

AUS DEM ADOLF-BUTENANDT-INSTITUT FÜR
STOFFWECHSELBIOCHEMIE DER
LUDWIGS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORSTAND: PROF. DR.RER.NAT. CHRISTIAN HAASS

**Untersuchungen zur Substratselektion und
pharmakologischen Modulierbarkeit der γ -Sekretase**

DISSERTATION
ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN
AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von

BENEDIKT DAVID PATRICK KRETNER

aus München

2014

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.rer.nat. Harald Steiner

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Rupert Egensperger
Prof. Dr. med. Christoph Schmitz
Prof. Dr. Michael Ewers

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: -

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2014

Eidesstattliche Versicherung

Kretner, Benedikt

Name, Vorname

Brunhamstr. 44

Straße, Hausnummer

81249 München

PLZ, Ort

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchungen zur Substratselektion und pharmakologischen Modulierbarkeit der γ -Sekretase

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 30. März 2013

Benedikt Kretner

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht, Nachdrucke befinden sich im Anhang:

B. Kretner, A. Fukumori, A. Gutsmedl, R. Page, T. Luebbbers, G. Galley, K. Baumann, C. Haass, and H. Steiner. Attenuated A β ₄₂ responses to low potency γ -secretase modulators can be overcome for many pathogenic presenilin mutants by second-generation compounds. *J Biol Chem*, 286(17):15240-51, 2011.

B. Kretner, A. Fukumori, P.-H. Kuhn, B. I. Pérez-Revuelta, S. F. Lichtenthaler, C. Haass, and H. Steiner. Important functional role for APP substrate cleavage specificity and substrate selectivity of γ -secretase. *J Neurochem*, 125(1):144-56, 2013.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	6
1.1 Die Alzheimer-Erkrankung	6
1.1.1 Genetik der Alzheimer-Erkrankung	7
1.2 Die Amyloidkaskaden-Hypothese	9
1.3 Das Amyloid-Vorläuferprotein	10
1.4 Die APP Prozessierung	10
1.4.1 Die α -Sekretase	11
1.4.2 Die β -Sekretase	12
1.4.3 Die sequentielle Prozessierung durch die γ -Sekretase	13
1.5 Die γ -Sekretase	16
1.5.1 Komponenten des γ -Sekretasekomplexes	16
1.5.1.1 Presenilin	16
1.5.1.2 Nicastrin (NCT), APH-1 und PEN-2	18
1.6 Substrate der γ -Sekretase	19
1.6.1 Notch	20
1.6.2 CD44	21
1.6.3 Substratselektion der γ -Sekretase	21
1.7 Die γ -Sekretase als therapeutischer Angriffspunkt	23
1.7.1 γ -Sekretaseinhibitoren (GSIs)	23
1.7.2 γ -Sekretasemodulatoren (GSMs)	24
1.8 Zielsetzung der Arbeit	27
2 Ergebnisse und Diskussion	30
2.1 Position x des GxGD-Motivs in PS beeinflusst die Schnittspezifität und Substratselektion der γ -Sekretase (Publikation 1)	30
2.2 GSMs der zweiten Generation überwinden die abgeschwächte $A\beta_{42}$ -Antwort von schwach-potenten GSMs (Publikation 2)	33
2.3 Ausblick	36
3 Material und Methoden	38
3.1 Antikörper	38
3.1.1 Monoklonale Antikörper	38
3.1.2 Polyklonale Antikörper	38
3.1.3 Zweit-Antikörper	38
3.2 Konstrukte und Vektoren	39
3.3 Zellkultur und cDNA-Transfektion	39
3.4 GSM-Behandlung	40
3.5 Proteinbiochemie	40
3.5.1 Gesamtzellysate	40
3.5.2 Immunpräzipitation	41
3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Immunoblot	41
3.5.4 Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECL-IA)	41
3.5.5 Massenspektrometrie (MS)	41
3.6 Statistik	42
Literatur	43

IUPAC-Namen der verwendeten Substanzen	70
Abkürzungsverzeichnis	70
Danksagung	73
Lebenslauf	74
Publikationen	75
Publikation 1	76
Publikation 2	92

Zusammenfassung

Die Alzheimer-Erkrankung ist die häufigste Form der Demenz, von der bis zu 10% der über 65-Jährigen betroffen sind. Aufgrund der weltweit steigenden Lebenserwartung sowie dem Fehlen effektiver Therapiemöglichkeiten stellt sie eine der größten medizinischen Herausforderungen der Zukunft dar.

Eine bedeutende Rolle in der Pathogenese spielt das Amyloid- β ($A\beta$)-Peptid, das über neurotoxische, lösliche Vorstufen zu extrazellulären Amyloidplaques, dem neuropathologischen Charakteristikum der Erkrankung, aggregiert. $A\beta$ entsteht durch sequentielle Proteolyse aus dem Amyloidvorläuferprotein (APP, engl. *amyloid precursor protein*). Im sogenannten amyloiden Weg wird, nach Abspaltung der APP-Ektodomäne durch die β -Sekretase, das verbleibende C-terminale Fragment (CTF) von der γ -Sekretase innerhalb der Membran prozessiert. Dabei wird die APP-intrazelluläre Domäne (AICD, engl. *APP intracellular domain*) ins Cytosol und das 37-43 Aminosäuren lange $A\beta$ -Peptid ins Lumen entlassen. Physiologisch bildet $A\beta_{40}$ mit 80-85% die Hauptspezies, die längeren $A\beta_{42/43}$ -Spezies, die deutlich stärker zur Aggregation neigen, werden dagegen nur in sehr geringen Mengen gebildet. Bei der genetisch bedingten Alzheimer-Erkrankung (FAD, engl. *familial Alzheimer's disease*) beruht der frühe Krankheitsbeginn meistens auf einer relativen Erhöhung von $A\beta_{42/43}$.

Die zentrale pathogenetische Stellung von $A\beta$ macht sowohl die β - als auch die γ -Sekretase zu prädestinierten therapeutischen Angriffspunkten. Im Gegensatz zu β -Sekretaseinhibitoren ist die klinische Erprobung von einigen γ -Sekretaseinhibitoren (GSIs) bereits so weit fortgeschritten, dass Ergebnisse von klinischen Phase-III-Studien vorliegen. Enttäuschenderweise erwies sich die klinische Anwendung von GSIs jedoch aufgrund des breiten Substratspektrums der γ -Sekretase als äußerst problematisch. Neben APP ist Notch1 das bedeutendste γ -Sekretasesubstrat, dessen ICD wichtige Gene der Zelldifferenzierung reguliert. Insbesondere Hemmung des Notch-Signalwegs ist mit ernstesten Nebenwirkungen assoziiert. Als mögliche therapeutische Alternative gelten APP-selektive GSIs, die bereits klinisch getestet werden. Um Einblick in den Mechanismus der APP-Selektivität dieser so genannten *Notch sparing* GSIs zu erhalten, ist ein detailliertes Verständnis der Substratelektion der γ -Sekretase von entscheidender Bedeutung.

Bei der γ -Sekretase handelt es sich um einen Proteinkomplex, bestehend aus vier essentiellen Untereinheiten: Presenilin (PS) 1 oder 2, Nicastrin, APH-1a oder b und PEN-2. Mutationen in PS, der katalytischen Untereinheit, sind für die meisten der FAD-Fälle verantwortlich. PS besitzt ein konserviertes GxGD-Motiv im aktiven Zentrum, das mit dem Andocken von Substraten in Verbindung gebracht wurde. Während die beiden hochkonservierten Glycine in erster Linie essentiell für die katalytische Aktivität sind, wurde die weniger gut charakterisierte Position x, L383 in PS1, mit der Differenzierung

der Substrate APP/Notch1 in Verbindung gebracht.

Um die Funktion von L383 besser zu verstehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine intensive Mutagenesestudie durchgeführt. Erstaunlicherweise wurde die APP-Prozessierung durch Veränderung an dieser Stelle nur wenig beeinträchtigt, während die Schnittspezifität der γ -Sekretase z.T. erheblich beeinflusst wurde. Mit einer Ausnahme produzierten alle Mutanten sehr niedrige Spiegel der kurzen $A\beta_{37-39}$ -Spezies, wobei einige zusätzlich die pathogenen $A\beta_{42/43}$ -Spezies erhöhten. Interessanterweise führte ein Teil der pathogenen Mutanten zu einer starken Reduktion der Prozessierung von Notch1 und CD44, die ansonsten von den anderen Mutanten relativ gut prozessiert wurden.

L383 ist also weniger kritisch für die katalytische Aktivität der γ -Sekretase als die beiden benachbarten Glycine, sondern scheint stärker Einfluss auf die Substratdifferenzierung zu nehmen. Zusammen mit den beiden benachbarten Glycinen gewährleistet L383 wahrscheinlich die räumliche Struktur für eine optimale Bindung und/oder Prozessierung von Substraten.

γ -Sekretasemodulatoren (GSMs) werden im Vergleich zu GSIs als deutlich sicherere Alternative angesehen, da sie lediglich das Verhältnis der $A\beta$ -Peptide zugunsten der weniger toxischen, kurzen $A\beta_{37/38}$ verschieben, ohne die Freisetzung der AICD zu beeinflussen. Auch die Freisetzung der ICDs anderer γ -Sekretasesubstrate, insbesondere der Notch1-ICD, wird durch GSMs nicht beeinträchtigt. Allerdings waren die ersten GSMs, nicht-steroidale Entzündungshemmer (NSAIDs, engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*), nicht in der Lage, die $A\beta_{42}$ -Spiegel von aggressiven PS-FAD-Mutationen abzusenkten. Die neueren GSMs der zweiten Generation sind jedoch deutlich potenter als die klassischen NSAIDs. Doch konnte der NSAID-ähnliche GSM-1 die $A\beta_{42}$ -Spiegel zweier aggressiver PS-Mutationen ebenfalls nicht absenkten. Zu Beginn dieser Arbeit war unklar, ob dieser Befund auch für andere aggressive PS-Mutationen gilt. Für GSMs der zweiten Generation gab es im Gegensatz zu den NSAIDs zum damaligen Zeitpunkt keine systematischen Untersuchungen, ob Erstere $A\beta_{42}$ bei aggressiven PS-Mutanten absenkten können.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die $A\beta_{42}$ -Antwort einer Reihe über das gesamte Molekül verteilter PS-Mutationen auf Behandlung mit GSM-1 untersucht. Dabei wurde die überraschende Beobachtung gemacht, dass GSM-1 im Gegensatz zu dem weniger potenten NSAID Sulindac Sulfid die $A\beta_{42}$ -Spiegel der meisten untersuchten PS-Mutationen deutlich absenkten kann. Die aggressive FAD-Mutante L166P war eine der wenigen PS1-Mutationen, deren $A\beta_{42}$ -Spiegel sich nicht durch GSM-1 absenkten ließen. Position L166 erwies sich als besonders kritisch für die Reduktion von $A\beta_{42}$ durch GSMs. Um ein besseres Verständnis für den Wirkmechanismus sowie die potentielle GSM-Bindungsstelle zu erhalten, wurde im Anschluss das

Verhalten von PS1 und 2 auf GSM-1-Behandlung verglichen. Interessanterweise reagierten sowohl PS1/2 Wildtyp (WT) als auch homologe PS1/2 Mutationen unterschiedlich auf Behandlung mit GSM-1, was eine nicht exakt konservierte Bindungsstelle nahelegt. Schließlich wurden noch zwei weitere hochpotente neuere GSMs untersucht, die mit GSM-1 keine chemische Verwandtschaft aufweisen. Diese zeigten ein sehr ähnliches Profil wie GSM-1, was eine(n) ähnliche(n) Wirkungsmechanismus bzw. Bindungsstelle vermuten lässt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass von der Entwicklung neuer potenter GSMs mit günstigen pharmakologischen Eigenschaften nicht nur Patienten mit sporadischer Alzheimer-Erkrankung, sondern auch solche mit PS-FAD-Mutationen profitieren könnten. Für diese Patientengruppe müsste allerdings individuell für jede PS-Mutation ein passender GSM ausgewählt werden, da eine positive $A\beta_{42}$ -Antwort sowohl von der jeweiligen Mutation als auch vom verwendeten GSM abhängt.

Summary

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent form of dementia worldwide affecting about 10% of the population over 65 years. Due to the rising life expectancy and the lack of an effective disease modifying therapy, AD belongs already today to the most urgent medical problems.

An invariant pathological hallmark of AD is the accumulation of extracellular neuritic plaques, which are mainly composed of the amyloid β -peptide ($A\beta$). Before aggregating to insoluble plaques, $A\beta$ -species form soluble oligomers, which are believed to be neurotoxic thus playing a major role in AD pathogenesis. $A\beta$ is generated by stepwise proteolysis of the β -amyloid precursor protein (APP), a type I transmembrane protein. In the amyloidogenic pathway, APP is first cleaved by β -secretase, which removes the APP ectodomain. The remaining C-terminal fragment (CTF) is subsequently cleaved by γ -secretase within the membrane resulting in the release of the APP-intracellular domain (AICD) to the cytosol and the secretion of 37-43 amino acid long $A\beta$ -species. Under physiological conditions $A\beta_{40}$ is the predominant species, whereas the minor but slightly longer $A\beta_{42/43}$ -species are more prone to aggregation. Most early-onset forms of familial Alzheimer's disease (FAD) shift the cleavage specificity towards an increased production of $A\beta_{42/43}$.

Lowering $A\beta$ production by inhibiting β - or γ -secretase seems to be a promising therapeutic approach. Unlike β -secretase inhibitors, some γ -secretase inhibitors (GSIs) have already advanced to clinical phase III studies. However, due to the broad spectrum of γ -secretase substrates, the clinical use of GSIs turned out to be critical. Besides APP, γ -secretase cleaves a wide range of type I membrane proteins of which Notch1

is the most important one. The Notch1-ICD released by γ -secretase has an important signaling function for cell differentiation. To avoid the severe side effects associated with Notch-inhibition by GSIs, so-called Notch-sparing GSIs represent a valuable alternative, whose development demands a detailed knowledge about the substrate selection of γ -secretase.

γ -Secretase is a protein complex consisting of four essential subunits, presenilin (PS) 1 or 2, nicastrin, APH-1a or b and PEN-2. PS represents the catalytic subunit harboring a highly conserved GxGD active site motif and PS mutations account for most FAD cases. Mutagenesis studies have shown that both glycine residues of the GxGD motif are mostly essential for catalytic activity, whereas the less well characterised position x, L383 in PS1, was found to affect APP/Notch1 substrate selectivity. To gain further insight into the function of L383 an extensive mutagenesis study was performed revealing that processing of APP was relatively well tolerated over a wide range of hydrophobic and hydrophilic mutations, whereas all mutations changed the cleavage specificity. All except one of the mutations produced reduced levels of the short $A\beta_{37-39}$ -species, and several increased the pathogenic $A\beta_{42/43}$ -species. Intriguingly, some of the $A\beta_{42/43}$ -increasing mutants also strongly reduced the processing of Notch1 and CD44, which were well processed by the other L383 mutations. In conclusion, L383 is less critical for the catalytic activity than the neighboring glycine residues and permits substrate selectivity. The data suggest that the GLGD motif in PS1 constitutes the spatial arrangement that is critical for cleavage and/or docking of different γ -secretase substrates.

γ -Secretase modulators (GSMs) selectively lower $A\beta_{42}$ without affecting the generation of the AICD as well as the ICDs of other substrates including Notch1. GSMs are thus considered to be therapeutically much safer drugs than GSIs. However, aggressive PS FAD mutations were shown to be resistant toward the $A\beta_{42}$ -lowering effect of first generation GSMs, mainly non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Meanwhile, second generation GSMs have been developed, which are considerably more potent than the classical NSAID-type GSMs. Nevertheless, the NSAID-like GSM-1 was also not able to lower the $A\beta_{42}$ -levels of two aggressive PS mutations, but it was not clear yet, if this result can be generalized for other aggressive PS mutations. In contrast to NSAIDs, systematic studies with second generation GSMs were lacking at the beginning of this study.

To address this question, a wide range of PS mutations covering the whole molecule were treated with GSMs in the second part of this study. Surprisingly, in contrast to the NSAID sulindac sulfide, the more potent GSM-1 efficiently lowered $A\beta_{42}$ -levels of most investigated mutations. Among the few mutations which did not respond with reduction of $A\beta_{42}$ upon GSM treatment was the aggressive L166P FAD mutation, and residue L166

turned out to be particularly critical with regard to the $A\beta_{42}$ -lowering effect of GSM-1 treatment. To get further insight into the mode of action and the potential GSM binding site in PS, the behavior of PS1 and 2 upon GSM-1 treatment was compared. Intriguingly, wild type (WT) PS1/2 as well as some mutations at homologous positions in PS1/2 displayed a differential $A\beta_{42}$ response to GSM-1 treatment suggesting that the spatial environment in γ -secretase is crucial for a positive GSM-1 response. Moreover, the binding site of GSMs is probably not fully conserved between the two PS homologues. Finally, treatment of PS1 mutations with two highly potent GSMs with distinct chemical structure from GSM-1 lead to very similar $A\beta_{42}$ -responses compared to GSM-1.

As highly potent second generation GSMs can overcome the $A\beta_{42}$ resistance of most PS mutations to first generation GSMs, they appear to be promising therapeutics, not only for sporadic AD but in particular for FAD patients. Since the $A\beta_{42}$ -responsiveness depends on the particular PS mutation, the GSMs must be carefully chosen for those patients.

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer-Erkrankung

Der Morbus Alzheimer [2, 3] ist mit ca. 60% die häufigste Form der Demenz. Aktuell wird die Zahl der Betroffenen weltweit auf über 30 Millionen geschätzt, ca. eine Million davon in Deutschland [4, 5]. Bei etwa 4,6 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr geht man von einer Verdopplung der Prävalenz alle 20 Jahre aus [4]. Die hieraus erwachsende finanzielle Belastung stellt eine enorme Herausforderung für die globalen Gesundheitssysteme dar [6–8], insbesondere für Entwicklungsländer, in denen aufgrund steigender Lebenserwartung nach WHO-Angaben 2050 etwa 70% der Demenzpatienten leben werden [9, 10]. Das klinische Krankheitsbild wurde erstmals 1901 von Alois Alzheimer beschrieben und ist durch langsam progrediente Gedächtnisstörungen sowie im weiteren Verlauf den zunehmenden Verlust höherer kognitiver Funktionen gekennzeichnet [11]. In seinen Post-mortem-Analysen beobachtete Alzheimer eine ausgeprägte Hirnatrophie sowie die pathognomonischen extrazellulären Amyloidplaques und die intraneuronalen neurofibrillären Bündel [12, 13] (siehe Abb.1). Es wurden diverse Subtypen von Amyloidplaques beschrieben (eine gute Übersicht bietet [14]), die teilweise auch bei kognitiv unauffälligen Personen vorkommen [15]. Spezifisch mit der Alzheimer-Erkrankung assoziiert sind die sogenannten neuritischen Plaques [16], die aus einem dichten Kern von Amyloidfibrillen bestehen, in dessen Umgebung dystrophe Neuriten sowie reaktive Gliazellen zu finden sind [17, 18](siehe Abb.1). Hauptkomponente der Amyloidplaques sind die 37-43 Aminosäuren (AS) langen Amyloid- β ($A\beta$)-Peptide, Spaltprodukte des Amyloidvorläuferproteins (APP, engl. *amyloid precursor protein*) [19–22], wobei dem

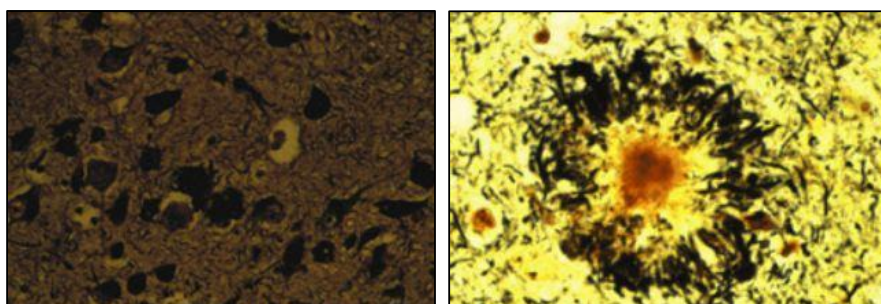


Abbildung 1: **Histopathologische Hauptmerkmale der Alzheimer-Erkrankung.** *Links* Neurofibrilläre Bündel kommen in der Silberfärbung schwarz zur Darstellung und füllen Zellkörper und Fortsätze pyramidaler Neurone aus. *Rechts* In der Bildmitte ist ein silbergefärbter Amyloidplaque zu sehen, der aus dicht gepackten $A\beta$ -Fibrillen besteht. Er ist umgeben von dystrophen Neuriten, die mit neurofibrillären Bündeln angefüllt sind. Entnommen aus [1].

A β ₄₂-Peptid essentielle Bedeutung für die Entstehung von Amyloidplaques zukommt [23, 24]. Die physiologische Bedeutung der A β -Peptide ist unklar (siehe 1.4.3). Auf die Bedeutung der Plaques und ihrer oligomeren Vorstufen wird ausführlich im Kapitel über die Amyloidkaskaden-Hypothese eingegangen (siehe 1.2.). Die neurofibrillären Bündel (NFTs, engl. *neurofibrillary tangles*) bestehen aus phosphorylierten Formen des Mikrotubuli-assoziierten Tau-Proteins [25, 26]. Physiologisch dient das Tau-Protein der Assemblierung und der Stabilisierung von Mikrotubuli [27], welche bei axonalen Transportprozessen eine wichtige Rolle spielen [28]. NFTs sind nicht spezifisch für die Alzheimer-Erkrankung, sondern pathologisches Hauptmerkmal einiger weiterer neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. der frontotemporalen Demenz (eine gute Übersicht bietet [29]). Im Gegensatz zu den Amyloidplaques folgt die Ausbreitung der NFTs einem relativ stereotypen Muster und korreliert besser mit der klinischen Symptomatik [30, 31]. Die NFTs entwickeln sich in subklinischen Stadien zunächst im Hippocampus sowie entorhinalen Cortex [32] und sind bei Auftreten im Neocortex meist mit klinischen Symptomen assoziiert [33].

Trotz intensiver Bemühungen sind die derzeitigen Therapiemöglichkeiten sehr begrenzt. Die zugelassenen Arzneimittel, Cholinesteraseinhibitoren und NMDA-Rezeptor-Antagonisten, führen lediglich zu einer Verzögerung des Krankheitsverlaufs um einige Monate [34, 35]. Aufgrund der enormen sozioökonomischen Herausforderungen kommt der Entwicklung wirksamer Therapiestrategien besondere Bedeutung zu.

1.1.1 Genetik der Alzheimer-Erkrankung

Bei der Alzheimer-Erkrankung wird die sporadische von der familiären Form unterschieden, wobei letztere lediglich für ca. 1-5% der Erkrankungsfälle verantwortlich ist [36]. Die Varianten der familiären Alzheimer-Erkrankung (FAD, engl. *familial Alzheimer's disease*) werden meist zwischen dem 30. und dem 60. Lebensjahr klinisch manifest (*early-onset*) und weisen einen autosomal-dominanten Erbgang auf, dem Mutationen in APP [37], Presenilin 1 (PS1) [38] oder Presenilin 2 (PS2) [39, 40] zugrunde liegen. PS1/2 bildet die katalytische Untereinheit der γ -Sekretase, eines Proteinkomplexes, der den letzten Schritt der A β -Bildung vermittelt (für detailliertere Informationen zu APP und PS siehe 1.3 bzw. 1.5.1.1) Eine umfassende Liste aller bekannten Mutationen ist in der von Marc Cruts betreuten Datenbank¹ zu finden. Allgemein begünstigen diese Mutationen die A β -Aggregation, indem sie entweder Gesamt-A β [41] oder den relativen Anteil von A β ₄₂ [42, 43], selten auch von A β ₄₃ [44] erhöhen. Einige APP-Mutationen verändern die physikochemischen Eigenschaften des A β -Peptids im Sinne einer erhöhten

¹www.molgen.ua.ac.be/ADmutations

Aggregationsneigung und/oder Toxizität (eine gute Übersicht bietet [45]). Ferner ist auch eine erhöhte Gendosis mit einer frühzeitigen Alzheimer-Demenz assoziiert, so etwa bei Duplikation des APP-Genlocus auf Chromosom 21 [46,47] oder bei der Trisomie des Chromosoms 21 (Down Syndrom) [48], auf dem das APP-Gen liegt [19–22].

Obwohl die meisten PS-FAD-Mutanten vergleichbare Mengen an Gesamt-A β produzieren, gibt es wenige Fälle wie z.B. PS1 L435F [49], die mit einem dramatischen Aktivitätsverlust einhergehen. Weiterhin zeigen einige PS-FAD-Mutationen einen Aktivitätsverlust bezüglich anderer γ -Sekretasesubstrate, insbesondere Notch1 [50–53], was gemäß der sogenannten „*loss of function*“-Theorie in entscheidendem Maße zur Pathogenese der familiären Alzheimer-Krankheit beitragen soll [54]. Allerdings gehen nicht alle PS-Mutationen mit einer Reduktion der γ -Sekretaseaktivität einher [51,55–58]. Des Weiteren wurden Mutationen in PS1, PEN-2 sowie NCT beschrieben, die mit einem Aktivitätsverlust der γ -Sekretase jedoch nicht mit einer Demenz assoziiert sind [59,60]. Außerdem können familiäre Erkrankungsfälle, denen APP-Mutationen zugrunde liegen, mit der *loss of function*-Hypothese nicht erklärt werden.

Die sporadische Alzheimer-Erkrankung tritt meist nach dem 60. Lebensjahr auf (*late-onset*) und hat eine multikausale Genese, bei der sich Umwelt- und genetische Faktoren über einen langen Zeitraum addieren. Der bedeutsamste Risikofaktor ist das Alter. So verdoppelt sich die Inzidenz ab dem 65. Lebensjahr alle 5 Jahre, so dass im Alter von 85 Jahren ca. jeder dritte Mensch von Alzheimer betroffen ist [61].

Der bedeutsamste genetische Risikofaktor ist das ϵ 4-Allel des Apolipoprotein E (ApoE)-Gens [62,63]. ApoE ist in Amyloidplaques nachweisbar [64,65] und für den cerebralen Lipidstoffwechsel von Bedeutung (gute Übersichten bieten [66,67]) und scheint eine Rolle im A β -Metabolismus zu spielen. So wird sein Einfluss auf die Fibrillogene- se [68,69], den Abbau [70] sowie den Abtransport von A β über die Bluthirnschranke [71,72] diskutiert. Relativ zum vorherrschenden ϵ 3-Allel weisen heterozygote Träger des ϵ 4-Allels ein dreifach erhöhtes, homozygote ein bis zu zwölfmal erhöhtes Erkrankungsrisiko auf [73]. Des Weiteren geht das Apo ϵ 4-Allel mit einem früheren Auftreten und einer stärkeren Ausprägung der Plauepathologie einher [74,75]. Im Gegensatz dazu weisen Träger des ϵ 2-Allels ein reduziertes Erkrankungsrisiko auf [76].

In den letzten Jahren wurden einige weitere genetische Risikofaktoren identifiziert, darunter SORL1 (kodiert für den Sortilin verwandten Rezeptor1) [77], CLU (kodiert für Clusterin) [78,79], PICALM (kodiert für das Phosphatidylinositol-bindende Clathrin-Assemblierungsprotein) [78], CR 1 (kodiert für den Komplementrezeptor 1, engl. *complement receptor 1*) [79,80], EPHA1 (kodiert für den Ephrin-Rezeptor A1) [81,82] und TREM2 (kodiert für den *triggering-receptor expressed on myeloid cells 2*) [83,84]. Diese Proteine übernehmen wichtige Aufgaben im Immunsystem und bei der Entzündungs-

antwort (CLU, CR1, EPHA1, TREM2), im Lipidmetabolismus (CLU) und bei der Endocytose (SORL1, PICALM) [85, 86]. Im Vergleich zu ApoE erhöhen diese Gene das Erkrankungsrisiko nur minimal, und es bleibt abzuwarten, inwieweit sie zur Pathogenese beitragen.

1.2 Die Amyloidkaskaden-Hypothese

Amyloidplaques sowie deren oligomere Vorstufen stehen im Zentrum der Amyloidkaskaden-Hypothese [87]. Sie ist das vorherrschende Modell zur Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung, auf deren Basis die meisten therapeutischen Strategien der letzten Jahre beruhen [18, 88]. Demnach steht die A β -Aggregation am Beginn der Pathogenese und löst die weiteren pathologischen Prozesse, wie Tau-Hyperphosphorylierung, NFT-Bildung, synaptische Dysfunktion und neuronalen Zelltod aus [17, 87]. Grundlage der Amyloidkaskaden-Hypothese war die Entdeckung, dass fast allen genetisch determinierten Alzheimer-Fällen eine Erhöhung entweder der A β -Gesamtproduktion [41] oder des Verhältnisses von A β_{42} /A β_{40} bzw. A β_{42} /Gesamt-A β [42, 43] zugrunde liegt. Dabei begünstigt der relative A β_{42} /A β_{40} -Anstieg die Aggregation stärker als der Anstieg der absoluten Konzentration [89]. Das stark hydrophobe A β_{42} zeichnet sich im Vergleich zu A β_{40} durch eine deutliche stärkere Aggregationsneigung aus [23, 90] und ist bei Mäusen essentiell für die Ausbildung der Amyloidplaques [24]. Kürzlich wurde für das A β_{43} eine mindestens ähnlich starke Toxizität nachgewiesen [44]. Wurden ursprünglich die Amyloidplaques als neurotoxisches Korrelat aufgefasst, rückten aufgrund ihrer besseren klinischen Korrelation zunehmend A β -Oligomere [91, 92], insbesondere Di- und Trimere, in den Fokus (eine gute Übersicht bietet [93]). Es wurde gezeigt, dass die A β -Oligomere neurotoxische Eigenschaften aufweisen, wie Inhibition der hippocampalen Langzeitpotenzierung (LTP) [94], Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität [95] sowie Induktion der Tau-Hyperphosphorylierung [96, 97]. Die Neurotoxizität der Oligomere scheint von Tau abhängig zu sein [98–100]. Ob darüber hinaus weitere Effekte zur Toxizität beitragen, ist trotz intensiver Forschung noch unklar (eine gute Übersicht bietet [93]). Es wurde eine direkte Schädigung der Zellmembran [101] oder Bindung einer Reihe von Rezeptoren, unter anderem NMDA-Rezeptoren [102, 103], vorgeschlagen.

Trotz starker Evidenz ist die Amyloidkaskaden-Hypothese keineswegs unumstritten [104], insbesondere ihre Rolle bei der sporadischen Erkrankung wird kontrovers diskutiert. Jüngst erhielt sie jedoch ein weiteres gewichtiges Argument mit der Identifizierung der APP-Mutation A673T, die durch Absenkung der A β -Level neuroprotektive Wirkung entfalten soll [105]. APP 673T korrelierte in einer großangelegten genetischen Assoziationsstudie bei über 85-jährigen mit einem normalen kognitiven Status [105].

1.3 Das Amyloid-Vorläuferprotein

APP gehört zu einer Familie konservierter Typ-I-Transmembranproteine [106], die in Säugetieren die drei Homologe APP [19–22], APLP1 [107] und APLP2 [108] umfasst. Diese stimmen in großen Bereichen konservierter Sequenz überein, insbesondere in den Domänen E1 und E2 der Ektodomäne sowie der Transmembrandomäne (TMD) und intrazellulären Domäne, wohingegen der juxtamembranöse Bereich des A β -Sequenzbereichs eine deutlich geringere Übereinstimmung aufweist [106]. APP und APLP2 werden ubiquitär, aber besonders stark im Gehirn exprimiert, während die Expression von APLP1 auf das Gehirn beschränkt ist [109]. Von APP werden verschiedene Spleißvarianten gebildet, wobei die drei häufigsten von 695, 751 und 770 AS Länge den A β -Sequenzbereich enthalten [110, 111]. APP770 und 751 werden vor allem in nicht-neuronalem Gewebe exprimiert und besitzen eine Domäne, die Serinproteasen vom Kunitztyp inhibiert [110, 112]. Diese fehlt in APP695, der vorherrschenden Isoform in Neuronen [113]. APP unterliegt während seines sekretorischen Transportwegs mehreren posttranslationalen Modifizierungen, darunter N- und O- Glykosylierungen sowie Phosphorylierungen [114].

Die physiologische Funktion des Volllängenproteins ist ungeachtet intensiver Forschung nach wie vor unklar (eine Übersicht möglicher Funktionen bietet [115]). APP wurde mit Zelladhäsion [116], Synaptogenese [117] sowie neuronaler Migration [118] in Verbindung gebracht. Die möglichen Funktionen der Spaltprodukte werden in Abschnitt 1.4 über die APP-Prozessierung abgehandelt.

Untersuchungen an Mausmodellen lassen auf funktionelle Überschneidungen von APP, APLP1 und APLP2 schließen. So führen Einzeldelationen lediglich zu milden Verhaltens- und neuronalen Defiziten [119–122]. Interessanterweise sind kombinierte Deletionen nur dann letal, wenn sie APLP2 einschließen, dessen Fehlen offenbar nicht kompensiert werden kann. So sterben APLP2- und APP-defiziente Mäuse kurz nach der Geburt und zeigen Störungen in der Entwicklung neuromuskulärer Synapsen [123]. Der Phänotyp dreifach deletierter Mäuse weist zusätzlich eine kortikale Dysplasie, ähnlich der Lissencephalie beim Menschen, auf, die vermutlich auf einer gestörten neuronalen Migration beruht [124].

1.4 Die APP Prozessierung

APP wird während seines sekretorischen Transportwegs posttranslational modifiziert und unterliegt dabei einer sequentiellen Proteolyse. Dabei kann entweder der nicht-amyloidogene oder der amyloidogene Weg eingeschlagen werden, wobei nur der Letztere zur Sekretion von A β führt (siehe Abb. 2). Im nicht-amyloidogenen Weg wird das Volllängenprotein zuerst durch die α -Secretase in ein lösliches APP α (sAPP α , engl.

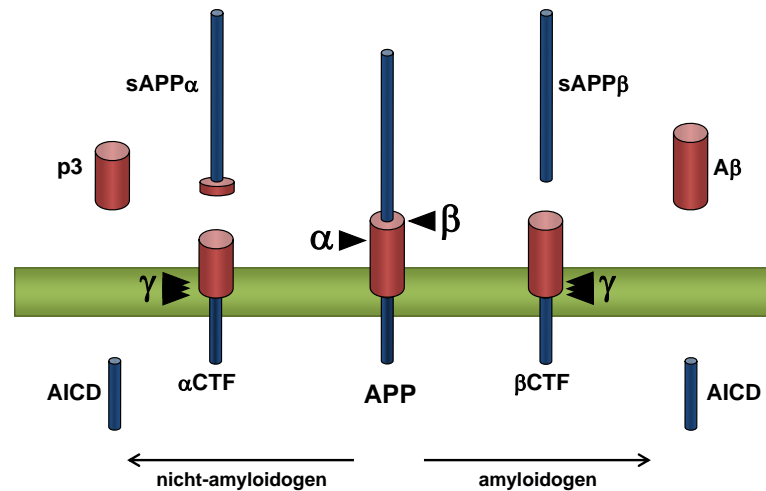


Abbildung 2: **Schematische Übersicht der proteolytischen APP-Prozessierung.** Die A β -Domäne ist rot hervorgehoben. α , β sowie γ kennzeichnen die jeweiligen Schnittstellen der entsprechenden Sekretasen. Nicht-amyloidogener und amyloidogener Weg sind durch Pfeile angedeutet.

soluble APP α) und das in der Membran verbleibende APP- α C-terminale Fragment (APP- α CTF) gespalten. Die α -Schnittstelle liegt innerhalb der A β -Domäne und schließt dadurch die Bildung von A β aus [125, 126] (siehe Abb. 2 und 3). Das APP- α CTF wird anschließend von der γ -Sekretase geschnitten, was in der Freisetzung der intrazellulären Domäne des APP (AICD, engl. *APP intracellular domain*) in das Cytosol [127] sowie der Sekretion des p3-Fragments in den extrazellulären Raum resultiert [128, 129]. Im amyloidogenen Weg dagegen wird APP von der β -Sekretase in das lösliche sAPP β (sAPP β , engl. *soluble APP β*) [114, 130] und das APP- β CTF [111] gespalten. Das APP- β CTF wird ebenfalls durch die γ -Sekretase gespalten, was wiederum zur Bildung der AICD sowie der Sekretion des A β -Peptids führt.

1.4.1 Die α -Sekretase

Die Prozessierung von APP durch die α -Sekretase findet konstitutiv an der Zellmembran statt [125, 126]. Lange Zeit war die genaue Identität der α -Sekretase unbekannt, für mehrere Proteasen aus der ADAM-Familie (engl. *A disintegrin and metalloproteinase*) insbesondere ADAM9 [131], ADAM10 [132] und ADAM17 (auch TACE, engl. *Tumor necrosis factor- α convertase*) [133] wurde α -Sekretaseaktivität nachgewiesen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass für die konstitutive α -Sekretaseaktivität in Neuronen ADAM10 verantwortlich ist [134, 135]. Die zur Familie der Zink-Metalloproteasen gehörenden ADAMs besitzen ein großes Substratspektrum, darunter Wachstumsfaktoren wie Notch und Ephri-



Abbildung 3: **Lokalisation der β -, α - und γ -Schnittstellen.** Die TMD ist grün unterlegt. Die Nummerierung orientiert sich an der A β -Sequenz. Die Pfeile kennzeichnen die Schnittstellen der jeweiligen Sekretase. Die γ -Sekretase scheidet sequentiell an mehreren Schnittstellen (siehe 1.4.3 für eine detaillierte Beschreibung).

ne, Zelladhäsionsmoleküle wie N- und E-Cadherin sowie Entzündungsmediatoren wie TNF α [136, 137]. In Mäusen, die eine APP-FAD-Mutante überexprimieren, führt die zusätzliche Überexpression von ADAM10 zur Reduktion von A β sowie Amyloidplaques [138]. Daher wird die pharmakologische Stimulation der α -Sekretase als therapeutische Option diskutiert [139]. Aufgrund des breiten Substratspektrums ist dieser Ansatz jedoch kritisch zu sehen, insbesondere im Hinblick auf mögliche onkogene Nebenwirkungen durch verstärkte Aktivierung von Wachstumsfaktoren [140].

Dem bei der α -Spaltung freigesetzten sAPP α werden neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben [141–144]. So soll es unter anderem stimulierende Wirkung auf Neuronenwachstum [145–147] und Synaptogenese [148, 149] haben (eine gute Übersicht bietet [150]). Expression des sAPP α kann den milden Phänotyp APP-defizienter Mäuse kompensieren [151] sowie die Letalität zusätzlicher APLP2-Defizienz aufheben [152]. Interessanterweise werden dem 16 AS kürzeren sAPP β deutlich geringere neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben [143] (siehe 1.4.2). So kann die APP/APLP2-Defizienz nicht durch das sAPP β kompensiert werden [153].

1.4.2 Die β -Sekretase

BACE1 (engl. *β -site APP cleaving enzyme*) ist eine Aspartylprotease mit einem klassischen D(T/S)G(T/S)-Motiv im aktiven Zentrum [154–158]. Aufgrund des sauren pH-Optimums wird β -Sekretaseaktivität vor allem in Endosomen und späten Golgi-Kompartimenten beobachtet [159–161]. BACE1 wird in vielen Geweben exprimiert, besonders stark jedoch im Gehirn [156, 158, 162], wobei sich die cerebrale Expression unter physiologischen Bedingungen weitgehend auf Neuronen beschränkt [154]. BACE1 spaltet humanes APP nicht nur vor AS 1 der A β -Sequenz, sondern auch vor AS 11 [156, 163] (siehe Abb.3). Die an der β -Schnittstelle lokalisierte schwedische APP-FAD-Mutation (APP^{sw}) K₆₇₀M₆₇₁/N₆₇₀L₆₇₁ (APP770 Nummerierung) [41, 164] bewirkt eine effiziente-

re Spaltung durch die β -Sekretase [41]. Das homologe BACE2 besitzt ebenfalls schwache β -Sekretaseaktivität, spaltet jedoch hauptsächlich vor den AS-Positionen 20 und 21 nahe der α -Schnittstelle [165] und wird im Gehirn nur schwach exprimiert [165, 166].

Entgegen früherer Ansicht prozessiert BACE1 eine große Anzahl verschiedener Substrate [167, 168], neben APP unter anderem auch APLP1 und 2 [169, 170], Neuregulin-1 [171–173] und -3 [173] sowie den Interleukinrezeptor-1 Typ 2 [174]. Überraschenderweise zeigten BACE1-defiziente Mäuse in ersten Untersuchungen keinen ausgeprägten Phänotyp [175–177]. Erst in weiteren Studien wurden leichte Verhaltensauffälligkeiten [178], eine erniedrigte Krampfschwelle [179] sowie eine Schädigung der retinalen Photorezeptoren [180] beschrieben. Überdies zeigen diese Mäuse eine stark gestörte Myelinisierung im peripheren Nervensystem [171], jedoch nicht im ZNS [172]. Dieser Phänotyp ist höchstwahrscheinlich auf die fehlende Prozessierung von Neuregulin-1 [171], das bei der Myelinisierung peripherer Nerven von besonderer funktioneller Bedeutung ist [181], zurückzuführen. BACE1-defiziente Mäuse bilden kein A β [175–177] und Deletion von BACE1 in Mäusen, die eine APP-FAD- oder zusätzlich eine PS1-FAD-Mutation überexprimieren, verhindert Ausbildung der typischen Plauepathologie [182, 183]. Die Entwicklung von β -Sekretaseinhibitoren scheint daher eine attraktive therapeutische Strategie zu sein (eine gute Übersicht bietet [184]). Bei der wachsenden Anzahl bekannter Substrate [168, 185] bleibt aber abzuwarten, ob sich der therapeutische Einsatz von BACE1-Inhibitoren beim Menschen als unbedenklich erweisen wird. So entwickelten Ratten, denen ein BACE1-Inhibitor oral verabreicht wurde, Schädigungen der retinalen Photorezeptoren [186]. Darüber hinaus ist die Entwicklung spezifischer β -Sekretaseinhibitoren, die gute pharmakologische Eigenschaften aufweisen, mit einigen Problemen behaftet. Zum einen ist die Struktur des aktiven Zentrums ungewöhnlich groß [187], was die Entwicklung spezifischer Inhibitoren erschwert, zum anderen konnten erst wenige Inhibitoren mit guten pharmakokinetischen Eigenschaften, wie z.B. eine gute Penetration der Blut-Hirn-Schranke, entwickelt werden [184, 186].

Die physiologische Funktion von sAPP β ist derzeit umstritten. So wurde einerseits eine stimulierende Wirkung auf das Wachstum von Axonen beschrieben [188], jedoch wird die neuroprotektive Potenz von sAPP β deutlich schwächer als die des sAPP α eingestuft [143].

1.4.3 Die sequentielle Prozessierung durch die γ -Sekretase

Bei der proteolytischen Spaltung der APP-CTFs durch die γ -Sekretase handelt es sich um einen sequentiellen Prozess (siehe Abb. 4) [189]. Zunächst wird durch den sogenannten ϵ -Schnitt an der luminalen Seite der TMD die 50 oder 51 AS lange AICD ins Cytosol freigesetzt [190–193].

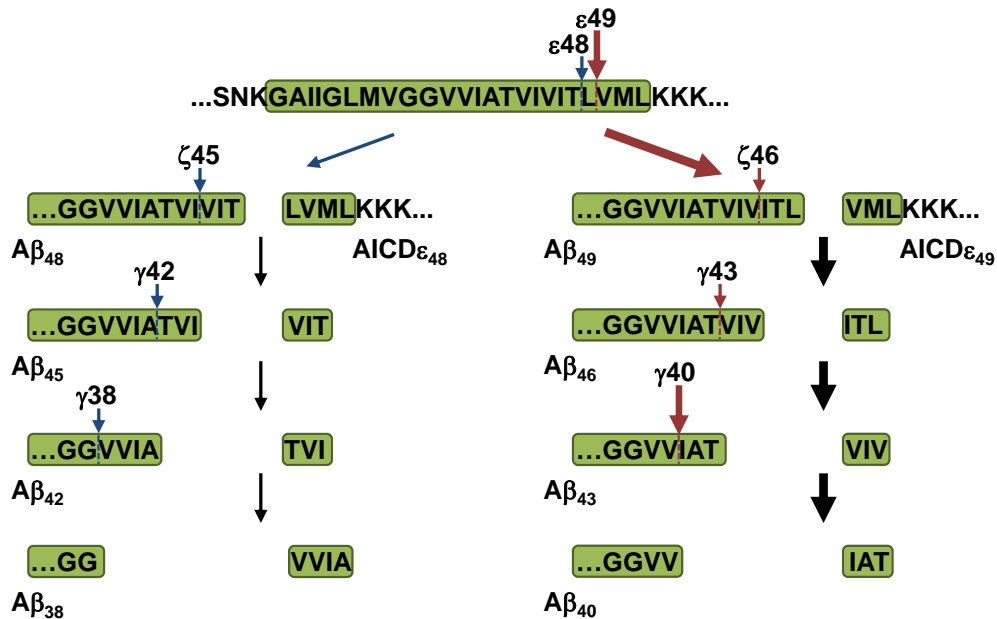


Abbildung 4: **Sequentielle Spaltung des APP-βCTFs durch die γ-Sekretase.** Die TMD ist grün unterlegt. Links ist die Nebenproduktlinie ausgehend von AICD ϵ_{48} dargestellt, rechts die deutlich häufiger genutzte Hauptproduktlinie von AICD ϵ_{49} . In geringen Mengen wird aus Aβ $_{40}$ durch Abspaltung eines weiteren Tripeptids Aβ $_{37}$ gebildet (nicht gezeigt).

Die verbleibenden Fragmente werden anschließend weiter durch die γ-Sekretase prozessiert, bis sie aus der Membran entweichen können. Prozessierung des αCTF führt dabei zur Sekretion des p3 Peptids [129, 159], für das bisher noch keine Funktion beschrieben wurde; es scheint weder neurotoxische Eigenschaften zu besitzen noch zu Oligomeren zu aggregieren [194]. Von den βCTFs werden an der sogenannten ζ- und schließlich der γ-Schnittstelle sukzessive Tripeptide abgespalten [195–197] (siehe Abb. 4). Beginnend mit der ε-Spaltung nach AS 48 oder AS 49 existieren zwei Produktlinien, wobei ε49 die Hauptschnittstelle darstellt [198]. Aus Aβ $_{49}$ entsteht primär Aβ $_{40}$ und aus Aβ $_{48}$ primär Aβ $_{42}$, aus dem durch Abspaltung eines Tetrapeptids Aβ $_{38}$ gebildet werden kann [189, 195]. Dabei ist zu beachten, dass dies die Situation für WT-γ-Sekretase reflektiert. Bei FAD-Mutationen in PS [199–201], der katalytischen Untereinheit des γ-Sekretasekomplexes (siehe 1.5.1), und auch in APP [202] ist eine Erhöhung von Aβ $_{42}$ nicht zwingend mit einer Absenkung von Aβ $_{38}$ verbunden. Erwähnenswert ist, dass der bei vielen PS-Mutanten beobachtete Aktivitätsverlust nicht zwangsläufig im Sinne einer verlangsamten Prozessivität an die Produktion von längeren Aβ-Spezies gekoppelt sein muss [51, 203]. Physiologisch ist Aβ $_{40}$ mit einem Anteil von 75-85% die Hauptspezies, Aβ $_{38}$ und Aβ $_{42}$ stellen jeweils ca. 5-10%, während Aβ $_{37}$ und Aβ $_{43}$ nur in sehr geringen

Mengen gebildet werden [42, 199, 204].

Die funktionelle Bedeutung der AICD wird nach wie vor kontrovers diskutiert; unter anderem wurden regulatorische Funktionen bei der Genexpression, Apoptose sowie Cytoskelettdynamik postuliert (eine gute Übersicht bietet [205]). Ob die AICD direkt die Transkription von Zielgenen im Zellkern reguliert [206, 207], ist jedoch umstritten [208]. Insbesondere der rasche Abbau der AICD durch das IDE (Insulin-abbauendes Enzym, engl. *insulin degrading enzyme*) erschwert seine funktionelle Analyse [209, 210]. Ob die A β -Peptide physiologische Funktionen besitzen, ist ebenfalls umstritten. So sollen A β -Monomere neuroprotektive Eigenschaften besitzen [211], indem sie Neurone vor exzessiver synaptischer Übertragung schützen [212] und die neuronale Differenzierung beeinflussen [213, 214]. Entgegen der früheren Auffassung ist die Bildung von A β per se kein pathologisches Ereignis, sondern ein physiologischer Prozess. So kann A β sowohl im Medium kultivierter Zellen [159, 215–217] als auch im Liquor cerebrospinalis (CSF, engl. *cerebral spinal fluid*) von kognitiv unauffälligen Probanden nachgewiesen werden [215, 216].

