

Nina Stemmer

**Alzheimer-Krankheit:
Bindepartner und Prozessierung
des Amyloid Precursor Proteins**

2008

Biochemie

**Alzheimer-Krankheit:
Bindepartner und Prozessierung
des Amyloid Precursor Proteins**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Nina Stemmer

aus Gütersloh

- Bielefeld/Hamburg · Mai 2008 -

Universität Hamburg

Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg
Institut für die Biosynthese von neuronalen Strukturen
Prof. Dr. M. Schachner
Falkenried 94
D-20251 Hamburg



ZMNH

Universität Bielefeld

Fakultät für Chemie
Biochemie II
Prof. Dr. J. Frey
Universitätsstr. 25
D-33615 Bielefeld



BIOCHEMIE II

Betreuer/1. Gutachter : Prof'in Dr. M. Schachner
Prof. Dr. J. Frey
2. Gutachter : Prof'in Dr. G. Fischer von Mollard
Tag der mündlichen Prüfung : 07.07.2008

IN GEDENKEN AN KAI

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben. Die verwendete Literatur und sonstige Hilfsmittel sind vollständig angegeben.

N. Sturm

Hamburg, Mai 2008

Inhaltsverzeichnis

Deckblatt	I
Erklärung	VII
Inhaltsverzeichnis	XIII
Kurzfassung	XV
Abstract	XVII
1 Einleitung	1
1.1 Die Alzheimer-Krankheit	1
1.2 Amyloid Plaques und A β Toxizität	3
1.3 Das Zelladhäsionsmolekül APP	5
1.4 Prozessierung von APP	7
1.4.1 Der nicht-amyloidogene Weg	7
1.4.2 Der amyloidogene Weg	9
1.5 Mutationen des <i>Amyloid Precursor Proteins</i>	9
1.6 β -Sekretase	10
1.7 γ -Sekretase	11
1.7.1 Presenilin	13
1.7.2 Nicastrin	15
1.7.3 Aph-1 und Pen-2	16
1.8 Das Zelladhäsionsmolekül L1	17
1.9 APP-Bindepartner	19
1.9.1 Kreatinkinase	20
1.9.2 Calretikulin	21
1.10 Proteasen	23
1.10.1 Metzinkine	23
1.10.1.1 ADAMs	24
1.10.1.2 MMPs	26
1.11 Aufgabenstellung	28
2 Material	29
2.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	29
2.2 Reaktionskits und Enzyme	30
2.3 Antibiotika	31
2.4 Detergenzien	31
2.5 Inhibitoren	32
2.6 Zelllinien	32
2.7 Basiszelllinien	32
2.8 Stabil transfizierte Zelllinien	32

2.9	Kultivierung und Langzeitlagerung von Zellen	33
2.9.1	Kultivierung	35
2.9.2	Langzeitlagerung	35
2.10	<i>E.coli</i> -Stämme	35
2.10.1	Stammhaltung und Kultivierung von <i>E.coli</i>	36
2.10.1.1	Stammhaltung	36
2.10.1.2	Kultivierung	36
2.11	Vektoren	36
2.12	Expressionskonstrukte	37
2.13	Antikörper	39
2.13.1	Primärantikörper	39
2.13.2	Sekundärantikörper	42
2.14	Metalloproteasen	43
2.15	Peptide	43
2.16	GST-Proteine	43
2.17	Molekulargewicht-Standards	44
2.18	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	44
3	Methoden	46
3.1	Biochemische Methoden	46
3.1.1	Eindimensionale SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	46
3.1.2	Trizin-SDS-PAGE	47
3.1.3	Zymographie	49
3.1.4	SDS-Gelfärbung	50
3.1.4.1	Coomassie-Färbung	50
3.1.4.2	Silberfärbung	51
3.1.5	Immunoblot-Analyse	52
3.1.5.1	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen	52
3.1.5.2	Immunreaktion	53
3.1.5.3	ECL-Reaktion	53
3.1.6	Proteinfällung	53
3.1.6.1	Proteinfällung nach Wessel	54
3.1.6.2	Acetonfällung	54
3.1.7	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration (BCA-Test)	55
3.1.8	Zellfraktionierung	55
3.1.8.1	Herstellung eines Mausgehirn-Homogenates	56
3.1.8.2	Herstellung der löslichen Fraktion S1 und des „17000 * g“ - Sedimentes3 aus Mausgehirn-Homogenat	57
3.1.8.3	Isolierung von Fraktionen, angereichert mit Synaptosomen, Myelin, Axolemma und Mitochondrien	57
3.1.9	Lösen von Membranbestandteilen	59
3.1.10	Aufreinigung des anti-D-Antikörpers	60
3.1.10.1	Isolierung des anti-D-IgG mit Hilfe des DEAE Kit (Bio-Rad)	60
3.1.10.2	Isolierung des anti-D-IgG durch Protein A	61
3.1.11	Konzentration einer Probe	61
3.1.12	Herstellung einer Säule für die Affinitätschromatographie	62
3.1.12.1	Kopplung des anti-D IgG an die Matrix einer CarboLink Säule	62
3.1.12.2	Kopplung des anti-D-IgG an CNBr-aktivierte Sepharose-4B	63

