysate wurden mit AK 6687 immunopräzipitiert und die Immunopräzipitate in der 12%-SDS-PAGE aufgetrennt. Abgebildet ist eine Autoradiografie des getrockneten Gels.

In der zusätzlich mit BACE transfizierten Zelllinie ist weniger von der N- und O-glycosylierten, murenen β APP-Form zu erkennen. Der Anteil der immaturen β APP-Spezies ändert sich kaum durch die BACE-Expression (Abbildung 42). Dies deutet daraufhin, dass die Expression von β APP in beiden Zelllinien ähnlich ist, jedoch durch die exogene BACE-Expression die Prozessierung von maturem β APP verstärkt wird. Durch eine erhöhte Prozessierung von β APP durch BACE wäre eine erhöhte Sezernierung von I- β APP β zu erwarten.

Die durch α -Sekretase oder BACE generierten, membrangebundenen β APP-CTF verändern ihr Migrationsverhalten im SDS-Gel in BACE transfizierten Zellen. β APP wird in MDCK überwiegend durch α -Sekretase prozessiert, und es entstehen fast ausschließlich β APP-CTF α (Haass et al., 1994a). Durch exogene BACE-Expression entstehen β APP-CTF, die im SDS-Gel bei einem höheren Molekulargewicht migrieren (Abbildung 42), es handelt sich hierbei um BACE generierte β APP-CTF β (1.3.2). α -Sekretase Prozessierung von β APP ist nicht mehr nachweisbar.

Die Sezernierung von I- β APP wurde in β APP und BACE transfizierten oder in nur β APP transfizierten MDCK Zellen analysiert. Auf Filtern gewachsene, polarisierte MDCK Zellen wurden mit [35 S]Methionin/Cystein metabolisch markiert. Apikal und basolateral konditioniertes Medium wurde getrennt gesammelt und Aliquote der Medien wurden mit dem I- β APP α

epitopspezifischen AK 1736 oder mit AK 5313, der alle I- β APP-Spezies erkennt, immunopräzipitiert.

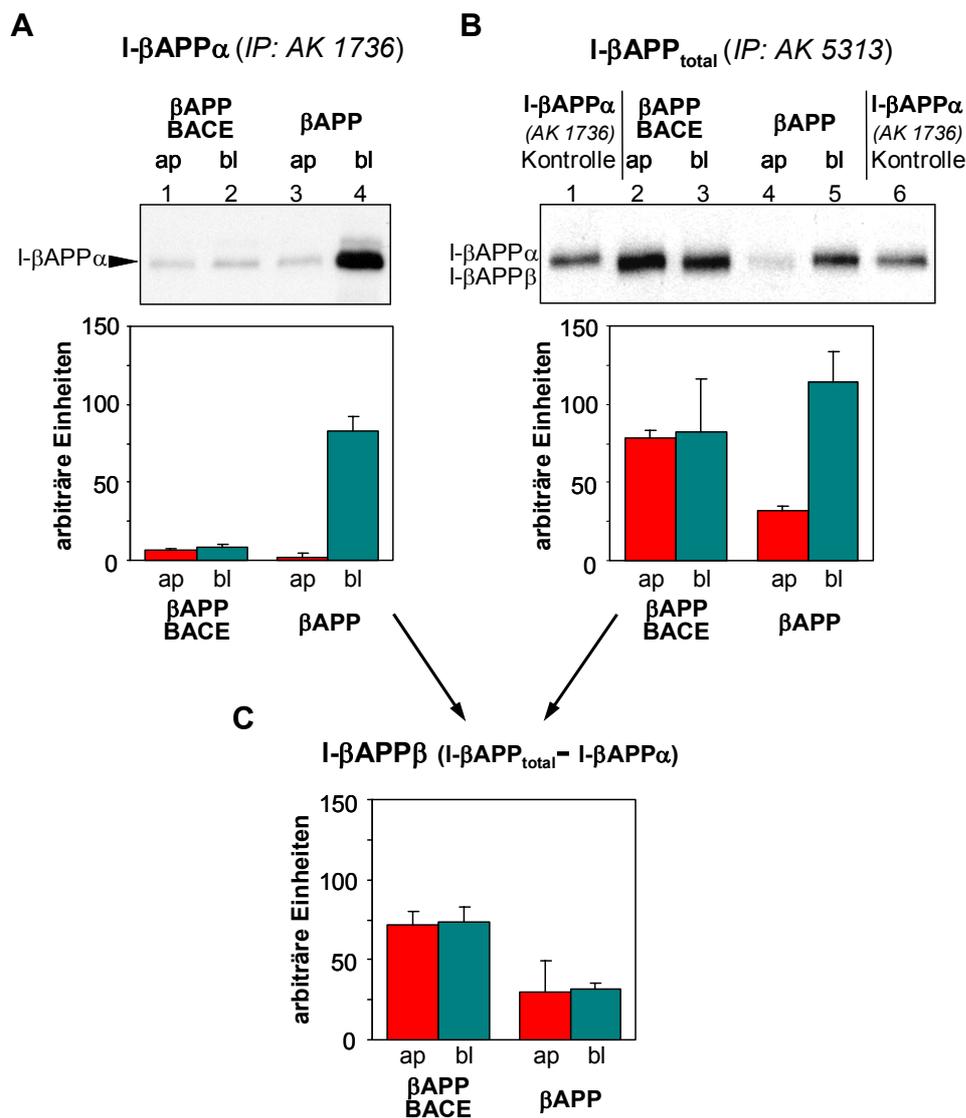


Abbildung 43: Sezernierung der I- β APP α - und I- β APP β -Spezies in BACE und β APP transfizierten MDCK Zellen

β APP transfizierte oder BACE und β APP transfizierte MDCK Zellen wurden in Filterkammern polarisiert und 4 h mit [35 S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert. Konditionierte Medien wurden apikal und basolateral getrennt gesammelt und zur Immunopräzipitation von I- β APP α (50 %) mit AK 1736 (**A**) und von I- β APP $_{total}$ (50%) mit AK 5313 (**B**) aufgeteilt. Zur Verdeutlichung des unterschiedlichen Migrationsverhaltens von I- β APP β und I- β APP α wurde zur Kontrolle, neben den Immunopräzipitaten mit AK 5313, zusätzlich I- β APP α aufgetragen. Die Immunopräzipitate von I- β APP wurden in der 8%-SDS-PAGE aufgetrennt, abgebildet sind Autoradiografien der getrockneten Gele. Unterhalb der Autoradiografie ist die Quantifizierung mittels Phosphor-Imagers dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. **C**: Quantifizierung von apikal und basolateral sezerniertem I- β APP β , berechnet aus der Differenz von I- β APP $_{total}$ und I- β APP α .

Wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt wurde (Haass et al., 1994a), entsteht in MDCK Zellen, die nur β APP exogen exprimieren, überwiegend α -Sekretase generiertes I- β APP (I- β APP α). I- β APP α wird fast ausschließlich basolateral sezerniert (Abbildung 43A, Spur 4), wohingegen die Immunopräzipitation mit AK 5313 eine geringe aber deutliche apikale Sezernierung von I- β APP $_{total}$ zeigt (Abbildung 43B, Spur 4), auch wenn die Majorität von I- β APP $_{total}$ basolateral sezerniert wird. Bei den ca. 20 % von I- β APP $_{total}$, die apikal sezerniert werden (Abbildung 43B,

Quantifizierung), muß es sich um I- β APP β handeln, da I- β APP α nicht apikal sezerniert wird (Abbildung 43A, Quantifizierung). Im SDS-Gel ist ein geringfügig unterschiedliches Migrationsverhalten von I- β APP β und I- β APP α erkennbar, I- β APP β migriert bei einem niedrigerem Molekulargewicht. Das Migrationsverhalten der mit AK 5313 präzipitierten, apikalen Fraktion unterstützt die Vermutung, dass es sich um I- β APP β handelt (Abbildung 43B, Spur 4 / vgl. Spur 3). Eine Quantifizierung von I- β APP β ist schwierig, da die Immunopräzipitation von I- β APP α und I- β APP_{total} mit unterschiedlichen AK durchgeführt wurde und das Präzipitationsverhalten AK-spezifisch ist. Trotz der Bedenken wurde versucht die sezernierte Menge von I- β APP β aus der Differenz von I- β APP_{total} und I- β APP α zu berechnen. Die Kalkulation ergibt eine identische apikale und basolaterale Sezernierung von I- β APP β (Abbildung 43C). Dass I- β APP β gleichmäßig apikal und basolateral sezerniert wird, wurde bisher nicht erkannt, da die BACE prozessierte I- β APP β Menge gering ist und von dem Hauptsezernierungsprodukt I- β APP α überdeckt wird.

Die apikale Sezernierung von I- β APP β ließe sich durch apikale Fehlsortierung des β APP-Holoproteins erklären, diese apikale β APP-Population wird ausschließlich von BACE prozessiert und nicht von der α -Sekretase, die resultierende I- β APP β Menge wird apikal sezerniert. Die basolaterale Menge von I- β APP β entsteht aufgrund der 20-30 % basolateral sortiertem BACE, das in diesem Kompartiment mit der α -Sekretase konkurriert (4.1.6.1). Die polarisierte Sezernierung von I- β APP ist zusammenfassend in Abbildung 44 dargestellt.

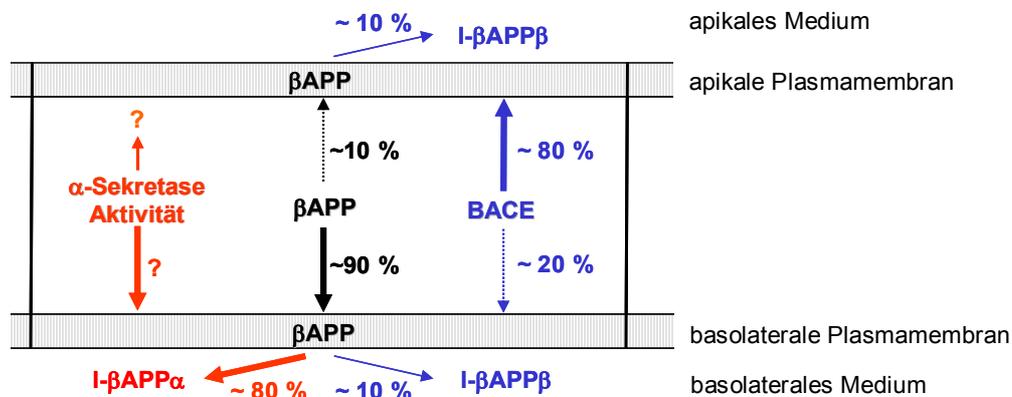


Abbildung 44: Polarisierte Sezernierung I- β APP α und I- β APP β

Dargestellt sind Oberflächenverteilungen von β APP (schwarz), BACE (blau) und die vermutete Verteilung der α -Sekretase Aktivität (rot). Die resultierenden I- β APP Prozessierungsprodukte sind in den Farben der prozessierenden Protease dargestellt. Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf die Gesamtmenge von β APP bzw. BACE.

Eine zusätzliche BACE-Transfektion der β APP exprimierenden MDCK Zelllinie verhindert fast vollständig die α -Sekretase Prozessierung von β APP. Nur geringe, basale Mengen von I- β APP α werden apikal und basolateral sezerniert (Abbildung 43A, Spur 1 / 2). Da α -Prozessierung kaum stattfindet entspricht I- β APP_{total}, in diesem Fall der I- β APP β -Spezies. I- β APP β wird gleichmäßig apikal und basolateral sezerniert (Abbildung 43B, Spur 2 / 3). Da das β APP-Holoprotein basolateral sortiert wird, überrascht die ausschließliche Prozessierung durch überwiegend apikal sortiertes BACE. Es wäre möglich, dass aufgrund der Übertransfektion BACE nicht im

endocytotischen Transportweg (Haass und Selkoe, 1993; Koo und Squazzo, 1994), sondern bereits in frühen sekretorischen Kompartimenten sein Substrat β APP schneidet, bevor es zu einer Trennung des apikalen und basolateralen Transportweges kommt. Auch in anderen Zelllinien wurde beobachtet, dass eine Überexpression von BACE zu einer Prozessierung von β APP in frühen sekretorischen Kompartimenten führt (Creemers et al., 2001; Vassar et al., 1999).

3.5.4.2 Polarisierte Sezernierung von A β und p3

Aus den bisherigen Ergebnissen ergibt sich, dass die nicht amyloidogene Prozessierung von β APP durch die α -Sekretase und die amyloidogene Prozessierung durch BACE in getrennten Transportwegen stattfindet. Zur Entstehung von A β oder p3 müssen die durch BACE oder α -Sekretase generierten, membrangebundenen C-terminalen Fragmente β APP-CTF β oder β APP-CTF α von dem γ -Sekretase-Komplex geschnitten werden (1.3.2) (Haass, 2004). Es entstehen A β oder p3, die sezerniert werden, und ein instabiles, verkürztes C-terminales Fragment (β APP-CTF γ , auch AICD) (Sastre et al., 2001).

Die Sezernierung von A β und p3 wurde, wie auch die Sezernierung von I- β APP β und I- β APP α in β APP und BACE transfizierten oder in nur β APP transfizierten MDCK Zellen analysiert. Auf Filtern gewachsene, polarisierte MDCK Zellen wurden mit [35 S]Methionin/Cystein metabolisch markiert, apikal und basolateral konditioniertes Medium wurde getrennt gesammelt. Die Medien wurden mit dem AK 3926 immunopräzipitiert (Abbildung 45).

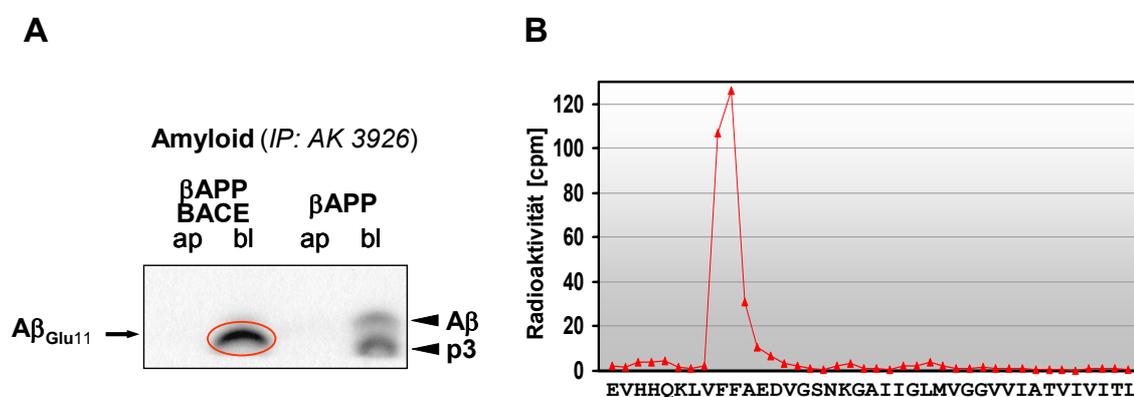


Abbildung 45: Sezernierung von A β und p3 in BACE und β APP transfizierten MDCK Zellen

A: β APP transfizierte oder BACE und β APP transfizierte MDCK Zellen wurden in Filterkammern polarisiert und 4 h mit [35 S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert. Konditionierte Medien wurden apikal und basolateral getrennt gesammelt, A β und p3 wurden mit AK 3926 immunopräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden im Tris-Tricine Gel aufgetrennt, abgebildet ist die Autoradiografie des getrockneten Gels. **B:** Zur Radiosequenzierung der A β Bande in BACE und β APP transfizierten MDCK Zellen, wurden diese in Filterkammern polarisiert und 4 h mit [3 H]Phenylalanin radioaktiv markiert. Konditioniertes Medium wurde basolateral gesammelt und mit AK 3926 immunopräzipitiert. Das Immunpräzipitat wurde im Tris-Tricine-Gel aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und die A β -Bande wurde in der Autoradiografie lokalisiert (entspricht der in A rot markierten Bande). Die Bande wurde aus der Membran ausgeschnitten und radiosequenziert. Die gemessene Radioaktivität pro Zyklus ist angegeben, die entsprechende Proteinsequenz ist im Einbuchstabencode dargestellt.

In β APP transfizierten MDCK Zellen werden sowohl $A\beta$ als auch p3 basolateral sezerniert (Abbildung 45A) (De Strooper et al., 1995a; Haass et al., 1994a; Lo et al., 1994), dies entspricht dem Transport des β APP-Holoproteins zur basolateralen Plasmamembran. Überraschend ist, dass kein $A\beta$ apikal detektiert wird, obwohl die zugehörige I- β APP Spezies apikal und basolateral detektiert wird (Abbildung 43).

In β APP und BACE transfizierten MDCK Zellen entsteht ausschließlich eine Peptidspezies, die bei einem Molekulargewicht zwischen dem von $A\beta$ und p3 im Tris-Tricine-Gel migriert und basolateral sezerniert wird (Abbildung 45A). Wie die Radiosequenzierung des Peptids ergab (2.5.4.5), handelt es sich um eine N-terminal verkürzte $A\beta_{Glu11}$ -Spezies (Abbildung 45B). Dieses an Position Glu11 beginnende Peptid wurde bereits nachgewiesen, bevor BACE kloniert war (Gouras et al., 1998; Haass et al., 1992a; Wang et al., 1996). Später konnte gezeigt werden, dass BACE auch diesen Schnitt katalysiert (Benjannet et al., 2001; Cai et al., 2001; Creemers et al., 2001; Farzan et al., 2000; Vassar et al., 1999). Die basolaterale Sezernierung der $A\beta$ -Spezies korrespondiert nicht mit der Sezernierung von I- β APP in BACE transfizierten Zellen (Abbildung 43). Eine mögliche Ursache wäre, dass der γ -Sekretase-Komplex nicht an der apikalen Plasmamembran lokalisiert bzw. aktiv ist und damit apikal kein $A\beta$ entstehen kann. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass das direkte Vorläuferprotein für die $A\beta$ -Bildung, β APP-CTF β , welches sein C-terminales, basolaterales Sortierungssignal noch enthält (1.5.2) (Haass et al., 1994a), zur basolateralen Plasmamembran transportiert wird und im basolateralen Kompartiment von der γ -Sekretase geschnitten wird. Die letztere Möglichkeit ist in der Abbildung 46 dargestellt.

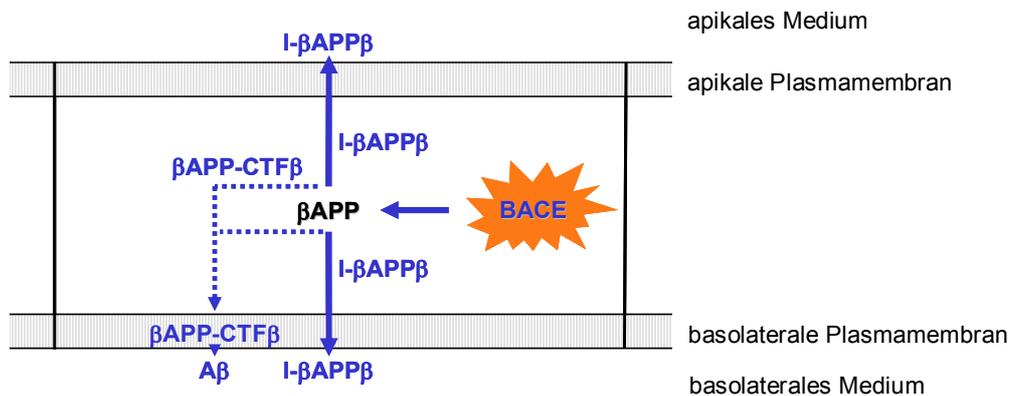


Abbildung 46: Polarisierte Sezernierung von I- β APP β und $A\beta$ in BACE transfizierten MDCK Zellen

Durch die hohe BACE Expression (Sternchen) findet fast ausschließlich BACE-Prozessierung von β APP (blau) statt.

3.5.4.3 Polarisierte Verteilung von β APP-CTF an der Plasmamembran

Um zu untersuchen, ob β APP-CTF polarisiert transportiert werden, wurden β APP exprimierende MDCK Zellen auf Filtern polarisiert und zur apikalen und basolateralen Oberflächenbiotinylierung eingesetzt. Es wurden keine zusätzlich BACE exprimierenden MDCK Zellen eingesetzt, da eine Überexpression von BACE zu einer Prozessierung von β APP in frühen sekretorischen Kompartimenten führt (3.5.4.1).

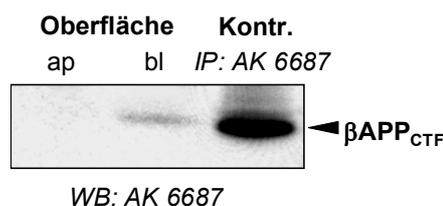


Abbildung 47: Biotinylierung von β APP-CTF an der Zelloberfläche von polarisierten MDCK Zellen

β APP exprimierende MDCK Zellen wurden auf Filtern polarisiert, die Oberfläche des Zellmonolayers wurde entweder apikal oder basolateral biotinyliert. Zelllysate wurden hergestellt und biotinylierte Proteine mit Strepavidin-Sepharose präzipitiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt, und β APP-CTF wurde mit AK 6687 im Western Blot nachgewiesen. Als Kontrolle wurde Zelllysate direkt mit AK 6687 immunopräzipitiert.

β APP-CTF kann nur an der basolateralen Plasmamembran, nicht apikal, detektiert werden (Abbildung 47). Es können nur geringe Mengen β APP-CTF an der Oberfläche nachgewiesen werden, vermutlich handelt es sich um β APP-CTF α , da β APP in MDCK Zellen überwiegend von der α -Sekretase prozessiert wird (Abbildung 42). Es ist anzunehmen, dass β APP-CTF β ebenfalls basolateral sortiert wird, da es das gleiche basolaterale Sortierungssignal enthält, wie β APP-CTF α . Aufgrund der geringen BACE-Prozessierung von β APP ist β APP-CTF β nicht nachweisbar.

Der basolaterale Transport von β APP-CTF, des unmittelbaren Substrats der γ -Sekretase und des direkten A β - und p3-Vorläufers, erklärt die ausschließlich basolaterale Sezernierung von A β , auch in BACE überexprimierenden Zellen.

3.5.4.4 Reinternalisierung und Transcytose von β APP

Das unterschiedliche Sezernierungsverhalten von A β und dem korrespondierenden I- β APP β in BACE transfizierten, aber auch in nur β APP transfizierten MDCK Zellen, könnte durch Reinternalisierung von β APP-CTF β und einen Rücktransport zum basolateralen Kompartiment folgendermaßen erklärt werden. Zunächst würde ein Teil des β APP-Holoproteins zur apikalen Plasmamembran transportiert werden, wo Prozessierung durch BACE stattfindet. L- β APP β wird apikal sezerniert und die entstehenden β APP-CTF β würden reinternalisiert, zur basolateralen Plasmamembran transportiert bzw. transcytiert und dort von der γ -Sekretase geschnitten werden, so könnte A β basolateral sezerniert werden.

Die Oberflächenexpression von β APP-CTF β konnte nicht nachgewiesen werden und die Oberflächenexpression von β APP-CTF α ist zu niedrig um eine mögliche Transcytose zu untersuchen. Die Reinternalisierung konnte nur am β APP-Holoprotein und den aus der Reinternalisierung folgenden Sezernierungsprodukten, I- β APP α und I- β APP β untersucht werden.

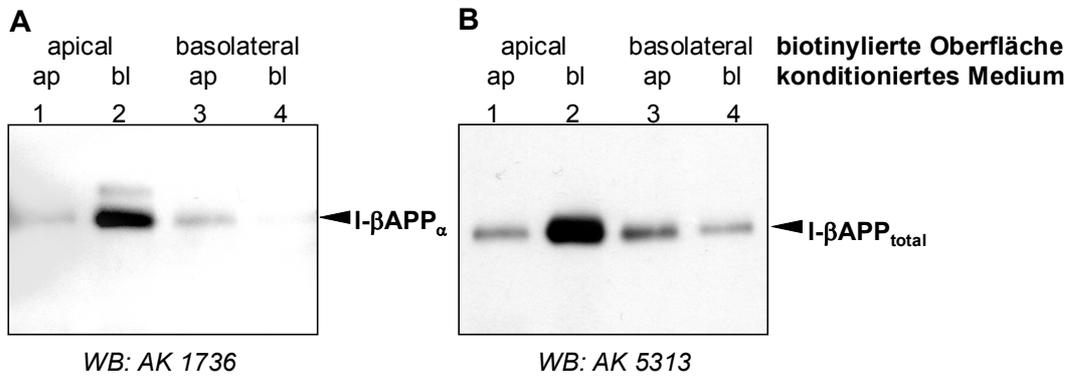


Abbildung 48: Reinternalisierung vom β APP-Holoprotein

Auf Filtern gewachsene, β APP überexprimierende MDCK Zellen wurden apikal oder basolateral zunächst bei 4°C biotinyliert und dann mit Medium 1 h bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert. Die konditionierten Medien wurden apikal und basolateral getrennt gesammelt, mit Strepavidin-Sepharose präzipitierte Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, und I- β APP wurde mit AK 1736 (A) und AK 5313 (B) im Western Blot nachgewiesen.

Apikal fehl-sortiertes β APP-Holoprotein wurde an der apikalen Plasmamembran biotinyliert, die resultierende, biotinylierte I- β APP-Spezies wird basolateral sezerniert (Abbildung 48A / B, Spur 2). Diese I- β APP-Spezies enthält I- β APP α (Abbildung 48A, Spur 2). Da die Differenz zwischen detektiertem I- β APP $_{total}$ und I- β APP α gering ist kann nicht beurteilt werden inwieweit diese Spezies auch I- β APP β beinhaltet. Von dem basolateral biotinylierten β APP-Holoproteins werden nur geringe Mengen I- β APP sezerniert (Abbildung 48A / B, Spur 3 / 4). Die Transcytose des fehl-sortierten β APP-Holoproteins von der apikalen Plasmamembran zu basolateralen Kompartimenten, ist ein Hinweis darauf, dass auch β APP-CTF von der apikalen zur basolateralen Plasmamembran transcytiert werden können. Damit wird die Vermutung unterstützt, dass der direkte Vorläufer von A β , β APP-CTF β zur basolateralen Oberfläche transportiert wird und dort A β ins basolaterale Medium freigesetzt wird, auch wenn das korrespondierende I- β APP β apikal sezerniert wurde (Abbildung 46).

3.5.4.5 Deletion des basolateralen β APP-Sortierungssignals und Auswirkung auf die β APP-Prozessierung

Eine Änderung des basolateralen β APP-Transports müsste nach den bisherigen Erkenntnissen eine Veränderung der β APP-Prozessierung bewirken. Durch einen vermehrten Transport von β APP zur apikalen Plasmamembran wäre eine erhöhte amyloidogene Prozessierung von β APP durch BACE zu erwarten, da BACE apikal sortiert wird und die bisherigen Ergebnisse nicht auf eine apikale α -Sekretase Aktivität schließen lassen. Ferner könnte durch den apikalen

Transport von β APP geklärt werden, ob γ -Sekretase Aktivität auch im apikalen Transportweg vorliegt.

Die Einführung eines Stoppkodons hinter der TM Domäne von β APP (β APP Δ C) deletiert das basolaterale Sortierungssignal und wie bereits gezeigt wurde, wird β APP Δ C gleichmäßig zur apikalen und basolateralen Plasmamembran transportiert (1.5.2) (Haass et al., 1995c).

Die Sezernierung von I- β APP wurde in β APP Δ C und BACE transfizierten oder in nur β APP Δ C transfizierten MDCK Zellen analysiert. Auf Filtern gewachsene, polarisierte MDCK Zellen wurden mit [35 S]Methionin/Cystein metabolisch markiert, apikal und basolateral konditioniertes Medium wurde getrennt gesammelt. Aliquote der Medien wurden mit dem I- β APP α epitopspezifischen AK 1736 oder AK 5313, der alle I- β APP-Spezies erkennt, immunopräzipitiert.

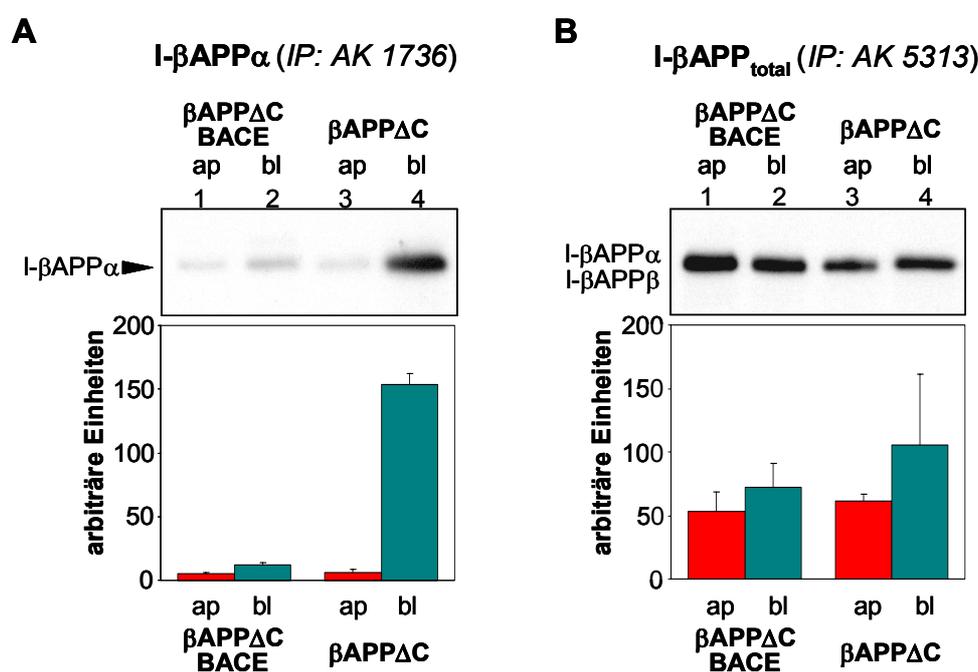


Abbildung 49: Sezernierung der I- β APP α und I- β APP β -Spezies in BACE und β APP Δ C transfizierten MDCK Zellen

β APP Δ C transfizierte oder BACE und β APP Δ C transfizierte MDCK Zellen wurden in Filterkammern polarisiert und 4 h mit [35 S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert. Konditionierte Medien wurden apikal und basolateral getrennt gesammelt und zur Immunopräzipitation von I- β APP α (50 %) mit AK 1736 (**A**) und von I- β APP $_{total}$ (50 %) mit AK 5313 (**B**) aufgeteilt. Die Immunopräzipitate von I- β APP wurden in der 8%-SDS-PAGE aufgetrennt, abgebildet sind Autoradiografien der getrockneten Gele. Unterhalb der Autoradiografie ist die Quantifizierung mittels Phosphor-Imagers dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten sind angegeben.

Obwohl β APP Δ C gleichmäßig zur apikalen und basolateralen Plasmamembran transportiert wird (Haass et al., 1995c), wird in MDCK Zellen die nur β APP Δ C exogen exprimieren, I- β APP α fast ausschließlich basolateral sezerniert (Abbildung 49A, Spur 3 / 4) wohingegen die Immunopräzipitation mit AK 5313 eine deutliche apikale Sezernierung von I- β APP $_{total}$ zeigt (Abbildung 49B, Spur 3 / 4). Bei dem I- β APP $_{total}$ das apikal sezerniert wird, muss es sich um I- β APP β handeln, da fast kein I- β APP α apikal sezerniert wird. Das basolateral sezernierte

I- β APP_{total} besteht überwiegend aus I- β APP α , dies ist auch am geringfügig größeren Molekulargewicht erkennbar (Abbildung 49B, Spur 3 / 4).

Eine zusätzliche BACE-Transfektion führt wiederum zu einer fast ausschließlichen BACE-Prozessierung von β APP Δ C und zur gleichmäßigen apikalen und basolateralen Sezernierung von I- β APP_{total} (Abbildung 49B, Spur 1 / 2). Dies unterstützt die Vermutung, dass die Überexpression von BACE zu einer sehr frühen Prozessierung von β APP führt, die unabhängig von der Sortierung des Enzyms und des Substrates ist.

Um Aufschluss über die Lokalisierung der γ -Sekretase Aktivität zu bekommen, wurde die A β - und p3-Sezernierung der β APP Δ C exprimierenden MDCK Zellen untersucht.

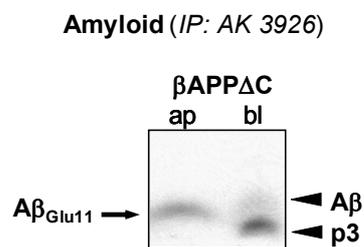


Abbildung 50: Sezernierung von A β und p3 in β APP Δ C transfizierten MDCK Zellen

β APP Δ C transfizierte MDCK Zellen wurden in Filterkammern polarisiert und 4 h mit [³⁵S]Methionin/Cystein radioaktiv markiert. Konditionierte Medien wurden apikal und basolateral getrennt gesammelt und A β und p3 wurden mit AK 3926 immunopräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden im Tris-Tricine-Gel aufgetrennt, abgebildet ist die Autoradiografie des getrockneten Gels.

Tatsächlich wird A β apikal und basolateral sezerniert (Abbildung 50), die basolateral sezernierte A β -Menge ist im Vergleich zu der, in β APP transfizierten Zellen reduziert (Abbildung 45). Die Ursache für die reduzierte basolateral sezernierte A β -Menge ist vermutlich die Blockierung der Reinternalisierung von β APP. Durch die Deletion des C-Terminus wurde auch das Reinternalisierungssignal von β APP entfernt (Haass et al., 1995c; Lai et al., 1995). Die apikal entstehende A β -Spezies migriert im Tris-Tricine-Gel bei einem Molekulargewicht zwischen dem von A β _(1-40/42) und p3 (Abbildung 50), damit entspricht das Migrationsverhalten dem der A β _{Glu11}-Spezies (Abbildung 45).

3.5.5 Oberflächenlokalisierung der Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes in polarisierten MDCK Zellen

Die apikale Sezernierung von A β in β APP Δ C transfizierten MDCK Zellen ist ein Hinweis darauf, dass γ -Sekretase Aktivität auch im apikalen Kompartiment vorhanden ist. Um die Zelloberflächenlokalisierung des γ -Sekretase-Komplex zu untersuchen wurde die Lokalisierung der Komplex-Komponenten PS1 und Nicastrin, analysiert (Capell et al., 1998; Capell et al., 2000a; Yang et al., 2002; Yu et al., 2000). Endogenes PS1 in MDCK Zellen konnte mit den zur

Verfügung stehenden, gegen humanes PS1 gerichteten AK, nicht nachgewiesen werden. Für die Untersuchung der PS1 Sortierung wurden MDCK Zellen stabil mit PS1 transfiziert. Endogenes Nicastrin konnte detektiert werden. Apikale und basolaterale Oberflächenbiotinylierungen wurden durchgeführt.