1.5 Die γ -Sekretase

Die γ -Sekretase katalysiert den letzten Schritt der APP-Prozessierung, der in der Sekretion von A β resultiert. Bei der γ -Sekretase handelt es sich um einen Proteinkomplex, bestehend aus vier Untereinheiten: PS1 oder 2, APH-1aS, 1aL oder 1b (engl. *anterior pharynx defective phenotype 1*), PEN-2 (engl. *presenilin enhancer-2*) und Nicastrin (NCT), die vermutlich in einer 1:1:1:1 Stöchiometrie im Komplex vorliegen [220] (siehe Abb. 5). Die vier Untereinheiten sind integrale Membranproteine und essentiell sowie ausreichend für die γ -Sekretaseaktivität [221–224]. Das addierte Molekulargewicht der vier Untereinheiten entspricht etwa 200–250 kDa, allerdings läuft der γ -Sekretasekomplex auf nativen Gelen bei ca. 500 kDa [220, 225–228]. Dies könnte auf dimere Komplexe [229] oder zusätzliche Kofaktoren zurückzuführen sein. Untersuchungen mit Raster-Transmissionselektronenmikroskopie (STEM, engl. *scanning transmission electron microscopy*) schätzen die Masse des Komplexes allerdings auf 230 kDa [230]. Da die γ -Sekretase noch nicht für eine Röntgenstrukturanalyse kristallisiert werden konnte, stützen sich Strukturmodelle der γ -Sekretase derzeit auf diverse Elektronenmikroskopie-Techniken [230–232]. Diese Modelle schlagen eine sphärische Struktur für den Komplex mit einem Durchmesser von etwa 100 Å mit einer [232] oder mehreren [230, 231] membranspannenden, wasserzugänglichen Pore(n) vor. Das aktive Zentrum soll in einer dieser Kavitäten liegen [232]. Dies steht in Einklang mit Studien, die biochemisch zeigen konnten, dass die zum aktiven Zentrum gehörenden TMDs 6, 7 und 9 wasserzugänglich sind [233–235].

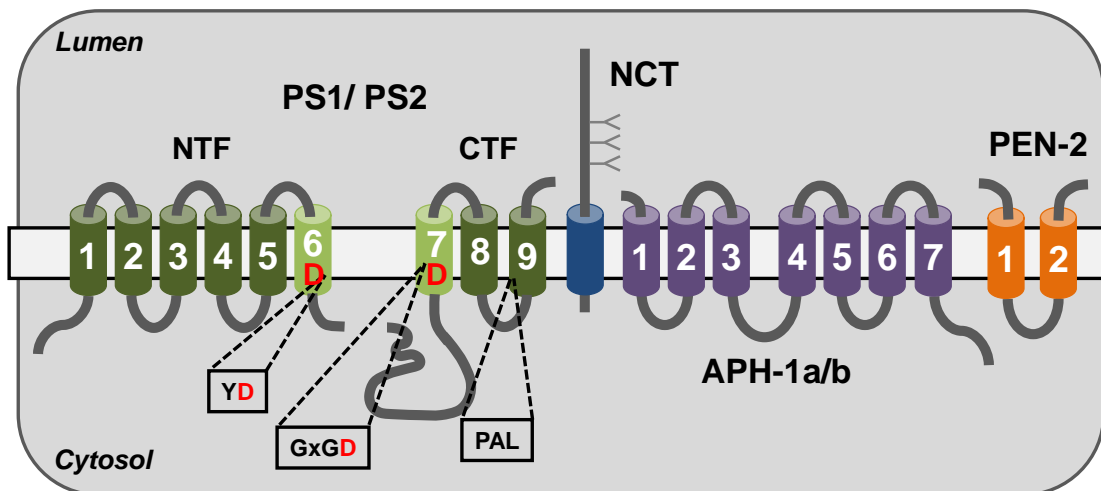


Abbildung 5: **Schematische Übersicht des γ -Sekretasekomplexes.** Gezeigt ist der Komplex bestehend aus den vier essentiellen Komponenten Presenilin (PS), Nicastrin (NCT), PEN-2 und APH-1. Der mature Komplex ist durch die glykosylierte Ektodomäne von NCT sowie das (auto)endoproteolytisch in das N-terminale (NTF) und das C-terminale Fragment (CTF) gesplattene Presenilin 1 bzw. 2 (PS1/PS2) gekennzeichnet. Die beiden katalytischen Aspartate (D) befinden sich in den TMDs 6 und 7 von PS, die hellgrün hervorgehoben sind. Die konservierten Motive in den TMDs 6, 7 und 9 von PS bilden das aktive Zentrum der Protease. NCT, APH-1 und PEN-2 sind weniger für die katalytische Aktivität, sondern vielmehr für Reifung und Stabilität des Komplexes von Bedeutung [218]. Modifiziert nach [219].

1.5.1 Komponenten des γ -Sekretasekomplexes

1.5.1.1 Presenilin

Die Preseniline wurden im Rahmen von genetischen Kopplungsanalysen von familiären Alzheimer-Fällen entdeckt und stellen die katalytische Untereinheit der γ -Sekretase dar. Die beiden Homologe PS1 und PS2 weisen etwa 63% Sequenzidentität auf [40] und kommen nicht innerhalb desselben γ -Sekretasekomplexes vor [236–238]. Sie besitzen eine 9-TMD-Topologie, wobei der N-Terminus ins Cytosol, der C-Terminus ins Lumen ragt [239–244] (siehe Abb. 5).

PS ist eine ungewöhnliche Aspartylprotease [245, 246], deren katalytische Aspartate sich in den TMDs 6 und 7 innerhalb der Membran befinden [247–249]. Die γ -Sekretaseaktivität lässt sich durch Inhibitoren gegen Aspartatproteasen hemmen [245, 246] und die katalytischen Aspartate können direkt mit Übergangszustandsanaloga [250, 251] und allosterischen Inhibitoren [252] photoaffinitätsmarkiert werden. Wie bereits erwähnt, erhöhen FAD-Mutationen in PS1 und 2 das Verhältnis von $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ [42, 43, 253–255].

Aufgrund der entscheidenden Bedeutung von PS1 im Notch-Signalweg [256,257] sterben PS1-defiziente Mäuse bereits während der Embryonalentwicklung [258]. PS2-Defizienz dagegen führt lediglich zu einem mildem Phänotyp [248,259]. Interessanterweise wird der Phänotyp der PS1-Defizienz durch zusätzliche Ausschaltung eines oder beider PS2-Gene deutlich verstärkt [259,260], was neben überlappenden auch für distinkte Funktionen von PS1 und PS2 spricht, wobei nur PS1 den Verlust von PS2 weitgehend kompensieren kann.

Während der Reifung der γ -Sekretase unterliegt PS einer endoproteolytischen Spaltung in ein ca. 30 kDa großes NTF und ein ca. 20 kDa großes CTF [261], die als Heterodimer Bestandteil des maturen γ -Sekretasekomplexes sind [236,262–264]. Freies PS-Holoprotein wird rasch abgebaut [265,266]. Bei der Endoproteolyse handelt es sich höchstwahrscheinlich um einen autokatalytischen Prozess [221]. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Endoproteolyse ähnlich wie die sequentielle Spaltung von APP schrittweise und jeweils im Abstand von drei AS erfolgt [267]. Allerdings ist die PS-Endoproteolyse keine unabdingbare Voraussetzung der γ -Sekretaseaktivität, da es proteolytische aktive PS1-Mutanten mit gestörter Endoproteolyse gibt [268,269]. Des Weiteren wurden PS1-Mutanten mit ungestörter Endoproteolyse, aber stark reduzierter Substratumsetzung beschrieben [267,270].

Die Preseniline gehören zu einer Familie ungewöhnlicher Aspartatproteasen, die anstatt des klassischen D(T/S)G(S/T)-Motivs durch ein GxGD-Motiv im aktiven Zentrum charakterisiert sind (GLGD-Motiv in PS TMD 7, siehe Abb. 5) [270]. Die beiden Glycine des GxGD-Motivs sind hochkonserviert und kritisch für die katalytische Aktivität. Beide Positionen erfordern kurze Seitenketten, so dass lediglich Mutationen zu Alanin toleriert werden, die jedoch die Schnittspezifität in Richtung der langen Spezies $A\beta_{42/43}$ verschieben [270,271]. Tatsächlich handelt es sich bei PS1 G384A um eine FAD-Mutation mit sehr frühem Krankheitsbeginn [272]. Position x, L383 in PS, scheint flexibler zu sein und ist möglicherweise bei der Selektion von Substraten von Bedeutung [273]. Daneben existiert noch ein konserviertes PxL-Motiv in TMD 9 (PAL-Motiv in PS1), das kritisch für die γ -Sekretaseaktivität ist [269,274,275]. Es wurde gezeigt, dass das aktive Zentrum von PS in einer wasserzugänglichen Pore liegt, an deren Bildung sowohl die beiden katalytischen Aspartate in den TMDs 6 und 7 als auch Teile von TMD 9 um das PAL-Motiv involviert sind [235,276]. Weiterhin wurde gezeigt, dass auch TMD 1 Einfluss auf die katalytische Aktivität hat [277] und sich räumlich sehr nahe am aktiven Zentrum befindet. So konnten bestimmte AS aus der TMD 1 mit L383 des GxGD- und L435 des PAL-Motivs quervernetzt werden [278].

Den Presenilinen werden weitere γ -Sekretase-unabhängige Funktionen zugeschrieben (eine gute Übersicht bietet [279]). Unter anderem sollen sie am intrazellulären Transport

von Proteinen [280], wie beispielsweise β -Catenin, einer wichtigen Komponente des Wnt-Signalwegs [281,282], beteiligt sein. Darüber hinaus wurde PS als passiver Ca^{2+} -Kanal im endoplasmatischen Retikulum (ER) beschrieben [283] sowie mit dem Prozess der Autophagie in Zusammenhang gebracht [284,285]. Die beiden letzteren Funktionen wurden aber in jüngsten Studien angezweifelt [286–288].

1.5.1.2 Nicastrin (NCT), APH-1 und PEN-2

NCT ist ein Typ-I-Glykoprotein und mit etwa 110 kDa die größte Untereinheit des γ -Sekretasekomplexes. Es wurde in Koimmunpräzipitationstudien als Interaktionspartner von PS1 und PS2 identifiziert [289] und erwies sich wie PS als essentielle Komponente des Notch-Signalwegs in verschiedenen Modellorganismen [290–293]. NCT zeichnet sich durch eine große thermostabile Ektodomäne aus [294], die während des sekretorischen Transportwegs komplex glykosyliert wird [210,295,296] (siehe Abb. 5). Neben der Endoproteolyse von PS ist komplex glykosyliertes NCT Indikator des muren γ -Sekretasekomplexes [297]. NCT soll als Rezeptor für γ -Sekretasesubstrate fungieren, indem seine Ektodomäne an die zuvor durch α - oder β -Spaltung verkürzten N-Termini bindet [298]. Diese Funktion ist allerdings sehr umstritten [299] und wird im Detail in Kapitel 1.6.3 über die Substratselektion der γ -Sekretase besprochen.

APH-1 ist ein zirka 20 kDa großes Protein mit 7 TMDs und aufgrund seiner kurzen extramembranösen Bereiche stark hydrophob [300] (siehe Abb.5). Es scheint vor allem der Stabilisierung des Komplexes zu dienen [301–303], wobei ein GxxxG-Motiv in TMD 4 [304–306] sowie zwei konservierte Histidinreste in TMD 5 und 6 von essentieller Bedeutung sind [306,307]. Im Menschen existieren die beiden Homologe APH-1a und 1b, die zirka 59% Sequenzidentität aufweisen [308]. Von APH-1a werden zusätzlich zwei Spleißvarianten APH-1aS und APH-1aL (von engl. *short* und *long*) gebildet [308,309]. Die APH-1 Varianten treten nicht zusammen in einem γ -Sekretasekomplex auf [238,310], so dass in Kombination mit PS1 und 2 sechs verschiedene γ -Sekretasekomplexe vorkommen, wobei Komplexe mit PS1 eine gut doppelt so hohe proteolytische Aktivität aufweisen wie Komplexe mit PS2 [311]. Allerdings produzieren alle Komplexe unabhängig von der APH-1-Variante pathologische $\text{A}\beta_{42}$ -Spezies bei Expression einer PS1- oder PS2-FAD-Mutation [238].

PEN-2 ist mit einem Molekulargewicht von 12 kDa die kleinste Untereinheit des γ -Sekretasekomplexes und besitzt eine Haarnadeltopologie [312] (siehe Abb.5). Funktionell ist PEN-2 für die Reifung und Stabilisierung des γ -Sekretasekomplexes von Bedeutung, indem es die Endoproteolyse von PS einleitet [222] und die Stabilität des entstandenen PS-NTF/CTF-Heterodimers vermittelt [313–315]. Überdies reguliert PEN-2 den Transport des assemblierten γ -Sekretasekomplexes aus dem ER durch ein ER-Retentionssignal,

das im distalen Bereich seiner TMD 1 lokalisiert ist [316]. PEN-2-Defizienz entspricht dem Phänotyp Notch-defizienter Mäuse, was die essentielle Bedeutung von PEN-2 im γ -Sekretasekomplex unterstreicht [317].

1.6 Substrate der γ -Sekretase

Bisher sind über 88 Proteine als γ -Sekretase-Substrate identifiziert worden (gute Übersichten bieten [318, 319]), deren gemeinsames Merkmal die Typ-I-Topologie ist. Unbestätigte Ausnahmen dieser Regel sind das Typ-II-Protein β 1,6-Acetylglucosamintransferase [320] und die polytope Glutamatrezeptoruntereinheit 3 [321]. Ein funktionell besonders bedeutsames Substrat ist Notch [322](siehe 1.6.1), das für die Zelldifferenzierung und Zellerneuerung von eminenter Bedeutung ist [323].

Die γ -Sekretase kann nur Substrate mit kurzen N-Termini effizient spalten [324]. Daher müssen Substrate mit großen Ektodomänen erst durch so genannte *Sheddasen* verkürzt werden, bevor sie von der γ -Sekretase prozessiert werden können. Die Prozessierung durch die γ -Sekretase scheint meist ähnlich wie bei APP nahe der cytoplasmatischen Grenze innerhalb der TMD zu beginnen und sequentiell zu verlaufen. Da die γ -Sekretase Substrate nur dann spalten kann, nachdem die N-Termini durch *Ectodomain Shedding* verkürzt wurden, wird dieser Prozess als „Regulierte Intramembranproteolyse“ bezeichnet.

Da die γ -Sekretase keine spezifische Erkennungssequenz hat, ist es noch weitgehend unklar, was Substrate von Nicht-Substrat-Typ-I-Membranproteinen unterscheidet [318, 325]. Einige Studien zeigten, dass die TMD und juxtamembran-Bereiche von Substraten Einfluss auf die γ -Sekretaseaktivität nehmen können [325–327]; allerdings waren in anderen Untersuchungen sowohl der C- [328, 329] als auch der N-Terminus [330] für die Prozessierung entbehrlich. Wieder eine andere Studie postulierte, dass die luminalen polaren Seitenketten S26 und K28 essentiell für die γ -Spaltung seien [327]. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden [202, 329, 331]. Wahrscheinlich ist die γ -Sekretaseaktivität weniger an bestimmte Sequenzbedingungen geknüpft, sondern vielmehr an die Konformation der TMD.

Aufgrund ihres breiten Spektrums an Substraten ist die γ -Sekretase auch als „Proteasom der Membran“ bezeichnet worden [332]. Dieses Konzept erwies sich allerdings als zu kurz gegriffen, nachdem immer mehr Substrate entdeckt worden waren, deren ICDs sowohl bei der Signaltransduktion als auch der Genregulation mitwirken. Für viele Substrate ist allerdings nicht bekannt, ob der ICD oder den A β -entsprechenden sekretierten Peptiden funktionelle Bedeutung zukommt, so dass der Abbau von TMDs durchaus eine der Hauptfunktionen der γ -Sekretase sein könnte.

Weitere wichtige Substrate neben APP und Notch sind die Zelladhäsionsmoleküle

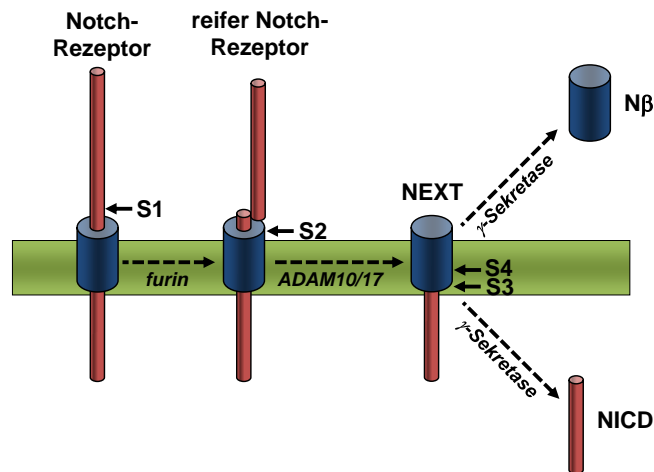


Abbildung 6: **Schematische Übersicht der proteolytischen Notch-Prozessierung.** Die Notch- β ($N\beta$)-Domäne ist blau hervorgehoben. Die S1-Spaltung findet während der Reifung im Golgi-Apparat statt. Der mature Notch-Rezeptor erreicht die Plasmamembran und nach Bindung eines Liganden (hier nicht gezeigt) wird die Ektodomäne an S2 abgespalten. NEXT wird daraufhin von der γ -Sekretase an S3 und S4 prozessiert, was zur Freisetzung der NICD ins Cytosol und des $N\beta$ -Peptids in den extrazellulären Raum führt. Die NICD transloziert in den Zellkern und aktiviert dort die Transkription von Zielgenen, die große Bedeutung für die Differenzierung von Zellen und Geweben haben.

CD44 [333] und N- und E-Cadherin [334, 335] sowie eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie z.B. Erb-B4 [336], die Zellproliferation und Differenzierung regulieren. Auf Notch und CD44 wird in den folgenden beiden Kapiteln näher eingegangen.

1.6.1 Notch

Notch, ein etwa 300 kDa großes Typ-I-Membranrezeptorprotein, ist eines der wichtigsten und neben APP am besten untersuchten Substrate der γ -Sekretase (eine gute Übersicht bietet [323]). Physiologisch ist Notch für Prozesse der Zelldifferenzierung vor allem während der Embryonalentwicklung, aber auch im adulten Organismus von essentieller Bedeutung [337, 338]. Im Menschen existieren vier Homologe, Notch 1-4, die alle ähnlich prozessiert werden [339] (siehe Abb. 6). Auf seinem Weg durch den sekretorischen Transportweg wird Notch durch Furin an der S1-Stelle in zwei Fragmente gespalten. Diese bleiben zunächst als Heterodimer assoziiert und erreichen als maturaer Rezeptor die Plasmamembran [340, 341]. Der mature Notch-Rezeptor wird durch Bindung der Liganden aus der DSL Familie (Delta, Serrate und Lag-2) aktiviert [342], deren Bindung die Abspaltung der Ektodomäne durch ADAM10 [343, 344] oder ADAM17 (auch TACE) [345, 346] an der S2-Schnittstelle auslöst, wobei ADAM10 dabei von größte-

rer physiologischer Bedeutung zu sein scheint [347, 348]. Der verbleibende N-Terminus (NEXT, engl. *notch extracellular truncation*), wird im Anschluss von der γ -Sekretase innerhalb der TMD prozessiert [322, 349, 350]. Analog zur ϵ - und γ -Spaltung bei APP wird zunächst durch die S3-Spaltung der C-Terminus (NICD, engl. *Notch intracellular domain*) ins Zellinnere entlassen. Nach Translokation in den Zellkern reguliert die NICD als Transkriptionsfaktor die Genexpression [322, 351]. Anschließend spaltet die γ -Sekretase an der S4-Schnittstelle das Notch β (N β)-Peptid, für das bisher noch keine Funktion beschrieben wurde, ab [352, 353]. Wie bei der Prozessierung von APP sind sowohl S3- als auch S4-Spaltung nicht präzise, daher resultieren NICD-Fragmente bzw. N β -Peptide unterschiedlicher Länge [323].

Störungen im Notch-Signalweg können diverse pathologische Prozesse, wie Entwicklungsstörungen und Tumore, zur Folge haben (eine gute Übersicht bietet [354]). Aufgrund der Bedeutung des Notch-Signalwegs bei der Genese von Tumoren sind γ -Sekretaseinhibitoren als Cytostatika in klinischer Erprobung [355]. Darüber hinaus verursachen Mutationen im Notch3-Gen die cerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukencephalopathie (CADASIL) [356].

1.6.2 CD44

CD44 ist ein stark glykosyliertes Typ-I-Membranprotein, das als Adhäsionsmolekül der Plasmamembran Zellkontakte mit der extrazellulären Matrix (EZM) vermittelt [357] (eine gute Übersicht bietet [358]). Es wird ubiquitär exprimiert und bindet an verschiedenste Komponenten der EZM, insbesondere Hyaluronsäure [359]. CD44 ist in viele zellbiologische Prozesse wie Zellmigration, Proliferation und Apoptose involviert, was seine Bedeutung für die Wundheilung, die Immunregulation sowie die Metastasierung von Tumoren erklärt [360–363].

Die Prozessierung von CD44 beginnt mit der Abspaltung der Ektodomäne durch ADAM10, ADAM17 oder Matrix-Metalloproteasen [364–366]. Es wird vermutet, dass die sekretierte Form sCD44 (engl. *soluble CD44*) die Interaktion mit der EZM während der Zellmigration reguliert [367]; zudem ist sCD44 bei einigen Tumoren erhöht [368]. Das verbleibende CD44-CTF wird von der γ -Sekretase innerhalb der Membran prozessiert, was zur Freisetzung der CD44-ICD in das Cytosol und zur Sekretion des CD44 β -Peptids in den extrazellulären Raum führt [333]. Die ICD fungiert nach Translokation in den Zellkern als Transkriptionsfaktor [369, 370]. Dadurch ist CD44 unter anderem an der Regulation der Genexpression glykolytischer Enzyme [370], der Matrix-Metalloprotease-9 [370] sowie von CD44 selbst [369] beteiligt.

1.6.3 Substratselektion der γ -Sekretase

Der Mechanismus der Substratbindung durch den γ -Sekretasekomplex ist noch weitgehend unverstanden. Wie bereits erwähnt, wurde NCT als potentieller Substratrezeptor vorgeschlagen [298]. Demnach soll ein konservierter Glutamatrest in AS-Position 333 (E333) innerhalb der Ektodomäne mit seiner Carboxygruppe mit der Aminogruppe am freien N-Terminus von γ -Sekretasesubstraten interagieren [298, 330]. Allerdings könnte E333 auch lediglich kritisch für die Reifung des Komplexes sein und weniger für die Substraterkennung [299, 371]. Weiterhin spricht gegen eine Funktion als Substratrezeptor die Beobachtung, dass ein sehr instabiler trimerer γ -Sekretasekomplex in Abwesenheit von NCT geringe proteolytische Aktivität aufweist [372]. Es ist jedoch schwer zu trennen, ob die reduzierte Aktivität nur auf der Instabilität des Komplexes beruht oder auch auf einer gestörten Substraterkennung. Antikörper-vermittelte Blockade der NCT-Ektodomäne beeinträchtigt jedoch die γ -Sekretaseaktivität bei ungestörter Maturierung [372, 373]; dies könnte auf eine gestörte NCT-Substrat-Interaktion hinweisen.

Kürzlich wurde auch APH-1 mit der Bindung von Substraten in Verbindung gebracht [374]. Ob es sich dabei um spezifische Interaktionen handelt, ist jedoch äußerst fraglich, da einerseits stark hydrophobe Proteine wie APH-1 zu unspezifischen Wechselwirkungen neigen und andererseits auch eine Interaktion von APH-1 mit dem APP-Volllängenprotein, das kein direktes γ -Sekretasesubstrat darstellt, beschrieben wurde [374].

Unabhängig von einer potentiell initialen Bindung an NCT wurde eine weitere, distinkte Bindungsstelle innerhalb des PS-Moleküls postuliert [375, 376]. Erste Hinweise auf diese sogenannte *Docking Site* lieferten Studien mit Übergangszustandsanaloga-Inhibitoren, die direkt an das aktive Zentrum der γ -Sekretase binden [250, 251]. Studien zur Enzymkinetik zeigten, dass die Hemmung der γ -Sekretase durch Übergangszustandsanaloga der charakteristischen Kinetik nicht-kompetitiver Inhibitoren folgt [376, 377]. Dies deutet darauf hin, dass Substrate trotz Blockade des aktiven Zentrums an den Komplex binden können. Würden nämlich γ -Sekretasesubstrate mit Übergangszustandsanaloga um die Bindung am aktiven Zentrum konkurrieren, wäre die typische Kinetik kompetitiver Hemmstoffe zu erwarten [376]. Dies steht in Einklang mit dem Befund, dass γ -Sekretasekomplexe, die mit Hilfe solcher Inhibitoren isoliert wurden, mit APP-CTFs - also Substraten - assoziiert waren [375, 378]. Mittels Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM, engl. *fluorescence lifetime imaging microscopy*), die auf der quantitativen Messung von FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)-Signalen beruht [379], wurde zudem eine enge Assoziation von PS1 mit APP-CTFs sowie mit NEXT1, beides direkte γ -Sekretasesubstrate, in Anwesenheit von Übergangszustandsanaloga beobachtet [379, 380]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass kurze 6-10 AS lange helikale Inhibitoren, die der APP-TMD nachempfunden sind, mit der *Docking Site* interagieren und um die Bindung von

Übergangszustandsanaloga nicht kompetitieren können [381, 382]. Mit Hilfe von Kompetitionsexperimenten mit Übergangszustandsanaloga und helikalen Peptidinhibitoren unterschiedlicher Länge konnte die Lokalisation der *Docking Site*, an deren Bildung auch die TMDs 2, 6 und 9 beteiligt sein sollen [276, 383, 384], auf wenige AS-Reste vom aktiven Zentrum entfernt eingegrenzt werden [385]. Helikale Peptidinhibitoren mit einer Länge von 13 AS sind im Gegensatz zu solchen mit einer Länge von 10 AS in der Lage, die Bindung von Übergangszustandsanaloga zu verhindern, was darauf hinweist, dass sie sowohl mit der *Docking Site* als auch mit dem aktiven Zentrum interagieren [385].

Die essentielle Bedeutung des hochkonservierten GxGD-Motivs in TMD 7 sowohl für die katalytische Aktivität als auch für die Diskriminierung von Substraten [270, 271, 273, 386] steht in Einklang mit der unmittelbaren Nähe von katalytischem Zentrum und *Docking Site*. Die beiden Glycine sind kritisch für die katalytische Aktivität [270, 271], lediglich bei Mutationen zu Alanin bleibt die Aktivität erhalten, jedoch nicht für alle Substrate [271]. Position x, L383 in PS1, ist für die Substratelektivität von Bedeutung und könnte daher direkt an der Bildung der *Docking Site* beteiligt sein [273]. So wird durch Mutation des GLGD-Motivs in PS1 zu einem GFGD-Motiv, wie es in der Natur bei SPE-4 [387], einem PS-Homolog in *C. elegans*, vorkommt, die katalytische Aktivität bezüglich Notch1 stark reduziert, die Prozessierung von APP wird dagegen nur wenig beeinträchtigt [273]. Ähnlich kritisch für die Aktivität sind auch die AS-Positionen des konservierten PAL-Motivs [269, 274, 275], das sich räumlich sehr nahe am aktiven Zentrum befindet [235, 276]. Die strengen Sequenzbedingungen sprechen für einen entscheidenden Einfluss der konservierten GxGD- und PAL-Motive auf die für eine korrekte Interaktion mit Substraten notwendige räumliche Struktur des aktiven Zentrums.

1.7 Die γ -Sekretase als therapeutischer Angriffspunkt

1.7.1 γ -Sekretaseinhibitoren (GSIs)

Gemäß der Amyloidkaskaden-Hypothese ist die Unterbindung der A β -Produktion die effektivste Therapiestrategie zur Prävention der Alzheimer-Erkrankung. Mittlerweile sind sowohl eine Reihe von β -Sekretaseinhibitoren (siehe 1.4.2) als auch GSIs mit guten pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften entwickelt worden, wobei die klinische Erprobung der GSIs weiter fortgeschritten ist (eine gute Übersicht bietet [388]). Die unselektive Inhibition der γ -Sekretase ist allerdings aufgrund der großen Anzahl physiologischer Substrate höchst problematisch. Insbesondere die Hemmung des Notch-Signalwegs ist mit ernststen gastrointestinalen [389–391] und immunmodulatorischen [392] Nebenwirkungen verbunden sowie mit einem erhöhten Hautkrebsrisiko assoziiert [393]. Eine Phase-III-Studie mit dem GSI Semagacestat wurde trotz guter Ergebnisse in Phase-

I/II-Studien [394, 395] abgebrochen. Patienten, die mit Semagacestat behandelt wurden, zeigten eine signifikante Verschlechterung ihrer Leistung in kognitiven Tests im Vergleich zur Kontrollgruppe [388, 396], was ebenfalls mit der Notch-Inhibition zusammenhängen könnte [397, 398]. Zudem wurde bei nachlassender Wirkung aufgrund der Akkumulation von β CTFs, welche dann vermehrt von der γ -Sekretase prozessiert werden, eine überschießende A β -Produktion beobachtet (*Rebound*-Effekt) [388, 399].

Um Notch-bezogene Nebenwirkungen zu vermeiden, wurden *Notch sparing* GSIs entwickelt, die APP deutlich stärker hemmen als Notch [388]. Potentiell problematisch ist dabei, dass meist die NICD- mit der A β -Produktion verglichen wurde, die zudem mit unterschiedlichen Assays bestimmt wurden [400]. Kürzlich wurde die Entwicklung des *Notch sparing* GSIs Avagacestat [401, 402], dessen APP-Selektivität allerdings in Frage gestellt wurde [58, 403], aufgrund der Ergebnisse einer klinischen Phase-II-Studie eingestellt². Generell ist auch bei diesen Substanzen nicht geklärt, inwieweit die Inhibition der Spaltung anderer Substrate bzw. die Akkumulation ungeschnittener Substrate zur Toxizität beitragen [404, 405].

In einer Studie zeigten Mäuse, die APP^{sw} überexprimieren, weder nach Behandlung mit Semagacestat noch mit Avagacestat Verbesserungen in kognitiven Tests [404]. Dies könnte sowohl auf der Akkumulation von APP- β CTFs als auch auf der Hemmung weiterer Substrate beruhen; jedoch wurde bei der verwendeten Dosierung zumindest der Notch-Signalweg nicht wesentlich beeinträchtigt [404]. Zudem verringerte chronische GSI-Behandlung bei Mäusen die Dichte an dendritischen Dornen (engl. *spines*) [406]. Dieser Effekt wurde jedoch nicht bei APP-defizienten Mäusen beobachtet [406]. Diese APP-Abhängigkeit könnte auf der Akkumulation der APP-CTFs beruhen. Insgesamt lassen diese Befunde daran zweifeln, ob GSIs zur Therapie der Alzheimer-Erkrankung Eingang in die klinische Praxis finden werden.

1.7.2 γ -Sekretasemodulatoren (GSMs)

Die GSMs stellen eine elegante Alternative zu GSIs dar und sind seit ihrer Entdeckung Gegenstand intensiver Forschung [400]. GSMs senken die Spiegel der langen A β -Spezies A $\beta_{42/43}$, z.T. auch A β_{40} bei gleichzeitiger Erhöhung der kurzen A β_{38} -Spezies, z.T. auch A β_{37} , ohne die Gesamtmenge der A β -Peptide zu verändern. Entscheidender Vorteil ist, dass die ϵ -Spaltung, d.h. die ICD-Produktion, nicht beeinflusst wird [407, 408], so dass der Notch-Signalweg nicht beeinträchtigt wird. GSMs führen auch nicht zur Akkumulation von APP-CTFs und daher auch nicht zu *Rebound*-Effekten [409], so dass im Vergleich zu GSIs deutlich weniger Nebenwirkungen zu erwarten sind. Interessanterweise wurden

²<http://www.bms.com/news/features/2012/Pages/AvagacestatDevelopmentStatus.aspx>

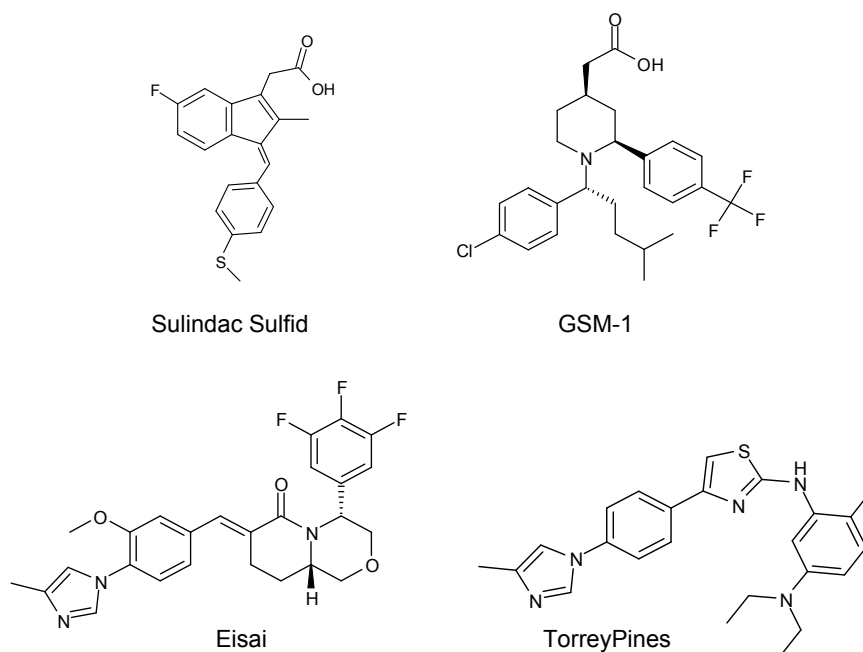


Abbildung 7: **Strukturformeln ausgewählter GSMs.** Sulindac Sulfid ist als klassisches NSAID ein GSM der ersten Generation. Der deutlich potentere GSM-1 gehört aufgrund seines acidi-schen Charakters bei fehlender COX-Inhibition zur Gruppe der NSAID-ähnlichen GSMs [199]. Die beiden GSMs von Eisai und TorreyPines sind Vertreter der verbrückten Aromaten und weisen eine etwas stärkere Potenz als GSM-1 auf [412].

auch inverse GSMs entdeckt, die die Spiegel der langen $A\beta_{42/43}$ -Spezies erhöhen und die kurzen senken [410, 411].

GSMs der ersten Generation sind bestimmte nicht-steroidale Entzündungshemmer (NSAIDs, engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*) wie Ibuprofen oder Sulindac Sulfid (Strukturformel siehe Abb. 7), nicht jedoch Aspirin oder Naproxen [407, 413]. Dieser Entdeckung war die Beobachtung epidemiologischer Studien vorausgegangen, dass die chronische Einnahme von NSAIDs mit einer geringeren Prävalenz der Alzheimer-Erkrankung einhergeht [414–418]. Dies wurde zunächst auf die entzündungshemmenden Eigenschaften der NSAIDs zurückgeführt, die auf der Inhibition der Cyclooxygenase (COX) beruhen [419]. Die modulatorische Aktivität ist jedoch unabhängig von der inhibitorischen Wirkung der NSAIDs auf die COX [407], vielmehr ist eine Carboxygruppe im Molekül essentiell für die Modulation [420, 421]. Tarenflurbil, das R-Enantiomer des NSAIDs Flurbiprofen, zeigte allerdings in einer Phase-III-Studie mit Alzheimerpatienten keine positiven Effekte auf den Krankheitsverlauf [422]. Angesichts der geringen modulatorischen Potenz sowie der schlechten Gehirngängigkeit dieser Substanz ist dieser Be-

fund jedoch nicht überraschend [388]. Außerdem befanden sich die Probanden bereits in fortgeschrittenen Stadien der Demenz, die bereits mit irreversiblen Neuronenverlusten assoziiert sind.

Mittlerweile wurden viele GSMs der zweiten Generation entwickelt, die über eine deutlich stärkere modulatorische Potenz verfügen (eine gute Übersicht bietet [412]). Zur Gruppe der NSAID-ähnlichen GSMs werden Substanzen gezählt, die bei fehlender COX-Inhibition noch die Carboxygruppe der NSAIDs enthalten, aber strukturell keine Verwandtschaft mit den konventionellen NSAIDs mehr aufweisen. Ein Vertreter ist GSM-1 aus der Klasse der acidischen Piperidine von Merck (Strukturformel siehe Abb. 7) [199]. In großangelegten Screenings wurde auch nach GSMs ohne Carboxygruppe gesucht, die aufgrund ihrer Ladung die Passage durch die Blut-Hirn-Schranke ungünstig beeinflusst. Interessanterweise kamen unterschiedliche Pharmaunternehmen zu einer ähnlichen Grundstruktur, bestehend aus vier (heteroaromatischen) Ringen, die direkt oder über sekundäre Amine miteinander verbunden sind und daher als verbrückte Aromaten bezeichnet werden. Abb. 7 zeigt die Strukturformeln von zwei Vertretern dieser Substanzklasse, die auch in dieser Dissertation verwendet wurden. Anders als z.B. GSM-1 senken diese auch $A\beta_{40}$ und erhöhen $A\beta_{37}$ [423, 424].

Der Wirkmechanismus der GSMs ist noch nicht abschließend geklärt. Es wurde gezeigt, dass GSMs als nicht-kompetitive Inhibitoren für $A\beta_{42}$ wirken, was einen allosterischen Mechanismus nahelegt [425, 426]. Zudem induzieren sowohl das NSAID Ibuprofen als auch der inverse Modulator Fenofibrat [427, 428] eine Konformationsänderung des γ -Sekretase-komplexes. Dabei vergrößert sich der Abstand zwischen PS1-NTF und PS1-CTF in Anwesenheit von Ibuprofen [427], während er sich in Anwesenheit von Fenofibrat verringert [428], ähnlich wie es auch bei PS1-FAD-Mutationen der Fall ist [428, 429]. Einige PS1-FAD-Mutationen erwiesen sich als resistent gegen die $A\beta_{42}$ -Absenkung durch Sulindac Sulfid, während die Modulation von $A\beta_{38}$ interessanterweise nicht beeinflusst wurde [199, 200, 430]. Diese Resistenz wurde auch bei PS1 L166P sowie PS2 N141I, zwei FAD-Mutationen, die $A\beta_{42}$ besonders stark erhöhen, nach Behandlung mit dem deutlich potenteren GSM-1 beobachtet [199]. Obwohl diese Befunde für eine Interaktion zwischen GSMs und der γ -Sekretase sprechen, wurde für die NSAIDs Sulindac Sulfid und Flurbiprofen als spezifisches molekulares Zielprotein das APP-CTF vorgeschlagen [431–433]. In Einklang damit steht, dass die modulatorische Wirkung dieser GSMs vom NSAID-Typ spezifisch für APP sein soll, ohne dass die β -Peptide anderer Substrate wie Notch1 [434, 435] und CD44 [434] betroffen sind. Manipulation eines Enzyms durch Bindung einer Substanz an dessen Substrat würde einen völlig neuen Wirkmechanismus darstellen und hätte weitreichende Konsequenzen für die Entwicklung hochspezifischer Inhibitoren.

Möglicherweise handelt es sich jedoch bei der beobachteten GSM-Substrat-Bindung um unspezifische Interaktionen [436,437]. Gegen die Hypothese der Substratbindung der GSMs vom NSAID-Typ sprechen zudem einige weitere biochemische Befunde. So wurde in einer früheren Studie mittels SDS-PAGE gezeigt, dass die GSMs vom NSAID-Typ Sulindac Sulfid und Indometacin sowie ein NSAID-ähnlicher GSM durch Modulation der S4-Spaltung von Notch1 (siehe Abb. 6), die der γ -Spaltung von APP entspricht (siehe Abb. 2), die Zusammensetzung der N β -Peptide verändern können [353]. Dies wurde in der Folge auch bei GSMs der zweiten Generation beobachtet [435]. Allerdings konnte die Modulation der N β -Peptide durch Sulindac Sulfid, wie bereits erwähnt, in späteren Untersuchungen nicht bestätigt werden, wobei diese Daten auf der Quantifizierung von Massenspektren beruhen [435] oder aber als *data not shown* lediglich erwähnt werden [434]. Diese Diskrepanzen könnten auf der schwachen Wirkstärke von Sulindac Sulfid beruhen, die den Nachweis der N β -Modulation erschwert. Zumal für deutlich potentere GSMs der zweiten Generation die Modulation der N β -Peptide eindeutig gezeigt werden konnte [435]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch die Signalpeptid-Peptidase (SPP), eine mit PS verwandte GxGD-Protease, auf die Behandlung mit Sulindac Sulfid und Indometacin anspricht [438]. Möglicherweise gilt dies auch für GSM-1 [439]. Außerdem ist im Gegensatz zu PS keine Mutation in APP bekannt, die nicht auf GSMs anspricht [202]. Die vorgeschlagene Bindungsstelle in APP beinhaltet ein GxxxG-Motiv (G29 und G33), das durch Dimerisierung die Schnittspezifität der γ -Sekretase beeinflussen soll [440], sowie einen juxtamembranen positiv geladenen Lysin-Rest (K28) [410]. Es wurde postuliert, dass GSMs mittels ihrer Carboxygruppe mit K28 [421, 441] interagieren und durch Abschwächung der Dimerisierungsstärke eine Absenkung von A β ₄₂ bewirken [432]. Allerdings wurde durch Mutagenese dieser kritischen AS-Reste die Modulierbarkeit der γ -Sekretase nicht wesentlich beeinträchtigt [202].

Eine andere Studie kam zu dem Schluss, dass GSMs an PEN-2 binden, jedoch wurde dies unter Bedingungen beobachtet, bei denen der γ -Sekretasekomplex dissoziiert vorliegt [423].

Die exakte Lokalisation der GSM-Bindungsstelle war somit zu Beginn der Arbeit aufgrund der sich teilweise widersprechenden Datenlage nicht abschließend geklärt und daher Thema kontroverser Diskussionen. Aktuelle Erkenntnisse, die in den letzten beiden Jahren gewonnen wurden, werden im Ergebnis- und Diskussionsteil dieser Arbeit eingehend besprochen (siehe 2.2).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Trotz der mittlerweile über 88 bekannten Substrate der γ -Sekretase [319] ist der Mechanismus ihrer Substratselektion noch weitgehend unverstanden. Ein besseres Verständnis

der Substratselektion ist, besonders im Hinblick auf die Entwicklung von APP-selektiven *Notch sparing* GSIs, von immenser Bedeutung. Die größte Akzeptanz findet derzeit ein schrittweises Modell zur Substratbindung. NCT soll dabei als initialer Substratrezeptor der verkürzten N-Termini fungieren [298, 330]. Diese Funktion ist jedoch umstritten [299]. Weiterhin besteht starke Evidenz, dass Substrate, bevor sie für die finale Prozessierung ins aktive Zentrum gelangen, an eine *Docking Site* in PS binden [375, 376]. So wurde in mehreren Studien gezeigt, dass direkte γ -Sekretasesubstrate in Anwesenheit von Übergangszustandsanaloga, die das aktive Zentrum blockieren [250], an den Komplex [375, 376, 378] bzw. PS1 [379, 380] binden können. In Kompetitionsstudien mit Übergangszustandsanaloga und helikalen Peptidinhibitoren, die an PS1 außerhalb des aktiven Zentrums binden und mit der Bindung von Substraten interferieren [381], wurde gezeigt, dass die *Docking Site* vermutlich nur wenige AS-Reste von den katalytischen Aspartaten im aktiven Zentrum entfernt lokalisiert ist [385]. Daher wurde eine Beteiligung des hochkonservierten GxGD-Motivs an der Bildung der *Docking Site* in Betracht gezogen. Die beiden Glycine des GxGD-Motivs erwiesen sich in erster Linie als essentiell für die katalytische Aktivität der γ -Sekretase [270, 271]. Bereits die subtile Mutation zu Alanin beeinträchtigt die Prozessierung der meisten Substrate [270, 271]. Position x, AS-Position 383 in PS1, dagegen scheint deutlich flexibler und bei der Diskriminierung von Substraten von größerer Bedeutung zu sein [273]. So kann die PS1-Variante L383F APP relativ gut prozessieren bei gleichzeitig starker Beeinträchtigung der Notch1-Prozessierung [273]. Im Gegensatz zu den beiden benachbarten kritischen Glycinen ist über die funktionelle Bedeutung von L383 des GLGD-Motivs in PS1 nur wenig bekannt. Um ein besseres Verständnis für den Einfluss von L383 auf die katalytische Aktivität der γ -Sekretase sowie auf die Differenzierung ihrer Substrate zu erhalten, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit eine umfangreiche Mutagenesestudie an dieser Position durchgeführt.

Der therapeutische Einsatz von klassischen GSIs ist insbesondere wegen der Inhibition des Notch-Signalwegs mit ernststen Nebenwirkungen behaftet [388]. Eine Alternative stellen GSMs dar, die die Spiegel der neurotoxischen $A\beta_{42/43}$ -Spezies senken ohne die Prozessierung anderer γ -Sekretasesubstrate zu beeinflussen. Deshalb besteht die Hoffnung, dass sie auch bei chronischer Einnahme deutlich besser verträglich sein werden als GSIs. Besonders FAD-Patienten, bei denen die Amyloidkaskade wahrscheinlich entscheidend zur Pathogenese beiträgt, könnten von GSMs durch eine signifikante Verzögerung des Krankheitsbeginns als auch des Verlaufs profitieren. Allerdings waren aggressive, d.h. $A\beta_{42}$ stark erhöhende PS-FAD-Mutanten resistent gegen den $A\beta_{42}$ -senkenden Effekt von GSMs der ersten Generation wie Sulindac Sulfid [199, 200]. Ebenso wenig konnte der deutlich potentere GSM-1 aus der zweiten Generation die $A\beta_{42}$ -Spiegel bei den bei-

den einzigen untersuchten aggressiven PS-Mutanten signifikant absenken [199]. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher das Verhalten einer großen Anzahl über das gesamte Molekül verteilter PS-FAD- und synthetischer Mutationen auf Behandlung mit neueren potenteren GSMs untersucht. Dabei sollte zum einen geklärt werden, ob aggressive PS-FAD-Mutationen generell nicht mehr auf die $A\beta_{42}$ -Inhibition durch GSMs ansprechen, was durch subtile Konformationsänderungen des γ -Sekretasekomplexes bedingt sein könnte. Zum anderen sollte untersucht werden, ob sich resistente Mutationen in bestimmten Regionen des PS-Moleküls häufen, um so Rückschlüsse auf eine potentielle Bindungsstelle ziehen zu können.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Position x des GxGD-Motivs in PS beeinflusst die Schnittspezifität und Substratselektion der γ -Sekretase (Publikation 1)

Die γ -Sekretase ist durch ihr breites Substratspektrum in viele physiologische Prozesse involviert [442], über die Bindung von Substraten an den γ -Sekretasekomplex ist jedoch erst wenig bekannt. Aufgrund der zentralen Stellung der γ -Sekretase in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung sowie im Hinblick auf mögliche Implikationen für die Entwicklung APP-selektiver GSIs kommt der Aufklärung des Mechanismus ihrer Substraterkennung und -selektion besondere Bedeutung zu. Das derzeitige Modell beruht auf teilweise widersprüchlichen Daten und ist daher Thema kontroverser Diskussionen. Als initialer Rezeptor für Substrate wurde NCT vorgeschlagen [298], was jedoch keineswegs unumstritten ist [299]. Ferner wurde eine weitere Bindungsstelle innerhalb des PS-Moleküls postuliert, die *Docking Site*, die dem aktiven Zentrum vorgeschaltet ist [375,376]. Sie soll sich sehr nahe am aktiven Zentrum befinden bzw. partiell mit diesem überlappen [385]. In Einklang mit der unmittelbaren Nähe von aktivem Zentrum und *Docking Site* steht die essentielle Bedeutung des konservierten GxGD-Motivs in TMD 7 für die Aktivität und die Substratdiskriminierung der γ -Sekretase [270,271,273]. Mutagenesestudien zeigten die kritische Bedeutung der beiden Glycine; lediglich die milde Mutation zu Alanin bewahrt eine gewisse proteolytische Aktivität der γ -Sekretase, jedoch nicht für jedes Substrat [270,271]. Von besonderer Bedeutung für die Substratselektion scheint Position x zu sein, die in fast allen PS-Proteinen mit einem Leucin besetzt ist. Mutation zu einem GFGD-Motiv, wie es in dem PS-Homolog SPE-4 in *C. elegans* vorkommt, führt zu einem unterschiedlichen Verhalten bei der Prozessierung von APP und Notch1 [273].

Um ein besseres Verständnis für die funktionelle Bedeutung der Position x, L383 in PS1, zu gewinnen, wurde eine intensive Mutagenesestudie an dieser Position durchgeführt. Fast alle AS-Reste wurden an dieser Position eingefügt. Jede dieser Mutanten erlaubt die korrekte Reifung der γ -Sekretase, was mittels der PS-Endoproteolyse sowie der Glykosylierung von NCT kontrolliert wurde. Dabei zeigte sich, dass die APP-Prozessierung nur durch das heterocyclische Prolin (P) sowie aromatische (F, Y, W) und positiv geladene (K, R) AS leicht beeinträchtigt wird, während hydrophobe aliphatische (G, A, V, I, M) und hydrophile (D, N, E, Q, H) Mutationen gut toleriert werden. Im Gegensatz zur Gesamt-A β Produktion veränderten jedoch alle L383-Mutanten die Schnittspezifität der γ -Sekretase. Alle Mutationen zeigten eine deutliche Reduktion der kurzen A β ₃₇₋₃₉ Spezies, außer L383N, das A β ₃₇₋₃₉ sogar erhöhte. Wie die meisten PS-FAD-Mutationen [43] erhöhten die hydrophilen AS (mit Ausnahme von L383N), Prolin und die aromatischen AS, nicht jedoch die hydrophoben Aliphaten das Verhältnis von

$A\beta_{42}/A\beta_{Total}$, wobei L383W den stärksten Anstieg aufwies. Außerdem produzierten L383K, R, Y und P deutlich detektierbare Mengen $A\beta_{43}$, das bei L383P sogar den größten Anteil der pathogenen Spezies ausmacht.