3.1.13	Affinitätschromatographie	64
3.1.14	Probenvorbereitung für die Sequenzanalyse	66
3.1.15	Immunpräzipitation	66
3.1.16	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	67
3.1.17	Aufreinigung der GST-Proteine	68
3.1.18	<i>pulldown</i> -Untersuchung	69
3.1.19	γ -Sekretasekomplex Isolierung	70
3.1.20	γ -Sekretase Aktivitätsbestimmung	71
3.1.21	<i>in vitro</i> γ -Sekretaseaktivitätsuntersuchung	72
3.1.22	Oberflächenbiotinylierung	73
3.1.23	<i>in vitro</i> -Spaltexperimente	74
3.1.23.1	ADAM-vermittelte Spaltung von Fc-Proteinen	74
3.1.23.2	Aktivierung von MMP-2	75
3.1.23.3	MMP-vermittelte Spaltung von Fc-Proteinen	75
3.2	Molekularbiologische Methoden	76
3.2.1	PCR	76
3.2.2	Aufreinigung von PCR-Produkten	76
3.2.3	Restriktionsverdau	77
3.2.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS	77
3.2.5	Ligation von DNS	78
3.2.6	Transformation von Bakterien	79
3.2.7	Minipräparation von Plasmid-DNS aus <i>E.coli</i> -Bakterienkulturen	79
3.2.8	Maxipräparation von Plasmid-DNS aus <i>E.coli</i> -Bakterienkulturen	80
3.2.9	DNS-Isolation aus Agarosegelen	81
3.2.10	DNS-Reinheitsanalyse und -Konzentrationsbestimmung	81
3.2.11	DNS-Sequenzierung	81
3.3	Zellbiologische Methoden	82
3.3.1	Transiente Transfektion	82
3.3.1.1	Transfektion mit Lipofektamin	82
3.3.1.2	Transfektion mit FuGENE	83
3.3.1.3	Magnet Assisted Transfection (MATra)	84
3.3.2	Aufarbeitung von Zellen und Zellkulturüberständen	84
3.3.3	Durchflusszytometrie	85
3.3.4	Primärzellkultur	86
3.3.4.1	Beschichtung von Deckgläsern mit poly-L-Lysin (PLL)	86
3.3.4.2	Einzelzellkulturen von hippocampalen Neuronen	86
3.3.5	Immunhistochemie	88
3.4	Theoretische Analyse	89
3.4.1	Komplementäre Hydropathie	89
3.4.1.1	Kyte-Doolittle Hydropathie-Profil	89
3.4.1.2	Theorie der molekularen Grundlage komplementärer Peptidinteraktionen	91
3.4.2	Sequenzanalyse	93
4	Ergebnisse	94
4.1	Identifikation APP-bindender Proteine	94
4.1.1	Studie 1: Identifizierung neuer Bindepartner der APP γ -Spaltstelle	96
4.1.1.1	Charakterisierung der anti-D-Antikörper	96
4.1.1.2	Expression von APP in den verschiedenen Gehirnfractionen	97