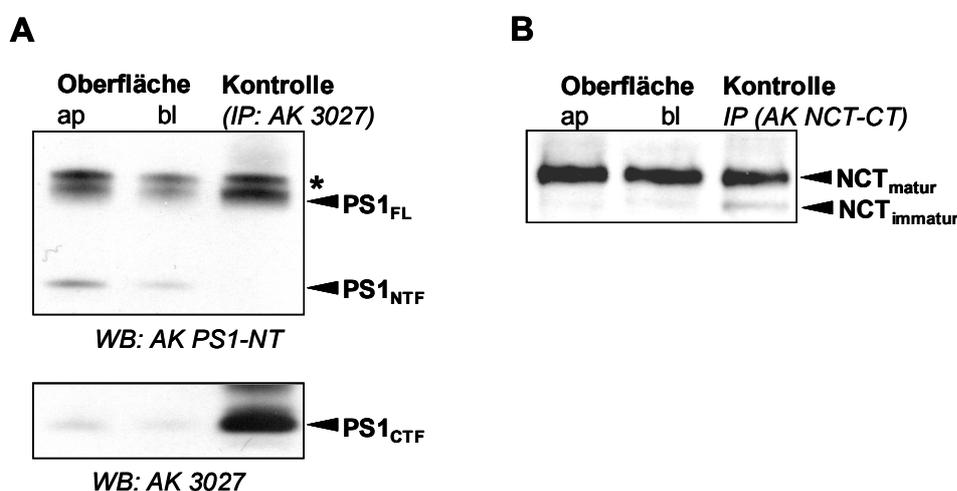


Abbildung 51: Biotinylierung von γ -Sekretase Komponenten an der Zelloberfläche von polarisierten MDCK Zellen

A: PS1 überexprimierende MDCK Zellen wurden auf Filtern polarisiert, die Oberfläche des Zellmonolayers wurde entweder basolateral oder apikal biotinyliert. Zellysate wurden hergestellt und biotinylierte Proteine mit Streptavidin-Sepharose präzipitiert, in der PAGE aufgetrennt, und PS1 wurde mit monoklonalem AK PS1-NT und mit AK 3027 im Western Blot nachgewiesen. Als Kontrolle wurde PS1 mit dem AK 3027, der das C-terminale PS1 Fragment erkennt, aus dem Zellysat immunopräzipitiert. Für die Immunopräzipitation wurde nur 1/5 des Materials der Biotinylierung eingesetzt. Der Stern kennzeichnet eine unspezifische Bande **B:** Endogenes Nicastrin wurde an der Oberfläche polarisierter MDCK Zellen biotinyliert und wie unter A mit AK NCT-CT nachgewiesen.

N-terminale und C-terminale PS1 Fragmente, aber auch das PS1 Holoprotein konnten an der apikalen und basolateralen Oberfläche nachgewiesen werden (Abbildung 51A). In der Kontrolle, in der PS1 aus dem MDCK Zellysat mit AK 3027 immunopräzipitiert wurde, wurden nur 20 % der Lysatmenge eingesetzt, die für die Biotinylierung eingesetzt wurden. Somit liegen nur sehr geringe Mengen des exprimierten PS1 an der Zelloberfläche vor (Kaether et al., 2002; Leem et al., 2002; Ray et al., 1999). Der zur Immunopräzipitation eingesetzte AK 3027 ist gegen den „Loop“ im C-terminalen PS1 Fragments gerichtet und präzipitiert unter den gewählten Lysisbedingungen kein N-terminales Fragment (1.3.2.3). Endogenes Nicastrin, kann an der apikalen und basolateralen Plasmamembran zu ungefähr gleichen Mengen nachgewiesen werden (Abbildung 51B).

Damit kann davon ausgegangen werden, dass der γ -Sekretase Komplex nicht polarisiert transportiert wird und in apikalen und basolateralen Kompartimenten aktiv ist.

3.6 In vitro Charakterisierung von BACE

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Charakteristik von BACE bezüglich der enzymatischen Aktivität *in vitro* analysiert. Durch die *in vitro* Analyse von BACE werden komplexe Einflüsse, z.B. durch zelluläre Transportvorgänge oder durch die Entstehung von Mikrodomänen, auf die BACE-Aktivität eliminiert. Damit kann sichergestellt werden, dass die primären Enzymeigenschaften analysiert werden. Es wurde ein BACE *in vitro* Assay entwickelt um weitere Aufschlüsse über das pH-Optimum und die Enzymkinetik zu erhalten.

Generell ist ein BACE *in vitro* Assay von immenser pharmakologischer Bedeutung, da BACE eins der beiden A β freisetzenden Enzyme ist und damit ein therapeutischer Hauptangriffspunkt zur Behandlung der Alzheimer Krankheit. In einem BACE *in vitro* Assay können pharmakologisch Substanzen auf die Inhibition von BACE untersucht werden. Ferner kann der Assay eingesetzt werden, um Regionen von BACE zu untersuchen, die für die Struktur von BACE oder für die Substratbindung und damit für die Aktivität des Enzyms notwendig sind.

3.6.1 Entwicklung eines *in vitro* Assays für BACE

Es wurde ein Fluoreszenz Assay entwickelt. Ein Peptidsubstrat konjugiert mit einer fluoreszierenden und einer quencheden Gruppe wurde synthetisiert, durch Inkubation mit dem Enzym kommt es zum Schnitt des Substrats, und aufgrund der Trennung von quencheder und fluoreszierender Gruppe zur Fluoreszenz (2.7.2). Vorteile sind, dass der Substratumsatz kontinuierlich verfolgt werden kann und dass der Assay im „high-throughput“ System eingesetzt werden kann (Osborn, 2002).

3.6.1.1 Enzymquelle und Enzymaufreinigung für den BACE-Assay

In vivo konnte gezeigt werden, dass BACE-L enzymatische Aktivität aufweist (Abbildung 30 / Abbildung 31) und über das konjugierte 6fach-His ließe sich BACE-L leicht aufreinigen. Konditioniertes Medium von BACE-L exprimierenden HEK 293 Zellen wurde als eine mögliche Enzymquelle untersucht. Konditioniertes, serumfreies Medium von BACE-L exprimierenden HEK 293 Zellen oder untransfizierten Kontrollzellen wurde gesammelt. Da andere Arbeitsgruppen BACE-Aktivität in einem Natrium-Acetat Puffer (pH 4-4,8) zeigen konnten (Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999) wurde dieser Puffer als Assay-Puffer eingesetzt (2.7.3). Zunächst wurde ein Teil des konditionierten Mediums gegen den Natrium-Acetat Puffer dialysiert. Aliquote des BACE-L enthaltenden Mediums, des Kontrollmediums und des dialysierten BACE-L Mediums wurden in der SDS-PAGE getrennt und anschließend in der Silberfärbung und im Western Blot mit AK 9E10 und AK GM190 analysiert (Abbildung 52A). Zur Aufreinigung von BACE-L wurde das konditionierte Medium im „batch-Verfahren“ mit Nickel-Agarose inkubiert (2.7.1.1). Aliquote der Aufreinigungsschritte wurden in der SDS-PAGE getrennt und anschließend in der Silberfärbung und im Western Blot mit AK 9E10 und AK GM190 analysiert (Abbildung 52B).

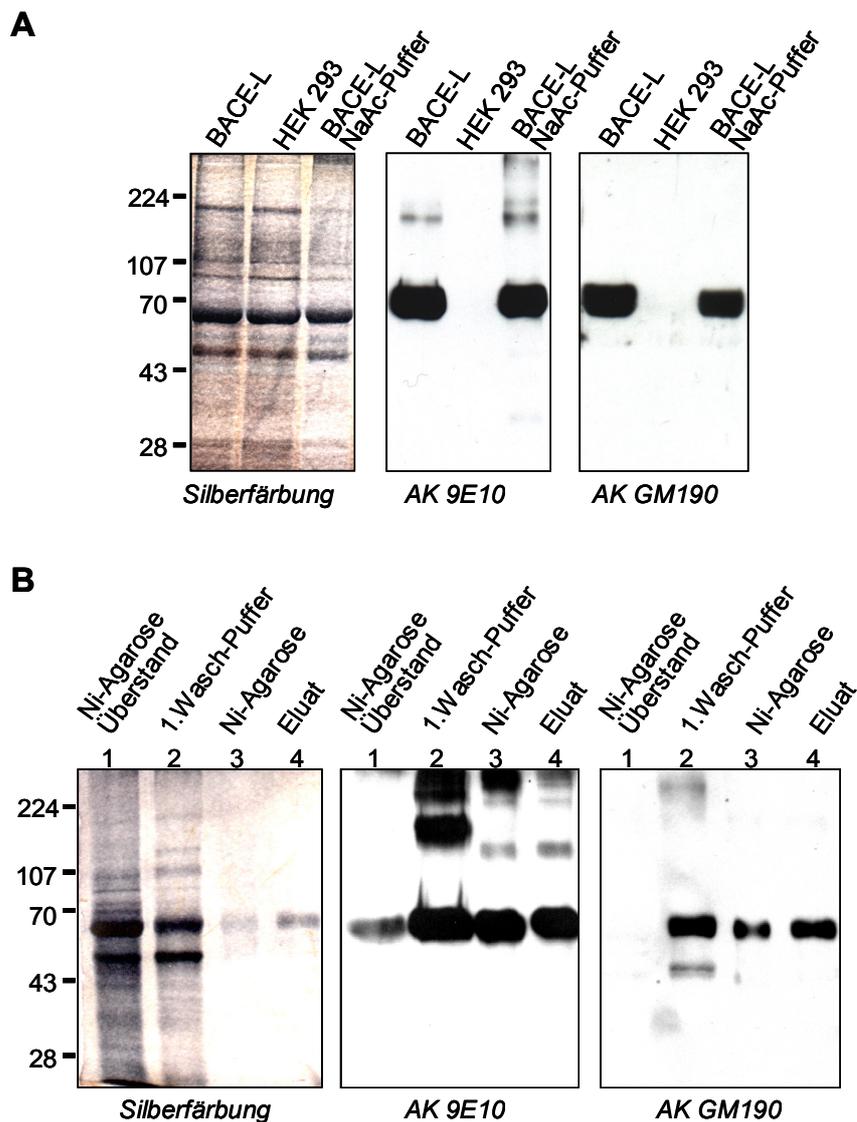


Abbildung 52 Partielle Aufreinigung von BACE-L über Ni-Agarose

Es wurde 16 h konditioniertes, serumfreies Medium (Optimem) von BACE-L exprimierenden HEK 293 Zellen oder Kontrollzellen gesammelt. **A:** 125 μ l des BACE-L Mediums, Kontrollmediums und des gegen Na-Acetat Puffer dialysierte BACE-L Medium wurden TCA gefällt, in der 10%-SDS-PAGE aufgetrennt und zur Silberfärbung oder zum Western Blot mit AK 9E10 und AK GM190 eingesetzt. **B:** 125 μ l konditioniertem BACE-L Medium entsprechende Aliquote der Aufreinigungsschritte mit Ni-Agarose wurden in der 10%-SDS-PAGE aufgetrennt, zur Silberfärbung oder zum Western Blot mit AK 9E10 und AK GM190 eingesetzt. Die Fraktion der Ni-Agarose zeigt die Menge BACE-L, die nicht eluiert werden konnte.

In der Silberfärbung des SDS-Gels sind zwischen den konditionierten Medien von BACE-L exprimierenden Zellen und Kontrollzellen keine Unterschiede erkennbar, bei den kräftigen Proteinbanden handelt es sich nicht um BACE-L, sondern vermutlich um Albumine. Die Dialyse vermindert geringfügig den Proteingehalt. Im Western Blot erkennen beide AK spezifisch BACE-L, keine Reaktion ist mit konditioniertem Medium von HEK 293 Zellen zu detektieren. Aufgrund der kräftigen Reaktion im Western Blot mit AK GM190 ist davon auszugehen, dass große Mengen von sezerniertem BACE-L das Propeptid enthalten (Abbildung 52A).

Die Aufreinigung von BACE-L aus konditioniertem Medium über Nickel-Agarose, zeigt, dass BACE-L effizient an der Nickel-Agarose bindet und die meisten Proteine im Überstand nach Inkubation mit Nickel-Agarose verbleiben. In den Waschschrritten werden noch unspezifisch gebundene Proteine eliminiert, jedoch auch große Mengen BACE-L (Abbildung 52B, Spur 2, vgl. Silberfärbung v. s. Western Blot). Die aufgereinigte Fraktion enthält fast ausschließlich BACE-L, in der Silberfärbung sind, neben der auch im Western Blot detektierten Bande, keine weiteren Proteinbanden erkennbar (Abbildung 52B, Spur 3 / 4, vgl. Silberfärbung v. s. Western Blot). Die Elution von BACE-L von der Nickel-Agarose ist nicht vollständig, trotzdem sollte die aufgereinigte BACE-L Menge ausreichend sein um Aktivität im *in vitro* Assay zu zeigen.

3.6.1.2 Substrat für den BACE-Assay

Als Substrat wurde ein β APP-Peptid gewählt, das die schwedische Mutation enthält, da gezeigt werden konnte, dass BACE eine deutlich höhere Affinität zu β APP^{sw} als zu β APP^{wt} hat (Citron et al., 1992; Citron et al., 1995; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999). Das Peptid musste relativ kurz sein, damit die Fluoreszenz durch die quenchende Gruppe effektiv unterdrückt werden kann. Dass kurze Peptide als BACE-Substrat ausreichend sind wurde bereits gezeigt (Lin et al., 2000; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999).

Es wurden 3 Substrate synthetisiert, die in der Peptidsequenz P5-P4' der β APP^{sw}-Schnittstelle identisch sind. Durch Einfügen von weiteren Argininresten wurde jedoch die Peptidlänge der Substrate verändert und der Abstand zwischen quenchender und fluoreszierender Gruppe erhöht (Cy3, Cy3 R), oder die Umgebung der quenchenden Gruppe verändert (Cy3 RR). Zur Kontrolle der Schnittspezifität wurde ein potentiell nicht durch BACE schneidbares Peptid Substrat synthetisiert, ein AS Austausch an Position P1 von Leu zu Val verhindert die β APP-Prozessierung durch BACE (Citron et al., 1995; Vassar et al., 1999). Als Enzym wurde das aufgereinigte BACE-L eingesetzt (3.6.1.1) und als Assay-Puffer wurde der beschriebene Na-Acetat Puffer gewählt (Sinha et al., 1999). Die Änderung der Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit von der Zeit gemessen (2.7.3).

A

| Name | Peptidsequenz |
|---------------|---|
| Cy3 | Cy3-S-E-V-N-L-D-A-E-F-K(Cy5Q)-NH ₂ |
| Cy3 R | Cy3-R-S-E-V-N-L-D-A-E-F-K(Cy5Q)-R-OH |
| Cy3 RR | Cy3-S-E-V-N-L-D-A-E-F-R-K(Cy5Q)-R-R-OH |
| Cy3 Kontrolle | Cy3-S-E-V-K-V-D-A-E-F-K(Cy5Q)-NH ₂ |

B

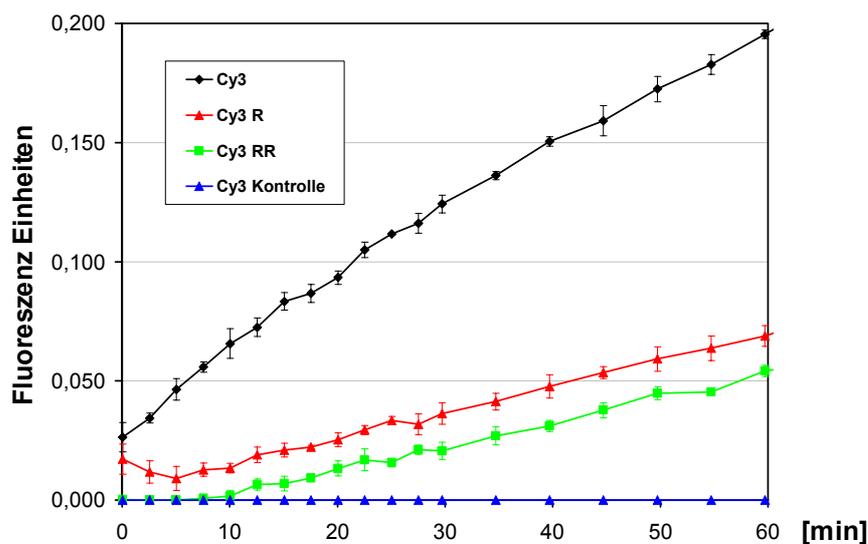


Abbildung 53: Optimierung der Substratkettenlänge

A: CyDye Peptid-Substrate für den BACE *in vitro* Assay. Die β APP-Sequenz ist blau, die β APPsw-Sequenz grün und der AS-Austausch zum nicht schneidbaren Kontrollpeptid rot dargestellt. **B:** Aufgereinigtes BACE-L (2,5 μ l, s. Abbildung 52) wurde mit den Substraten Cy3, Cy3 R und Cy3 RR (100 nM) und dem nicht schneidbaren Peptid Cy3 Kontrolle im Na-Acetat Puffer (pH 4,5) bei RT inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Ansätzen. Gemessen wurde die Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit von der Zeit.

Das aufgereinigte BACE-L ist enzymatisch aktiv, es kommt zu keiner zeitabhängigen Zunahme der Fluoreszenz, und das Cy3 Kontrollpeptid wird nicht prozessiert. Das Substrat Cy3 zeigt, verglichen mit den verlängerten Substraten Cy3R und Cy3RR, unter Enzymzugabe den größten Fluoreszenzanstieg in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Abbildung 53). Vermutlich wird es am schnellsten katalytisch umgesetzt, damit ist dieses Substrat für den *in vitro* Assay am besten geeignet.

3.6.1.3 Konditioniertes Medium als Enzymquelle

Da es bei der Aufreinigung von BACE-L zu erheblichen Enzymverlusten kam, wurde untersucht ob konditioniertes Medium direkt oder nach einer Aufkonzentrierung im *in vitro* Assay eingesetzt werden kann.

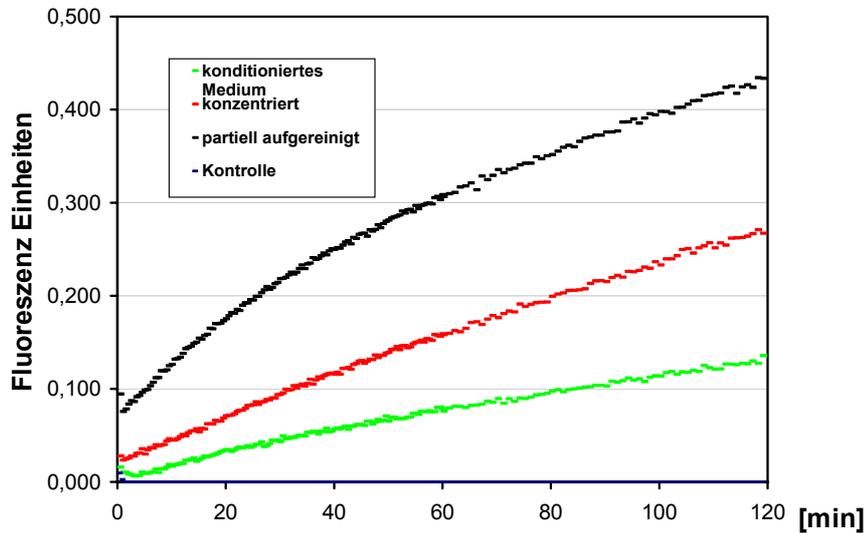


Abbildung 54: Aufbereitung des konditionierten Mediums BACE-L exprimierender Zellen

Konditioniertes Medium von BACE-L exprimierenden HEK 293 Zellen wurde partiell aufgereinigt (5 μ l, 100x), ca. 4fach konzentriert (5 μ l, 4x) oder direkt (10 μ l, 1x) im Assay eingesetzt (Substrat Cy3, 100 nM). Als Kontrolle wurde konzentriertes Medium von HEK 293 Zellen eingesetzt (5 μ l, 4x). Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messpunkte aus drei Ansätzen, gemessen wurde die Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit von der Zeit.

Über Nickel-Agarose aufgereinigtes BACE-L zeigt die größte Aktivität, wobei die eingesetzte Enzymmenge am größten war und das Enzym für eine Reaktion aus 500 μ l Medium aufgereinigt wurde. Aber auch 4fach konzentriertes Medium (20 μ l / Reaktion) und direkt eingesetztes Medium (10 μ l / Reaktion) zeigen im Vergleich zu Kontrollmedien, konditioniert auf HEK 293 Zellen, deutliche BACE-Aktivität. Die BACE-Aktivität des konzentrierten Mediums erhöht sich fast entsprechend des Konzentrationsfaktors, der Einsatz der doppelten Enzymmenge führt zu einer ca. 2fachen Aktivitätserhöhung (Abbildung 54). Die Konzentration des Mediums erfolgte mittels Zentrifugation durch einen Membranfilter mit einem „cut-off“ von 10 kDa (2.7.1.3). Die geringen Verluste können durch ein Haften bleiben der Proteine am Filter erklärt werden. Trotz dieser Verluste wurde für die weiteren Assays überwiegend konzentriertes, konditioniertes Medium BACE-L exprimierender HEK 293 Zellen eingesetzt. Eine Dialyse des Mediums mit dem Assay-Puffer veränderte die Enzymaktivität nicht (Ergebnisse nicht gezeigt).

Um Assays über einen längeren Zeitraum mit einer Enzymquelle durchführen zu können und so eine bessere Vergleichbarkeit, der an verschiedenen Tagen durchgeführten Assays, zu erzielen wurde die Stabilität von BACE-L untersucht. Es wurden Studien zur Lagerung von BACE-L in konditioniertem Medium durchgeführt.

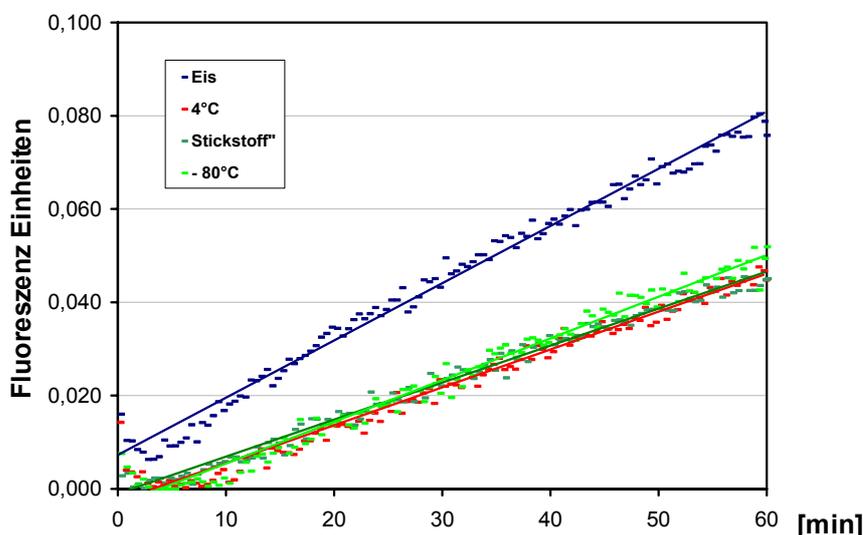


Abbildung 55: Stabilität von BACE-L im konditionierten Medium

Konditioniertes Medium von BACE-L exprimierenden HEK 293 Zellen wurde gesammelt. Aliquote wurden auf Eis, bei 4°C, im flüssigen Stickstoff oder bei -80°C gelagert. Nach 48 h wurden die unterschiedlich gelagerten, konditionierten Medien im Assay eingesetzt (Medium 10 µl / Substrat Cy3 100 nM). Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messpunkte aus drei Ansätzen, gemessen wurde die Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit von der Zeit

Die Aktivität von BACE-L ändert sich durch Lagerung auf Eis kaum, auch eine längere Lagerung auf Eis beeinflusst die BACE-Aktivität kaum (Daten nicht gezeigt). Einfrieren bei -80°C oder im flüssigen Stickstoff reduziert die BACE-L-Aktivität, ebenso wie eine Lagerung bei 4°C (Abbildung 55).

3.6.2 Charakterisierung der *in vitro* Aktivität von BACE-L

3.6.2.1 Bestimmung des pH-Optimums der BACE-L-Aktivität

Es wurde beschrieben, dass BACE die maximale Aktivität im sauren Milieu entwickelt (Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999). Endogen konnte BACE-Aktivität überwiegend in Endosomen und Lysosomen des endocytotischen Transportwegs nachgewiesen werden (Koo und Squazzo, 1994; Perez et al., 1999; Thinakaran et al., 1996b; Vassar et al., 1999). Die exogene Expression von BACE in HEK 293 Zellen führt zu einer BACE-Aktivität im gesamten sekretorischen Transportweg (3.3.2) (Benjannet et al., 2001; Haniu et al., 2000; Huse et al., 2000) so ist eine Untersuchung des pH-Wert Optimums von BACE in BACE exogen exprimierenden Zelllinien nicht möglich.

Der *in vitro* Assay ermöglicht die Untersuchung der BACE-L-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert. Der pH-Wert der konditionierten, konzentrierten Medien wurde dem jeweiligen Assay pH-Wert entsprechend eingestellt.

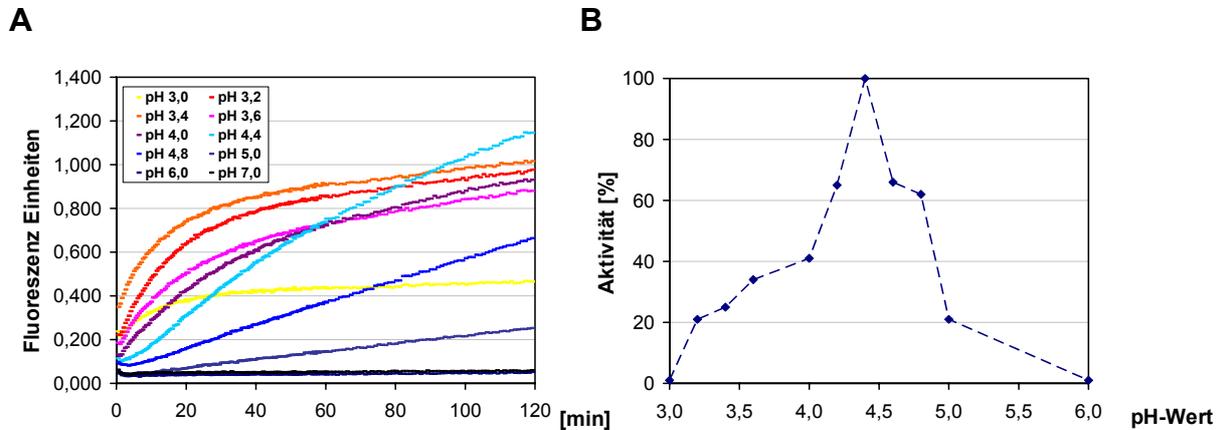


Abbildung 56: BACE-L-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert.

A: Konditioniertes Medium von BACE-L exprimierenden HEK 293 Zellen wurde ca. 4fach konzentriert, 5 µl / Reaktion wurden im Assay eingesetzt (Substrat Cy3, 250 nM). Der Assay Puffer wurde auf die angegebenen pH-Werte eingestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messpunkte aus drei Ansätzen, gemessen wurde die Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit von der Zeit. **B:** Die Reaktionsgeschwindigkeit von BACE-L wurde für die verschiedenen pH-Werte im Inkubationszeitraum von 60-70 min aus der Steigung der Fluoreszenz ermittelt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, bei einem pH-Wert von 4,4 wurde als 100 % gesetzt, die Reaktionsgeschwindigkeiten bei den anderen pH-Werten wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Die relative Reaktionsgeschwindigkeit ist in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt.

Bei einem pH-Wert von 3,0 ist BACE-L kaum aktiv, ebenso bei pH-Werten von 6,0 und 7,0. Interessant ist, dass bei niedrigen pH-Werten von 3,2-4,0 BACE-L anfänglich, in den ersten 10 Minuten, im Assay eine hohe Aktivität zeigt, die bei längerer Inkubation (>10 min) im sauren Milieu sehr stark zurückgeht. Dieser Rückgang in der Enzymaktivität deutet auf eine säureabhängige Denaturierung von BACE hin und kann nicht auf mangelnde Substratmenge zurückgeführt werden, da bei ähnlichem Substratverbrauch bei einem pH-Wert von 4,4 die Fluoreszenzzunahme weiterhin linear ist. Lässt man die Anfangsaktivitäten von BACE-L außer Acht und ermittelt die Geschwindigkeit des Substratumsatzes bei einer Inkubationszeit von 60-70 min, erreicht BACE-L sein Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von 4,4, die Aktivität fällt sowohl zum niedrigeren pH-Wert 4,0 als auch zum höheren pH-Wert 5,0 deutlich ab (Abbildung 56).

3.6.2.2 Die BACE-L-Aktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Der *in vitro* Assay wurde zunächst mit einer Substratkonzentration von 100 nM durchgeführt, der Substratumsatz, gemessen als Zunahme der Fluoreszenz, war bis zu 2 Stunden Inkubationszeit linear (Abbildung 54), eine Erhöhung der Enzymkonzentration führte zu einer entsprechenden Erhöhung des Substratumsatzes (Abbildung 54). Eine Erhöhung der Substratkonzentration, bei gleicher Enzymkonzentration, wie bei der Ermittlung des pH-Optimums geschehen (Abbildung 54, pH-Wert 4,5 v. s. Abbildung 56, pH-Wert 4,4), von 100 nM auf 250 nM führte jedoch überraschender Weise zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit. Um weiteren Aufschluss über die BACE Substratinteraktion zu bekommen, wurde die Kinetik der von BACE katalysierten Reaktion untersucht. Es wurden im Assay bei gleicher Enzymkonzentration ansteigende Substratmengen eingesetzt.

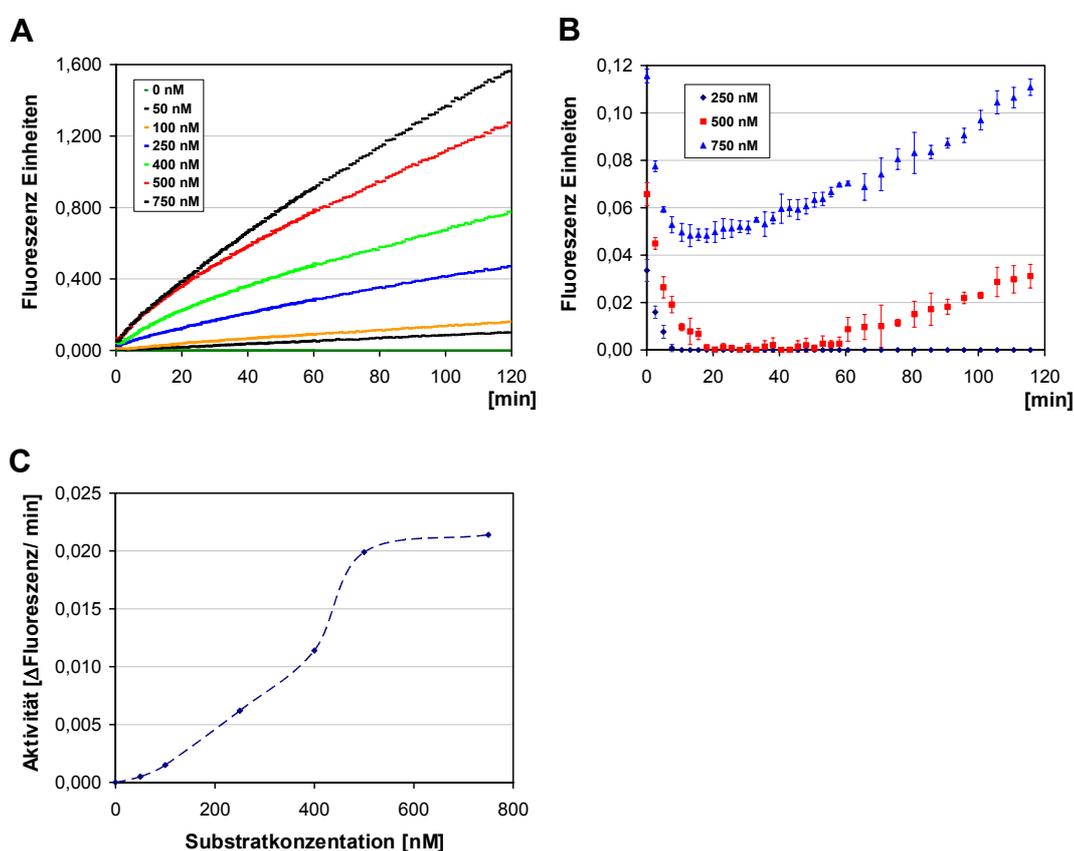


Abbildung 57: BACE-L-Kinetik

A: Konditioniertes Medium von BACE-L exprimierenden HEK 293 Zellen wurde ca. 4fach konzentriert, 2,5 μ l / Reaktion wurden im Assay eingesetzt. Die für die jeweilige Reaktion eingesetzte Substratmenge ist angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messpunkte aus drei Ansätzen, gemessen wurde die Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit von der Zeit. **B:** Das Substratpeptid wurde in der angegebenen Konzentration ohne Enzymzugabe im Assay Puffer inkubiert, gemessen wurde die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. **C:** Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (5-15 min) wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratmenge dargestellt.

Bei einer Substratkonzentration von 250 nM liegt unter den gewählten Assay Bedingungen keine Substratsättigung vor, die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion, gemessen als Änderung der Fluoreszenz, nimmt noch bis zu einer Substratkonzentration von 500 nM zu. Erst bei Substratkonzentrationen von 500 nM und 750 nM ist die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit gleich (Abbildung 57A). Bei diesen Konzentrationen kommt es zu einer von der Inkubationszeit abhängigen Autofluoreszenz des Substrats (Abbildung 57B). Für die weiteren, in dieser Arbeit gezeigten, *in vitro* Assays wurde eine Substratkonzentration von 250 nM eingesetzt.

Zur Beurteilung der BACE-Kinetik wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration dargestellt (Abbildung 57C). Der Kurvenverlauf entspricht nicht dem Verlauf einer einfachen Substrat-Produkt-Umsetzung nach Michaelis-Menten. Die bei niedrigen Substratkonzentrationen sehr langsame Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei Anstieg der Substratkonzentration, weist auf Geschwindigkeit begrenzende Faktoren hin. Der Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ist unabhängig von der BACE-L Aufreinigung (Daten nicht gezeigt), damit ist die Verzögerung der Substratumsetzung durch weitere Kofaktoren unwahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit wäre die Geschwindigkeit begrenzende Entstehung von Intermediaten, durch Enzymumfaltung oder durch Konformationsänderungen im Enzym-Substrat-Komplex (4.2).

3.6.2.3 Spezifische Inhibitoren von BACE-L

Der BACE-Assay wurde neben der weiteren Charakterisierung von BACE auch zur Identifikation von BACE-Inhibitoren entwickelt. In dem *in vitro* Assay können pharmakologisch Substanzen im „high-throughput“ Verfahren auf die Inhibition von BACE untersucht werden. Die Analyse des Profils von BACE-Inhibitoren lässt weitere Aufschlüsse über das katalytische Zentrum von BACE zu.

Zunächst wurden zum Substrat homologe Peptide synthetisiert, die zur Erhöhung der Stabilität C-terminal mit einer Amidgruppe und N-terminal mit einer Acylgruppe konjugiert sind. Durch Einfügung eines Statins an der postulierten Schnittstelle sind die Peptide nicht schneidbar und kompetitieren mit dem Substrat um das aktive Zentrum des Enzyms. Die Peptidinhibitoren GL189 und GL190 (2.7.3.1) wurden entsprechend dem bereits beschriebenen Inhibitor (Sinha et al., 1999) synthetisiert und im *in vitro* Assay in Konzentrationen von 5 nM bis 5 μ M eingesetzt (Abbildung 58).

Die Inhibitoren GL189 und GL190 unterscheiden sich unwesentlich in ihrem Effekt auf BACE-L, beide inhibieren BACE mit einem IC_{50} -Wert von ca. 100 nM. Die Inhibition von GL189 und GL190 ist spezifisch, ein Proteaseinhibitor-Mix zeigt keinen Effekt auf die BACE-Aktivität (Abbildung 58).