Bei PS-FAD-Mutationen beruht der Anstieg der pathogenen $A\beta_{42/43}$ -Spezies auf Konformationsänderungen des γ -Sekretasekomplexes [429]. Diese könnten der Grund sein für die Resistenz einiger PS-FAD-Mutationen mit stark erhöhten $A\beta_{42}$ -Spiegeln gegen die $A\beta_{42}$ -Senkung durch GSMs [199–201]. Da alle L383-Mutanten die Schnittspezifität der γ -Sekretase verändern, wurde im nächsten Schritt das Verhalten ausgewählter, insbesondere $A\beta_{42}$ erhöhender L383-Mutanten auf GSM-Behandlung untersucht. Interessanterweise ließen sich die $A\beta_{42}$ -Spiegel von PS1 L383P, der aromatischen sowie positiv geladenen Mutanten weder durch den acidischen GSM-1 noch durch den potentiellen nicht-acidischen GSM aus der Klasse der verbrückten Aromaten von Eisai senken. Lediglich L383Y sprach partiell auf den GSM von Eisai an, jedoch deutlich schwächer als PS1 WT. Im Gegensatz dazu reagierten alle Mutanten mit einer deutlichen Erhöhung von $A\beta_{38}$, die Bindung der GSMs wurde offensichtlich nicht beeinträchtigt. Überraschenderweise war die GSM-Resistenz nicht strikt an eine starke Erhöhung von $A\beta_{42}/A\beta_{Total}$ gekoppelt. So reagierte PS1 L383H, das einen erhöhten $A\beta_{42}$ -Spiegel aufweist, mit einer deutlichen $A\beta_{42}$ -Absenkung auf Behandlung mit GSM-1.

Konzentrierte sich die bisherige Analyse auf APP, sollte im nächsten Schritt die Prozessierung weiterer Substrate, CD44 und Notch1, durch die L383-Mutanten untersucht werden. In einer früheren Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die Mutation PS1 L383F die proteolytische Umsetzung von Notch1 stark reduziert, ohne jedoch die APP-Prozessierung entscheidend einzuschränken [273]. Dabei fielen wieder Prolin, die aromatischen und die positiv geladenen AS durch ein besonderes Verhalten auf. Die Prozessierung sowohl von Notch1 als auch von CD44 wurde durch diese Mutationen signifikant reduziert, ohne jedoch zu einem vollständigen Verlust der proteolytischen Aktivität zu führen. CD44, das sich bereits in einer früheren Arbeit als besonders sensitiv gegenüber Mutationen im GxGD-Motiv erwiesen hatte [271], war von der Reduktion der proteolytischen Aktivität in noch stärkerem Maße betroffen als Notch1, das zumindest durch PS1 L383F und Y noch mäßig prozessiert wurde. Jedoch wurde für L383F bereits gezeigt, dass die Restaktivität nicht genügt, den Notch-Signalweg *in vivo* ausreichend zu unterstützen [273]. Die restlichen Mutanten wurden wesentlich besser toleriert und waren durch eine robuste Umsetzung beider Substrate gekennzeichnet.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass L383 weniger kritisch für katalytische Aktivität der γ -Sekretase ist als die beiden benachbarten Glycine [270, 271]. In Einklang mit Yamasaki *et al.* [273] scheinen die L383-Mutanten stärkeren Einfluss auf die Selektion von Substraten zu haben. APP wurde von allen Mutanten prozessiert, lediglich einige AS

(Prolin, Aromaten und positiv geladene AS) führten zu einem leichten Verlust der proteolytischen Aktivität. Dieser Aktivitätsverlust fiel allerdings für Notch1 und CD44 deutlich drastischer aus. Ob dies auf einer gestörten Substratbindung oder einer reduzierten katalytischen Aktivität beruht, lässt sich nicht abschließend beantworten. Die APP-TMD ist, im Gegensatz zu den TMDs von Notch1 und CD44, durch auffallend viele sogenannte β -*branched* AS (V, T und I) gekennzeichnet [443]. Diese kommen bevorzugt in β -Faltblättern vor und sollen α -Helices in TMDs destabilisieren [444,445]. Die Konformation der APP-TMD weist daher möglicherweise eine höhere Flexibilität auf, wodurch die Interaktion mit der *Docking Site* bzw. dem aktiven Zentrum weniger anfällig gegenüber Mutationen an Position x sein könnte.

Trotz des geringen Einflusses auf die proteolytische APP-Prozessierung veränderten alle L383-Mutanten die Schnittspezifität der γ -Sekretase. Dies steht in Einklang mit früheren Daten, die zeigten, dass die proteolytische Aktivität nicht zwangsläufig mit der Prozessivität korreliert [51, 58, 203]. Interessanterweise reagierten Mutationen, die die Notch1- bzw. CD44-Prozessierung beeinträchtigten und $A\beta_{42/43}/A\beta_{Total}$ erhöhten, nach Behandlung mit potenten GSMs unterschiedlicher Struktur nicht mit einer $A\beta_{42}$ -Absenkung.

Der konservierte Leucinrest an Position x des GxGD-Motivs gewährleistet eine effiziente Umsetzung einer großen Anzahl verschiedener γ -Sekretasesubstrate, während ein Prolinrest, aromatische Reste oder positive Ladung an dieser Position die Vielfalt der Substrate einschränkt. Veränderungen an dieser Position, wie es bei SPE-4 der Fall ist, das ein GFGD-Motiv aufweist [273], könnten aufgrund des reduzierten Substratspektrums eine Erhöhung der Spezifität für permissive Substrate wie z.B. APP bewirken.

Interessanterweise wurde kürzlich das GxGD-Motiv als Teil einer Nucleotid-Bindestelle vorgeschlagen, die Angriffspunkt von bestimmten *Notch-sparing* GSIs, die sich von 2-Hydroxy-naphthyl-Derivaten ableiten, sein soll [386]. Demzufolge kommt L383 eine kritische Bedeutung für die Bindung von Notch1, nicht jedoch von APP, zu [386]. Daten zur Kristallstruktur von FlaK, einer archealen GxGD-Protease [446], haben gezeigt, dass das GxGD-Motiv dieser Protease in einem wenig strukturierten TM-Bereich liegt [447], wie es auch biochemische [233] und NMR-Daten [448] für PS nahelegen. Position L383 ist räumlich wahrscheinlich von den benachbarten Glycinen abgewandt [233, 386] und könnte für die räumliche Struktur, die eine optimale Substratinteraktion garantiert, von entscheidender Bedeutung sein. Jüngst wurde die Kristallstruktur eines archealen PS-Homologs [449] publiziert [450]. Allerdings weichen diese Kristallstrukturdaten in einigen Punkten von den bisherigen Strukturdaten von PS ab. So weist TMD 7 durchgehend eine α -helikale Struktur auf [450], so dass das GxGD-Motiv nicht in einem unstrukturierten Bereich zu liegen kommt. Ein weiterer markanter Unterschied betrifft TMD 9.

Diese ist in der neuen Struktur ebenfalls durchgehend α -helikal, während FlaK [447] sowie NMR-Strukturdaten von PS1 [448] einen deutlichen Knick in TMD 9 aufweisen. Auch biochemische Daten stützen das Modell einer abgewinkelten TMD 9 [239, 276]. Möglicherweise beruhen diese Diskrepanzen darauf, dass es sich bei dieser Protease weniger um ein PS-Homolog, sondern vielmehr um eine homologe Signalpeptid-Peptidase (SPP) handelt.

2.2 GSMs der zweiten Generation überwinden die abgeschwächte $A\beta_{42}$ -Antwort von schwach-potenten GSMs (Publikation 2)

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte das Verhalten von aggressiven PS-Mutationen, die zu einer starken $A\beta_{42}$ -Erhöhung führen, auf Behandlung mit GSMs untersucht werden. Mehrere Studien berichten über abgeschwächte $A\beta_{42}$ -Reaktionen einiger PS-Mutanten nach Behandlung mit schwach potenten NSAIDs wie Sulindac Sulfid ($IC_{50} = 70 \mu M$) [199–201]. Die zwei besonders aggressiven Mutanten PS1 L166P und PS2 N141I erwiesen sich auch als resistent gegen GSM-1, einem deutlich potenteren NSAID-ähnlichem GSM der zweiten Generation ($IC_{50} = 180 nM$) [199]. Erstaunlicherweise blieb die Modulierbarkeit von $A\beta_{38}$ dagegen immer erhalten [199–201]. Diese Befunde führten zu dem Konzept, dass stark $A\beta_{42}$ -erhöhende PS-Mutationen eine Konformationsänderung des γ -Komplexes bewirken, die dem Komplex eine Resistenz gegen die $A\beta_{42}$ -Inhibition durch GSMs verleiht.

Im Rahmen der GSM-Versuche im ersten Teil der Arbeit wurde die unerwartete Entdeckung gemacht, dass die ebenfalls sehr aggressive Mutante PS1 G384A, die eine der PS1 L166P-Mutante vergleichbare $A\beta_{42}$ -Erhöhung bewirkt, auf Behandlung mit GSM-1 mit einer deutlichen $A\beta_{42}$ -Absenkung reagiert, wenn auch etwas schwächer als PS1 WT. Durch die besondere Lage direkt neben dem katalytischen Aspartat in TMD 7 führt G384A möglicherweise zu keiner Beeinträchtigung der allosterischen GSM-Bindungsstelle. Um den Einfluss verschiedener PS-Mutationen zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt über das gesamte PS-Molekül verteilte PS-Mutationen (inklusive der konservierten Motive des aktiven Zentrums) in Bezug auf $A\beta_{42}$ -Inhibition durch GSM-1 analysiert. Es stellte sich heraus, dass sich die $A\beta_{42}$ -Spiegel selbst der meisten aggressiven PS1-Mutationen, wie z.B. P117L, M223V oder Y256S, mit GSM-1 deutlich absenken lassen, so dass resistente Mutanten eher die Ausnahme darstellen. Weiterhin scheint die Modulierbarkeit von $A\beta_{42}$ nicht mit der Höhe des $A\beta_{42}$ -Spiegels zu korrelieren, wie anhand der PS1 L166W Mutante gezeigt werden konnte, bei der sich die lediglich leicht erhöhten $A\beta_{42}$ -Spiegel durch GSM-1 nicht absenken ließen. Darüber hinaus reagierten einige PS1-Mutanten auch mit einer deutlichen $A\beta_{40}$ -Absenkung; so wurde $A\beta_{38}$ z.B. bei PS1 G384A durch GSM-1-Behandlung zur Hauptspezies. Dieser Effekt wurde weder

bei WT-PS1 nach GSM-1-Behandlung noch bei einer PS-Mutante nach Behandlung mit Sulindac Sulfid beobachtet.

Da das grobe Muster der $A\beta_{42}$ -Reaktion der meisten PS-Mutanten auf Behandlung mit Sulindac Sulfid und GSM-1 eine gewisse Ähnlichkeit aufwies, wurde durch Titrationsgezeigt, dass GSM-1-sensible PS-Mutanten bei Verdopplung der Konzentration auch auf Sulindac Sulfid anzusprechen begannen, während GSM-1-resistente Mutanten auf eine Erhöhung der Sulindac Sulfid Dosis nicht reagierten. Zudem war das Verhalten ausgewählter PS-Mutanten nach Behandlung mit neuen potenten nicht-acidischen GSMs von Eisai ($IC_{50} = 40$ nM) und TorreyPines ($IC_{50} = 45$ nM) dem nach GSM-1-Behandlung sehr ähnlich. So waren beide Substanzen in der Lage, die $A\beta$ -Spiegel aggressiver PS1-Mutanten zu senken, mit Ausnahme der GSM-1-resistenten Mutanten PS1 N135I, L166P sowie L383W.

Diese Befunde sprechen für einen ähnlichen Wirkungsmechanismus dieser Substanzen und lassen sich eher mit einer Bindungsstelle bzw. sich überlappenden Bindungsstellen innerhalb von PS vereinbaren. Interessanterweise ließen sich die $A\beta_{42}$ -Spiegel bei PS2 WT nach GSM-1-Behandlung im Vergleich zu PS1 WT weniger stark absenken, während bei Sulindac Sulfid kein Unterschied festzustellen war. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für einige homologe PS-Mutationen beobachtet. So sprachen die zu den aggressiven PS1-Mutationen M233V und G384A homologen PS2-Mutationen M239V und G365A deutlich schlechter auf GSM-1 an. Diese Befunde sprechen dafür, dass die potentielle GSM-Bindungsstelle in einer nicht vollständig konservierten Region des PS-Moleküls liegt.

Die Unterschiede der modulatorischen Potenz könnten auf unterschiedlichen Affinitäten der Substanzen zu PS1 und PS2 beruhen, so dass subtile Konformationsänderungen des γ -Sekretasekomplexes schwach affine Substanzen wie Sulindac Sulfid stärker betreffen würden. Potentere Substanzen wie GSM-1 wären erst durch drastischere Konformationsänderungen betroffen. In PS2 scheint die Bindungsstelle für GSM-1 nicht vollständig konserviert zu sein, so dass Mutationen die Bindung stärker beeinträchtigen. Interessanterweise wurden auch GSMs beschrieben, die ein umgekehrtes Verhalten zeigen, also bei PS2 WT zu einer stärkeren $A\beta_{42}$ -Absenkung als bei PS1 WT führen [451].

PS1 L166 erwies sich für die $A\beta_{42}$ -senkende Wirkung von GSMs als besonders kritisch. Mit Ausnahme der konservativen L166V-Mutation wurde die $A\beta_{42}$ -Modulation durch jede andere Mutation stark beeinträchtigt. Möglicherweise trägt die Position L166 entscheidend zur Konformation der Bindungsstelle bei.

In Einklang mit diesen Ergebnissen konnten kürzlich mehrere Gruppen unabhängig voneinander das PS-NTF mittels chemischer Querverknüpfung als Zielprotein von GSMs der zweiten Generation unterschiedlicher Strukturklassen identifizieren [439, 451–453].

GSM-1 soll dabei spezifisch an TMD1 von PS binden [439]. In einer Studie konnte die Quervernetzung des PS1-NTF mit einem Aminopyrimidin-GSM sowohl mit Sulindac Sulfid als auch mit den in dieser Arbeit verwendeten nicht-acidischen GSMs von Eisai bzw. TorreyPines kompetitiert werden, was auf eine überlappende Bindungsstelle schließen lässt [451]. Insgesamt besteht starke Evidenz für eine zumindest überlappende Bindungsstelle der GSMs innerhalb des PS-NTF, was nur schwer mit der von Kukar *et al.* vorgeschlagenen Substratbindung in Einklang zu bringen ist [431].

Der Befund, dass PS-Mutationen selektiv die Modulierbarkeit von $A\beta_{42}$, nicht jedoch von $A\beta_{38}$ beeinträchtigen, ist mit den bisher erhobenen Daten nicht zu erklären. Es wurde noch keine PS-Mutation beschrieben, welche die Reaktion von $A\beta_{38}$ deutlich abschwächt, was Hinweise auf den Mechanismus geben könnte. Erst nach exakter Lokalisierung der Bindungsstelle(n) mit Hilfe passender Photoaffinitätsmarkierungsderivate von potenten GSMs kann dieses Problem in Angriff genommen werden. Möglicherweise interferieren resistente Mutanten weniger mit der GSM-Bindung, sondern beeinflussen die Positionierung von APP am aktiven Zentrum derart, dass die γ -42-Schnittstelle nicht mehr moduliert werden kann.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass die $A\beta_{42}$ -senkende Wirkung von GSMs nicht von der Höhe des $A\beta_{42}$ -Spiegels abhängt, sondern von der Potenz des GSM, der jeweiligen Mutation sowie der speziellen räumlichen Umgebung innerhalb des Moleküls. Stark potente GSMs sind in der Lage die $A\beta_{42}$ -Spiegel der großen Mehrheit der bekannten PS-FAD-Mutationen zu senken.

Aus diesen Befunden ergeben sich einige wichtige Implikationen. Einerseits müssen, wie bereits eine frühere Studie zeigte [199], Mausmodelle für präklinische Untersuchungen mit GSMs mit Sorgfalt ausgewählt werden und die jeweilige PS-Mutation sowie der jeweilige GSM berücksichtigt werden. Andererseits bedeutet die Entwicklung hochpotenter GSMs mit günstigen pharmakologischen Eigenschaften eine therapeutische Hoffnung besonders für Menschen, die an der familiären Alzheimer-Erkrankung leiden. Da bei diesen Patienten die Amyloidkaskaden-Hypothese für die Krankheitsentstehung eine entscheidende Rolle spielt, könnte eine effektive Absenkung der $A\beta_{42}$ -Spiegel durch GSMs den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen ohne die typischen Nebenwirkungen von GSIs hervorzurufen. Aktuell koordiniert das Netzwerk für die dominant vererbte Alzheimer-Krankheit (DIAN³, engl. *Dominantly Inherited Alzheimer Network*) die Planung großangelegter multizentrischer Studien, in denen zwei monoklonale Anti- $A\beta$ -Antikörper sowie möglicherweise ein β -Sekretaseinhibitor erstmals klinisch an FAD-Patienten getestet werden sollen⁴. Möglicherweise könnten im Rahmen dieser Studien auch geeignete GSMs

³Nähere Informationen über das DIAN finden sich auf www.dian-info.org/de.

⁴Detaillierte Informationen sind auf www.alzforum.org/new/detail.asp?id=3289 zu finden.

klinisch erprobt werden. Dabei müsste individuell für jede FAD-Mutation sorgfältig ein passender GSM ausgewählt werden. Träger bestimmter Mutationen, wie z.B. PS1 L166P oder PS2 N141I, die nicht von einer GSM-Therapie profitieren würden, sollten nicht in eine solche Studie aufgenommen werden.

Die Aufnahme von GSMs in die klinische Studienplanung des DIAN-Projektes wäre wünschenswert, da sie aussichtsreiche Kandidaten für eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlauf bei FAD-Patienten sind. Insbesondere die Kombination mit β -Sekretaseinhibitoren könnte sich als effektive Therapieoption erweisen. Zudem wäre die klinische Wirksamkeit von GSMs bei FAD-Patienten eine Bestätigung der Amyloidkaskaden-Hypothese.

2.3 Ausblick

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist Position x des GxGD-Motivs, L383 in PS1, weniger kritisch für die γ -Sekretaseaktivität als die beiden benachbarten Glycine. Einige der L383-Mutationen (Prolin, aromatische und positiv geladene AS) wiesen differentielle Effekte auf die Substratprozessierung sowie eine relative Erhöhung der pathogenen $A\beta_{42/43}$ -Spezies auf. Zusätzlich reagierten diese Mutanten auf GSM-Behandlung nicht mit einer Absenkung von $A\beta_{42}$. Mittels FLIM/FRET könnte man nun untersuchen, ob diese pathogenen L383-Mutationen ebenfalls eine Konformationsänderung der γ -Sekretase induzieren, wie bei FAD-Mutationen bereits gezeigt wurde. Mit Co-IP Experimenten könnte man die Frage klären, ob diese Mutationen die Substratbindung oder eher die katalytische Aktivität bei ungestörter Substratbindung beeinträchtigen. Für eine genaue Lokalisierung bzw. Eingrenzung der Substratbindestelle wären allerdings querverknüpfbare Substrate erforderlich. Mit diesen wären genauere Untersuchungen möglich, inwieweit pathogene L383-Mutationen die Substratbindung beeinflussen. Ferner wäre interessant, die Sequenzbedingungen der Substrate für deren Prozessierung im Hintergrund pathogener L383-Mutationen genauer aufzuklären. Dies könnte mit Konstrukten untersucht werden, bei denen verschiedene Bereiche von APP und Notch1 bzw. CD44, wie TMD und juxtamembran-Bereiche, ausgetauscht sind.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass stark potente GSMs der zweiten Generation im Gegensatz zu den schwach potenten GSMs der ersten Generation die $A\beta_{42}$ -Spiegel der meisten aggressiven PS-Mutationen deutlich absenken können. Eine positive $A\beta_{42}$ -Reaktion hängt dabei im Wesentlichen von der jeweiligen PS-Mutation, der räumlichen Umgebung im PS-Molekül und dem verwendeten GSM ab, jedoch nicht von der Höhe des $A\beta_{42}$ -Spiegels. Mehrere andere Gruppen identifizierten inzwischen das PS-NTF als GSM-Bindungsstelle [439, 451–453]. Diese scheint jedoch nicht vollständig zwischen den beiden PS-Homologen konserviert zu sein, da GSMs ei-

ne differentielle Wirkung auf PS1 und PS2 haben können. Im Gegensatz zu dem in dieser Studie verwendeten GSM-1 zeigte RO-02, ein Aminopyrimidin-GSM, in einer anderen Studie eine effektivere Wirksamkeit bei PS2 als bei PS1 [451]. Es wäre interessant zu untersuchen, ob RO-02 die $A\beta_{42}$ -Spiegel der in der vorliegenden Arbeit untersuchten $A\beta_{42}$ -resistenten PS2-Mutationen absenken kann. Lohnenswert wäre auch, die klinischen Implikationen, die sich für FAD-Patienten ergeben, weiter zu untersuchen. In präklinischen Studien mit geeigneten FAD-Mausmodellen, die eine aggressive $A\beta_{42}$ -permissive PS-Mutation exprimieren, müsste zunächst geklärt werden, ob GSMs die $A\beta_{42}$ -Spiegel und die Plauepathologie auch *in vivo* im Hintergrund von PS-FAD-Mutationen reduzieren können. Als nächster Schritt könnte die Planung einer klinischen Studie stehen, die auf FAD-Patienten, die z.B. im Rahmen des DIAN Projektes rekrutiert werden, zurückgreifen könnte.

3 Material und Methoden

Material und Methoden sind im Nachfolgenden kurz beschrieben. Für eine detailliertere Beschreibung wird auf die angegebenen Referenzen verwiesen.

3.1 Antikörper

3.1.1 Monoklonale Antikörper

Antikörper	Epitop	IB	IP	Quelle/Referenz
PS1N	PS1-NTF, AS 41-49	1:2000	-	R. Nixon [454]
Flag M2	Flag Peptid	1:1000	1:300 ¹	Sigma
9E10	c-myc-Peptid	1:2000	-	SantaCruz
BI.HF5c	PS2-CTF, AS 297-356	1:5000	-	[455]
22C11	APP, AS 66-81, Gesamt-sAPP	1:1000	-	Millipore
4G8	A β , AS 1-40	-	1:300	Covance
2D8	A β , AS 1-16	1 μ g/ml	-	[311]
2D8-Biotin	A β , AS 1-16	-	1:1000 ²	[311]
α -A β ₃₈ -Ruthenium	A β ₃₈ ³	-	1:1000 ²	MSD
BAP24-Ruthenium	A β ₄₀ , AS 34-40	-	1:1000 ²	Roche [456]
BAP15-Ruthenium	A β ₄₂ , AS 36-42	-	1:1000 ²	Roche [456]

IB: Verdünnung für Immunoblot; **IP:** Verdünnung für Immunpräzipitation

¹ Konjugiert an Agarose

² Verdünnung für Elektrochemilumineszenz-Immunoassay

³ Das Epitop wird vom Hersteller nicht angegeben

3.1.2 Polyklonale Antikörper

Antikörper	Epitop	IB	IP	Quelle/Referenz
3027	PS1-CTF, AS 263-407	1:1000	-	[457]
N1660	NCT, AS 693-709	1:5000	-	Sigma
6687	APP, AS 675-695	1:2000	-	[270]
3552	A β , AS 1-40	-	1:300	[273]
Val1744	geschnittenes Maus-Notch1, vor Val1744	1:2000	-	Cell Signaling

3.1.3 Zweit-Antikörper

Antikörper	Epitop	IB	IP	Quelle/Referenz
α -Maus-HRP	Maus IgG	1:5000	-	Promega
α -Kaninchen-HRP	Kaninchen IgG	1:10000	-	Promega
α -Ratte-HRP	Ratte IgG	1:5000	-	Santa Cruz

3.2 Konstrukte und Vektoren

Die folgende Tabelle enthält die in dieser Arbeit verwendeten Basis-cDNA-Konstrukte.

Konstrukt	Klonierungsstellen	Vektor	Referenz
H ₆ X-PS1 wt	BamHI/XhoI	pcDNA4/HisC	[237]
H ₆ X-PS1 D385A	BamHI/XhoI	pcDNA4/HisC	[237]
H ₆ X-PS1 L383F	BamHI/XhoI	pcDNA4/HisC	[273]
PS2 wt	EcoRI/XhoI	pcDNA3.1/zeo(+)	[199]
APP ^{sw} -6myc	ClaI	pCS2(+)	[274]
F-NEXT	- ¹	pcDNA3.1/Hygro(+)	[352]
CD44ΔE-Flag	HindIII/XhoI	pSecTag2/HygroC	[333]

¹ F-Next wurde mit einem kommerziellen PCR-Kit (ExSite PCR-based site-directed mutagenesis kit, Stratagene) kloniert, daher wurden bei der Klonierung keine Restriktionsschnittstellen benötigt [352].

Für die Einführung der gewünschten synthetischen und FAD-PS1/2-Mutationen wurden Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCRs, engl. *polymerase chain reaction*) nach dem QuikChange-Protokoll von Stratagene durchgeführt. Als Grundkonstrukte dienen pcDNA4/HisC::PS1 [237] sowie pcDNA3.1/zeo(+)::PS2 [199]. Die erzeugten cDNA-Konstrukte wurden anschließend durch GATC Biotech nach Sanger [458] sequenziert. Eine detaillierte Auflistung aller hergestellten PS-Konstrukte befindet sich in Tabelle 1 in Publikation 1 sowie in Tabelle 2 in Publikation 2.

Für die stabile Expression von PS1 WT bzw. der PS1 L383-Mutanten in embryonalen Mausfibroblasten (MEF, engl. *mouse embryonic fibroblasts*) wurden die Konstrukte mithilfe der Restriktionsenzyme BamHI/XhoI in den FU-ΔZeo Vektor umkloniert [135], wobei das H₆X-Epitop-Tag abgeschnitten wurde.

3.3 Zellkultur und cDNA-Transfektion

Embryonale humane Nierenzellen 293 (HEK293, engl. *human embryonic kidney cells*), welche stabil APP^{sw} exprimieren (HEK293/sw) [41], wurden bei 37°C und 5% CO₂ in Dulbecos Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) bei Zusatz von 10% fötalem Rinderserum (FBS, engl. *fetal bovine serum*, Sigma), 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep; 100 U/ml / 100 µg/ml) sowie 200 µg/ml G418 (Geneticin, Invitrogen) kultiviert. Zur Herstellung stabiler PS-Zelllinien (beschrieben in [51]) wurden HEK293/sw mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) und den entsprechenden PS-cDNAs gemäß den Angaben des Herstellers transfiziert und mit Zeocin (200 µg/ml, Invitrogen) selektioniert. Um klonale Effekte zu vermeiden, wurden stabil transfizierte Zellpools für die Analysen verwendet (eine detaillierte Liste aller liposomal transfizierten PS-Konstrukte befindet sich in Tabelle 1 in Publikation 1 und in Tabelle 2 in Publikation 2).

MEF-Zellen, die aus PS1/2-defizienten Mäusen gewonnen wurden (PS^{-/-} MEF) [259], wurden unter den gleichen Bedingungen wie HEK293-Zellen, lediglich ohne Zusatz von G418, kultiviert. Mithilfe lentiviraler Gentransduktion wurden, wie bei Kuhn *et al.*

beschrieben [135], PS-cDNAs stabil in PS^{-/-} MEF-Zellen exprimiert (eine detaillierte Liste viral transduzierter PS-Konstrukte befindet sich in Tabelle 1 in Publikation 1). Diese stabilen PS^{-/-} MEF-Zelllinien wurden mit Lipofectamin 2000 transient gemäß den Angaben des Herstellers mit je 8 µg cDNA von APP^{sw-6myc}, F-Next oder CD44ΔE-Flag transfiziert.

3.4 GSM-Behandlung

Die folgende Tabelle enthält sämtliche in dieser Arbeit verwendeten GSMs. Die IC₅₀-Werte für die Aβ₄₂-Inhibition in HEK/sw-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit bestimmt. Die Strukturformeln sind in Abb. 7 gezeigt, die IUPAC-Namen finden sich im Anhang.

Substanz	IC ₅₀ für Aβ ₄₂ in HEK293/sw-Zellen, ggf. ± Standardfehler	Eingesetzte Konzentrationen
Eisai (E2212)	40 nM (logIC ₅₀ = - 7.39 ± 0.12)	1 µM
TorreyPines	45 nM (logIC ₅₀ = - 7.34 ± 0.10)	1 µM
GSM-1	180 nM (logIC ₅₀ = - 6.75 ± 0.16)	0.1, 1 und 10 µM
Sulindac Sulfid	ca. 70 µM	50 und 100 µM

HEK293/sw-Zellpools, die stabil PS WT oder PS-Mutanten überexprimieren, wurden über Nacht (ca. 16 h) mit dem entsprechendem GSM oder DMSO als Kontrolle inkubiert, wie bei Page *et al.* beschrieben [199].

3.5 Proteinbiochemie

Die folgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick der proteinchemischen Methodik für die Analyse der gewünschten Proteine. In den folgenden Unterkapiteln werden die einzelnen Methoden dann kurz erläutert.

Untersuchte Proteine	Ausgangsmaterial	Methoden
PS, NCT, APP (AICD, CTFs), Notch (NICD), CD44-CTFs	Gesamtzelllysate	direkter Immunoblot
Gesamt-sAPP	konditioniertes Medium	direkter Immunoblot
Gesamt-Aβ, CD44β	konditioniertes Medium	Immunpräzipitation/Immunoblot
Aβ ₃₈ , Aβ ₄₀ , Aβ ₄₂	konditioniertes Medium	Immunpräzipitation/Immunoblot ECL-IA Massenspektrometrie

3.5.1 Gesamtzelllysate

Wie in [199] beschrieben, wurden konfluent bewachsene Zellkulturschalen abgeschabt und die Zellen 5 min bei 1000 g abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets in STEN-Lysepuffer (50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Nonidet P-40,

protease inhibitors (Sigma)) resuspendiert und Zellkerne und -debris durch Ultrazentrifugation bei 100000 g entfernt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay bestimmt.

3.5.2 Immunpräzipitation

Die sekretierten A β - und CD44 β -Peptide wurden vor der Detektion im Immunoblot aus konditioniertem Medium von HEK293/sw (A β)- oder stabil transduzierter PS^{-/-} MEF Zellen (A β und CD44 β) durch Immunfällung angereichert [271, 273, 333].

Für A β wurden dem konditionierten Medium je 25 μ l Protein-A-Sepharose (PAS) und 3552-Antikörper zugegeben und bei 4°C über Nacht geschüttelt. Anschließend wurden die Proben je einmal mit STEN-NaCl (wie STEN, aber 500 mM NaCl), STEN-SDS (wie STEN, zusätzlich 0.1% SDS) und STEN (50 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl 2 mM EDTA pH 8.0, 0.2% NP-40) gewaschen.

Für die Immunfällung von CD44 β wurde konditioniertes Medium unter Zugabe von 20 μ l Flag M2-Agarose für mindestens 4h bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden die Proben dreimal mit PBS (140 mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.75 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl) gewaschen. Im Anschluss wurden die Immunpräzipitate nach Zugabe von SDS-PAGE-Probenpuffer und Inkubation bei 95°C mittels SDS-Page und Immunoblot analysiert.

3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Immunoblot

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen transferiert. Die Detektion der gewünschten Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern (siehe 3.1).

3.5.4 Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECL-IA)

Die sekretierten A β ₃₈-, A β ₄₀- und A β ₄₂-Spezies wurden aus konditioniertem Medium mit Hilfe eines ECL-IA quantifiziert [199]. Die Markierung der spezifischen A β -Antikörper BAP-15 (A β ₄₂) und BAP-24 (A β ₄₀) mit dem Sulpho-Ruthenium-Tag folgte den Herstellerangaben; bereits markierter Antikörper gegen A β ₃₈ wurde von MSD bezogen (siehe 3.1). Streptavidinbeschichtete 96-Well-Platten wurden bei Raumtemperatur mit Blockpuffer (1% BSA, 0.05% Tween-20 in PBS) geschüttelt und anschließend mit dem biotinylierten 2D8-Antikörper (1:1000 in Blockpuffer, je 100 μ l) über Nacht inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 75 μ l konditioniertes Medium sowie 25 μ l des jeweiligen Antikörpers (1: 1000 in Blockpuffer) bei Raumtemperatur für mindestens 2 h geschüttelt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde Lesepuffer von Meso Scale Discovery (MSD) zugegeben und unmittelbar im Anschluss die Lichtemission bei 620 nm mit dem MSD Sector Imager 2400 Reader gemessen. Die Bestimmung der Konzentration von A β ₃₈, A β ₄₀ und A β ₄₂ erfolgte mit der MSD Discovery Workbench Software.

3.5.5 Massenspektrometrie (MS)

Konditioniertes Medium von HEK293/sw-Zellen wurde mit dem 4G8-Antikörper und Protein-G-Sepharose (PGS) immungefällt und anschließend dreimal mit MS-IP-Puffer (140 nM NaCl, 0.1% n-Octylglucosid, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA) und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach komplettem Absaugen der Flüssigkeit von der Sepharose wurde das Immunpräzipitat mit 10 μ l MS-Matrix (Trifluoressigsäure: Wasser: Acetonitril (1: 20: 20), gesättigt mit α -Cyano-4-hydroxymethylsäure) eluiert. Davon wurden dann 6 mal 0.8 μ l auf die Probenplatte gegeben. Die Messung der Proben erfolgte im Massenspektrometer, die Datenanalyse erfolgte mit dem Data Explorer.

3.6 Statistik

Für die statistische Analyse wurde beim Vergleich zweier unabhängiger Proben der zweiseitige, ungepaarte t-Test in Microsoft Excel angewendet. Wurden hingegen mehrere unabhängige Proben mit einer Kontrolle verglichen, wurde eine einfache Varianzanalyse (one-way ANOVA, engl. *analysis of variance*) mit nachfolgendem Dunnett's Post-hoc-Test in Prism (GraphPad Prism Version 5.0) durchgeführt. Bei $p \leq 0.05$ wurde das Ergebnis als statistisch signifikant gewertet. Es wurden folgende Signifikanzniveaus festgelegt: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) und $p \leq 0.001$ (**).

Literatur

- [1] S.S. Sisodia and P.H. St George-Hyslop. γ -Secretase, notch, A β and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci*, 3(4):281–90, 2002.
- [2] C. Ballard, S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland, and E. Jones. Alzheimer's disease. *Lancet*, 377(9770):1019–31, 2011.
- [3] D. M. Holtzman, J. C. Morris, and A. M. Goate. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med*, 3(77):77sr1, 2011.
- [4] C.P. Ferri, M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366(9503):2112–7, 2005.
- [5] U. Ziegler and G. Doblhammer. Prävalenz und Inzidenz von Demenz in Deutschland - Eine Studie auf Basis von Daten der gesetzlichen Krankenversicherungen von 2002. *Gesundheitswesen*, 71(5):281–90, 2009.
- [6] R. Brookmeyer, E. Johnson, K. Ziegler-Graham, and H.M. Arrighi. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 3(3):186–91, 2007.
- [7] P. Kiencke, D. Daniel, C. Grimm, and R. Rychlik. Direct costs of Alzheimer's disease in Germany. *Eur J Health Econ*, 12(6):533–9, 2011.
- [8] H. Hampel, D. Prvulovic, S. Teipel, F. Jessen, C. Luckhaus, L. Frölich, M.W. Riepe, R. Dodel, T. Leyhe, L. Bertram, et al. The future of Alzheimer's disease: the next 10 years. *Prog Neurobiol*, 95(4):718–28, 2011.
- [9] R. N. Kalaria, G. E. Maestre, R. Arizaga, R. P. Friedland, D. Galasko, K. Hall, J. A. Luchsinger, A. Ogunniyi, E. K. Perry, F. Potocnik, et al. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol*, 7(9):812–26, 2008.
- [10] A. Gulland. Number of people with dementia will reach 65.7 million by 2030, says report. *BMJ*, 344:e2604, 2012.
- [11] K. Maurer, S. Volk, and H. Gerbaldo. Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet*, 349(9064):1546–9, 1997.
- [12] A. Alzheimer. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *All Z Psychoat Psych-Gerichtl Med*, 64(1-2):146–8, 1907.
- [13] A. Alzheimer. Über eigenartige Krankheitsfälle des späten Alters. *Z Ges Neurol Psychiat*, 4(1):356–85, 1911.
- [14] C. Duyckaerts, B. Delatour, and M.-C. Potier. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*, 118(1):5–36, 2009.
- [15] D. W. Dickson, H. A. Crystal, L. A. Mattiace, D. M. Masur, A. D. Blau, P. Davies, S. H. Yen, and M. K. Aronson. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging*, 13(1):179–89, 1992.
- [16] V. Haroutunian, D. P. Perl, D. P. Purohit, D. Marin, K. Khan, M. Lantz, K. L. Davis, and R. C. Mohs. Regional distribution of neuritic plaques in the nondemented elderly and subjects with very mild Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 55(9):1185–91, 1998.
- [17] J. Hardy and D.J. Selkoe. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580):353–6, 2002.
- [18] D.J. Selkoe. Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nat Med*, 17(9):1060–5, 2011.
- [19] J. Kang, H.G. Lemaire, A. Unterbeck, J.M. Salbaum, C.L. Masters, K.H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, and B. Müller-Hill. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106):733–6, 1987.
- [20] D. Goldgaber, M.I. Lerman, O.W. McBride, U. Saffiotti, and D.C. Gajdusek. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*, 235(4791):877–80, 1987.

- [21] R.E. Tanzi, J.F. Gusella, P.C. Watkins, G.A. Bruns, P. St George-Hyslop, M.L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D.M. Kurnit, and R.L. Neve. Amyloid β protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*, 235(4791):880–4, 1987.
- [22] N. K. Robakis, N. Ramakrishna, G. Wolfe, and H. M. Wisniewski. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(12):4190–4, 1987.
- [23] T. Iwatsubo, D. M. Mann, A. Odaka, N. Suzuki, and Y. Ihara. Amyloid β protein (A β) deposition: A β 42(43) precedes A β 40 in Down syndrome. *Ann Neurol*, 37(3):294–9, 1995.
- [24] E. McGowan, F. Pickford, J. Kim, L. Onstead, J. Eriksen, C. Yu, L. Skipper, M. P. Murphy, J. Beard, P. Das, et al. A β 42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron*, 47(2):191–9, 2005.
- [25] M. Goedert, M.G. Spillantini, N.J. Cairns, and R.A. Crowther. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron*, 8(1):159–68, 1992.
- [26] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, and L.I. Binder. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(13):4913–7, 1986.
- [27] D.G. Drubin and M.W. Kirschner. Tau protein function in living cells. *J Cell Biol*, 103(6):2739–46, 1986.
- [28] R. Dixit, J.L. Ross, Y.E. Goldman, and E.L.F. Holzbaur. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science*, 319(5866):1086–9, 2008.
- [29] D. W. Dickson, N. Kouri, M. E. Murray, and K. A. Josephs. Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-tau (FTLD-tau). *J Mol Neurosci*, 45(3):384–9, 2011.
- [30] H. Braak and E. Braak. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82(4):239–59, 1991.
- [31] H. Braak, E. Braak, D. Yilmazer, R.A. de Vos, E.N. Jansen, and J. Bohl. Pattern of brain destruction in Parkinson’s and Alzheimer’s diseases. *J Neural Transm*, 103(4):455–90, 1996.
- [32] V. Haroutunian, D. P. Purohit, D. P. Perl, D. Marin, K. Khan, M. Lantz, K. L. Davis, and R. C. Mohs. Neurofibrillary tangles in nondemented elderly subjects and mild Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 56(6):713–18, 1999.
- [33] P. T. Nelson, I. Alafuzoff, E. H. Bigio, C. Bouras, H. Braak, N. J. Cairns, R. J. Castellani, B. J. Crain, P. Davies, K. Del Tredici, et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*, 71(5):362–81, 2012.
- [34] H. Kaduszkiewicz and F. Hoffmann. Review: cholinesterase inhibitors and memantine consistently but marginally improve symptoms of dementia. *Evid Based Ment Health*, 11(4):113, 2008.
- [35] L. E. Farrimond, E. Roberts, and R. McShane. Memantine and cholinesterase inhibitor combination therapy for Alzheimer’s disease: a systematic review. *BMJ Open*, 2(3), 2012.
- [36] C. Reitz, C. Brayne, and R. Mayeux. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 7(3):137–52, 2011.
- [37] A. Goate, M.C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer’s disease. *Nature*, 349(6311):704–6, 1991.
- [38] R. Sherrington, E.I. Rogaev, Y. Liang, E.A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer’s disease. *Nature*, 375(6534):754–60, 1995.
- [39] E. Levy-Lahad, W. Wasco, P. Poorkaj, D.M. Romano, J. Oshima, W.H. Pettingell, C.E. Yu, P.D. Jondro, S.D. Schmidt, K. Wang, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer’s disease locus. *Science*, 269(5226):973–7, 1995.

- [40] E.I. Rogaev, R. Sherrington, E.A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda, et al. 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):775–8, 1995.
- [41] M. Citron, T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A.Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg, and D.J. Selkoe. Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature*, 360(6405):672–4, 1992.
- [42] D. Scheuner, C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T.D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, et al. 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):864–70, 1996.
- [43] O. Murayama, T. Tomita, N. Nihonmatsu, M. Murayama, X. Sun, T. Honda, T. Iwatsubo, and A. Takashima. Enhancement of amyloid β 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 265(1):61–3, 1999.
- [44] T. Saito, T. Suemoto, N. Brouwers, K. Sleegers, S. Funamoto, N. Mihira, Y. Matsuba, K. Yamada, P. Nilsson, J. Takano, et al. Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A γ ₄₃. *Nat Neurosci*, 14(8):1023–32, 2011.
- [45] N. Brouwers, K. Sleegers, and C. Van Broeckhoven. Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update. *Ann Med*, 40(8):562–83, 2008.
- [46] A. Rovelet-Lecrux, D. Hannequin, G. Raux, N. Le Meur, A. Laquerrière, A. Vital, C. Dumanchin, S. Feuillette, A. Brice, M. Vercelletto, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*, 38(1):24–6, 2006.
- [47] H. Thonberg, M. Fallström, J. Björkström, J. Schoumans, I. Nennesmo, and C. Graff. Mutation screening of patients with Alzheimer disease identifies APP locus duplication in a Swedish patient. *BMC Res Notes*, 4:476, 2011.
- [48] S. Ness, M. Raffi, P. Aisen, M. Krams, W. Silverman, and H. Manji. Down's syndrome and Alzheimer's disease: towards secondary prevention. *Nat Rev Drug Discov*, 11(9):655–6, 2012.
- [49] E.A. Heilig, W. Xia, J. Shen, and R.J. Kelleher, 3rd. A presenilin-1 mutation identified in familial Alzheimer disease with cotton wool plaques causes a nearly complete loss of γ -secretase activity. *J Biol Chem*, 285(29):22350–9, 2010.
- [50] W. Song, P. Nadeau, M. Yuan, X. Yang, J. Shen, and B. A. Yankner. Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(12):6959–63, 1999.
- [51] T. Moehlmann, E. Winkler, X. Xia, D. Edbauer, J. Murrell, A. Capell, C. Kaether, H. Zheng, B. Ghetti, C. Haass, et al. 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, 2002.
- [52] M. Bentahir, O. Nyabi, J. Verhamme, A. Tolia, K. Horré, J. Wiltfang, H. Esselmann, and B. De Strooper. Presenilin Clinical Mutations Can Affect γ -Secretase Activity by Different Mechanisms. *J Neurochem*, 96(3):732–742, 2006.
- [53] J. Shen and R.J. Kelleher, 3rd. The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(2):403–9, 2007.
- [54] B. De Strooper. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep*, 8(2):141–6, 2007.
- [55] J. A. Davis, S. Naruse, H. Chen, C. Eckman, S. Younkin, D. L. Price, D. R. Borchelt, S. S. Sisodia, and P. C. Wong. An Alzheimer's disease-linked PS1 variant rescues the developmental abnormalities of PS1-deficient embryos. *Neuron*, 20(3):603–9, 1998.
- [56] S. Qian, P. Jiang, X. M. Guan, G. Singh, M. E. Trumbauer, H. Yu, H. Y. Chen, L. H. Van de Ploeg, and H. Zheng. Mutant human presenilin 1 protects presenilin 1 null mouse against embryonic lethality and elevates A β 1-42/43 expression. *Neuron*, 20(3):611–7, 1998.

- [57] L. Kulic, J. Walter, G. Multhaup, D. B. Teplow, R. Baumeister, H. Romig, A. Capell, H. Steiner, and C. Haass. Separation of presenilin function in amyloid β -peptide generation and endoproteolysis of Notch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11):5913–18, 2000.
- [58] L. Chávez-Gutiérrez, L. Bammens, I. Benilova, A. Vandersteen, M. Benurwar, M. Borgers, S. Lismond, L. Zhou, S. Van Cleynebreugel, H. Esselmann, et al. The mechanism of γ -secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J*, 31(10):2261–74, 2012.
- [59] B. Wang, W. Yang, W. Wen, J. Sun, B. Su, B. Liu, D. Ma, D. Lv, Y. Wen, T. Qu, et al. γ -secretase gene mutations in familial acne inversa. *Science*, 330(6007):1065, 2010.
- [60] A. E. Pink, M. A. Simpson, G. W. Brice, C. H. Smith, N. Desai, P. S. Mortimer, J. N. Barker, and R. C. Trembath. PSENEN and NCSTN mutations in familial hidradenitis suppurativa (Acne Inversa). *J Invest Dermatol*, 131(7):1568–70, 2011.
- [61] L. E. Hebert, P. A. Scherr, J. L. Bienias, D. A. Bennett, and D. A. Evans. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol*, 60(8):1119–22, 2003.
- [62] E.H. Corder, A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G.W. Small, A.D. Roses, J.L. Haines, and M.A. Pericak-Vance. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer’s disease in late onset families. *Science*, 261(5123):921–3, 1993.
- [63] W.J. Strittmatter, A.M. Saunders, D. Schmechel, M. Pericak-Vance, J. Enghild, G.S. Salvesen, and A.D. Roses. Apolipoprotein E: high-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(5):1977–81, 1993.
- [64] Y. Namba, M. Tomonaga, H. Kawasaki, E. Otomo, and K. Ikeda. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer’s disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res*, 541(1):163–6, 1991.
- [65] T. Wisniewski and B. Frangione. Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett*, 135(2):235–8, 1992.
- [66] J. Kim, J.M. Basak, and D.M. Holtzman. The role of apolipoprotein E in Alzheimer’s disease. *Neuron*, 63(3):287–303, 2009.
- [67] D.M. Holtzman, J. Herz, and G. Bu. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(3):a006312, 2012.
- [68] D.M. Holtzman, K.R. Bales, T. Tenkova, A.M. Fagan, M. Parsadanian, L.J. Sartorius, B. Mackey, J. Olney, D. McKeel, D. Wozniak, and S.M. Paul. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6):2892–7, 2000.
- [69] E. Cerf, A. Gustot, E. Goormaghtigh, J.-M. Ruysschaert, and V. Raussens. High ability of apolipoprotein E4 to stabilize amyloid- β peptide oligomers, the pathological entities responsible for Alzheimer’s disease. *FASEB J*, 25(5):1585–95, 2011.
- [70] Q. Jiang, C.Y.D. Lee, S. Mandrekar, B. Wilkinson, P. Cramer, N. Zelcer, K. Mann, B. Lamb, T.M. Willson, J.L. Collins, et al. ApoE promotes the proteolytic degradation of A β . *Neuron*, 58(5):681–93, 2008.
- [71] R. Deane, A. Sagare, K. Hamm, M. Parisi, S. Lane, M. B. Finn, D. M. Holtzman, and B. V. Zlokovic. apoE isoform-specific disruption of amyloid β peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest*, 118(12):4002–13, 2008.
- [72] J. M. Castellano, J. Kim, F. R. Stewart, H. Jiang, R. B. DeMattos, B. W. Patterson, A. M. Fagan, J. C. Morris, K. G. Mawuenyega, C. Cruchaga, et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med*, 3(89):89ra57, 2011.
- [73] J.W. Ashford. APOE genotype effects on Alzheimer’s disease onset and epidemiology. *J Mol Neurosci*, 23(3):157–65, 2004.
- [74] P. Tiraboschi, L. A. Hansen, E. Masliah, M. Alford, L. J. Thal, and J. Corey-Bloom. Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology*, 62(11):1977–83, 2004.