4.1.1.3	Charakterisierung der vom anti-D-IgG erkannten Proteine	97
4.1.1.4	Affinitätschromatographie	99
4.1.1.5	Sequenzanalyse der ausgeschnittenen Proteinbanden	101
4.1.1.6	Überprüfen des Vorkommens der identifizierten Proteine in den, durch die Affinitätschromatographie erhaltenen, Elutionsfraktionen	109
4.1.1.7	Überprüfen einer möglichen Interaktion der identifizierten Proteine und APP mittels Co-Immunpräzipitation	110
4.1.1.8	Überprüfen einer Bindung der Na ⁺ -/K ⁺ -ATPase und APP mittels ELISA	111
4.1.1.9	Überprüfen einer Bindung der möglichen APP-Bindepartner und Presenilin mittels Co-Immunpräzipitation	112
4.1.2	Studie 2: Charakterisierung der Interaktion von APP und der CK-B	113
4.1.2.1	Co-Immunpräzipitation der Kreatinkinase-B und APP	113
4.1.2.2	Oberflächenbiotinylierung	114
4.1.3	Studie 3: Charakterisierung der Interaktion von CRT und APP hinsichtlich APP- γ -Spaltung	116
4.1.3.1	Bestätigung der Bindung von CRT und APP mittels Co-Immunpräzipitation	116
4.1.3.2	Überprüfen einer Bindung von CRT und C99-APP mittels Co-Immunpräzipitation	117
4.1.3.3	Charakterisierung der Bindung von CRT und C99-APP durch <i>Pulldown</i> -Untersuchungen	118
4.1.3.4	Überprüfen einer Bindung von CRT und PS1 durch Co-Immunpräzipitation	119
4.1.3.5	Bestätigung einer Interaktion von APP, CRT und PS1 mittels Co-Lokalisations-Experimenten	121
4.1.3.6	Charakterisierung der Bindung von CRT und PS1 durch <i>pull-down</i> Untersuchungen	122
4.1.3.7	Isolierung des γ -Sekretasekomplexes	122
4.1.3.8	Aufreinigung der γ -Sekretase in vier Schritten	123
4.1.3.9	Überprüfen einer Bindung von CRT und NCT, APH-1 sowie PEN-2 mittels Co-Immunpräzipitation	124
4.1.3.10	Charakterisierung der Interaktion von CRT und NCT durch <i>Pulldown</i> -Untersuchungen	124
4.1.4	Analyse eines Einflusses von CRT auf die γ -Spaltung von APP	125
4.1.4.1	Analyse der Zelloberflächenkonzentration von APP mittels Oberflächenbiotinylierung	125
4.1.4.2	Analyse der Zelloberflächenkonzentration von APP mittels Durchflusszytometrie	126
4.1.4.3	γ -Sekretase-Aktivitätsbestimmung mittels ELISA	128
4.1.4.4	<i>in vitro</i> - γ -Sekretase-Aktivitätsuntersuchung	128
4.1.4.5	Analyse des PS1-Einflusses auf CRT	129
4.1.4.6	Überprüfen einer Interaktion von CRT und L1 mittels Co-Immunpräzipitation	130
4.1.4.7	Charakterisierung der Interaktion von CRT und L1 mittels Co-Immunpräzipitation	131
4.1.4.8	Analyse eines CRT-Einflusses auf die Expression und Lokalisation von L1	132

4.2	Prozessierung der Zelladhäsionsmoleküle APP und L1	134
4.2.1	ADAM vermittelte Spaltung	134
4.2.2	Gelatinasespaltung	135
5	Diskussion	138
5.1	Diskussion der möglichen Bindepartner von APP und der daraus ersichtlichen Funktionen	138
5.2	Kreatinkinase-B: ein APP-Bindepartner? - Kritische Einschätzung der angewandten Methoden	149
5.3	Charakterisierung der Interaktion von APP und CRT	151
5.4	Metalloprotease-vermittelte Spaltung der Zelladhäsionsmoleküle APP und L1	157
5.5	Allgemeine Einschätzung der Ergebnisse	160
	Literatur	161
	Anhang A Akzessionsnummer	195
	Anhang B Oligonukleotide	195
	Anhang C Plasmide	196
	L1-30kDa	196
	L1-ICD	196
	Abkürzungsverzeichnis	197
	Abbildungsverzeichnis	202
	Tabellenverzeichnis	204
	Danksagung	205

Kurzfassung

Die Alzheimer-Krankheit ist die häufigste Form der Demenz, bis heute nur teilweise verstanden und nicht therapierbar. Mit steigender Lebenserwartung gewinnt sie zunehmend an Bedeutung, wodurch das Aufklären der molekularen Abläufe immer wichtiger wird. Dabei ist das, durch amyloidogene Prozessierung des *Amyloid Precursor Proteins* (APP) entstehende, A β -Peptid sowohl durch Aggregation und Ablagerung in Amyloid Plaques als auch in löslicher Form maßgeblich an der Pathologie der Krankheit beteiligt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Bindepartner der APP- γ -Spaltstelle, eingeschlossen der Na⁺-/K⁺-ATPase, HXK1, DNMI, MAG und 14-3-3, identifiziert und eine mögliche Funktion bei der γ -Sekretase-vermittelten Spaltung diskutiert. Des Weiteren wurde die schon bekannte Interaktion von APP und Calretikulin (CRT) hinsichtlich einer Beteiligung an dem Vorgang der A β -Produktion charakterisiert. Die über die C-Domäne erfolgende Bindung an APP ist nicht Oligosaccharid-vermittelt, wie bereits publiziert, und entspricht demnach nicht der Chaperonfunktion von CRT. Darüber hinaus interagiert CRT P-Domänen-vermittelt auch mit Presenilin 1 (PS1), der katalytischen Komponente des γ -Sekretasekomplexes, wobei eine generelle Beteiligung des Proteins an dem Vorgang der γ -Spaltung jedoch noch nicht ganz geklärt ist. CRT scheint jedoch substratspezifisch zu agieren. Während die Sekretase-vermittelte Spaltung von APP durch das Chaperon wahrscheinlich inhibiert wird, fördert es möglicherweise die L1-Prozessierung durch den Enzymkomplex, wobei die einzelnen CRT-P-Domänen einen jeweils gegensätzlichen Effekt haben. Demnach agiert CRT für APP als eine Art *gatekeeper* mit einer, vor der amyloidogenen Proteolyse, schützenden Funktion, die durch einen noch unbekanntem Stimulus induziert und durch Trennung des Chaperons von dem Zelladhäsionsmolekül aufgehoben wird, wie es bereits bei der nur PS1-bindenden CRT-P-Domäne der Fall ist. Im Gegensatz dazu hat CRT hinsichtlich L1 wahrscheinlich eine γ -Proteolyse fördernde Funktion. Das Substrat wird zuerst von dem Chaperon, nicht von der CRT-P-Domäne, gebunden und so an das aktive Zentrum der Sekretase herangeführt, die nach Bindung beider Proteine die Spaltung des Zelladhäsionsmoleküls ausführt. Anschließend könnte CRT allein oder, zur Stabilisation von A β , mit dem Peptid assoziiert den Komplex verlassen. Ein die Arbeit abschließender proteolytischer Vergleich von APP und L1 durch verschiedene Metalloproteasen zeigt viele Parallelen auf, die Rückschlüsse über Gemeinsamkeiten der jeweiligen Prozessierungen sowie entsprechenden Krankheitsverläufe zulassen.

Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, wie komplex und noch wenig verstanden sowohl die amyloidogene Spaltung als auch die physiologische Funktion von APP und der an das Zelladhäsionsmolekül bindenden Proteine ist.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent form of dementia, up to now only partially understood and not curable. Its importance rises with increasing life expectancy and therefore the elucidation of the molecular processes of AD becomes crucial. The A β -peptide, which is produced by the amyloidogenic proteolysis of the Amyloid Precursor Protein (APP), is a main cause of the pathology by Amyloid plaque formation as well as in soluble form. In the context of this work several proteins binding to the APP γ -cleavage site are identified, including Na⁺-/K⁺-ATPase, HXK1, DNMI, MAG and 14-3-3 and a possible role concerning the γ -secretase cleavage is discussed. Furthermore the already known interaction of APP and calreticulin (CRT) is characterized regarding an involvement in the production of A β . The binding of the CRT-C-domain to APP is not mediated by oligosaccharides and thus does not correspond to the proteins chaperone function. CRT (P-domain) also interacts with Presenilin 1 (PS), the catalytic subunit of the γ -secretase. A general attendance of the protein in the process of γ -cleavage remains unclear, but it seems to act substrate specific. On the one hand the secretase cleavage of APP is probably inhibited by the chaperone and on the other hand it maybe promotes the L1-proteolysis mediated by the enzyme complex. In both cases the CRT-P-domain has opposite effects. According to this, CRT functions as a kind of gatekeeper and protects APP against amyloidogenic processing. The protective effect is abolished by separation of the chaperone from the cell adhesion molecule after occurrence of a yet unknown stimulus which is also the case for the exclusively PS1-binding CRT-P-domain. In contrast to this L1 is probably bound by CRT, not by CRT-P-domain, and introduced to the γ -secretase which cleaves the cell adhesion molecule after association of both proteins. CRT afterwards leaves the complex either alone or for stabilization of A β in attendance of the peptide. Finally a comparison of the proteolytic processing of APP and L1 by different metalloproteases points out many parallels that allow conclusions concerning similarities of the particular processing and accordant etiopathology. Consolidated this work points out how complex and little understood the amyloidogenic APP-cleavage as well as the physiological functions of APP and its binding partners are.

1 Einleitung

Demenzkrankungen gewinnen aufgrund der kontinuierlich steigenden Lebenserwartung und der immer größer werdenden Bevölkerungsgruppe der über 65-Jährigen zunehmend an klinischer, sozialer und auch ökonomischer Bedeutung. Dabei sind sie nach kardiovaskulären Erkrankungen und bösartigen Tumoren bereits die derzeit dritthäufigste Todesursache (Jellinger et al., 2008). Die Alzheimer-Krankheit (Kap. 1.1, S. 1) stellt mit etwa 65% bis 70% der Fälle die häufigste Demenzform dar (Schmidtke, 2005; Blennow et al., 2006). Aufgrund der steigenden Anzahl potentiell betroffener Menschen ist es von großer Bedeutung, eine entsprechende Behandlungsmöglichkeit zu finden. Eines an der Pathologie der AD hauptsächlich beteiligten Proteine ist das Amyloid Vorläuferprotein (APP; Kap. 1.3, S. 5). Durch definierte Proteolyse mittels Sekretasen entsteht das $A\beta$ -Peptid, welches sowohl in löslicher Form verschiedene zytotoxische Funktionen hat als auch den Hauptbestandteil der extrazellulären Amyloid Plaques (Kap. 1.2, S. 3), ein typisches Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit, darstellt. Dabei sind das Verständnis der γ -Spaltung sowie der γ -Sekretase und möglichen, an diesem Spaltvorgang beteiligten Proteine, wichtig für eine Klärung der Entstehung sowie des Verlaufs dieser Krankheit und damit der Möglichkeit eine Therapie und/oder Prävention zu entwickeln.