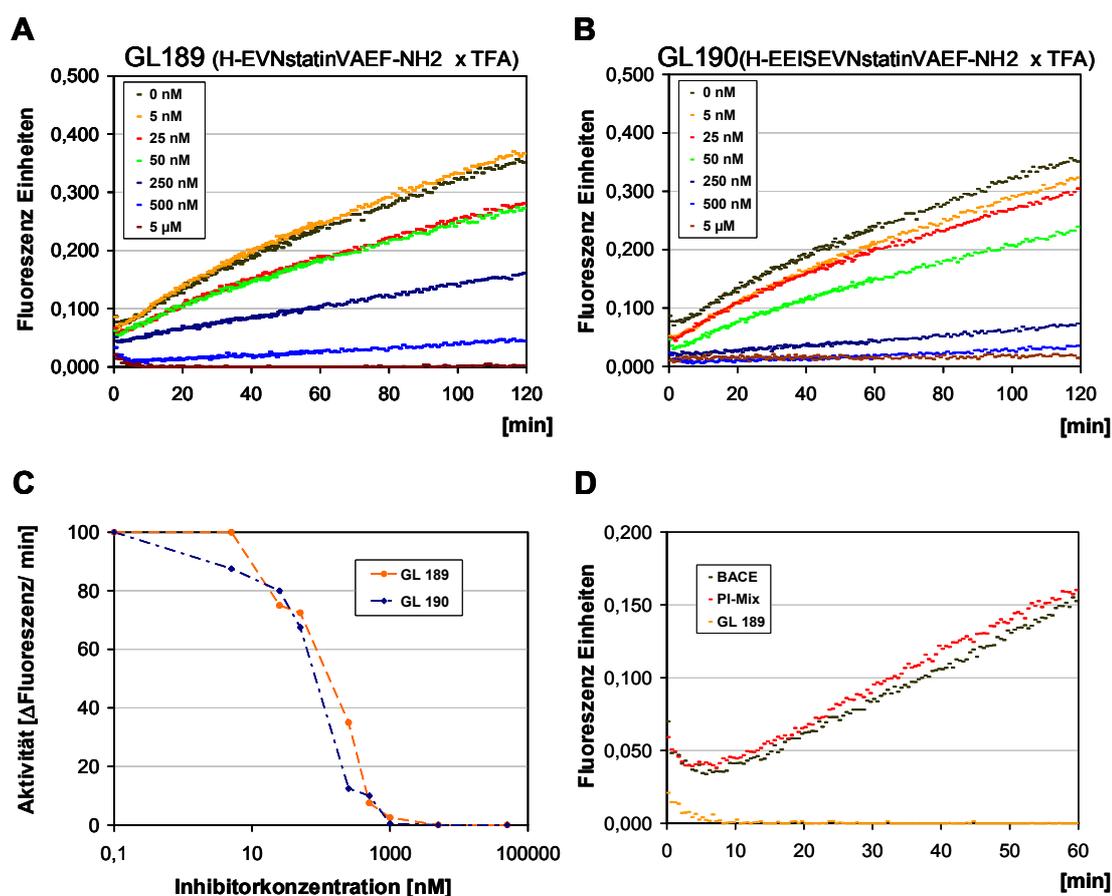


Abbildung 58: Hemmung von BACE-L durch Peptidinhibitoren

A/B: Konditioniertes Medium von BACE-L exprimierenden HEK 293 Zellen wurde ca. 4fach konzentriert, 2,5 μ l / Reaktion wurden im Assay eingesetzt. Die für die jeweilige Reaktion eingesetzte Konzentration für Inhibitor GL189 (A) und Inhibitor GL190 (B) ist angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messpunkte aus drei Ansätzen, gemessen wurde die Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit von der Zeit. **C:** Die BACE-Aktivität in [%] bezogen auf die Aktivität ohne Inhibitor ($[A_t / A_0] \times 100$) ist in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration dargestellt, die Reaktionsgeschwindigkeit wurde für den Zeitraum 40-60 min berechnet. **D:** Der Assay wurde wie unter A durchgeführt. Neben der Kontrolle wurden zum Reaktionsansatz der Inhibitor GL189 (5 μ M) oder ein Mix verschiedenen Proteaseinhibitoren zugesetzt (2.7.3.1). Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messpunkte aus drei Ansätzen. Gemessen wurde die Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit von der Zeit.

Zusammenfassend kann festgestellt werden: Es wurde im Rahmen dieser Arbeit ein funktioneller BACE *in vitro* Assay entwickelt, der auch im „highthrough-put“ System eingesetzt werden kann. BACE konnte mit Hilfe des Assays weiter charakterisiert werden, so konnte gezeigt werden, dass die Membranbindung von BACE für die proteolytische Aktivität nicht notwendig ist und das Aktivitätsverhalten von BACE in Abhängigkeit von der Substratkonzentration nicht der einfachen Michaelis-Menten-Kinetik entspricht. Das pH-Optimum, liegt bei einem pH-Wert von ca. 4,5. Ferner sind kurze, lösliche Peptide, von P5 bis P4', als Substrat ausreichend und auf Statin basierende Peptidinhibitoren, gerichtet gegen das aktive Zentrum von BACE, sind funktionell.

Der *in vitro* Assay kann neben Tests von möglichen BACE-Inhibitoren auch für die Überprüfung der enzymatischen Aktivität von BACE-Konstrukten genutzt werden.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung von BACE im Zellkultursystem

In dieser Arbeit werden die Maturierung und der intrazelluläre Transport der Aspartyl-Protease BACE untersucht. Post-translationale Modifikationen werden in Hinblick auf die Enzymaktivität und auf die subzelluläre Lokalisierung analysiert. Ferner wird der Transport von BACE im Vergleich zum Transport von β APP in polarisierten Zellen untersucht (1.6). Es wird geklärt inwieweit die Amyloid-Entstehung durch den Transport von β APP und der prozessierenden Sekretase BACE beeinflusst werden kann.

4.1.1 Expression von BACE in HEK 293 und MDCK Zellen

Zur Charakterisierung von BACE wurden HEK 293 und MDCK Zellen eingesetzt (3.1.1). HEK 293 Zellen stellen bei der Untersuchung der β APP-Prozessierung ein weit verbreitetes Modellsystem dar. Es konnte bereits 1992 von Haass und Kollegen gezeigt werden, dass in HEK 293 Zellen, wie auch in anderen eukaryotischen Zellen, neben der α -Prozessierung von β APP auch β -Prozessierung stattfindet und das A β -Peptid aus dem Vorläuferprotein freigesetzt werden kann (Haass et al., 1992b). Damit wurde der indirekte Nachweis erbracht, dass neben der α -Sekretase auch β -Sekretase und γ -Sekretase endogen in HEK 293 Zellen vorhanden sind. Später konnten die Komponenten des γ -Sekretase-Komplex (Capell et al., 1998; Shirotani et al., 2004; Steiner et al., 2002; Yu et al., 1998; Yu et al., 2000) und die α -Sekretase ADAM10 (Lammich et al., 1999) in HEK 293 Zellen nachgewiesen werden. BACE wurde unter anderem in HEK 293 Zellen kloniert (Vassar et al., 1999), und erste Untersuchungen an transfiziertem BACE wurden ebenfalls in HEK 293 Zellen durchgeführt (Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999).

Die endogene BACE-Expression in peripheren Zellen, so auch in HEK 293 Zellen, ist niedrig. Durch eine untranslatierte 5'-RNA-Region wird die Expression von BACE reguliert (Christensen et al., 2004; Ge et al., 2004; Lammich et al., 2004; Sambamurti et al., 2004). In Northern Blots konnte eine hohe mRNA-Expression in verschiedenen Hirnregionen, wie Hippocampus, Cortex, Cerebellum sowie in Pankreas und eine niedrige Expression im peripheren Gewebe nachweisen (Lin et al., 2000; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Entsprechend konnte eine hohe BACE-Aktivität in neuronalen Kulturen und eine niedrige Aktivität in anderen Zelllinien gezeigt werden (Busciglio et al., 1993; Haass et al., 1992b; Sinha et al., 1999; Sinha und Lieberburg, 1999).

In dieser Arbeit konnte im Western Blot mit keinem der drei verwendeten AK endogenes BACE nachgewiesen werden (Abbildung 17). Um BACE und den Einfluss von BACE auf die β APP-Prozessierung untersuchen zu können, wurde die Protease BACE und das Substrat β APP₆₉₅ exogen exprimiert. Alle Untersuchungen wurden an stabil transfizierten Zelllinien durchgeführt und um klonale Effekte ausschließen zu können wurden alle Ergebnisse, an verschiedenen

Einzelzellklonen verifiziert. Morphologische Veränderungen der Zellen und verändertes Zellwachstum wurden nicht beobachtet.

4.1.2 Maturierung und Stabilität von BACE

Aufgrund der Aminosäuresequenz wurde für BACE eine Membranverankerung postuliert, und erste Arbeiten konnten zeigen, dass BACE membranengebunden (Vassar et al., 1999) und BACE-Aktivität membranassoziiert ist (Sinha et al., 1999). Entsprechend wurde in dieser Arbeit transfiziertes BACE in Gesamtzelllysaten und in Membranproteinlysaten nachgewiesen (Abbildung 17 / Abbildung 18). BACE migriert im SDS-Gel als Doppelbande bei einem Molekulargewicht von ca. 65 und 70 kDa, wobei die kleinere Form präferentiell von dem gegen das Propeptid gerichteten Antikörper erkannt wird (Abbildung 18). Bisherige Arbeiten hatten BACE als 70 kDa Protein beschrieben und vermutet, dass die Differenz des kalkulierten Molekulargewichts von 51 kDa zu dem im SDS-Gel beobachteten Migrationsverhalten bei 70 kDa durch N-Glycosylierung hervorgerufen wird (Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999).

Der Antikörper gegen den C-Terminus von BACE erkennt zusätzlich kleinere, BACE spezifische Fragmente, mit einer prominenten Bande bei ca. 28 kDa (Abbildung 17). Diese Bande wurde auch in der Arbeit von Vassar und Kollegen beschrieben (Vassar et al., 1999). Es könnte sich um Abbauprodukte handeln, die Überexpression könnte zu einer Akkumulation von Degradationsprodukten führen. Eine andere Möglichkeit für die Entstehung der C-terminalen Fragmente wäre die beschriebene Ektodomänen-Abspaltung von BACE an der Zelloberfläche (Benjannet et al., 2001; Hussain et al., 2003). Da nur sehr geringe Mengen der BACE-Ektodomäne sezerniert werden (Benjannet et al., 2001; Hussain et al., 2003), und ein Zusammenhang der Sezernierung und der Entstehung der C-terminalen Fragmente nicht gezeigt werden konnte, ist es unwahrscheinlich, dass die C-terminalen Fragmente aus der Ektodomänen-Abspaltung resultieren. Endogen konnte bisher keine Sezernierung von BACE gezeigt werden.

Die in dieser Arbeit benutzten Antikörper, gerichtet gegen das Propeptid, die Ektodomäne und die cytoplasmatische Domäne, erkennen alle die 65 kDa und die 70 kDa BACE-Form, wenn auch mit sehr unterschiedlicher Affinität (Abbildung 18). Dies ist ein Beleg dafür, dass die kleinere 65 kDa BACE-Form nicht durch Proteolyse entsteht. Damit und aufgrund der vier N-Glycosylierungsmotive in BACE ist es wahrscheinlich, dass die Molekulargewichtsdifferenz von 5 kDa auf der Umwandlung mannosereicher Zucker in Zucker des komplexen Typs beruht, was auch in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden konnte (4.1.3) (Capell et al., 2000b).

Zunächst wurde mit Hilfe von „pulse/chase“-Experimenten belegt, dass die 65 kDa BACE-Form ein Vorläufer der 70 kDa Form ist. Die 65 kDa Form nimmt mit der „chase“-Zeit ab und die 70 kDa Form zu. Nach 60 min „chase“-Zeit ist die 70 kDa Form erstmals zu detektieren und bei

120 min migriert der überwiegende Teil von BACE bei 70 kDa. Diese Maturierung von BACE ist im Prinzip unabhängig von der cytoplasmatischen Domäne und der Membranverankerung von BACE (Abbildung 20). Die lösliche Form von BACE (BACE-L) maturiert effizient und nur matures BACE-L wird sezerniert. Nach 60 min „chase“-Zeit wurden schon fast 50 % von BACE-L sezerniert. Die Deletion der cytoplasmatischen Domäne führt zu einer deutlich verlangsamten und ineffizienteren Maturierung im Vergleich zu BACE-wt, aber ebenso zu einem verlangsamten Abbau (Abbildung 20 / Abbildung 21). Dies war ein erster Hinweis darauf, dass der C-Terminus den Transport von membrangebundenem BACE reguliert und dadurch die Maturierung und Degradation beeinflusst werden kann. Dass die Deletion des BACE C-Terminus Missfaltung induziert und dadurch eine langsamere Maturierung verursacht wird, ist weitestgehend auszuschließen, da die lösliche Form BACE-L effizient maturiert.

Spätere Arbeiten bestätigen die, in dieser Arbeit erstmalig gezeigte, Maturierung von BACE mit einer Molekulargewichtszunahme von ca. 5 kDa (Capell et al., 2000b). Die Molekulargewichtangaben variieren, immatures BACE wird mit 58 kDa (Huse et al., 2000), 60 kDa (Hussain et al., 1999) oder 66 kDa (Benjannet et al., 2001) und matures BACE mit 65 kDa (Hussain et al., 1999), 66 kDa (Huse et al., 2000) oder 72 kDa (Benjannet et al., 2001) angegeben. Die Differenzen sind möglicherweise auf unterschiedliche Gelsysteme oder Molekulargewichtsmarker zurückzuführen, ferner weisen verschiedene Zelllinien unterschiedliche Glycosylierungsmuster auf (Albach et al., 2001; Ohl et al., 2003).

Die relativ langsame Maturierung von BACE, im „pulse/chase“-Experiment liegt BACE erst nach 120 min „chase“ überwiegend als mature Form vor, wurde bestätigt (Benjannet et al., 2001; Huse et al., 2000). Allerdings weist BACE mit einer Halbwertszeit von 16 h (Huse et al., 2000) eine deutlich größere Stabilität auf, als in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Matures BACE-wt ist nach 3,5 h zur Hälfte degradiert (Abbildung 21). Die Ursache für die erheblichen Differenzen in der Stabilität von BACE könnte in der deutlich unterschiedlichen experimentellen Durchführung begründet liegen. Huse und Kollegen transfizierten BACE-wt, konjugiert mit einem Hämagglutination-Sequenzabschnitt (HA-tag), transient und markierten BACE radioaktiv während einer 30-minütigen „pulse“-Zeit (Huse et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden myc-His-konjugierte BACE-Konstrukte eingesetzt, Zelllinien mit stabiler Expression generiert, und die radioaktive Markierung erfolgte in einem 10-minütigen „pulse“. Die unterschiedlichen BACE-Konjugate könnten die Degradation beeinflussen, ebenso könnte die hohe Expression aufgrund der transienten Transfektion die Abbaumaschinerie der Zelle beeinträchtigen bzw. absättigen, wodurch es zu einer längeren Halbwertszeit von BACE kommen würde. In der langen „pulse“-Zeit von 30 min wird eine größere Population markiert als im 10-minütigen „pulse“, die Abbauphase müsste entsprechend länger sein.

Die Vermutung, dass der C-Terminus von BACE den Transport von BACE regulieren könnte (Capell et al., 2000b), wurde durch weitere Arbeiten bestätigt (Huse et al., 2000; Pastorino et al., 2002; Walter et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass BACE nach dem Transport zur

Plasmamembran reinternalisiert wird und ein Di-Leucin-Motiv in der C-terminalen Domäne von BACE den Transport zu endosomalen Kompartimenten reguliert (Huse et al., 2000; Pastorino et al., 2002; Walter et al., 2001). Die Phosphorylierung am dem Di-Leucin-Motiv benachbarten Serin an AS-Position 498 reguliert den Transport von frühen Endosomen über späte Endosomen zurück zum TGN (Walter et al., 2001).

Die Deletion des Di-Leucin-Motivs und damit auch die Deletion des gesamten BACE C-Terminus beeinträchtigt die Reinternalisierung (Pastorino et al., 2002). BACE akkumuliert an der Plasmamembran und kann nicht mehr dem lysosomalen Abbau zugeführt werden, dadurch kommt es vermutlich zu der in dieser Arbeit beobachteten erhöhten Stabilität von BACE- Δ C. Für Di-Leucin-Motive konnte generell gezeigt werden, dass sie mit der VHS-Domäne von Clathrin bindenden Adaptorproteinen interagieren, die für den endosomalen Transport und den Edosomen/TGN-Transport eine wichtige Rolle spielen (Maxfield und McGraw, 2004). Für BACE konnte eine Interaktion mit den Adaptorproteinen GGA1 (Golgi-localizing, γ -adaptin ear homology domain, ARF-interacting) (He et al., 2002; Shiba et al., 2004) und GGA2 (He et al., 2002) gezeigt werden. Die Phosphorylierung des Ser498 verstärkt die Interaktion mit GGA1 (Shiba et al., 2004; von Arnim et al., 2004). Eine Regulation des Di-Leucin-Motivs durch die Phosphorylierung eines benachbarten Serins konnte ebenfalls für andere Proteine gezeigt werden (Bonifacino, 2004).

Ferner wurde gezeigt, dass der BACE C-Terminus eine Konsensussequenz für Palmitoylierung enthält und die Palmitoylierung von BACE förderlich für den Transport von BACE aus dem ER ist (Benjannet et al., 2001). Die Deletion des BACE C-Terminus würde damit den BACE Transport aus dem ER inhibieren und damit die in dieser Arbeit beobachtete verlangsamte Maturierung von BACE- Δ C erklären.

4.1.3 Die Glycosylierung von BACE

Die Vermutung, dass die Differenz des berechneten und des tatsächlichen Molekulargewichts von BACE auf Glycosylierung zurückzuführen ist (Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999) konnte in dieser Arbeit erstmalig experimentell bestätigt werden (Capell et al., 2000b). Deglycosylierung von BACE mit N-Glycosidase F zeigte, dass die mature und die immature Form von BACE N-glycosyliert sind. Beide Formen migrieren nach N-Glycosidase F Behandlung im SDS-Gel bei einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa (Abbildung 22), dies ist auch ein Hinweis darauf, dass das unterschiedliche Migrationsverhalten der immaturren und der maturen Form auf differentiellen Zuckeraufbau zurückzuführen ist. Wird die N-Glycosylierung durch Behandlung mit dem Antibiotikum Tunicamycin unterbunden (3.2.2), migriert BACE wie nach der Deglycosylierung ebenfalls bei einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa (Abbildung 23). Eine Behandlung mit der Endoglycosidase H zeigte, dass die mature Form von BACE Endo H Resistenz erreicht und damit komplex glycosyliert sein muss (Abbildung 24). Endo H spaltet ausschließlich mannosereiche und keine komplexen N-glycosylierten Zuckerketten. In der Zelle findet der Umbau von mannosereichen in komplexe Zucker im späten Golgi-Apparat

statt (Helenius und Aebi, 2001; Roth, 2002), dass heißt matures BACE hat auf dem sekretorischen Transportweg auf jeden Fall den späten Golgi-Apparat erreicht (Abbildung 59) (Capell et al., 2000b).

Andere Gruppen konnten diese Ergebnisse bestätigen (Benjannet et al., 2001; Charwood et al., 2001; Creemers et al., 2001; Haniu et al., 2000; Huse et al., 2000; Pinnix et al., 2001). Darüber hinaus zeigen Huse und Kollegen durch sequenzielle Zuckerabspaltung, dass BACE an drei der vier möglichen N-Glycosylierungsstellen glycosyliert ist (Huse et al., 2000). Ferner konnten sie zeigen, dass aufgrund eines C-terminal konjugierten ER-Retentionssignals (-KKXX) im ER zurückgehaltenes BACE keine Endo H Resistenz erreicht (Huse et al., 2000). Kontrovers zu den Ergebnissen von Huse et al. zeigen Charwood et al. eine N-Glycosylierung von BACE an allen vier möglichen Glycosylierungsstellen (Asn 153, Asn 172, Asn 223, Asn 354) (Charwood et al., 2001). In eukaryotischen Zellen werden alle Zucker in den Komplex-Typ mit zwei bis drei Verzweigungsgraden modifiziert (Charwood et al., 2001).

Die Glycosylierung von BACE beeinflusst die proteolytische BACE-Aktivität. Mutation der N-Glycosylierungsstellen oder Expression von BACE in einem nicht eukaryotischen Zellsystem, in dem keine komplexe Glycosylierung stattfinden kann, reduzieren die BACE-Aktivität um 40-50 % (Charwood et al., 2001). Ursache für die verminderte Enzymaktivität ist wahrscheinlich eine veränderte Faltung von BACE (Charwood et al., 2001).

Die Ergebnisse der N-Glycosidase F und der Tunicamycin Behandlung dieser Arbeit lassen vermuten, dass keine O-Glycosylierung von BACE stattfindet. Die Deglycosylierung und die Verhinderung der N-Glycosylierung von BACE resultieren in einer BACE-Spezies von ca. 50 kDa. Da die Blockierung der N-Glycosylierung auch den Transport von BACE aus dem ER verhindert (4.1.4), wird auch eine mögliche O-Glycosylierung im Golgi-Apparat unterbunden. Die Abspaltung der N-glycosidisch gebundenen Zucker führt somit zum gleichen Molekulargewicht, wie die Verhinderung der N- und O-Glycosylierung. Damit ist anzunehmen, dass BACE nicht O-glycosyliert wird. Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls keine O-Glycosylierung von BACE detektieren (Haniu et al., 2000).

4.1.4 Die Prozessierung des BACE-Propeptids

BACE enthält entsprechend von Sequenzanalysen eine Propeptiddomäne von AS 22-45 (Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999) und mit dem Sequenzmotiv -RLPR- wird die minimale Anforderung für die Konsensussequenz von Furin oder furinähnlichen Propeptidkonvertasen (PK) erfüllt (3.2.3). Furin und furinähnliche PK erkennen die Konsensussequenz -RXXR-, der Schnitt erfolgt C-terminal der Konsensussequenz, an Position P2 ist eine basische AS ausreichend.

Für BACE konnte bereits bei Beginn dieser Arbeit gezeigt werden, dass aufgereinigtes Enzym zu 90 % mit der AS an Position 46 beginnt und nur zu 10 % mit AS 22 (Sinha et al., 1999), d.h. bei dem überwiegenden Anteil von BACE erfolgte die Propeptidabtrennung, und bei einem

geringen Anteil wurde nur das Signalpeptid abgetrennt. Proteinsequenzierungen bestätigten diese Angaben (Bennett et al., 2000a).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe eines Antikörpers (AK), der spezifisch das Propeptid erkennt, erstmalig gezeigt werden, dass fast nur immatures BACE das Propeptid enthält (Abbildung 25). Matures, komplex glycosyliertes BACE wird kaum von dem gegen das Propeptid gerichteten AK erkannt. Die intrazelluläre Lokalisierung bestätigt, dass Propeptid enthaltendes BACE (Pro-BACE) nicht im Golgi-Apparat sondern überwiegend an der Zellkernhülle sowie im ER lokalisiert ist. Ein AK, der alle BACE-Spezies detektiert, zeigt hingegen deutliche BACE-Lokalisation im Golgi-Apparat. Bei dieser Spezies muss bereits das Propeptid abgespalten sein.

Inhibition von zellulären Transportvorgängen durch BFA oder Monensin verhindert die Abspaltung des Propeptids (Abbildung 26). BFA blockiert den Vorwärtstransport vom ER zum Golgi-Apparat (Dinter und Berger, 1998; Klausner et al., 1992) und führt vermutlich zur Verschmelzung von ER- und Golgi-Kompartimenten (Alberts et al., 2002; Lippincott-Schwartz et al., 1991). Bei BFA-Behandlung kommt es zu einer geringen Reduktion des Molekulargewichts von BACE, die möglicherweise auf den Umbau der Zuckerketten im ER zurückzuführen ist (Helenius und Aebi, 2001; Roth, 2002). Bei fehlgefalteten Proteinen werden zunächst einzelne Mannosereste vom Oligosaccharid entfernt, bleibt das Protein falsch gefaltet kann es der ER-assoziierten Degradation (ERAD) zugeführt werden (Molinari et al., 2003; Tsai et al., 2002). So ist auch die im Molekulargewicht reduzierte BACE-Form nicht stabil und nach 120 min „chase“-Zeit vollständig abgebaut (Abbildung 26). Andere Gruppen konnten bestätigen, dass BFA die Maturierung und die Abspaltung des Propeptids von BACE verhindern (Benjannet et al., 2001; Bennett et al., 2000a; Haniu et al., 2000), ebenso wurde eine Reduzierung im Molekulargewicht von Pro-BACE nach BFA-Behandlung beobachtet (Benjannet et al., 2001).

Monensin blockiert den Transport von cis- und medialen-Golgi-Zisternen zum trans-Golgi-Apparat und TGN (Dinter und Berger, 1998) und verhindert die Propeptidabspaltung und Maturierung von BACE. Eine Veränderung des Molekulargewichts wird nicht beobachtet und die immature Form von BACE, vermutlich lokalisiert in frühen Golgi-Kompartimenten, scheint stabil zu sein. Bennet et al. bestätigten die Inhibition der Propeptidabspaltung und der komplexen Glycosylierung von BACE bei Monensin Behandlung (Bennett et al., 2000a). Wird durch Tunicamycin die N-Glycosylierung von BACE verhindert, kommt es ebenfalls nicht zur Abspaltung des Propeptids (Abbildung 23), vermutlich wird BACE aufgrund der falschen Faltung im ER zurückgehalten.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass das Propeptid von BACE nicht im ER oder in frühen Golgi-Kompartimenten abgespalten wird, aber dass die Propeptidabspaltung vor der Maturierung stattfindet (3.2.3.1) (Capell et al., 2000b). Da die Maturierung, d.h. der Aufbau von komplexen Zuckern im trans-Golgi-Apparat (Helenius und Aebi, 2001; Roth, 2002) lokalisiert ist, muss die Abspaltung des Propeptids unmittelbar vor dem trans-Golgi-Apparat oder im trans-Golgi-Apparat direkt vor dem Umbau der Zucker stattfinden (Abbildung 59).

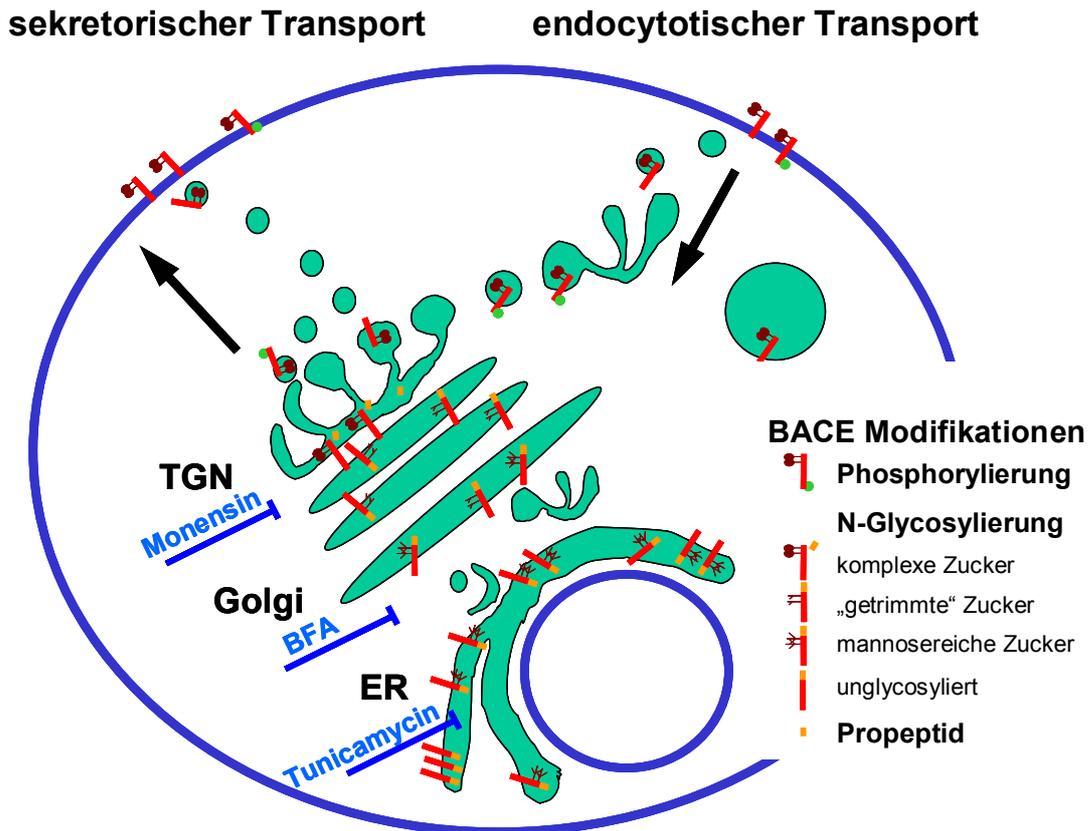


Abbildung 59: Modell des BACE Transports und Lokalisierung der posttranslationalen Modifikationen

Dargestellt ist die Prozessierung von BACE durch die Kompartimente des sekretorischen Transportwegs zur Zelloberfläche und die Reinternalisierung von BACE. Die parallel stattfindenden sekundären Modifikationen sind gekennzeichnet. Die Angriffspunkte der zur Untersuchung der BACE Prozessierung eingesetzten Transport-Inhibitoren bzw. Glycosylierungs-Inhibitoren sind angegeben.

Die BACE schneidende PK wurde in der vorliegenden Arbeit weiter charakterisiert. Wird das Arginin an Position P1 der PK-Konsensussequenz zu Alanin mutiert, kann die Sequenz nicht mehr von der PK erkannt werden (Krysan et al., 1999; Molloy et al., 1992). Wird in BACE die Mutation R45A eingefügt, kommt es nicht mehr zur Propeptidabspaltung und Maturation von BACE (Abbildung 28). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass es sich bei der PK von BACE um Furin oder eine furinähnliche PK handelt. Im Gegensatz zu den hier gezeigten Daten konnten andere Gruppen bei Einführung der Mutation R45A bzw. der Mutation R42A in BACE keinen veränderten Transport von BACE detektieren (Benjannet et al., 2001; Creemers et al., 2001). Es kam zur komplexen Glycosylierung von BACE R45A, allerdings enthielt komplex glycosyliertes BACE zum Teil noch das Propeptid (s. unten). Möglicherweise ist in der vorliegenden Arbeit die Expression von BACE R45A zu niedrig, um komplex glycosyliertes BACE detektieren zu können. Es war jedoch nicht möglich Einzelzellklone zu finden deren BACE-Expression der der anderen Konstrukte entsprach.

Ein weiterer Hinweis auf Furin oder eine furinähnliche PK als BACE-PK ist die Calciumabhängigkeit der Propeptidabspaltung. Die Aktivierung von Pro-Furin ist

calciumabhängig (Vey et al., 1994). Wird Calcium-Ionophor A23187 parallel mit calciumfreien Medium eingesetzt, kommt es zur reduzierten intrazellulären Calciumkonzentration (3.4). Eine Calcium-Depletion blockiert die Propeptidabspaltung und die Maturierung von BACE (Abbildung 35). Die erhebliche Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration blockiert nicht den Transport vom ER zum Golgi-Apparat und die Maturierung der Zucker von Glycoproteinen sollte nicht beeinträchtigt sein (Klenk et al., 1984; Oda, 1992). Die Retention von Pro-BACE im ER oder frühen Golgi-Apparat ist damit nicht direkt auf die Calcium-Depletion zurückzuführen, sondern andere Retentionsmechanismen, z.B. Qualitätskontrollmechanismen scheinen den Transport und die Maturierung von Pro-BACE zu verhindern.

Eine andere Arbeitsgruppe hat als Folge der intrazellulären Calcium-Depletion ebenfalls eine Inhibition der Propeptidabspaltung festgestellt, im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen kommt es jedoch zur komplexen Glycosylierung von BACE, und der Transport wird nicht behindert (Bennett et al., 2000a). Es gab jedoch erhebliche Unterschiede in der Versuchsdurchführung. In der in dieser Arbeit beschriebenen Calcium-Ionophor Behandlung wurden die Zellen für 10 h in calciumfreien Medium vorinkubiert und die Calcium-Ionophor-Behandlung wurde ebenfalls in calciumfreien Medium durchgeführt. Bennet et al. beschreiben nicht, dass sie calciumfreies Medium eingesetzt haben, und setzen Calcium-Ionophor ausschließlich während der 5 h „chase“-Zeit ein (Bennett et al., 2000a). Die Calciumreduktion war möglicherweise nicht vollständig.

Furin und furinähnliche PK können durch, der Konsensussequenz homologen Peptide, wie dem Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketon inhibiert werden (3.4) (Garten et al., 1994; Hallenberger et al., 1992; Jean et al., 1995). Der Einsatz des Inhibitors verhindert nicht die BACE-Maturierung, es entsteht jedoch matures BACE, das noch das Propeptid enthält. Damit wurde gezeigt, dass die Abspaltung des Propeptids nicht Bedingung für eine komplexe Glycosylierung und für den Transport zum TGN ist. Der Peptidinhibitor ist nicht furinspezifisch, sondern inhibiert auch furinähnliche PK mit nanomolaren Ki-Werten. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann festgestellt werden, dass Furin oder furinähnliche PK das BACE Propeptid abspalten.

Auch die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen können nicht eindeutig klären, ob es sich bei der BACE-PK um Furin oder eine furinähnliche PK handelt (Baek et al., 2002; Benjannet et al., 2001; Bennett et al., 2000a; Creemers et al., 2001; Pinnix et al., 2001). Transiente Transfektion von cDNAs verschiedener PK Inhibitoren, wie z.B. α_1 -PDX (α_1 -Anti-trypsin Portland) ein relativ spezifischer Furin-Inhibitor (Jean et al., 1998), den Prosegmenten verschiedener PK (Pro-Furin, -PC7, -PC5, -SKL-1), die als Inhibitoren der jeweiligen PK fungieren und α_2 -M (α_2 -Macroglobulin) sowie der Furin inhibierenden Mutante (α_2 -M-F) gaben weitere Hinweise über die BACE-PK. Eine Inhibition der Propeptidabspaltung wurden bei Furin- und PC5-Inhibitoren (α_1 -PDX, Pro-Furin, Pro-PC5, α_2 -M-F) beobachtet nicht jedoch bei PC7 und SKL-1 Inhibitoren (Pro-PC7, Pro-SKL-1) (Benjannet et al., 2001; Bennett et al., 2000a). Eine Inhibition der Propeptidabspaltung verhindert nicht die komplexe Glycosylierung von BACE (Benjannet et al., 2001; Bennett et al., 2000a). Dieses Phänomen wurde auch in der

vorliegenden Arbeit bei dem Einsatz des Peptidinhibitors beobachtet. Eine humane Kolon-Karzinom-Zelllinie (LoVo), die kein funktionelles Furin exprimiert zeigt keine Propeptidabspaltung von BACE, jedoch eine komplexe Glycosylierung von Pro-BACE (Bennett et al., 2000a).

Eine furindefiziente CHO (Chinese hamster ovary) Zelllinie zeigt ebenfalls eine stark reduzierte Abspaltung des BACE-Propeptids und eine komplexe Glycosylierung von Pro-BACE (Creemers et al., 2001; Pinnix et al., 2001). Durch Transfektion der Furin cDNA, aber auch durch Transfektion anderer PK cDNA (PACE4, PC4/6, PC7), kann die Propeptidabspaltung von BACE in der furindefizienten CHO Zelllinie wieder eingeleitet werden (Creemers et al., 2001; Pinnix et al., 2001). Ferner kann in der furindefizienten CHO Zelllinie durch Einsatz eines PK Peptidinhibitors eine weitere Reduktion der Propeptidabspaltung erreicht werden (s. oben) (Pinnix et al., 2001). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Furin nicht die einzige BACE-PK ist, sondern andere furinähnliche PK bei der Konvertierung von Pro-BACE zu BACE eine Rolle spielen.