- [75] J. C. Morris, C. M. Roe, C. Xiong, A. M. Fagan, A. M. Goate, D. M. Holtzman, and M. A. Mintun. APOE predicts amyloid- β but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging. *Ann Neurol*, 67(1):122–31, 2010.
- [76] E.H. Corder, A.M. Saunders, N.J. Risch, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, Jr, J.B. Rimmler, P.A. Locke, P.M. Conneally, K.E. Schmechel, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet*, 7(2):180–4, 1994.
- [77] E. Rogaeva, Y. Meng, J.H. Lee, Y. Gu, T. Kawarai, F. Zou, T. Katayama, C.T. Baldwin, R. Cheng, H. Hasegawa, et al. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*, 39(2):168–77, 2007.
- [78] D. Harold, R. Abraham, P. Hollingworth, R. Sims, A. Gerrish, M.L. Hamshere, J.S. Pahwa, V. Moskvin, K. Dowzell, A. Williams, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer’s disease. *Nat Genet*, 41(10):1088–93, 2009.
- [79] J.-C. Lambert, S. Heath, G. Even, D. Campion, K. Sleegers, M. Hiltunen, O. Combarros, D. Zelenika, M.J. Bullido, B. Tavernier, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer’s disease. *Nat Genet*, 41(10):1094–9, 2009.
- [80] S. Seshadri, A.L. Fitzpatrick, M.A. Ikram, A.L. DeStefano, V. Gudnason, M. Boada, J.C. Bis, A.V. Smith, M.M. Carrasquillo, J.C. Lambert, et al. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*, 303(18):1832–40, 2010.
- [81] A. C. Naj, G. Jun, G. W. Beecham, L.-S. Wang, B. N. Vardarajan, J. Buross, P. J. Gallins, J. D. Buxbaum, G. P. Jarvik, P. K. Crane, et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer’s disease. *Nat Genet*, 43(5):436–41, 2011.
- [82] M. Carrasquillo, O. Belbin, T. A. Hunter, L. Ma, G. D. Bisceglia, F. Zou, J. E. Crook, V. S. Pankratz, S. B. Sando, J. O. Aasly, et al. Replication of EPHA1 and CD33 associations with late-onset Alzheimer’s disease: a multi-centre case-control study. *Mol Neurodegener*, 6(1):54, 2011.
- [83] R. Guerreiro, A. Wojtas, J. Bras, M. Carrasquillo, E. Rogaeva, E. Majounie, C. Cruchaga, C. Sassi, J. S. K. Kauwe, S. Younkin, et al. TREM2 variants in Alzheimer’s disease. *N Engl J Med*, 368(2):117–27, Jan 2013.
- [84] T. Jonsson, H. Stefansson, S. Steinberg, I. Jonsdottir, P. V. Jonsson, J. Snaedal, S. Bjornsson, J. Huttenlocher, A. I. Levey, J. J. Lah, et al. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer’s disease. *N Engl J Med*, 368(2):107–16, 2013.
- [85] R.J. Guerreiro and J. Hardy. Alzheimer’s disease genetics: lessons to improve disease modelling. *Biochem Soc Trans*, 39(4):910–6, 2011.
- [86] A. W. Fjorback, M. Seaman, C. Gustafsen, A. Mehmedbasic, S. Gokool, C. Wu, D. Miltz, V. Schmidt, P. Madsen, J. R. Nyengaard, et al. Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing. *J Neurosci*, 32(4):1467–80, 2012.
- [87] J.A. Hardy and G.A. Higgins. Alzheimer’s disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054):184–5, 1992.
- [88] E. Karran, M. Mercken, and B. De Strooper. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer’s disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 10(9):698–712, 2011.
- [89] I. Kuperstein, K. Broersen, I. Benilova, J. Rozenski, W. Jonckheere, M. Debulpaep, A. Vandersteen, I. Segers-Nolten, K. Van Der Werf, V. Subramaniam, et al. Neurotoxicity of Alzheimer’s disease A β peptides is induced by small changes in the A β ₄₂ to A β ₄₀ ratio. *EMBO J*, 29(19):3408–20, 2010.
- [90] J. T. Jarrett, E. P. Berger, and P.T. Lansbury, Jr. 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):4693–7, 1993.
- [91] C. A. McLean, R. A. Cherny, F. W. Fraser, S. J. Fuller, M. J. Smith, K. Beyreuther, A. I. Bush, and C. L. Masters. Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer’s disease. *Ann Neurol*, 46(6):860–6, 1999.

- [92] J. M. Mc Donald, G. M. Savva, C. Brayne, A. T. Welzel, G. Forster, G. M. Shankar, D. J. Selkoe, P. G. Ince, D. M. Walsh, and Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study. The presence of sodium dodecyl sulphate-stable A β dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain*, 133(Pt 5):1328–41, 2010.
- [93] I. Benilova, E. Karran, and B. De Strooper. The toxic A β oligomer and Alzheimer’s disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*, 15(3):349–57, 2012.
- [94] D.M. Walsh, I. Klyubin, J.V. Fadeeva, W.K. Cullen, R. Anwyl, M.S. Wolfe, M.J. Rowan, and D.J. Selkoe. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature*, 416(6880):535–9, 2002.
- [95] G.M. Shankar, S. Li, T.H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N.E. Shepardson, I. Smith, F.M. Brett, M.A. Farrell, M.J. Rowan, C.A. Lemere, et al. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer’s brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*, 14(8):837–42, 2008.
- [96] F. G. De Felice, D. Wu, M. P. Lambert, S. J. Fernandez, P. T. Velasco, P. N. Lacor, E. H. Bigio, J. Jerecic, P. J. Acton, P. J. Shughrue, et al. Alzheimer’s disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by a β oligomers. *Neurobiol Aging*, 29(9):1334–47, 2008.
- [97] M. Jin, N. Shepardson, T. Yang, G. Chen, D. Walsh, and D.J. Selkoe. Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(14):5819–24, 2011.
- [98] E.D. Roberson, K. Scarce-Levie, J.J. Palop, F. Yan, I.H. Cheng, T. Wu, H. Gerstein, G.-Q. Yu, and L. Mucke. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β -induced deficits in an Alzheimer’s disease mouse model. *Science*, 316(5825):750–4, 2007.
- [99] L.M. Ittner, Y.D. Ke, F. Delerue, M. Bi, A. Gladbach, J. van Eersel, H. Wölfing, B.C. Chieng, M.J. Christie, I.A. Napier, et al. Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer’s disease mouse models. *Cell*, 142(3):387–97, 2010.
- [100] O. A. Shipton, J. R. Leitz, J. Dworzak, C. Acton, E. M. Tunbridge, F. Denk, H. N. Dawson, M. P. Vitek, R. Wade-Martins, O. Paulsen, et al. Tau protein is required for amyloid β -induced impairment of hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*, 31(5):1688–92, 2011.
- [101] S. Campioni, B. Mannini, M. Zampagni, A. Pensalfini, C. Parrini, E. Evangelisti, A. Relini, M. Stefani, C.M. Dobson, C. Cecchi, and F. Chiti. A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. *Nat Chem Biol*, 6(2):140–7, 2010.
- [102] F. G. De Felice, P. T. Velasco, M. P. Lambert, K. Viola, S. J. Fernandez, S. T. Ferreira, and W. L. Klein. A β oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem*, 282(15):11590–601, 2007.
- [103] H. Decker, K. Y. Lo, S. M. Unger, S. T. Ferreira, and M. A. Silverman. Amyloid- β peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3 β in primary cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*, 30(27):9166–71, 2010.
- [104] J. Hardy. The amyloid hypothesis for Alzheimer’s disease: a critical reappraisal. *J Neurochem*, 110(4):1129–34, 2009.
- [105] T. Jonsson, J. K. Atwal, S. Steinberg, J. Snaedal, P. V. Jonsson, S. Bjornsson, H. Stefansson, P. Sulem, D. Gudbjartsson, J. Maloney, et al. A mutation in APP protects against Alzheimer’s disease and age-related cognitive decline. *Nature*, 488(7409):96–9, 2012.
- [106] H. Zheng and E.H. Koo. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener*, 6(1):27, 2011.
- [107] W. Wasco, K. Bupp, M. Magendantz, J.F. Gusella, R.E. Tanzi, and F. Solomon. Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid β protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(22):10758–62, 1992.
- [108] W. Wasco, S. Gurubhagavatula, M.D. Paradis, D.M. Romano, S.S. Sisodia, B.T. Hyman, R.L. Neve, and R.E. Tanzi. Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer’s associated amyloid β protein precursor. *Nat Genet*, 5(1):95–100, 1993.

-
- [109] K. Lorent, L. Overbergh, D. Moechars, B. De Strooper, F. Van Leuven, and H. Van den Berghe. Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the α -2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, α -2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein. *Neuroscience*, 65(4):1009–25, 1995.
- [110] N. Kitaguchi, Y. Takahashi, Y. Tokushima, S. Shiojiri, and H. Ito. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature*, 331(6156):530–2, 1988.
- [111] D.J. Selkoe, M.B. Podlisny, C.L. Joachim, E.A. Vickers, G. Lee, L.C. Fritz, and T. Oltersdorf. β -Amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(19):7341–5, 1988.
- [112] R.E. Tanzi, A.I. McClatchey, E.D. Lamperti, L. Villa-Komaroff, J.F. Gusella, and R.L. Neve. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature*, 331(6156):528–30, 1988.
- [113] S.S. Sisodia, E.H. Koo, P.N. Hoffman, G. Perry, and D.L. Price. Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci*, 13(7):3136–42, 1993.
- [114] A. Weidemann, G. König, D. Bunke, P. Fischer, J.M. Salbaum, C.L. Masters, and K. Beyreuther. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*, 57(1):115–26, 1989.
- [115] C. Reinhard, S.S. Hébert, and B. De Strooper. The amyloid- β precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J*, 24(23):3996–4006, 2005.
- [116] P. Soba, S. Eggert, K. Wagner, H. Zentgraf, K. Siehl, S. Kreger, A. Löwer, A. Langer, G. Merdes, R. Paro, et al. Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J*, 24(20):3624–34, 2005.
- [117] Z. Wang, B. Wang, L. Yang, Q. Guo, N. Aithmitti, Z. Songyang, and H. Zheng. Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis. *J Neurosci*, 29(35):10788–801, 2009.
- [118] T.L. Young-Pearse, J. Bai, R. Chang, J.B. Zheng, J.J. LoTurco, and D.J. Selkoe. A critical function for β -amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci*, 27(52):14459–69, 2007.
- [119] U. Müller, N. Cristina, Z. W. Li, D. P. Wolfer, H. P. Lipp, T. Rüllicke, S. Brandner, A. Aguzzi, and C. Weissmann. Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified β -amyloid precursor protein gene. *Cell*, 79(5):755–65, 1994.
- [120] H. Zheng, M. Jiang, M.E. Trumbauer, D.J. Sirinathsinghji, R. Hopkins, D.W. Smith, R.P. Heavens, G.R. Dawson, S. Boyce, M.W. Conner, et al. β -Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*, 81(4):525–31, 1995.
- [121] S. Heber, J. Herms, V. Gajic, J. Hainfellner, A. Aguzzi, T. Rüllicke, H. von Kretschmar, C. von Koch, S. Sisodia, P. Tremml, et al. Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci*, 20(21):7951–63, 2000.
- [122] C.S. von Koch, H. Zheng, H. Chen, M. Trumbauer, G. Thinakaran, L.H. van der Ploeg, D.L. Price, and S.S. Sisodia. Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging*, 18(6):661–9, 1997.
- [123] P. Wang, G. Yang, D.R. Mosier, P. Chang, T. Zaidi, Y.-D. Gong, N.-M. Zhao, B. Dominguez, K.-F. Lee, W.-B. Gan, and H. Zheng. Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci*, 25(5):1219–25, 2005.
- [124] J. Herms, B. Anliker, S. Heber, S. Ring, M. Fuhrmann, H. Kretschmar, S. Sisodia, and U. Müller. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J*, 23(20):4106–15, 2004.

- [125] F.S. Esch, P.S. Keim, E.C. Beattie, R.W. Blacher, A.R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure, and P.J. Ward. Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*, 248(4959):1122–4, 1990.
- [126] S. S. Sisodia, E. H. Koo, K. Beyreuther, A. Unterbeck, and D. L. Price. Evidence that β – amyloid protein in Alzheimer’s disease is not derived by normal processing. *Science*, 248(4954):492–5, 1990.
- [127] C. McLendon, T. Xin, C. Ziani-Cherif, M.P. Murphy, K.A. Findlay, P.A. Lewis, I. Pinnix, K. Sambamurti, R. Wang, A. Fauq, and T.E. Golde. Cell-free assays for γ -secretase activity. *FASEB J*, 14(15):2383–6, 2000.
- [128] C. Haass, M.G. Schlossmacher, A.Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B.L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E.H. Koo, D. Schenk, D.B. Teplow, and D. Selkoe. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359(6393):322–5, 1992.
- [129] C. Haass, A.Y. Hung, M.G. Schlossmacher, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe. β -Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem*, 268(5):3021–4, 1993.
- [130] P. Seubert, T. Oltersdorf, M. G. Lee, R. Barbour, C. Blomquist, D. L. Davis, K. Bryant, L. C. Fritz, D. Galasko, L. J. Thal, et al. Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the β -amyloid peptide. *Nature*, 361(6409):260–63, 1993.
- [131] H. Koike, S. Tomioka, H. Sorimachi, T.C. Saido, K. Maruyama, A. Okuyama, A. Fujisawa-Sehara, S. Ohno, K. Suzuki, and S. Ishiura. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an α -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J*, 343:371–5, 1999.
- [132] S. Lammich, E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass, and F. Fahrenholz. Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer’s amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7):3922–7, 1999.
- [133] J.D. Buxbaum, K.N. Liu, Y. Luo, J.L. Slack, K.L. Stocking, J.J. Peschon, R.S. Johnson, B.J. Castner, D.P. Cerretti, and R.A. Black. 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):27765–7, 1998.
- [134] E. Jorissen, J. Prox, C. Bernreuther, S. Weber, R. Schwanbeck, L. Serneels, A. Snellinx, K. Craessaerts, A. Thathiah, I. Tesseur, et al. The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci*, 30(14):4833–44, 2010.
- [135] P.-H. Kuhn, H. Wang, B. Dislich, A. Colombo, U. Zeitschel, J.W. Ellwart, E. Kremmer, S. Rossner, and S.F. Lichtenthaler. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J*, 29(17):3020–32, 2010.
- [136] S.M. Le Gall, P. Bobé, K. Reiss, K. Horiuchi, X.-D. Niu, D. Lundell, D.R. Gibb, D. Conrad, P. Saftig, and C.P. Blobel. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor α , L-selectin, and tumor necrosis factor α . *Mol Biol Cell*, 20(6):1785–94, 2009.
- [137] K. Reiss and P. Saftig. The “A Disintegrin And Metalloprotease“ (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol*, 20(2):126–37, 2009.
- [138] R. Postina, A. Schroeder, I. Dewachter, J. Bohl, U. Schmitt, E. Kojro, C. Prinzen, K. Endres, C. Hiemke, M. Blessing, et al. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*, 113(10):1456–64, 2004.
- [139] F. Fahrenholz. α -secretase as a therapeutic target. *Curr Alzheimer Res*, 4(4):412–7, 2007.
- [140] S. F. Lichtenthaler. α -secretase in alzheimer’s disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem*, 116(1):10–21, 2011.
- [141] M. P. Mattson, B. Cheng, A. R. Culwell, F. S. Esch, I. Lieberburg, and R. E. Rydel. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the β -amyloid precursor protein. *Neuron*, 10(2):243–54, 1993.
- [142] K. Furukawa, S.W. Barger, E.M. Blalock, and M. P. Mattson. Activation of K^+ channels and suppression of neuronal activity by secreted β -amyloid-precursor protein. *Nature*, 379(6560):74–8, 1996.

- [143] K. Furukawa, B. L. Sopher, R. E. Rydel, J. G. Begley, D. G. Pham, G. M. Martin, M. Fox, and M. P. Mattson. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of α -secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem*, 67(5):1882–96, 1996.
- [144] P. Han, F. Dou, F. Li, X. Zhang, Y.-W. Zhang, H. Zheng, S. A. Lipton, H. Xu, and F.-F. Liao. Suppression of cyclin-dependent kinase 5 activation by amyloid precursor protein: a novel excitoprotective mechanism involving modulation of tau phosphorylation. *J Neurosci*, 25(50):11542–52, 2005.
- [145] D. H. Small, V. Nurcombe, G. Reed, H. Clarris, R. Moir, K. Beyreuther, and C. L. Masters. A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer’s disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci*, 14(4):2117–27, 1994.
- [146] I. Ohsawa, C. Takamura, and S. Kohsaka. The amino-terminal region of amyloid precursor protein is responsible for neurite outgrowth in rat neocortical explant culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 236(1):59–65, 1997.
- [147] N. Gakhar-Koppole, P. Hundeshagen, C. Mandl, S.W. Weyer, B. Allinquant, U. Müller, and F. Ciccolini. Activity requires soluble amyloid precursor protein α to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway. *Eur J Neurosci*, 28(5):871–82, 2008.
- [148] T. Morimoto, I. Ohsawa, C. Takamura, M. Ishiguro, and S. Kohsaka. Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse formation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res*, 51(2):185–95, 1998.
- [149] K. F S. Bell, L. Zheng, F. Fahrenholz, and A. C. Cuello. ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol Aging*, 29(4):554–65, 2008.
- [150] S. Chasseigneaux and B. Allinquant. Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *J Neurochem*, 120 Suppl 1:99–108, 2012.
- [151] S. Ring, S.W. Weyer, S.B. Kilian, E. Waldron, C.U. Pietrzik, M.A. Filippov, J. Herms, C. Buchholz, C.B. Eckman, M. Korte, et al. The secreted β -amyloid precursor protein ectodomain APPs α is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci*, 27(29):7817–26, 2007.
- [152] S.W. Weyer, M. Klevanski, A. Delekate, V. Voikar, D. Aydin, M. Hick, M. Filippov, N. Drost, K.L. Schaller, M. Saar, et al. APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP. *EMBO J*, 30(11):2266–80, 2011.
- [153] H. Li, B. Wang, Z. Wang, Q. Guo, K. Tabuchi, R.E. Hammer, T.C. Südhof, and H. Zheng. Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates *transthyretin* and *Klotho* gene expression without rescuing the essential function of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(40):17362–7, 2010.
- [154] I. Hussain, D. Powell, D.R. Howlett, D.G. Tew, T.D. Meek, C. Chapman, I.S. Gloger, K.E. Murphy, C.D. Southan, D.M. Ryan, et al. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase. *Mol Cell Neurosci*, 14(6):419–27, 1999.
- [155] S. Sinha, J.P. Anderson, R. Barbour, G.S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H.F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature*, 402(6761):537–40, 1999.
- [156] R. Vassar, B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, et al. β -Secretase cleavage of Alzheimer’s amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286(5440):735–41, 1999.
- [157] R. Yan, M.J. Bienkowski, M.E. Shuck, H. Miao, M.C. Tory, A.M. Pauley, J.R. Brashier, N.C. Stratman, W.R. Mathews, A.E. Buhl, et al. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer’s disease β -secretase activity. *Nature*, 402(6761):533–7, 1999.
- [158] X. Lin, G. Koelsch, S. Wu, D. Downs, A. Dashti, and J. Tang. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4):1456–60, 2000.

- [159] C. Haass, E.H. Koo, A. Mellon, A.Y. Hung, and D.J. Selkoe. Targeting of cell-surface β -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*, 357(6378):500–3, 1992.
- [160] E.H. Koo and S.L. Squazzo. Evidence that production and release of amyloid β -protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*, 269(26):17386–9, 1994.
- [161] E.H. Koo, S.L. Squazzo, D.J. Selkoe, and C.H. Koo. Trafficking of cell-surface amyloid β -protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *J Cell Sci*, 109(5):991–8, 1996.
- [162] M. Marcinkiewicz and N. G. Seidah. Coordinated expression of β -amyloid precursor protein and the putative β -secretase BACE and α -secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem*, 75(5):2133–43, 2000.
- [163] K. Liu, R.W. Doms, and V. M.-Y. Lee. Glu11 site cleavage and N-terminally truncated A β production upon BACE overexpression. *Biochemistry*, 41(9):3128–36, 2002.
- [164] M. Mullan, F. Crawford, K. Axelman, H. Houlden, L. Lilius, B. Winblad, and L. Lannfelt. A pathogenic mutation for probable Alzheimer’s disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nat Genet*, 1(5):345–7, 1992.
- [165] M. Farzan, C.E. Schnitzler, N. Vasilieva, D. Leung, and H. Choe. BACE2, a β -secretase homolog, cleaves at the β site and within the amyloid- β region of the amyloid- β precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(17):9712–7, 2000.
- [166] B.D. Bennett, S. Babu-Khan, R. Loeloff, J.C. Louis, E. Curran, M. Citron, and R. Vassar. Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem*, 275(27):20647–51, 2000.
- [167] M. Willem, S. Lammich, and C. Haass. Function, regulation and therapeutic properties of β -secretase (BACE1). *Semin Cell Dev Biol*, 20(2):175–82, 2009.
- [168] P.-H. Kuhn, K. Koroniak, S. Hognl, A. Colombo, U. Zeitschel, M. Willem, C. Volbracht, U. Schepers, A. Imhof, A. Hoffmeister, et al. Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *EMBO J*, 31(14):3157–68, 2012.
- [169] Q. Li and T. C. Südhof. Cleavage of amyloid- β precursor protein and amyloid- β precursor-like protein by BACE 1. *J Biol Chem*, 279(11):10542–50, 2004.
- [170] S. Eggert, K. Paliga, P. Soba, G. Evin, C. L. Masters, A. Weidemann, and K. Beyreuther. The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves α -, β -, γ -, and ϵ -like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J Biol Chem*, 279(18):18146–56, 2004.
- [171] M. Willem, A.N. Garratt, B. Novak, M. Citron, S. Kaufmann, A. Rittger, B. De Strooper, P. Saftig, C. Birchmeier, and C. Haass. Control of peripheral nerve myelination by the β -secretase BACE1. *Science*, 314(5799):664–6, 2006.
- [172] X. Hu, C.W. Hicks, W. He, P. Wong, W.B. Macklin, B.D. Trapp, and R. Yan. BACE1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci*, 9(12):1520–5, 2006.
- [173] X. Hu, W. He, C. Diaconu, X. Tang, G. J. Kidd, W. B. Macklin, B. D. Trapp, and R. Yan. Genetic deletion of BACE1 in mice affects remyelination of sciatic nerves. *FASEB J*, 22(8):2970–80, 2008.
- [174] P.-H. Kuhn, E. Marjaux, A. Imhof, B. De Strooper, C. Haass, and S.F. Lichtenthaler. Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by α -, β -, and γ -secretase. *J Biol Chem*, 282(16):11982–95, 2007.
- [175] H. Cai, Y. Wang, D. McCarthy, H. Wen, D. R. Borchelt, D. L. Price, and P. C. Wong. BACE1 is the major β -secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nat Neurosci*, 4(3):233–4, 2001.
- [176] Y. Luo, B. Bolon, S. Kahn, B. D. Bennett, S. Babu-Khan, P. Denis, W. Fan, H. Kha, J. Zhang, Y. Gong, et al. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer’s β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation. *Nat Neurosci*, 4(3):231–2, 2001.
- [177] S. L. Roberds, J. Anderson, G. Basi, M. J. Bienkowski, D. G. Branstetter, K. S. Chen, S. B. Freedman, N. L. Frigon, D. Games, K. Hu, et al. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary β -secretase activity in brain: implications for Alzheimer’s disease therapeutics. *Hum Mol Genet*, 10(12):1317–24, 2001.

- [178] S.M. Harrison, A.J. Harper, J. Hawkins, G. Duddy, E. Grau, P.L. Pugh, P.H. Winter, C.S. Shilliam, Z.A. Hughes, L.A. Dawson, et al. BACE1 (β -secretase) transgenic and knockout mice: identification of neurochemical deficits and behavioral changes. *Mol Cell Neurosci*, 24(3):646–55, 2003.
- [179] D. Kobayashi, M. Zeller, T. Cole, M. Buttini, L. McConlogue, S. Sinha, S. Freedman, R.G.M. Morris, and K.S. Chen. BACE1 gene deletion: impact on behavioral function in a model of Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging*, 29(6):861–73, 2008.
- [180] J. Cai, X. Qi, N. Kociok, S. Skosyrski, A. Emilio, Q. Ruan, S. Han, L. Liu, Z. Chen, C. Bowes Rickman, et al. β -Secretase (BACE1) inhibition causes retinal pathology by vascular dysregulation and accumulation of age pigment. *EMBO Mol Med*, 4(9):980–91, 2012.
- [181] A. N. Garratt, S. Britsch, and C. Birchmeier. Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays*, 22(11):987–96, Nov 2000.
- [182] F.M. Laird, H. Cai, A.V. Savonenko, M.H. Farah, K. He, T. Melnikova, H. Wen, H.-C. Chiang, G. Xu, V.E. Koliatsos, et al. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid- β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci*, 25(50):11693–709, 2005.
- [183] M. Ohno, E.A. Sametsky, L.H. Younkin, H. Oakley, S.G. Younkin, M. Citron, R. Vassar, and J.F. Disterhoft. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Neuron*, 41(1):27–33, 2004.
- [184] A.K. Ghosh, M. Brindisi, and J. Tang. Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer’s disease. *J Neurochem*, 120(S1):71–83, 2012.
- [185] L. Zhou, S. Barão, M. Laga, K. Bockstael, M. Borgers, H. Gijzen, W. Annaert, D. Moechars, M. Mercken, K. Gevaer, and B. De Strooper. The neural cell adhesion molecules L1 and CHL1 are cleaved by BACE1 protease in vivo. *J Biol Chem*, 287(31):25927–40, 2012.
- [186] P. C. May, R. A. Dean, S. L. Lowe, F. Martenyi, S. M. Sheehan, L. N. Boggs, S. A. Monk, B. M. Mathes, D. J. Mergott, B. M. Watson, et al. Robust central reduction of amyloid- β in humans with an orally available, non-peptidic β -secretase inhibitor. *J Neurosci*, 31(46):16507–16, 2011.
- [187] L. Hong, G. Koelsch, X. Lin, S. Wu, S. Terzyan, A.K. Ghosh, X.C. Zhang, and J. Tang. Structure of the protease domain of memapsin 2 (β -secretase) complexed with inhibitor. *Science*, 290(5489):150–3, 2000.
- [188] S. Chasseigneaux, L. Dinc, C. Rose, C. Chabret, F. Couplier, P. Topilko, G. Mauger, and B. Alinquant. Secreted amyloid precursor protein β and secreted amyloid precursor protein β induce axon outgrowth *in vitro* through Egr1 signaling pathway. *PLoS One*, 6(1):e16301, 2011.
- [189] M. Takami, Y. Nagashima, Y. Sano, S. Ishihara, M. Morishima-Kawashima, S. Funamoto, and Y. Ihara. γ -Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of β -carboxyl terminal fragment. *J Neurosci*, 29(41):13042–52, 2009.
- [190] M. Sastre, H. Steiner, K. Fuchs, A. Capell, G. Multhaup, M.M. Condron, D.B. Teplow, and C. Haass. Presenilin-dependent γ -secretase processing of β -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep*, 2(9):835–41, 2001.
- [191] Y. Gu, H. Misonou, T. Sato, N. Dohmae, K. Takio, and Y. Ihara. Distinct intramembrane cleavage of the β -amyloid precursor protein family resembling γ -secretase-like cleavage of Notch. *J Biol Chem*, 276(38):35235–8, 2001.
- [192] C. Yu, S.H. Kim, T. Ikeuchi, H. Xu, L. Gasparini, R. Wang, and S.S. Sisodia. Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment γ . EVIDENCE FOR DISTINCT MECHANISMS INVOLVED IN γ -SECRETASE PROCESSING OF THE APP AND NOTCH1 TRANSMEMBRANE DOMAINS. *J Biol Chem*, 276(47):43756–60, 2001.
- [193] A. Weidemann, S. Eggert, F.B.M. Reinhard, M. Vogel, K. Paliga, G. Baier, C.L. Masters, K. Beyreuther, and G. Evin. A novel ϵ -cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry*, 41(8):2825–35, 2002.

- [194] F. Dulin, F. Léveillé, J. B. Ortega, J.-P. Mornon, A. Buisson, I. Callebaut, and N. Colloc'h. P3 peptide, a truncated form of $\text{a}\beta$ devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett*, 582(13):1865–70, 2008.
- [195] S. Funamoto, M. Morishima-Kawashima, Y. Tanimura, N. Hirotsu, T.C. Saido, and Y. Ihara. Truncated carboxyl-terminal fragments of β -amyloid precursor protein are processed to amyloid β -proteins 40 and 42. *Biochemistry*, 43(42):13532–40, 2004.
- [196] G. Zhao, M.-Z. Cui, G. Mao, Y. Dong, J. Tan, L. Sun, and X. Xu. γ -Cleavage is dependent on ζ -cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain. *J Biol Chem*, 280(45):37689–97, 2005.
- [197] Y. Qi-Takahara, M. Morishima-Kawashima, Y. Tanimura, G. Dolios, N. Hirotsu, Y. Horikoshi, F. Kametani, M. Maeda, T.C. Saido, R. Wang, and Y. Ihara. Longer forms of amyloid β protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by γ -secretase. *J Neurosci*, 25(2):436–45, 2005.
- [198] T. Sato, N. Dohmae, Y. Qi, N. Kakuda, H. Misonou, R. Mitsumori, H. Maruyama, E.H. Koo, C. Haass, K. Takio, et al. Potential link between amyloid β -protein 42 and C-terminal fragment γ 49-99 of β -amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 278(27):24294–301, 2003.
- [199] R.M. Page, K. Baumann, M. Tomioka, B.I. Pérez-Revuelta, A. Fukumori, H. Jacobsen, A. Flohr, T. Luebbbers, L. Ozmen, H. Steiner, et al. Generation of $\text{A}\beta_{38}$ and $\text{A}\beta_{42}$ is independently and differentially affected by familial Alzheimer disease-associated presenilin mutations and γ -secretase modulation. *J Biol Chem*, 283(2):677–83, 2008.
- [200] E. Czirr, S. Leuchtenberger, C. Dorner-Ciossek, A. Schneider, M. Jucker, E.H. Koo, C.U. Pietrzik, K. Baumann, and S. Weggen. Insensitivity to $\text{A}\beta_{42}$ -lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs and γ -secretase inhibitors is common among aggressive presenilin-1 mutations. *J Biol Chem*, 282(34):24504–13, 2007.
- [201] E. Czirr, B.A. Cottrell, S. Leuchtenberger, T. Kukar, T.B. Ladd, H. Esselmann, S. Paul, R. Schubenel, J.W. Torpey, C.U. Pietrzik, et al. Independent generation of $\text{A}\beta_{42}$ and $\text{A}\beta_{38}$ peptide species by γ -secretase. *J Biol Chem*, 283(25):17049–54, 2008.
- [202] R.M. Page, A. Gutsmedl, A. Fukumori, E. Winkler, C. Haass, and H. Steiner. β -Amyloid precursor protein mutants respond to γ -secretase modulators. *J Biol Chem*, 285(23):17798–810, 2010.
- [203] O. Quintero-Monzon, M.M. Martin, M.A. Fernandez, C.A. Cappello, A.J. Krzysiak, P. Osenkowski, and M.S. Wolfe. Dissociation between the processivity and total activity of γ -secretase: implications for the mechanism of Alzheimer's disease-causing presenilin mutations. *Biochemistry*, 50(42):9023–35, 2011.
- [204] A. Asami-Odaka, Y. Ishibashi, T. Kikuchi, C. Kitada, and N. Suzuki. Long amyloid β -protein secreted from wild-type human neuroblastoma IMR-32 cells. *Biochemistry*, 34(32):10272–8, 1995.
- [205] Raphaëlle Pardossi-Piquard and Frédéric Checler. The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem*, 120 Suppl 1:109–24, 2012.
- [206] X. Cao and T.C. Südhof. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, 293(5527):115–20, 2001.
- [207] S.S. Hébert, L. Serneels, A. Tolia, K. Craessaerts, C. Derks, M.A. Filippov, U. Müller, and B. De Strooper. Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO Reports*, 7(7):739–45, 2006.
- [208] E. Waldron, S. Isbert, A. Kern, S. Jaeger, A.M. Martin, S.S. Hébert, C. Behl, S. Weggen, B. De Strooper, and C.U. Pietrzik. Increased AICD generation does not result in increased nuclear translocation or activation of target gene transcription. *Exp Cell Res*, 314(13):2419–33, 2008.
- [209] W. Farris, S. Mansourian, Y. Chang, L. Lindsley, E.A. Eckman, M.P. Frosch, C.B. Eckman, R.E. Tanzi, D.J. Selkoe, and S. Guenette. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7):4162–7, 2003.

- [210] D. Edbauer, M. Willem, S. Lammich, H. Steiner, and C. Haass. Insulin-degrading enzyme rapidly removes the β -amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J Biol Chem*, 277(16):13389–93, 2002.
- [211] M. L. Giuffrida, F. Caraci, B. Pignataro, S. Cataldo, P. De Bona, V. Bruno, G. Molinaro, G. Pappalardo, A. Messina, A. Palmigiano, et al. β -amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci*, 29(34):10582–87, 2009.
- [212] F. Kamenetz, T. Tomita, H. Hsieh, G. Seabrook, D. Borchelt, T. Iwatsubo, S. Sisodia, and R. Malinow. APP processing and synaptic function. *Neuron*, 37(6):925–37, 2003.
- [213] Y. Chen and C. Dong. A β 40 promotes neuronal cell fate in neural progenitor cells. *Cell Death Differ*, 16(3):386–94, 2009.
- [214] E. Abramov, I. Dolev, H. Fogel, G. D. Ciccotosto, E. Ruff, and I. Slutsky. Amyloid- β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci*, 12(12):1567–76, 2009.
- [215] P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, S. Sinha, M. Schlossmacher, J. Whaley, C. Swindlehurst, and others. Isolation and quantification of soluble Alzheimer’s β -peptide from biological fluids. *Nature*, 359(6393):325–7, 1992.
- [216] M. Shoji, T.E. Golde, J. Ghiso, T.T. Cheung, S. Estus, L.M. Shaffer, X.D. Cai, D.M. McKay, R. Tintner, B. Frangione, et al. Production of the Alzheimer amyloid β protein by normal proteolytic processing. *Science*, 258(5079):126–9, 1992.
- [217] J. Busciglio, D.H. Gabuzda, P. Matsudaira, and B.A. Yankner. Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(5):2092–6, 1993.
- [218] D.R. Dries and G. Yu. Assembly, maturation, and trafficking of the γ -secretase complex in Alzheimer’s disease. *Curr Alzheimer Res*, 5(2):132–46, 2008.
- [219] H. Steiner, R. Fluhner, and C. Haass. Intramembrane proteolysis by γ -secretase. *J Biol Chem*, 283(44):29627–33, 2008.
- [220] T. Sato, T.S. Diehl, S. Narayanan, S. Funamoto, Y. Ihara, B. De Strooper, H. Steiner, C. Haass, and M.S. Wolfe. Active γ -secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem*, 282(47):33985–93, 2007.
- [221] D. Edbauer, E. Winkler, J.T. Regula, B. Pesold, H. Steiner, and C. Haass. Reconstitution of γ -secretase activity. *Nat Cell Biol*, 5(5):486–8, 2003.
- [222] N. Takasugi, T. Tomita, I. Hayashi, M. Tsuruoka, M. Niimura, Y. Takahashi, G. Thinakaran, and T. Iwatsubo. The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex. *Nature*, 422(6930):438–41, 2003.
- [223] S.-H. Kim, T. Ikeuchi, C. Yu, and S.S. Sisodia. Regulated hyperaccumulation of presenilin-1 and the “ γ -secretase” complex. EVIDENCE FOR DIFFERENTIAL INTRAMEMBRANOUS PROCESSING OF TRANSMEMBRANE SUBSTRATES. *J Biol Chem*, 278(36):33992–4002, 2003.
- [224] W.T. Kimberly, M.J. LaVoie, B.L. Ostaszewski, W. Ye, M.S. Wolfe, and D.J. Selkoe. γ -Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(11):6382–7, 2003.
- [225] D. Edbauer, E. Winkler, C. Haass, and H. Steiner. Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid β -peptide production via complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(13):8666–71, 2002.
- [226] M.R. Farmery, L.O. Tjernberg, S.E. Pursglove, A. Bergman, B. Winblad, and J. Näslund. Partial purification and characterization of γ -secretase from post-mortem human brain. *J Biol Chem*, 278(27):24277–84, 2003.
- [227] O. Nyabi, M. Bentahir, K. Horré, A. Herreman, N. Gottardi-Littell, C. Van Broeckhoven, P. Merchiers, K. Spittaels, W. Annaert, and B. De Strooper. Presenilins mutated at Asp-257 or Asp-385 restore Pen-2 expression and Nicastrin glycosylation but remain catalytically inactive in the absence of wild type Presenilin. *J Biol Chem*, 278(44):43430–6, 2003.

- [228] E. Winkler, S. Hobson, A. Fukumori, B. Dimpelfeld, T. Luebbbers, K. Baumann, C. Haass, C. Hopf, and H. Steiner. Purification, pharmacological modulation, and biochemical characterization of interactors of endogenous human γ -secretase. *Biochemistry*, 48(6):1183–97, 2009.
- [229] E.H. Schroeter, M.X.G. Ilagan, A.L. Brunkan, S. Hecimovic, Y. Li, M. Xu, H.D. Lewis, M.T. Saxena, B. De Strooper, A. Coonrod, et al. A presenilin dimer at the core of the γ -secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis. *Proc Natl Acad Sci*, 100(22):13075–80, 2003.
- [230] P. Osenkowski, H. Li, W. Ye, D. Li, L. Aeschbach, P.C. Fraering, M.S. Wolfe, D.J. Selkoe, and H. Li. Cryoelectron microscopy structure of purified γ -secretase at 12 Å resolution. *J Mol Biol*, 385(2):642–52, 2009.
- [231] V.K. Lazarov, P.C. Fraering, W. Ye, M.S. Wolfe, D.J. Selkoe, and H. Li. Electron microscopic structure of purified, active γ -secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(18):6889–94, 2006.
- [232] F. Renzi, X. Zhang, W.J. Rice, C. Torres-Arancivia, Y. Gomez-Llorente, R. Diaz, K. Ahn, C. Yu, Y.-M. Li, S.S. Sisodia, and I. Ubarretxena-Belandia. Structure of γ -secretase and its trimeric pre-activation intermediate by single-particle electron microscopy. *J Biol Chem*, 286(24):21440–9, 2011.
- [233] C. Sato, Y. Morohashi, T. Tomita, and T. Iwatsubo. Structure of the catalytic pore of γ -secretase probed by the accessibility of substituted cysteines. *J Neurosci*, 26(46):12081–8, 2006.
- [234] A. Tolia, L. Chávez-Gutiérrez, and B. De Strooper. Contribution of presenilin transmembrane domains 6 and 7 to a water-containing cavity in the γ -secretase complex. *J Biol Chem*, 281(37):27633–42, 2006.
- [235] A. Tolia, K. Horré, and B. De Strooper. Transmembrane domain 9 of presenilin determines the dynamic conformation of the catalytic site of γ -secretase. *J Biol Chem*, 283(28):19793–803, 2008.
- [236] G. Yu, F. Chen, G. Levesque, M. Nishimura, D.M. Zhang, L. Levesque, E. Rogaeva, D. Xu, Y. Liang, M. Duthie, et al. The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains β -catenin. *J Biol Chem*, 273(26):16470–5, 1998.
- [237] H. Steiner, E. Winkler, D. Edbauer, S. Prokop, G. Basset, A. Yamasaki, M. Kostka, and C. Haass. PEN-2 is an integral component of the γ -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem*, 277(42):39062–5, 2002.
- [238] K. Shirotani, D. Edbauer, S. Prokop, C. Haass, and H. Steiner. Identification of distinct γ -secretase complexes with different APH-1 variants. *J Biol Chem*, 279(40):41340–5, 2004.
- [239] C. Kaether, A. Capell, D. Edbauer, E. Winkler, B. Novak, H. Steiner, and C. Haass. The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and γ -secretase activity. *EMBO J*, 23(24):4738–48, 2004.
- [240] H. Laudon, E.M. Hansson, K. Melén, A. Bergman, M.R. Farmery, B. Winblad, U. Lendahl, G. von Heijne, and J. Näslund. A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem*, 280(42):35352–60, 2005.
- [241] A. Henricson, L. Käll, and E.L.L. Sonnhammer. A novel transmembrane topology of presenilin based on reconciling experimental and computational evidence. *FEBS J*, 272(11):2727–33, 2005.
- [242] Y.S. Oh and R.J. Turner. Evidence that the COOH terminus of human presenilin 1 is located in extracytoplasmic space. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289(3):C576–81, 2005.
- [243] Y.S. Oh and R.J. Turner. Topology of the C-terminal fragment of human presenilin 1. *Biochemistry*, 44(35):11821–8, 2005.
- [244] D. Spasic, A. Tolia, K. Dillen, V. Baert, B. De Strooper, S. Vrijens, and W. Annaert. Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway. *J Biol Chem*, 281(36):26569–77, 2006.
- [245] M.S. Wolfe, W. Xia, C.L. Moore, D.D. Leatherwood, B. Ostaszewski, T. Rahmati, I.O. Donkor, and D.J. Selkoe. Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer’s γ -secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry*, 38(15):4720–7, 1999.

- [246] M.S. Shearman, D. Beher, E.E. Clarke, H.D. Lewis, T. Harrison, P. Hunt, A. Nadin, A.L. Smith, G. Stevenson, and J.L. Castro. L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid β -protein precursor γ -secretase activity. *Biochemistry*, 39(30):8698–704, 2000.
- [247] M.S. Wolfe, W. Xia, B.L. Ostaszewski, T.S. Diehl, W.T. Kimberly, and D.J. Selkoe. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature*, 398(6727):513–7, 1999.
- [248] H. Steiner, K. Duff, A. Capell, H. Romig, M.G. Grim, S. Lincoln, J. Hardy, X. Yu, M. Picciano, K. Fichteler, et al. A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid β -peptide production and notch signaling. *J Biol Chem*, 274(40):28669–73, 1999.
- [249] W.T. Kimberly, W. Xia, T. Rahmati, M.S. Wolfe, and D.J. Selkoe. The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for γ -secretase activity and amyloid β -protein generation. *J Biol Chem*, 275(5):3173–8, 2000.
- [250] W.P. Esler, W.T. Kimberly, B.L. Ostaszewski, T.S. Diehl, C.L. Moore, J.Y. Tsai, T. Rahmati, W. Xia, D.J. Selkoe, and M.S. Wolfe. Transition-state analogue inhibitors of γ -secretase bind directly to presenilin-1. *Nat Cell Biol*, 2(7):428–34, 2000.
- [251] Y.M. Li, M. Xu, M.-T. Lai, Q. Huang, J.L. Castro, J. DiMuzio-Mower, T. Harrison, C. Lellis, A. Nadin, J.G. Neduvilil, et al. Photoactivated γ -secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature*, 405(6787):689–94, 2000.
- [252] D. Seiffert, J.D. Bradley, C.M. Rominger, D.H. Rominger, F. Yang, J.E. Meredith Jr., Q. Wang, A.H. Roach, L.A. Thompson, S.M. Spitz, et al. Presenilin-1 and -2 are molecular targets for γ -secretase inhibitors. *J Biol Chem*, 275(44):34086–91, 2000.
- [253] D.R. Borchelt, G. Thinakaran, C.B. Eckman, M.K. Lee, F. Davenport, T. Ratovitsky, C.M. Prada, G. Kim, S. Seekins, D. Yager, et al. Familial Alzheimer’s disease-linked presenilin 1 variants elevate $A\beta$ 1-42/1-40 ratio *in vitro* and *in vivo*. *Neuron*, 17(5):1005–13, 1996.
- [254] K. Duff, C. Eckman, C. Zehr, X. Yu, C.M. Prada, J. Perez-tur, M. Hutton, L. Buee, Y. Harigaya, D. Yager, et al. Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, 383(6602):710–3, 1996.
- [255] M. Citron, D. Westaway, W. Xia, G. Carlson, T. Diehl, G. Levesque, K. Johnson-Wood, M. Lee, P. Seubert, A. Davis, et al. 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):67–72, 1997.
- [256] D. Levitan and I. Greenwald. Facilitation of *lin-12*-mediated signalling by *sel-12*, a *Caenorhabditis elegans* *S182* Alzheimer’s disease gene. *Nature*, 377(6547):351–4, 1995.
- [257] Z. Zhang, P. Nadeau, W. Song, D. Donoviel, M. Yuan, A. Bernstein, and B.A. Yankner. Presenilins are required for γ -secretase cleavage of β -APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat Cell Biol*, 2(7):463–5, 2000.
- [258] P.C. Wong, H. Zheng, H. Chen, M.W. Becher, D.J. Sirinathsinghji, M.E. Trumbauer, H.Y. Chen, D.L. Price, L.H. Van der Ploeg, and S.S. Sisodia. Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature*, 387(6630):288–92, 1997.
- [259] A. Herreman, D. Hartmann, W. Annaert, P. Saftig, K. Craessaerts, L. Serneels, L. Umans, V. Schrijvers, F. Checler, H. Vanderstichele, et al. 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 U S A*, 96(21):11872–7, 1999.
- [260] D. B. Donoviel, A. K. Hadjantonakis, M. Ikeda, H. Zheng, P. S. Hyslop, and A. Bernstein. Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev*, 13(21):2801–10, 1999.
- [261] G. Thinakaran, D.R. Borchelt, M.K. Lee, H.H. Slunt, L. Spitzer, G. Kim, T. Ratovitsky, F. Davenport, C. Nordstedt, M. Seeger, et al. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives *in vivo*. *Neuron*, 17(1):181–90, 1996.

- [262] A. Capell, J. Grünberg, B. Pesold, A. Diehlmann, M. Citron, R. Nixon, K. Beyreuther, D.J. Selkoe, and C. Haass. The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. *J Biol Chem*, 273(6):3205–11, 1998.
- [263] G. Thinakaran, J.B. Regard, C.M. Bouton, C.L. Harris, D.L. Price, D.R. R Borchelt, and S.S. Sisodia. Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP. *Neurobiol Dis*, 4(6):438–53, 1998.
- [264] C.A. Saura, T. Tomita, F. Davenport, C.L. Harris, T. Iwatsubo, and G. Thinakaran. Evidence that intramolecular associations between presenilin domains are obligatory for endoproteolytic processing. *J Biol Chem*, 274(20):13818–23, 1999.
- [265] T. Ratovitski, H.H. Slunt, G. Thinakaran, D.L. Price, S.S. Sisodia, and D.R. Borchelt. Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin. *J Biol Chem*, 272(39):24536–41, 1997.
- [266] H. Steiner, A. Capell, B. Pesold, M. Citron, P.M. Kloetzel, D.J. Selkoe, H. Romig, K. Mendla, and C. Haass. Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. *J Biol Chem*, 273(48):32322–31, 1998.
- [267] A. Fukumori, R. Fluhrer, H. Steiner, and C. Haass. Three-amino acid spacing of presenilin endoproteolysis suggests a general stepwise cleavage of γ -secretase-mediated intramembrane proteolysis. *J Neurosci*, 30(23):7853–62, 2010.
- [268] H. Steiner, H. Romig, B. Pesold, U. Philipp, M. Baader, M. Citron, H. Loetscher, H. Jacobsen, and C. Haass. Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis. *Biochemistry*, 38(44):14600–5, 1999.
- [269] Y. Nakaya, T. Yamane, H. Shiraishi, H.-Q. Wang, E. Matsubara, T. Sato, G. Dolios, R. Wang, B. De Strooper, M. Shoji, et al. Random mutagenesis of presenilin-1 identifies novel mutants exclusively generating long amyloid β -peptides. *J Biol Chem*, 280(19):19070–7, 2005.
- [270] H. Steiner, M. Kostka, H. Romig, G. Basset, B. Pesold, J. Hardy, A. Capell, L. Meyn, M.L. Grim, R. Baumeister, et al. Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat Cell Biol*, 2(11):848–51, 2000.
- [271] B.I. Pérez-Revuelta, A. Fukumori, S. Lammich, A. Yamasaki, C. Haass, and H. Steiner. Requirement for small side chain residues within the GxGD-motif of presenilin for γ -secretase substrate cleavage. *J Neurochem*, 112(4):940–50, 2010.
- [272] M. Cruts, H. Backhovens, S.Y. Wang, G. Van Gassen, J. Theuns, C.D. De Jonghe, A. Wehnert, J. De Voecht, G. De Winter, P. Cras, et al. Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum Mol Genet*, 4(12):2363–71, 1995.
- [273] A. Yamasaki, S. Eimer, M. Okochi, A. Smialowska, C. Kaether, R. Baumeister, C. Haass, and H. Steiner. The GxGD motif of presenilin contributes to catalytic function and substrate identification of γ -secretase. *J Neurosci*, 26(14):3821–8, 2006.
- [274] J. Wang, A.L. Brunkan, S. Hecimovic, E. Walker, and A. Goate. Conserved "PAL" sequence in presenilins is essential for γ -secretase activity, but not required for formation or stabilization of γ -secretase complexes. *Neurobiol Dis*, 15(3):654–66, 2004.
- [275] J. Wang, D. Beher, A.C. Nyborg, M.S. Shearman, T.E. Golde, and A. Goate. C-terminal PAL motif of presenilin and presenilin homologues required for normal active site conformation. *J Neurochem*, 96(1):218–27, 2006.
- [276] C. Sato, S. Takagi, T. Tomita, and T. Iwatsubo. The C-terminal PAL motif and transmembrane domain 9 of presenilin 1 are involved in the formation of the catalytic pore of the γ -secretase. *J Neurosci*, 28(24):6264–71, 2008.
- [277] A. L. Brunkan, M. Martinez, J. Wang, E. S. Walker, D. Beher, M. S. Shearman, and A. M. Goate. Two domains within the first putative transmembrane domain of presenilin 1 differentially influence presenilinase and γ -secretase activity. *J Neurochem*, 94(5):1315–28, 2005.