Das erste Kapitel behandelt die Pathologie und den aktuellen Forschungsstand der Alzheimer-Krankheit im Hinblick auf den amyloiden Verlauf sowie APP, deren Bindepartner und die an dem γ -Spaltvorgang beteiligten Proteine und schließt mit der Zielsetzung der Arbeit. Während Kapitel zwei das verwendete Material enthält, beschreibt das dritte Kapitel die eingesetzten Methoden. Im Kapitel vier der Arbeit werden die Ergebnisse der biochemischen, zell- und molekularbiologischen Untersuchungen erläutert und diese sowie ihre Relevanz für die Alzheimer-Erkrankung in dem fünften Kapitel diskutiert.

1.1 Die Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit (AD), auch Morbus Alzheimer oder “Demenz vom Alzheimer-Typ”, wurde erstmals 1906 von dem Würzburger Psychiater Alois Alzheimer (1864-1915) bei seiner Patientin Auguste Deter beobachtet und nach Sektion des Hirns der Verstorbenen als eine “eigenartige Krankheit der Hirnrinde” beschrieben (Alzheimer, 1907), die hauptsächlich ältere Menschen betrifft und mit einem fortschreitenden Verlust der mentalen Fähigkeiten verbunden ist. (Keine Autoren angegeben, übersetzt von Jarvik & Greenson, 1987). Das

Gehirn der Patientin wies neben einem Verlust von Neuronen die Bildung von intrazellulären Fibrillenbündeln und extrazellulären Amyloid Plaques auf (Abb. 1.1, S. 2; Kap. 1.2, S. 3).

A



B

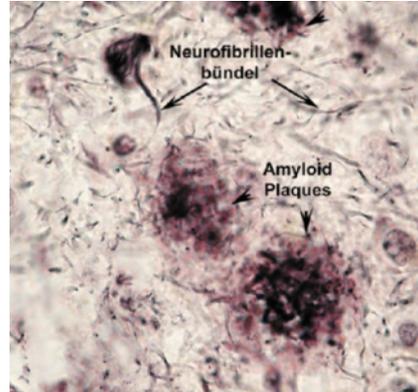


Abb. 1.1: A. Alzheimer & die Originalaufnahme des Gehirns seiner Patientin Auguste D.

Wie von Alois Alzheimer (A) beschrieben sind das Gehirn seiner verstorbenen Patientin Auguste D. betrachtet neben einer Neurodegeneration sowohl intrazelluläre Neurofibrillenbündel (Pfeile) als auch extrazelluläre Ablagerungen, die Amyloid Plaques (Pfeilspitzen), zu erkennen (B). [Silberfärbung, aus den Archiven des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung, München. (Priller, 2006, S.2)]

1910 wird dieses Krankheitsbild von Kraepelin charakterisiert und nach seinem Entdecker benannt (Kraepelin, 1910). Klinisch gesehen ist Morbus Alzheimer eine progressiv fortschreitende Krankheit, welche sich durch eine anfängliche Gedächtnisschwäche auszeichnet, die im Verlauf zunimmt und zu einem völligen Verlust der Urteilsfähigkeit sowie der Persönlichkeit führen kann - begleitet von Ausprägungen bzw. Defiziten in einem oder mehreren der folgenden kognitiven Bereiche: Aphasie (Sprachstörungen), Agnosie (die Unfähigkeit, Personen oder Objekte trotz intakter sensorischer Funktionen zu erkennen), Apraxie (das Fehlen von motorischen Fähigkeiten trotz intakten motorischen Systems) oder Exekutivfunktionen (planen, organisieren, Abläufe ausführen oder geistesgegenwärtig sein) (Brown et al., 2005; Sparks, 2008). Auch Angstzustände und Depressionen treten häufig auf. Vom Zeitpunkt der Diagnose an führt die Krankheit in der Regel nach ca. 5-8 Jahren zum Tod des Patienten (Bracco et al., 1994).