In vitro Assays hingegen ergaben, dass Furin besonders effizient Pro-BACE spalten kann (Benjannet et al., 2001; Bennett et al., 2000a).

Zusammenfassend kann aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit und den Daten anderer Gruppen festgestellt werden, dass BACE als Proenzym exprimiert wird. Die Abspaltung des Propeptids erfolgt nicht autokatalytisch (Benjannet et al., 2001; Bennett et al., 2000a; Creemers et al., 2001). Furin und furinähnliche PK erkennen die BACE-Konsensussequenz -RLPR- und können das Propeptid von BACE schneiden (Benjannet et al., 2001; Bennett et al., 2000a; Capell et al., 2000b; Pinnix et al., 2001). In Vertebraten umfasst die PK-Familie der calciumabhängigen Serin-Proteasen sieben Mitglieder: Furin, PC1/PC3, PC2, PC4, PACE4, PC5/PC6 und PC7 (Thomas, 2002). Furin und PC7 sind wie BACE ubiquitär exprimiert und im sekretorischen sowie endocytotischen Transportweg lokalisiert und aktiv (Molloy et al., 1999; Seidah und Chretien, 1997). Das Expressionsprofil, Experimente mit Furin-Inhibitoren und in furindefizienten Zelllinien weisen auf Furin als Hauptkandidat der BACE-PK hin (Benjannet et al., 2001; Bennett et al., 2000a; Creemers et al., 2001; Shi et al., 2001). Es gibt jedoch auch Arbeiten, die die Bedeutung furinähnlicher PK für die Konvertierung von Pro-BACE betonen (Ermolieff et al., 2000; Pinnix et al., 2001). Abschließend kann nicht eindeutig geklärt werden welche PK Pro-BACE *in vivo* prozessiert, möglicherweise sind auch *in vivo* verschiedene Furin und furinähnliche PK an der Propeptidabspaltung von BACE beteiligt.

Eine typische Funktion der N-terminalen Prodomäne in Aspartylproteasen ist die Regulation der katalytischen Enzymaktivität (Tang und Wong, 1987). Prodomänen haben oft zymogen-ähnliche Eigenschaften und inhibieren die Aktivität des Proenzym. Die Prodomäne von BACE inhibiert jedoch nur geringfügig die Aktivität von BACE (Ermolieff et al., 2000; Shi et al., 2001). Pro-BACE und auch im ER zurückgehaltenes BACE ist enzymatisch aktiv (Benjannet et al., 2001; Creemers et al., 2001). Die Prodomäne von BACE spielt aber eine Rolle für die Faltung von BACE (Chou und Howe, 2002; Shi et al., 2001) und möglicherweise auch für den intrazellulären

Transport (Benjannet et al., 2001; Creemers et al., 2001). Es bleibt zu untersuchen ob die Prodomäne von BACE zymogene Eigenschaften für andere Substrate als β APP zeigt. Die Inhibition des Propeptidschnitts von BACE hat daher als therapeutisches Ziel für die Alzheimer Krankheit keine Relevanz.

4.1.5 Die β APP-Prozessierung durch BACE und BACE-Varianten

BACE erfüllt nicht nur alle für eine β -Sekretase geforderten Kriterien (vgl. Einleitung), sondern scheint auch die einzige A β generierende Sekretase im Hirn zu sein, zeigen doch BACE defiziente Mäuse keine A β -Bildung (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001).

Aufgrund der in peripheren Zellen niedrigen endogenen BACE-Expression wird β APP überwiegend durch die α -Sekretasen prozessiert (Haass et al., 1993b).

α -Sekretasen und BACE konkurrieren um das gleiche Substrat β APP (Haass et al., 1993a; Hung et al., 1993; Lin et al., 2000; Sinha und Lieberburg, 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Eine Überexpression von BACE führt in β APP^{sw} oder β APP^{wt} exprimierenden Zelllinien zu einer erhöhten β -Sekretase und einer verminderten α -Sekretase Prozessierung von β APP. Die A β -Sezernierung wird verdoppelt (Huse et al., 2000; Vassar et al., 1999) und es entstehen A β -Spezies, die an den Positionen Asp1 und Glu11 der A β -Sequenz beginnen (Vassar et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass BACE-wt und die Varianten BACE- Δ C sowie BACE-L enzymatisch aktiv sind. In HEK 293 Zellen stabil transfiziert mit BACE-wt, BACE- Δ C oder BACE-L ist die α -Sekretase Prozessierung von β APP^{wt} stark reduziert und die Prozessierung durch BACE entsprechend erhöht (Abbildung 31). Ein offensichtlicher Unterschied in der enzymatischen Aktivität der BACE-Varianten besteht nicht. Die C-terminale Domäne oder eine Membranverankerung von BACE ist für die Aktivität nicht notwendig. Eine genauere Betrachtung der entstehenden A β -Spezies zeigt, dass alle BACE-Varianten sowohl A β _{Asp1} als auch A β _{Glu11} generieren. Allerdings zeigt die BACE-L exprimierende Zelllinie am wenigsten der A β _{Glu11}-Spezies und die BACE- Δ C exprimierende Zelllinie am meisten (Abbildung 30 / Abbildung 32). Da sowohl BACE-L als auch BACE- Δ C nicht endocytiert werden können, kann die Amyloid-Entstehung in Recycling-Kompartimenten keine Rolle für die unterschiedlichen Verhältnisse von A β _{Glu11} und A β _{Asp1} spielen. In „pulse/chase“-Experimenten war aufgefallen, dass BACE-L schneller und BACE- Δ C langsamer als BACE-wt maturiert (Abbildung 20). Es scheint ein Zusammenhang zwischen der Maturierungsgeschwindigkeit und der Entstehung der A β _{Glu11}-Spezies zu bestehen: Je langsamer die Maturierung, desto mehr A β _{Glu11} entsteht. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass A β _{Glu11} in frühen und A β _{Asp1} in späten Kompartimenten des sekretorischen Transportweges entsteht.

Andere Arbeitsgruppen bestätigen, dass lösliche BACE-Varianten enzymatisch aktiv sind, schnell maturieren bzw. schnell in Plasmamembran nahe Kompartimente transportiert werden und überwiegend die A β _{Asp1}-Spezies generieren (Benjannet et al., 2001; Creemers et al., 2001; Vassar et al., 1999). Ferner wurde festgestellt, dass A β _{Glu11} in Abhängigkeit von der BACE-

Expression entsteht (Creemers et al., 2001; Liu et al., 2002; Vassar et al., 1999). Eine hohe BACE-wt Expression führt neben der $A\beta_{Glu11}$ -Bildung auch zur Akkumulation von BACE prozessierten β APP-CTF (Benjannet et al., 2001). Bei einer Überexpression schneidet BACE verstärkt in frühen zellulären Kompartimenten wie dem ER (Benjannet et al., 2001; Creemers et al., 2001). Da in diesen Kompartimenten γ -Sekretase nicht aktiv ist (Annaert und De Strooper, 1999; Annaert et al., 1999; Cupers et al., 2001; Herreman et al., 2003), kommt es zur Akkumulation von β APP-CTF (Benjannet et al., 2001). Zunächst entstehen β APP-CTF durch den Asp1-Schnitt, diese Fragmente können an der Glu11-Position nachgeschnitten werden (Creemers et al., 2001; Fluhner et al., 2002; Liu et al., 2002). Möglicherweise sind die mit Glu11 beginnenden β APP-CTF der direkte Vorläufer für $A\beta_{Glu11}$.

Wird BACE aber durch ein ER-Retentionssignal (-KKXX) oder durch Transportinhibitoren (BFA, Monensin) im ER oder in frühen sekretorischen Kompartimenten zurückgehalten, kommt es überwiegend zum Asp1 Schnitt des β APP (Fluhner et al., 2002; Huse et al., 2002). Im ER wird $A\beta_{Glu11}$ demnach nicht generiert. Eine BACE-Chimäre, bei der der C-Terminus von BACE durch den C-Terminus von Furin ersetzt wurde, wodurch überwiegend eine TGN Lokalisierung erreicht wurde (Huse et al., 2002), führt zu einer Erhöhung des Glu11 Schnitts von β APP (Huse et al., 2002). Wurde hingegen das Reinternalisierungssignal von BACE deletiert, entstehen geringere Mengen von $A\beta_{Glu11}$ (Huse et al., 2002). Da die BACE-Furin-Chimäre zwischen Endosomen und TGN recycelt (Jones et al., 1995; Molloy et al., 1998), wäre es auch möglich, dass $A\beta_{Glu11}$ nicht nur im TGN, sondern auch im endocytotischen Transportweg entstehen kann. Ein Einfluss des pH-Wertes oder der Glycosylierung von BACE auf die Entstehung von $A\beta_{Asp1}$ und $A\beta_{Glu11}$ konnte nicht festgestellt werden (Huse et al., 2002).

Die Ursache dafür, dass lösliche BACE-Varianten kaum $A\beta_{Glu11}$ produzieren, bleibt unklar, da BACE-L schnell in späte Kompartimente transportiert wird und in diesen überwiegend der Glu11-Schnitt erfolgen soll (Fluhner et al., 2002; Huse et al., 2002). Der Asp1-Schnitt kann wahrscheinlich im gesamten sekretorischen Transportweg stattfinden, wie die Prozessierung von β APPsw im sekretorischen Transportweg zeigt (Citron et al., 1995; Haass et al., 1995a; Haass et al., 1995b; Steinhilb et al., 2002). Hingegen findet der Glu11-Schnitt erst in späteren Kompartimenten statt, wenn die Bedingungen für die BACE-Aktivität besser sind, weil ein niedriger pH-Wert als im ER vorliegt (Alberts et al., 2002; Machen et al., 2003) und die sekundären Modifikationen des Proteins, wie die Abspaltung der Prodomäne und die Glycosylierung abgeschlossen sind. Entsteht jedoch $A\beta_{Glu11}$, liegen auch immer akkumulierte β APP-CTF vor, d.h. in dem Kompartiment der BACE Prozessierung ist die γ -Sekretase in diesem Fall nicht aktiv. Bei der Überexpression von BACE-L kommt es nicht zur Akkumulation von β APP-CTF. Möglicherweise ist die spezifische Aktivität von BACE-L geringer als die anderer BACE-Varianten, oder aber aufgrund seines schnellen Transports zur Plasmamembran schneidet es sein Substrat in späteren Kompartimenten des sekretorischen Transportwegs, in denen auch die γ -Sekretase aktiv ist. Dadurch generieren BACE-L exprimierende Zellen mehr $A\beta$ als Zellen, die andere BACE-Varianten exprimieren. Möglich wäre auch, dass BACE-L nicht

in der Lage ist den Glu11-Schnitt zu katalysieren, da diese Schnittstelle näher an der Membran liegt und evtl. für die lösliche BACE-Form nicht zugänglich ist (Vassar et al., 1999). Vermutlich hat die Asp1-Schnittstelle die größere Affinität zu BACE. In HEK 293 Zellen entsteht $A\beta_{Glu11}$ erst nach exogener Expression von BACE. Ist jedoch aufgrund einer veränderten AS-Sequenz die Affinität dieser Schnittstelle zu BACE verschlechtert, wie z.B. in der Maus- bzw. Ratten-Sequenz (De Strooper et al., 1995b) findet die β APP-Prozessierung durch BACE überwiegend an der Glu11-Schnittstelle statt. Die Maus und Ratten Glu11-Schnittstelle entspricht den Anforderungen von BACE mit Phenylalanin, einer polaren AS mit sterisch großem Rest, an Position P1 und Glutamat, eine AS mit kleinen, negativ geladenen Seitenketten, an Position P1' (Lin et al., 2000; Sauder et al., 2000). Folglich ist die $A\beta_{Glu11}$ -Spezies die dominante Amyloid-Form in neuronalen Primärkulturen der Ratte und der Maus (Cai et al., 2001; Gouras et al., 1998; Wang et al., 1996). In humanen neuronalen Zellen entstehen sowohl endogen als auch nach Überexpression von BACE die $A\beta_{Asp1}$ - und die $A\beta_{Glu11}$ -Spezies (Lee et al., 2003). Ferner konnte $A\beta_{Glu11}$ in Amyloid-Ablagerungen im Gehirn nachgewiesen werden (Huse et al., 2002; Masters et al., 1985a; Naslund et al., 1994; Wang et al., 1999). *In vitro* konnte eine stärkere Fibrillenbildung und eine größere Neurotoxizität für die N-terminal verkürzte Spezies festgestellt werden (Pike et al., 1995). Einige FAD-Mutationen in β APP erhöhen im Zellkulturmodell ebenfalls die Bildung der $A\beta_{Glu11}$ -Spezies (Haass et al., 1994b; Nilsberth et al., 2001).

4.1.6 Polarisierter Transport von BACE

Zunächst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass BACE auch in einer polarisierten Epithel-Zelllinie, der MDCK Zelllinie, durch Propeptid Abspaltung und dem Aufbau Endo H resistenter komplexer Zucker maturiert (Abbildung 36 / Abbildung 37) (Capell et al., 2002). Die Maturierung von BACE in MDCK Zellen unterscheidet sich damit nicht von der Maturierung in anderen Zellen (3.2) (Capell et al., 2000b; Creemers et al., 2001; Haniu et al., 2000; Huse et al., 2000). Im Vergleich zu HEK 293 Zellen maturiert BACE in MDCK Zellen schneller, schon nach 30 min „chase“-Zeit liegt überwiegend und nach 60 min ausschließlich die mature Spezies vor (Abbildung 36). In HEK 293 Zellen überwiegt die mature Form erst nach 120 min (Abbildung 20). Ferner konnte im *in vitro* Assay gezeigt werden, dass stabil in MDCK Zellen exprimiertes BACE enzymatisch aktiv ist (Abbildung 38) (Capell et al., 2002). Damit waren die Grundvoraussetzungen für die Analyse des Transports von BACE in einer polarisierten Zelllinie gegeben. In der Immunofluoreszenz konnte BACE mit Hilfe eines konfokalen Laser-Mikroskops sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Plasmamembran nachgewiesen werden (Abbildung 39). Durch Oberflächenbiotinylierung wurde die Verteilung von BACE an der apikalen und basolateralen Plasmamembran quantifiziert (3.5.3.2). Es zeigte sich, dass BACE überwiegend apikal lokalisiert ist. In Klonen mit hoher BACE-Expression war 60-70 % des an der Oberfläche befindlichen BACE apikal lokalisiert, in Klonen mit niedriger Expression konnten über 80 % an der apikalen Plasmamembran nachgewiesen werden (Abbildung 40) (Capell et

al., 2002). Dass niedrig exprimierende Klone eine akkuratere Sortierung zeigen als hoch exprimierende Klone, wird häufig beobachtet, da die Sortierungsmaschinerie durch die Überexpression abgesättigt werden kann. Darüber hinaus sind apikale Sortierungssignale selten stringent, so dass eine basolaterale Fehlsortierung von 20-30 % im üblichen Rahmen liegt.

Im Gegensatz zu basolateralen Transportsignalen, oft bestehend aus hydrophoben cytoplasmatischen Sequenzmotiven, sind Signale für die apikale Sortierung meistens N- oder O-Glycosylierungen und GPI-Anke (Rodriguez-Boulan und Gonzalez, 1999). GPI-verankerte Proteine sind oft „lipid raft“ assoziiert und „lipid rafts“ werden überwiegend apikal transportiert (Benting et al., 1999; Brown und London, 1998; Simons und Ikonen, 2000). Bei „lipid rafts“ handelt es sich um Mikrodomänen der Membran, in denen bestimmte Lipide, wie Phospholipide, Sphingolipide und Cholesterin, angereichert vorliegen. Ferner sind „lipid rafts“ durch eine Unlöslichkeit in Nicht-Ionischen-Detergenzien bei 4°C gekennzeichnet (Simons und Toomre, 2000). Selten sind luminale oder Membran assoziierte Sequenzmotive die Ursache für eine apikale Proteinsortierung (Benting et al., 1999; Mostov et al., 2003). Es ist wahrscheinlich, dass die N-Glycosylierung von BACE für die apikale Sortierung verantwortlich ist. BACE kann an vier Stellen N-glycosyliert werden. Auf Deletion der Glycosylierungsstellen wurde jedoch verzichtet, da eine Inhibition der Glycosylierung durch Tunicamycin den Transport von BACE blockiert (Abbildung 23). Eine Verhinderung der Glycosylierung kann die Gesamtstruktur der Ektodomäne derart verändern, dass der Transport und die Stabilität des Proteins erheblich beeinflusst werden (Helenius, 1994; Helenius und Aebi, 2001; Roth, 2002). In MDCK Zellen können apikal sortierte Proteine sowohl direkt als auch über Transcytose zur apikalen Plasmamembran transportiert werden. Bei der Transcytose erfolgt zunächst ein Transport zur basolateralen Membran, meist in eine laterale Membranregion unterhalb der „tight junctions“, dort werden die Proteine über Endocytose aufgenommen und zur apikalen Plasmamembran transportiert (Mostov et al., 2003; Polishchuk et al., 2004). Da für den apikalen Sortierungsmechanismus der Transcytose eine Proteinaufnahme von der lateralen Plasmamembran erfolgen muss, wurde untersucht, ob das Di-Leucin-Motiv im BACE C-Terminus eine Rolle bei dem apikalen Transport von BACE spielt (4.1). Eine BACE-Variante (BACE STOP₄₉₄), bei der die letzten acht AS inklusive des Di-Leucin-Motivs deletiert sind, wird immer noch apikal transportiert (Abbildung 41). Damit ist gezeigt, dass das Di-Leucin-Motiv keine Rolle für den apikalen Transport von BACE spielt.

Andere Gruppen konnten eine Anreicherung von BACE in „lipid rafts“ nachweisen (Ehehalt et al., 2003; Marlow et al., 2003; Riddell et al., 2001), so könnte der apikale Transport von BACE seine Ursache auch in der „lipid raft“-Assoziation von BACE haben.

Wichtig für die Beurteilung der Relevanz der in MDCK Zellen erzielten Ergebnisse für die Alzheimer Krankheit wäre eine Verifizierung in Neuronen. Die apikale Lokalisierung von BACE in MDCK Zellen würde einer axonalen Lokalisierung in Neuronen entsprechen (Dotti und Simons, 1990). Die Sortierungsmechanismen in MDCK Zellen und Neuronen sind ähnlich. Es wurden zunehmend aber auch Ausnahmen gefunden, bei denen eine apikale Sortierung in

MDCK Zellen keiner axonalen Sortierung in Neuronen entsprach (Winckler und Mellman, 1999). Für BACE konnte in Übereinstimmung mit der apikalen Lokalisierung in MDCK Zellen eine axonale Lokalisierung in neuronalen Primärkulturen (Capell et al., 2002) und im Hirn (Sheng et al., 2003) gezeigt werden.

4.1.6.1 Auswirkungen des polarisierten Transports von BACE auf die β APP-Prozessierung

Das Holoprotein β APP wird in MDCK Zellen zu >80 % basolateral sortiert und die Prozessierungsprodukte $A\beta$ -, p3-Peptid und I- β APP werden basolateral sezerniert (De Strooper et al., 1995a; Haass et al., 1994a; Lo et al., 1994). Das basolaterale Sortierungssignal wurde in der cytoplasmatischen Domäne identifiziert (1.5.2) (Haass et al., 1995c).

Zur Untersuchung des Einflusses von BACE auf die Prozessierung von β APP wurde eine stabil BACE und β APP exogen exprimierende MDCK Zelllinie generiert. Die BACE-Überexpression führt zu einer Akkumulation von BACE geschnittenem β APP-CTF und einer Reduktion der intrazellulären, maturen β APP-Spezies, wohingegen die immature β APP-Spezies nicht beeinflusst wird (Abbildung 42). Die Reduktion der maturen β APP-Form ist vermutlich auf eine verstärkte Prozessierung durch BACE und damit verbunden auf eine erhöhte Sezernierung von I- β APP β zurückzuführen. Die Abnahme der maturen β APP-Spezies wurde auch in anderen BACE transfizierten Zelllinien beobachtet (Creemers et al., 2001; Yan et al., 1999).

Die Untersuchung der polarisierten Sezernierung von I- β APP in BACE transfizierten MDCK Zellen zeigt, dass fast ausschließlich I- β APP β entsteht. α -Prozessierung von β APP findet kaum noch statt (Abbildung 43A). Da kein epitopspezifischer AK für die Detektion von I- β APP β zur Verfügung stand, wurde die von BACE generierte I- β APP β -Spezies aus der Differenz der I- β APP_{total}-Spezies und der durch α -Sekretase generierten I- β APP α -Spezies berechnet. Diese Berechnung kann Anhaltspunkte liefern, jedoch keine absoluten Werte, da zwei verschiedene AK mit unterschiedlichen Affinitäten zu ihren Antigenen eingesetzt wurden. So ist die Kalkulation für I- β APP β nur als Abschätzung zu verstehen. Trotzdem kann festgestellt werden, dass I- β APP β gleichmäßig apikal und basolateral sezerniert wird (Abbildung 43B), obwohl das BACE-Substrat β APP fast vollständig basolateral transportiert wird. Auch eine Deletion des β APP Sortierungssignals (β APP Δ C) (1.5.2) und damit verbunden eine gleichmäßige apikale und basolaterale Oberflächenlokalisation von β APP Δ C ändert die Sezernierung von I- β APP β nicht (Abbildung 49). Das bedeutet, dass in BACE transfizierten Zellen die Sortierung von β APP keine Rolle für die Prozessierung spielt. Aufgrund der Überexpression von BACE wird β APP fast ausschließlich durch BACE prozessiert und wie bereits für andere Zelllinien beobachtet wurde (Benjannet et al., 2001; Creemers et al., 2001; Vassar et al., 1999), ist exogen exprimiertes BACE bereits in frühen Kompartimenten des sekretorischen Transportweges aktiv. Dadurch schneidet BACE sein Substrat β APP bevor es zur Trennung des apikalen und basolateralen Transports kommt.

Aufgrund der hohen BACE-Expression wird ausschließlich die verkürzte $A\beta_{\text{Glu11}}$ -Spezies generiert (Abbildung 45, 4.1.5) und $A\beta_{\text{Glu11}}$ wird weiterhin basolateral sezerniert. Für die basolaterale Sezernierung von $A\beta_{\text{Glu11}}$ gibt es mehrere mögliche Erklärungen, so könnte die $A\beta$ C-terminal generierende γ -Sekretase nur basolateral aktiv sein (4.1.6.2), oder aber das direkte Substrat für den γ -Sekretase-Schnitt wird basolateral sortiert. Die in Folge der BACE-Prozessierung von β APP entstehenden β APP-CTF β enthalten noch das cytoplasmatische Sortierungssignal für den basolateralen Transport von β APP (Haass et al., 1995c). Es konnte β APP-CTF an der basolateralen Plasmamembran nachgewiesen werden (Abbildung 47). Dieser Nachweis konnte nur in β APP transfizierten und nicht in zusätzlich mit BACE transfizierten Zellen erbracht werden. In BACE transfizierten Zellen kommt es aufgrund der hohen BACE-Aktivität in frühen sekretorischen Kompartimenten zu einer β APP-Prozessierung und zu einer Akkumulation von β APP-CTF β . Aufgrund der Akkumulation der β APP-CTF β wird vermutlich der Transport zur Oberfläche behindert, so konnte für β APP_{sw} und BACE exprimierende Zellen eine Akkumulation von β APP-CTF β und im Vergleich zu β APP_wt exprimierende Zellen eine niedrigere Sezernierung von $A\beta$ nachgewiesen werden (Sinha et al., 1999; Sinha und Lieberburg, 1999; Vassar et al., 1999).

Da die Überexpression von BACE eine frühe Prozessierung von β APP verursacht, wurde die Prozessierung von β APP nochmals mit endogener BACE-Expression unter Berücksichtigung des apikalen BACE Transports analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass I-APP α fast ausschließlich basolateral sezerniert wird (Abbildung 43). Auch, wenn das basolaterale Sortierungssignal von β APP deletiert ist (β APP Δ C) und das Vollängenprotein gleichmäßig apikal und basolateral sortiert wird (Haass et al., 1995c), konnte I- β APP α nur basolateral nachgewiesen werden (Abbildung 49). Eine basolaterale Sezernierung von I- β APP α wurde bereits von anderen Arbeitgruppen gezeigt (De Strooper et al., 1995a; Haass et al., 1994a; Lo et al., 1994). Für β APP Δ C wurde seiner Zeit nur die Sezernierung der I- β APP α -Spezies untersucht (Haass et al., 1995c) und die weiterhin basolaterale Sezernierung ließ vermuten, dass sich in der Ektodomäne von β APP ein weiteres basolaterales Sortierungssignal befindet (De Strooper et al., 1995a). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen jedoch daraufhin, dass auch die α -Sekretase Aktivität basolateral lokalisiert ist. Basolateral transportiertes β APP-Holoprotein wird fast ausschließlich von der α -Sekretase prozessiert und die Prozessierungsprodukte I- β APP α und das p3-Peptid werden basolateral sezerniert. Apikal transportiertes β APP Δ C oder fehlsortiertes β APP wird von BACE prozessiert und I- β APP β wird apikal sezerniert (Abbildung 43 / Abbildung 49). Zur Verdeutlichung wird nochmals die Prozessierung von β APP und β APP Δ C vergleichend dargestellt (Abbildung 60).

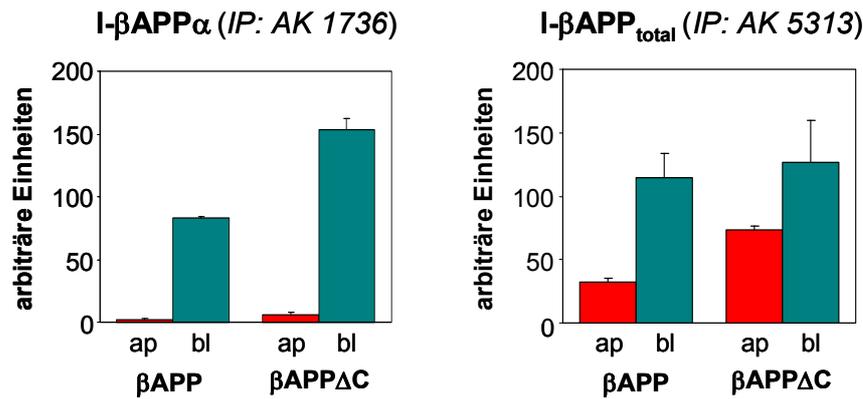


Abbildung 60: Sekretion von I-βAPPα und I-βAPP_{total} in βAPP und βAPPΔC transfizierten MDCK Zellen

Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abbildung 43 und Abbildung 49. I-βAPPα wird basolateral sezerniert. Bei der apikal sezernierten Spezies, detektiert mit dem AK 5313 gerichtet gegen I-βAPP_{total}, muss es sich um I-βAPPβ handeln. Diese I-βAPPβ-Spezies ist deutlich erhöht, wenn βAPP, wie die βAPPΔC Variante, auch apikal sortiert wird.

Die aus dem apikalen Fehltransport von βAPP resultierenden βAPP-CTFβ werden vermutlich reinternalisiert und aufgrund des Sortierungssignals in basolaterale Kompartimente transportiert, dort durch die γ-Sekretase prozessiert und das Aβ-Peptid wird basolateral sezerniert (Abbildung 45). Die hier postulierte Transcytose für βAPP-CTFβ konnte für das βAPP-Holoprotein gezeigt werden. L-βAPP, resultierend aus apikal markiertem Holoprotein, konnte im basolateral konditionierten Medium nachgewiesen werden (Abbildung 48). Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob neben I-βAPPα auch I-βAPPβ auf dem Transportweg der Transcytose entsteht. Andere Gruppen konnten nach Reinternalisierung ausschließlich die Entstehung von I-βAPPα zeigen (Haass et al., 1994a; Lo et al., 1994).

Ist das C-terminale Sortierungssignal jedoch deletiert, wie im Falle von βAPPΔC, wird eine verkürzte Aβ-Spezies auch apikal sezerniert (Abbildung 50) (Haass et al., 1995c). Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die verkürzte, apikal sezernierte Aβ-Spezies in Abhängigkeit von Cholesterin entsteht und eine Cholesterin Depletion führt zu einer „normalen“ apikal sezernierten Aβ-Spezies (Mizuno et al., 1998). Da apikale Membranen einen höheren Cholesteringehalt aufweisen als basolaterale, wäre es möglich, dass die Membranzusammensetzung einen Einfluss auf den BACE-Schnitt von βAPP hat.

4.1.6.2 βAPP prozessierende Sekretase Aktivitäten in MDCK Zellen

Die Produkte der γ-Sekretase Prozessierung von βAPP-CTF werden überwiegend im basolateralen Medium nachgewiesen (Abbildung 45). Wird das Vollängenprotein jedoch auch apikal sortiert wie βAPPΔC, kann Aβ auch im apikalen Medium nachgewiesen werden (Abbildung 50). Neben den apikalen und basolateralen Aktivitäten konnten auch zwei Komponenten (Presenilin 1 und Nicastrin) des γ-Sekretase Komplex apikal und basolateral nachgewiesen werden (Abbildung 51). Im Gegensatz zeigte jedoch eine andere Gruppe eine ausschließliche basolaterale Lokalisierung von Presenilin in MDCK Zellen (Georgakopoulos et al., 1999). Eine basolaterale Lokalisierung von Presenilin kann aber nicht die Möglichkeit der

apikalen A β -Sekernierung erklären. Es ist auch unwahrscheinlich, dass die Vielzahl der γ -Sekretase Substrate basolateral sortiert werden. Ferner wurde eine „lipid raft“ Assoziation (Vetrivel et al., 2004) und in Neuronen ein axonaler Transport von Presenilin 1 beschrieben (Sheng et al., 2003). Axone würden dem apikalen Kompartiment von MDCK Zellen entsprechen. Mit apikal lokalisierter BACE-Aktivität und α -Sekretase Aktivität im basolateralen Kompartiment ergibt sich für β APP die in Abbildung 61 dargestellte Prozessierung in polarisierten MDCK Zellen.

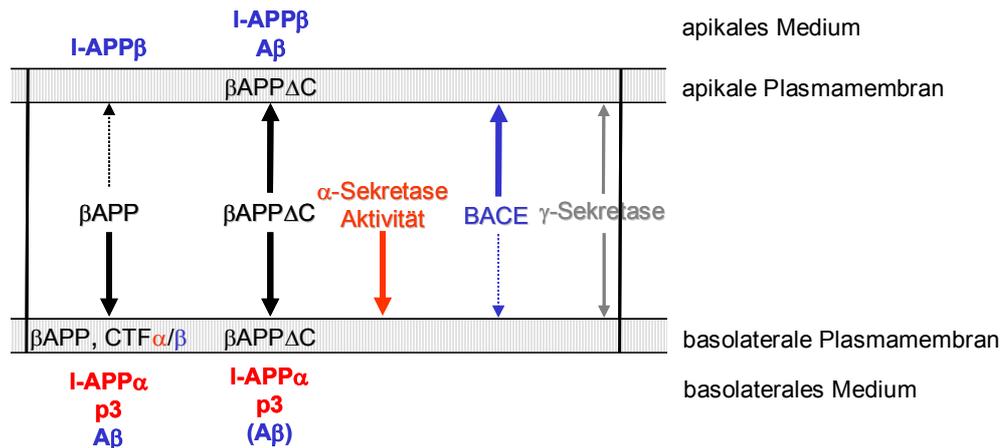


Abbildung 61: Polarisierte Sortierung von β APP und den proteolytischen Enzymen

Dargestellt ist die Oberflächenverteilung von β APP und β APP Δ C (schwarz), BACE (blau), α -Sekretase Aktivität (rot) und γ -Sekretase (grau). Die resultierenden Prozessierungsprodukte sind in den Farben der proteolytischen Enzyme dargestellt.

4.2 Charakterisierung von BACE - *in vitro*

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit ein spezifischer, sensitiver BACE-Assay entwickelt, der zur Identifikation von BACE-Inhibitoren im „high-throughput“ System eingesetzt werden kann. Anderen Gruppen haben für die Analyse von BACE-Inhibitoren ähnliche Assays entwickelt und bestätigen die Funktionalität des in dieser Arbeit beschriebenen quenched Fluoreszenzassays (Andrau et al., 2003; Marcinkeviciene et al., 2001; Touloukhonova et al., 2003).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird (3.3.2) (Capell et al., 2000b) und andere Arbeiten gezeigt haben, sind lösliche BACE-Varianten aktiv (Benjannet et al., 2001; Creemers et al., 2001; Vassar et al., 1999), und Peptidsubstrate, die die β APPwt- oder die β APPsw-Sequenz enthalten, werden von BACE prozessiert (Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999). Da die Affinität von BACE zur β APPsw-Sequenz deutlich größer ist als zur β APPwt-Sequenz (Lin et al., 2000; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999), wurden für die *in vitro* Untersuchungen Peptide mit der β APPsw-Sequenz als Substrat eingesetzt. Für den

Fluoreszenz Assay wurden Peptide unterschiedlicher Länge, konjugiert mit einer fluoreszierenden und einer quenchenden Gruppe, eingesetzt (2.7.2). Das kürzeste Peptid mit der P5-P4' Sequenz der BACE-Schnittstelle war für den Fluoreszenz Assay das am besten geeignete Substrat. Andere Gruppen haben unterschiedlich lange Peptidsubstrate eingesetzt: P3-P3' (Andrau et al., 2003), P4-P4' (Lin et al., 2000), P5-P5' (Yan et al., 1999), P21-P9' (Vassar et al., 1999). Als Kontrolle der BACE-Spezifität des Peptidumsatzes wurde ein Substratpeptid mit einer AS-Substitution von Leucin zu Valin an Position P1 generiert. Dieser AS-Austausch verhindert die Prozessierung durch BACE-L nahezu vollständig (Abbildung 53) (Citron et al., 1995; Vassar et al., 1999). Ferner wird die Spezifität des Assays nochmals dadurch bestätigt, dass Inhibitoren gegen bekannte Proteasegruppen, wie Serin-, Cystein-, Metallo- und andere Aspartyl-Proteasen, die BACE-Aktivität nicht inhibieren (Abbildung 58) (Mallender et al., 2001; Sinha et al., 1999).

Als Enzymquelle wurde konditioniertes Medium von BACE-L exprimierenden HEK 293 Zellen eingesetzt. BACE-L-Aktivität konnte direkt im konditionierten Medium nachgewiesen werden, durch Konzentration des Mediums konnte die BACE-L-Aktivität entsprechend verstärkt werden (Abbildung 54). Sezerniertes BACE-L ist komplex glycosyliert, enthält jedoch vermutlich zum Großteil noch das Propeptid (Abbildung 52A) (Bennett et al., 2000a; Haniu et al., 2000). Da der Nachweis der Propeptid enthaltenden BACE-L-Form mit einem anderen AK erfolgte als der der Gesamtpopulation, ist aufgrund der unterschiedlichen AK-Affinitäten ein direkter quantitativer Vergleich nicht möglich. Eine Ursache für die ineffiziente Abspaltung des Propeptids von BACE-L könnte der schnelle Transport zur Plasmamembran sein. Im *in vitro* Assay wird demzufolge ein Gemisch aus BACE-L mit und ohne Propeptid eingesetzt. Obwohl gezeigt wurde, dass das Propeptid nur geringen Einfluss auf die BACE-Aktivität hat (Benjannet et al., 2001; Creemers et al., 2001; Ermolieff et al., 2000; Shi et al., 2001), muss bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass eine heterogene BACE-L-Spezies eingesetzt wurde. Hat das Propeptid Einfluss auf die Faltung von BACE, wie vermutet wird (Shi et al., 2001), so könnte auch ein Einfluss auf die *in vitro* Eigenschaften des Enzyms bestehen.