- [278] S. Takagi, A. Tominaga, C. Sato, T. Tomita, and T. Iwatsubo. Participation of transmembrane domain 1 of presenilin 1 in the catalytic pore structure of the γ -secretase. *J Neurosci*, 30(47):15943–50, 2010.
- [279] M.R. Hass, C. Sato, R. Kopan, and G. Zhao. Presenilin: RIP and beyond. *Semin Cell Dev Biol*, 20(2):201–10, 2009.
- [280] S. Naruse, G. Thinakaran, J.J. Luo, J.W. Kusiak, T. Tomita, T. Iwatsubo, X. Qian, D.D. Ginty, D.L. Price, D.R. Borchelt, et al. Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron*, 21(5):1213–21, 1998.
- [281] M. Nishimura, G. Yu, G. Levesque, D.M. Zhang, L. Ruel, F. Chen, P. Milman, E. Holmes, Y. Liang, T. Kawarai, et al. Presenilin mutations associated with Alzheimer disease cause defective intracellular trafficking of β -catenin, a component of the presenilin protein complex. *Nat Med*, 5(2):164–9, 1999.
- [282] E. Noll, M. Medina, D. Hartley, J. Zhou, N. Perrimon, and K.S. Kosik. Presenilin affects arm/ β -catenin localization and function in *Drosophila*. *Dev Biol*, 227(2):450–64, 2000.
- [283] H. Tu, O. Nelson, A. Bezprozvanny, Z. Wang, S.-F. Lee, Y.-H. Hao, L. Serneels, B. De Strooper, G. Yu, and I. Bezprozvanny. Presenilins form ER Ca^{2+} leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer’s disease-linked mutations. *Cell*, 126(5):981–93, 2006.
- [284] J.-H. Lee, W.H. Yu, A. Kumar, S. Lee, P. Mohan, C.M. Peterhoff, D.M. Wolfe, M. Martinez-Vicente, A.C. Massey, G. Sovak, et al. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, 141(7):1146–58, 2010.
- [285] K.M. Neely, K.N. Green, and F.M. LaFerla. Presenilin is necessary for efficient proteolysis through the autophagy-lysosome system in a γ -secretase-independent manner. *J Neurosci*, 31(8):2781–91, 2011.
- [286] D. Shilling, D.-O.D. Mak, D.E. Kang, and J.K. Foskett. Lack of evidence for presenilins as endoplasmic reticulum Ca^{2+} leak channels. *J Biol Chem*, 287(14):10933–44, 2012.
- [287] X. Zhang, K. Garbett, K. Veeraraghavalu, B. Wilburn, R. Gilmore, K. Mirnics, and S. S. Sisodia. A role for presenilins in autophagy revisited: normal acidification of lysosomes in cells lacking PSEN1 and PSEN2. *J Neurosci*, 32(25):8633–48, 2012.
- [288] K. Coen, R. S. Flannagan, S. Baron, L. R. Carraro-Lacroix, D. Wang, W. Vermeire, C. Michiels, S. Munck, V. Baert, S. Sugita, et al. Lysosomal calcium homeostasis defects, not proton pump defects, cause endo-lysosomal dysfunction in PSEN-deficient cells. *J Cell Biol*, 198(1):23–35, 2012.
- [289] G. Yu, M. Nishimura, S. Arawaka, D. Levitan, L. Zhang, A. Tandon, Y.Q. Song, E. Rogava, F. Chen, T. Kawarai, et al. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. *Nature*, 407(6800):48–54, 2000.
- [290] C. Goutte, W. Hepler, K.M. Mickey, and J.R. Priess. *aph-2* encodes a novel extracellular protein required for GLP-1-mediated signaling. *Development*, 127(11):2481–92, 2000.
- [291] D. Levitan, G. Yu, P. St George Hyslop, and C. Goutte. APH-2/nicastrin functions in LIN-12/Notch signaling in the *Caenorhabditis elegans* somatic gonad. *Dev Biol*, 240(2):654–61, 2001.
- [292] Y. Hu, Y. Ye, and M.E. Fortini. Nicastrin is required for γ -secretase cleavage of the *Drosophila* Notch receptor. *Dev Cell*, 2(1):69–78, 2002.
- [293] T. Li, G. Ma, H. Cai, D.L. Price, and P.C. Wong. Nicastrin is required for assembly of presenilin/ γ -secretase complexes to mediate Notch signaling and for processing and trafficking of β -amyloid precursor protein in mammals. *J Neurosci*, 23(8):3272–7, 2003.
- [294] R. Fluhrer, F. Kamp, G. Grammer, B. Nuscher, H. Steiner, K. Beyer, and C. Haass. The nicastrin ectodomain adopts a highly thermostable structure. *Biol Chem*, 392(11):995–1001, 2011.
- [295] J.Y. Leem, S. Vijayan, P. Han, D. Cai, M. Machura, K.O. Lopes, M.L. Veselits, H. Xu, and G. Thinakaran. Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin. *J Biol Chem*, 277(21):19236–40, 2002.

- [296] D.S. Yang, A. Tandon, F. Chen, G. Yu, H. Yu, S. Arawaka, H. Hasegawa, M. Duthie, S.D. Schmidt, T.V. Ramabhadran, et al. Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its binding to presenilins. *J Biol Chem*, 277(31):28135–42, 2002.
- [297] C. Kaether, S. Lammich, D. Edbauer, M. Ertl, J. Rietdorf, A. Capell, H. Steiner, and C. Haass. 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):551–61, 2002.
- [298] S. Shah, S.F. Lee, K. Tabuchi, Y.H. Hao, C. Yu, Q. LaPlant, H. Ball, C.E. Dann, T. Südhof, and G. Yu. Nicastrin functions as a γ -secretase-substrate receptor. *Cell*, 122(3):435–47, 2005.
- [299] L. Chávez-Gutiérrez, A. Tolia, E. Maes, T. Li, P.C. Wong, and B. de Strooper. Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for γ -secretase complex maturation but not for its activity. *J Biol Chem*, 283(29):20096–105, 2008.
- [300] R.R. Fortna, A.S. Crystal, V.A. Morais, D.S. Pijak, V. M.-Y. Lee, and R.W. Doms. Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of APH-1, a component of the γ -secretase complex. *J Biol Chem*, 279(5):3685–93, 2004.
- [301] Y. Gu, F. Chen, N. Sanjo, T. Kawarai, H. Hasegawa, M. Duthie, W. Li, X. Ruan, A. Luthra, H.T.J. Mount, et al. APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes. *J Biol Chem*, 278(9):7374–80, 2003.
- [302] Y. Hu and M.E. Fortini. Different cofactor activities in γ -secretase assembly: evidence for a nicastrin-Aph-1 subcomplex. *J Cell Biol*, 161(4):685–90, 2003.
- [303] M.J. LaVoie, P.C. Fraering, B.L. Ostaszewski, W. Ye, W.T. Kimberly, M.S. Wolfe, and D.J. Selkoe. Assembly of the γ -secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem*, 278(39):37213–22, 2003.
- [304] S.F. Lee, S. Shah, C. Yu, W.C. Wigley, H. Li, M. Lim, K. Pedersen, W. Han, P. Thomas, J. Lundkvist, et al. A conserved GXXXG motif in APH-1 is critical for assembly and activity of the γ -secretase complex. *J Biol Chem*, 279(6):4144–52, 2004.
- [305] D. Edbauer, C. Kaether, H. Steiner, and C. Haass. Co-expression of nicastrin and presenilin rescues a loss of function mutant of aph-1. *J Biol Chem*, 279(36):37311–5, 2004.
- [306] P.-M. Chiang, R. R. Fortna, D. L. Price, T. Li, and P. C. Wong. Specific domains in anterior pharynx-defective 1 determine its intramembrane interactions with nicastrin and presenilin. *Neurobiol Aging*, 33(2):277–85, 2012.
- [307] R. Pardossi-Piquard, S.-P. Yang, S. Kanemoto, Y. Gu, F. Chen, C. Böhm, J. Sevalle, T. Li, P.C. Wong, F. Checler, et al. APH1 polar transmembrane residues regulate the assembly and activity of presenilin complexes. *J Biol Chem*, 284(24):16298–307, 2009.
- [308] R. Francis, G. McGrath, J. Zhang, D.A. Ruddy, M. Sym, J. Apfeld, M. Nicoll, M. Maxwell, B. Hai, M.C. Ellis, et al. 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):85–97, 2002.
- [309] C. Goutte, M. Tsunozaki, V.A. Hale, and J.R. Priess. APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(2):775–9, 2002.
- [310] S.S. Hébert, L. Serneels, T. Dejaegere, K. Horré, M. Dabrowski, V. Baert, W. Annaert, D. Hartmann, and B. De Strooper. Coordinated and widespread expression of γ -secretase *in vivo*: evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiol Dis*, 17(2):260–72, 2004.
- [311] K. Shirotani, M. Tomioka, E. Kremmer, C. Haass, and H. Steiner. Pathological activity of familial Alzheimer’s disease-associated mutant presenilin can be executed by six different γ -secretase complexes. *Neurobiol Dis*, 27(1):102–7, 2007.
- [312] A.S. Crystal, V.A. Morais, T.C. Pierson, D.S. Pijak, D. Carlin, V.M.-Y. Lee, and R.W. Doms. Membrane topology of γ -secretase component PEN-2. *J Biol Chem*, 278(22):20117–23, 2003.
- [313] S. Prokop, K. Shirotani, D. Edbauer, C. Haass, and H. Steiner. Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the γ -secretase complex. *J Biol Chem*, 279(22):23255–61, 2004.

- [314] H. Hasegawa, N. Sanjo, F. Chen, Y.-J. Gu, C. Shier, A. Petit, T. Kawarai, T. Katayama, S.D. Schmidt, P.M. Mathews, et al. Both the sequence and length of the C terminus of PEN-2 are critical for intermolecular interactions and function of presenilin complexes. *J Biol Chem*, 279(45):46455–63, 2004.
- [315] S. Prokop, C. Haass, and H. Steiner. Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain determines its function in the stabilization of presenilin fragments. *J Neurochem*, 94(1):57–62, 2005.
- [316] C. Kaether, J. Scheuermann, M. Fassler, S. Zilow, K. Shirotani, C. Valkova, B. Novak, S. Kacmar, H. Steiner, and C. Haass. Endoplasmic reticulum retention of the γ -secretase complex component PEN-2 by Rer1. *EMBO Rep*, 8(8):743–48, 2007.
- [317] L. Bammens, L. Chávez-Gutiérrez, A. Tolia, A. Zwijsen, and B. De Strooper. Functional and topological analysis of Pen-2, the fourth subunit of the γ -secretase complex. *J Biol Chem*, 286(14):12271–82, 2011.
- [318] A.J. Beel and C.R. Sanders. Substrate specificity of γ -secretase and other intramembrane proteases. *Cell Mol Life Sci*, 65(9):1311–34, 2008.
- [319] A. Haapasalo and D.M. Kovacs. The many substrates of presenilin/ γ -secretase. *J Alzheimers Dis*, 25(1):3–28, 2011.
- [320] S. Nakahara, T. Saito, N. Kondo, K. Moriwaki, K. Noda, S. Ihara, M. Takahashi, Y. Ide, J. Gu, H. Inohara, et al. A secreted type of β 1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V), a novel angiogenesis inducer, is regulated by γ -secretase. *FASEB J*, 20(14):2451–9, 2006.
- [321] E.L. Meyer, N. Strutz, L.C. Gahring, and S.W. Rogers. Glutamate receptor subunit 3 is modified by site-specific limited proteolysis including cleavage by γ -secretase. *J Biol Chem*, 278(26):23786–96, 2003.
- [322] B. De Strooper, W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J.S. Mumm, E.H. Schroeter, V. Schrijvers, M.S. Wolfe, W.J. Ray, et al. A presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 398(6727):518–22, 1999.
- [323] R. Kopan and M. X. G. Ilagan. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137(2):216–33, 2009.
- [324] G. Struhl and A. Adachi. Requirements for presenilin-dependent cleavage of Notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell*, 6(3):625–36, 2000.
- [325] M. L. Hemming, J. E. Elias, S. P. Gygi, and D. J. Selkoe. Proteomic profiling of γ -secretase substrates and mapping of substrate requirements. *PLoS Biol*, 6(10):e257, 2008.
- [326] J. Zhang, W. Ye, R. Wang, M. S. Wolfe, B. D. Greenberg, and D. J. Selkoe. Proteolysis of chimeric β -amyloid precursor proteins containing the Notch transmembrane domain yields amyloid β -like peptides. *J Biol Chem*, 277(17):15069–75, 2002.
- [327] Z. Ren, D. Schenk, G.S. Basi, and I.P. Shapiro. Amyloid β -protein precursor juxtamembrane domain regulates specificity of γ -secretase-dependent cleavages. *J Biol Chem*, 282(48):35350–60, 2007.
- [328] M. Citron, D. B. Teplow, and D. J. Selkoe. Generation of amyloid β protein from its precursor is sequence specific. *Neuron*, 14(3):661–70, 1995.
- [329] S.F. Lichtenthaler, D. Behr, H.S. Grimm, R. Wang, M.S. Shearman, C.L. Masters, and K. Beyreuther. The intramembrane cleavage site of the amyloid precursor protein depends on the length of its transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(3):1365–70, 2002.
- [330] D.R. Dries, S. Shah, Y.-H. Han, C. Yu, S. Yu, M.S. Shearman, and G. Yu. Glu-333 of nicastrin directly participates in γ -secretase activity. *J Biol Chem*, 284(43):29714–24, 2009.
- [331] T.L. Kukar, T.B. Ladd, P. Robertson, S.A. Pintchovski, B. Moore, M.A. Bann, Z. Ren, K. Jansen-West, K. Malphrus, S. Eggert, et al. Lysine 624 of the amyloid precursor protein (APP) is a critical determinant of amyloid β peptide length: support for a sequential model of γ -secretase intramembrane proteolysis and regulation by the amyloid β precursor protein (APP) juxtamembrane region. *J Biol Chem*, 286(46):39804–12, 2011.

- [332] R. Kopan and M.X.G. Ilagan. γ -Secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(6):499–504, 2004.
- [333] S. Lammich, M. Okochi, M. Takeda, C. Kaether, A. Capell, A.K. Zimmer, D. Edbauer, J. Walter, H. Steiner, and C. Haass. 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):44754–9, 2002.
- [334] P. Marambaud, J. Shioi, G. Serban, A. Georgakopoulos, S. Sarner, V. Nagy, L. Baki, P. Wen, S. Efthimiopoulos, Z. Shao, et al. A presenilin-1/ γ -secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J*, 21(8):1948–56, 2002.
- [335] P. Marambaud, P. H. Wen, A. Dutt, J. Shioi, A. Takashima, R. Siman, and N. K. Robakis. A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/ ϵ -cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell*, 114(5):635–45, 2003.
- [336] Y. Yarden and M. X. Sliwkowski. Untangling the erbb signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2):127–37, 2001.
- [337] Mark E. Fortini. γ -secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(9):673–84, 2002.
- [338] S. Artavanis-Tsakonas, M. D. Rand, and R. J. Lake. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284(5415):770–6, 1999.
- [339] M. T. Saxena, E. H. Schroeter, J. S. Mumm, and R. Kopan. Murine notch homologs (N1-4) undergo presenilin-dependent proteolysis. *J Biol Chem*, 276(43):40268–73, 2001.
- [340] C. M. Blaumueller, H. Qi, P. Zagouras, and S. Artavanis-Tsakonas. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*, 90(2):281–91, 1997.
- [341] F. Logeat, C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N. G. Seidah, and A. Israël. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(14):8108–12, 1998.
- [342] R. G. Fehon, P. J. Kooh, I. Rebay, C. L. Regan, T. Xu, M. A. Muskavitch, and S. Artavanis-Tsakonas. Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell*, 61(3):523–34, 1990.
- [343] J. Rooke, D. Pan, T. Xu, and G. M. Rubin. KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science*, 273(5279):1227–31, 1996.
- [344] D. Pan and G. M. Rubin. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell*, 90(2):271–80, 1997.
- [345] C. Brou, F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J. R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R. A. Black, and A. Israël. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*, 5(2):207–16, 2000.
- [346] J. S. Mumm, E. H. Schroeter, M. T. Saxena, A. Griesemer, X. Tian, D. J. Pan, W. J. Ray, and R. Kopan. A ligand-induced extracellular cleavage regulates γ -secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell*, 5(2):197–206, 2000.
- [347] J. J. Peschon, J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, 282(5392):1281–4, 1998.
- [348] D. Hartmann, B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lübke, A. Lena Illert, K. von Figura, and P. Saftig. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for α -secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet*, 11(21):2615–24, 2002.
- [349] G. Struhl and A. Adachi. Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell*, 93(4):649–60, 1998.
- [350] G. Struhl and I. Greenwald. Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature*, 398(6727):522–5, 1999.

- [351] S. Jarriault, C. Brou, F. Logeat, E. H. Schroeter, R. Kopan, and A. Israel. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature*, 377(6547):355–8, 1995.
- [352] M. Okochi, H. Steiner, A. Fukumori, H. Tanii, T. Tomita, T. Tanaka, T. Iwatsubo, T. Kudo, M. Takeda, and C. Haass. Presenilins mediate a dual intramembranous γ -secretase cleavage of notch-1. *EMBO J*, 21(20):5408–16, 2002.
- [353] M. Okochi, A. Fukumori, J. Jiang, N. Itoh, R. Kimura, H. Steiner, C. Haass, S. Tagami, and M. Takeda. Secretion of the notch-1 A β -like peptide during notch signaling. *J Biol Chem*, 281(12):7890–8, 2006.
- [354] A. Louvi and S. Artavanis-Tsakonas. Notch and disease: a growing field. *Semin Cell Dev Biol*, 23(4):473–80, 2012.
- [355] B. Purow. Notch inhibition as a promising new approach to cancer therapy. *Adv Exp Med Biol*, 727:305–19, 2012.
- [356] A. Joutel, C. Corpechot, A. Ducros, K. Vahedi, H. Chabriat, P. Mouton, S. Alamowitch, V. Domenga, M. Cécillion, E. Marechal, et al. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*, 383(6602):707–10, 1996.
- [357] M. Culty, K. Miyake, P. W. Kincade, E. Sikorski, E. C. Butcher, and C. Underhill. The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *J Cell Biol*, 111(6 Pt 1):2765–74, 1990.
- [358] O. Nagano and H. Saya. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci*, 95(12):930–5, 2004.
- [359] J. Bajorath, B. Greenfield, S. B. Munro, A. J. Day, and A. Aruffo. Identification of CD44 residues important for hyaluronan binding and delineation of the binding site. *J Biol Chem*, 273(1):338–43, 1998.
- [360] L. Thomas, H. R. Byers, J. Vink, and I. Stamenkovic. CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J Cell Biol*, 118(4):971–7, 1992.
- [361] U. Günthert, M. Hofmann, W. Rudy, S. Reber, M. Zöller, I. Haussmann, S. Matzku, A. Wenzel, H. Ponta, and P. Herrlich. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*, 65(1):13–24, 1991.
- [362] M. Yasuda, Y. Tanaka, K. Fujii, and K. Yasumoto. CD44 stimulation down-regulates Fas expression and Fas-mediated apoptosis of lung cancer cells. *Int Immunol*, 13(10):1309–19, 2001.
- [363] M. K. Hertweck, F. Erdfelder, and K.-A. Kreuzer. CD44 in hematological neoplasias. *Ann Hematol*, 90(5):493–508, 2011.
- [364] M. Kajita, Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh, and M. Seiki. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol*, 153(5):893–904, 2001.
- [365] O. Nagano, D. Murakami, D. Hartmann, B. De Strooper, P. Saftig, T. Iwatsubo, M. Nakajima, M. Shinohara, and H. Saya. Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J Cell Biol*, 165(6):893–902, 2004.
- [366] H. Nakamura, N. Suenaga, K. Taniwaki, H. Matsuki, K. Yonezawa, M. Fujii, Y. Okada, and M. Seiki. Constitutive and induced CD44 shedding by ADAM-like proteases and membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res*, 64(3):876–82, 2004.
- [367] I. Okamoto, Y. Kawano, H. Tsuiki, J. Sasaki, M. Nakao, M. Matsumoto, M. Suga, M. Ando, M. Nakajima, and H. Saya. CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration. *Oncogene*, 18(7):1435–46, 1999.
- [368] I. Okamoto, H. Tsuiki, L. C. Kenyon, A. K. Godwin, D. R. Emlet, M. Holgado-Madruga, I. S. Lanham, C. J. Joynes, K. T. Vo, A. Guha, et al. Proteolytic cleavage of the CD44 adhesion molecule in multiple human tumors. *Am J Pathol*, 160(2):441–7, 2002.

- [369] I. Okamoto, Y. Kawano, D. Murakami, T. Sasayama, N. Araki, T. Miki, A. J. Wong, and H. Saya. Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *J Cell Biol*, 155(5):755–62, 2001.
- [370] K. E. Miletti-González, K. Murphy, M. N. Kumaran, A. K. Ravindranath, R. P. Wernyj, S. Kaur, G. D. Miles, E. Lim, R. Chan, M. Chekmareva, et al. Identification of function for CD44 intracytoplasmic domain (CD44-ICD): modulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) transcription via novel promoter response element. *J Biol Chem*, 287(23):18995–19007, 2012.
- [371] K. Shirovani, D. Edbauer, M. Kostka, H. Steiner, and C. Haass. Immature nicastrin stabilizes APH-1 independent of PEN-2 and presenilin: identification of nicastrin mutants that selectively interact with APH-1. *J Neurochem*, 89(6):1520–7, 2004.
- [372] X. Zhang, R.J. Hoey, G. Lin, A. Koide, B. Leung, K. Ahn, G. Dolios, M. Paduch, T. Ikeuchi, R. Wang, et al. Identification of a tetratricopeptide repeat-like domain in the nicastrin subunit of γ -secretase using synthetic antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(22):8534–9, 2012.
- [373] I. Hayashi, S. Takatori, Y. Urano, Y. Miyake, J. Takagi, M. Sakata-Yanagimoto, H. Iwanari, S. Osawa, Y. Morohashi, T. Li, et al. Neutralization of the γ -secretase activity by monoclonal antibody against extracellular domain of nicastrin. *Oncogene*, 31(6):787–98, 2012.
- [374] A.C. Chen, L.Y. Guo, B.L. Ostaszewski, D. J. Selkoe, and M.J. LaVoie. Aph-1 associates directly with full-length and C-terminal fragments of γ -secretase substrates. *J Biol Chem*, 285(15):11378–91, 2010.
- [375] W.P. Esler, W.T. Kimberly, B.L. Ostaszewski, W. Ye, T.S. Diehl, D.J. Selkoe, and M.S. Wolfe. Activity-dependent isolation of the presenilin- γ -secretase complex reveals Nicastrin and a γ substrate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(5):2720–5, 2002.
- [376] G. Tian, C.D. Sobotka-Briner, J. Zysk, X. Liu, C. Birr, M.A. Sylvester, P.D. Edwards, C.D. Scott, and B.D. Greenberg. Linear non-competitive inhibition of solubilized human γ -secretase by pepstatin A methylester, L-685,458, sulfonamides, and benzodiazepines. *J Biol Chem*, 277(35):31499–505, 2002.
- [377] G. Tian, S.V. Ghanekar, D. Aharony, A.B. Shenvi, R.T. Jacobs, X. Liu, and B.D. Greenberg. The mechanism of γ -secretase: MULTIPLE INHIBITOR BINDING SITES FOR TRANSITION STATE ANALOGS AND SMALL MOLECULE INHIBITORS. *J Biol Chem*, 278(31):28968–75, 2003.
- [378] D. Behr, M. Fricker, A. Nadin, E. E. Clarke, J. D. J. Wrigley, Y.M. Li, J. G. Culvenor, C. L. Masters, T. Harrison, and M. S. Shearman. In vitro characterization of the presenilin-dependent γ complex using a novel affinity ligand. *Biochemistry*, 42(27):8133–42, 2003.
- [379] O. Berezovska, P. Ramdya, J. Skoch, M.S. Wolfe, B.J. Bacskai, and B.T. Hyman. Amyloid precursor protein associates with a nicastrin-dependent docking site on the presenilin 1- γ -secretase complex in cells demonstrated by fluorescence lifetime imaging. *J Neurosci*, 23(11):4560–6, 2003.
- [380] P. Ramdya, J. Skoch, B.J. Bacskai, B.T. Hyman, and O. Berezovska. Activated Notch1 associates with a presenilin-1/ γ -secretase docking site. *J Neurochem*, 87(4):843–50, 2003.
- [381] C. Das, O. Berezovska, T.S. Diehl, C. Genet, I. Buldyrev, J.-Y. Tsai, B.T. Hyman, and M.S. Wolfe. Designed helical peptides inhibit an intramembrane protease. *J Am Chem Soc*, 125(39):11794–5, 2003.
- [382] A.Y. Kornilova, C. Das, and M.S. Wolfe. Differential effects of inhibitors on the γ -secretase complex. MECHANISTIC IMPLICATIONS. *J Biol Chem*, 278(19):16470–3, 2003.
- [383] P. Gong, K. S. Vetrivel, P. D. Nguyen, X. Meckler, H. Cheng, M. Z. Kounnas, S. L. Wagner, A. T. Parent, and G. Thinakaran. Mutation analysis of the presenilin 1 N-terminal domain reveals a broad spectrum of γ -secretase activity toward amyloid precursor protein and other substrates. *J Biol Chem*, 285(49):38042–52, 2010.
- [384] N. Watanabe, S. Takagi, A. Tominaga, T. Tomita, and T. Iwatsubo. Functional analysis of the transmembrane domains of presenilin 1: participation of transmembrane domains 2 and 6 in the formation of initial substrate-binding site of γ -secretase. *J Biol Chem*, 285(26):19738–46, 2010.
- [385] A.Y. Kornilova, F. Bihel, C. Das, and M.S. Wolfe. The initial substrate-binding site of γ -secretase is located on presenilin near the active site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(9):3230–5, 2005.

- [386] F. Wu, C. Schweizer, N. Rudinskiy, D. M. Taylor, A. Kazantsev, R. Luthi-Carter, and P. C. Fraering. Novel γ -secretase inhibitors uncover a common nucleotide-binding site in JAK3, SIRT2, and PS1. *FASEB J*, 24(7):2464–74, 2010.
- [387] S. W. L'Hernault and P. M. Arduengo. Mutation of a putative sperm membrane protein in *Caenorhabditis elegans* prevents sperm differentiation but not its associated meiotic divisions. *J Cell Biol*, 119(1):55–68, 1992.
- [388] B.P. Imbimbo and G.A.M. Giardina. γ -Secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: disappointments and hopes. *Curr Top Med Chem*, 11(12):1555–70, 2011.
- [389] G. H. Searfoss, W. H. Jordan, D. O. Calligaro, E. J. Galbreath, L. M. Schirtzinger, B. R. Berridge, H. Gao, M. A. Higgins, P. C. May, and T. P. Ryan. Adipsin, a biomarker of gastrointestinal toxicity mediated by a functional γ -secretase inhibitor. *J Biol Chem*, 278(46):46107–16, 2003.
- [390] G.T. Wong, D. Manfra, F.M. Poulet, Q. Zhang, H. Josien, T. Bara, L. Engstrom, M. Pinzon-Ortiz, J.S. Fine, H.-J.J. Lee, et al. Chronic treatment with the γ -secretase inhibitor LY-411,575 inhibits β -amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem*, 279(13):12876–82, 2004.
- [391] J. Milano, J. McKay, C. Dagenais, L. Foster-Brown, F. Pognan, R. Gadiant, R.T. Jacobs, A. Zacco, B. Greenberg, and P.J. Ciaccio. Modulation of notch processing by γ -secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol Sci*, 82(1):341–58, 2004.
- [392] B.K. Hadland, N.R. Manley, D. Su, G.D. Longmore, C.L. Moore, M.S. Wolfe, E.H. Schroeter, and R. Kopan. γ -Secretase inhibitors repress thymocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13):7487–91, 2001.
- [393] John Panelos and Daniela Massi. Emerging role of Notch signaling in epidermal differentiation and skin cancer. *Cancer Biol Ther*, 8(21):1986–93, 2009.
- [394] E.R. Siemers, J.F. Quinn, J. Kaye, M.R. Farlow, A. Porsteinsson, P. Tariot, P. Zoulnouni, J.E. Galvin, D.M. Holtzman, D.S. Knopman, et al. Effects of a γ -secretase inhibitor in a randomized study of patients with Alzheimer disease. *Neurology*, 66(4):602–4, 2006.
- [395] A.S. Fleisher, R. Raman, E.R. Siemers, L. Becerra, C.M. Clark, R.A. Dean, M.R. Farlow, J.E. Galvin, E.R. Peskind, J.F. Quinn, et al. Phase 2 safety trial targeting amyloid β production with a γ -secretase inhibitor in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 65(8):1031–8, 2008.
- [396] K. Samson. NerveCenter: Phase III Alzheimer trial halted: Search for therapeutic biomarkers continues. *Ann Neurol*, 68(4):A9–A12, 2010.
- [397] J. D. Lathia, M. P. Mattson, and A. Cheng. Notch: from neural development to neurological disorders. *J Neurochem*, 107(6):1471–81, 2008.
- [398] Rui M. Costa, Tasuku Honjo, and Alcino J. Silva. Learning and memory deficits in Notch mutant mice. *Curr Biol*, 13(15):1348–54, 2003.
- [399] E. Siemers, M. Skinner, R. A. Dean, C. Gonzales, J. Satterwhite, M. Farlow, D. Ness, and P. C. May. Safety, tolerability, and changes in amyloid β concentrations after administration of a γ -secretase inhibitor in volunteers. *Clin Neuropharmacol*, 28(3):126–32, 2005.
- [400] M. S. Wolfe. γ -Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 120 Suppl 1:89–98, 2012.
- [401] K.W. Gillman, J.E. Starrett, M.F. Parker, K. Xie, J.J. Bronson, L.R. Marcin, K.E. McElhone, C.P. Bergstrom, R.A. Mate, R. Williams, et al. Discovery and evaluation of BMS-708163, a potent, selective and orally bioavailable γ -secretase inhibitor. *ACS Med Chem Lett*, 1(3):120–4, 2010.
- [402] G. Tong, J.-S. Wang, O. Sverdlov, S.-P. Huang, R. Slemmon, R. Croop, L. Castaneda, H. Gu, O. Wong, H. Li, et al. Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, single-ascending dose study of the oral γ -secretase inhibitor BMS-708163 (avagacestat): tolerability profile, pharmacokinetic parameters, and pharmacodynamic markers. *Clin Ther*, 34(3):654–67, 2012.
- [403] C. J. Crump, S. V. Castro, F. Wang, N. Pozdnyakov, T. E. Ballard, S. S. Sisodia, K. R. Bales, D. S. Johnson, and Y.-M. Li. BMS-708,163 Targets Presenilin and Lacks Notch-Sparing Activity. *Biochemistry*, 51(37):7209–11, 2012.

- [404] Y. Mitani, J. Yarimizu, K. Saita, H. Uchino, H. Akashiba, Y. Shitaka, K. Ni, and N. Matsuoka. Differential effects between γ -secretase inhibitors and modulators on cognitive function in amyloid precursor protein-transgenic and nontransgenic mice. *J Neurosci*, 32(6):2037–50, 2012.
- [405] A. Lleó and C.A. Saura. γ -Secretase substrates and their implications for drug development in Alzheimer’s disease. *Curr Top Med Chem*, 11(12):1513–27, 2011.
- [406] T. Bittner, M. Fuhrmann, S. Burgold, C.K.E. Jung, C. Volbracht, H. Steiner, G. Mitteregger, H.A. Kretzschmar, C. Haass, and J. Herms. γ -Secretase inhibition reduces spine density *in vivo* via an amyloid precursor protein-dependent pathway. *J Neurosci*, 29(33):10405–9, 2009.
- [407] S. Weggen, J.L. Eriksen, P. Das, S.A. Sagi, R. Wang, C.U. Pietrzik, K.A. Findlay, T.E. Smith, M.P. Murphy, T. Bulter, et al. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic $A\beta_{42}$ independently of cyclooxygenase activity. *Nature*, 414(6860):212–16, 2001.
- [408] S. Weggen, J.L. Eriksen, S.A. Sagi, C.U. Pietrzik, T.E. Golde, and E.H. Koo. $A\beta_{42}$ -lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs preserve intramembrane cleavage of the amyloid precursor protein (APP) and ErbB-4 receptor and signaling through the APP intracellular domain. *J Biol Chem*, 278(33):30748–54, 2003.
- [409] T. Li, Y. Huang, S. Jin, L. Ye, N. Rong, X. Yang, Y. Ding, Z. Cheng, J. Zhang, Z. Wan, et al. γ -secretase modulators do not induce $A\beta$ -rebound and accumulation of β -C-terminal fragment. *J Neurochem*, 121(2):277–86, 2012.
- [410] T. Kukar, M.P. Murphy, J.L. Eriksen, S.A. Sagi, S. Weggen, T.E. Smith, T. Ladd, M.A. Khan, R. Kache, J. Beard, et al. Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting $A\beta_{42}$ production. *Nat Med*, 11(5):545–50, 2005.
- [411] C. Czech, M.P. Burns, L. Vardanian, A. Augustin, H. Jacobsen, K. Baumann, and G.W. Rebeck. Cholesterol independent effect of LXR agonist TO-901317 on γ -secretase. *J Neurochem*, 101(4):929–36, 2007.
- [412] D. Oehlich, D.J.-C. Berthelot, and H.J.M. Gijzen. γ -Secretase modulators as potential disease modifying anti-Alzheimer’s drugs. *J Med Chem*, 54(3):669–98, 2011.
- [413] J.L. Eriksen, S.A. Sagi, T.E. Smith, S. Weggen, P. Das, D.C. McLendon, V.V. Ozols, K.W. Jessing, K.H. Zavitz, E.H. Koo, and T.E. Golde. NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target γ -secretase and lower $A\beta_{42}$ *in vivo*. *J Clin Invest*, 112(3):440–9, 2003.
- [414] J. Rogers, L.C. Kirby, S.R. Hempelman, D.L. Berry, P.L. McGeer, A.W. Kaszniak, J. Zalinski, M. Cofield, L. Mansukhani, P. Willson, et al. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer’s disease. *Neurology*, 43(8):1609–11, 1993.
- [415] P.L. McGeer, M. Schulzer, and E.G. McGeer. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer’s disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology*, 47(2):425–32, 1996.
- [416] W.F. Stewart, C. Kawas, M. Corrada, and E.J. Metter. Risk of Alzheimer’s disease and duration of NSAID use. *Neurology*, 48(3):626–32, 1997.
- [417] J.C. Anthony, J.C. Breitner, P.P. Zandi, M.R. Meyer, I. Jurasova, M.C. Norton, and S.V. Stone. Reduced prevalence of AD in users of NSAIDs and H2 receptor antagonists: the Cache County study. *Neurology*, 54(11):2066–71, 2000.
- [418] B. A. in t’ Veld, A. Ruitenber, A. Hofman, L. J. Launer, C. M. van Duijn, T. Stijnen, M. M. Breteler, and B. H. Stricker. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer’s disease. *N Engl J Med*, 345(21):1515–21, 2001.
- [419] W.L. Smith, D.L. DeWitt, and R.M. Garavito. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 69:145–82, 2000.
- [420] R. Narlawar, B.I. Pérez Revuelta, K. Baumann, R. Schubanel, C. Haass, H. Steiner, and B. Schmidt. N-Substituted carbazolyloxyacetic acids modulate Alzheimer associated γ -secretase. *Bioorg Med Chem Lett*, 17(1):176–82, 2007.
- [421] A. Zall, D. Kieser, N. Höttecke, E.C. Naumann, B. Thomaszewski, K. Schneider, D.T. Steinbacher, R. Schubanel, S. Masur, K. Baumann, and B. Schmidt. NSAID-derived γ -secretase modulation requires an acidic moiety on the carbazole scaffold. *Bioorg Med Chem*, 19(16):4903–9, 2011.

- [422] R. C. Green, L. S. Schneider, D. A. Amato, A. P. Beelen, G. Wilcock, E. A. Swabb, K. H. Zavitz, and Tarenflurbil Phase 3 Study Group. Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA*, 302(23):2557–64, 2009.
- [423] M.Z. Kounnas, A.M. Danks, S. Cheng, C. Tyree, E. Ackerman, X. Zhang, K. Ahn, P. Nguyen, D. Comer, L. Mao, et al. Modulation of γ -secretase reduces β -amyloid deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Neuron*, 67(5):769–80, 2010.
- [424] E. Portelius, B. Van Broeck, U. Andreasson, M.K. Gustavsson, M. Mercken, H. Zetterberg, H. Borghys, and K. Blennow. Acute effect on the A β isoform pattern in CSF in response to γ -secretase modulator and inhibitor treatment in dogs. *J Alzheimers Dis*, 21(3):1005–12, 2010.
- [425] Y. Takahashi, I. Hayashi, Y. Tominari, K. Rikimaru, Y. Morohashi, T. Kan, H. Natsugari, T. Fukuyama, T. Tomita, and T. Iwatsubo. Sulindac sulfide is a noncompetitive γ -secretase inhibitor that preferentially reduces A β_{42} generation. *J Biol Chem*, 278(20):18664–70, 2003.
- [426] D. Beher, E.E. Clarke, J.D.J. Wrigley, A.C.L. Martin, A. Nadin, I. Churcher, and M.S. Shearman. Selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives target γ -secretase at a novel site: EVIDENCE FOR AN ALLOSTERIC MECHANISM. *J Biol Chem*, 279(42):43419–26, 2004.
- [427] A. Lleó, O. Berezovska, L. Herl, S. Raju, A. Deng, B.J. Bacskai, M.P. Frosch, M. Irizarry, and B.T. Hyman. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs lower A β_{42} and change presenilin 1 conformation. *Nat Med*, 10(10):1065–6, 2004.
- [428] K. Uemura, C.M. Lill, X. Li, J.A. Peters, A. Ivanov, Z. Fan, B. De Strooper, B.J. Bacskai, B.T. Hyman, and O. Berezovska. Allosteric modulation of PS1/ γ -secretase conformation correlates with amyloid $\beta_{42/40}$ ratio. *PLoS One*, 4(11):e7893, 2009.
- [429] O. Berezovska, A. Lleó, L. D. Herl, M. P. Frosch, E. A. Stern, B. J. Bacskai, and B. T. Hyman. Familial alzheimer’s disease presenilin 1 mutations cause alterations in the conformation of presenilin and interactions with amyloid precursor protein. *J Neurosci*, 25(11):3009–17, Mar 2005.
- [430] S. Weggen, J. L. Eriksen, S. A. Sagi, C. U. Pietrzik, V. Ozols, A. Fauq, T. E. Golde, and E. H. Koo. Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid β 42 production by direct modulation of γ -secretase activity. *J Biol Chem*, 278(34):31831–7, 2003.
- [431] T.L. Kukar, T.B. Ladd, M.A. Bann, P.C. Fraering, R. Narlawar, G.M. Maharvi, B. Healy, R. Chapman, A.T. Welzel, R.W. Price, et al. Substrate-targeting γ -secretase modulators. *Nature*, 453(7197):925–9, 2008.
- [432] L. Richter, L.M. Munter, J. Ness, P.W. Hildebrand, M. Dasari, S. Unterreitmeier, B. Bulic, M. Beyermann, R. Gust, B. Reif, et al. Amyloid β_{42} peptide (A β_{42})-lowering compounds directly bind to A β and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(33):14597–602, 2010.
- [433] A. Botev, L.M. Munter, R. Wenzel, L. Richter, V. Althoff, J. Ismer, U. Gerling, C. Weise, B. Kopsch, P.W. Hildebrand, et al. The amyloid precursor protein C-terminal fragment C100 occurs in monomeric and dimeric stable conformations and binds γ -secretase modulators. *Biochemistry*, 50(5):828–35, 2011.
- [434] S.A. Sagi, C.B. Lessard, K.D. Winden, H. Maruyama, J.C. Koo, S. Weggen, T.L. Kukar, T.E. Golde, and E.H. Koo. Substrate sequence influences γ -secretase modulator activity: role of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 286(46):39794–803, 2011.
- [435] J. Wangren, J. Ottervald, S. Parpal, E. Portelius, K. Strömberg, T. Borgegård, R. Klintonberg, A. Juréus, J. Blomqvist, K. Blennow, et al. Second Generation γ -Secretase Modulators Exhibit Different Modulation of Notch β and A β Production. *J Biol Chem*, 287(39):32640–50, 2012.
- [436] A.J. Beel, P. Barrett, P.D. Schnier, S.A. Hitchcock, D. Bagal, C.R. Sanders, and J.B. Jordan. Nonspecificity of binding of γ -secretase modulators to the amyloid precursor protein. *Biochemistry*, 48(50):11837–9, 2009.
- [437] P.J. Barrett, C.R. Sanders, S.A. Kaufman, K. Michelsen, and J.B. Jordan. NSAID-based γ -secretase modulators do not bind to the amyloid- β polypeptide. *Biochemistry*, 50(47):10328–42, 2011.

- [438] T. Sato, A.C. Nyborg, N. Iwata, T.S. Diehl, T.C. Saido, T.E. Golde, and M.S. Wolfe. Signal peptide peptidase: biochemical properties and modulation by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Biochemistry*, 45(28):8649–56, 2006.
- [439] Y. Ohki, T. Higo, K. Uemura, N. Shimada, S. Osawa, O. Berezovska, S. Yokoshima, T. Fukuyama, T. Tomita, and T. Iwatsubo. Phenylpiperidine-type γ -secretase modulators target the transmembrane domain 1 of presenilin 1. *EMBO J*, 30(23):4815–24, 2011.
- [440] L.M. Munter, P. Voigt, A. Harmeier, D. Kaden, K.E. Gottschalk, C. Weise, R. Pipkorn, M. Schaefer, D. Langosch, and G. Multhaup. GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of A β ₄₂. *EMBO J*, 26(6):1702–12, 2007.
- [441] S. Baumann, N. Höttecke, R. Schubanel, K. Baumann, and B. Schmidt. NSAID-derived γ -secretase modulators. Part III: Membrane anchoring. *Bioorg Med Chem Lett*, 19(24):6986–90, 2009.
- [442] T. Wakabayashi and B. De Strooper. Presenilins: members of the γ -secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiology (Bethesda)*, 23:194–204, 2008.
- [443] T. Sato, T.-C. Tang, G. Reubins, J.Z. Fei, T. Fujimoto, P. Kienlen-Campard, S.N. Constantinescu, J.-N. Octave, S. Aimoto, and S.O. Smith. A helix-to-coil transition at the ϵ -cut site in the transmembrane dimer of the amyloid precursor protein is required for proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(5):1421–6, 2009.
- [444] S. C. Li and C. M. Deber. Glycine and β -branched residues support and modulate peptide helicity in membrane environments. *FEBS Lett*, 311(3):217–20, 1992.
- [445] C. M. Deber, A. R. Khan, Z. Li, C. Joensson, M. Glibowicka, and J. Wang. Val \rightarrow Ala mutations selectively alter helix-helix packing in the transmembrane segment of phage M13 coat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(24):11648–52, 1993.
- [446] S.L. Bardy and K.F. Jarrell. FlaK of the archaeon *Methanococcus maripaludis* possesses preflagellin peptidase activity. *FEMS Microbiol Lett*, 208(1):53–9, 2002.
- [447] J. Hu, Y. Xue, S. Lee, and Y. Ha. The crystal structure of GXGD membrane protease FlaK. *Nature*, 475(7357):528–31, 2011.
- [448] S. Sobhanifar, B. Schneider, F. Löhr, D. Gottstein, T. Ikeya, K. Mlynarczyk, W. Pulawski, U. Ghoshdastider, M. Kolinski, S. Filipek, et al. Structural investigation of the C-terminal catalytic fragment of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(21):9644–9, 2010.
- [449] C.P. Ponting, M. Hutton, A. Nyborg, M. Baker, K. Jansen, and T.E. Golde. Identification of a novel family of presenilin homologues. *Hum Mol Genet*, 11(9):1037–44, 2002.
- [450] X. Li, S. Dang, C. Yan, X. Gong, J. Wang, and Y. Shi. Structure of a presenilin family intramembrane aspartate protease. *Nature*, 493(7430):56–61, 2013.
- [451] A. Ebke, T. Luebbbers, A. Fukumori, K. Shirotani, C. Haass, K. Baumann, and H. Steiner. Novel γ -secretase enzyme modulators directly target presenilin protein. *J Biol Chem*, 286(43):37181–6, 2011.
- [452] C.J. Crump, B.A. Fish, S.V. Castro, D.-M. Chau, N. Gertsik, K. Ahn, C. Stiff, N. Pozdnyakov, K.R. Bales, D.S. Johnson, and Y.-M. Li. Piperidine acetic acid based γ -secretase modulators directly bind to Presenilin-1. *ACS Chem Neurosci*, 2(12):705–710, 2011.
- [453] T. Jumpertz, A. Rennhack, J. Ness, S. Baches, C.U. Pietrzik, B. Bulic, and S. Weggen. Presenilin is the molecular target of acidic γ -secretase modulators in living cells. *PLoS One*, 7(1):e30484, 2012.
- [454] A. Capell, R. Saffrich, J.C. Olivo, L. Meyn, J. Walter, J. Grünberg, P. Mathews, R. Nixon, C. Dotti, and C. Haass. Cellular expression and proteolytic processing of presenilin proteins is developmentally regulated during neuronal differentiation. *J Neurochem*, 69(6):2432–40, 1997.
- [455] H. Steiner, H. Romig, M.G. Grim, U. Philipp, B. Pesold, M. Citron, R. Baumeister, and C. Haass. The biological and pathological function of the presenilin-1 Δ exon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J Biol Chem*, 274(12):7615–8, 1999.

- [456] M. Brockhaus, J. Grünberg, S. Röhrig, H. Loetscher, N. Wittenburg, R. Baumeister, H. Jacobsen, and C. Haass. Caspase-mediated cleavage is not required for the activity of presenilins in amyloidogenesis and notch signaling. *Neuroreport*, 9(7):1481–6, 1998.
- [457] J. Walter, J. Grünberg, A. Capell, B. Pesold, A. Schindzielorz, M. Citron, K. Mendla, P. St George-Hyslop, G. Multhaup, D.J. Selkoe, and C. Haass. Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an *in vivo* substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10):5349–54, 1997.
- [458] F. Sanger, S. Nicklen, and A.R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–7, 1977.

IUPAC-Namen der verwendeten Substanzen

Die IUPAC-Namen aller verwendeten Substanzen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Substanz	IUPAC-Name
Eisai (E2212)	(4 <i>R</i> ,9 <i>aS</i> , <i>E</i>)-7-(3-Methoxy-4-(4-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)benzyliden)-4-(3,4,5-trifluorophenyl)hexahydropyrido[2,1- <i>c</i>][1,4]-oxazin-6(1 <i>H</i>)-on
TorreyPines	<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ¹ -Diethyl-4-methyl- <i>N</i> ³ -{4-[4-(4-methyl-imidazol-1-yl)-phenyl]-thiazol-2-yl}-benzen-1,3-diamin
Sulindac Sulfid	2-[6-Fluoro-2-methyl-3-[(4-methylsulfanylphenyl)methyliden]inden-1-yl]acetat
GSM-1	[(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-[(<i>R</i>)-1-(4-Chloro-phenyl)-4-methyl-pentyl]-2-(4-trifluoromethyl-phenyl)-piperidin-4-yl]-acetat

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid- β
Abb.	Abbildung
ADAM	Disintegrin- und Metalloprotease (engl. <i>a disintegrin and metalloproteinase</i>)
AICD	APP intrazelluläre Domäne (engl. <i>APP intracellular domain</i>)
ApoE	Apolipoprotein E
APH-1	engl. <i>anterior pharynx-defective phenotype 1</i>
APLP	Homolog des APP (engl. <i>APP-like protein</i>)
APP	Amyloidvorläuferprotein (engl. <i>amyloid precursor protein</i>)
APP- α CTF	α -C-terminales Fragment des APP, Produkt der Spaltung von APP durch die α -Sekretase
APP- β CTF	β -C-terminales Fragment des APP, Produkt der Spaltung von APP durch die β -Sekretase
APP ^{sw}	schwedische APP-FAD-Mutation
AS	Aminosäure(n)
BACE	β -APP schneidendes Enzym (engl. <i>β-APP cleaving enzyme</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumine</i>)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i>
CD44-CTF	C-terminales Fragment von CD44
CD44 Δ E	CD44-Konstrukt ohne Ektodomäne
CD44-ICD	CD44 intrazelluläre Domäne (engl. <i>CD44 intracellular domain</i>)
COX	Cyclooxygenase
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins oder Peptids
CTF	C-terminales Fragment

DIAN	Netzwerk für die dominant vererbte Alzheimer-Krankheit (engl. <i>Dominantly Inherited Alzheimer Network</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ECL-IA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (engl. <i>SIA, sandwich immunosorbent assay</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZM	extrazelluläre Matrix
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FAD	familiäre Alzheimer-Erkrankung (engl. <i>familial Alzheimer's disease</i>)
FLIM	Fluoreszenzlebensdauer Mikroskopie (engl. <i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i>)
F-NEXT	Flag-markiertes Notch1-Konstrukt ohne Ektodomäne (engl. <i>Flag-tagged Notch1ΔE extracellular truncation</i>)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Erdbeschleunigung ($g \approx 9.81 \text{ m/s}^2$)
ggf.	gegebenenfalls
GSI	γ -Sekretaseinhibitor
GSM	γ -Sekretasemodulator
HEK-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzellen (engl. <i>human embryonic kidney cells</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
IB	Immunoblot
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration; Konzentration eines Inhibitors, bei der 50% der maximalen Inhibition beobachtet wird
ICD	Intrazelluläres Fragment (engl. <i>intracellular domain</i>)
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
MEF	embryonale Mausfibroblasten (engl. <i>embryonic mouse fibroblasts</i>)
MS	Massenspektrometrie
N β	Notch- β
NCT	Nicastrin
NEXT	Notch1 Δ E-Konstrukt ohne Ektodomäne (engl. <i>Notch1 extracellular truncation</i>)
NFT	Neurofibrilläre Bündel (engl. <i>neurofibrillary tangles</i>)
NICD	Notch1 intrazelluläre Domäne (engl. <i>Notch1 intracellular domain</i>)
NMR-Spektroskopie	Kernspinresonanz-Spektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NSAID	nicht-steroidale Entzündungshemmer (engl. <i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>)
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins oder Peptids

NTF	N-terminales Fragment
PBS	phosphat gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PEN-2	presenilin Verstärker Protein 2 (engl. <i>Presenilin enhancer 2</i>)
PS	Presenilin
RT	Raumtemperatur
sAPP α	lösliches APP α -Fragment (engl. <i>soluble APPα</i>)
sAPP β	lösliches APP β -Fragment (engl. <i>soluble APPβ</i>)
sCD44	lösliches CD44-Fragment (engl. <i>soluble CD44</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPE-4	<i>Spermatogenesis defective-4</i>
SPP	Signalpeptidpeptidase
TACE	Tumornekrosefaktor α schneidendes Enzym (engl. <i>tumor necrosis factor-α convertase</i>)
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Units</i> , 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ Substratumsatz unter angegebenen Bedingungen
u.a.	unter anderem
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Danksagung

Herzlichen Dank an Prof. Dr. Harald Steiner der mir durch seine stets engagierte Betreuung eine hervorragende wissenschaftliche Ausbildung neben dem Medizinstudium zuteilwerden ließ. Seine konsequente Unterstützung und die Teilhabe an seiner reichhaltigen wissenschaftlichen Erfahrung trugen maßgeblich zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit bei. Die mir vermittelte exakte Arbeitsweise wird für meinen weiteren beruflichen Werdegang als Arzt von immensem Nutzen sein.