Das Risiko, zwischen einem Lebensalter von 65 und 100 Jahren AD zu bekommen, beläuft sich auf 33% für Männer und 45% für Frauen mit einem jährlichen Anstieg von 1-2% in der siebten bis zu fast 60% in der zehnten Dekade (Jellinger, 2008). Schätzungen zufolge leben derzeit weltweit über 30 Millionen an Alzheimer erkrankte Menschen, wobei allein in Deutschland von über 80.000 Patienten ausgegangen wird. Nach einer 2005 durchgeführten Studie von Ferri und Kollegen steigt diese Zahl von etwa 24 Millionen Menschen im Jahr 2001 auf ca. 81 Millionen im Jahr 2040 (Ferri et al., 2005). Schon 2006 betragen die jährlichen Kosten für die Behandlungen und Versorgung dementer Patienten weltweit schätzungsweise 250 Billionen US Dollar (Winblad et al., 2006).

Betrachtet man die Veränderungen auf der Zellebene, so sind die klinischen Auswirkungen die Konsequenz eines massiven, fortschreitenden Verlustes an Neuronen und Synapsen. Es

werden selektiv Gehirnregionen geschädigt und neurale Prozesse beeinträchtigt, insbesondere Neuronen im Neokortex, Hippocampus, cholinergen System des basalen Vorderhirns, in der Amygdala und den monoaminergen Kernen des Hirnstamms sind betroffen. Die cholinergen Nervenbahnen zwischen basalen Vorderhirnstrukturen, Großhirnrinde und Hippocampus spielen eine zentrale Rolle bei Lern- und Gedächtnisfunktionen, Aufmerksamkeitsverhalten und anderen kognitiven Prozessen (Price et al., 1998). Neben der Neurodegeneration kommt es zu der bereits erwähnten Bildung extrazellulärer Amyloid Plaques (Kap. 1.2, S. 3) und intrazellulärer Fibrillenbündel.

Die Alzheimer-Krankheit lässt sich in zwei Gruppen klinisch und neuropathologisch ähnlicher Krankheitsbilder einteilen: Bei den senilen, sporadischen Formen treten die ersten klinischen Symptome meist erst nach Erreichen des 65. Lebensjahres auf. Dagegen manifestiert sich die Symptomatik der seltener auftretenden presenilen familiären Formen (FAD), die für ca. 1% aller Alzheimer Fälle verantwortlich sind, schon häufig vor dem 50., in Einzelfällen sogar schon vor dem 30. Lebensjahr (Haass and Selkoe, 1993; Selkoe, 1993; Hardy, 1997). Ein großer Teil der FAD tritt infolge autosomal dominanter Mutationen der Gene von APP (Chromosom 21; Goate et al., 1991), Presenilin 1 (Sherrington et al., 1995) und Presenilin 2 (Levy-Lahad, 1995) auf. Es gibt auch genetische Veränderungen, die mit dem Auftreten der senilen AD assoziiert sind, wobei bis heute das Apolipoprotein E Gen (APOE), insbesondere das $\epsilon 4$ Allel, der einzig bestätigte genetische Risikofaktor bleibt, welcher für bis zu 50% der Fälle verantwortlich ist (Rebeck et al., 1993; Waring & Rosenberg, 2008). ApoE4 bindet an A β und kann demzufolge auch in senilen Plaques nachgewiesen werden (Wisniewski & Frangione, 1992). Darüber hinaus wird in der Literatur über zahlreiche mögliche Risikoallele und vielversprechende genetische Variationen berichtet. Neueste Publikationen individueller Studien diesbezüglich sind signifikant häufig verbunden mit dem Sortilin-verwandten Rezeptor (SORL1; Rogaeva et al., 2007), dem Glycin-reichen Protein-2-verbundenen Bindeprotein-2 (GAB2) auf Chromosom 11 (Li et al., 2004), der *death-associated protein kinase 1* (DAPK1; Li et al., 2006), Ubiquilin 1 (UBQLN1; Bertram et al., 2005), dem ATP-Bindekassette Transporter 1, Gruppe A (ABCA1), auf Chromosom 9 (Sundar et al., 2007) und dem *Low-Density Lipoprotein Receptor*-verwandten Protein 6 (LRP6) auf Chromosom 12 (De Ferrari et al., 2007). Obwohl all diesen Varianten die Bestätigung in großen repräsentativen Populationen fehlt, haben sie doch eine Relevanz in neuropathologischen Mechanismen und Signalwegen, die möglicherweise mit der Alzheimer Pathologie verbunden sind (Waring & Rosenberg, 2008).