BACE-L konnte über das konjugierte sechsfache Histidin mit Hilfe von Nickel-Agarose aufgereinigt werden (Abbildung 52B). Die aufgereinigte, in der Silberfärbung ausschließlich BACE-L enthaltende, Fraktion war enzymatisch aktiv (Abbildung 54). Konditioniertes Kontrollmedium zeigte keine enzymatische Aktivität. Da die Prozessierung des Substratpeptids spezifisch war (s. oben) und die Aktivität des konzentrierten, konditionierten BACE-L Mediums ausreichend war, wurde dieses Medium für die weiteren Experimente eingesetzt. Eine Optimierung der Aufreinigung von BACE-L war für die Ziele dieser Arbeit nicht notwendig.

BACE-L hat im *in vitro* Assay bei einem pH-Wert von 4,4 die maximale Aktivität, die Aktivität nimmt außerhalb des engen pH-Bereichs von 4,2-4,8 schnell ab, bei einem pH-Wert von 5,0 liegen nur noch 20 % der maximalen Aktivität vor (3.6.2.1). Andere Arbeitsgruppen haben *in vitro* für BACE ebenfalls eine maximale Aktivität im sauren Milieu mit pH-Werten von 4,0-4,5 festgestellt (Andrau et al., 2003; Gruninger-Leitch et al., 2002; Lin et al., 2000; Vassar et al.,

1999). Das pH-Maximum der BACE-Aktivität ist unabhängig vom Substrat (Gruninger-Leitch et al., 2002; Lin et al., 2000).

Überraschend ist, dass BACE *in vivo*, d.h. in Zellkultur, eine deutlich größere pH-Wert Toleranz aufweist. So ist BACE zwar überwiegend in leicht sauren Kompartimenten (Haass und Selkoe, 1993; Knops et al., 1995) wie dem Golgi-Apparat, dem TGN (Haass et al., 1995a; Haass et al., 1995b; Hussain et al., 1999; Steinhilb et al., 2002; Vassar et al., 1999) und dem endosomalen/lysosomalen System (Huse et al., 2002; Huse et al., 2000; Koo und Squazzo, 1994; Perez et al., 1999; Thinakaran et al., 1996a; Vassar et al., 1999; Walter et al., 2001; Yan et al., 2001b) lokalisiert und aktiv. Es wurde jedoch auch BACE-Aktivität im ER (Benjannet et al., 2001; Chyung et al., 1997; Cook et al., 1997; Haniu et al., 2000; Hartmann et al., 1997; Huse et al., 2000; Wild-Bode et al., 1997) und an der Zelloberfläche (Chyung und Selkoe, 2003; Kinoshita et al., 2003) gezeigt. Die BACE-Aktivität und die Entstehung von A β ist damit nicht auf ein zelluläres Kompartiment begrenzt, A β kann an verschiedenen Orten in der Zelle entstehen. Entweder ermöglichen lokale saure pH-Werte auch in nicht sauren Kompartimenten die BACE-Aktivität, oder *in vivo* ist BACE in einem breiteren pH-Bereich aktiv und außerhalb des pH-Optimums ist die BACE-Aktivität reduziert.

Erste Untersuchungen der Enzymkinetik zeigen, dass keine hyperbole Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration besteht, sondern eine fast sigmoidale Beziehung vorliegt (Abbildung 57). Bei der Substraterhöhung im Bereich niedriger Substratkonzentrationen (< 400 nM) steigt die Reaktionsgeschwindigkeit nur sehr langsam an, geschwindigkeitsbegrenzende Enzymumfaltungen oder die Entstehung von Enzym-Substrat-Intermediaten könnten eine mögliche Ursache sein. Sehr häufig bestehen Enzyme mit einer sigmoidalen Kinetik aus mehreren Untereinheiten, die verschiedene Konformationen mit unterschiedlicher Fähigkeit zur Substratbindung und Enzymkatalyse eingehen können. Bei Erhöhung der Substratkonzentration kommt es zu einer Stabilisierung der enzymatisch aktiveren Form (Löffler und Petrides, 2003). Für BACE konnten zwei kinetische Phasen in der Substratumsetzung festgestellt werden, möglicherweise verursacht durch einen zwei-stufigen Substrat-Bindungsmechanismus. Durch die strukturelle Änderung, vermutlich in der „flap“-Region, entsteht ein Enzym-Substrat-Komplex, der die Katalyse erhöht, die enzymatische Reaktion zeigt dann eine hyperbole Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Marcinkeviciene et al., 2001; Touloukhonova et al., 2003).

Der Einsatz von Inhibitoren zeigt, dass der Enzymassay geeignet ist, BACE-Inhibitoren aus pharmakologischen Komponenten-Banken zu detektieren. Es wurden zwei auf der β APPsw-Sequenz basierende Peptidinhibitoren GL189 P4-P4' und GL190 P8-P4' generiert. Bei beiden Inhibitoren ersetzt Statin die AS an Position P1 (Leucin), und die AS an Position P1' (Aspartat) wurde durch Valin substituiert (2.7.3.1). Beide Inhibitoren zeigen ein ähnliches BACE-Inhibitionsprofil mit einem IC₅₀-Wert von ca. 100 nM. Die N-terminale Verlängerung von GL190 hat keinen Einfluss auf die Inhibition der BACE-Aktivität (Abbildung 58).

Andere Arbeitsgruppen haben für substratanaloge Peptidinhibitoren, die auf Statin-Substitution basieren, IC_{50} -Werte von 30 nM bis 40 μ M ermittelt (Andrau et al., 2003; Gruninger-Leitch et al., 2002; Mallender et al., 2001; Sinha et al., 1999). Für einen Inhibitor P10-P4', der den Substitutionen von GL189 und GL190 entspricht wurden IC_{50} -Werte von 30 nM (Sinha et al., 1999) und 200 nM (Gruninger-Leitch et al., 2002) ermittelt. Eine Inhibitorklasse, die auch bei der Kristallisation von BACE eingesetzt wurde (Hong et al., 2000), zeigt deutlich niedrigere IC_{50} -Werte im Bereich von 1 nM (Ermolieff et al., 2000; Ghosh et al., 2001). Bei den OM-99 Inhibitoren wurden die AS der Schnittstelle P1-P1' durch ein Hydroxylethylen-Dipeptid-Isoster ersetzt und das Aspartat an Position P1' durch Alanin ersetzt. Aufgrund der genauen Strukturkenntnis von BACE war es möglich, Inhibitoren mit einer größeren Affinität zu generieren. Genaue Bindungsanalysen ergaben, dass nur P1-P4 sowie P1'-P2' an der Enzymbindung beteiligt sind (Ghosh et al., 2001; Hong et al., 2000). Damit ist erklärt warum eine N-terminale Verlängerung des Inhibitors keinen Einfluss auf die Inhibition hat (s. oben). Genaue Sequenzanalysen von BACE-Inhibitoren und -Substraten ergaben, dass BACE sehr niedrige Kinetik-Konstanten zum Substrat β APP hat (Gruninger-Leitch et al., 2002; Lin et al., 2000), und bei weitem nicht so sequenzspezifisch ist wie vermutet wurde (Ghosh et al., 2001; Hong et al., 2002).

4.3 Relevanz der Ergebnisse bezüglich der Alzheimer Krankheit

Die Behandlung der Alzheimer Krankheit ist aufgrund der weiten Verbreitung, des langen Krankheitsverlaufs und der gesellschaftlichen Belastung ein herausragendes Ziel der neurologischen Forschung (1.1). Bisher werden ausschließlich die Symptome der Alzheimer Krankheit behandelt, wodurch der Krankheitsverlauf verlangsamt und die Symptome zeitweilig vermindert werden (Citron, 2004a). Ziel der Erforschung der Alzheimer Krankheit ist es die Entstehungsmechanismen aufzudecken und mögliche therapeutische Angriffspunkte zur Ursachenbekämpfung offen zu legen. Eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Alzheimer Krankheit spielt die Entstehung und Akkumulation des A β -Peptids, insbesondere der um zwei AS verlängerten A β_{42} -Spezies (1.3). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Reduktion von A β im Hirn transgener Alzheimer Mäuse deren kognitive Funktion verbessert wurde (Dodart et al., 2002; Morgan et al., 2000).

BACE schneidet β APP N-terminal der A β -Sequenz und durch den folgenden C-terminalen γ -Sekretase-Schnitt wird A β freigesetzt (1.3.2). Die Inhibition von BACE würde zu einer Verminderung der Amyloid-Produktion führen. Da BACE „knock-out“ Mäuse keinen bzw. nur einen minimalen Phänotyp zeigen (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001) ist die BACE-Inhibition vermutlich unproblematisch. Im Gegensatz dazu sind „knock-out“ Mäuse einzelner γ -Sekretase Komplex Komponenten pränatal letal (De Strooper et al., 1998; Herreman et al., 1999; Shen et al., 1997; Wong et al., 1997). Die Ursache hierfür liegt in der Vielzahl der γ -Sekretase Substrate begründet (1.3.2.3) (Kopan und Ilagan, 2004; Xia und Wolfe, 2003), so

spielt z.B. die γ -Sekretase Prozessierung von Notch eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung (De Strooper et al., 1999; Mumm et al., 2000; Selkoe und Kopan, 2003). Damit ist die BACE-Inhibition der primäre Ansatzpunkt um die Entstehung von Amyloid zu reduzieren (Citron, 2004b; Dingwall, 2001; Dodart et al., 2002; Ghosh et al., 2002; Hong et al., 2002). Eine Inhibition von BACE führt nicht zur Akkumulation von toxischen β APP-Fragmenten sondern zu einer erhöhten nicht amyloidogenen Prozessierung durch die α -Sekretase. Die Inhibition von BACE würde den initialen Schritt in der Entstehung der Alzheimer Krankheit unterbinden. Kürzlich konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass BACE-Inhibitoren, kovalent an einen Peptidcarrier gebunden, die Blut-Hirn-Schranke passieren und zur reduzierten A β -Produktion führen (Chang et al., 2004). Durch diese Ergebnisse wird der Therapieansatz der BACE-Inhibition weiter unterstützt.

In dieser Arbeit wurde ein sensitiver *in vitro* Assay aufgebaut, mit dessen Hilfe BACE-Inhibitoren analysiert werden können.

Um neben der BACE-Inhibition weitere mögliche Eingriffspunkte für die Modulation der BACE-Aktivität aufzudecken, wurden die Maturierung und der Transport von BACE analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass BACE auch in frühen Kompartimenten des sekretorischen Transportwegs aktiv sein kann und dass die BACE-Aktivität unabhängig von der cytoplasmatischen Domäne und der Transmembrandomäne ist. Die Experimente in MDCK Zellen zeigen jedoch, dass der Transport von BACE erheblichen Einfluss auf die A β -Entstehung hat. In MDCK Zellen werden BACE und β APP differenziell transportiert, BACE apikal und β APP basolateral, dadurch wird die α -Sekretase Prozessierung von β APP begünstigt. Wird jedoch β APP, durch Deletion des basolateralen Sortierungssignals, in apikale Kompartimente transportiert findet verstärkt BACE-Prozessierung von β APP statt. Damit ist eindeutig gezeigt das der Transport des β APP bzw. der β APP prozessierenden Proteasen die Amyloid-Entstehung beeinflusst. Es wäre also möglich, dass geringe, evtl. altersabhängige, Änderungen in Transportmechanismen die Entstehung der Alzheimer Krankheit begünstigen könnten. Andere Gruppen konnten ebenfalls den Transport bzw. die Lokalisierung von β APP und BACE als den, die A β -Entstehung begrenzenden Faktor ausmachen. BACE wurde überwiegend in „lipid rafts“ lokalisiert (Marlow et al., 2003; Riddell et al., 2001) und eine Erhöhung der β APP-Fraktion (Marlow et al., 2003) oder der BACE- und β APP-Fraktion (Eehalt et al., 2003) in „lipid rafts“ verstärkt die amyloidogene Prozessierung von β APP.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|--|
| A β | Amyloid β-Peptid |
| A β ₁₋₄₀ , A β ₁₋₄₂ , A β ₄₀ , A β ₄₂ | Spezifizierung von A β : Angabe der beginnenden und endenden Aminosäure oder nur der endenden Aminosäure, wobei Asp597 bezogen auf β APP ₆₉₅ als Aminosäure 1 (Asp1) gesetzt ist. |
| A β _{Asp1} , A β _{Glu11} | Spezifizierung von A β : Angabe der ersten Aminosäure |
| β APP, β APPwt | β-Amyloid precursor protein |
| β APPsw | β APP ₆₉₅ mit der FAD-Doppelmutation K595N/M596L, gefunden in einer schwedischen Familie |
| β APP ₆₉₅ , β APP ₇₅₁ , β APP ₇₇₀ | Spleißvarianten von β APP |
| β APP-CTF α , β APP-CTF β | C-terminales β APP Fragment, entstanden durch α - oder β -Sekretase-Schnitt |
| ADAM | A disintegrin and metalloprotease |
| AICD | βAPP intracellular domain |
| AK | Antikörper |
| APH-1 | Anterior pharynx-defective-1 |
| ap | Apikal |
| APLP-1, APLP-2 | βAPP-like protein-1, -2 |
| Apo E | Apolipoprotein E |
| APS | Amoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BACE | β-site APP cleaving enzyme |
| bl | Basolateral |
| BFA | Brefeldin A |
| BSA | Bovine serum albumin |
| Δ C | Deletion einer carboxy-terminalen Proteindomäne |
| cpm | Counts per minute |
| C-Terminus | Carboxy-Terminus eines Proteins oder Peptids |
| CTF | C-terminales Fragment |
| DABCO | Diazabicyclooctan |
| DMEM | Dulbecco`s modified Eagle`s medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleic acid |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | Enhanced Chemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetracetat |
| Endo H | Endoglycosidase H |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| FAD | Familial Alzheimer`s Disease |
| FKS | Fötales Kälberserum |

| | |
|------------|---|
| g | Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ |
| HEK | H uman E mryonic K idney |
| HRP | H orseradish P eroxidase |
| IF | I mmunofluoreszenz |
| IgG | I mmunoglobulin G |
| IP | I mmunopräzipitation |
| KLH | K eyhole limpet h emocyanin |
| L, I | L öslich (bezeichnet die lösliche Proteindomäne, ohne Membrandomäne) |
| LB | L uria- B ertani (-Medium) |
| LTP | L ong t erm p otentiation |
| MDCK | M adin- D arby c anine k idney |
| MEM | M odified E agle`s m edium |
| NICD | N otch intracellular d omain |
| NP-40 | N onidet P -40 |
| N-Terminus | Amino-Terminus eines Proteins oder Peptids |
| PAGE | P oly- A crylamid- G eleelektrophorese |
| PBS | P hosphate b uffered s aline |
| PCR | P olymerase c hain r eaction |
| PDBu | P horboldibutyrat |
| PEN-2 | P resenilin e nhancer 2 |
| Pp | P ropeptid |
| PS | P resenilin |
| PVDF | P olyvinylidendifluorid |
| RNA | R ibonucleic a cid |
| SDS | S odiumdodecylsulfat |
| Sp | S ignalpeptid |
| SPP | S ignalpeptid- P eptidase |
| TACE | T umor necrosis factor- α (TNF- α)- c onverting e nzyme |
| TBE | T ris- B orat- E DTA |
| TCA | T richloroacetic a cid |
| TEMED | N,N,N',N' - T etramethylethyldiamin |
| TGN | T rans- G olgi- N etzwerk |
| TM | T ransmembrandomäne |
| Tris | T ris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UpM | U mdrehungen p ro M inute |
| WB | W estern B lot |
| wt | W ildtyp-Form eines Proteins |

| Bezeichnung | Abkürzung | Einbuchstabencode |
|--------------------|------------------|--------------------------|
| Alanin | Ala | A |
| Arginin | Arg | R |
| Asparagin | Asn | N |
| Aspartat | Asp | D |
| Cystein | Cys | C |
| Glutamin | Gln | Q |
| Glutamat | Glu | E |
| Glycin | Gly | G |
| Histidin | His | H |
| Isoleucin | Ile | I |
| Leucin | Leu | L |
| Lysin | Lys | K |
| Methionin | Met | M |
| Phenylalanin | Phe | F |
| Prolin | Pro | P |
| Serin | Ser | S |
| Threonin | Thr | T |
| Tryptophan | Trp | W |
| Tyrosin | Tyr | Y |
| Valin | Val | V |

Literaturverzeichnis

- Albach, C.; Klein, R. A. und Schmitz, B. (2001): Do rodent and human brains have different N-glycosylation patterns?, *Biol Chem* 382 [2], Seite 187-94.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. und Walter, P. (2002): *Molecular biology of the cell*, 4th edition. Garland Science (Taylor & Francis Group).
- Allinson, T. M.; Parkin, E. T.; Turner, A. J. und Hooper, N. M. (2003): ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases, *J Neurosci Res* 74 [3], Seite 342-52.
- Alzheimer, A. (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, *Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtl Med* 64, Seite 146-148.
- Andrau, David; Dumanchin-Njock, Cecile; Ayrat, Erwan; Vizzavona, Jean; Farzan, Mike; Boisbrun, Michel; Fulcrand, Pierre; Hernandez, Jean-Francois; Martinez, Jean; Lefranc-Jullien, Solveig und Checler, Frederic (2003): BACE1- and BACE2-expressing Human Cells: CHARACTERIZATION OF β -AMYLOID PRECURSOR PROTEIN-DERIVED CATABOLITES, DESIGN OF A NOVEL FLUORIMETRIC ASSAY, AND IDENTIFICATION OF NEW IN VITRO INHIBITORS, *J Biol Chem* 278 [28], Seite 25859-25866.
- Andreasen, N.; Sjogren, M. und Blennow, K. (2003): CSF markers for Alzheimer's disease: total tau, phospho-tau and Abeta42, *World J Biol Psychiatry* 4 [4], Seite 147-55.
- Andreeva, N. S.; Bochkarev, A. und Pechik, I. (1995): A new way of looking at aspartic proteinase structures: a comparison of pepsin structure to other aspartic proteinases in the near active site region, *Adv Exp Med Biol* 362, Seite 19-32.
- Ankri, J. und Poupard, M. (2003): [Prevalence and incidence of dementia among the very old. Review of the literature], *Rev Epidemiol Sante Publique* 51 [3], Seite 349-60.
- Annaert, W. und De Strooper, B. (1999): Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction, *Trends Neurosci.* 22 [10], Seite 439-43.
- Annaert, W. G.; Levesque, L.; Craessaerts, K.; Dierinck, I.; Snellings, G.; Westaway, D.; George-Hyslop, P. S.; Cordell, B.; Fraser, P. und De Strooper, B. (1999): Presenilin 1 controls γ -secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons, *J Cell Biol* 147 [2], Seite 277-94.
- Baek, S. H.; Ohgi, K. A.; Rose, D. W.; Koo, E. H.; Glass, C. K. und Rosenfeld, M. G. (2002): Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF- κ B and β -amyloid precursor protein, *Cell* 110, Seite 55-67.
- Bard, F.; Cannon, C.; Barbour, R.; Burke, R. L.; Games, D.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Nguyen, M.; Soriano, F.; Vasquez, N.; Weiss, K.; Welch, B.; Seubert, P.; Schenk, D. und Yednock, T. (2000): Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease, *Nat Med* 6 [8], Seite 916-9.
- Barrow, C. J. und Zagorski, M. G. (1991): Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition, *Science* 253 [5016], Seite 179-82.
- Baxter, J. D.; Duncan, K.; Chu, W.; James, M. N.; Russell, R. B.; Haidar, M. A.; DeNoto, F. M.; Hsueh, W. und Reudelhuber, T. L. (1991): Molecular biology of human renin and its gene, *Recent Prog Horm Res* 47, Seite 211-57.
- Benjannet, S.; Elagoz, A.; Wickham, L.; Mamarbachi, M.; Munzer, J. S.; Basak, A.; Lazure, C.; Cromlish, J. A.; Sisodia, S.; Checler, F.; Chretien, M. und Seidah, N. G. (2001): Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid- converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production, *J Biol Chem* 276 [14], Seite 10879-87.

- Bennett, B. D.; Denis, P.; Haniu, M.; Teplow, D. B.; Kahn, S.; Louis, J. C.; Citron, M. und Vassar, R. (2000a): A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase, *J Biol Chem* 275 [48], Seite 37712-7.
- Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Loeloff, R.; Louis, J. C.; Curran, E.; Citron, M. und Vassar, R. (2000b): Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues, *J Biol Chem* 275 [27], Seite 20647-51.
- Benting, J. H.; Rietveld, A. G. und Simons, K. (1999): N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells, *J Cell Biol* 146 [2], Seite 313-20.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* 7 [6], Seite 1513-23.
- Black, R. A.; Rauch, C. T.; Kozlosky, C. J.; Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Wolfson, M. F.; Castner, B. J.; Stocking, K. L.; Reddy, P.; Srinivasan, S.; Nelson, N.; Boiani, N.; Schooley, K. A.; Gerhart, M.; Davis, R.; Fitzner, J. N.; Johnson, R. S.; Paxton, R. J.; March, C. J. und Cerretti, D. P. (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells, *Nature* 385 [6618], Seite 729-33.
- Blacker, M.; Noe, M. C.; Carty, T. J.; Goodyer, C. G. und LeBlanc, A. C. (2002): Effect of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) and metalloprotease inhibitor on amyloid precursor protein metabolism in human neurons, *J Neurochem* 83 [6], Seite 1349-57.
- Blennow, K. und Hampel, H. (2003): CSF markers for incipient Alzheimer's disease, *Lancet Neurol* 2 [10], Seite 605-13.
- Bondareff, W.; Harrington, C. R.; McDaniel, S. W.; Wischik, C. M. und Roth, M. (1994): Presence of axonal paired helical filament-tau in Alzheimer's disease: submicroscopic localization, *J Neurosci Res* 38 [6], Seite 664-9.
- Bonifacino, J. S. und Lippincott-Schwartz, J. (1991): Degradation of proteins within the endoplasmic reticulum, *Curr Opin Cell Biol* 3 [4], Seite 592-600.
- Bonifacino, J. S. (2004): The GGA proteins: adaptors on the move, *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 [1], Seite 23-32.
- 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. und Sisodia, S. S. (1996): Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo, *Neuron* 17 [5], Seite 1005-13.
- Bothwell, M. und Giniger, E. (2000): Alzheimer's disease: neurodevelopment converges with neurodegeneration, *Cell* 102 [3], Seite 271-3.
- Bott, R.; Subramanian, E. und Davies, D. R. (1982): Three-dimensional structure of the complex of the *Rhizopus chinensis* carboxyl proteinase and pepstatin at 2.5-Å resolution, *Biochemistry* 21 [26], Seite 6956-62.
- Braak, H.; Braak, E.; Yilmazer, D.; de Vos, R. A.; Jansen, E. N. und Bohl, J. (1996): Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases, *J Neural Transm* 103 [4], Seite 455-90.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, Seite 248-54.
- Bresnahan, P. A.; Leduc, R.; Thomas, L.; Thorner, J.; Gibson, H. L.; Brake, A. J.; Barr, P. J. und Thomas, G. (1990): Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo, *J Cell Biol* 111 [6 Pt 2], Seite 2851-9.
- Brown, D. A. und London, E. (1998): Functions of lipid rafts in biological membranes, *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, Seite 111-36.

- Bursavich, M. G.; West, C. W. und Rich, D. H. (2001): From peptides to non-peptide peptidomimetics: design and synthesis of new piperidine inhibitors of aspartic peptidases, *Org Lett* 3 [15], Seite 2317-20.
- Busciglio, J.; Gabuzda, D. H.; Matsudaira, P. und Yankner, B. A. (1993): Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 90 [5], Seite 2092-6.
- Bush, A. I.; Multhaup, G.; Moir, R. D.; Williamson, T. G.; Small, D. H.; Rumble, B.; Pollwein, P.; Beyreuther, K. und Masters, C. L. (1993): A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease, *J Biol Chem* 268 [22], Seite 16109-12.
- Bush, A. I.; Pettingell, W. H.; Multhaup, G.; d Paradis, M.; Vonsattel, J. P.; Gusella, J. F.; Beyreuther, K.; Masters, C. L. und Tanzi, R. E. (1994): Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc, *Science* 265 [5177], Seite 1464-7.
- Buxbaum, J. D.; Oishi, M.; Chen, H. I.; Pinkas-Kramarski, R.; Jaffe, E. A.; Gandy, S. E. und Greengard, P. (1992): Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor, *Proc Natl Acad Sci USA* 89 [21], Seite 10075-8.
- Buxbaum, J. D.; Koo, E. H. und Greengard, P. (1993): Protein phosphorylation inhibits production of Alzheimer amyloid beta/A4 peptide, *Proc Natl Acad Sci USA* 90 [19], Seite 9195-8.
- Buxbaum, J. D.; Thinakaran, G.; Koliatsos, V.; O'Callahan, J.; Slunt, H. H.; Price, D. L. und Sisodia, S. S. (1998a): Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path, *J Neurosci* 18 [23], Seite 9629-37.
- 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. und Black, R. A. (1998b): Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor, *J Biol Chem* 273 [43], Seite 27765-7.
- Cai, H.; Wang, Y.; McCarthy, D.; Wen, H.; Borchelt, D. R.; Price, D. L. und Wong, P. C. (2001): BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons, *Nat Neurosci* 4 [3], Seite 233-4.
- Cai, X. D.; Golde, T. E. und Younkin, S. G. (1993): Release of excess amyloid β protein from a mutant amyloid β protein precursor, *Science* 259 [5094], Seite 514-6.
- Cao, X. und Südhof, T. C. (2001): A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60, *Science* 293 [5527], Seite 115-20.
- Cao, X. und Südhof, T. C. (2004): Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation, *J Biol Chem* 279 [23], Seite 24601-11.
- Capell, A.; Saffrich, R.; Olivo, J. C.; Meyn, L.; Walter, J.; Grunberg, J.; Mathews, P.; Nixon, R.; Dotti, C. und Haass, C. (1997): Cellular expression and proteolytic processing of presenilin proteins is developmentally regulated during neuronal differentiation, *J. Neurochem* 69 [6], Seite 2432-40.
- Capell, A.; Grunberg, J.; Pesold, B.; Diehlmann, A.; Citron, M.; Nixon, R.; Beyreuther, K.; Selkoe, D. J. und Haass, C. (1998): The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex, *J Biol Chem* 273 [6], Seite 3205-11.
- Capell, A.; Steiner, H.; Romig, H.; Keck, S.; Baader, M.; Grim, M. G.; Baumeister, R. und Haass, C. (2000a): Presenilin-1 differentially facilitates endoproteolysis of the β -amyloid precursor protein and Notch, *Nat Cell Biol* 2 [4], Seite 205-211.
- Capell, A.; Steiner, H.; Willem, M.; Kaiser, H.; Meyer, C.; Walter, J.; Lammich, S.; Multhaup, G. und Haass, C. (2000b): Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase, *J Biol Chem* 275 [40], Seite 30849-54.

- Capell, A.; Meyn, L.; Fluhrer, R.; Teplow, D. B.; Walter, J. und Haass, C. (2002): Apical sorting of beta-secretase limits amyloid beta-peptide production, *J Biol Chem* 277 [7], Seite 5637-43.
- Capell, A.; Kaether, C.; Edbauer, D.; Shirotani, K.; Merkl, S.; Steiner, H. und Haass, C. (2003): Nicastrin interacts with gamma-secretase complex components via the N-terminal part of its transmembrane domain, *J Biol Chem* 278 [52], Seite 52519-23.
- Chaiet, G. und Wolf, F.J. (1964): The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by *Streptomyces*, *Arch Biochem Biophys* 106, Seite 1-5.
- Chandra, V.; Pandav, R.; Dodge, H. H.; Johnston, J. M.; Belle, S. H.; DeKosky, S. T. und Ganguli, M. (2001): Incidence of Alzheimer's disease in a rural community in India: the Indo-US study, *Neurology* 57 [6], Seite 985-9.
- Chang, W. P.; Koelsch, G.; Wong, S.; Downs, D.; Da, H.; Weerasena, V.; Gordon, B.; Devasamudram, T.; Bilcer, G.; Ghosh, A. K. und Tang, J. (2004): In vivo inhibition of Abeta production by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors, *J Neurochem* 89 [6], Seite 1409-16.
- Chantry, A.; Gregson, N. A. und Glynn, P. (1989): A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization, *J Biol Chem* 264 [36], Seite 21603-7.
- Charlwood, J.; Dingwall, C.; Matico, R.; Hussain, I.; Johanson, K.; Moore, S.; Powell, D. J.; Skehel, J. M.; Ratcliffe, S.; Clarke, B.; Trill, J.; Sweitzer, S. und Camilleri, P. (2001): Characterization of the glycosylation profiles of Alzheimer's beta - secretase protein Asp-2 expressed in a variety of cell lines, *J Biol Chem* 276 [20], Seite 16739-48.
- Chartier-Harlin, M. C.; Crawford, F.; Houlden, H.; Warren, A.; Hughes, D.; Fidani, L.; Goate, A.; Rossor, M.; Roques, P.; Hardy, J. und et al. (1991): Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene, *Nature* 353 [6347], Seite 844-6.
- Cherny, R. A.; Atwood, C. S.; Xilinas, M. E.; Gray, D. N.; Jones, W. D.; McLean, C. A.; Barnham, K. J.; Volitakis, I.; Fraser, F. W.; Kim, Y.; Huang, X.; Goldstein, L. E.; Moir, R. D.; Lim, J. T.; Beyreuther, K.; Zheng, H.; Tanzi, R. E.; Masters, C. L. und Bush, A. I. (2001): Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice, *Neuron* 30 [3], Seite 665-76.
- Chou, K. C. und Howe, W. J. (2002): Prediction of the tertiary structure of the beta-secretase zymogen, *Biochem Biophys Res Commun* 292 [3], Seite 702-8.
- Christensen, M. A.; Zhou, W.; Qing, H.; Lehman, A.; Philipsen, S. und Song, W. (2004): Transcriptional regulation of BACE1, the beta-amyloid precursor protein beta-secretase, by Sp1, *Mol Cell Biol* 24 [2], Seite 865-74.
- Chyung, A. S.; Greenberg, B. D.; Cook, D. G.; Doms, R. W. und Lee, V. M. (1997): Novel beta-secretase cleavage of beta-amyloid precursor protein in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells, *J Cell Biol* 138 [3], Seite 671-80.
- Chyung, J. H. und Selkoe, D. J. (2003): Inhibition of receptor-mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid beta-protein at the cell surface, *J Biol Chem* 278 [51], Seite 51035-43.
- Citron, M.; Oltersdorf, T.; Haass, C.; McConlogue, L.; Hung, A. Y.; Seubert, P.; Vigo-Pelfrey, C.; Lieberburg, I. und Selkoe, D. J. (1992): Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production, *Nature* 360 [6405], Seite 672-4.
- Citron, M.; Teplow, D.B. und Selkoe, D.J. (1995): Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific., *Neuron* 14 [3], Seite 661-670.
- Citron, M.; Diehl, T. S.; Capell, A.; Haass, C.; Teplow, D. B. und Selkoe, D. J. (1996): Inhibition of amyloid beta-protein production in neural cells by the serine protease inhibitor AEBSF, *Neuron* 17 [1], Seite 171-9.

- 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. und Selkoe, D. J. (1997): Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42- residue amyloid β -protein in both transfected cells and transgenic mice, *Nat Med* 3 [1], Seite 67-72.
- Citron, M. (2004a): Strategies for disease modification in Alzheimer's disease, *Nat Rev Neurosci* 5 [9], Seite 677-85.
- Citron, M. (2004b): Beta-secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease--promise and challenge, *Trends Pharmacol Sci* 25 [2], Seite 92-7.
- Cook, D. G.; Forman, M. S.; Sung, J. C.; Leight, S.; Kolson, D. L.; Iwatsubo, T.; Lee, V. M. und Doms, R. W. (1997): Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells, *Nat Med* 3 [9], Seite 1021-3.
- Corder, E. H.; Saunders, A. M.; Risch, N. J.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D. E.; Gaskell, P. C., Jr.; Rimmler, J. B.; Locke, P. A.; Conneally, P. M.; Schmechel, K. E. und et al. (1994): Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease, *Nat Genet* 7 [2], Seite 180-4.
- Creemers, J. W.; Ines Dominguez, D.; Plets, E.; Serneels, L.; Taylor, N. A.; Multhaup, G.; Craessaerts, K.; Annaert, W. und De Strooper, B. (2001): Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family, *J Biol Chem* 276 [6], Seite 4211-7.
- Crowther, R. A. und Goedert, M. (2000): Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases, *J Struct Biol* 130 [2-3], Seite 271-9.
- Cupers, P.; Bentahir, M.; Craessaerts, K.; Orleans, I.; Vanderstichele, H.; Saftig, P.; De Strooper, B. und Annaert, W. (2001): The discrepancy between presenilin subcellular localization and γ -secretase processing of amyloid precursor protein, *J. Cell Biol.* 154 [4], Seite 731-40.
- De Strooper, B.; Umans, L.; Van Leuven, F. und 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* 121 [2], Seite 295-304.
- De Strooper, B.; Craessaerts, K.; Dewachter, I.; Moechars, D.; Greenberg, B.; Van Leuven, F. und Van den Berghe, H. (1995a): Basolateral secretion of amyloid precursor protein in Madin-Darby canine kidney cells is disturbed by alterations of intracellular pH and by introducing a mutation associated with familial Alzheimer's disease, *J Biol Chem* 270 [8], Seite 4058-65.
- De Strooper, B.; Simons, M.; Multhaup, G.; Van Leuven, F.; Beyreuther, K. und Dotti, C. G. (1995b): Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence, *Embo J* 14 [20], Seite 4932-8.
- De Strooper, B.; Beullens, M.; Contreras, B.; Levesque, L.; Craessaerts, K.; Cordell, B.; Moechars, D.; Bollen, M.; Fraser, P.; George-Hyslop, P. S. und Van Leuven, F. (1997): Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins, *J Biol Chem* 272 [6], Seite 3590-8.
- De Strooper, B.; Saftig, P.; Craessaerts, K.; Vanderstichele, H.; Guhde, G.; Annaert, W.; Von Figura, K. und Van Leuven, F. (1998): Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein, *Nature* 391 [6665], Seite 387-90.
- De Strooper, B.; Annaert, W.; Cupers, P.; Saftig, P.; Craessaerts, K.; Mumm, J. S.; Schroeter, E. H.; Schrijvers, V.; Wolfe, M. S.; Ray, W. J.; Goate, A. und Kopan, R. (1999): A presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain, *Nature* 398 [6727], Seite 518-22.