Bei Prof. Dr. Christian Haass bedanke ich mich für die Möglichkeit, meine Dissertation innerhalb seines Instituts durchführen zu können, sowie seine fachliche Unterstützung in den *one-to-one meetings*. Die stets hilfreichen Ratschläge und kritischen Anmerkungen der beiden Mitglieder meines PhD-Komitees, Dr. Anja Capell und Dr. Sven Lammich, trugen ebenfalls zum Fortschritt meiner Arbeit bei. Wertvolle finanzielle Unterstützung erfuhr diese Arbeit durch Prof. Dr. Heesemann im Rahmen des Promotionsstudiengangs Molekulare Medizin.

Herzlicher Dank gilt Dr. Peer-Hendrik Kuhn für die Herstellung der viral transduzierten MEF-Zellen sowie seine zur Verfügung gestellte technische Expertise. Insbesondere bei allen Mitgliedern der γ -Sekretase-Gruppe möchte ich mich für die herzliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Dr. Akio Fukumori hatte durch die Messung der Massenspektren sowie seinem wissenschaftlichen Input erheblichen Anteil an den Veröffentlichungen meiner Arbeit. Dr. Richard Page und Edith Winkler gewährten mir bei technisch-experimentellen Problemen stets ihre Unterstützung, worauf sich die hervorragende Zusammenarbeit im Labor gründete. Dr. Amelie Ebke stand mir bei Problemen jeglicher Art mit Rat und Tat zur Seite und die anregenden, bisweilen hitzigen fachlichen und nicht-fachlichen Diskussionen lockerten selbst von experimentellen Enttäuschungen geprägte Tage im Labor auf. Besonderer Dank gilt Dr. Blanca Pérez-Revuelta und Gabi Basset, die mit großer Geduld und viel heiterem bis schwarzem Humor meine ersten Schritte im Labor begleiteten.

Des Weiteren möchte ich mich noch ausdrücklich bei allen bisher nicht explizit erwähnten Mitarbeitern des Haass-Lehrstuhls für die herzliche Aufnahme sowie die ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein abschließender Dank geht an meine Eltern, deren Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit erst möglich machte.

Lebenslauf

Name	Benedikt Kretner
Geburtsdatum	27. Oktober 1982
Geburtsort	München
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Ausbildung und Berufserfahrung

seit 2007	Dissertation Adolf-Butenandt-Institut, LMU München Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie (Direktor: Prof. Dr. Christian Haass) Betreuer: Prof. Dr. Harald Steiner
2003 - 2011	Studium Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der LMU München
09/2005	1. Staatsexamen Medizin
05/2011	Klinisches Studium der Humanmedizin an der TU München 2. Staatsexamen Medizin
09/2002 - 06/2003	Zivildienst Helmholtz Zentrum München Institut für Bodenökologie
1989 - 2002	Schulische Ausbildung Kurt-Huber-Gymnasium Gräfelfing Grundschule Lochham
2007 - 2009	Stipendium Förderprogramm für Forschung und Lehre der LMU (FöFoLe)

Publikationen

Publikation 1, Seite 77 - 91:

B. Kretner, A. Fukumori, P.-H. Kuhn, B. I. Pérez-Revuelta, S. F. Lichtenthaler, C. Haass, and H. Steiner. Important functional role for APP substrate cleavage specificity and substrate selectivity of γ -secretase. *J Neurochem*, 125(1):144-56, 2013. (mit ergänzender Abbildung)

Publikation 2, Seite 93 - 104:

B. Kretner, A. Fukumori, A. Gutsmedl, R. Page, T. Luebbers, G. Galley, K. Baumann, C. Haass, and H. Steiner. Attenuated $A\beta_{42}$ responses to low potency γ -secretase modulators can be overcome for many pathogenic presenilin mutants by second-generation compounds. *J Biol Chem*, 286(17):15240-51, 2011.

Publikation 1

Important functional role for APP substrate cleavage specificity and substrate selectivity of γ -secretase.

ORIGINAL
ARTICLEImportant functional role of residue x of the presenilin GxGD protease active site motif for APP substrate cleavage specificity and substrate selectivity of γ -secretaseBenedikt Kretner,* Akio Fukumori,* Peer-Hendrik Kuhn,*†
Blanca Isabel Pérez-Revuelta,*‡ Stefan F. Lichtenthaler,*†§¶
Christian Haass*†¶ and Harald Steiner*†

*Adolf-Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

†DZNE, German Center for Neurodegenerative Diseases, Munich, Germany

‡DZNE, German Center for Neurodegenerative Diseases, Bonn, Germany

§Technical University of Munich, Munich, Germany

¶Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy), Munich, Germany

Abstract

γ -Secretase plays a central role in the generation of the Alzheimer disease-causing amyloid β -peptide (A β) from the β -amyloid precursor protein (APP) and is thus a major Alzheimer's disease drug target. As several other γ -secretase substrates including Notch1 and CD44 have crucial signaling functions, an understanding of the mechanism of substrate recognition and cleavage is key for the development of APP selective γ -secretase-targeting drugs. The γ -secretase active site domain in its catalytic subunit presenilin (PS) 1 has been implicated in substrate recognition/docking and cleavage. Highly critical in this process is its GxGD active site motif, whose invariant glycine residues cannot be replaced without causing severe functional losses in substrate selection and/or cleavage efficiency. Here, we have investigated the contribution of the less well characterized residue x of the motif (L383 in PS1) to this function. Extensive mutational analysis showed

that processing of APP was overall well-tolerated over a wide range of hydrophobic and hydrophilic mutations. Interestingly, however, most L383 mutants gave rise to reduced levels of A β _{37–39} species, and several increased the pathogenic A β _{42/43} species. Several of the A β _{42/43}-increasing mutants severely impaired the cleavages of Notch1 and CD44 substrates, which were not affected by any other L383 mutation. Our data thus establish an important, but compared with the glycine residues of the motif, overall less critical functional role for L383. We suggest that L383 and the flanking glycine residues form a spatial arrangement in PS1 that is critical for docking and/or cleavage of different γ -secretase substrates.

Keywords: γ -secretase, Alzheimer's disease, amyloid- β peptide, GxGD-type protease, intramembrane proteolysis, presenilin.

J. Neurochem. (2013) **125**, 144–156.

Read the **Editorial Highlight** for this article on page 1.

Alzheimer disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder affecting the elderly population. AD is characterized by the massive cerebral deposition of the amyloid β -peptide (A β), which is widely believed to be disease-causative (Haass and Selkoe 2007). The small (~ 4 kDa) A β is generated by sequential processing of the β -amyloid precursor protein (APP), a type I membrane protein, by two aspartyl proteases, β - and γ -secretase (Lichtenthaler *et al.* 2011). Both secretases are key AD drug targets (Tomita 2009). In contrast to the type I membrane

Received August 9, 2012; revised manuscript received December 10, 2012; accepted December 10, 2012.

Address correspondence and reprint requests to Harald Steiner, Adolf-Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, and DZNE, German Center for Neurodegenerative Diseases, Schillerstr. 44, 80336 Munich, Germany.

E-mail: harald.steiner@med.uni-muenchen.de.

Abbreviations used: A β , amyloid β -peptide; AD, Alzheimer's disease; AICD, APP intracellular domain; APP, β -amyloid precursor protein; CTF, C-terminal fragment; GSM, γ -secretase modulator; ICD, intracellular domain; NCT, nicastrin; NTF, N-terminal fragment; PS, presenilin; TMD, transmembrane domain.

protease β -secretase, γ -secretase is a more complicated enzyme, comprised of four essential integral membrane protein subunits, which are necessary and sufficient for activity (Steiner *et al.* 2008). The catalytic subunit of the complex is presenilin (PS), an intramembrane-cleaving protease of the GxGD-protease family, which is activated by autoproteolysis into an N- and C-terminal fragment (NTF, CTF) (Steiner 2008). The other subunits nicastrin (NCT), APH-1, and PEN-2 are required for assembly, activation, stabilization, and maturation of the γ -secretase complex (Dries and Yu 2008).

Following ectodomain shedding of APP by β -secretase, γ -secretase cleaves the resulting CTF of APP in the transmembrane domain (TMD) thereby releasing A β species of various length (A β_{37} –A β_{43}), which are subsequently secreted (Lichtenthaler *et al.* 2011). Cleavage of the TMD starts at the ϵ -site close to the cytosolic border releasing the APP intracellular domain and is followed by stepwise carboxy-terminal trimming (Qi-Takahara *et al.* 2005; Takami *et al.* 2009). The resultant A β_{49} is further processed to the secreted A β_{43} , A β_{40} , and A β_{37} species. Imprecise cleavage at the ϵ -site leads to the generation of small amounts of the A β_{48} species from which A β_{42} and A β_{38} are produced. Subtle changes in the ratio of the principal A β_{40} species and its longer pathogenic byproduct A β_{42} towards a relative increase in A β_{42} are sufficient to cause neurotoxicity and ultimately trigger the onset of AD (Kuperstein *et al.* 2010). This disease-underlying principle is reflected by the majority of early onset familial forms of AD that are caused by changes of the A β_{42} /A β_{40} ratio because of mutations in PS1, its homolog PS2, and APP (Scheuner *et al.* 1996). Although A β_{43} is a minor secreted species, which is generated at lower level than A β_{42} , it apparently has a stronger pathogenicity than the latter (Saito *et al.* 2011).

As evident from the processing of numerous other substrates apart from APP, γ -secretase activity is involved in a number of physiological cellular processes besides its central role in AD pathogenesis (Wakabayashi and De Strooper 2008). A primary function of γ -secretase is the degradation of membrane protein stubs, which remain after ectodomain shedding. In several cases, this can be coupled with signal transduction, where the ICD, which is released from the substrate by γ -secretase cleavage, translocates to the nucleus and regulates gene transcription. The most important substrate of γ -secretase of this type is Notch1, a crucial signaling molecule controlling cell differentiation during development as well as in adulthood via its γ -secretase-released Notch1 ICD (NICD) (Bray 2006).

Understanding how γ -secretase recognizes and selects its many substrates is a key issue for the development of drugs that inhibit or modulate A β generation of the enzyme while sparing cleavage of its other substrates (Tomita 2009). In addition, this knowledge is of general interest for understanding the mechanism of intramembrane-cleaving

proteases (Wolfe 2009). Despite some advances, little is still known, however, about γ -secretase substrate recognition. The current model suggests a stepwise process in that the complex first recognizes the ectodomain-shedded substrate before it is presented to the active site where substrate cleavage occurs. NCT has been implicated as substrate receptor in this step, although this role is not firmly established and controversially discussed (Shah *et al.* 2005; Chavéz-Gutiérrez *et al.* 2008; Dries *et al.* 2009; Pamrén *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2012). Whether substrate recognition is mediated by NCT or not, the substrate associates with the docking site, a substrate binding site spatially separated from the active site (Esler *et al.* 2002; Tian *et al.* 2002). This site has been identified in PS very close to and partially overlapping with the active site (Kornilova *et al.* 2005), and may involve TMDs 2, 6, 9 (Sato *et al.* 2008; Gong *et al.* 2010; Watanabe *et al.* 2010). Following binding at the docking site, the substrate comes in contact with the active site aspartates in TMDs 6 and 7, which enable catalysis of peptide bond hydrolysis, by a mechanism involving translocation or swinging of bound substrate into the catalytic site (Tian *et al.* 2002).

Consistent with a spatial proximity of docking and catalytic site (Kornilova *et al.* 2005), the highly conserved non-classical GxGD aspartyl protease family motif in the PS active site domain bearing the catalytic aspartate in TMD7 (Steiner *et al.* 2000) has been implicated in substrate docking/recognition and/or cleavage (Yamasaki *et al.* 2006; Pérez-Revuelta *et al.* 2010; Wu *et al.* 2010). Mutational analysis has revealed that the invariant glycine residues of the GxGD motif are critical for substrate recognition and/or cleavage, probably by ensuring efficient substrate accommodation at the active site. Maximally the very subtle amino acid change from glycine to alanine is functionally tolerated at this position (Steiner *et al.* 2000; Pérez-Revuelta *et al.* 2010). However, depending on the substrate, even this minimal amino acid change can block cleavage (Pérez-Revuelta *et al.* 2010). Similar findings have been made by mutational analyses for the conserved PAL motif (Nakaya *et al.* 2005; Wang *et al.* 2006), which although distant in primary sequence is close to the active site (Sato *et al.* 2008; Tolia *et al.* 2008).

To further our understanding of how the active site domain of γ -secretase contributes to substrate recognition and cleavage, we investigated the functional role of residue x of the GxGD motif in PS1, which is a leucine in almost all PSs. The leucine is replaced, however, by a phenylalanine in the *C. elegans* PS homolog SPE-4 and we recently identified this sequence variation as being critical for APP/Notch substrate selectivity of PS1 γ -secretase (Yamasaki *et al.* 2006). Apart from this initial information, however, the functional role of the leucine residue within the GLGD motif of PS1 has not been investigated yet and it is not known if it is of similar functional importance as the surrounding

invariant glycine residues. In light of limited structural information for the γ -secretase active site, we decided to perform an extensive mutational analysis of the x residue. Our results demonstrate that aliphatic residues are preferred over aromatic, proline and positively charged residues, which strongly impair the cleavage of crucial signaling substrates such as Notch1 and CD44 (Miletti-González *et al.* 2012) without much effect on the efficiency of APP processing. Thus, we show that while L383 contributes to substrate selectivity it is overall the least critical residue of the GxGD motif in PS1. Finally, together with our previous data, we conclude that the spatial side chain arrangement of this motif is highly critical for γ -secretase substrate processing and selectivity/specificity.

Materials and methods

Antibodies

Monoclonal and polyclonal antibodies used were to the PS1 N-terminus (PS1N) (Capell *et al.* 1997), the NCT C-terminus (N1660) (Sigma, St Louis, MO, USA), the APP ectodomain (22C11) (Weidemann *et al.* 1989), and C-terminus (6687) (Steiner *et al.* 2000), A β 1-16 (2D8) (Shirovani *et al.* 2007), A β 17-24 (4G8) (Signet Laboratories, Dedham, MA, USA), A β 1-40 (3552) (Yamasaki *et al.* 2006), the c-myc (9E10) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and the FLAG-epitope (M2) (Sigma). Anti-FLAG M2 antibody agarose conjugate was obtained from Sigma.

cDNA constructs

N-terminally-His₆Xpress (H₆X) epitope-tagged PS1 wt, PS1 D385A, and PS1 L383F cDNA constructs were described before (Steiner *et al.* 2002; Yamasaki *et al.* 2006). PS1 L383 mutants were generated by PCR-mediated mutagenesis of pcDNA4/HisC:PS1, which encodes H₆X-PS1 wt (Steiner *et al.* 2002), using oligonucleotide primers encoding the respective mutations. All cDNA constructs were confirmed by DNA sequencing. For stable expression of wt PS1 and the corresponding mutants in mouse embryonic fibroblast (MEF) cells deficient for PS1 and PS2 (PS^{-/-}), the PS cDNA constructs were subcloned without the H₆X-epitope tag as BamHI/XhoI fragments into FU-ΔZeo vector (Kuhn *et al.* 2010). APPsw-6myc, F-NEXT and CD44ΔE-Flag constructs have been described previously (Lammich *et al.* 2002; Okochi *et al.* 2002; Wang *et al.* 2004).

Cell culture, cell lines, cDNA transfections, and transductions

Human embryonic kidney (HEK) 293 cells stably expressing Swedish mutant APP (HEK293/sw) were cultured and stably transfected with H₆X-tagged PS1 cDNA constructs as described (Steiner *et al.* 2000; Page *et al.* 2008). Pools of stably transfected cells were investigated to avoid clonal variations. Treatment of HEK293 cells with γ -secretase modulator (GSMs) (kind gift of Dr. Karlheinz Baumann) was carried out as described (Page *et al.* 2008). PS^{-/-} MEF cells stably expressing wt and mutant PS1 cDNA constructs were generated by lentiviral gene transduction. Generation of lentiviral particles and administration to PS^{-/-} MEF cells was carried out as described previously (Kuhn *et al.* 2010).

The stably transduced PS^{-/-} MEF cells were cultured and transiently transfected as described (Yamasaki *et al.* 2006).

Protein analysis

PS1, NCT, APP, Notch1, CD44, and/or derivatives, respectively, were analyzed from cell lysates (Page *et al.* 2008) by direct immunoblotting as described (Lammich *et al.* 2002; Yamasaki *et al.* 2006). Total secreted APP_s was analyzed by direct immunoblotting of conditioned media with antibody 22C11. Analysis of total secreted A β and CD44 β was performed as described (Lammich *et al.* 2002; Yamasaki *et al.* 2006; Pérez-Revuelta *et al.* 2010). Mass spectrometry analysis of individual secreted A β species and their quantitation by an A β sandwich immunoassay was carried out as outlined previously (Page *et al.* 2008, 2010). Where indicated, immunoblotted proteins were quantified as described before (Pérez-Revuelta *et al.* 2010).

Statistical analysis

Quantitative data were subjected to statistical analysis by student's *t* test or one way ANOVA with Dunnett's post test using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) software where indicated. Data with *p* values lower than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

A wide range of amino acids at PS1 residue 383 supports APP processing

To investigate the role of the leucine 383 residue of PS1 for γ -secretase activity and substrate selectivity, we generated a variety of mutant PS1 constructs covering almost all possible amino acid substitutions at this site. We first were interested to investigate how these would affect processing of APP and thus stably expressed the L383 mutant constructs in HEK293/sw cells. PS1 wt and catalytically inactive D385A mutant constructs were used as positive and negative controls, respectively. To facilitate analysis, N-terminally-H₆X-epitope-tagged PS1 constructs were used. We first analyzed how aliphatic and aromatic amino acids substitutions at the L383 residue would affect APP processing. As shown in Fig. 1a, all PS L383 mutant constructs replaced endogenous PS and were endoproteolyzed like wt PS1 demonstrating functional γ -secretase complex formation and suggesting that the L383 residue of the GxGD motif is not critical for PS endoproteolysis. This characteristic conversion of PS into an N- and C-terminal fragment is believed to represent an activated state of γ -secretase and – being an autocatalytic process (Edbauer *et al.* 2003; Fukumori *et al.* 2010) – is not observed for the catalytically inactive PS1 D385A mutant (Steiner *et al.* 1999; Wolfe *et al.* 1999).

As judged from the levels of APP CTFs, which are the direct substrates of γ -secretase, processing of APP was overall largely supported as only a few mutations caused substrate accumulation indicative for activity loss (Fig. 1b). The aliphatic mutations did not affect activity, while the

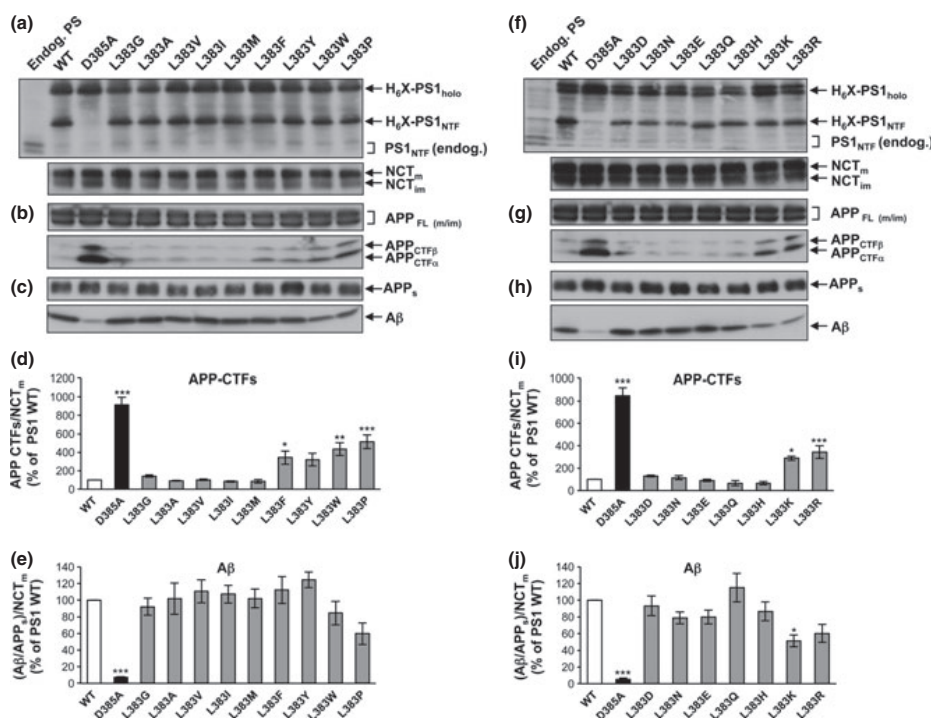


Fig. 1 Presenilin (PS)1 L383 mutations support PS endoproteolysis, but display differential impacts on β -amyloid precursor protein (APP) processing including weak functional loss. (a) HEK293/sw cells stably expressing H₆X-tagged PS1 wt, PS1 D385A and the indicated PS1 L383 hydrophobic mutants were analyzed for expression and endoproteolysis of PS1 as well as for replacement of endogenous PS by immunoblotting of cell lysates with antibody PS1N. Maturation of nicastrin (NCT) was analyzed by immunoblotting with antibody N1660. To assess the level of endogenous PS1 replacement in the H₆X-tagged PS1 transfected cell lines, the parental HEK293/sw cell line (endog. PS) was analyzed in parallel. (b–e) PS1 transfected cell lines described above (a) were analyzed for APP processing. Full length APP and APP C-terminal fragment (CTF)s were analyzed by immunoblotting of cell lysates with antibody 6687 (b). Secreted APP_s and A β were analyzed from conditioned medium by immunoblotting with antibody 22C11 and by combined immunoprecipitation/immunoblotting

with antibodies 3552/2D8, respectively (c). Levels of NCT_m, APP CTFs, secreted APP_s, and A β analyzed as in (a–c), were quantified by measuring their chemiluminescence signal intensities. APP CTFs/NCT_m ratios (d) and (A β /APP_s)/NCT_m ratios (e) were expressed relative to those generated in cells expressing wt PS1 that was set 100%. Bars represent the mean of four independent experiments \pm SE. Asterisks indicate the significance (one way ANOVA with Dunnett's post test) relative to PS1 wt (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001). (f) HEK293/sw cells stably expressing H₆X-tagged PS1 wt, PS1 D385A and the indicated PS1 L383 hydrophilic mutants were analyzed as in (a). (g–j) PS1 transfected cell lines described in (f) were analyzed for APP processing as in (b and c). Quantitations were done as in (d) and (e). In (i) and (j), bars represent the mean of four independent experiments \pm SE. Asterisks indicate the significance (one way ANOVA with Dunnett's post test) relative to PS1 wt (**p* < 0.05, ****p* < 0.001).

aromatic mutations and the proline mutant displayed a partial loss of function. Although the latter mutations caused an increase in APP CTFs, this accumulation of substrate was less pronounced when compared with the PS1 D385A mutant, which displayed a dramatic increase in these substrates. Consistent with the analysis of APP CTFs, the generation of A β was not significantly affected (Fig. 1c). A moderate reduction was only seen for the aromatic residues and proline, while all other mutants generated A β at levels comparable to wt PS1. Quantitation confirmed these results (Fig. 1d and e).

As all above described mutations maintained the hydrophobic nature of the side chain, we next investigated whether charged amino acid substitutions would have a stronger impact on APP processing. As shown in Fig. 1f, these mutants also allowed functional complex formation as judged from their ability to undergo efficient PS endoproteolysis. The negatively charged amino acids as well as their isosteric uncharged analogs did not affect γ -secretase activity (Fig. 1g). Likewise, the positively charged histidine substitution was supporting γ -secretase activity. As judged from the weak accumulation of the APP CTFs, a mild decrease in

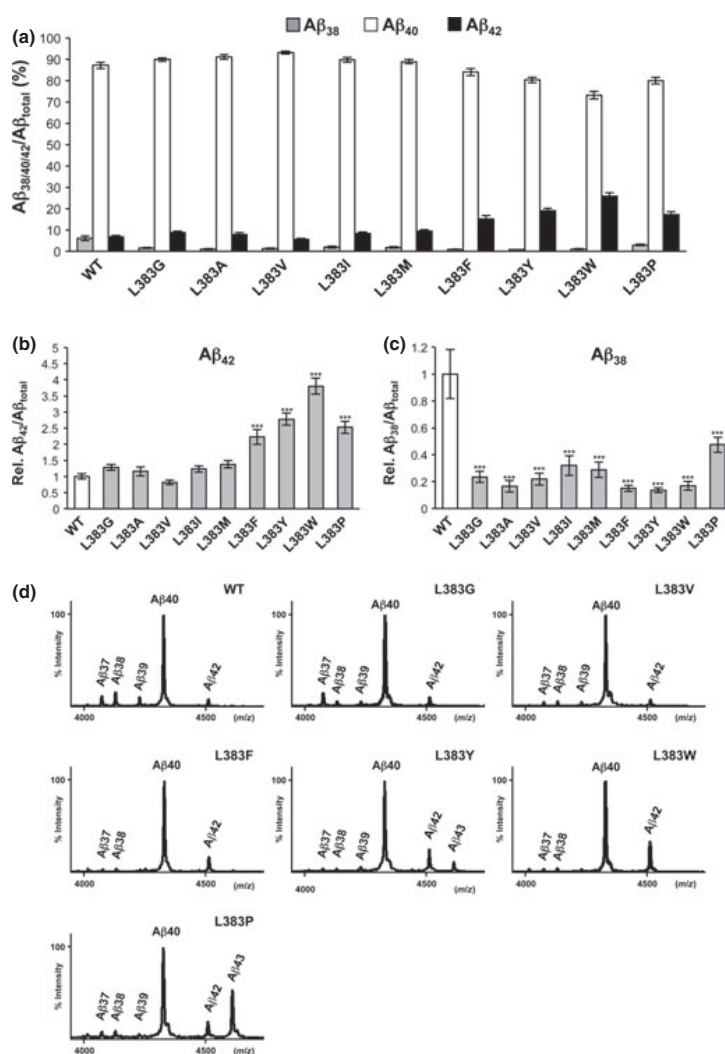


Fig. 2 Hydrophobic mutations of presenilin (PS)1 L383 preferentially lower the generation of short Aβ species and can also increase pathogenic Aβ generation (a) Levels of secreted Aβ₃₈, Aβ₄₀, and Aβ₄₂ species in conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing H₆X-tagged PS1 wt or the indicated PS1 L383 hydrophobic mutants were quantified by a highly specific Aβ sandwich immunoassay and plotted as a percentage of the total Aβ measured. Bars represent the mean of six independent experiments ± SE. (b, c) Data of (a) were plotted such that Aβ₄₂/Aβ_{total} ratios (b) and Aβ₃₈/Aβ_{total} ratios (c) produced by the PS1 L383 mutants were expressed relative to those of PS1 wt that were set 1.00. Asterisks indicate the significance (one way ANOVA with Dunnett's post test) relative to PS1 wt (***) $p < 0.001$. (d) Secreted Aβ in conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing H₆X-tagged PS1 wt or the indicated representative PS1 L383 mutants was immunoprecipitated with antibody 4G8 and subjected to MALDI-TOF mass spectrometry analysis. Note the relative peak changes of individual Aβ species. The spectrum of L383V is representative for the L383A, L383I, and L383M mutants, which show a similar profile of Aβ species.

substrate turnover could, however, be attested for the arginine and lysine substitutions (Fig. 1g). This partial loss of function of these two mutants was also reflected in lower Aβ levels (Fig. 1h). Apart from these exceptions, however, total Aβ levels of the mutants were all very similar to those generated by wt PS1, suggesting that overall, the hydrophilic amino acid substitutions had no substantial impact on γ-secretase activity (Fig. 1h). Quantitation confirmed these results (Fig. 1i and j).

L383 mutants preferentially lower the generation of short Aβ species

We next investigated whether the mutants would change γ-secretase cleavage specificity and if they would potentially cause pathogenic production of longer Aβ species, such as

Aβ₄₂. Using an Aβ immunoassay specific for Aβ₃₈, Aβ₄₀, and Aβ₄₂ (Page *et al.* 2008), differences in the profiles of the Aβ species generated by the hydrophobic mutants compared with wt PS1 were noted (Fig. 2a). In particular, we found that aliphatic amino acid substitutions did not affect the Aβ₄₂/Aβ_{total} ratios, while in contrast, the aromatic amino acids, as well as the L383P mutant showed a mild – moderate increase of Aβ₄₂ generation (Fig. 2b). Interestingly, all mutants substantially decreased the generation of the shorter Aβ species Aβ₃₈ (Fig. 2c). Because we could not detect all Aβ species with our assay, we asked how other Aβ species would be affected by the mutations of L383 and thus additionally analyzed these by mass spectrometry. In addition to confirming the increase in Aβ₄₂ for the aromatic amino acids, this analysis revealed that the L383P mutant

caused an exceptional, very strong increase in the generation of the long $A\beta_{43}$ species, which exceeded that of $A\beta_{42}$. An increase in $A\beta_{43}$ was also noted for the L383Y mutant. Mass spectrometry analysis also showed that nearly all hydrophobic mutants of L383 reduced the levels of the shorter $A\beta$ species $A\beta_{37}$, $A\beta_{38}$, $A\beta_{39}$. Only the L383G mutant still produced $A\beta_{37}$. Fig. 2d illustrates these findings by showing representative examples for each observed mass spectrometry profile of the $A\beta$ species obtained for the mutants. As shown in Fig. 3a, also the hydrophilic amino acid substitutions showed effects on the cleavage specificity of γ -secretase. The negatively charged amino acids aspartate

and glutamate as well as the positively charged amino acid substitutions did mildly increase the generation of $A\beta_{42}$ (Fig. 3b). From the isosteric analogs of aspartate and glutamate, asparagine and glutamine differed in their behavior as only glutamine caused a mild increase in $A\beta_{42}$ generation (Fig. 3b). A decrease in $A\beta_{38}$ was noted as well, but not so pronouncedly as for the hydrophobic mutants, and for the L383N mutant even an increase in $A\beta_{38}$ was observed (Fig. 3c). Mass spectrometry analysis of the mutants was in good agreement with the above measurements of the individual $A\beta$ species. For the L383N mutant, the generation of short $A\beta$ species was increased, in particular that of $A\beta_{37}$,

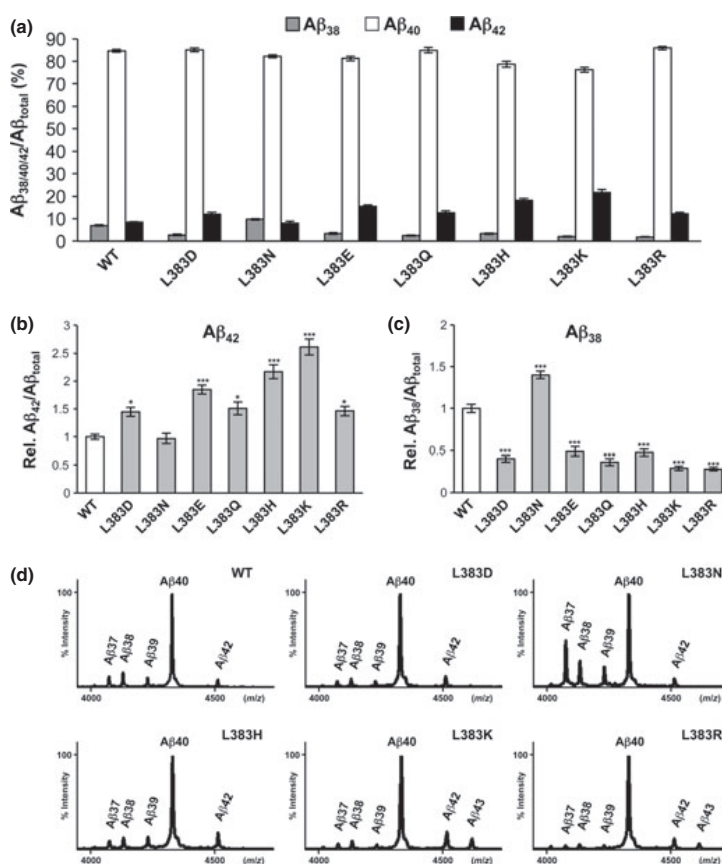


Fig. 3 Hydrophilic mutations of presenilin (PS)1 L383 cause diverse profiles of $A\beta$ species including pathogenic changes of γ -secretase cleavage specificity. (a) Levels of secreted $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$ species in conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing H_6X -tagged PS1 wt or the indicated PS1 L383 hydrophilic mutants were quantified as in Fig. 2a and plotted as a percentage of the total $A\beta$ measured. Bars represent the mean of six independent experiments \pm SE. (b, c) Data of (a) were plotted such that $A\beta_{42}/A\beta_{total}$ ratios (b) and $A\beta_{38}/A\beta_{total}$ ratios (c) produced by the PS1 L383 mutants were expressed relative to those of PS1 wt that were set 1.00. Asterisks

indicate the significance (one way ANOVA with Dunnett's post test) relative to PS1 wt (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). (d) Secreted $A\beta$ in conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing H_6X -tagged PS1 wt or the indicated representative PS1 L383 mutants was subjected to MALDI-TOF mass spectrometry analysis as in Fig. 2d. Note the relative peak changes of individual $A\beta$ species. The spectrum of L383D is representative for the L383E and L383Q mutants, which show a similar profile of $A\beta$ species. Note that the L383N mutant shows a unique $A\beta$ profile with an increased preference for the generation of short $A\beta$ species, most prominently $A\beta_{37}$.

which besides $A\beta_{40}$ became the major species generated. In addition to an increase in $A\beta_{42}$, the positively charged L383K and L383R mutants robustly increased the generation of $A\beta_{43}$. Like above, these findings are illustrated by showing representative examples for each observed mass spectrometry profile of the $A\beta$ species obtained for the mutants (Fig. 3d).

Taken together, we conclude that, unlike the neighboring glycine residues G382 and G384, which are highly critical residues on γ -secretase processing, mutation of L383 of the GxGD motif is considerably tolerable for APP substrate processing. However, most mutants reduced the generation of the short $A\beta_{37-39}$ species indicating a reduced efficiency in the intrinsic carboxy-terminal trimming activity of γ -secretase. Only a subset of the mutants showed a partial loss of function and these changed γ -secretase cleavage specificity toward an elevated generation of the pathogenic $A\beta_{42/43}$ species.

Most $A\beta_{42/43}$ -increasing L383 mutants are resistant to GSMs

The above results indicate conformational changes of γ -secretase induced by the majority of the L383 mutants that may alter APP substrate positioning thus giving rise to the observed changes in the $A\beta$ profiles including increased $A\beta_{42/43}$ productions. Changed PS conformations as a consequence of e.g. $A\beta_{42/43}$ -increasing FAD-associated mutations (Berezovska *et al.* 2005) might also cause an unwanted resistance to GSMs, $A\beta_{42}$ -lowering drugs that from a therapeutic point of view, are expected to be superior to γ -secretase inhibitors, as they do not block γ -secretase activity and thus leave the cleavage of crucial substrates such as Notch1 unaffected (Imbimbo and Giardina 2011). A few PS FAD mutants are locked in a conformation, which render γ -secretase even resistant to the $A\beta_{42}$ -lowering capacity of highly potent second generation GSMs (Page *et al.* 2008; Hahn *et al.* 2011; Kretner *et al.* 2011). Having this in mind, we next investigated whether L383 mutants would be responsive to such GSMs using a representative selection for each amino acid class of the above mutants and including those which showed the strongest pathogenic, i.e. $A\beta_{42/43}$ -increasing activities. As shown in Fig. 4a, only a subset of the L383 mutants showed reduced $A\beta_{42}$ production in response to GSM-1, a frequently used acidic GSM (Page *et al.* 2008; Hahn *et al.* 2011; Kretner *et al.* 2011). The positively charged L383K and R mutants, the aromatic L383F, Y and W mutants, and the L383P mutant were highly resistant to GSM-1. For the latter mutant, GSM-1 also failed to lower the generation of $A\beta_{43}$, the preferentially generated long $A\beta$ species by L383P (data not shown). These mutants showed also a striking resistance to a structurally different non-acidic bridged aromatic GSM with increased potency developed by Eisai (Kretner *et al.* 2011), with the exception of the L383Y mutant, which showed a partial response (Fig. 4c). However, all mutants clearly increased the generation of $A\beta_{38}$ showing that the resistant mutants not

simply failed to be targeted by the GSMs (Fig. 4b and d). We conclude that the generation of $A\beta_{42(43)}$ species cannot efficiently be lowered by advanced GSMs of two different structural classes for most of the pathogenic L383 mutants.

L383 is critical for γ -secretase substrate selectivity

The above results showed that mutation of L383 of the GLGD active site motif of PS1 have overall little impact on total γ -secretase activity toward APP substrate processing. In the next set of experiments, we compared the processing of APP, Notch1, and CD44 in mouse embryonic fibroblast (MEF) cells derived from PS1/2 ($PS^{-/-}$) double knockout mice to further investigate the previously identified substrate selectivity provided by this residue (Yamasaki *et al.* 2006). We first concentrated on the analysis of the aliphatic and aromatic amino acid substitutions, as these keep the hydrophobic nature of the L383 residue and thus represent conservative exchanges at this position. APPsw-6myc (Wang *et al.* 2004), F-NEXT (Okochi *et al.* 2002), and CD44 Δ E-Flag (Lammich *et al.* 2004) substrates were transiently transfected into $PS^{-/-}$ MEF cells stably transduced with the various wt and mutant PS1 constructs. To assess γ -secretase activity on APP and Notch1 substrate cleavage, formation of APP intracellular domain and NICD was analyzed. Because of the difficulty to detect the ICD of CD44, the $A\beta$ -like CD44 β peptide was analyzed for this substrate, given the ease of its analysis (Pérez-Revuelta *et al.* 2010). Processing of APP was in line with the results obtained in the stably transfected HEK293 cells above and confirmed that the aromatic amino acid substitutions maintained γ -secretase activity substantially, although they were lower in their activity than their aliphatic counterparts (Fig. 5a). Consistent with our previous findings (Yamasaki *et al.* 2006), processing of Notch1 was strongly impaired by the PS1 L383F mutant (Fig. 5b). The other aromatic amino acid substitutions PS1 L383Y and L383W as well as the L383P mutant behaved like the L383F mutant and displayed a similar severe impairment of Notch1 substrate processing. In contrast, the aliphatic amino acid substitutions supported normal γ -secretase activity on this substrate (Fig. 5b). Additional analysis using a NICD-specific antibody confirmed these results (Figure S1a, b). As shown in Fig. 5c, the same profile was observed for processing of CD44. For this substrate the aromatic acids and proline caused a nearly complete block of substrate cleavage. Quantitation confirmed the differential effects imposed by the aromatic amino acid substitutions of L383 on APP, Notch1, and CD44 and substrate processing (Fig. 5d). We conclude that the L383 residue of the active site of PS1 is critical for γ -secretase substrate selectivity.

We next analyzed the hydrophilic substitutions in the same experimental paradigm. In agreement with the results obtained above in HEK293 cells, all mutants except the positively charged L383K and L383R mutants, which

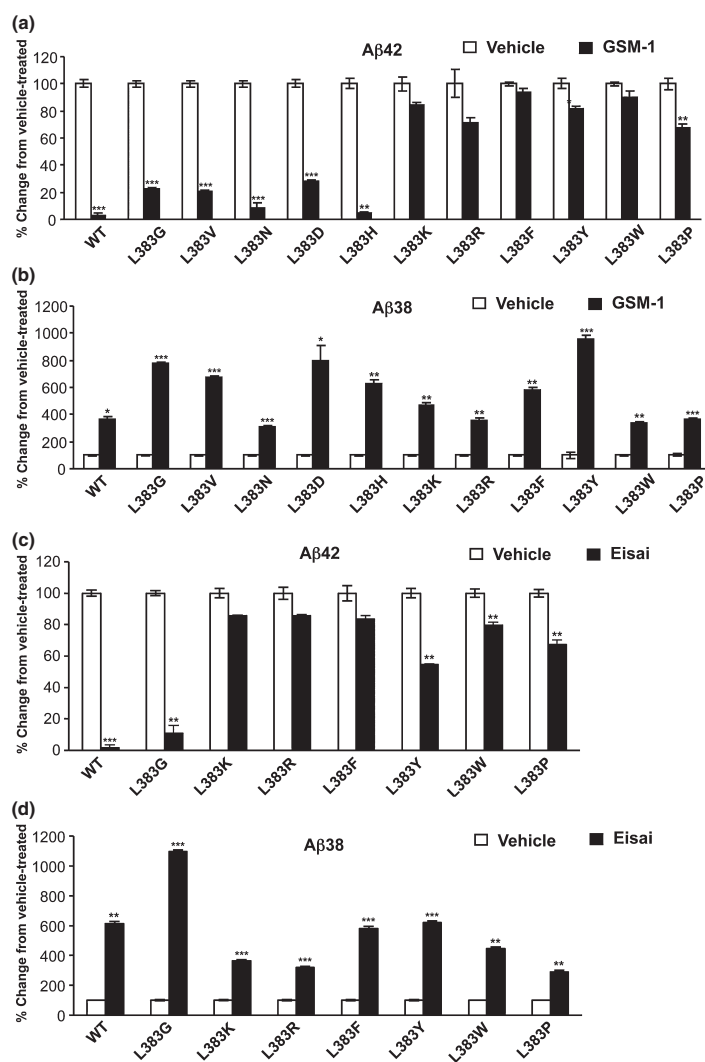


Fig. 4 Presenilin (PS)1 L383 mutants show differential A β_{42} responses to γ -secretase modulator (GSM)s. (a–d) Conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing wt PS1 or the indicated PS1 L383 mutants treated with GSM-1 (1 μ M) (a, b), Eisai compound (1 μ M) (c, d) or vehicle control (DMSO) were analyzed by sandwich immunoassay for the levels of A β_{42} , A β_{38} , and A β_{40} . Changes in the ratios of long A β_{42} (a, c) and short A β_{38} (b, d) species to total A β (i.e. the sum of A β_{38} , A β_{40} , and A β_{42}) are shown as percentage of those obtained for vehicle-treated cells, which were set to 100%. Bars represent the mean of three independent experiments \pm SE. Asterisks indicate the significance (two-tailed unpaired Student's *t* test) of the GSM responses relative to vehicle control (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

displayed a partial loss of function, supported the processing of APP (Fig. 6a). All hydrophilic mutants supported the processing of Notch1 (Fig. 6b), and CD44 (Fig. 6c) except the L383K and L383R mutants, which almost completely inhibited the cleavage of these substrates. Quantitation, as well as validation of the Notch1 processing data using a NICD-specific antibody (Figure S1c, d) confirmed these results (Fig. 6d).

Taken together, these data show that L383 residue tolerates a number of amino acid substitutions without loss of γ -secretase activity. Only a subset of the mutants, i.e. the aromatic mutants, the proline mutant and the positively charged lysine and arginine mutants strongly inhibit substrate cleavage of at least two substrates, Notch1 and CD44.

In contrast, the same mutations affect APP processing to a much lesser extent. We conclude that while providing γ -secretase substrate selectivity, residue x is also the least critical residue of the GxGD motif in PS1.

Discussion

Several studies have implicated the active site domain of γ -secretase in PS1 in both substrate recognition and cleavage, with the residues N-terminal to the TMD7 active site probably providing subsites, i.e. substrate-binding pockets (Schechter and Berger 1967), of the protease (Yamasaki *et al.* 2006; Pérez-Revuelta *et al.* 2010). The invariant glycine residues of the GxGD motif have been shown to

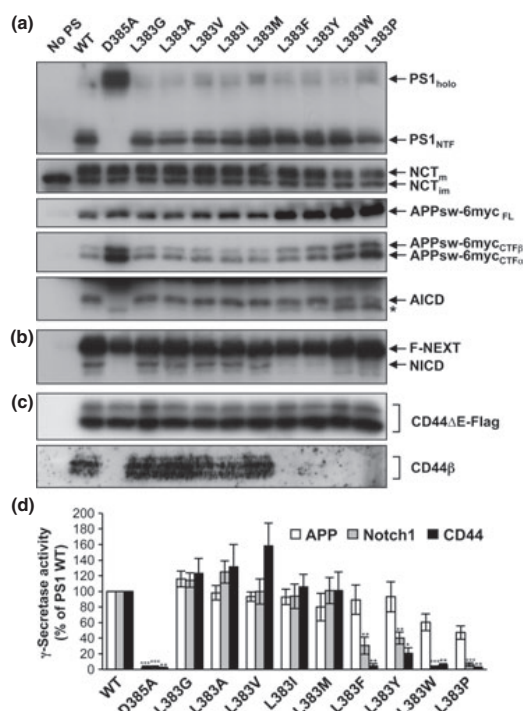


Fig. 5 Hydrophobic mutations of L383 differentially affect γ -secretase substrate processing. (a) PS^{-/-} MEF cells stably transduced with wt presenilin (PS)1 or the indicated PS1 L383 hydrophobic mutants were transiently transfected with β -amyloid precursor protein (APP)sw-6myc. Expression and endoproteolysis of PS1 was analyzed by immunoblotting of cell lysates with antibody PS1N and maturation of nicastrin (NCT) by immunoblotting with antibody N1660. Expression and processing of APP was analyzed by immunoblotting of APP FL, APP CTFs and APP intracellular domain (AICD) with anti-myc antibody 9E10. The asterisk denotes an unspecific band most likely resulting from a γ -secretase-independent degradation of accumulated APP CTFs. (b) Stably transduced PS^{-/-} MEF cells were transiently transfected with F-NEXT. Expression and processing of F-NEXT was analyzed by immunoblotting with anti-myc antibody 9E10. (c) Stably transduced PS^{-/-} MEF cells were transiently transfected with CD44 Δ E-Flag. Expression of CD44 Δ E-Flag was analyzed by immunoblotting with anti-myc antibody 9E10. Note that the CD44 ICD cannot be detected by direct immunoblotting. CD44 β levels were analyzed from conditioned media by combined immunoprecipitation/immunoblotting with anti-FLAG-M2 antibody. (d) Levels of the APP, Notch1, and CD44 cleavage products AICD, Notch1 ICD (NICD), and CD44 β , respectively, were analyzed as in (a-c), respectively, and the intensities of their immunoblot signals were quantified by measuring their chemiluminescence signal intensities. These were normalized to the levels of NCT_m (analyzed as in (a) and quantified by measuring its chemiluminescence signal intensities) and expressed relative to those generated in cells expressing wt PS1 that was set 100%. Bars represent the mean of four (AICD and CD44 β) or five (NICD) independent experiments \pm SE. Asterisks indicate the significance (one way ANOVA with Dunnett's post test) relative to PS1 wt (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

be highly critical for substrate processing (Steiner *et al.* 2000; Pérez-Revuelta *et al.* 2010). In this study, we have in detail investigated the role of the x position of the GxGD motif of the active site domain of γ -secretase in PS1. By domain exchange experiments between PS1 and its *C. elegans* homolog SPE-4 we had previously mapped L383 as an APP/Notch substrate selectivity-providing residue (Yamasaki *et al.* 2006). To further define the functional role of this leucine residue, we were interested to investigate how mutations of it and thus of residue x of the GxGD motif, affect PS endoproteolysis and γ -secretase substrate processing, how they affect γ -secretase cleavage specificity of APP, how they influence substrate selectivity of γ -secretase and finally, whether the spatial side chain arrangement (i.e. small-big-small) of the GLGD motif is critical for γ -secretase activity.