1.2 Amyloid Plaques und A β Toxizität

Amyloid Plaques stellen eines der charakteristischen Merkmale der Alzheimer-Krankheit (Kap. 1.1, S. 1) dar. Die Bezeichnung "amyloid" bedeutet Stärke-ähnlich und wurde 1851 von Virchow aufgrund seiner Fehlidentifikation der Struktur als Kohlenhydrat geprägt. Es können zwei Arten von extrazellulären Amyloid-Ablagerungen im Parenchym von menschlichen Gehirnen unterschieden werden: neuritische (senile) und nichtneuritische (diffuse) Plaques, wobei

sie sich im Extrazellulärraum bilden und zu 90% aus dem 4kDa großen $A\beta$ -Peptid bestehen (Glenner & Wong, 1984). Bereits 1987 zeigten Kang und Kollegen, dass $A\beta$ ein proteolytisches Spaltprodukt eines höhermolekularen Vorläuferproteins, des etwa 110kDa großen Amyloid Precursor Proteins (APP) ist (Kang et al., 1987). Neuritische Plaques kommen hauptsächlich in der grauen Hirnsubstanz vor (Katzman, 1986) und bestehen im Zentrum aus einem stark verdichteten Kern des Amyloid-Proteins. Die durch Aggregation von $A\beta$ gebildeten Amyloidfibrillen sind von dystroph veränderten Nervenzellfortsätzen umgeben, wobei auch reaktive Astrozyten sowie Mikroglia innerhalb oder in näherer Umgebung seniler Plaques zu finden sind (Selkoe, 1996). Diffuse Plaques enthalten keinen Amyloid-Kern. Ihre Ultrastruktur weist im Gegensatz zu neuritischen Plaques nur einen geringen Anteil an Amyloid-Fibrillen und wenige oder keine neuritischen Veränderungen auf (Terry et al., 1999). Analysen der Amyloid Plaques identifizierten neben der Hauptkomponente $A\beta$ weitere mit diesen Ablagerungen assoziierte Moleküle (Roher et al., 1993), wie z.B. Laminin (Monji et al., 2000), Glykosaminoglykane (Diaz-Nido et al., 2002) und Apolipoproteine (Strittmatter and Roses, 1995). Dabei ist bisher nicht geklärt, wie sich die Zusammensetzung der Plaques definiert und welchen Einfluss sie genau auf die Pathologie der Krankheit nimmt. Die Entstehung der Plaques begründet sich in einer Konformationsänderung von löslichem $A\beta$ zu einer β -Faltblattform, welche anfällig für Aggregationen sowohl zu löslichen Oligomeren als auch zu größeren, unlöslichen Fibrillen ist. Im Verlauf dieses Prozesses regt die fibrinogene $A\beta_{42}$ -Isoform die Aggregation anderer toxisch wirkender Spezies an (Chromy et al., 2003; Deshpande et al., 2006). Neueste Studien identifizieren weitere nicht-fibrilläre $A\beta$ -Ablagerungen (Protofibrillen) mit neurotoxischem Effekt und vermuten, dass die Toxizität dieses dynamischen Gleichgewichts beider Formen die Funktionen von Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen verändert sowie von der jeweiligen Kortexregion abhängt (Irvine et al., 2008). Neben den pathogenen Auswirkungen der in den Plaques abgelagerten, aggregierten Form von $A\beta$ hat dieses auch als lösliches Peptid neurotoxische Funktionen (Butterfield et al., 2007). Dabei fungiert es sowohl extrazellulär (Sotthibundhu et al., 2008), eventuell Zelltyp-spezifisch (Simakova & Arispe, 2007), als auch intrazellulär in Mitochondrien (Rhein & Eckert, 2007; Chen & Yan, 2007), im Endoplasmatischen Retikulum (Ferreiro et al., 2008) und anderen Zellkompartimenten (Barrantes et al., 2007). Die beschriebene Toxizität sowohl der Amyloid Plaques als auch des löslichen $A\beta$ (Selkoe, 2008) bildet das Ziel intensiver Forschung bezüglich geeigneter Therapiemöglichkeiten (Marcello et al., 2008). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit gegen die Sequenz von $A\beta$ gerichteten Antikörpern (Gardberg et al., 2007) zu der Verringerung der Aggregation des Peptids sowie dem Abbau der Amyloid Plaques (Prada et al., 2007) führt, eine Beseitigung diesbezüglicher synaptischer Fehlfunktionen zur Folge hat und demnach auch präventiv eingesetzt werden kann (Tampellini et al., 2007 ; Klyubin et al., 2008)

1.3 Das Zelladhäsionsmolekül APP

Zahlreiche Studien belegen, dass Veränderungen der Expression sowie der Funktionen von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) in Verbindung mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen, wie Hydrozephalie, Schizophrenie und der Alzheimer-Krankheit (Vawter, 2000; Okamoto et al., 2004; Nielsen et al., 2007; Mattson & van Praag, 2008), stehen und geben so einen neuen Einblick in sowohl klinische als auch grundlagenbezogene Forschung. Die CAMs stellen eine große Gruppe Zellmembran-assoziiierter Proteine dar, die interzelluläre Signalleitung und Adhäsion vermitteln. Dabei übernehmen sie eine wichtige Funktion bezüglich der Migration und Erkennung geeigneter Zellen hinsichtlich der Formation funktioneller neuronaler Verbindungen sowie der Innervierung entsprechender Ziele. CAMs sind an den meisten wichtigen Entwicklungsprozessen beteiligt, eingeschlossen Zellmigration, Neuritenwachstum, Weg- bzw. Zielfindung wachsender Axone (*axonal pathfinding*), axonale Faszikulierung (*axon fasciculation*), Synaptogenese, Synapsenstabilisation und Myelinummantelung (Cotman et al., 1998; Mousa, 2008).