- De Strooper, B. und Annaert, W. (2000): Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein, *J Cell Sci* 113 (Pt 11), Seite 1857-70.
- De Strooper, B. (2003): Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex, *Neuron* 38 [1], Seite 9-12.
- DeKosky, S. T. und Marek, K. (2003): Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders, *Science* 302 [5646], Seite 830-4.
- Demetriades, A. K. (2002): Functional neuroimaging in Alzheimer's type dementia, *J Neurol Sci* 203-204, Seite 247-51.
- Dickson, D. W. (1997): The pathogenesis of senile plaques, *J Neuropathol Exp Neurol* 56 [4], Seite 321-39.
- Dingwall, C. (2001): Spotlight on BACE: the secretases as targets for treatment in Alzheimer disease, *J Clin Invest* 108 [9], Seite 1243-6.
- Dinter, A. und Berger, E. G. (1998): Golgi-disturbing agents, *Histochem Cell Biol* 109 [5-6], Seite 571-90.
- 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. und Sisodia, S. S. (1996): Protein topology of presenilin 1, *Neuron* 17 [5], Seite 1023-30.
- Dodart, J. C.; Bales, K. R.; Gannon, K. S.; Greene, S. J.; DeMattos, R. B.; Mathis, C.; DeLong, C. A.; Wu, S.; Wu, X.; Holtzman, D. M. und Paul, S. M. (2002): Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model, *Nat Neurosci* 5 [5], Seite 452-7.
- Dotti, C. G. und Simons, K. (1990): Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture, *Cell* 62 [1], Seite 63-72.
- 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. und Younkin, S. (1996): Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1, *Nature* 383 [6602], Seite 710-3.
- Dunn, B. M. (2002): Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases, *Chem Rev* 102 [12], Seite 4431-58.
- Ebinu, J. O. und Yankner, B. A. (2002): A RIP tide in neuronal signal transduction, *Neuron* 34 [4], Seite 499-502.
- Edbauer, D.; Willem, M.; Lammich, S.; Steiner, H. und Haass, C. (2002a): Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD), *J Biol Chem* 277 [16], Seite 13389-93.
- Edbauer, D.; Winkler, E.; Haass, C. und Steiner, H. (2002b): Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid β -peptide production via complex formation, *Proc Natl Acad Sci USA* 99 [13], Seite 8666-71.
- Edbauer, D.; Winkler, E.; Regula, J. T.; Pesold, B.; Steiner, H. und Haass, C. (2003): Reconstitution of gamma-secretase activity, *Nat Cell Biol* 5 [5], Seite 486-8.
- Eehalt, R.; Keller, P.; Haass, C.; Thiele, C. und Simons, K. (2003): Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts, *J Cell Biol* 160 [1], Seite 113-23.
- Ermolieff, J.; Loy, J. A.; Koelsch, G. und Tang, J. (2000): Proteolytic activation of recombinant pro-memapsin 2 (pro-beta-secretase) studied with new fluorogenic substrates, *Biochemistry* 39 [40], Seite 12450-6.
- Esch, F. S.; Keim, P. S.; Beattie, E. C.; Blacher, R. W.; Culwell, A. R.; Oltersdorf, T.; McClure, D. und Ward, P. J. (1990): Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor, *Science* 248 [4959], Seite 1122-4.
- Esler, W. P. und Wolfe, M. S. (2001): A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces, *Science* 293 [5534], Seite 1449-54.

- 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. und Wolfe, M.S. (2000): Transition-state analogue inhibitors of γ -secretase bind directly to presenilin-1, *Nat Cell Biol* 2, Seite 428-433.
- Esteban, J. A. (2004): Living with the enemy: a physiological role for the beta-amyloid peptide, *Trends Neurosci* 27 [1], Seite 1-3.
- Farzan, M.; Schnitzler, C. E.; Vasilieva, N.; Leung, D. und Choe, H. (2000): BACE2, a beta - secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein, *Proc Natl Acad Sci USA* 97 [17], Seite 9712-7.
- Fluhrer, R.; Capell, A.; Westmeyer, G.; Willem, M.; Hartung, B.; Condron, M. M.; Teplow, D. B.; Haass, C. und Walter, J. (2002): A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway, *J Neurochem* 81 [5], Seite 1011-20.
- Fox, N. C.; Crum, W. R.; Scahill, R. I.; Stevens, J. M.; Janssen, J. C. und Rossor, M. N. (2001): Imaging of onset and progression of Alzheimer's disease with voxel-compression mapping of serial magnetic resonance images, *Lancet* 358 [9277], Seite 201-5.
- Fraering, P. C.; Ye, W.; Strub, J. M.; Dolios, G.; LaVoie, M. J.; Ostaszewski, B. L.; van Dorselaer, A.; Wang, R.; Selkoe, D. J. und Wolfe, M. S. (2004): Purification and characterization of the human gamma-secretase complex, *Biochemistry* 43 [30], Seite 9774-89.
- Francis, R.; McGrath, G.; Zhang, J.; Ruddy, D. A.; Sym, M.; Apfeld, J.; Nicoll, M.; Maxwell, M.; Hai, B.; Ellis, M. C.; Parks, A. L.; Xu, W.; Li, J.; Gurney, M.; Myers, R. L.; Himes, C. S.; Hiebsch, R.D.; Ruble, C.; Nye, J. S. und Curtis, D. (2002): aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP, and presenilin protein accumulation, *Dev Cell* 3 [1], Seite 85-97.
- Fraser, M. E.; Strynadka, N. C.; Bartlett, P. A.; Hanson, J. E. und James, M. N. (1992): Crystallographic analysis of transition-state mimics bound to penicillopepsin: phosphorus-containing peptide analogues, *Biochemistry* 31 [22], Seite 5201-14.
- Friedhoff, P.; von Bergen, M.; Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E. (2000): Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments, *Biochim Biophys Acta* 1502 [1], Seite 122-32.
- Fukumoto, H.; Cheung, B. S.; Hyman, B. T. und Irizarry, M. C. (2002): beta-Secretase Protein and Activity Are Increased in the Neocortex in Alzheimer Disease, *Arch Neurol* 59 [9], Seite 1381-9.
- Fullekrug, J. und Simons, K. (2004): Lipid rafts and apical membrane traffic, *Ann N Y Acad Sci* 1014, Seite 164-9.
- Gan, Y.; McGraw, T. E. und Rodriguez-Boulan, E. (2002): The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane, *Nat Cell Biol* 4 [8], Seite 605-9.
- Gandy, S. E.; Caporaso, G. L.; Buxbaum, J. D.; de Cruz Silva, O.; Iverfeldt, K.; Nordstedt, C.; Suzuki, T.; Czernik, A. J.; Nairn, A. C. und Greengard, P. (1993): Protein phosphorylation regulates relative utilization of processing pathways for Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein, *Ann N Y Acad Sci* 695, Seite 117-21.
- Garten, W.; Hallenberger, S.; Ortmann, D.; Schafer, W.; Vey, M.; Angliker, H.; Shaw, E. und Klenk, H. D. (1994): Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones, *Biochimie* 76 [3-4], Seite 217-25.
- Ge, Y. W.; Maloney, B.; Sambamurti, K. und Lahiri, D. K. (2004): Functional characterization of the 5' flanking region of the BACE gene: identification of a 91 bp fragment involved in basal level of BACE promoter expression, *Faseb J* 18 [9], Seite 1037-9.
- Georgakopoulos, A.; Marambaud, P.; Efthimiopoulos, S.; Shioi, J.; Cui, W.; Li, H. C.; Schutte, M.; Gordon, R.; Holstein, G. R.; Martinelli, G.; Mehta, P.; Friedrich, V. L., Jr. und Robakis, N. K. (1999): Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell

- adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts, *Mol. Cell* 4 [6], Seite 893-902.
- Gervais, F. G.; Xu, D.; Robertson, G. S.; Vaillancourt, J. P.; Zhu, Y.; Huang, J.; LeBlanc, A.; Smith, D.; Rigby, M.; Shearman, M. S.; Clarke, E. E.; Zheng, H.; Van Der Ploeg, L. H.; Ruffolo, S. C.; Thornberry, N. A.; Xanthoudakis, S.; Zamboni, R. J.; Roy, S. und Nicholson, D. W. (1999): Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation, *Cell* 97 [3], Seite 395-406.
- Ghosh, A. K.; Bilcer, G.; Harwood, C.; Kawahama, R.; Shin, D.; Hussain, K. A.; Hong, L.; Loy, J. A.; Nguyen, C.; Koelsch, G.; Ermolieff, J. und Tang, J. (2001): Structure-based design: potent inhibitors of human brain memapsin 2 (beta-secretase), *J Med Chem* 44 [18], Seite 2865-8.
- Ghosh, A. K.; Hong, L. und Tang, J. (2002): beta-Secretase as a Therapeutic Target for Inhibitor Drugs, *Curr Med Chem* 9 [11], Seite 1135-44.
- Glabe, C. (2001): Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease, *J Mol Neurosci* 17 [2], Seite 137-45.
- Glenner, G. G. und 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 [3], Seite 885-90.
- Goate, A.; Chartier-Harlin, M. C.; Mullan, M.; Brown, J.; Crawford, F.; Fidani, L.; Giuffra, L.; Haynes, A.; Irving, N.; James, L. und et al. (1991): Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease, *Nature* 349 [6311], Seite 704-6.
- Goedert, M.; Jakes, R.; Spillantini, M. G.; Hasegawa, M.; Smith, M. J. und Crowther, R. A. (1996): Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans, *Nature* 383 [6600], Seite 550-3.
- Golde, T. E.; Estus, S.; Younkin, L. H.; Selkoe, D. J. und Younkin, S. G. (1992): Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives, *Science* 255 [5045], Seite 728-30.
- Gottlieb, T. A.; Beaudry, G.; Rizzolo, L.; Colman, A.; Rindler, M.; Adesnik, M. und Sabatini, D. D. (1986): Secretion of endogenous and exogenous proteins from polarized MDCK cell monolayers, *Proc Natl Acad Sci USA* 83 [7], Seite 2100-4.
- Gotz, J.; Chen, F.; van Dorpe, J. und Nitsch, R. M. (2001): Formation of neurofibrillary tangles in P301l tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils, *Science* 293 [5534], Seite 1491-5.
- Gouras, G. K.; Xu, H.; Jovanovic, J. N.; Buxbaum, J. D.; Wang, R.; Greengard, P.; Relkin, N. R. und Gandy, S. (1998): Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons, *J Neurochem* 71 [5], Seite 1920-5.
- Goutte, C.; Tsunozaki, M.; Hale, V. A. und Priess, J. R. (2002a): APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos, *Proc Natl Acad Sci USA* 99 [2], Seite 775-779.
- Goutte, C. (2002b): Genetics leads the way to the accomplices of presenilins, *Dev Cell* 3 [1], Seite 6-7.
- Green, N. M.; Konieczny, L.; Toms, E. J. und Valentine, R. C. (1971): The use of bifunctional biotinyl compounds to determine the arrangement of subunits in avidin, *Biochem J* 125 [3], Seite 781-91.
- Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Tung, Y. C.; Quinlan, M.; Wisniewski, H. M. und Binder, L. I. (1986): Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proc Natl Acad Sci USA* 83 [13], Seite 4913-7.
- Gruninger-Leitch, F.; Schlatter, D.; Kung, E.; Nelbock, P. und Dobeli, H. (2002): Substrate and inhibitor profile of BACE (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases, *J Biol Chem* 277 [7], Seite 4687-93.

- Haass, C.; Koo, E. H.; Mellon, A.; Hung, A. Y. und Selkoe, D. J. (1992a): Targeting of cell-surface β -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments, *Nature* 357 [6378], Seite 500-3.
- 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. und et al. (1992b): Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism, *Nature* 359 [6393], Seite 322-5.
- Haass, C. und Selkoe, D. J. (1993): Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide, *Cell* 75 [6], Seite 1039-42.
- Haass, C.; Hung, A. Y.; Schlossmacher, M. G.; Teplow, D. B. und Selkoe, D. J. (1993a): beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms, *J Biol Chem* 268 [5], Seite 3021-4.
- Haass, C.; Hung, A. Y.; Schlossmacher, M. G.; Oltersdorf, T.; Teplow, D. B. und Selkoe, D. J. (1993b): Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules, *Ann N Y Acad Sci* 695, Seite 109-16.
- Haass, C.; Koo, E. H.; Teplow, D. B. und Selkoe, D. J. (1994a): Polarized secretion of beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in MDCK cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 91 [4], Seite 1564-8.
- Haass, C.; Hung, A. Y.; Selkoe, D. J. und Teplow, D. B. (1994b): Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor, *J Biol Chem* 269 [26], Seite 17741-8.
- Haass, C.; Lemere, C. A.; Capell, A.; Citron, M.; Seubert, P.; Schenk, D.; Lannfelt, L. und Selkoe, D. J. (1995a): The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway, *Nat Med* 1 [12], Seite 1291-6.
- Haass, C.; Capell, A.; Citron, M.; Teplow, D. B. und Selkoe, D. J. (1995b): The vacuolar H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 differentially affects proteolytic processing of mutant and wild-type beta-amyloid precursor protein, *J Biol Chem* 270 [11], Seite 6186-92.
- Haass, C.; Koo, E. H.; Capell, A.; Teplow, D. B. und 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 [4], Seite 537-47.
- Haass, C. und Steiner, H. (2002): Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases, *Trends Cell Biol* 12 [12], Seite 556-62.
- Haass, C. (2004): Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation, *Embo J* 23 [3], Seite 483-8.
- Hadland, B.; Manley, N.; Su, D. M.; Longmore, G.; Moore, C.; Wolfe, M.; Schroeter, E. und Kopan, R. (2001): γ -Secretase inhibitors repress thymocyte development, *Proc Natl Acad Sci USA* 98, Seite 7487-7491.
- Hallenberger, S.; Bosch, V.; Angliker, H.; Shaw, E.; Klenk, H. D. und Garten, W. (1992): Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160, *Nature* 360 [6402], Seite 358-61.
- Hempel, H.; Mitchell, A.; Blennow, K.; Frank, R. A.; Brettschneider, S.; Weller, L. und Moller, H. J. (2004): Core biological marker candidates of Alzheimer's disease - perspectives for diagnosis, prediction of outcome and reflection of biological activity, *J Neural Transm* 111 [3], Seite 247-72.
- Haniu, M.; Denis, P.; Young, Y.; Mendiaz, E. A.; Fuller, J.; Hui, J. O.; Bennett, B. D.; Kahn, S.; Ross, S.; Burgess, T.; Katta, V.; Rogers, G.; Vassar, R. und Citron, M. (2000): Characterization of Alzheimer's beta-secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties, *J Biol Chem* 275 [28], Seite 21099-106.
- Hardy, J. und Allsop, D. (1991): Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease, *Trends Pharmacol Sci* 12 [10], Seite 383-8.

- Hardy, J. (1997a): The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis?, *Proc Natl Acad Sci USA* 94 [6], Seite 2095-7.
- Hardy, J. (1997b): Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease [see comments], *Trends Neurosci* 20 [4], Seite 154-9.
- Hardy, J.; Duff, K.; Hardy, K. G.; Perez-Tur, J. und Hutton, M. (1998): Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau, *Nat Neurosci* 1 [5], Seite 355-8.
- Hardy, J. und Selkoe, D. J. (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science* 297 [5580], Seite 353-6.
- Harris, B. Z. und Lim, W. A. (2001): Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly, *J Cell Sci* 114 [Pt 18], Seite 3219-31.
- Harrison, T. M.; Chidgey, M. A.; Brammar, W. J. und Adams, G. J. (1989): The pro-peptide is not necessary for active renin secretion from transfected mammalian cells, *Proteins* 5 [4], Seite 259-65.
- Hartmann, T.; Bieger, S. C.; Bruhl, B.; Tienari, P. J.; Ida, N.; Allsop, D.; Roberts, G. W.; Masters, C. L.; Dotti, C. G.; Unsicker, K. und Beyreuther, K. (1997): Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides, *Nat Med* 3 [9], Seite 1016-20.
- Hartmann, D.; de Strooper, B.; Serneels, L.; Craessaerts, K.; Herreman, A.; Annaert, W.; Umans, L.; Lubke, T.; Lena Illert, A.; von Figura, K. und Saftig, P. (2002): The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts, *Hum Mol Genet* 11 [21], Seite 2615-24.
- Hatsuzawa, K.; Nagahama, M.; Takahashi, S.; Takada, K.; Murakami, K. und Nakayama, K. (1992): Purification and characterization of furin, a Kex2-like processing endoprotease, produced in Chinese hamster ovary cells, *J Biol Chem* 267 [23], Seite 16094-9.
- Hayashi, I.; Urano, Y.; Fukuda, R.; Isoo, N.; Kodama, T.; Hamakubo, T.; Tomita, T. und Iwatsubo, T. (2004): Selective reconstitution and recovery of functional gamma-secretase complex on budded baculovirus particles, *J Biol Chem* 279 [36], Seite 38040-6.
- He, X.; Chang, W. P.; Koelsch, G. und Tang, J. (2002): Memapsin 2 (beta-secretase) cytosolic domain binds to the VHS domains of GGA1 and GGA2: implications on the endocytosis mechanism of memapsin 2, *FEBS Lett* 524 [1-3], Seite 183-7.
- Heber, S.; Herms, J.; Gajic, V.; Hainfellner, J.; Aguzzi, A.; Rulicke, T.; von Kretschmar, H.; von Koch, C.; Sisodia, S.; Tremml, P.; Lipp, H. P.; Wolfer, D. P. und Muller, U. (2000): Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members, *J Neurosci* 20 [21], Seite 7951-63.
- Helenius, A. (1994): How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum, *Mol Biol Cell* 5 [3], Seite 253-65.
- Helenius, A. und Aebi, M. (2001): Intracellular functions of N-linked glycans, *Science* 291 [5512], Seite 2364-9.
- Hendrie, H. C.; Ogunniyi, A.; Hall, K. S.; Baiyewu, O.; Unverzagt, F. W.; Gureje, O.; Gao, S.; Evans, R. M.; Ogunseyinde, A. O.; Adeyinka, A. O.; Musick, B. und Hui, S. L. (2001): Incidence of dementia and Alzheimer disease in 2 communities: Yoruba residing in Ibadan, Nigeria, and African Americans residing in Indianapolis, Indiana, *Jama* 285 [6], Seite 739-47.
- 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. und et al. (1992): Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene, *Nat Genet* 1 [3], Seite 218-21.

- Hendriks, L. und Van Broeckhoven, C. (1996): A beta A4 amyloid precursor protein gene and Alzheimer's disease, *Eur J Biochem* 237 [1], Seite 6-15.
- Herreman, A.; Hartmann, D.; Annaert, W.; Saffig, P.; Craessaerts, K.; Serneels, L.; Umans, L.; Schrijvers, V.; Checler, F.; Vanderstichele, H.; Baekelandt, V.; Dressel, R.; Cupers, P.; Huylebroeck, D.; Zwijsen, A.; Van Leuven, F. und 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 [21], Seite 11872-7.
- Herreman, A.; Serneels, L.; Annaert, W.; Collen, D.; Schoonjans, L. und De Strooper, B. (2000): Total inactivation of γ -secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells, *Nat. Cell Biol.* 2, Seite 461-2.
- Herreman, A.; Van Gassen, G.; Bentahir, M.; Nyabi, O.; Craessaerts, K.; Mueller, U.; Annaert, W. und De Strooper, B. (2003): gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation, *J Cell Sci* 116 [Pt 6], Seite 1127-36.
- Holsinger, R. M.; McLean, C. A.; Beyreuther, K.; Masters, C. L. und Evin, G. (2002): Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease, *Ann Neurol* 51 [6], Seite 783-6.
- Hong, L.; Koelsch, G.; Lin, X.; Wu, S.; Terzyan, S.; Ghosh, A. K.; Zhang, X. C. und Tang, J. (2000): Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor, *Science* 290 [5489], Seite 150-3.
- Hong, L.; Turner, R. T., 3rd; Koelsch, G.; Ghosh, A. K. und Tang, J. (2002): Memapsin 2 (beta-secretase) as a therapeutic target, *Biochem Soc Trans* 30 [4], Seite 530-4.
- Hosaka, M.; Nagahama, M.; Kim, W. S.; Watanabe, T.; Hatsuzawa, K.; Ikemizu, J.; Murakami, K. und Nakayama, K. (1991): Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway, *J Biol Chem* 266 [19], Seite 12127-30.
- Hu, Y. und Fortini, M. E. (2003): Different cofactor activities in gamma-secretase assembly: evidence for a nicastrin-Aph-1 subcomplex, *J Cell Biol* 161 [4], Seite 685-90.
- Hung, A. Y.; Haass, C.; Nitsch, R. M.; Qiu, W. Q.; Citron, M.; Wurtman, R. J.; Growdon, J. H. und Selkoe, D. J. (1993): Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein, *J Biol Chem* 268 [31], Seite 22959-62.
- Hung, A. Y. und Selkoe, D. J. (1994): Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein, *Embo J* 13 [3], Seite 534-42.
- Huse, J. T.; Pijak, D. S.; Leslie, G. J.; Lee, V. M. und Doms, R. W. (2000): Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase, *J Biol Chem* 275 [43], Seite 33729-37.
- Huse, J. T. und Doms, R. W. (2001): Neurotoxic traffic: uncovering the mechanics of amyloid production in Alzheimer's disease, *Traffic* 2 [2], Seite 75-81.
- Huse, J. T.; Liu, K.; Pijak, D. S.; Carlin, D.; Lee, V. M. und Doms, R. W. (2002): Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain, *J Biol Chem* 277 [18], Seite 16278-84.
- 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. und Christie, G. (1999): Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase, *Mol Cell Neurosci* 14 [6], Seite 419-27.
- Hussain, I.; Hawkins, J.; Shikotra, A.; Riddell, D. R.; Faller, A. und Dingwall, C. (2003): Characterization of the ectodomain shedding of the beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1), *J Biol Chem* 278 [38], Seite 36264-8.
- Hutton, M.; Lendon, C. L.; 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.; Joosse, M.; Kwon, J. M.; Nowotny, P.; Heutink, P. und et al. (1998): Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17, *Nature* 393 [6686], Seite 702-5.
- Hyman, B. T. und Tanzi, R. (1995): Molecular epidemiology of Alzheimer's disease, *N Engl J Med* 333 [19], Seite 1283-4.
- Ikin, A. F.; Annaert, W. G.; Takei, K.; De Camilli, P.; Jahn, R.; Greengard, P. und Buxbaum, J. D. (1996): Alzheimer amyloid protein precursor is localized in nerve terminal preparations to Rab5-containing vesicular organelles distinct from those implicated in the synaptic vesicle pathway, *J Biol Chem* 271 [50], Seite 31783-6.
- Iwatsubo, T.; Odaka, A.; Suzuki, N.; Mizusawa, H.; Nukina, N. und Ihara, Y. (1994): Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43), *Neuron* 13 [1], Seite 45-53.
- Jacob, R. und Naim, H. Y. (2001): Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers, *Curr Biol* 11 [18], Seite 1444-50.
- James, M. N.; Sielecki, A.; Salituro, F.; Rich, D. H. und Hofmann, T. (1982): Conformational flexibility in the active sites of aspartyl proteinases revealed by a pepstatin fragment binding to penicillopepsin, *Proc Natl Acad Sci USA* 79 [20], Seite 6137-41.
- Janus, C.; Pearson, J.; McLaurin, J.; Mathews, P. M.; Jiang, Y.; Schmidt, S. D.; Chishti, M. A.; Horne, P.; Heslin, D.; French, J.; Mount, H. T.; Nixon, R. A.; Mercken, M.; Bergeron, C.; Fraser, P. E.; St George-Hyslop, P. und Westaway, D. (2000): A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease, *Nature* 408 [6815], Seite 979-82.
- Jarrett, J. T.; Berger, E. P. und Lansbury, P. T., Jr. (1993): The carboxy terminus of the β -amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Biochemistry* 32 [18], Seite 4693-7.
- Jean, F.; Boudreault, A.; Basak, A.; Seidah, N. G. und Lazure, C. (1995): Fluorescent peptidyl substrates as an aid in studying the substrate specificity of human prohormone convertase PC1 and human furin and designing a potent irreversible inhibitor, *J Biol Chem* 270 [33], Seite 19225-31.
- Jean, F.; Stella, K.; Thomas, L.; Liu, G.; Xiang, Y.; Reason, A. J. und Thomas, G. (1998): alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent, *Proc Natl Acad Sci USA* 95 [13], Seite 7293-8.
- Joachim, C. L. und Selkoe, D. J. (1992): The seminal role of beta-amyloid in the pathogenesis of Alzheimer disease, *Alzheimer Dis Assoc Disord* 6 [1], Seite 7-34.
- Jones, B. G.; Thomas, L.; Molloy, S. S.; Thulin, C. D.; Fry, M. D.; Walsh, K. A. und Thomas, G. (1995): Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail, *Embo J* 14 [23], Seite 5869-83.
- Kaether, C.; Skehel, P. und Dotti, C. G. (2000): Axonal membrane proteins are transported in distinct carriers: a two-color video microscopy study in cultured hippocampal neurons, *Mol Biol Cell* 11 [4], Seite 1213-24.
- Kaether, C.; Lammich, S.; Edbauer, D.; Ertl, M.; Rietdorf, J.; Capell, A.; Steiner, H. und Haass, C. (2002): Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane, *J Cell Biol* 158 [3], Seite 551-61.
- Kamal, A.; Stokin, G. B.; Yang, Z.; Xia, C. H. und Goldstein, L. S. (2000): Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I, *Neuron* 28 [2], Seite 449-59.
- Kamal, A.; Almenar-Queralt, A.; LeBlanc, J. F.; Roberts, E. A. und Goldstein, L. S. (2001): Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP, *Nature* 414 [6864], Seite 643-8.

- Kamenetz, F.; Tomita, T.; Hsieh, H.; Seabrook, G.; Borchelt, D.; Iwatsubo, T.; Sisodia, S. und Malinow, R. (2003): APP processing and synaptic function, *Neuron* 37 [6], Seite 925-37.
- Kang, J.; Lemaire, H. G.; Unterbeck, A.; Salbaum, J. M.; Masters, C. L.; Grzeschik, K. H.; Multhaup, G.; Beyreuther, K. und Muller-Hill, B. (1987): The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor, *Nature* 325 [6106], Seite 733-6.
- Kim, D. Y.; Ingano, L. A. und Kovacs, D. M. (2002): Nectin-1alpha, an immunoglobulin-like receptor involved in the formation of synapses, is a substrate for presenilin/gamma-secretase-like cleavage, *J Biol Chem* 277 [51], Seite 49976-81.
- Kimberly, W. T.; Xia, W.; Rahmati, T.; Wolfe, M. S. und Selkoe, D. J. (2000): The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for γ -secretase activity and amyloid β -protein generation, *J Biol Chem* 275 [5], Seite 3173-8.
- Kimberly, W. T.; Zheng, J. B.; Guenette, S. Y. und Selkoe, D. J. (2001): The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner, *J Biol Chem* 276 [43], Seite 40288-92.
- Kimberly, W. T.; LaVoie, M. J.; Ostaszewski, B. L.; Ye, W.; Wolfe, M. S. und Selkoe, D. J. (2003): Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2, *Proc Natl Acad Sci USA* 100 [11], Seite 6382-7.
- Kinoshita, A.; Fukumoto, H.; Shah, T.; Whelan, C. M.; Irizarry, M. C. und Hyman, B. T. (2003): Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes, *J Cell Sci* 116 [Pt 16], Seite 3339-46.
- Kitaguchi, N.; Takahashi, Y.; Tokushima, Y.; Shiojiri, S. und Ito, H. (1988): Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity, *Nature* 331 [6156], Seite 530-2.
- Kitazume, S.; Tachida, Y.; Oka, R.; Shirotani, K.; Saido, T. C. und Hashimoto, Y. (2001): Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase, *Proc Natl Acad Sci USA* 98 [24], Seite 13554-9.
- Klausner, R. D.; Donaldson, J. G. und Lippincott-Schwartz, J. (1992): Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure, *J Cell Biol* 116 [5], Seite 1071-80.
- Klenk, H. D.; Garten, W. und Rott, R. (1984): Inhibition of proteolytic cleavage of the hemagglutinin of influenza virus by the calcium-specific ionophore A23187, *Embo J* 3 [12], Seite 2911-5.
- Knops, J.; Suomensaari, S.; Lee, M.; McConlogue, L.; Seubert, P. und Sinha, S. (1995): Cell-type and amyloid precursor protein-type specific inhibition of A beta release by bafilomycin A1, a selective inhibitor of vacuolar ATPases, *J Biol Chem* 270 [6], Seite 2419-22.
- Koelsch, G.; Mares, M.; Metcalf, P. und Fusek, M. (1994): Multiple functions of pro-parts of aspartic proteinase zymogens, *FEBS Lett* 343 [1], Seite 6-10.
- Koike, H.; Tomioka, S.; Sorimachi, H.; Saido, T. C.; Maruyama, K.; Okuyama, A.; Fujisawa-Sehara, A.; Ohno, S.; Suzuki, K. und Ishiura, S. (1999): Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an α -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein, *Biochem J* 343, Seite 371-375.
- Koo, E. H.; Sisodia, S. S.; Archer, D. R.; Martin, L. J.; Weidemann, A.; Beyreuther, K.; Fischer, P.; Masters, C. L. und Price, D. L. (1990): Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport, *Proc Natl Acad Sci USA* 87 [4], Seite 1561-5.
- Koo, E. H. und Squazzo, S. L. (1994): Evidence that production and release of amyloid β -protein involves the endocytic pathway, *J Biol Chem* 269 [26], Seite 17386-9.

- Koo, E. H.; Squazzo, S. L.; Selkoe, D. J. und Koo, C. H. (1996): Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody, *J Cell Sci* 109 [Pt 5], Seite 991-8.
- Koo, E. H. (2002): The beta-amyloid precursor protein (APP) and Alzheimer's disease: does the tail wag the dog?, *Traffic* 3 [11], Seite 763-70.
- Kopan, R. und Goate, A. (2000): A common enzyme connects notch signaling and Alzheimer's disease, *Genes Dev* 14 [22], Seite 2799-806.
- Kopan, R. und Goate, A. (2002): Aph-2/Nicastrin: an essential component of γ -secretase and regulator of Notch signaling and Presenilin localization, *Neuron* 33 [3], Seite 321-4.
- Kopan, R. und Ilagan, M. X. (2004): Gamma-secretase: proteasome of the membrane?, *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 [6], Seite 499-504.
- Kreitzer, G.; Schmoranzer, J.; Low, S. H.; Li, X.; Gan, Y.; Weimbs, T.; Simon, S. M. und Rodriguez-Boulan, E. (2003): Three-dimensional analysis of post-Golgi carrier exocytosis in epithelial cells, *Nat Cell Biol* 5 [2], Seite 126-36.
- Krysan, D. J.; Rockwell, N. C. und Fuller, R. S. (1999): Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides, *J Biol Chem* 274 [33], Seite 23229-34.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [259], Seite 680-5.
- Lai, A.; Sisodia, S. S. und Trowbridge, I. S. (1995): Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain, *J Biol Chem* 270 [8], Seite 3565-73.
- Lai, E. C. (2002): Notch cleavage: Nicastrin helps Presenilin make the final cut, *Curr Biol* 12 [6], Seite R200-2.
- Lammich, S.; Kojro, E.; Postina, R.; Gilbert, S.; Pfeiffer, R.; Jasionowski, M.; Haass, C. und Fahrenholz, F. (1999): Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 [7], Seite 3922-7.
- Lammich, S.; Okochi, M.; Takeda, M.; Kaether, C.; Capell, A.; Zimmer, A.-K.; Edbauer, D.; Walter, J.; Steiner, H. und Haass, C. (2002): Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an A β -like peptide, *J Biol Chem* 277 [47], Seite 44754-9.
- Lammich, S.; Schobel, S.; Zimmer, A. K.; Lichtenthaler, S. F. und Haass, C. (2004): Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region, *Embo Rep* 5 [6], Seite 620-5.
- Lapatto, R.; Blundell, T.; Hemmings, A.; Overington, J.; Wilderspin, A.; Wood, S.; Merson, J. R.; Whittle, P. J.; Danley, D. E.; Geoghegan, K. F. und et al. (1989): X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes, *Nature* 342 [6247], Seite 299-302.
- LaPointe, C. F. und Taylor, R. K. (2000): The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases, *J Biol Chem* 275 [2], Seite 1502-10.
- LaVoie, M. J.; Fraering, P. C.; Ostaszewski, B. L.; Ye, W.; Kimberly, W. T.; Wolfe, M. S. und Selkoe, D. J. (2003): Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin, *J Biol Chem* 278 [39], Seite 37213-22.
- LaVoie, M. J. und Selkoe, D. J. (2003): The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments, *J Biol Chem* 278 [36], Seite 34427-37.
- Leavitt, R.; Schlesinger, S. und Kornfeld, S. (1977): Tunicamycin inhibits glycosylation and multiplication of Sindbis and vesicular stomatitis viruses, *J Virol* 21 [1], Seite 375-85.

- Lee, E. B.; Skovronsky, D. M.; Abtahian, F.; Doms, R. W. und Lee, V. M. (2003): Secretion and intracellular generation of truncated A β in beta-site amyloid-beta precursor protein-cleaving enzyme expressing human neurons, *J Biol Chem* 278 [7], Seite 4458-66.
- Lee, H. J.; Jung, K. M.; Huang, Y. Z.; Bennett, L. B.; Lee, J. S.; Mei, L. und Kim, T. W. (2002): Presenilin-dependent γ -secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4, *J Biol Chem* 277 [8], Seite 6318-23.
- Lee, J. Y.; Cole, T. B.; Palmiter, R. D.; Suh, S. W. und Koh, J. Y. (2002): Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci USA* 99 [11], Seite 7705-10.
- Lee, S. F.; Shah, S.; Li, H.; Yu, C.; Han, W. und Yu, G. (2002): Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin, and is required for intramembrane proteolysis of APP and Notch., *J Biol Chem* 279 [6], Seite 3555-63.
- Lee, V. M. und Trojanowski, J. Q. (1999): Neurodegenerative tauopathies: human disease and transgenic mouse models, *Neuron* 24 [3], Seite 507-10.
- Leem, J. Y.; Vijayan, S.; Han, P.; Cai, D.; Machura, M.; Lopes, K. O.; Veselits, M. L.; Xu, H. und Thinakaran, G. (2002): Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin, *J Biol Chem* 277 [21], Seite 19236-40.
- Lemere, C. A.; Blusztajn, J. K.; Yamaguchi, H.; Wisniewski, T.; Saido, T. C. und Selkoe, D. J. (1996): Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation, *Neurobiol Dis* 3 [1], Seite 16-32.
- Levy, E.; Carman, M. D.; Fernandez-Madrid, I. J.; Power, M. D.; Lieberburg, I.; van Duinen, S. G.; Bots, G. T.; Luyendijk, W. und Frangione, B. (1990): Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type, *Science* 248 [4959], Seite 1124-6.
- Levy-Lahad, E.; Wasco, W.; Poorkaj, P.; Romano, D. M.; Oshima, J.; Pettingell, W. H.; Yu, C. E.; Jondro, P. D.; Schmidt, S. D.; Wang, K. und et al. (1995a): Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus, *Science* 269 [5226], Seite 973-7.
- Levy-Lahad, E.; Wijsman, E. M.; Nemens, E.; Anderson, L.; Goddard, K. A.; Weber, J. L.; Bird, T. D. und Schellenberg, G. D. (1995b): A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1, *Science* 269 [5226], Seite 970-3.
- Lewis, J.; McGowan, E.; Rockwood, J.; Melrose, H.; Nacharaju, P.; Van Slegtenhorst, M.; Gwinn-Hardy, K.; Paul Murphy, M.; Baker, M.; Yu, X.; Duff, K.; Hardy, J.; Corral, A.; Lin, W. L.; Yen, S. H.; Dickson, D. W.; Davies, P. und Hutton, M. (2000): Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein, *Nat Genet* 25 [4], Seite 402-5.
- Li, J.; Ma, J. und Potter, H. (1995): Identification and expression analysis of a potential familial Alzheimer disease gene on chromosome 1 related to AD3, *Proc Natl Acad Sci USA* 92 [26], Seite 12180-4.
- Li, M.; Phylip, L. H.; Lees, W. E.; Winther, J. R.; Dunn, B. M.; Wlodawer, A.; Kay, J. und Gustchina, A. (2000): The aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae* folds its own inhibitor into a helix, *Nat Struct Biol* 7 [2], Seite 113-7.
- Li, Q. und Südhof, T. C. (2004): Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1, *J Biol Chem* 279 [11], Seite 10542-50.
- Li, X. und Greenwald, I. (1998): Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for *Caenorhabditis elegans* and human presenilins, *Proc Natl Acad Sci USA* 95 [12], Seite 7109-14.
- 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. und Gardell, S. J. (2000a): Presenilin 1 is linked with γ -secretase activity in the detergent solubilized state, *Proc Natl Acad Sci USA* 97 [11], Seite 6138-43.