Overall, we found that L383 is the least critical residue of the GxGD protease active site motif of PS1. Residue x is less sensitive to mutation and more permissive than the glycine residues with respect to PS endoproteolysis and γ -secretase substrate processing. We found that aromatic residues are interfering with Notch1 and CD44 processing, whereas they are relatively well-tolerated for APP. The presence of aliphatic acid residues at position x such as leucine in the wt case represents a critical determinant for processing of substrates such as Notch1 and CD44. Thus, we confirm and extend our previous findings that γ -secretase substrate selectivity depends on the side chain at residue x of the GxGD active site motif (Yamasaki *et al.* 2006). Similar to the situation with the G382 and G384 mutants, Notch1 and CD44 are substrates, which are critical to alteration of these key residues of the active site domain (Pérez-Revuelta *et al.* 2010). In contrast with mutation of the glycine residues, however, a number of L383 alterations for which Notch1 and CD44 are already severely affected are still tolerable for APP. Aromatic residues cause a weak loss of function on APP processing while other substrates such as Notch1 and CD44 are much more sensitive. This suggests that in contrast with the latter substrates, APP might be conformationally more flexible, such that its residues coming in contact with the γ -secretase active site domain may more stably interact with the subsites of the protease. Despite the only mild impact of the L383 mutations on the generation of total A β , robustly increased A β ₄₂₍₄₃₎/A β _{total} ratios were observed for the substitution of L383 with aromatic amino acids, proline, and positively charged amino acids. Thus, some of the mutants, which displayed a weak loss of function, also affected the cleavage specificity of γ -secretase and increased the generation of A β ₄₂ or A β ₄₃, respectively. Almost all mutations showed reduced amounts of the short A β species A β ₃₇–A β ₃₉ compared with wt PS1. Thus, compared with wt, L383 mutants affect APP substrate positioning such that the γ -37, γ -38, and γ -39 sites are less exposed to the active site. One of the mutations (L383N) was, however, exceptional in

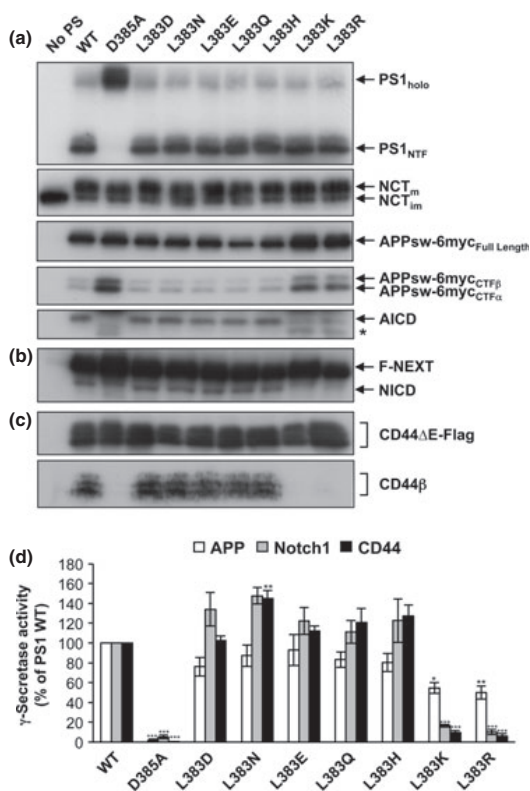


Fig. 6 Hydrophilic mutations of L383 differentially affect γ -secretase substrate processing. (a) PS^{-/-} MEF stably transduced with wt presenilin (PS)1 or the indicated PS1 L383 hydrophilic mutants were transiently transfected with β -amyloid precursor protein (APP)^{sw-6myc}. Expression and endoproteolysis of PS1, maturation of nicastrin (NCT), as well as expression and processing of APP was analyzed by immunoblotting of cell lysates as in Fig. 5a. The asterisk denotes an unspecific band most likely resulting from a γ -secretase-independent degradation of accumulated APP CTFs. (b) Stably transduced PS^{-/-} MEF were transiently transfected with F-NEXT. Expression and processing of F-NEXT was analyzed by immunoblotting as in Fig. 5b. (c) Stably transduced PS^{-/-} MEF cells were transiently transfected with CD44 Δ E-Flag. Expression and processing of CD44 Δ E-Flag was analyzed as in Fig. 5c. (d) Levels of the APP, Notch1 and CD44 cleavage products APP intracellular domain (AICD), Notch1 ICD (NICD), and CD44 β , respectively, were analyzed as in Fig. 5a–c, respectively, and the intensities of their immunoblot signals were quantified by measuring their chemiluminescence signal intensities. These were normalized to the levels of NCT_m (analyzed as in Fig. 5a and quantified by measuring its chemiluminescence signal intensities) and expressed relative to those generated in cells expressing wt PS1 that was set 100%. Bars represent the mean of four (AICD and NICD) or three (CD44 β) independent experiments \pm SE. Asterisks indicate the significance (one way ANOVA with Dunnett's post test) relative to PS1 wt (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

that regard and displayed an increase in the generation of short A β species, in particular of A β ₃₇. Collectively, these observations suggest that most of the L383 mutants reduce carboxy-terminal trimming of the APP TMD, i.e. the processivity of γ -secretase. The impaired generation of short A β species is, however, not a strict consequence of reduced γ -secretase processivity and premature release of longer A β species as recently suggested (Chavéz-Gutiérrez *et al.* 2012), as an concomitant accumulation of longer A β _{42/43} species was observed only for some of the L383 mutants. Interestingly, although total γ -secretase activity and processivity are not necessarily coupled (Moehlmann *et al.* 2002; Quintero-Monzon *et al.* 2011; Chavéz-Gutiérrez *et al.* 2012), it is striking that most of the mutants which showed a weak-moderate loss of function in APP processing and increased the generation of A β _{42/43} were also resistant to GSMS, and were those mutations, which displayed strong loss of function effects on Notch1 and CD44 processing (see Table 1 for a summary).

The evolutionary basis for the highly conserved presence of aliphatic amino acids at the x position of the GxGD motif in PS is likely that only these amino acids allow efficient processing of γ -secretase substrates other than the overall very robust substrate APP. From the hydrophobic amino acids analyzed, aromatic amino acids and proline at this site are not supported and/or preferred by all substrates. This feature provides some selectivity in γ -secretase substrate processing and may contribute to the fact that not all type I membrane proteins, which are potential substrates are processed by γ -secretase (Hemming *et al.* 2008). Apparently, a certain side chain arrangement that in approximation can be defined as G- π / ψ / ζ -G-D (π = small side chain amino acid, ψ = aliphatic amino acid, ζ = hydrophilic amino acid) is critical for γ -secretase substrate processing and selectivity. Exceptions are the positively charged amino acid substitutions lysine and arginine, as well as proline, which support APP processing only partially and besides A β ₄₂ also increase the generation of the longer species A β ₄₃. The side chain length *per se* of the amino acids at L383 residue does not play a similar important role compared with the strict requirement for short side chains at the neighboring G382 and G384 residues (Pérez-Revuelta *et al.* 2010).

Interestingly, consistent with the GxGD motif providing substrate selectivity, the GxG sequence has recently been suggested to represent a putative nucleotide-binding site in γ -secretase, which may be the target of novel Notch-sparing γ -secretase inhibitors (Wu *et al.* 2010). Structurally, the motif is part of an unstructured flexible loop (Sato *et al.* 2006; Sobhanifar *et al.* 2010), which has also been found for the PS-related archaeal GxGD protease FlaK, for which crystal structure information has recently been obtained (Hu *et al.* 2011). In PS1, L383 likely faces away from the both flanking glycine residues (Wu *et al.* 2010) forming a spatial

Table 1 Summary of the activities of PS1 L383 mutants and their responses to GSMs

Presenilin 1	γ -Secretase Activity			A β Species Change from WT						A β_{42} Response to	
	APP	Notch1	CD44	A β_{37}^b	A β_{38}^a	A β_{39}^b	A β_{40}^a	A β_{42}^a	A β_{43}^b	GSM-1	Eisai
WT	+	+	+							++	++
L383G	+	+	+	–	↓↓	↓	–	–	↑	++	++
L383A	+	+	+	↓	↓↓	↓	–	–	↑	N.D.	N.D.
L383V	+	+	+	↓	↓↓	↓	–	–	↑	+	N.D.
L383I	+	+	+	↓	↓↓	↓	–	–	↑	N.D.	N.D.
L383M	+	+	+	↓	↓↓	↓	–	–	↑	N.D.	N.D.
L383F	+	↓↓	↓↓↓	↓	↓↓	↓	–	↑	↑	–	–
L383Y	+	↓↓	↓↓↓	↓	↓↓	↓	–	↑↑	↑	–	+/-
L383W	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓↓	↓	–	↑↑↑	–	–	–
L383P	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓	↓	–	↑↑	↑ ^d	+/-	+/-
L383D	+	+	+	↓	↓↓	↓	–	–	↑	+	N.D.
L383N	+	+	+	↑ ^c	↑	↑	–	–	↑	++	N.D.
L383E	+	+	+	↓	↓↓	↓	–	↑	↑	N.D.	N.D.
L383Q	+	+	+	↓	↓↓	↓	–	↑	↑	N.D.	N.D.
L383H	+	+	+	↓	↓↓	–	–	↑	↑	++	N.D.
L383K	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓↓	↓	–	↑↑	↑	–	–
L383R	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓↓	↓	–	↑	↑	+/-	–

γ -Secretase activities of PS1 L383 mutants for APP, Notch1 and CD44 processing relative to that of PS1 WT (set to 100%) as determined by generation of AICD, NICD, and CD44 β respectively, are indicated (+, robust activity, > 75%; ↓, reduced activity, > 50–75%; ↓↓, only weak activity, 25–50%; ↓↓↓, almost no activity, < 25%).

Changes in the cleavage specificity of γ -secretase were determined with regard to the different secreted A β species.

^aThe relative change in the A β_{38} , A β_{40} , or A β_{42} to A β_{total} ratio as measured by A β immunoassay for each mutant compared with PS1 WT is indicated by arrows (for the A β_{38} /A β_{total} and A β_{40} /A β_{total} ratio: ↓↓, < 0.5-fold; ↓, 0.5–0.75-fold decrease; ↑, > 1.25-fold increase; for the A β_{42} /A β_{total} ratio: ↑, = 1.5–2.5-fold; ↑↑, > 2.5–3.5-fold; ↑↑↑, > 3.5-fold increase; –, no change).

^bA β_{37} , A β_{39} , and A β_{43} were determined by mass spectrometry, arrows reflect qualitative changes compared with PS1 WT (↓, reduced peak; ↑, increased peak; ↑, only a very small peak was observed; –, no change).

^cA β_{37} was the major short A β species for PS1 L383N.

^dA β_{43} was the major pathogenic species for PS1 L383P.

Additionally, the relative levels of the A β_{42} /A β_{total} ratios in response to treatment with GSM-1 and the Eisai compound (each 1 μ M) compared with vehicle control are indicated (++ = 0–25%; +, > 25–50%; +/-, > 50–75%; –, > 75%). N.D. not determined.

arrangement that is critical for docking and/or cleavage of different γ -secretase substrates.

In conclusion, by determining the sequence requirements at residue L383 of PS1 for three critical γ -secretase substrates, our study complements previous mutational analyses of the GxGD active site motif in PS1 such that the side chains for substrate selectivity and cleavage efficiency provided by this critical motif are now fairly well defined for all three residues of the GxG sequence. Further major insights into the structure of the γ -secretase active site domain in PS and the mechanism of substrate selection and cleavage are awaited from a crystal structure, as it will come available.

Acknowledgements

We thank Bart De Strooper for PS1^{-/-} MEF cells; Ralph Nixon for monoclonal antibody PS1N; Alison Goate, Masayasu Okochi, and Sven Lammich for the APPsw-6myc; F-NEXT and CD44 Δ E constructs, respectively; and Karlheinz Baumann for GSMs. This

work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB596) (C.H., H.S.), the BMBF (KNDD) (C.H., H.S., S.F.L.), the FöFoLe program of the Ludwig-Maximilians-University (LMU) Munich (B.K., H.S.), and the Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM). The LMUexcellent program supports C.H. with a research professorship. The authors declare that they do not have conflicts of interest to disclose.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Figure S1. Analysis of Notch1 processing using a NICD-specific antibody.

References

- Berezovska O., Lleo A., Herl L. D., Froesch M. P., Stern E. A., Bacskai B. J. and Hyman B. T. (2005) Familial Alzheimer's disease presenilin 1 mutations cause alterations in the conformation of

- presenilin and interactions with amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* **25**, 3009–3017.
- Bray S. J. (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 678–689.
- Capell A., Saffrich R., Olivo J. C., Meyn L., Walter J., Grunberg J., Mathews P., Nixon R., Dotti C. and Haass C. (1997) Cellular expression and proteolytic processing of presenilin proteins is developmentally regulated during neuronal differentiation. *J. Neurochem.* **69**, 2432–2440.
- Chavéz-Gutiérrez L., Tolia A., Maes E., Li T., Wong P. C. and de Strooper B. (2008) Glu332 in the nicastrin ectodomain is essential for γ -secretase complex maturation but not for its activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 20096–20105.
- Chavéz-Gutiérrez L., Bammens L., Benilova I. *et al.* (2012) The mechanism of γ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J.* **31**, 2261–2274.
- Dries D. R. and Yu G. (2008) Assembly, maturation, and trafficking of the γ -secretase complex in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **5**, 132–146.
- Dries D. R., Shah S., Han Y. H., Yu C., Yu S., Shearman M. S. and Yu G. (2009) Glu-333 of nicastrin directly participates in γ -secretase activity. *J. Biol. Chem.* **284**, 29714–29724.
- Edbauer D., Winkler E., Regula J. T., Pesold B., Steiner H. and Haass C. (2003) Reconstitution of γ -secretase activity. *Nat. Cell Biol.* **5**, 486–488.
- Esler W. P., Kimberly W. T., Ostaszewski B. L., Ye W., Diehl T. S., Selkoe D. J. and Wolfe M. S. (2002) Activity-dependent isolation of the presenilin- γ -secretase complex reveals nicastrin and a γ substrate. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 2720–2725.
- Fukumori A., Fluhrer R., Steiner H. and Haass C. (2010) Three-amino acid spacing of presenilin endoproteolysis suggests a general stepwise cleavage of γ -secretase-mediated intramembrane proteolysis. *J. Neurosci.* **30**, 7853–7862.
- Gong P., Vetrivel K. S., Nguyen P. D., Meckler X., Cheng H., Kounnas M. Z., Wagner S. L., Parent A. T. and Thinakaran G. (2010) Mutation analysis of the presenilin 1 N-terminal domain reveals a broad spectrum of γ -secretase activity toward amyloid precursor protein and other substrates. *J. Biol. Chem.* **285**, 38042–38052.
- Haass C. and Selkoe D. J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 101–112.
- Hahn S., Bruning T., Ness J., Czir E., Baches S., Gijzen H., Korth C., Pietrzik C. U., Bulic B. and Weggen S. (2011) Presenilin-1 but not amyloid precursor protein mutations present in mouse models of Alzheimer's disease attenuate the response of cultured cells to γ -secretase modulators regardless of their potency and structure. *J. Neurochem.* **116**, 385–395.
- Hemming M. L., Elias J. E., Gygi S. P. and Selkoe D. J. (2008) Proteomic profiling of γ -secretase substrates and mapping of substrate requirements. *PLoS Biol.* **6**, e257.
- Hu J., Xue Y., Lee S. and Ha Y. (2011) The crystal structure of GXGD membrane protease FlaK. *Nature* **475**, 528–531.
- Imbimbo B. P. and Giardina G. A. (2011) γ -Secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: disappointments and hopes. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 1555–1570.
- Kornilova A. Y., Bihel F., Das C. and Wolfe M. S. (2005) The initial substrate-binding site of γ -secretase is located on presenilin near the active site. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 3230–3235.
- Kretner B., Fukumori A., Gutsmiedl A., Page R. M., Luebberts T., Galley G., Baumann K., Haass C. and Steiner H. (2011) Attenuated A β 42 responses to low potency γ -secretase modulators can be overcome for many pathogenic presenilin mutants by second-generation compounds. *J. Biol. Chem.* **286**, 15240–15251.
- Kuhn P. H., Wang H., Dislich B., Colombo A., Zeitschel U., Ellwart J. W., Kremmer E., Rossner S. and Lichtenthaler S. F. (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* **29**, 3020–3032.
- Kuperstein I., Broersen K., Benilova I. *et al.* (2010) Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β 42 to A β 40 ratio. *EMBO J.* **29**, 3408–3420.
- Lammich S., Okochi M., Takeda M., Kaether C., Capell A., Zimmer A. K., Edbauer D., Walter J., Steiner H. and 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**, 44754–44759.
- Lammich S., Schobel S., Zimmer A. K., Lichtenthaler S. F. and Haass C. (2004) Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region. *EMBO Rep.* **5**, 620–625.
- Lichtenthaler S. F., Haass C. and Steiner H. (2011) Regulated intramembrane proteolysis – lessons from amyloid precursor protein processing. *J. Neurochem.* **117**, 779–796.
- Miletti-González K. E., Murphy K., Kumaran M. N. *et al.* (2012) Identification of Function for CD44 Intracytoplasmic Domain (CD44-ICD): modulation of matrix metalloproteinase 9 (mmp-9) transcription via novel promoter response element. *J. Biol. Chem.* **287**, 18995–19007.
- Moehlmann T., Winkler E., Xia X. *et al.* (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**, 8025–8030.
- Nakaya Y., Yamane T., Shiraiishi H. *et al.* (2005) Random mutagenesis of presenilin-1 identifies novel mutants exclusively generating long amyloid β -peptides. *J. Biol. Chem.* **280**, 19070–19077.
- Okochi M., Steiner H., Fukumori A., Tani H., Tomita T., Tanaka T., Iwatsubo T., Kudo T., Takeda M. and Haass C. (2002) Presenilins mediate a dual intramembraneous γ -secretase cleavage of Notch-1. *EMBO J.* **21**, 5408–5416.
- Page R. M., Baumann K., Tomioka M. *et al.* (2008) Generation of A β 38 and A β 42 is independently and differentially affected by FAD-associated presenilin 1 mutations and γ -secretase modulation. *J. Biol. Chem.* **283**, 677–683.
- Page R. M., Gutsmiedl A., Fukumori A., Winkler E., Haass C. and Steiner H. (2010) β -Amyloid precursor protein mutants respond to γ -secretase modulators. *J. Biol. Chem.* **285**, 17798–17810.
- Pamrén A., Wanngren J., Tjernberg L. O., Winblad B., Bhat R., Naslund J. and Karlström H. (2011) Mutations in nicastrin protein differentially affect amyloid β -peptide production and Notch protein processing. *J. Biol. Chem.* **286**, 31153–31158.
- Pérez-Revuelta B. I., Fukumori A., Lammich S., Yamasaki A., Haass C. and Steiner H. (2010) Requirement for small side chain residues within the GxGD-motif of presenilin for γ -secretase substrate cleavage. *J. Neurochem.* **112**, 940–950.
- Qi-Takahara Y., Morishima-Kawashima M., Tanimura Y. *et al.* (2005) Longer forms of amyloid β protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by γ -secretase. *J. Neurosci.* **25**, 436–445.
- Quintero-Monzon O., Martin M. M., Fernandez M. A., Cappello C. A., Krzysiak A. J., Osenkowski P. and Wolfe M. S. (2011) Dissociation between the processivity and total activity of γ -secretase: implications for the mechanism of Alzheimer's disease-causing presenilin mutations. *Biochemistry* **50**, 9023–9035.
- Saito T., Suemoto T., Brouwers N. *et al.* (2011) Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43. *Nat. Neurosci.* **14**, 1023–1032.
- Sato C., Morohashi Y., Tomita T. and Iwatsubo T. (2006) Structure of the catalytic pore of γ -secretase probed by the accessibility of substituted cysteines. *J. Neurosci.* **26**, 12081–12088.

- Sato C., Takagi S., Tomita T. and Iwatsubo T. (2008) The C-terminal PAL motif and transmembrane domain 9 of presenilin 1 are involved in the formation of the catalytic pore of the γ -secretase. *J. Neurosci.* **28**, 6264–6271.
- Schechter I. and Berger A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157–162.
- Scheuner D., Eckman C., Jensen M. *et al.* (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**, 864–870.
- Shah S., Lee S. F., Tabuchi K., Hao Y. H., Yu C., Laplant Q., Ball H., Dann C. E. 3rd, Sudhof T. and Yu G. (2005) Nicastrin functions as a γ -secretase-substrate receptor. *Cell* **122**, 435–447.
- Shirotani K., Tomioka M., Kremmer E., Haass C. and Steiner H. (2007) Pathological activity of familial Alzheimer's disease-associated mutant presenilin can be executed by six different γ -secretase complexes. *Neurobiol. Dis.* **27**, 102–107.
- Sobhanifar S., Schneider B., Lohr F. *et al.* (2010) Structural investigation of the C-terminal catalytic fragment of presenilin 1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 9644–9649.
- Steiner H. (2008) The catalytic core of γ -secretase: presenilin revisited. *Curr. Alzheimer Res.* **5**, 147–157.
- Steiner H., Duff K., Capell A. *et al.* (1999) A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid β -peptide production and Notch signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 28669–28673.
- Steiner H., Kostka M., Romig H. *et al.* (2000) Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in polytopic bacterial aspartyl proteases. *Nat. Cell Biol.* **2**, 848–851.
- Steiner H., Winkler E., Edbauer D., Prokop S., Basset G., Yamasaki A., Kostka M. and Haass C. (2002) PEN-2 is an integral component of the γ -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J. Biol. Chem.* **277**, 39062–39065.
- Steiner H., Fluhrer R. and Haass C. (2008) Intramembrane proteolysis by γ -secretase. *J. Biol. Chem.* **283**, 29627–29631.
- Takami M., Nagashima Y., Sano Y., Ishihara S., Morishima-Kawashima M., Funamoto S. and Ihara Y. (2009) γ -Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of β -carboxyl terminal fragment. *J. Neurosci.* **29**, 13042–13052.
- Tian G., Sobotka-Briner C. D., Zysk J., Liu X., Birr C., Sylvester M. A., Edwards P. D., Scott C. D. and Greenberg B. D. (2002) Linear non-competitive inhibition of solubilized human γ -secretase by pepstatin A methylester, L685458, sulfonamides, and benzodiazepines. *J. Biol. Chem.* **277**, 31499–31505.
- Toia A., Horre K. and De Strooper B. (2008) Transmembrane domain 9 of presenilin determines the dynamic conformation of the catalytic site of γ -secretase. *J. Biol. Chem.* **283**, 19793–19803.
- Tomita T. (2009) Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease treatment. *Expert Rev. Neurother.* **9**, 661–679.
- Wakabayashi T. and De Strooper B. (2008) Presenilins: members of the γ -secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiology* **23**, 194–204.
- Wang J., Brunkan A. L., Hecimovic S., Walker E. and Goate A. (2004) Conserved "PAL" sequence in presenilins is essential for γ -secretase activity, but not required for formation or stabilization of γ -secretase complexes. *Neurobiol. Dis.* **15**, 654–666.
- Wang J., Behr D., Nyborg A. C., Shearman M. S., Golde T. E. and Goate A. (2006) C-terminal PAL motif of presenilin and presenilin homologues required for normal active site conformation. *J. Neurochem.* **96**, 218–227.
- Watanabe N., Image I., II, Takagi S., Tominaga A., Image Image I., Tomita T. and Iwatsubo T. (2010) Functional analysis of the transmembrane domains of presenilin 1: participation of transmembrane domains 2 and 6 in the formation of initial substrate-binding site of γ -secretase. *J. Biol. Chem.* **285**, 19738–19746.
- Weidemann A., Konig G., Bunke D., Fischer P., Salbaum J. M., Masters C. L. and Beyreuther K. (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* **57**, 115–126.
- Wolfe M. S. (2009) Intramembrane-cleaving proteases. *J. Biol. Chem.* **284**, 13969–13973.
- Wolfe M. S., Xia W., Ostaszewski B. L., Diehl T. S., Kimberly W. T. and Selkoe D. J. (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature* **398**, 513–517.
- Wu F., Schweizer C., Rudinskiy N., Taylor D. M., Kazantsev A., Luthi-Carter R. and Fraering P. C. (2010) Novel γ -secretase inhibitors uncover a common nucleotide-binding site in JAK3, SIRT2, and PS1. *FASEB J.* **24**, 2464–2474.
- Yamasaki A., Eimer S., Okochi M., Smialowska A., Kaether C., Baumeister R., Haass C. and Steiner H. (2006) The GxGD motif of presenilin contributes to catalytic function and substrate identification of γ -secretase. *J. Neurosci.* **26**, 3821–3828.
- Zhang X., Hoey R. J., Lin G. *et al.* (2012) Identification of a tetratricopeptide repeat-like domain in the nicastrin subunit of γ -secretase using synthetic antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 8534–8539.

Kretner, Benedikt; Fukumori, Akio; Kuhn, Peer-Hendrik; Pérez-Revuelta, Blanca; Lichtenthaler, Stefan; Haass, Christian; Steiner, Harald:

Important functional role of residue x of the presenilin GxGD protease active site motif for APP substrate cleavage specificity and substrate selectivity of γ -secretase

Figure S1: Analysis of Notch1 processing using a NICD-specific antibody (a, c) PS^{-/-} MEF cells stably transduced with wt PS1 or the indicated PS1 L383 hydrophobic (a) or hydrophilic mutants (c) were transiently transfected with the Notch1 substrate F-NEXT. Generation of the F-NEXT cleavage product NICD was analyzed by immunoblotting of cell lysates with Cleaved Notch1 antibody specific for the NICD. Note the functional loss of the aromatic, proline, and positively charged L383 mutants ranging from very minor residual to (nearly) abrogated activity. (b, d) The levels of the NICD immunoblot signals were quantified by measuring their chemiluminescence signal intensities. These were normalized to the levels of NCT_m (analyzed as in Fig. 5A and quantified by measuring its chemiluminescence signal intensities) and expressed relative to those generated in cells expressing wt PS1 that was set 100%. Bars represent the mean of five (b) or four (d) independent experiments \pm S.E. Asterisks indicate the significance (one way ANOVA with Dunnett's post test) relative to PS1 WT (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

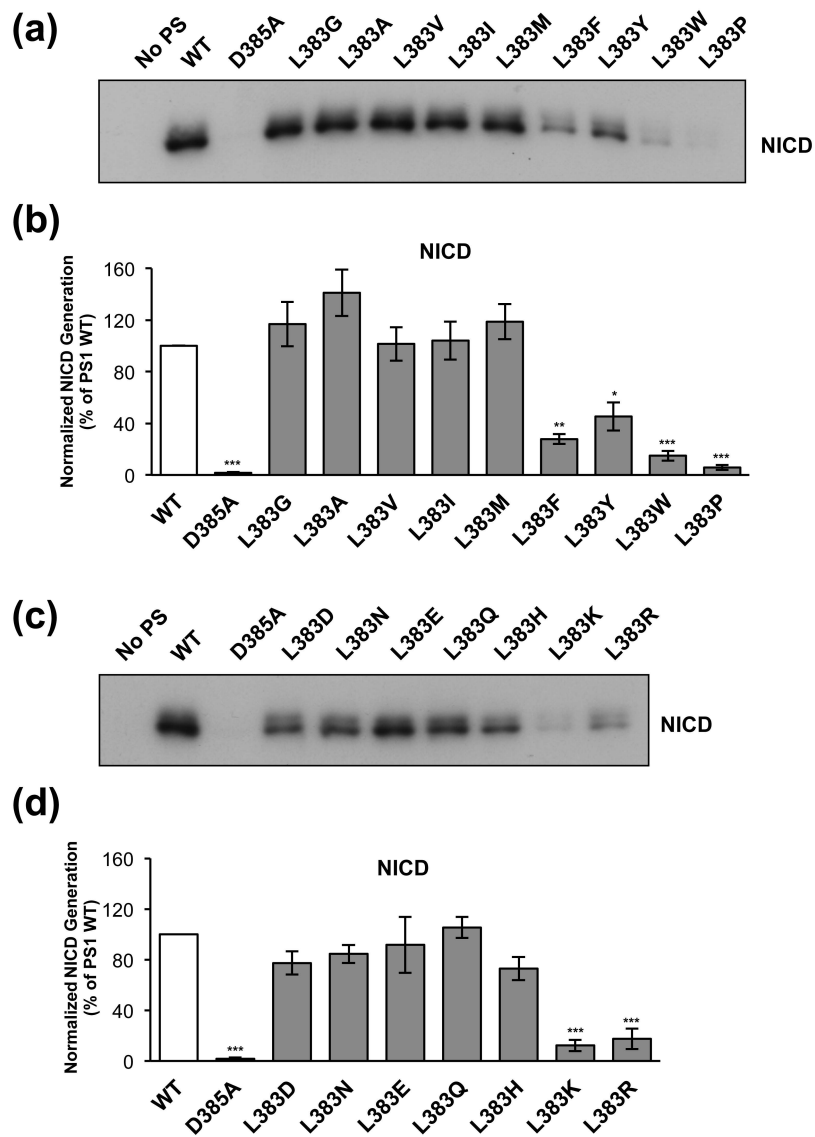


Figure S1

Publikation 2

Attenuated $A\beta_{42}$ responses to low potency γ -secretase modulators can be overcome for many pathogenic presenilin mutants by second-generation compounds.

Attenuated $A\beta_{42}$ Responses to Low Potency γ -Secretase Modulators Can Be Overcome for Many Pathogenic Presenilin Mutants by Second-generation Compounds*

Received for publication, December 17, 2010, and in revised form, February 21, 2011. Published, JBC Papers in Press, February 25, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.213587

Benedikt Kretner^{‡§}, Akio Fukumori^{‡§}, Amelie Gutsmiel^{‡§1}, Richard M. Page^{‡§}, Thomas Luebbbers[¶], Guido Galley[¶], Karlheinz Baumann[¶], Christian Haass^{‡§2}, and Harald Steiner^{‡§3}

From the [‡]DZNE-German Center for Neurodegenerative Diseases and the [§]Adolf-Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, 80336 Munich, Germany and [¶]Preclinical CNS Research, Pharmaceuticals Division, F. Hoffmann-La Roche Ltd., CH-4070 Basel, Switzerland

Sequential processing of the β -amyloid precursor protein by β - and γ -secretase generates the amyloid β -peptide ($A\beta$), which is widely believed to play a causative role in Alzheimer disease. Selective lowering of the pathogenic 42-amino acid variant of $A\beta$ by γ -secretase modulators (GSMs) is a promising therapeutic strategy. Here we report that mutations in presenilin (PS), the catalytic subunit of γ -secretase, display differential responses to non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-type GSMs and more potent second-generation compounds. Although many pathogenic PS mutations resisted lowering of $A\beta_{42}$ generation by the NSAID sulindac sulfide, the potent NSAID-like second-generation compound GSM-1 was capable of lowering $A\beta_{42}$ for many but not all mutants. We further found that mutations at homologous positions in PS1 and PS2 can elicit differential $A\beta_{42}$ responses to GSM-1, suggesting that a positive GSM-1 response depends on the spatial environment in γ -secretase. The aggressive pathogenic PS1 L166P mutation was one of the few pathogenic mutations that resisted GSM-1, and Leu-166 was identified as a critical residue with respect to the $A\beta_{42}$ -lowering response of GSM-1. Finally, we found that GSM-1-responsive and -resistant PS mutants behave very similarly toward other potent second-generation compounds of different structural classes than GSM-1. Taken together, our data show that a positive $A\beta_{42}$ response for PS mutants depends both on the particular mutation and the GSM used and that attenuated $A\beta_{42}$ responses to low potency GSMs can be overcome for many PS mutants by second generation GSMs.

The amyloid β -peptide ($A\beta$)⁴ is a 37–43-amino acid secreted peptide and an invariant pathological hallmark of Alzheimer disease (AD). The 42-amino acid variant $A\beta_{42}$ has been suggested to be causative for the disease by triggering the amyloid cascade, a sequence of pathogenic events that ultimately leads to neurodegeneration and dementia in affected patients (1). The pathogenic peptide is generated by a sequential cleavage of the β -amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretase (2). After β -secretase cleavage, γ -secretase cleaves the C-terminal fragment of APP that is left in the membrane by an intramembrane cleavage to release the various $A\beta$ species (3–5). Although $A\beta_{42}$ is normally a minor species produced by this cleavage besides the major $A\beta_{40}$ species, its production is enhanced by familial AD (FAD) mutations in presenilin (PS) 1 and PS2, the catalytic component of γ -secretase (6), as well as by a subset of FAD mutations in APP. Targeting β - and γ -secretase by specific inhibitors is one of the current approaches toward an effective AD treatment (7). With respect to γ -secretase, however, γ -secretase inhibitors also block the cleavage of Notch1, a major physiological γ -secretase substrate and, thus, the generation of the Notch1 intracellular domain (NICD), which is a crucial signaling molecule controlling cell differentiation (7). Interfering with the cleavage of this substrate accounts for adverse side effects in animal studies (7) and probably in humans as well. γ -Secretase modulators (GSMs) that selectively lower $A\beta_{42}$, such as a subset of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), are considered to be a safer approach than using inhibitors of γ -secretase that target the active site of the protease. These compounds lower $A\beta_{42}$ generation without affecting Notch1 intracellular domain generation, thus precluding potential Notch-related side effects (8). More potent drugs than NSAIDs, such as the NSAID-like GSM-1 and others effective in the nanomolar range, have been recently identified (9, 10).

The precise mechanistic mode(s) of action as well as the binding site(s) of GSMs, being on the substrate, the enzyme, and/or both, has not yet been fully resolved and may also

* This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Collaborative Research Center (SFB596) "Molecular Mechanisms of Neurodegeneration" (to H. S. and C. H.), the Bundesministerium für Bildung und Forschung ("Degenerative Dementias: Target Identification, Validation, and Translation into Treatment Strategies"; to C. H. and H. S.), the FöFoLe program of the Ludwig-Maximilians-University Munich (to B. K. and H. S.), and the Center for Integrated Protein Science Munich.

¹ Supported by the Elitenetzwerk Bayern.

² Supported by a LMUexcellent program research professorship.

³ To whom correspondence should be addressed: DZNE-German Center for Neurodegenerative Diseases and Adolf-Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, Schillerstr. 44, 80336 Munich, Germany. Tel.: 49-89-2180-75480; Fax: 49-89-2180-75415; E-mail: harald.steiner@med.uni-muenchen.de.

⁴ The abbreviations used are: $A\beta$, amyloid β -peptide; AD, Alzheimer disease; APP, β -amyloid precursor protein; FAD, familial Alzheimer disease; GSM, γ -secretase modulator; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; PS, presenilin; TMD, transmembrane domain; Tris-Bicine, Tris-*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)glycine.

Overcoming GSM Resistance of Pathogenic PS Mutants

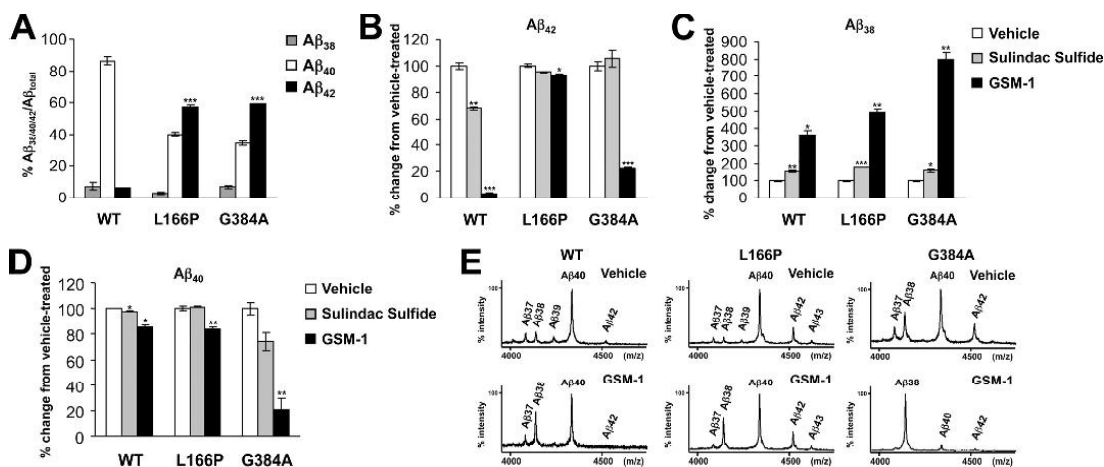


FIGURE 1. Pathogenic Aβ₄₂ generation of PS1 G384A can be lowered by GSM-1. A, conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT PS1, PS1 L166P, or PS1 G384A were analyzed for levels of secreted Aβ₃₈, Aβ₄₀, and Aβ₄₂ species by sandwich immunoassay. Each species is plotted as a percentage of the total Aβ (i.e. the sum of Aβ₃₈, Aβ₄₀, and Aβ₄₂) measured for each cell line. Bars represent the mean of three experiments with error bars indicating the S.E. Asterisks indicate the significance (two-tailed unpaired Student's *t* test) of the Aβ₄₂/Aβ_{total} ratio changes relative to WT PS1 (***, *p* < 0.001). B–D, conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT PS1, PS1 L166P, or PS1 G384A treated with sulindac sulfide (50 μM), GSM-1 (1 μM), or vehicle control (DMSO) were analyzed by sandwich immunoassay for the levels of Aβ₄₂, Aβ₃₈, and Aβ₄₀. Changes in the ratios of Aβ₄₂ (B), Aβ₃₈ (C), and Aβ₄₀ (D) species to total Aβ (i.e. the sum of Aβ₃₈, Aβ₄₀, and Aβ₄₂) are shown as a percentage of those obtained for vehicle-treated cells, which were set to 100%. Bars represent the mean of three experiments with error bars indicating the S.E. Asterisks indicate the significance (two-tailed unpaired Student's *t* test) of the GSM responses relative to vehicle control (*, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001). E, 4G8-immunoprecipitated total Aβ species from conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT PS1, PS1 L166P, or PS1 G384A treated with GSM-1 (1 μM) or vehicle control (DMSO) were subjected to MALDI-TOF mass spectrometry analysis. The intensities of the highest peaks were set to 100% in the spectra.

differ for various types of GSMs (10, 11). Many GSMs typically shift the cleavage specificity of γ -secretase such that the inhibition of Aβ₄₂ generation is accompanied by an increased generation of the shorter Aβ₃₈ (8). For some GSMs, such as the NSAID flurbiprofen, an increase of Aβ₃₇ and even the shorter Aβ₃₃ and Aβ₃₄ species is observed (12). In addition to Aβ₄₂, the longer Aβ₄₃ (e.g. by flurbiprofen) and also the shorter Aβ₃₅ and Aβ₄₀ as well as the rare Aβ₄₁ species can be decreased by GSMs, suggesting a complex mechanism of GSM action (13). Of note, inverse modulators have also been identified that increase the longer Aβ₄₂ species while lowering the shorter Aβ₃₈ species (14). GSMs were reported to target the substrate by binding to a short region of the Aβ domain located in the N-terminal half of the APP transmembrane domain (TMD) (11). More recently, the binding of GSMs to Aβ has been reported to cause reduced dimerization of the APP TMD thereby lowering Aβ₄₂ generation (15, 16). However, controversial data challenging the view of substrate-targeting GSMs were also reported (10, 17) and supported a number of studies that had initially suggested that GSMs target the enzyme (12, 18–21). Mutational analyses of APP do not seem to support substrate binding of GSMs either (13). Point mutations disrupting key residues within the proposed GSM binding site in APP did not abolish the efficacy of GSMs (13). Likewise, both familial and synthetic mutations at the γ -secretase cleavage site domain showed the typical GSM responses (13). In contrast, although FAD mutations in PS still increase Aβ₃₈ in response to NSAIDs, lowering of Aβ₄₂ is not effective for the majority of these mutants (9, 22, 23). This was seen mostly

for aggressive mutations with early disease onset that cause a strong increase of Aβ₄₂, such as the PS1 L166P mutant, which was also resistant to the potent compound GSM-1 (9). These data suggested that in particular, aggressive mutations lock γ -secretase in a conformation that renders the enzyme resistant to the Aβ₄₂-lowering activity of GSMs. Here, we report the unexpected finding that Aβ₄₂ can be lowered for many sulindac sulfide-resistant pathogenic and synthetic PS mutations by GSM-1 and other second-generation GSMs. Thus, a positive Aβ₄₂-lowering response not only depends on the respective mutation but also on the particular GSM.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies—Polyclonal and monoclonal anti-Aβ antibodies (3552) to Aβ_{1–40} and 2D8 to Aβ_{1–16} were described previously (24, 25) or obtained from Covance (4G8 to Aβ_{17–24}). The C-terminal-specific anti-Aβ₃₈ antibody was obtained from Meso Scale Discovery, and C-terminal-specific anti-Aβ₄₀ (BAP24) and anti-Aβ₄₂ (BAP15) antibodies were kind gifts of Dr. Manfred Brockhaus (Roche Applied Science).

cDNA Constructs—cDNA constructs encoding synthetic and FAD-associated PS1 and PS2 mutants were generated by PCR-mediated mutagenesis of pcDNA4/HisC::PS1 (26) or pcDNA3.1/zeo(+):PS2 (9), respectively, using oligonucleotide primers encoding the respective mutations.

Cell Lines, cDNA Transfections, and Cell Culture—HEK293 cells stably expressing Swedish mutant APP (HEK293/sw) were stably transfected with the indicated PS cDNAs using LipofectAmine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and cultured as described before (27). Pools of

Overcoming GSM Resistance of Pathogenic PS Mutants

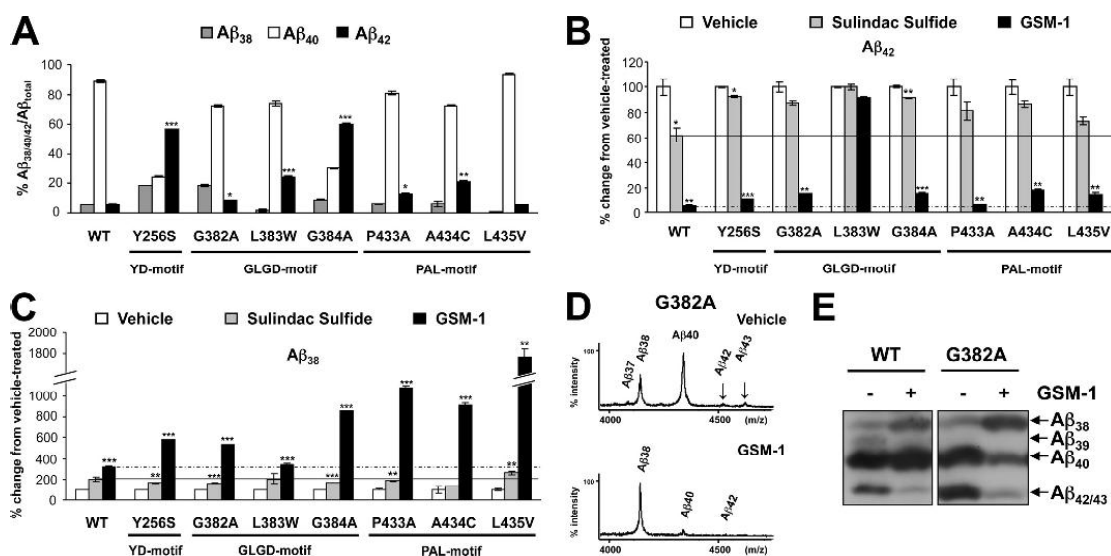


FIGURE 2. Differential response of active site mutants to GSM-1. *A*, conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT PS1 or mutants of the YD, GLGD, and PAL active site motifs of PS1 were analyzed for levels of secreted $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$ species by sandwich immunoassay. Data were plotted as described in Fig. 1*A*. Bars represent the mean of three experiments with error bars indicating the S.E. Asterisks indicate the significance (two-tailed unpaired Student's *t* test) of the $A\beta_{42}/A\beta_{total}$ ratio changes relative to WT PS1 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). *B* and *C*, conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT or mutant PS1 described in *A* that had been treated with sulindac sulfide (50 μ M), GSM-1 (1 μ M) or vehicle control (DMSO) were analyzed by sandwich immunoassay for the levels of $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$. Changes in the ratios of $A\beta_{42}$ (*B*) and $A\beta_{38}$ species (*C*) to total $A\beta$ (i.e. the sum of $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$) were plotted as described in Fig. 1*B* and *C*, bars represent the mean of three experiments with error bars indicating the S.E. Asterisks indicate the significance (two-tailed unpaired Student's *t* test) of the GSM responses relative to vehicle control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Solid and dashed horizontal lines denote the levels of the responses for WT PS1 to sulindac sulfide or GSM-1, respectively. *D*, 4G8-immunoprecipitated total $A\beta$ species from conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing PS1 G382A that had been treated with GSM-1 (1 μ M) or vehicle control (DMSO) were subjected to qualitative MALDI-TOF mass spectrometry analysis. Note that GSM-1 also causes a reduction of $A\beta_{43}$ generated by the PS1 G382A mutant. The intensities of the highest peaks were set to 100% in the spectra. In *B* and *C*, solid and dashed horizontal lines denote the levels of the responses for WT PS1 to sulindac sulfide or GSM-1, respectively. *E*, total $A\beta$ species from conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT PS1 or PS1 G382A that had been treated with GSM-1 (1 μ M) or vehicle control (DMSO) were immunoprecipitated using antibody 3552, separated by Tris-Bicine urea SDS-PAGE, and analyzed by immunoblotting using antibody 2D8.

stably transfected cells with robust PS expression were investigated to avoid clonal variations (27).

Drug Treatment and Analysis of $A\beta$ —Cultured cells were treated in six-well dishes with GSMs or vehicle (DMSO) at the indicated concentrations as described (9). Secreted $A\beta$ species were analyzed by sandwich immunoassay specific for $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$ species (Meso Scale Discovery), Tris-Bicine urea SDS-PAGE, and MALDI-TOF mass spectrometry as described previously (13). IC_{50} values of GSMs for inhibition of $A\beta_{42}$ were determined from dose-response curves by nonlinear regression analysis (sigmoidal dose-response with variable slope) using GraphPad Prism software.

Compound Synthesis—The TorreyPines compound N^1, N^1 -diethyl-4-methyl- N^3 -{4-[4-(4-methyl-imidazol-1-yl)-phenyl]-thiazol-2-yl}-benzene-1,3-diamine was prepared by coupling of (5-diethylamino-2-methyl-phenyl)-thiourea with 2-bromo-1-[4-(4-methyl-imidazol-1-yl)-phenyl]-ethanone acetate in N,N -dimethylformamide according to patent WO2004110350, general procedure Example 3. Synthesis of the Eisai compound (4*R*,9*a*,*S*,*E*)-7-(3-methoxy-4-(4-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)benzylidene)-4-(3,4,5-trifluorophenyl)hexahydroprido[2,1-*c*][1,4]-oxazin-6(1*H*)-one was accomplished as previously outlined in the patent applications WO2007060821 and WO2009081959.

RESULTS

Effective Lowering of $A\beta_{42}$ Generated by the Aggressive PS1 G384A FAD Mutant with GSM-1—The NSAID-like compound GSM-1 is a second-generation GSM capable of reducing $A\beta_{42}$ generation with considerably higher potency ($IC_{50} = 180$ nM in HEK293/sw cells) than typical GSMs of the NSAID class such as sulindac sulfide ($IC_{50} = 70$ μ M in HEK293/sw cells). Similar to NSAIDs but more potently than these, GSM-1 can also lower $A\beta_{42}$ generated by pathogenic mutant APP substrates (13). Unlike the APP mutants, pathogenic mutants in PS appear to be rather refractory to sulindac sulfide or other classical $A\beta_{42}$ -lowering NSAIDs. Two exceptionally strong PS mutants, PS1 L166P and PS2 N141I, have been tested so far with GSM-1 and also do not respond to this highly potent compound (9). This has led to the concept that many pathogenic PS mutations, in particular those that generate high amounts of $A\beta_{42}$, lock γ -secretase in a GSM-resistant conformation such that the aberrant generation of $A\beta_{42}$ is maintained (9, 22, 23). Surprisingly, when we now analyzed the PS1 G384A mutant, which causes a similarly strong increase of the $A\beta_{42}$ to total $A\beta$ ratio (total $A\beta = A\beta_{38} + A\beta_{40} + A\beta_{42}$) as the PS1 L166P mutant as assessed by a highly sensitive and specific $A\beta$ immunoassay (Fig. 1*A*), we found that GSM-1 strongly reduced the

Overcoming GSM Resistance of Pathogenic PS Mutants

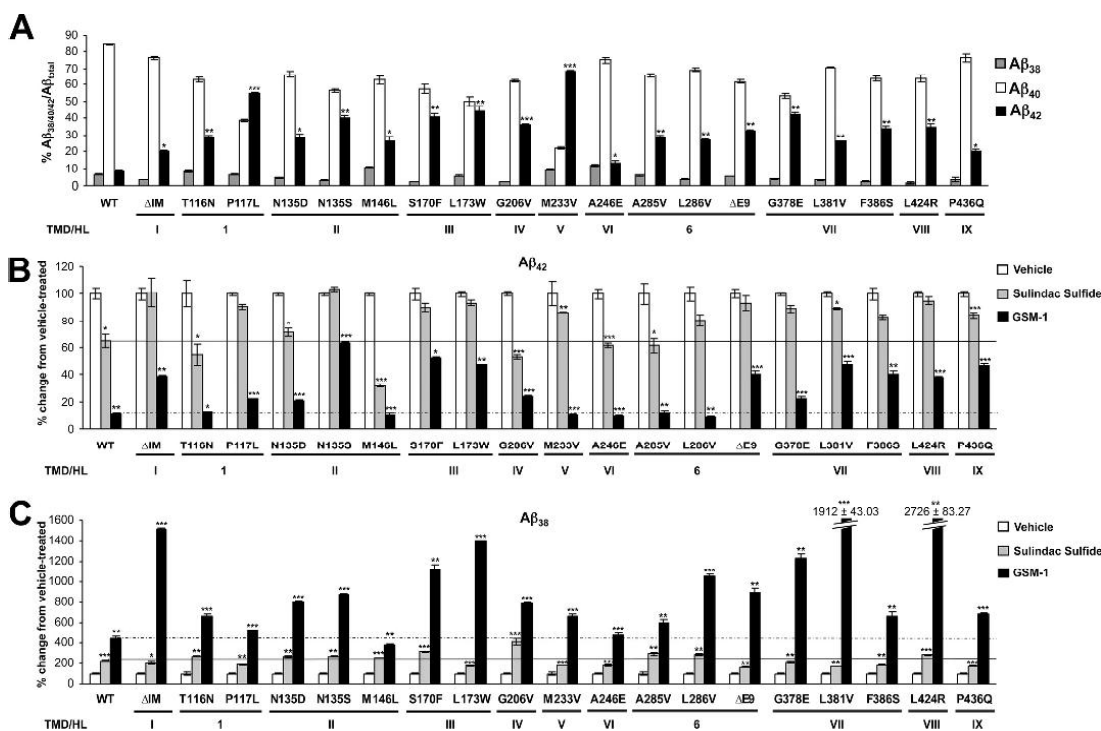


FIGURE 3. Many sulindac sulfide-resistant PS1 FAD mutants respond to GSM-1. A, conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT PS1 or the indicated PS1 FAD mutants (Δ IM = Δ I83/M84, Δ E9 = Δ Exon9) were analyzed for levels of A β ₃₈, A β ₄₀, and A β ₄₂ species by sandwich immunoassay. Data were plotted as described in Fig. 1A. Bars represent the mean of three experiments with error bars indicating the S.E. Asterisks indicate the significance of the A β ₄₂/A β _{total} ratio change (two-tailed unpaired Student's *t* test) relative to WT PS1 (*, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001). B and C, conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT PS1 or mutant PS1 described in A that had been treated with sulindac sulfide (50 μ M), GSM-1 (1 μ M), or vehicle control (DMSO) were analyzed by sandwich immunoassay for the levels of A β ₃₈, A β ₄₀, and A β ₄₂. Changes in the ratios of A β ₄₂ (B) and A β ₃₈ (C) species to total A β (i.e. the sum of A β ₃₈, A β ₄₀, and A β ₄₂) were plotted as described in Fig. 1, B and C. Bars represent the mean of three to six experiments with error bars indicating the S.E. Asterisks indicate the significance (two-tailed unpaired Student's *t* test) of the GSM responses relative to vehicle control (*, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001). Solid and dashed horizontal lines denote the levels of the responses for WT PS1 to sulindac sulfide or GSM-1, respectively. In A–C, numbers of the TMDs and hydrophilic loops (HLs) are denoted in Roman and Arabic letters, respectively.