- Li, Y. M.; Xu, M.; Lai, M. T.; Huang, Q.; Castro, J. L.; DiMuzio-Mower, J.; Harrison, T.; Lellis, C.; Nadin, A.; Neduvelli, J. G.; Register, R. B.; Sardana, M. K.; Shearman, M. S.; Smith, A. L.; Shi, X. P.; Yin, K. C.; Shafer, J. A. und Gardell, S. J. (2000b): Photoactivated γ -secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1, *Nature* 405, Seite 689-94.
- Lichtenthaler, S. F.; Beher, D.; Grimm, H. S.; Wang, R.; Shearman, M. S.; Masters, C. L. und Beyreuther, K. (2002): The intramembrane cleavage site of the amyloid precursor protein depends on the length of its transmembrane domain, *Proc Natl Acad Sci USA* 99 [3], Seite 1365-70.
- Lichtenthaler, S. F.; Dominguez, D. I.; Westmeyer, G. G.; Reiss, K.; Haass, C.; Saftig, P.; De Strooper, B. und Seed, B. (2003): The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1, *J Biol Chem* 278 [49], Seite 48713-9.
- Lichtenthaler, S. F. und Haass, C. (2004): Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model, *J Clin Invest* 113 [10], Seite 1384-7.
- Lin, X.; Koelsch, G.; Wu, S.; Downs, D.; Dashti, A. und Tang, J. (2000): Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein, *Proc Natl Acad Sci USA* 97 [4], Seite 1456-60.
- Linstedt, A. D. und Hauri, H. P. (1993): Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa, *Mol Biol Cell* 4 [7], Seite 679-93.
- Lippincott-Schwartz, J.; Yuan, L.; Tipper, C.; Amherdt, M.; Orci, L. und Klausner, R. D. (1991): Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic, *Cell* 67 [3], Seite 601-16.
- Liu, K.; Doms, R. W. und Lee, V. M. (2002): Glu11 site cleavage and N-terminally truncated A beta production upon BACE overexpression, *Biochemistry* 41 [9], Seite 3128-36.
- Lo, A. C.; Haass, C.; Wagner, S. L.; Teplow, D. B. und Sisodia, S. S. (1994): Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in Madin- Darby canine kidney cells, *J Biol Chem* 269 [49], Seite 30966-73.
- Lobo, A.; Launer, L. J.; Fratiglioni, L.; Andersen, K.; Di Carlo, A.; Breteler, M. M.; Copeland, J. R.; Dartigues, J. F.; Jagger, C.; Martinez-Lage, J.; Soininen, H. und Hofman, A. (2000): Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group, *Neurology* 54 [11 Suppl 5], Seite S4-9.
- Löffler, G. und Petrides, P. E. (2003): *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage. Auflage, Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Lopez-Perez, E.; Zhang, Y.; Frank, S. J.; Creemers, J.; Seidah, N. und Checler, F. (2001): Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10, *J Neurochem* 76 [5], Seite 1532-9.
- Lu, D. C.; Rabizadeh, S.; Chandra, S.; Shayya, R. F.; Ellerby, L. M.; Ye, X.; Salvesen, G. S.; Koo, E. H. und Bredesen, D. E. (2000): A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor, *Nat Med* 6 [4], Seite 397-404.
- Luo, W. J.; Wang, H.; Li, H.; Kim, B. S.; Shah, S.; Lee, H. J.; Thinakaran, G.; Kim, T. W.; Yu, G. und Xu, H. (2003): PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1, *J Biol Chem* 278 [10], Seite 7850-4.
- Luo, Y.; Bolon, B.; Kahn, S.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Denis, P.; Fan, W.; Kha, H.; Zhang, J.; Gong, Y.; Martin, L.; Louis, J. C.; Yan, Q.; Richards, W. G.; Citron, M. und Vassar, R. (2001): Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation, *Nat Neurosci* 4 [3], Seite 231-2.

- Machen, T. E.; Leigh, M. J.; Taylor, C.; Kimura, T.; Asano, S. und Moore, H. P. (2003): pH of TGN and recycling endosomes of H⁺/K⁺-ATPase-transfected HEK-293 cells: implications for pH regulation in the secretory pathway, *Am J Physiol Cell Physiol* 285 [1], Seite C205-14.
- Mager, P. P. (2001): The active site of HIV-1 protease, *Med Res Rev* 21 [4], Seite 348-53.
- Mahdi, F.; Van Nostrand, W. E. und Schmaier, A. H. (1995): Protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor inhibits factor Xa in the prothrombinase complex, *J Biol Chem* 270 [40], Seite 23468-74.
- Mallender, W. D.; Yager, D.; Onstead, L.; Nichols, M. R.; Eckman, C.; Sambamurti, K.; Kopcho, L. M.; Marcinkeviciene, J.; Copeland, R. A. und Rosenberry, T. L. (2001): Characterization of recombinant, soluble beta-secretase from an insect cell expression system, *Mol Pharmacol* 59 [3], Seite 619-26.
- Mandelkow, E. M. und Mandelkow, E. (1998): Tau in Alzheimer's disease, *Trends Cell Biol* 8 [11], Seite 425-7.
- Marambaud, P.; Shioi, J.; Serban, G.; Georgakopoulos, A.; Sarter, S.; Nagy, V.; Baki, L.; Wen, P.; Efthimiopoulos, S.; Shao, Z.; Wisniewski, T. und Robakis, N. K. (2002): A presenilin-1/ γ -secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions, *Embo J* 21 [8], Seite 1948-56.
- Marambaud, P.; Wen, P. H.; Dutt, A.; Shioi, J.; Takashima, A.; Siman, R. und Robakis, N. K. (2003): A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations, *Cell* 114 [5], Seite 635-45.
- Marcinkeviciene, J.; Luo, Y.; Graciani, N. R.; Combs, A. P. und Copeland, R. A. (2001): Mechanism of Inhibition of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE) by a statine-based peptide, *J Biol Chem* 276 [26], Seite 23790-4.
- Marcinkiewicz, M. und Seidah, N. G. (2000): Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain, *J Neurochem* 75 [5], Seite 2133-43.
- Marlow, L.; Cain, M.; Pappolla, M. A. und Sambamurti, K. (2003): Beta-secretase processing of the Alzheimer's amyloid protein precursor (APP), *J Mol Neurosci* 20 [3], Seite 233-9.
- Masliah, E.; Mallory, M.; Alford, M.; DeTeresa, R.; Hansen, L. A.; McKeel, D. W., Jr. und Morris, J. C. (2001): Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease, *Neurology* 56 [1], Seite 127-9.
- Masters, C. L.; Simms, G.; Weinman, N. A.; Multhaup, G.; McDonald, B. L. und Beyreuther, K. (1985a): Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome, *Proc Natl Acad Sci USA* 82 [12], Seite 4245-9.
- Masters, C. L.; Multhaup, G.; Simms, G.; Pottgiesser, J.; Martins, R. N. und Beyreuther, K. (1985b): Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels, *Embo J* 4 [11], Seite 2757-63.
- Matsuda, S.; Yasukawa, T.; Homma, Y.; Ito, Y.; Niikura, T.; Hiraki, T.; Hirai, S.; Ohno, S.; Kita, Y.; Kawasumi, M.; Kouyama, K.; Yamamoto, T.; Kyriakis, J. M. und Nishimoto, I. (2001): c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein-1b/islet-brain-1 scaffolds Alzheimer's amyloid precursor protein with JNK, *J Neurosci* 21 [17], Seite 6597-607.
- Maurer, K und Maurer, U (1998): Alzheimer. Das Leben eines Arztes und die Karriere einer Krankheit, Piper, München.
- Maxfield, F. R. und McGraw, T. E. (2004): Endocytic recycling, *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 [2], Seite 121-32.
- May, P.; Reddy, Y. K. und Herz, J. (2002): Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain, *J Biol Chem* 277 [21], Seite 18736-43.

- McDowell, W. und Schwarz, R. T. (1988): Dissecting glycoprotein biosynthesis by the use of specific inhibitors, *Biochimie* 70 [11], Seite 1535-49.
- McKhann, G.; Drachman, D.; Folstein, M.; Katzman, R.; Price, D. und Stadlan, E. M. (1984): Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease, *Neurology* 34 [7], Seite 939-44.
- McPhie, D. L.; Golde, T.; Eckman, C. B.; Yager, D.; Brant, J. B. und Neve, R. L. (2001): beta-Secretase cleavage of the amyloid precursor protein mediates neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer's disease mutations, *Brain Res Mol Brain Res* 97 [1], Seite 103-13.
- Mills, J. und Reiner, P. B. (1999): Mitogen-activated protein kinase is involved in N-methyl-D-aspartate receptor regulation of amyloid precursor protein cleavage, *Neuroscience* 94 [4], Seite 1333-8.
- Milward, E. A.; Papadopoulos, R.; Fuller, S. J.; Moir, R. D.; Small, D.; Beyreuther, K. und Masters, C. L. (1992): The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth, *Neuron* 9 [1], Seite 129-37.
- Minopoli, G.; de Candia, P.; Bonetti, A.; Faraonio, R.; Zambrano, N. und Russo, T. (2001): The beta-amyloid precursor protein functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 nuclear translocation, *J Biol Chem* 276 [9], Seite 6545-50.
- Mizuno, T.; Haass, C.; Michikawa, M. und Yanagisawa, K. (1998): Cholesterol-dependent generation of a unique amyloid beta-protein from apically missorted amyloid precursor protein in MDCK cells, *Biochim Biophys Acta* 1373 [1], Seite 119-30.
- Mohan, M. J.; Seaton, T.; Mitchell, J.; Howe, A.; Blackburn, K.; Burkhardt, W.; Moyer, M.; Patel, I.; Waitt, G. M.; Becherer, J. D.; Moss, M. L. und Milla, M. E. (2002): The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity, *Biochemistry* 41 [30], Seite 9462-9.
- Molinari, M.; Calanca, V.; Galli, C.; Lucca, P. und Paganetti, P. (2003): Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle, *Science* 299 [5611], Seite 1397-400.
- Molloy, S. S.; Bresnahan, P. A.; Leppla, S. H.; Klimpel, K. R. und Thomas, G. (1992): Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen, *J Biol Chem* 267 [23], Seite 16396-402.
- Molloy, S. S.; Thomas, L.; Kamibayashi, C.; Mumby, M. C. und Thomas, G. (1998): Regulation of endosome sorting by a specific PP2A isoform, *J Cell Biol* 142 [6], Seite 1399-411.
- Molloy, S. S.; Anderson, E. D.; Jean, F. und Thomas, G. (1999): Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis, *Trends Cell Biol* 9 [1], Seite 28-35.
- Morais, V. A.; Crystal, A. S.; Pijak, D. S.; Carlin, D.; Costa, J.; Lee, V. M. und Doms, R. W. (2003): The transmembrane domain region of nicastrin mediates direct interactions with APH-1 and the gamma-secretase complex, *J Biol Chem* 278 [44], Seite 43284-91.
- Morgan, D.; Diamond, D. M.; Gottschall, P. E.; Ugen, K. E.; Dickey, C.; Hardy, J.; Duff, K.; Jantzen, P.; DiCarlo, G.; Wilcock, D.; Connor, K.; Hatcher, J.; Hope, C.; Gordon, M. und Arendash, G. W. (2000): A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease, *Nature* 408 [6815], Seite 982-5.
- Morris, H. R.; Perez-Tur, J.; Janssen, J. C.; Brown, J.; Lees, A. J.; Wood, N. W.; Hardy, J.; Hutton, M. und Rossor, M. N. (1999): Mutation in the tau exon 10 splice site region in familial frontotemporal dementia, *Ann Neurol* 45 [2], Seite 270-1.
- Morris, H. R.; Khan, M. N.; Janssen, J. C.; Brown, J. M.; Perez-Tur, J.; Baker, M.; Ozansoy, M.; Hardy, J.; Hutton, M.; Wood, N. W.; Lees, A. J.; Revesz, T.; Lantos, P. und Rossor, M. N. (2001): The genetic and pathological classification of familial frontotemporal dementia, *Arch Neurol* 58 [11], Seite 1813-6.

- Morris, R. G. (2003): Long-term potentiation and memory, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358 [1432], Seite 643-7.
- Moss, M. L.; Jin, S. L.; Milla, M. E.; Bickett, D. M.; Burkhart, W.; Carter, H. L.; Chen, W. J.; Clay, W. C.; Didsbury, J. R.; Hassler, D.; Hoffman, C. R.; Kost, T. A.; Lambert, M. H.; Leesnitzer, M. A.; McCauley, P.; McGeehan, G.; Mitchell, J.; Moyer, M.; Pahel, G.; Rocque, W.; Overton, L. K.; Schoenen, F.; Seaton, T.; Su, J. L.; Becherer, J. D. und et al. (1997): Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha, *Nature* 385 [6618], Seite 733-6.
- Mostov, K.; Su, T. und ter Beest, M. (2003): Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity, *Nat Cell Biol* 5 [4], Seite 287-93.
- Mucke, L.; Masliah, E.; Yu, G. Q.; Mallory, M.; Rockenstein, E. M.; Tatsuno, G.; Hu, K.; Kholodenko, D.; Johnson-Wood, K. und McConlogue, L. (2000): High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation, *J Neurosci* 20 [11], Seite 4050-8.
- Mullan, M.; Crawford, F.; Axelman, K.; Houlden, H.; Lilius, L.; Winblad, B. und Lannfelt, L. (1992): A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid, *Nat Genet* 1 [5], Seite 345-7.
- Müller, U.; Gajic, V.; Steinbach, J.; Aguzzi, A.; Herms, J.; Tremml, P.; Sisodia, S.S.; Wolfer, D.P. und Lipp, H.-P. (1998): Single and combined gene deficiencies of APP/APLP-family members, *Neurobiol. Aging* 16, Seite 1174.
- Müller, U. und Kins, S. (2002): APP on the move, *Trends Mol Med* 8 [4], Seite 152-5.
- Mumm, J. S. und Kopan, R. (2000): Notch signaling: from the outside in, *Dev Biol* 228 [2], Seite 151-65.
- Mumm, J. S.; Schroeter, E. H.; Saxena, M. T.; Griesemer, A.; Tian, X.; Pan, D. J.; Ray, W. J. und Kopan, R. (2000): A ligand-induced extracellular cleavage regulates γ -secretase-like proteolytic activation of Notch1, *Mol Cell* 5 [2], Seite 197-206.
- Murrell, J.; Farlow, M.; Ghetti, B. und Benson, M. D. (1991): A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease, *Science* 254, Seite 97-99.
- Nakayama, K. (1997): Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins, *Biochem J* 327 (Pt 3), Seite 625-35.
- 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. und Sisodia, S. S. (1998): Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons, *Neuron* 21 [5], Seite 1213-21.
- Naslund, J.; Schierhorn, A.; Hellman, U.; Lannfelt, L.; Roses, A. D.; Tjernberg, L. O.; Silberring, J.; Gandy, S. E.; Winblad, B.; Greengard, P. und et al. (1994): Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging, *Proc Natl Acad Sci USA* 91 [18], Seite 8378-82..
- Naslund, J.; Haroutunian, V.; Mohs, R.; Davis, K. L.; Davies, P.; Greengard, P. und Buxbaum, J. D. (2000): Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline, *Jama* 283 [12], Seite 1571-7.
- Nelson, W. J. und Yeaman, C. (2001): Protein trafficking in the exocytic pathway of polarized epithelial cells, *Trends Cell Biol* 11 [12], Seite 483-6.
- Ng, K. K.; Petersen, J. F.; Cherney, M. M.; Garen, C.; Zalatoris, J. J.; Rao-Naik, C.; Dunn, B. M.; Martzen, M. R.; Peanasky, R. J. und James, M. N. (2000): Structural basis for the inhibition of porcine pepsin by *Ascaris* pepsin inhibitor-3, *Nat Struct Biol* 7 [8], Seite 653-7.
- Ni, C. Y.; Murphy, M. P.; Golde, T. E. und Carpenter, G. (2001): γ -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase, *Science* 294 [5549], Seite 2179-2181.

- Nilsberth, C.; Westlind-Danielsson, A.; Eckman, C. B.; Condrón, M. M.; Axelman, K.; Forsell, C.; Sten, C.; Luthman, J.; Teplow, D. B.; Younkin, S. G.; Naslund, J. und Lannfelt, L. (2001): The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation, *Nat Neurosci* 4 [9], Seite 887-93.
- Nishimoto, I.; Okamoto, T.; Matsuura, Y.; Takahashi, S.; Murayama, Y. und Ogata, E. (1993): Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o), *Nature* 362 [6415], Seite 75-9.
- Nitsch, R. M.; Slack, B. E.; Wurtman, R. J. und Growdon, J. H. (1992): Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors, *Science* 258 [5080], Seite 304-7.
- Nitsch, R. M.; Farber, S. A.; Growdon, J. H. und Wurtman, R. J. (1993): Release of amyloid beta-protein precursor derivatives by electrical depolarization of rat hippocampal slices, *Proc Natl Acad Sci USA* 90 [11], Seite 5191-3.
- Norman, J. A.; Hadjilambris, O.; Baska, R.; Sharp, D. Y. und Kumar, R. (1992): Stable expression, secretion, and characterization of active human renin in mammalian cells, *Mol Pharmacol* 41 [1], Seite 53-9.
- Oda, K. (1992): Calcium depletion blocks proteolytic cleavages of plasma protein precursors which occur at the Golgi and/or trans-Golgi network. Possible involvement of Ca(2+)-dependent Golgi endoproteases, *J Biol Chem* 267 [24], Seite 17465-71.
- Oddo, S.; Caccamo, A.; Kitazawa, M.; Tseng, B. P. und LaFerla, F. M. (2003): Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging* 24 [8], Seite 1063-70.
- Oddo, S.; Billings, L.; Kesslak, J. P.; Cribbs, D. H. und LaFerla, F. M. (2004): Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome, *Neuron* 43 [3], Seite 321-32.
- Ohl, C.; Albach, C.; Altevogt, P. und Schmitz, B. (2003): N-glycosylation patterns of HSA/CD24 from different cell lines and brain homogenates: a comparison, *Biochimie* 85 [6], Seite 565-73.
- Okamoto, I.; Tsuiki, H.; Kenyon, L. C.; Godwin, A. K.; Emlet, D. R.; Holgado-Madruga, M.; Lanham, I. S.; Joynes, C. J.; Vo, K. T.; Guha, A.; Matsumoto, M.; Ushio, Y.; Saya, H. und Wong, A. J. (2002): Proteolytic cleavage of the CD44 adhesion molecule in multiple human tumors, *Am J Pathol* 160 [2], Seite 441-7.
- Okochi, M.; Steiner, H.; Fukumori, A.; Tanii, H.; Tomita, T.; Tanaka, T.; Iwatsubo, T.; Kudo, T.; Haass, C. und Takeda, M. (2002): Presenilins mediate a dual intramembraneous γ -secretase cleavage of Notch, which is required for signaling and removal of the transmembrane domain, *Embo J* 21 [20], Seite 5408-16.
- Okoniewska, M.; Tanaka, T. und Yada, R. Y. (1999): The role of the flap residue, threonine 77, in the activation and catalytic activity of pepsin A, *Protein Eng* 12 [1], Seite 55-61.
- Okoniewska, M.; Tanaka, T. und Yada, R. Y. (2000): The pepsin residue glycine-76 contributes to active-site loop flexibility and participates in catalysis, *Biochem J* 349 [Pt 1], Seite 169-77.
- Oltersdorf, T.; Ward, P. J.; Henriksson, T.; Beattie, E. C.; Neve, R.; Lieberburg, I. und Fritz, L. C. (1990): The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway, *J Biol Chem* 265 [8], Seite 4492-7.
- Osborn, J. (2002): A review of the suitability of CyDye fluors for use in high-throughput drug screening applications, *Bioscience, Amersham, Drug Discovery Technology, Life Science News Online, Buckinghamshire, England U. K.*
- Pastorino, L.; Ikin, A. F.; Lamprinou, S.; Vacaresse, N.; Revelli, J. P.; Platt, K.; Paganetti, P.; Mathews, P. M.; Harroch, S. und Buxbaum, J. D. (2004): BACE (beta-secretase) modulates the processing of APLP2 in vivo, *Mol Cell Neurosci* 25 [4], Seite 642-9.

- Pastorino, L.; Ikin, A. F.; Nairn, A. C.; Pursnani, A. und Buxbaum, J. D. (2002): The carboxyl-terminus of BACE contains a sorting signal that regulates BACE trafficking but not the formation of total A(beta), *Mol Cell Neurosci* 19 [2], Seite 175-85.
- Perez, R. G.; Soriano, S.; Hayes, J. D.; Ostaszewski, B.; Xia, W.; Selkoe, D. J.; Chen, X.; Stokin, G. B. und Koo, E. H. (1999): Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42, *J Biol Chem* 274 [27], Seite 18851-6.
- Periz, G. und Fortini, M. E. (2004): Functional reconstitution of gamma-secretase through coordinated expression of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2, *J Neurosci Res* 77 [3], Seite 309-22.
- Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Reddy, P.; Stocking, K. L.; Sunnarborg, S. W.; Lee, D. C.; Russell, W. E.; Castner, B. J.; Johnson, R. S.; Fitzner, J. N.; Boyce, R. W.; Nelson, N.; Kozlosky, C. J.; Wolfson, M. F.; Rauch, C. T.; Cerretti, D. P.; Paxton, R. J.; March, C. J. und Black, R. A. (1998): An essential role for ectodomain shedding in mammalian development, *Science* 282 [5392], Seite 1281-4.
- Phylip, L. H.; Lees, W. E.; Brownsey, B. G.; Bur, D.; Dunn, B. M.; Winther, J. R.; Gustchina, A.; Li, M.; Copeland, T.; Wlodawer, A. und Kay, J. (2001): The potency and specificity of the interaction between the IA3 inhibitor and its target aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem* 276 [3], Seite 2023-30.
- Pike, C. J.; Cummings, B. J.; Monzavi, R. und Cotman, C. W. (1994): Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease, *Neuroscience* 63 [2], Seite 517-31.
- Pike, C. J.; Overman, M. J. und Cotman, C. W. (1995): Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro, *J Biol Chem* 270 [41], Seite 23895-8.
- Pinnix, I.; Council, J. E.; Roseberry, B.; Onstead, L.; Mallender, W.; Sucic, J. und Sambamurti, K. (2001): Convertases other than furin cleave beta-secretase to its mature form, *Faseb J* 15 [10], Seite 1810-2.
- Polishchuk, R.; Di Pentima, A. und Lippincott-Schwartz, J. (2004): Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway, *Nat Cell Biol* 6 [4], Seite 297-307.
- Ponte, P.; Gonzalez-DeWhitt, P.; Schilling, J.; Miller, J.; Hsu, D.; Greenberg, B.; Davis, K.; Wallace, W.; Lieberburg, I. und Fuller, F. (1988): A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors, *Nature* 331 [6156], Seite 525-7.
- Ponting, C. P.; Hutton, M.; Nyborg, A.; Baker, M.; Jansen, K. und Golde, T. E. (2002): Identification of a novel family of presenilin homologues, *Hum Mol Genet* 11 [9], Seite 1037-44.
- Postina, R.; Schroeder, A.; Dewachter, I.; Bohl, J.; Schmitt, U.; Kojro, E.; Prinzen, C.; Endres, K.; Hiemke, C.; Blessing, M.; Flamez, P.; Dequenue, A.; Godaux, E.; van Leuven, F. und Fahrenholz, F. (2004): A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model, *J Clin Invest* 113 [10], Seite 1456-64.
- Potter, B. A.; Ihrke, G.; Bruns, J. R.; Weixel, K. M. und Weisz, O. A. (2004): Specific N-glycans direct apical delivery of transmembrane, but not soluble or glycosylphosphatidylinositol-anchored forms of endolyn in Madin-Darby canine kidney cells, *Mol Biol Cell* 15 [3], Seite 1407-16.
- Prencipe, M.; Casini, A. R.; Ferretti, C.; Lattanzio, M. T.; Fiorelli, M. und Culasso, F. (1996): Prevalence of dementia in an elderly rural population: effects of age, sex, and education, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60 [6], Seite 628-33.
- Prokop, S.; Shirotani, K.; Edbauer, D.; Haass, C. und Steiner, H. (2004): Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex, *J Biol Chem* 279 [22], Seite 23255-61.

- Ratovitski, T.; Slunt, H. H.; Thinakaran, G.; Price, D. L.; Sisodia, S. S. und Borchelt, D. R. (1997): Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin, *J Biol Chem.* 272 [39], Seite 24536-41.
- Ray, W. J.; Yao, M.; Mumm, J.; Schroeter, E. H.; Saftig, P.; Wolfe, M.; Selkoe, D. J.; Kopan, R. und Goate, A. M. (1999): Cell surface presenilin-1 participates in the γ -secretase-like proteolysis of Notch, *J Biol Chem* 274 [51], Seite 36801-7.
- Rebeck, G. W.; Reiter, J. S.; Strickland, D. K. und Hyman, B. T. (1993): Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions, *Neuron* 11 [4], Seite 575-80.
- Rich, D. H.; Bernatowicz, M. S.; Agarwal, N. S.; Kawai, M.; Salituro, F. G. und Schmidt, P. G. (1985): Inhibition of aspartic proteases by pepstatin and 3-methylstatine derivatives of pepstatin. Evidence for collected-substrate enzyme inhibition, *Biochemistry* 24 [13], Seite 3165-73.
- Riddell, D. R.; Christie, G.; Hussain, I. und Dingwall, C. (2001): Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts, *Curr Biol* 11 [16], Seite 1288-93.
- Riedel-Heller, S. G.; Busse, A.; Aurich, C.; Matschinger, H. und Angermeyer, M. C. (2001): Prevalence of dementia according to DSM-III-R and ICD-10: results of the Leipzig Longitudinal Study of the Aged (LEILA75+) Part 1, *Br J Psychiatry* 179, Seite 250-4.
- Roberds, S. L.; Anderson, J.; Basi, G.; Bienkowski, M. J.; Branstetter, D. G.; Chen, K. S.; Freedman, S. B.; Frigon, N. L.; Games, D.; Hu, K.; Johnson-Wood, K.; Kappenman, K. E.; Kawabe, T. T.; Kola, I.; Kuehn, R.; Lee, M.; Liu, W.; Motter, R.; Nichols, N. F.; Power, M.; Robertson, D. W.; Schenk, D.; Schoor, M.; Shopp, G. M.; Shuck, M. E.; Sinha, S.; Svensson, K. A.; Tatsuno, G.; Tintrop, H.; Wijsman, J.; Wright, S. und McConlogue, L. (2001): BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics, *Hum Mol Genet* 10 [12], Seite 1317-24.
- Rodriguez-Boulan, E. und Gonzalez, A. (1999): Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props?, *Trends Cell Biol* 9 [8], Seite 291-4.
- Rogaev, E. I.; Sherrington, R.; Rogaeva, E. A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Liang, Y.; Chi, H.; Lin, C.; Holman, K.; Tsuda, T. und et al. (1995): Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene, *Nature* 376 [6543], Seite 775-8.
- Rosa, P.; Mantovani, S.; Rosboch, R. und Huttner, W. B. (1992): Monensin and brefeldin A differentially affect the phosphorylation and sulfation of secretory proteins, *J Biol Chem* 267 [17], Seite 12227-32.
- Roth, J. (2002): Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions, *Chem Rev* 102 [2], Seite 285-303.
- Sabo, S. L.; Ikin, A. F.; Buxbaum, J. D. und Greengard, P. (2001): The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement, *J Cell Biol* 153 [7], Seite 1403-14.
- Sambamurti, K.; Kinsey, R.; Maloney, B.; Ge, Y. W. und Lahiri, D. K. (2004): Gene structure and organization of the human beta-secretase (BACE) promoter, *Faseb J* 18 [9], Seite 1034-6.
- Sambrook, J. und Russel, D.W. (2001): *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd. Auflage, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samuels, S. C. und Davis, K. L. (1998): Experimental approaches to cognitive disturbance in Alzheimer's disease, *Harv Rev Psychiatry* 6 [1], Seite 11-22.
- Sandbrink, R.; Masters, C. L. und Beyreuther, K. (1994): Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4- amyloid protein precursor-like proteins, *J Biol Chem* 269 [19], Seite 14227-34.

- Sastre, M.; Steiner, H.; Fuchs, K.; Capell, A.; Multhaup, G.; Condrón, M. M.; Teplow, D. B. und 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], Seite 835-41.
- Sauder, J. M.; Arthur, J. W. und Dunbrack, R. L., Jr. (2000): Modeling of substrate specificity of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein beta-secretase, *J Mol Biol* 300 [2], Seite 241-8.
- Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D.; George-Hyslop, P. H.; Pericak-Vance, M. A.; Joo, S. H.; Rosi, B. L.; Gusella, J. F.; Crapper-MacLachlan, D. R.; Alberts, M. J. und et al. (1993): Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease, *Neurology* 43 [8], Seite 1467-72.
- Saunders, A.; Kim, T-W. und Tanzi, R. (1999): BACE Maps to Chromosome 11 and a BACE Homolog, BACE2, Reside in the Obligate Down Syndrome Region of Chromosome 21, *Science* 286, Seite 1255a.
- Saura, C. A.; Choi, S. Y.; Beglopoulos, V.; Malkani, S.; Zhang, D.; Shankaranarayana Rao, B. S.; Chattarji, S.; Kelleher, R. J., 3rd; Kandel, E. R.; Duff, K.; Kirkwood, A. und Shen, J. (2004): Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration, *Neuron* 42 [1], Seite 23-36.
- Saxena, M. T.; Schroeter, E. H.; Mumm, J. S. und Kopan, R. (2001): Murine Notch homologs (N1-4) undergo presenilin-dependent proteolysis, *J Biol Chem* 276 [43], Seite 40268-73.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal Biochem* 166 [2], Seite 368-79.
- Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandeventer, C.; Walker, S.; Wogulis, M.; Yednock, T.; Games, D. und Seubert, P. (1999): Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse [see comments], *Nature* 400 [6740], Seite 173-7.
- 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. und Younkin, S. (1996): Secreted amyloid β -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 [8], Seite 864-70.
- Schmaier, A. H.; Dahl, L. D.; Rozemuller, A. J.; Roos, R. A.; Wagner, S. L.; Chung, R. und Van Nostrand, W. E. (1993): Protease nexin-2/amyloid beta protein precursor. A tight-binding inhibitor of coagulation factor IXa, *J Clin Invest* 92 [5], Seite 2540-5.
- Schmechel, D. E.; Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Crain, B. J.; Hulette, C. M.; Joo, S. H.; Pericak-Vance, M. A.; Goldgaber, D. und Roses, A. D. (1993): Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci USA* 90 [20], Seite 9649-53.
- Schuck, S. und Simons, K. (2004): Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane, *J Cell Sci* 117 [Pt 25], Seite 5955-64.
- Seals, D. F. und Courtneidge, S. A. (2003): The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions, *Genes Dev* 17 [1], Seite 7-30.
- Seelmeier, S.; Schmidt, H.; Turk, V. und von der Helm, K. (1988): Human immunodeficiency virus has an aspartic-type protease that can be inhibited by pepstatin A, *Proc Natl Acad Sci USA* 85 [18], Seite 6612-6.
- Seidah, N. G. und Chretien, M. (1997): Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins, *Curr Opin Biotechnol* 8 [5], Seite 602-7.

- Selkoe, D. J. (1994): Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease, *Annu Rev Cell Biol* 10, Seite 373-403.
- Selkoe, D. J. (1996): Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease, *J Biol Chem* 271 [31], Seite 18295-8.
- Selkoe, D. J.; Podlisny, M. B.; Joachim, C. L.; Vickers, E. A.; Lee, G.; Fritz, L. C. und Oltersdorf, T. (1988): Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues, *Proc Natl Acad Sci USA* 85 [19], Seite 7341-5.
- Selkoe, D. J. (1999): Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease, *Nature* 399 [6738 Suppl], Seite A23-31.
- Selkoe, D. J. (2001a): Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy, *Physiol Rev* 81 [2], Seite 741-66.
- Selkoe, D. J. (2001b): Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein, *J Alzheimers Dis* 3 [1], Seite 75-80.
- Selkoe, D. J. (2002): Alzheimer's disease is a synaptic failure, *Science* 298 [5594], Seite 789-91.
- Selkoe, D. und Kopan, R. (2003): Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration, *Annu Rev Neurosci* 26, Seite 565-97.
- Seubert, P.; Vigo-Pelfrey, C.; Esch, F.; Lee, M.; Dovey, H.; Davis, D.; Sinha, S.; Schlossmacher, M.; Whaley, J.; Swindlehurst, C. und et al. (1992): Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids, *Nature* 359 [6393], Seite 325-7.
- Seubert, P.; Oltersdorf, T.; Lee, M. G.; Barbour, R.; Blomquist, C.; Davis, D. L.; Bryant, K.; Fritz, L. C.; Galasko, D.; Thal, L. J. und et al. (1993): Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the β -amyloid peptide, *Nature* 361 [6409], Seite 260-3.
- Shearman, M. S.; Behr, D.; Clarke, E. E.; Lewis, H. D.; Harrison, T.; Hunt, P.; Nadin, A.; Smith, A. L.; Stevenson, G. und Castro, J. L. (2000): L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid β -protein precursor γ -secretase activity, *Biochemistry* 39 [30], Seite 8698-704.
- Shen, J.; Bronson, R. T.; Chen, D. F.; Xia, W.; Selkoe, D. J. und Tonegawa, S. (1997): Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice, *Cell* 89 [4], Seite 629-39.
- Sheng, J. G.; Price, D. L. und Koliatsos, V. E. (2003): The beta-amyloid-related proteins presenilin 1 and BACE1 are axonally transported to nerve terminals in the brain, *Exp Neurol* 184 [2], Seite 1053-7.
- Sherrington, R.; Rogaev, E. I.; Liang, Y.; Rogaeva, E. A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Chi, H.; Lin, C.; Li, G.; Holman, K. und et al. (1995): Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease, *Nature* 375 [6534], Seite 754-60.
- Shi, Xiao-Ping; Chen, Elizabeth; Yin, Kuo-Chang; Na, Sang; Garsky, Victor M.; Lai, Ming-Tain; Li, Yue-Ming; Platchek, Michael; Register, R. Bruce; Sardana, Mohinder K.; Tang, Mei-Jy; Thiebeau, James; Wood, Theresa; Shafer, Jules A. und Gardell, Stephen J. (2001): The Pro Domain of beta -Secretase Does Not Confer Strict Zymogen-like Properties but Does Assist Proper Folding of the Protease Domain, *J Biol Chem* 276 [13], Seite 10366-10373.
- Shiba, T.; Kametaka, S.; Kawasaki, M.; Shibata, M.; Waguri, S.; Uchiyama, Y. und Wakatsuki, S. (2004): Insights into the phosphoregulation of beta-secretase sorting signal by the VHS domain of GGA1, *Traffic* 5 [6], Seite 437-48.
- Shirotani, K.; Edbauer, D.; Prokop, S.; Haass, C. und Steiner, H. (2004): Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APH-1 variants, *J Biol Chem* 279 [40], Seite 41340-5.

- 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. und et al. (1992): Production of the Alzheimer amyloid β -protein by normal proteolytic processing, *Science* 258 [5079], Seite 126-9.
- Sielecki, A. R.; Fedorov, A. A.; Boodhoo, A.; Andreeva, N. S. und James, M. N. (1990): Molecular and crystal structures of monoclinic porcine pepsin refined at 1.8 Å resolution, *J Mol Biol* 214 [1], Seite 143-70.
- Simmen, T.; Honing, S.; Icking, A.; Tikkanen, R. und Hunziker, W. (2002): AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells, *Nat Cell Biol* 4 [2], Seite 154-9.
- Simons, K. und Ikonen, E. (2000): How cells handle cholesterol, *Science* 290 [5497], Seite 1721-6.
- Simons, K. und Toomre, D. (2000): Lipid rafts and signal transduction, *Nat Rev Mol Cell Biol* 1 [1], Seite 31-9.
- Simons, M.; de Strooper, B.; Multhaup, G.; Tienari, P. J.; Dotti, C. G. und Beyreuther, K. (1996): Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons, *J Neurosci* 16 [3], Seite 899-908.
- Sinha, S.; Anderson, J. P.; Barbour, R.; Basi, G. S.; Caccavello, R.; Davis, D.; Doan, M.; Dovey, H. F.; Frigon, N.; Hong, J.; Jacobson-Croak, K.; Jewett, N.; Keim, P.; Knops, J.; Lieberburg, I.; Power, M.; Tan, H.; Tatsuno, G.; Tung, J.; Schenk, D.; Seubert, P.; Suomensaaari, S. M.; Wang, S.; Walker, D.; John, V. und et al. (1999): Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain, *Nature* 402 [6761], Seite 537-40.
- Sinha, S. und Lieberburg, I. (1999): Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion, *Proc Natl Acad Sci USA* 96 [20], Seite 11049-53.
- Sisodia, S. S. (1992): Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease, *Proc Natl Acad Sci USA* 89 [13], Seite 6075-9.
- Sisodia, S. S.; Koo, E. H.; Hoffman, P. N.; Perry, G. und Price, D. L. (1993): Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system, *J Neurosci* 13 [7], Seite 3136-42.
- Sisodia, S. S. und St George-Hyslop, P. H. (2002): gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in?, *Nat Rev Neurosci* 3 [4], Seite 281-90.
- Six, E.; Ndiaye, D.; Laabi, Y.; Brou, C.; Gupta-Rossi, N.; Israel, A. und Logeat, F. (2003): The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase, *Proc Natl Acad Sci USA* 100 [13], Seite 7638-43.
- Skovronsky, D. M.; Moore, D. B.; Milla, M. E.; Doms, R. W. und Lee, V. M. (2000): Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network, *J Biol Chem* 275 [4], Seite 2568-75.
- Skovronsky, D. M.; Fath, S.; Lee, V. M. und Milla, M. E. (2001): Neuronal localization of the TNFalpha converting enzyme (TACE) in brain tissue and its correlation to amyloid plaques, *J Neurobiol* 49 [1], Seite 40-6.
- Small, D. H.; Mok, S. S. und Bornstein, J. C. (2001): Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom, *Nat Rev Neurosci* 2 [8], Seite 595-8.
- Solans, A.; Estivill, X. und de La Luna, S. (2000): A new aspartyl protease on 21q22.3, BACE2, is highly similar to Alzheimer's amyloid precursor protein beta-secretase, *Cytogenet Cell Genet* 89 [3-4], Seite 177-84.
- Sopher, B. L.; Fukuchi, K.; Smith, A. C.; Leppig, K. A.; Furlong, C. E. und Martin, G. M. (1994): Cytotoxicity mediated by conditional expression of a carboxyl-terminal derivative of the beta-amyloid precursor protein, *Brain Res Mol Brain Res* 26 [1-2], Seite 207-17.

- Sprecher, C. A.; Grant, F. J.; Grimm, G.; O'Hara, P. J.; Norris, F.; Norris, K. und Foster, D. C. (1993): Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family, *Biochemistry* 32 [17], Seite 4481-6.
- Steiner, H.; Duff, K.; Capell, A.; Romig, H.; Grim, M. G.; Lincoln, S.; Hardy, J.; Yu, X.; Picciano, M.; Fichtler, K.; Citron, M.; Kopan, R.; Pesold, B.; Keck, S.; Baader, M.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Baumeister, R. und Haass, C. (1999a): A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling, *J Biol Chem* 274 [40], Seite 28669-73.
- Steiner, H.; Romig, H.; Grim, M. G.; Philipp, U.; Pesold, B.; Citron, M.; Baumeister, R. und Haass, C. (1999b): The biological and pathological function of the presenilin-1 Deltaexon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing, *J Biol Chem* 274 [12], Seite 7615-8.
- Steiner, H.; Romig, H.; Pesold, B.; Philipp, U.; Baader, M.; Citron, M.; Loetscher, H.; Jacobsen, H. und Haass, C. (1999c): Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis, *Biochemistry* 38 [44], Seite 14600-5.
- Steiner, H.; Kostka, M.; Romig, H.; Basset, G.; Pesold, B.; Hardy, J.; Capell, A.; Meyn, L.; Grim, M.G.; Baumeister, R.; Fichtler, K. und Haass, C. (2000): Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in polytopic bacterial aspartyl proteases, *Nat. Cell Biol* 2, Seite 848-51.
- Steiner, H.; Winkler, E.; Edbauer, D.; Prokop, S.; Basset, G.; Yamasaki, A.; Kostka, M. und Haass, C. (2002): PEN-2 is an integral component of the gamma -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin, *J Biol Chem* 277 [42], Seite 39062-65.
- Steinhilb, M. L.; Turner, R. S. und Gaut, J. R. (2002): ELISA analysis of beta-secretase cleavage of the Swedish amyloid precursor protein in the secretory and endocytic pathways, *J Neurochem* 80 [6], Seite 1019-28.
- Storey, E.; Beyreuther, K. und Masters, C. L. (1996): Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components, *Brain Res* 735 [2], Seite 217-31.
- Strittmatter, W. J.; Saunders, A. M.; Schmechel, D.; Pericak-Vance, M.; Enghild, J.; Salvesen, G. S. und Roses, A. D. (1993): Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci USA* 90 [5], Seite 1977-81.
- Struhl, G. und Adachi, A. (2000): Requirements for presenilin-dependent cleavage of Notch and other transmembrane proteins, *Mol Cell* 6, Seite 625-636.
- Suzuki, N.; Cheung, T. T.; Cai, X. D.; Odaka, A.; Otvos, L., Jr.; Eckman, C.; Golde, T. E. und Younkin, S. G. (1994): An increased percentage of long amyloid β -protein secreted by familial amyloid β -protein precursor (β APP717) mutants, *Science* 264 [5163], Seite 1336-40.
- Sze, C. I.; Bi, H.; Kleinschmidt-DeMasters, B. K.; Filley, C. M. und Martin, L. J. (2000): Selective regional loss of exocytotic presynaptic vesicle proteins in Alzheimer's disease brains, *J Neurol Sci* 175 [2], Seite 81-90.
- Takasugi, N.; Tomita, T.; Hayashi, I.; Tsuruoka, M.; Niimura, M.; Takahashi, Y.; Thinakaran, G. und Iwatsubo, T. (2003): The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex, *Nature* 422 [6930], Seite 438-41.
- Tang, J. und Wong, R. N. (1987): Evolution in the structure and function of aspartic proteases, *J Cell Biochem* 33 [1], Seite 53-63.
- Tang, M. X.; Cross, P.; Andrews, H.; Jacobs, D. M.; Small, S.; Bell, K.; Merchant, C.; Lantigua, R.; Costa, R.; Stern, Y. und Mayeux, R. (2001): Incidence of AD in African-Americans, Caribbean Hispanics, and Caucasians in northern Manhattan, *Neurology* 56 [1], Seite 49-56.

- Tanzi, R. E.; Gusella, J. F.; Watkins, P. C.; Bruns, G. A.; St George-Hyslop, P.; Van Keuren, M. L.; Patterson, D.; Pagan, S.; Kurnit, D. M. und Neve, R. L. (1987): Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus, *Science* 235 [4791], Seite 880-4.
- Tanzi, R. E.; McClatchey, A. I.; Lamperti, E. D.; Villa-Komaroff, L.; Gusella, J. F. und Neve, R. L. (1988): Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease, *Nature* 331 [6156], Seite 528-30.
- Tarentino, A. L. und Maley, F. (1974): Purification and properties of an endo-beta-N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces griseus*, *J Biol Chem* 249 [3], Seite 811-7.
- Tarentino, A. L.; Gomez, C. M. und Plummer, T. H., Jr. (1985): Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F, *Biochemistry* 24 [17], Seite 4665-71.
- Terry, R. D.; Gonatas, N. K. und Weiss, M. (1964): The ultrastructure of the cerebral cortex in Alzheimer's disease, *Trans Am Neurol Assoc* 89, Seite 12.
- Thinakaran, G.; Teplow, D. B.; Siman, R.; Greenberg, B. und Sisodia, S. S. (1996a): Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the "beta-secretase" site occurs in the golgi apparatus, *J Biol Chem* 271 [16], Seite 9390-7.
- 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. und Sisodia, S. S. (1996b): Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo, *Neuron* 17 [1], Seite 181-90.
- Thinakaran, G.; Harris, C. L.; Ratovitski, T.; Davenport, F.; Slunt, H. H.; Price, D. L.; Borchelt, D. R. und 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 [45], Seite 28415-22.
- Thomas, G. (2002): Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 [10], Seite 753-66.
- Thorsett, E. D. und Latimer, L. H. (2000): Therapeutic approaches to Alzheimer's disease, *Curr Opin Chem Biol* 4 [4], Seite 377-82.
- Tienari, P. J.; De Strooper, B.; Ikonen, E.; Simons, M.; Weidemann, A.; Czech, C.; Hartmann, T.; Ida, N.; Multhaup, G.; Masters, C. L.; Van Leuven, F.; Beyreuther, K. und Dotti, C. G. (1996): The beta-amyloid domain is essential for axonal sorting of amyloid precursor protein, *Embo J* 15 [19], Seite 5218-29.
- Tilley, L.; Morgan, K. und Kalsheker, N. (1998): Genetic risk factors in Alzheimer's disease, *Mol Pathol* 51 [6], Seite 293-304.
- Touloukhonova, Larisa; Metzler, William J.; Witmer, Mark R.; Copeland, Robert A. und Marcinkeviciene, Jovita (2003): Kinetic Studies on beta -Site Amyloid Precursor Protein-cleaving Enzyme (BACE). CONFIRMATION OF AN ISO-MECHANISM, *J Biol Chem* 278 [7], Seite 4582-4589.
- Tsai, B.; Ye, Y. und Rapoport, T. A. (2002): Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 [4], Seite 246-55.
- 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. und Citron, M. (1999): Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE, *Science* 286 [5440], Seite 735-41.
- Vassar, R. (2002): beta-Secretase (BACE) as a drug target for alzheimer's disease, *Adv Drug Deliv Rev* 54 [12], Seite 1589-602.
- Verkade, P.; Harder, T.; Lafont, F. und Simons, K. (2000): Induction of caveolae in the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells, *J Cell Biol* 148 [4], Seite 727-39.

- Vetrivel, K. S.; Cheng, H.; Lin, W.; Sakurai, T.; Li, T.; Nukina, N.; Wong, P. C.; Xu, H. und Thinakaran, G. (2004): Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes, *J Biol Chem* 279 [43], Seite 44945-54.
- Vey, M.; Schafer, W.; Berghofer, S.; Klenk, HD und Garten, W (1994): Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation, *J Cell Biol* 127 [6], Seite 1829-1842.
- von Arnim, C. A.; Tangredi, M. M.; Peltan, I. D.; Lee, B. M.; Irizarry, M. C.; Kinoshita, A. und Hyman, B. T. (2004): Demonstration of BACE (beta-secretase) phosphorylation and its interaction with GGA1 in cells by fluorescence-lifetime imaging microscopy, *J Cell Sci* 117 [Pt 22], Seite 5437-45.
- von Koch, C. S.; Zheng, H.; Chen, H.; Trumbauer, M.; Thinakaran, G.; van der Ploeg, L. H.; Price, D. L. und Sisodia, S. S. (1997): Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice, *Neurobiol Aging* 18 [6], Seite 661-9.
- Walsh, D. M.; Fadeeva, J. V.; LaVoie, M. J.; Paliga, K.; Eggert, S.; Kimberly, W. T.; Wasco, W. und Selkoe, D. J. (2003): gamma-Secretase cleavage and binding to FE65 regulate the nuclear translocation of the intracellular C-terminal domain (ICD) of the APP family of proteins, *Biochemistry* 42 [22], Seite 6664-73.
- Walsh, D. M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J. V.; Cullen, W. K.; Anwyl, R.; Wolfe, M. S.; Rowan, M. J. und Selkoe, D. J. (2002): Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*, *Nature* 416 [6880], Seite 535-9.
- Walter, J.; Capell, A.; Hung, A. Y.; Langen, H.; Schnolzer, M.; Thinakaran, G.; Sisodia, S. S.; Selkoe, D. J. und Haass, C. (1997): Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations, *J Biol Chem* 272 [3], Seite 1896-903.
- Walter, J.; Schindzielorz, A.; Hartung, B. und Haass, C. (2000): Phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein at the cell surface by ectocasein kinases 1 and 2, *J Biol Chem* 275 [31], Seite 23523-9.
- Walter, J.; Fluhrer, R.; Hartung, B.; Willem, M.; Kaether, C.; Capell, A.; Lammich, S.; Multhaup, G. und Haass, C. (2001): Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase, *J Biol Chem* 276 [18], Seite 14634-41.
- Wang, J.; Dickson, D. W.; Trojanowski, J. Q. und Lee, V. M. (1999): The levels of soluble versus insoluble brain A β distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging, *Exp Neurol* 158 [2], Seite 328-37.
- Wang, R.; Sweeney, D.; Gandy, S. E. und Sisodia, S. S. (1996): The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry, *J Biol Chem* 271 [50], Seite 31894-902.
- Wang, Y.; Haughey, N. J.; Mattson, M. P. und Furukawa, K. (2004): Dual effects of ATP on rat hippocampal synaptic plasticity, *Neuroreport* 15 [4], Seite 633-6.
- Wasco, W.; Bupp, K.; Magendantz, M.; Gusella, J. F.; Tanzi, R. E. und Solomon, F. (1992): Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor, *Proc Natl Acad Sci USA* 89 [22], Seite 10758-62.
- Wasco, W.; Gurubhagavatula, S.; Paradis, M. D.; Romano, D. M.; Sisodia, S. S.; Hyman, B. T.; Neve, R. L. und Tanzi, R. E. (1993): Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor, *Nat Genet* 5 [1], Seite 95-100.
- Weidemann, A.; Konig, G.; Bunke, D.; Fischer, P.; Salbaum, J. M.; Masters, C. L. und Beyreuther, K. (1989): Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein, *Cell* 57 [1], Seite 115-26.
- Weidemann, A.; Eggert, S.; Reinhard, F. B.; Vogel, M.; Paliga, K.; Baier, G.; Masters, C. L.; Beyreuther, K. und Evin, G. (2002): A novel ϵ -cleavage within the transmembrane

- domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing, *Biochemistry* 41 [8], Seite 2825-35.
- Weihofen, A.; Binns, K.; Lemberg, M. K.; Ashman, K. und Martoglio, B. (2002): Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease, *Science* 296 [5576], Seite 2215-8.
- Weihofen, A. und Martoglio, B. (2003): Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides, *Trends Cell Biol* 13 [2], Seite 71-8.
- Wertkin, A. M.; Turner, R. S.; Pleasure, S. J.; Golde, T. E.; Younkin, S. G.; Trojanowski, J. Q. und Lee, V. M. (1993): Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides, *Proc Natl Acad Sci USA* 90 [20], Seite 9513-7.
- Wilcheck M. und Bayer E.A. (1990): Avidin-biotin technology, *Methods in Enzymology* 184.
- Wild-Bode, C.; Yamazaki, T.; Capell, A.; Leimer, U.; Steiner, H.; Ihara, Y. und Haass, C. (1997): Intracellular generation and accumulation of amyloid β -peptide terminating at amino acid 42, *J Biol Chem* 272 [26], Seite 16085-8.
- Winckler, B. und Mellman, I. (1999): Neuronal polarity: controlling the sorting and diffusion of membrane components, *Neuron* 23 [4], Seite 637-40.
- Wolfe, M. S.; Xia, W.; Moore, C. L.; Leatherwood, D. D.; Ostaszewski, B.; Rahmati, T.; Donkor, I. O. und Selkoe, D. J. (1999a): Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's γ -secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease, *Biochemistry* 38 [15], Seite 4720-7.
- Wolfe, M. S.; Xia, W.; Ostaszewski, B. L.; Diehl, T. S.; Kimberly, W. T. und Selkoe, D. J. (1999b): Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity, *Nature* 398 [6727], Seite 513-7.
- Wong, P. C.; Zheng, H.; Chen, H.; Becher, M. W.; Sirinathsinghji, D. J.; Trumbauer, M. E.; Chen, H. Y.; Price, D. L.; Van der Ploeg, L. H. und Sisodia, S. S. (1997): Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm, *Nature* 387 [6630], Seite 288-92.
- Xia, W.; Ray, W. J.; Ostaszewski, B. L.; Rahmati, T.; Kimberly, W. T.; Wolfe, M. S.; Zhang, J.; Goate, A. M. und Selkoe, D. J. (2000): Presenilin complexes with the C-terminal fragments of amyloid precursor protein at the sites of amyloid β -protein generation, *Proc Natl Acad Sci USA* 97, Seite 9299-9304.
- Xia, W. und Wolfe, M. S. (2003): Intramembrane proteolysis by presenilin and presenilin-like proteases, *J Cell Sci* 116 [Pt 14], Seite 2839-44.
- Yamaguchi, H.; Nakazato, Y.; Hirai, S.; Shoji, M. und Harigaya, Y. (1989): Electron micrograph of diffuse plaques. Initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain, *Am J Pathol* 135 [4], Seite 593-7.
- Yamazaki, T.; Selkoe, D. J. und Koo, E. H. (1995): Trafficking of cell surface beta-amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons, *J Cell Biol* 129 [2], Seite 431-42.
- Yamazaki, T.; Koo, E. H. und Selkoe, D. J. (1996): Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization, *J Cell Sci* 109 (Pt 5), Seite 999-1008.
- Yamazaki, T.; Koo, E. H. und Selkoe, D. J. (1997): Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells, *J Neurosci* 17 [3], Seite 1004-10.
- 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. und Gurney, M. E. (1999): Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity, *Nature* 402 [6761], Seite 533-7.

- Yan, R.; Munzner, J. B.; Shuck, M. E. und Bienkowski, M. J. (2001a): BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells, *J Biol Chem* 276 [36], Seite 34019-27.
- Yan, R.; Han, P.; Miao, H.; Greengard, P. und Xu, H. (2001b): The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta -amyloid precursor protein (APP) substrate, *J Biol Chem* 276 [39], Seite 36788-96.
- Yang, D. S.; Tandon, A.; Chen, F.; Yu, G.; Yu, H.; Arawaka, S.; Hasegawa, H.; Duthie, M.; Schmidt, S. D.; Ramabhadran, T. V.; Nixon, R. A.; Mathews, P. M.; Gandy, S. E.; Mount, H. T.; St George-Hyslop, P. und Fraser, P. E. (2002): Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its binding to presenilins, *J Biol Chem* 277 [31], Seite 28135-42.
- Yang, J. M.; Lee, J.; Southern, J. F.; Warshaw, A. L.; Dhanak, E. und Lewandrowski, K. B. (1998): Measurement of pS2 protein in pancreatic cyst fluids. Evidence for a potential role of pS2 protein in the pathogenesis of mucinous cystic tumors, *Int J Pancreatol* 24 [3], Seite 181-6.
- Yang, L. B.; Lindholm, K.; Yan, R.; Citron, M.; Xia, W.; Yang, X. L.; Beach, T.; Sue, L.; Wong, P.; Price, D.; Li, R. und Shen, Y. (2003): Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease, *Nat Med* 9 [1], Seite 3-4.
- Yankner, B. A. (1996): Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease, *Neuron* 16 [5], Seite 921-32.
- Yao, P. J. (2004): Synaptic frailty and clathrin-mediated synaptic vesicle trafficking in Alzheimer's disease, *Trends Neurosci* 27 [1], Seite 24-9.
- Younkin, S. G. (1998): The role of A beta 42 in Alzheimer's disease, *J Physiol Paris* 92 [3-4], Seite 289-92.
- Yu, C.; Kim, S. H.; Ikeuchi, T.; Xu, H.; Gasparini, L.; Wang, R. und Sisodia, S. S. (2001): Characterization of a presenilin-mediated APP carboxyl terminal fragment CTF γ : evidence for distinct mechanisms involved in γ -secretase processing of the APP and Notch1 transmembrane domains, *J Biol Chem* 276, Seite 43756-43760.
- Yu, G.; Chen, F.; Levesque, G.; Nishimura, M.; Zhang, D. M.; Levesque, L.; Rogaeva, E.; Xu, D.; Liang, Y.; Duthie, M.; St George-Hyslop, P. H. und 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 [26], Seite 16470-5.
- 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.; Aebbersold, R.; Farrer, L. S.; Sorbi, S.; Bruni, A.; Fraser, P. und St George-Hyslop, P. (2000): Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing, *Nature* 407 [6800], Seite 48-54.
- Zhang, Z.; Nadeau, P.; Song, W.; Donoviel, D.; Yuan, M.; Bernstein, A. und Yankner, B. A. (2000): Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1, *Nat Cell Biol* 2 [7], Seite 463-5.
- Zheng, H.; Jiang, M.; Trumbauer, M. E.; Sirinathsinghji, D. J.; Hopkins, R.; Smith, D. W.; Heavens, R. P.; Dawson, G. R.; Boyce, S.; Conner, M. W. und et al. (1995): beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity, *Cell* 81 [4], Seite 525-31.
- Zhou, C.; Yang, Y. und Jong, A. Y. (1990): Mini-prep in ten minutes, *Biotechniques* 8 [2], Seite 172-3.

Anhang

Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel für die Betreuung der Arbeit danken und dafür, es mir ermöglicht zu haben ein lange geplantes Projekt tatsächlich umsetzen zu können.

Prof. Dr. Christian Haass danke ich für die große Unterstützung in all den Jahren der Zusammenarbeit, seinen inspirierenden Enthusiasmus und seine grenzenlose Energie.

Prof. Dr. Dennis Selkoe danke ich für den Einstieg in die Erforschung der Alzheimer Krankheit.

Allen die kleine und große Stücke dieser Arbeit Korrektur gelesen haben danke ich recht herzlich: Regina Fluhrer, Sven Lammich, Christoph Kaether, Christof Haffner, Alice Sülzen, Michael Willem und Manfred Gellert, der, obwohl er nichts verstand, sich um die richtige Verteilung der Kommata bemüht hat.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich und besonders dem kleinen Frauenlabor für Harmonie, Spaß und Käsebrötchen im rauen Forscheralltag: Christine Wild-Bode, Sabine Merkl, Alice Sülzen und Katrin Fellerer.

Natürlich danke ich auch denen, die mich immer wieder erinnert haben, dass ich meine Dissertation schreibe und ein bisschen mehr denen die wussten, dass ich es zu Ende bringen werde.

Ich danke meinen Eltern und meinen Freunden besonders Brigitte, die mich im letzten Jahr weniger aber ein bisschen angespannter ertragen mussten. Erwin danke ich für die liebevolle Unterstützung, seine (in letzter Zeit) große Ausgeglichenheit und das gute Essen.

Erklärung

Ich erkläre die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt. Ich erkläre, dass ich mich nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe und keinen entsprechenden Doktorgrad besitze.

München, den 24.02.2005

(Anja Capell)

Lebenslauf

Anja Capell

Guldeinstraße 45
80339 München

Tel.: (089) 54072872 (privat) / (089) 2180 75484 (Labor)
acapell@med.uni-muenchen.de

Persönliche Daten geboren am 23. Dezember 1960 in Hamburg,
ledig

Ausbildung

1967 - 1971 Grundschole in Hamburg
1971 - 1980 Neusprachlich-Naturwissenschaftliches Gymnasium
Juni 1980 Allgemeine Hochschulreife

1980 - 1984 Studium an der Fachhochschule Hamburg
Fachrichtung: Bio-Ingenieurwesen
Studienrichtung: Umwelttechnik
Nov. 1984 Abschluß: Diplom Ingenieurin (FH)

Beruflicher Werdegang

Feb.1985 - Sept.1986 Ingenieurin in der Arbeitsgruppe Meßtechnik der
Ingenieursgesellschaft Goepfert, Reimer und Partner

Okt.1986 - Dez.1987 Technische Assistentin an der Universität Hamburg,
Institut für Physiologische Chemie

Jan. 1988 - Juli 1992 Bio-Ingenieurin in der Biochemie und in der Dermatologie des
Hautforschungszentrums der Beiersdorf AG, Hamburg

Aug. 1992 - März 1994 **USA** **Career Trainings Programm** der Carl Duisberg Gesellschaft
"Research Associate" bei International Biotechnology Lab. Inc.,
Cambridge, MA
"Research Technologist" am "Center for Neurologic Diseases,
Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School"

April 1994 - Mai 1995 **USA** "Research Fellow" bei Prof. Dennis J. Selkoe
in der Neurologie des „Massachusetts General Hosp./
Brigham and Women's Hosp., Harvard Medical School"

Juli 1995 – Juni 1999 Wissenschaftliche Angestellte am Zentralinstitut für Seelische
Gesundheit, Mannheim, in der Abteilung Molekularbiologie

Seit Juli 1999 Projektleiterin bei Prof. Dr. Christian Haass
Angestellte an der Ludwig-Maximilians-Universität
München, am Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie

Januar 2000 Beginn mit experimentellen Arbeiten zur Dissertation
März 2003 Zulassung zur Promotion an der Humboldt-Universität zu Berlin

München, den 24.02.2005

(Anja Capell)

Publikationen

Capell A., Beher D., Prokop S., Steiner H., Kaether C., Shearman M.S., Haass C. (2004) Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.*; in press.

Kaether C., **Capell A.**, Edbauer D., Winkler E., Novak B., Steiner H., Haass C. (2004) The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and gamma-secretase activity. *EMBO J.* 23(24); 4738-4748.

Peters N., Opherck C., Zacherle S., **Capell A.**, Gempel P., Dichgans M. (2004) CADASIL-associated Notch3 mutations have differential effects both on ligand binding and ligand-induced Notch3 receptor signaling through RBP-Jk. *Exp. Cell. Res.* 299(2); 454-464.

Capell A., Kaether C., Edbauer D., Shirotani K., Merkl S., Steiner H., Haass C. (2003) Nicastrin interacts with gamma-secretase complex components via the N-terminal part of its transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* 278(52); 52519-52523.

Shirotani K., Edbauer D., **Capell A.**, Schmitz J., Steiner H., Haass C. (2003) Gamma-secretase activity is associated with a conformational change of nicastrin. *J. Biol. Chem.* 278(19); 16474-16477

Lammich S., Okochi M., Takeda M., Kaether C., **Capell A.**, Zimmer K., Edbauer D., Walter J., Steiner H., Haass C. (2002) Presenilin dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an A β -like peptide. *J. Biol. Chem.* 277(47); 44754-44759.

Kaether C., Lammich S., Edbauer D., Ertl M., Rietdorf J., **Capell A.**, Steiner H., Haass C. (2002). Presenilin-1 affects trafficking and processing of β APP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 158(3); 551-561.

Fluhrer R., **Capell A.**, Westmeyer G., Willem M., Hartung B., Condrón M.M., Teplow D.B., Haass C., Walter J. (2002) A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway. *J. Neurochem.* 81(5); 1011-1020.

Moehlmann T., Winkler E., Xia X., Edbauer D., Murrell J., **Capell A.**, Kaether C., Zheng H., Ghetti B., Haass C., Steiner H. (2002) Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on A β 42 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(12); 8025-8030.

Capell A., Meyn L., Fluhrer R., Teplow D.B., Walter J., Haass C. (2002) Apical sorting of β -secretase limits amyloid β -peptide production. *J. Biol. Chem.* 277(7); 5637-5643.

Sastre M., Steiner H., Fuchs K., **Capell A.**, Multhaup G., Condrón 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.

Walter J., Fluhrer R., Hartung B., Willem M., Kaether C., **Capell A.**, Lammich S., Multhaup G., Haass C. (2001) Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J. Biol. Chem.* 276(18); 14634-14641.

Okochi M., Eimer S., Bottcher A., Baumeister R., Romig H., Walter J., **Capell A.**, Steiner H., Haass C. (2000) A Loss of Function Mutant of the Presenilin Homologue SEL-12 Undergoes Aberrant Endoproteolysis in *Caenorhabditis elegans* and Increases A β 42 Generation in Human Cells. *J. Biol. Chem.* 275(52); 40925-40932.

Steiner H., Kostka M., Romig H., Basset G., Pesold B., Hardy J., **Capell A.**, Meyn L., Grim M.L., Baumeister R., Fichtler K., Haass C. (2000). Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat. Cell Biol.* 2(11); 848-851.

Capell A., Steiner H., Willem M., Kaiser H., Meyer C., Walter J., Lammich S., Multhaup G., Haass C. (2000) Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J. Biol. Chem.* 275(40); 30849-30854.

Kulic L., Walter J., Multhaup G., Teplow D.B., Baumeister R., Romig H., **Capell A.**, Steiner H., Haass C. (2000). Separation of presenilin function in amyloid beta-peptide generation and endoproteolysis of Notch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 23, 97(11); 5913-5918.

Capell A., Steiner H., Romig H., Keck S., Baader M., Grim MG., Baumeister R., Haass C. (2000) Presenilin-1 differentially facilitates endoproteolysis of the beta-amyloid precursor protein and Notch. *Nat. Cell Biol.* 2(4); 205-211.

Steiner H., **Capell A.**, Leimer U., Haass C. (1999) Genes and mechanisms involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci.* 249(6); 266-270. Review.

Steiner H., Duff K., **Capell A.**, Romig H., Grim M.G., Lincoln S., Hardy J., Yu X., Picciano M., Fichtler K., Citron M., Kopan R., Pesold B., Keck S., Baader M., Tomita T., Iwatsubo T., Baumeister R., Haass C. (1999) A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling. *J. Biol. Chem.* 1, 274(40); 28669-73.

Guenette S.Y., Chen J., Ferland A., Haass C., **Capell A.**, Tanzi R.E. (1999) hFE65L influences amyloid precursor protein maturation and secretion. *J. Neurochem.* 73(3); 985-993.

Steiner H., **Capell A.**, Haass C. (1999) Proteolytic processing and degradation of Alzheimer's disease relevant proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 27(2); 234-242. Review.

Grünberg J., Walter J., Eckman C., **Capell A.**, Schindzielorz A., Younkin S., Mehta N., Hardy J., Haass C. (1998) Truncated presenilin 2 derived from differentially spliced mRNA does not affect the ratio of amyloid beta-peptide 1-42/1-40. *Neuroreport* 9(14); 3293-3299.

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(48); 32322-32331.

Haass C., Grünberg J., **Capell A.**, Wild-Bode C., Leimer U., Walter J., Yamazaki T., Ihara I., Zweckbronner I., Jakubek C., Baumeister R. (1998) Proteolytic processing of Alzheimer's disease associated proteins. *J. Neural. Transm. Suppl.* 53; 159-167. Review.

Capell A., Grünberg J., Pesold B., Diehlmann A., Citron M., Nixon R., Beyreuther K., Selkoe D.J. and Haass C. (1998) The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150 kDa molecular mass complex. *J. Biol. Chem.* 273(6); 3205-3211

Oyama F., Sawamura N., Kobayashi K., Morishima-Kawashima M., Kuramochi T., Ito M., Tomita T., Maruyama K., Saido T.C., Iwatsubo T., **Capell A.**, Walter J., Grünberg J., Ueyama Y., Haass C., Ihara Y. (1998) Mutant presenilin 2 transgenic mouse: effect on an age-dependent increase of amyloid beta-protein 42 in the brain. *J. Neurochem.* 71(1); 313-322

Capell A., Saffrich R., Olivio J.-C., Meyn L., Walter J., Grünberg J., Dotti C. and Haass C. (1997) Cellular expression and proteolytic processing of presenilin proteins is developmentally regulated during neuronal differentiation. *J. Neurochem.* 69(6); 2432-2440

Tomita T., Maruyama K., Saido T., Kume H., Shinozaki K., Tokohiro S., Haass C., **Capell A.**, Walter J., Grünberg J., Iwatsubo T. and Obata K. (1997) The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer's disease increases the secretion of Amyloid β -protein ending at A β 42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (5); 2025-2030.

Walter J., Grünberg J., **Capell A.**, Pesold B., Schindzierlorz A., Mendla K., St George Hyslop P., Selkoe D. J. and Haass C. (1997) Proteolytic processing of presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (10); 5349-5354.

Walter J., **Capell A.**, Hung A.Y., Langen, H., Schnölzer M., Thinakaran G., Sisodia S. S., Selkoe D.J. and Haass C. (1996) Ectodomain phosphorylation of β -Amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J. Biol. Chem.* 272(3); 1896-1903.

Wild-Bode C.*, Yamazaki T.*, **Capell A.***, Leimer U., Steiner H., Ihara Y. and Haass C. (1997) Intracellular generation and accumulation of Amyloid β -peptide terminating at amino acid 42. *J. Biol. Chem.* 272(26); 16085-16088.

*** the first three authors contributed equally to this manuscript**

Walter J., **Capell A.**, Grünberg J., Pesold B., Schindzielorz A., Prior R., Podlisny M., Fraser P., St George Hyslop P., Selkoe D.J. and Haass C. (1996) The Alzheimer's disease associated presenilins are differentially phosphorylated proteins located predominantly within the endoplasmic reticulum. *Molecular Medicine* 2(6); 673-691.

Capell A., Teplow D.B., Citron M., Selkoe D.J. and Haass C. (1996) Substitution of phenylalanine by proline at position 19 of amyloid- β peptide results in the inhibition of protein kinase C mediated decrease of amyloidogenic processing; *Amyloid* 3; 150-155.

Citron M., Diehl T.S., **Capell A.**, Haass C., Teplow D.B. and Selkoe D.J. (1996) Inhibition of Amyloid β -Protein production in neural cells by the serine protease inhibitor AEBSF. *Neuron* 17(1); 171-17

Haass C., Koo E.H., **Capell A.**, Teplow D.B. and Selkoe D.J. (1995) Polarized sorting of β -Amyloid precursor protein and its proteolytic products in MDCK cells is regulated by two independent signals. *J. Cell Biol.* 128(4); 537-547.

Haass C., **Capell A.**, Citron M., Teplow D.B. and Selkoe D.J. (1995) The vacuolar H⁺-ATPase inhibitor Bafilomycin A1 differentially affects proteolytic processing of mutant and wild-type β -amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 270(11); 6186-6192.

Haass C., Lemere C.A., **Capell A.**, Citron M., Seubert P., Schenk D., Lannfelt L. and Selkoe D.J. (1995) β -Secretase cleavage of β -Amyloid precursor protein with the Swedish mutation occurs within the secretory pathway after the trans-Golgi network. *Nature Medicine* 1(12); 1291-1296.

München, den 24.02.2005

(Anja Capell)