A β ₄₂ generation of this mutant in cultured cells (Fig. 1B). Consistent with previous results (9, 22, 23), the NSAID sulindac sulfide was only effective in lowering A β ₄₂ for WT PS1 but not for the two mutants (Fig. 1B). Despite their differential A β ₄₂ response, A β ₃₈ was increased for both mutants by both drugs, demonstrating the modulatory activity of these compounds (Fig. 1C), which was substantially stronger for GSM-1 than for sulindac sulfide. Interestingly, for the PS1 G384A mutant, A β ₄₀ was also robustly lowered by GSM-1 and somewhat by sulindac sulfide, whereas this A β species was much less affected by the drugs for WT PS1 or the PS1 L166P mutant (Fig. 1D). The unexpected behavior of the G384A mutant in response to GSM-1 was fully confirmed by a mass spectrometry analysis of the individual A β species (Fig. 1E), which further showed that A β ₃₈ was the major A β species generated by this mutant in response to GSM-1.

Taken together, the behavior of the PS1 G384A mutant demonstrates that a pathogenic PS mutant can be unresponsive to a classical NSAID-type GSM while still being responsive to the A β ₄₂-lowering activity of another GSM such as GSM-1. We

further conclude that the capability of GSM-1 to lower A β ₄₂ can be differentially affected by PS FAD mutations of similar pathogenic strength and that the lack of an A β ₄₂-lowering response to GSMs may not be generally observed for very strong PS FAD mutants.

Mutants of the Active Site Domain of γ -Secretase Respond Differentially to GSMs—Because the PS1 G384A mutant is distinguished from other FAD mutants by its immediate location directly to the active site aspartate 385 and may thus behave differently from other FAD mutants, we next investigated whether mutants of the γ -secretase active site domain might be generally permissive to this particular GSM. The active site domain of γ -secretase is characterized by conserved YD and GLGD motifs in TMD6 and TMD7 of PS, respectively, that include the catalytic aspartate residues and a PAL motif at the N-terminal end of TMD9. Besides the N-terminal aspartate in TMD6, the latter two sequence motifs are highly conserved in PS and related aspartyl proteases as GXGD and PXL consensus sequences (28).

To investigate whether and how active site domain mutants in PS1 respond to GSM-1, known familial and synthetic mutants of

Overcoming GSM Resistance of Pathogenic PS Mutants

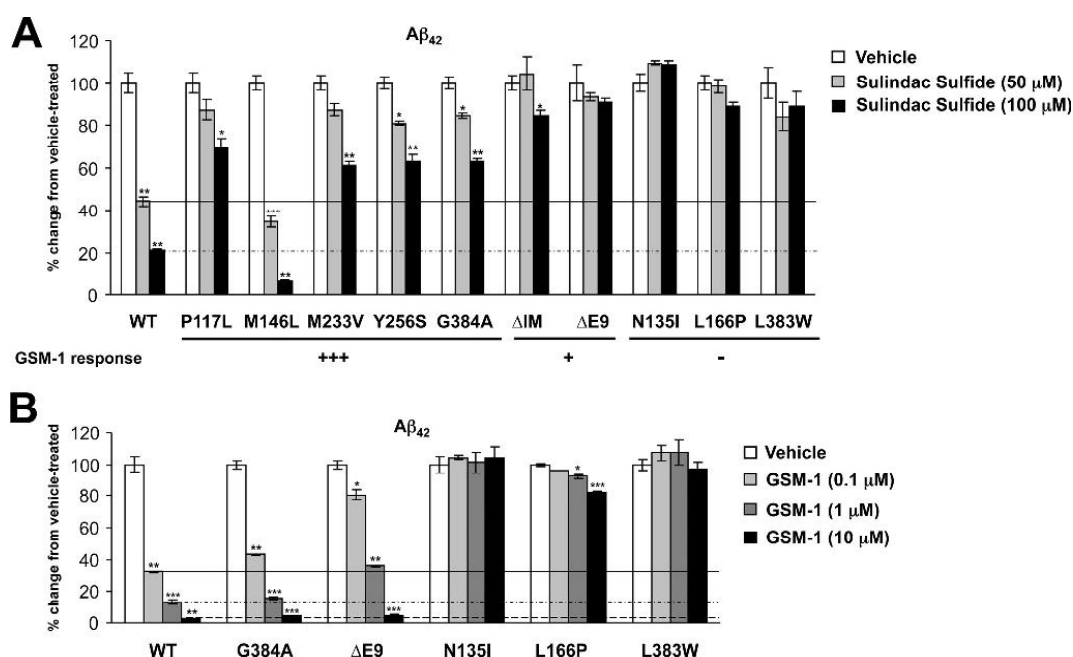


FIGURE 4. Differential dose responses to GSMs of PS mutants for $A\beta_{42}$ generation. *A*, conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT PS1 or the indicated mutant PS1 variants that had been treated with either 50 or 100 μM sulindac sulfide or vehicle control (DMSO) were analyzed by sandwich immunoassay for the levels of $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$. Changes in the ratios of $A\beta_{42}$ species to total $A\beta$ (i.e. the sum of $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$) were plotted as described in Fig. 1B. Bars represent the mean of three experiments with error bars indicating the S.E. Asterisks indicate the significance (two-tailed unpaired Student's *t* test) of the GSM responses relative to vehicle control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Solid and dashed horizontal lines denote the levels of the responses of WT PS1 for 50 and 100 μM sulindac sulfide, respectively. *B*, conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT PS1 or the indicated mutant PS1 variants that had been treated with either 0.1, 1, or 10 μM GSM-1 or vehicle control (DMSO) were analyzed by sandwich immunoassay for the levels of $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$. Changes in the ratios of $A\beta_{42}$ species to total $A\beta$ (i.e. the sum of $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$) were plotted as described in Fig. 1B. Bars represent the mean of three experiments with error bars indicating the S.E. Asterisks indicate the significance (two-tailed unpaired Student's *t* test) of the GSM responses relative to vehicle control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Solid and dashed horizontal lines denote the levels of the responses of WT PS1 for the respective GSM-1 concentrations.

the above sequence motifs were selected. For the YD motif, the Y256S FAD mutant was chosen for analysis. This mutant is located directly adjacent to the TMD6 active site aspartate, similar to the G384A mutant in the immediate vicinity to the TMD7 aspartate. In addition, this mutation also generates very high, comparable amounts of $A\beta_{42}$ (9). For the GLGD motif, besides the G384A mutant described above, the G382A mutant was chosen. Both mutants are the only known substitutions of the glycine residue, which are functionally tolerated for APP processing (29, 30). Considerably more amino acid substitutions are tolerated for APP processing for the more flexible *X* position of the motif (Leu-383), but only a few mutants at this position cause an increased production of $A\beta_{42}$.⁵ From these, the L383W mutant displayed the strongest increase of $A\beta_{42}$ generation, so this mutant was chosen for analysis. Again, only very few substitutions are functionally tolerated at the PAL motif (31, 32) for which the P433A, A434C, and L435V mutants were selected. As expected, the selected mutants increased the $A\beta_{42}/A\beta_{\text{total}}$ ratio to very different extents (Fig. 2A). As shown in Fig. 2B, all mutants responded substantially less well to the low potency GSM sulindac sulfide compared with WT PS1. Strikingly, although the Y256S mutant caused, like the G384A

mutant, one of the strongest increases of $A\beta_{42}$ among the PS mutations (9) (Fig. 2A), the levels of $A\beta_{42}$ could be robustly reduced by GSM-1 (Fig. 2B). Both $A\beta_{42}$ and (as assessed by mass spectrometry and Tris-Bicine urea SDS-PAGE) also $A\beta_{43}$, which is the preferentially generated long $A\beta$ species of the G382A mutant (30), could be lowered by GSM-1 (Fig. 2, B, D, and E). In contrast, GSM-1 was unable to effectively lower $A\beta_{42}$ generated by the L383W mutant, whereas all PAL motif mutants responded robustly to GSM-1 (Fig. 2B). The lack of a positive $A\beta_{42}$ response of the L383W mutant was not due to a general failure of GSM action as sulindac sulfide and GSM-1 were capable of raising $A\beta_{38}$ levels for this and all other mutants, which for certain mutants (see e.g. PS L435V) was very strong (Fig. 2C). Thus, several but not all active site domain mutants other than the G384A mutant, including another aggressive FAD mutant (Y256S), are also responsive to the $A\beta_{42}$ -lowering capacity of GSM-1. Therefore, we confirm that the responses to GSM-1 are apparently independent of the levels of $A\beta_{42}$ generated by the individual mutants.

The Attenuated Response to Low Potency $A\beta_{42}$ -lowering GSMs Observed for Many PS Mutants Can Be Overcome by GSM-1—The above results show that all but one (PS L383W) of the analyzed PS mutations of the active site domain are permissive to GSM-1. To investigate whether the response to this

⁵ B. Kretner and H. Steiner, manuscript in preparation.

Overcoming GSM Resistance of Pathogenic PS Mutants

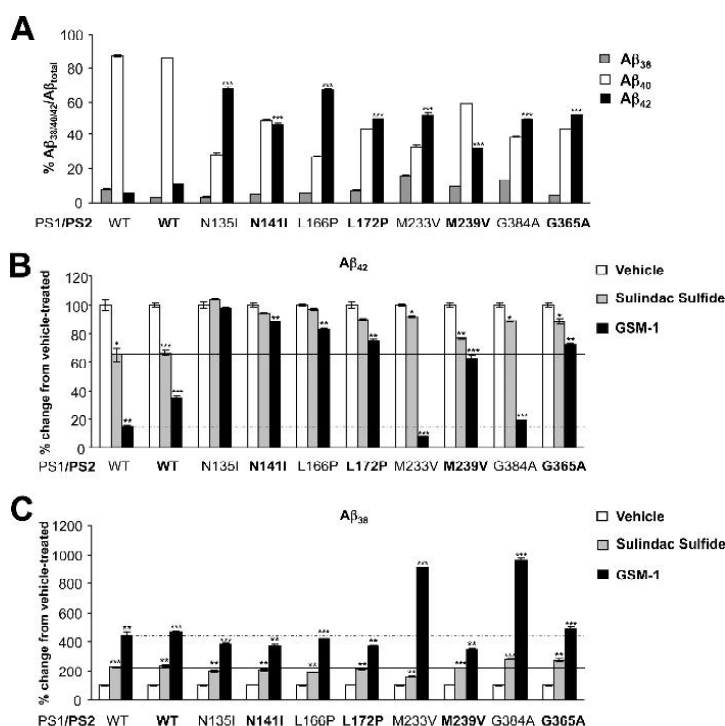


FIGURE 5. **Homologous PS mutants can elicit distinct $A\beta_{42}$ response to GSM-1.** A, conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT PS1, WT PS2, or the indicated mutants were analyzed for levels of $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$ species by sandwich immunoassay. Data were plotted as described in Fig. 1A. Bars represent the mean of three experiments with error bars indicating the S.E. Asterisks indicate the significance (two-tailed unpaired Student's *t* test) of the $A\beta_{42}/A\beta_{total}$ ratio changes relative to WT PS1 (***, $p < 0.001$). B and C, conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT PS1, WT PS2, or the indicated PS variants that had been treated with sulindac sulfide (50 μ M), GSM-1 (1 μ M), or vehicle control (DMSO) were analyzed by sandwich immunoassay for the levels of $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$. Changes in the ratios of $A\beta_{42}$ (B) and $A\beta_{38}$ (C) species to total $A\beta$ (i.e. the sum of $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$) were plotted as described in Fig. 1, B and C. Bars represent the mean of three experiments with error bars indicating the S.E. Asterisks indicate the significance (two-tailed unpaired Student's *t* test) of the GSM responses relative to vehicle control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Solid and dashed horizontal lines denote the levels of the responses for WT PS1 to sulindac sulfide or GSM-1, respectively.

potent compound is a more common behavior of PS mutants, we analyzed additional FAD mutants of different pathogenic strength within each individual TMD of PS1. For this study PS1 Δ IM83/84 (TMD1), N135D, N135S, and M146L (all TMD2), S170F and L173W (both TMD3), G206V (TMD4), M233V (TMD5), A246E (TMD6), G378E, L381V, and F386S (all TMD7), L424R (TMD8), and P436Q (TMD9) were analyzed. In addition, we also analyzed additional mutations located in hydrophilic loop (HL) regions of PS1 such as T116N, P117L (HL1), A285V, L286V, and Δ exon9 (HL6). Fig. 3A shows the relative increases of the $A\beta_{42}/A\beta_{total}$ ratios measured for the mutants selected. The strongest increase was observed for the M233V mutant, whereas the A246E mutant caused the weakest increase of the $A\beta_{42}/A\beta_{total}$ ratio. With respect to their response to $A\beta_{42}$ reduction by GSM-1, all mutants responded to the compound (Fig. 3B), although to different extents. Strikingly, aggressive mutants with extreme increases of $A\beta_{42}$ generation such as P117L or M233V (Fig. 3A) were again clearly responsive to GSM-1. Five mutants (T116N, M146L, M233V, A246E, A285V, L286V) showed a similar response to WT PS1, whereas several mutants showed a \sim 3–4-fold

weaker response than WT PS1. The N135S mutant showed the weakest response to GSM-1 (\sim 5-fold less than WT PS1). Its response was similar to that which was typically reached for WT PS1 with sulindac sulfide. In agreement with our previous results (9), many mutants were clearly attenuated or even resistant to the $A\beta_{42}$ -lowering activity of sulindac sulfide. With respect to modulation of $A\beta_{38}$ levels, all mutants responded to GSM-1, increasing the levels of this short $A\beta$ species at least \sim 3–4-fold as for WT PS1. For some mutants, exceptionally high (e.g. \sim 27-fold for the L424R mutant) $A\beta_{38}$ increases were observed (Fig. 3C). Sulindac sulfide showed a very similar but less pronounced behavior to GSM-1 on the generation of the short $A\beta$ species, consistent with being a less potent GSM (Fig. 3C).

Inspection of the GSM response profiles of the various mutants compared with WT showed that these were very similar for a number of mutants. This suggests that the attenuated responses of these mutants can be overcome with more potent drugs such as GSM-1. Additional dose-response experiments showed that the $A\beta_{42}$ generation of several aggressive mutants that responded well to GSM-1 (PS1

Overcoming GSM Resistance of Pathogenic PS Mutants

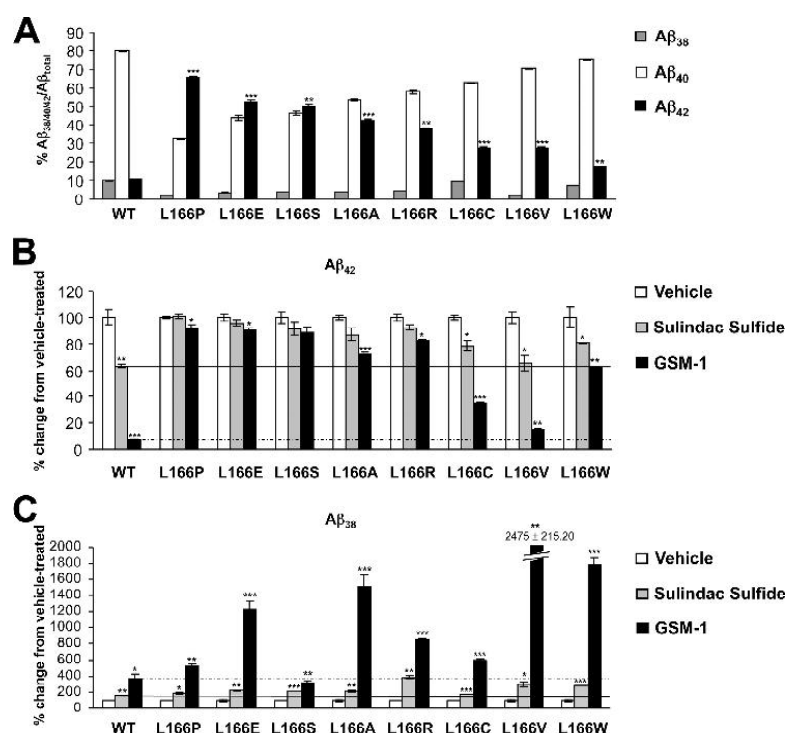


FIGURE 6. The Leu-166 residue of PS1 is critical for a positive $A\beta_{42}$ response to GSMs. A, conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT PS1 or the indicated PS1 Leu-166 variants were analyzed for levels of $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$ species by sandwich immunoassay. Data were plotted as described in Fig. 1A. Bars represent the mean of three experiments with error bars indicating the S.E. Asterisks indicate the significance (two-tailed unpaired Student's *t* test) of the $A\beta_{42}/A\beta_{\text{total}}$ ratio changes relative to WT PS1 (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). B and C, conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT PS1 or the indicated PS1 Leu-166 variants and treated with sulindac sulfide (50 μM), GSM-1 (1 μM), or vehicle control (DMSO) were analyzed by sandwich immunoassay for the levels of $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$. Changes in the ratios of $A\beta_{42}$ (B) and $A\beta_{38}$ (C) species to total $A\beta$ (i.e. the sum of $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$) were plotted as described in Fig. 1, B and C. Bars represent the mean of three to six experiments with error bars indicating the S.E. Asterisks indicate the significance (two-tailed unpaired Student's *t* test) of the GSM responses relative to vehicle control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Solid and dashed horizontal lines denote the levels of the responses for WT PS1 to sulindac sulfide or GSM-1, respectively.

P117L, M233V, Y256S, and G384A) could also be further lowered by doubling the dose of sulindac sulfide (100 μM ; i.e. ~ 1.5 times the IC_{50}) (Fig. 4A). This increase of drug dose was, however, still not effective for mutants with attenuated $A\beta_{42}$ response to GSM-1 (PS1 ΔIM and ΔE9)- or GSM-1-resistant mutants (PS1 N135I, a synthetic PS1 homolog of the GSM-1-resistant PS2 N141I mutant (see below), L166P, and L383W). As expected, the PS1 M146L mutant showed a dose-dependent and enhanced $A\beta_{42}$ response compared with WT PS1 in agreement with previous results (18). Dose-response experiments with GSM-1 using a selection of the above mutants tested showed that $A\beta_{42}$ could be further lowered in a dose-dependent manner for PS1 G384A or PS1 ΔE9 , whereas the GSM-1-resistant mutants remained rather unresponsive even at a 10-fold higher concentration of GSM-1 (10 μM ; i.e. ~ 55 times the IC_{50}) (Fig. 4B). Taken together, these data suggest a similar mode of action of these compounds and indicate that the differences in their potency may relate to differences in the affinity to their target binding site, which is individually affected by the mutations.

Homologous PS Mutations Can Respond Differently to GSMs—We next asked whether and how PS2 mutations would respond to

GSM-1 and how their response would compare with corresponding mutants in PS1. From the very few FAD mutations that have been identified in PS2, we chose the "Italian" M239V (TMD5) mutant for analysis besides the GSM-1-resistant "Volga-German" N141I (TMD3) (9) and its synthetic GSM-1-resistant PS1 N135I homolog (see Fig. 4B). The Italian mutant was chosen as it represents the homolog of the GSM-1-responsive PS1 M233V mutant analyzed above (see Fig. 3), thus, allowing a direct comparison of the GSM response of these two PS variants. To further compare PS1 and PS2 mutants with each other, we additionally generated a direct homolog of the aggressive and GSM-1 resistant PS1 L166P mutant (PS2 L172P) and a direct PS2 homolog of the similarly aggressive but GSM-1-responsive PS1 G384A mutant (PS2 G365A). As shown in Fig. 5A, all mutants increased the $A\beta_{42}/A\beta_{\text{total}}$ ratio, which in several cases were similar to those of the aggressive PS1 L166P mutant. Except for the PS1 N135I, PS1 L166P, and M233V mutants, which displayed stronger increases of $A\beta_{42}$ generation than their PS2 homologs, the other mutant pair (PS1 G384A/PS2 G365A) was comparable in its respective pathogenic activities.

Compared with WT PS2, the PS2 mutants were clearly attenuated (PS2 L172P, PS2 M239V, PS2 G365A) or, in agreement

Overcoming GSM Resistance of Pathogenic PS Mutants

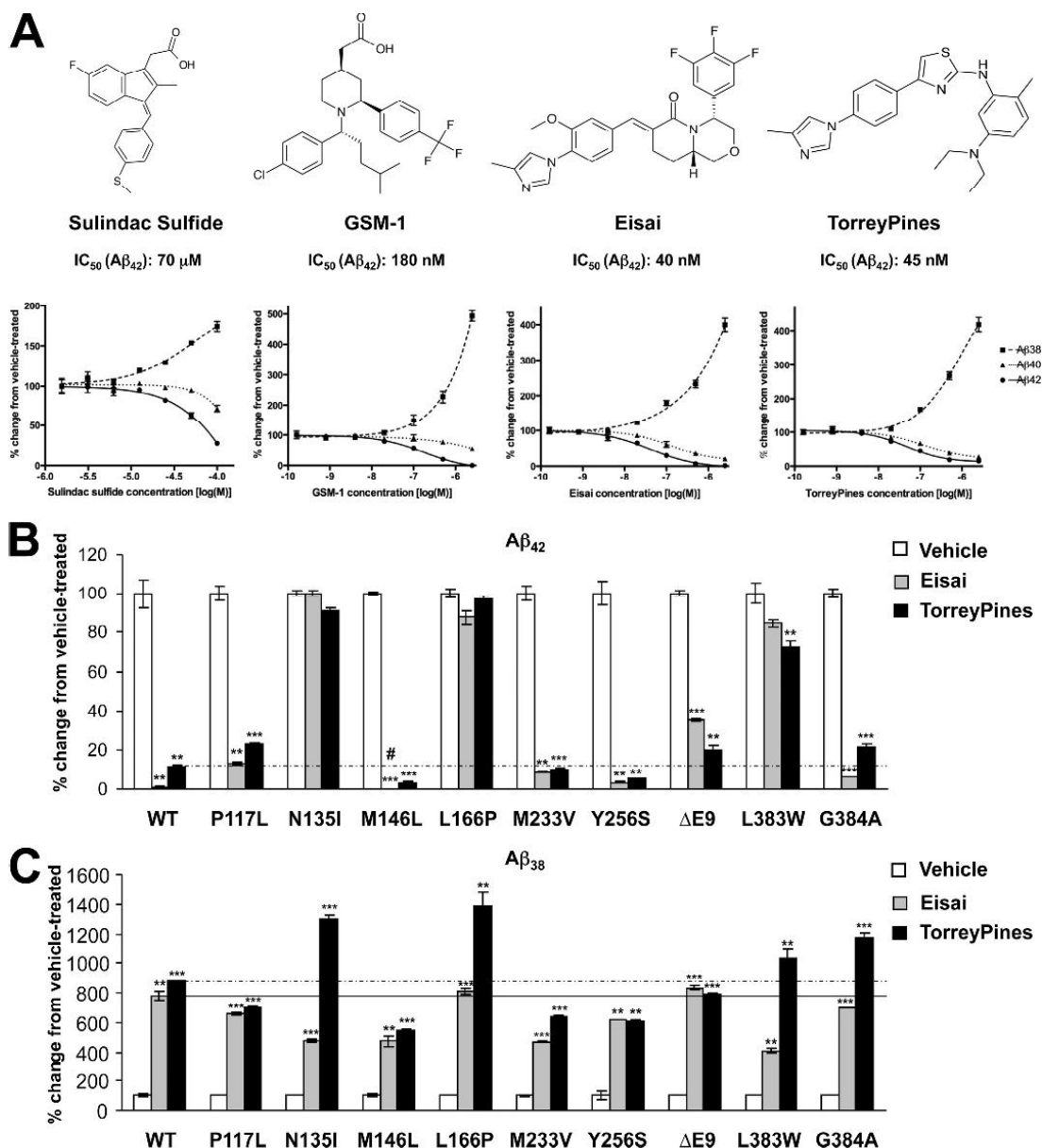


FIGURE 7. Potent second-generation GSMs of different structural class act similar to GSM-1. *A*, structures and dose-response curves of the acidic GSMs sulindac sulfide and GSM-1 and the non-acidic GSMs from Eisai and TorreyPines Therapeutics are shown. To determine GSM potencies, conditioned media of HEK293/sw cells treated with vehicle (DMSO) or increasing concentrations of GSM were analyzed for Aβ₃₈, Aβ₄₀, and Aβ₄₂ levels by sandwich immunoassay. Data are shown as percentage of the mean value of the vehicle control, which was set 100%. Error bars indicate the S.E. of the mean of three independent experiments. IC₅₀ values for Aβ₄₂ inhibition were determined by non-linear regression analysis (sigmoidal dose-response with variable slope). *B* and *C*, conditioned media of HEK293/sw cells stably expressing WT PS1 or the indicated mutant PS1 variants that had been treated with 1 μM of either Eisai or TorreyPines compound or vehicle control (DMSO) were analyzed by sandwich immunoassay for the levels of Aβ₃₈, Aβ₄₀, and Aβ₄₂. Changes in the ratios of Aβ₄₂ (*B*) and Aβ₃₈ (*C*) species to total Aβ (i.e. the sum of Aβ₃₈, Aβ₄₀, and Aβ₄₂) were plotted as described in Fig. 1, *B* and *C*. Bars represent the mean of three experiments with error bars indicating the S.E. (#, below detection level). Asterisks indicate the significance (two-tailed unpaired Student's *t* test) of the GSM responses relative to vehicle control (**, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001). Solid and dashed horizontal lines denote the levels of the responses for WT PS1 to the Eisai or the TorreyPines compound, respectively.

Overcoming GSM Resistance of Pathogenic PS Mutants

with our previous results (9), resistant (PS2 N141I) with respect to the inhibition of $A\beta_{42}$ generation by GSM-1 (Fig. 5B). The substantially attenuated response of the PS2 M239V mutant to the $A\beta_{42}$ -lowering capacity of GSM-1 was surprising as $A\beta_{42}$ could be very effectively lowered for its PS1 homolog (PS1 M233V), consistent with our results above (Fig. 3B). Likewise, with its substantially attenuated $A\beta_{42}$ response to GSM-1, the PS2 G365A mutant behaved strikingly differently than its PS1 G384A homolog. Thus, the PS1 M233V/PS2 M239V and PS1 G384A/PS2 G365A mutant pairs behaved differently from the GSM-1-resistant PS1 N135I/PS2 N141I and PS1 L166P/PS2 L172P mutant pairs (Fig. 5B).

As expected, several PS1 and PS2 mutants showed attenuated $A\beta_{42}$ responses to the less potent drug sulindac sulfide. Interestingly, although both WT PSs were similarly responsive to sulindac sulfide, WT PS2 was considerably less responsive to GSM-1 than WT PS1. Moreover, the analyzed PS2 mutants showed attenuated responses to sulindac sulfide compared with WT PS2. Similar sulindac sulfide responses were observed for the PS1 G384A mutant and its PS2 homolog, whereas their GSM-1 responses were strikingly different (Fig. 5B). Finally, as expected, all mutants elicited robust increases of $A\beta_{38}$ generation in response to the used GSMs (Fig. 5C).

Taken together, some but not all homologous mutations in PS1 and PS2 show comparable $A\beta_{42}$ responses to GSM-1. This suggests that the respective spatial environment, which might be subtly different between homologous PS mutations, is an important determinant as to whether a given mutant PS will show an effective $A\beta_{42}$ response to GSM-1.

The Side Chain of a Particular Residue Individually and Differentially Affects $A\beta_{42}$ Changes in Response to GSM-1—The above data suggest that the PS1 L166P mutant belongs to a group of few and rather exceptional mutants with respect to their resistance to the highly potent GSM-1. They further suggest, considering the differential responses of the PS1 N135D/S/I mutants (Figs. 3 and 4) as well as the differential behavior of a subset of homologous PS1 and PS2 mutations (Fig. 4), that the nature of the amino acid exchange and/or its structural context within PS can have a substantial influence as to whether GSM-1 will be effective as an $A\beta_{42}$ -lowering drug or not. However, drastic amino acid exchanges *per se* such as leucine to proline (P117L, L166P) or others, do not necessarily block the GSM-1 response (Figs. 1 and 3).

To further explore the influence of the amino acid side chain on the efficacy of GSM-1, we compared the L166P mutation with a number of additional well characterized amino acid substitutions of this residue (27) including a conservative mutant (L166V). Consistent with our previous results (27), the individual mutations increased the $A\beta_{42}/A\beta_{total}$ ratios to various extents (Fig. 6A). Strikingly, with respect to their $A\beta_{42}$ response, many of the PS1 Leu-166 mutants were resistant to GSM-1 (Fig. 6B). The L166C mutant showed some response to GSM-1, which, however, was still ~4-fold weaker than for WT PS1. Only the conservative L166V mutant responded effectively to GSM-1 and showed an $A\beta_{42}$ inhibition comparable with WT PS1. As expected, the mutants with poor GSM-1

TABLE 1

Summary of PS mutants for which inhibition of $A\beta_{40}$ generation was observed and their $A\beta_{40}$ responses to GSMs

The relative levels of the $A\beta_{40}/A\beta_{total}$ ratios as determined by $A\beta$ immunoassay in response to GSM treatment compared to vehicle control (set to 100%) are indicated (+++, 0–25%; ++, >25–50%; +, >50–75%; –, >75%).

PS1 Mutant	$A\beta_{40}$ response to GSMs			
	50 μ M Sulindac sulfide	1 μ M GSM-1	1 μ M Eisai	1 μ M TorreyPines
Wild type	–	–	++	++
Δ M83/84	–	++	–	–
P117L	–	–	–	+
N135I	–	–	+	++
M146L	–	–	++	++
L166P	–	–	+	++
L166V	–	+	–	–
L166W	–	+	–	–
M233V	–	–	+	+
Y256S	–	+++	+++	+++
Δ Exon9	–	++	–	++
L381V	–	++	–	–
G382A	–	++	–	–
L383W	–	–	–	–
G384A	–	+++	+++	++
P433A	–	++	–	–
A434C	–	+	–	–
P436Q	–	+	–	–

response also showed a strongly attenuated $A\beta_{42}$ response to sulindac sulfide (Fig. 6B). The conservative L166V mutant displayed an $A\beta_{42}$ response to sulindac sulfide comparable with WT PS1. Despite their poor $A\beta_{42}$ response, all mutants increased $A\beta_{38}$ in response to GSM-1 and sulindac sulfide (Fig. 6C). The poor response of the L166W mutant that showed only a mild increase of $A\beta_{42}$ generation (Fig. 6A) further confirmed that the response to GSM-1 is independent of the $A\beta_{42}$ levels generated by the particular mutant. These data indicate that Leu-166 of PS1 is a critical residue for maintaining an enzyme and/or substrate conformation that supports an $A\beta_{42}$ -lowering shift in γ -secretase cleavage specificity in response to GSM-1.

GSMs of Different Structural Classes Act Similarly as GSM-1—Finally, we asked whether GSMs lacking any structural relationship to NSAID-type GSMs would be effective on aggressive PS mutations. To address this question, we analyzed the $A\beta_{42}$ response of several mutants, which showed a good (P117L, M146L, M233V, Y256S, G384A) or moderate response (Δ E9) to GSM-1 or which were resistant to this compound (N135I, L166P, and L383W) (see Fig. 4) to other potent second generation GSMs developed by Eisai or TorreyPines Therapeutics (10). These compounds are structurally distinct from sulindac sulfide and GSM-1 and also lack the carboxylic acid that is common for these NSAID and NSAID-like GSMs (Fig. 7A). Determination of their IC_{50} values in dose-response experiments revealed that they are ~4-fold more potent than GSM-1 with respect to inhibition of $A\beta_{42}$ generation in HEK293/sw cells (Fig. 7A). To evaluate their activity on the PS mutants selected, the compounds were used at 1 μ M, like GSM-1 in the above experiments. As shown in Fig. 7B, the Eisai compound was also not able to lower $A\beta_{42}$ for the GSM-1-resistant PS1 N135I, L166P, and L383W mutants, whereas the other mutants responded effectively to this compound. Very similar results were obtained for the TorreyPines GSM (Fig. 7B). As expected for their modulatory activity, the compounds increased the generation of

Overcoming GSM Resistance of Pathogenic PS Mutants

TABLE 2

Summary of PS mutations and their A β_{42} responses to GSMs

The relative change in the A β_{42} /A β_{total} ratio as determined by A β immunoassay for each mutant compared to wild type is indicated by arrows (\uparrow = 1.5-3-fold; $\uparrow\uparrow$, >3-4.5-fold; $\uparrow\uparrow\uparrow$, >4.5-6-fold; $\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$, >6-fold increase of the A β_{42} /A β_{total} ratio). Double horizontal arrow, no change. Additionally, the relative levels of the A β_{42} /A β_{total} ratios in response to GSM treatment compared to vehicle control are indicated (+++ = 0-25%; ++, >25-50%; +, 50-75%; -, >75%). For FAD mutations, the average age of onset is also indicated. N.D., not determined.

Region	Presenilin	Age of Onset*	A β_{42} /A β_{total} Ratio Change from WT	A β_{42} Response to GSMs			
				50 μ M Sulindac Sulfide	1 μ M GSM-1	1 μ M Eisai	1 μ M TorreyPines
	PS1 Wildtype			+	+++	+++	+++
	PS1 FAD Mutants						
TMD I	Δ M83/84	36y	\uparrow	-	++		
HL I	T116N	37.5y	$\uparrow\uparrow$	+	+++		
	P117L	31.6y	$\uparrow\uparrow\uparrow$	-	+++	+++	+++
TMD II	N135D	34-38y	$\uparrow\uparrow$	+	+++		
	N135S	33.4y	$\uparrow\uparrow\uparrow$	-	+		
	M146L	39.9y	$\uparrow\uparrow$	++	+++	+++	+++
TMD III	L166P	24y	$\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	-	-	-	-
	S170F	27.9y	$\uparrow\uparrow\uparrow$	-	+		
	L173W	26.5y	$\uparrow\uparrow\uparrow$	-	++		
TMD IV	G206V	33y	$\uparrow\uparrow$	+	+++		
TMD V	M233V	32y	$\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	-	+++	+++	+++
TMD VI	A246E	52.5y	\uparrow	+	+++		
	Y256S	27.5y	$\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	-	+++	+++	+++
HL 6	A285V	50.5y	$\uparrow\uparrow$	+	+++		
	L286V	47.5y	$\uparrow\uparrow$	-	+++		
	Δ Exon9	45.5y	$\uparrow\uparrow$	-	++	++	+++
TMD VII	G378E	37.5y	$\uparrow\uparrow\uparrow$	-	+++		
	L381V	30.5y	$\uparrow\uparrow$	-	++		
	G384A	34.9y	$\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	-	+++	+++	+++
	F386S	N.D.	$\uparrow\uparrow$	-	++		
TMD VIII	L424R	30y	$\uparrow\uparrow$	-	++		
TMD IX	A434C	30.3y	$\uparrow\uparrow$	-	+++		
	P436Q	28.3y	\uparrow	-	++		
	PS1 Synthetic Mutants						
TMD II	N135I		$\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	-	-	-	-
TMD III	L166E		$\uparrow\uparrow\uparrow$	-	-	-	-
	L166S		$\uparrow\uparrow\uparrow$	-	-	-	-
	L166A		$\uparrow\uparrow$	-	+		
	L166R		$\uparrow\uparrow$	-	-		
	L166C		\uparrow	-	++		
	L166V		\uparrow	+	+++		
	L166W		\uparrow	-	+		
TMD VII	G382A		\uparrow	-	+++		
	L383W		$\uparrow\uparrow$	-	-	-	+
HL 8	P433A		\uparrow	-	+++		
TMD IX	L435V		\leftrightarrow	+	+++		
	PS2 Wildtype			+	++/+++		
	PS2 FAD Mutants						
TMD II	N141I	56.9y	$\uparrow\uparrow$	-	-		
TMD V	M239V	50y	\uparrow	-	+		
	PS2 Synthetic Mutants						
TMD III	L172P		$\uparrow\uparrow\uparrow$	-	+		
TMD VII	G365A		$\uparrow\uparrow\uparrow$	-	+		

* Data are from the Alzheimer Disease and Frontotemporal Dementia Mutation Database.

A β_{38} (Fig. 7C). Thus, the analyzed mutants showed very similar A β_{42} responses to second generation GSMs structurally different from GSM-1. We conclude that potent second generation GSMs of distinct structural classes are suitable to lower A β_{42} for a number of PS mutants.

DISCUSSION

Many FAD mutations in PS, in particular aggressive ones, are known to resist low potency A β_{42} -lowering drugs such as sulindac sulfide and others (9, 22, 23). Two previously analyzed mutants, PS1 L166P and PS2 N141I, were also shown to be resistant to the more potent second-generation compound GSM-1 (9). Together, these data have led to the concept that A β_{42} generation may not be inhibitable by GSMs for strong FAD mutations. Unexpectedly, we now found that several but not all aggressive mutations in PS can be effectively modulated by GSM-1. The A β_{42} -responsive mutants identified were widespread over the entire PS molecule.

Although their A β_{42} responses to GSM-1 varied in their strength and rather depended on the particular mutation, they were apparently independent of the levels of A β_{42} they generated. Besides the known GSM-1-resistant PS1 L166P and PS2 N141I mutations, only a few other PS mutations were identified to confer resistance to GSM-1. Interestingly, homologous PS1 and PS2 mutations could display differential responses, suggesting that a positive A β_{42} response depends on the particular mutation and its spatial environment in PS.

For many mutants, the A β_{42} response profiles for sulindac sulfide and GSM-1 were similar, suggesting that these modulators act also mechanistically very similar. Accordingly, with respect to drug action, GSM-1 may have a higher affinity to the GSM binding site than for example the low potency drug sulindac sulfide, thus being more potent than this compound. PS mutations may weaken the binding affinity of a low potency GSM but not of a high potency GSM, thus dif-

Overcoming GSM Resistance of Pathogenic PS Mutants

ferentially affecting the modulatory capacity of certain GSMs on $A\beta_{42}$ generation. In that regard, the PS1 L166P mutation is apparently rather an exception as it neither responded to GSM-1 nor to other potent GSMs of different structural class (see below). Moreover, the PS1 Leu-166 residue appears to be critical for GSM-1 action, as a number of the analyzed additional mutations were either not, or at best only moderately, responsive to GSM-1. Only the conservative L166V mutant showed a comparable $A\beta_{42}$ response to WT PS1.

Despite differences in the response of the PS mutants with respect to the capacity to lower $A\beta_{42}$, sulindac sulfide and GSM-1 elicited in all cases an increase of $A\beta_{38}$ generation. Consistent with being the more potent drug, the increases of $A\beta_{38}$ generation induced by GSM-1 were also much stronger than that of sulindac sulfide. The question of how it is possible that for a given mutation $A\beta_{42}$ cannot be lowered by a certain GSM, whereas $A\beta_{38}$ can still be increased (9, 23), is also not readily explainable by our present study. This question can probably only be resolved when suitable cross-linkable second-generation GSM reagents become available to identify their binding site(s), which once known may shed light on these mechanistic issues. In the absence of such reagents, mutational analyses are reasonable experimental tools to probe GSM binding sites. Unfortunately, no mutation has so far been identified that blocks the modulatory capacity of GSMs on all $A\beta$ species, which would be indicative that a common GSM binding site was destroyed. Although our data can, thus, also not fully clarify whether GSMs target the substrate, the protease, and/or both, the differential responses of GSMs to PS mutations may be more compatible with a GSM binding site(s) in γ -secretase, probably within the catalytic subunit PS itself. With respect to this view, we found that, interestingly, WT PS2 displayed attenuated $A\beta_{42}$ responses to GSM-1 as compared with WT PS1. In addition, all analyzed PS2 mutants were resistant to GSM-1. These differences in GSM response between the two PSs may also be easier to reconcile with an enzyme-located GSM binding site.

The $A\beta_{42}$ responses of several PS mutants analyzed that were positive for GSM-1 were also positive for other potent second-generation compounds from Eisai and TorreyPines Therapeutics (10). Likewise the GSM-1-resistant mutants such as PS1 L166P were also resistant to the Eisai and the TorreyPines compounds. This may be surprising as these compounds are structurally different from GSM-1, indicating that the GSM binding site is rather flexible and can thus also accommodate, probably by an induced-fit mechanism, structurally distinct GSMs with high affinity. Another interesting feature of GSM-1-responsive mutants was that besides $A\beta_{42}$, $A\beta_{40}$ could also be inhibited in several cases. This was very prominent for the PS1 G384A mutant, for which $A\beta_{38}$ became the principal species in response to GSM-1, and also for the Eisai and TorreyPines compounds (Table 1). The reduction of $A\beta_{40}$ generation is typical for GSMs of these potent compound classes (10, 33).

In conclusion, our data show that the resistance of many PS mutations to low potency drugs can be overcome by GSMs with higher potencies such as GSM-1 (see Table 2 for a summary). Potent GSMs that may become available for AD

therapy could therefore also be useful to treat patients suffering from FAD caused by PS mutations when a careful preclinical analysis of their suitability with respect to the particular mutation carried by the patient is undertaken. In that respect, our data reinforce the notion that not all transgenic AD mouse models are suitable for preclinical studies with GSMs and thus have to be carefully selected. Our study indicates that their suitability depends both on the particular GSM to be tested and the particular PS mutant expressed as transgene. Thus, although PS1 L166P and PS2 N141I mouse models (34, 35) may not be suitable for GSM testing *in vivo* (9), other AD mouse models such as the APP23/PS45 (swAPP/PS1 G384A) mouse with similarly fast $A\beta$ deposition (36) are expected to be better suited for the *in vivo* analysis of GSMs in preclinical settings.

Acknowledgment—We thank Manfred Brockhaus for the $A\beta_{40}$ - and $A\beta_{42}$ -specific antibodies.

REFERENCES

- Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002) *Science* **297**, 353–356
- Haass, C. (2004) *EMBO J.* **23**, 483–488
- Steiner, H., Fluhrer, R., and Haass, C. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 29627–29631
- Tolia, A., and De Strooper, B. (2009) *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 211–218
- Wolfe, M. S. (2009) *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 219–224
- Steiner, H. (2008) *Curr. Alzheimer Res.* **5**, 147–157
- Tomita, T. (2009) *Expert Rev. Neurother.* **9**, 661–679
- Weggen, S., Eriksen, J. L., Das, P., Sagi, S. A., Wang, R., Pietrzik, C. U., Findlay, K. A., Smith, T. E., Murphy, M. P., Bulter, T., Kang, D. E., Marquez-Sterling, N., Golde, T. E., and Koo, E. H. (2001) *Nature* **414**, 212–216
- Page, R. M., Baumann, K., Tomioka, M., Pérez-Revuelta, B. I., Fukumori, A., Jacobsen, H., Flohr, A., Luebbbers, T., Ozmen, L., Steiner, H., and Haass, C. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 677–683
- Kounnas, M. Z., Danks, A. M., Cheng, S., Tyree, C., Ackerman, E., Zhang, X., Ahn, K., Nguyen, P., Comer, D., Mao, L., Yu, C., Pleynt, D., Digregorio, P. J., Velicelebi, G., Stauderman, K. A., Comer, W. T., Mobley, W. C., Li, Y. M., Sisodia, S. S., Tanzi, R. E., and Wagner, S. L. (2010) *Neuron* **67**, 769–780
- Kukar, T. L., Ladd, T. B., Bann, M. A., Fraering, P. C., Narlawar, R., Maharvi, G. M., Healy, B., Chapman, R., Welzel, A. T., Price, R. W., Moore, B., Rangachari, V., Cusack, B., Eriksen, J., Jansen-West, K., Verbeeck, C., Yager, D., Eckman, C., Ye, W., Sagi, S., Cottrell, B. A., Torpey, J., Rosenberry, T. L., Fauq, A., Wolfe, M. S., Schmidt, B., Walsh, D. M., Koo, E. H., and Golde, T. E. (2008) *Nature* **453**, 925–929
- Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Smith, T. E., Weggen, S., Das, P., McLendon, D. C., Ozols, V. V., Jessing, K. W., Zavitz, K. H., Koo, E. H., and Golde, T. E. (2003) *J. Clin. Invest.* **112**, 440–449
- Page, R. M., Gutsmiedl, A., Fukumori, A., Winkler, E., Haass, C., and Steiner, H. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 17798–17810
- Kukar, T., Murphy, M. P., Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Weggen, S., Smith, T. E., Ladd, T., Khan, M. A., Kache, R., Beard, J., Dodson, M., Merit, S., Ozols, V. V., Anastasiadis, P. Z., Das, P., Fauq, A., Koo, E. H., and Golde, T. E. (2005) *Nat. Med.* **11**, 545–550
- Munter, L. M., Voigt, P., Harmeyer, A., Kaden, D., Gottschalk, K. E., Weise, C., Pipkorn, R., Schaefer, M., Langosch, D., and Multhaup, G. (2007) *EMBO J.* **26**, 1702–1712
- Richter, L., Munter, L. M., Ness, J., Hildebrand, P. W., Dasari, M., Unterreitmeier, S., Bulic, B., Beyermann, M., Gust, R., Reif, B., Weggen, S., Langosch, D., and Multhaup, G. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 14597–14602
- Beel, A. J., Barrett, P., Schnier, P. D., Hitchcock, S. A., Bagal, D., Sanders, C. R., and Jordan, J. B. (2009) *Biochemistry* **48**, 11837–11839
- Weggen, S., Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Pietrzik, C. U., Ozols, V., Fauq, A.,

Overcoming GSM Resistance of Pathogenic PS Mutants

- Golde, T. E., and Koo, E. H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 31831–31837
19. Takahashi, Y., Hayashi, I., Tominari, Y., Rikimaru, K., Morohashi, Y., Kan, T., Natsugari, H., Fukuyama, T., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 18664–18670
20. Beher, D., Clarke, E. E., Wrigley, J. D., Martin, A. C., Nadin, A., Churcher, I., and Shearman, M. S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 43419–43426
21. Lleó, A., Berezovska, O., Herl, L., Raju, S., Deng, A., Bacskai, B. J., Frosch, M. P., Irizarry, M., and Hyman, B. T. (2004) *Nat. Med.* **10**, 1065–1066
22. Czirr, E., Leuchtenberger, S., Dorner-Ciossek, C., Schneider, A., Jucker, M., Koo, E. H., Pietrzik, C. U., Baumann, K., and Weggen, S. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 24504–24513
23. Czirr, E., Cottrell, B. A., Leuchtenberger, S., Kukar, T., Ladd, T. B., Esselmann, H., Paul, S., Schubel, R., Torpey, J. W., Pietrzik, C. U., Golde, T. E., Wiltfang, J., Baumann, K., Koo, E. H., and Weggen, S. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 17049–17054
24. Yamasaki, A., Eimer, S., Okochi, M., Smialowska, A., Kaether, C., Baumeister, R., Haass, C., and Steiner, H. (2006) *J. Neurosci.* **26**, 3821–3828
25. Shirovani, K., Tomioka, M., Kremmer, E., Haass, C., and Steiner, H. (2007) *Neurobiol. Dis.* **27**, 102–107
26. Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., and Haass, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 39062–39065
27. Moehlmann, T., Winkler, E., Xia, X., Edbauer, D., Murrell, J., Capell, A., Kaether, C., Zheng, H., Ghetti, B., Haass, C., and Steiner, H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 8025–8030
28. Moliaka, Y. K., Grigorenko, A., Madera, D., and Rogae, E. I. (2004) *FEBS Lett.* **557**, 185–192
29. Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. L., Baumeister, R., Fechteler, K., and Haass, C. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 848–851
30. Pérez-Revuelta, B. I., Fukumori, A., Lammich, S., Yamasaki, A., Haass, C., and Steiner, H. (2010) *J. Neurochem.* **112**, 940–950
31. Nakaya, Y., Yamane, T., Shiraishi, H., Wang, H. Q., Matsubara, E., Sato, T., Dolios, G., Wang, R., De Strooper, B., Shoji, M., Komano, H., Yanagisawa, K., Ihara, Y., Fraser, P., St George-Hyslop, P., and Nishimura, M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 19070–19077
32. Wang, J., Beher, D., Nyborg, A. C., Shearman, M. S., Golde, T. E., and Goate, A. (2006) *J. Neurochem.* **96**, 218–227
33. Portelius, E., Van Broeck, B., Andreasson, U., Gustavsson, M. K., Mercken, M., Zetterberg, H., Borghys, H., and Blennow, K. (2010) *J. Alzheimers Dis.* **21**, 1005–1012
34. Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S. A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stolze, L., Calhoun, M. E., Jäggi, F., Wolburg, H., Gengler, S., Haass, C., Ghetti, B., Czech, C., Hölscher, C., Mathews, P. M., and Jucker, M. (2006) *EMBO Rep.* **7**, 940–946
35. Richards, J. G., Higgins, G. A., Ouagazzal, A. M., Ozmen, L., Kew, J. N., Bohrmann, B., Malherbe, P., Brockhaus, M., Loetscher, H., Czech, C., Huber, G., Bluethmann, H., Jacobsen, H., and Kemp, J. A. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 8989–9003
36. Busche, M. A., Eichhoff, G., Adelsberger, H., Abramowski, D., Wiederhold, K. H., Haass, C., Staufenbiel, M., Konnerth, A., and Garaschuk, O. (2008) *Science* **321**, 1686–1689