Das *Amyloid Precursor Protein* (Amyloid Vorläuferprotein, APP) ist ein Typ 1 Transmembran-Glykoprotein von 695-770 Aminosäuren Länge, bestehend aus einer großen N-terminalen, extrazellulären Domäne (Ektodomäne), einer singulären integralen Membranregion und einem kurzen C-terminalen, intrazellulären Bereich (Price & Sisodia, 1998; Walsh et al., 2007; Abb. 1.2, S. 5).

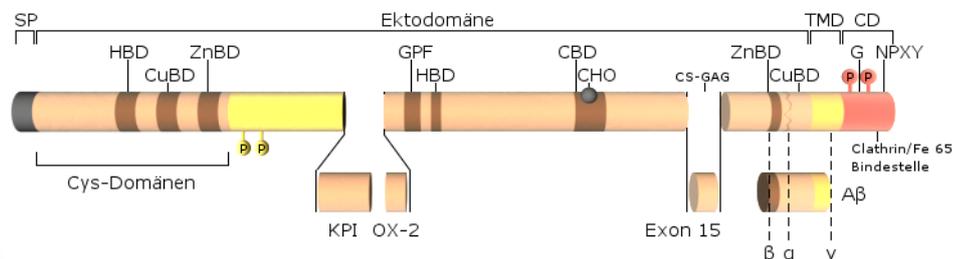


Abb. 1.2: Strukturelle und funktionelle Domänen des Amyloid Precursor Proteins

APP ist ein integrales Membranprotein mit einer großen extrazellulären Domäne (Ektodomäne), einer Transmembran- (TMD) und einer zytoplasmatischen Domäne (CD). Weitere Bereiche: SP, Signalpeptid; HBD, Heparin-bindende Domäne; CuBD, Kupfer-bindende Domäne; ZnBD, Zink-bindende Domäne; KPI, Kunitz- Serinprotease-Inhibitor; OX-2, OX-2 homologe Domäne; GPF, wachstumsfördernder Faktor; CBD, Kollagen-bindende Domäne; CHO, Anheftungsstelle für Kohlenhydrate, CS-GAG, Chondroitinsulfat-Glycosaminoglykan.

Es wird ubiquitär an der Zelloberfläche exprimiert, gehört, wie die *Amyloid Precursor-like* Proteine APLP1 (Wasco et al., 1992) und APLP2 (Wasco et al., 1993) zur Amyloid Precursor Superfamilie (Coulson et al., 2000) und ist sowohl zwischen den Spezies als auch innerhalb der Familie hoch konserviert (Bush et al., 1994; De Strooper & Annaert, 2000). APP wird durch ein aus 19 Exons bestehendes Gen auf Chromosom 21 kodiert, welches sich beim Menschen über einen Bereich von 400 kb erstreckt (Tanzi et al., 1987; Lamb et al., 1993). Während der Translation gelangt das Protein in das endoplasmatische Retikulum (ER) und über Golgi-Vesikel zur Zellmembran. Auf diesem sogenannten sekretorischen Weg

wird APP durch N- und O-Glykosylierung (Weidemann et al., 1989), Sulphatierung (Suzuki et al., 1994) und Phosphorylierung (Hung and Selkoe, 1994) posttranslational modifiziert (Lyckman et al., 1998). Anschließend wird das Zelladhäsionsprotein wieder endozytiert, gelangt in endosomale Kompartimente und konnte bereits in Mitochondrien nachgewiesen werden (Anandatheerthavarada et al., 2003; 2007). Durch alternatives mRNA-Spleißen der Exone 7, 8 und 15 und durch die verschiedenen posttranslationalen Modifikationen werden eine Reihe von Isoformen gebildet, die bei elektrophoretischer Auftrennung entsprechende Banden im Bereich von 110 bis 130 kD zeigen. Im Gehirn kommen überwiegend drei Isoformen vor (APP695, APP751 und APP770), wobei APP695 hauptsächlich von Neuronen (Haass et al., 1991; Agca et al., 2008), die sich durch acht Exone unterscheidenden Spleißformen APP751 und APP770 hingegen von Glia- und anderen nicht-neuronalen Zellen exprimiert werden (Small et al., 1996; Wilson et al., 1999). Im Gegensatz zu der kürzeren APP695 Form enthalten APP751 und APP770 ein 56 Aminosäuren großes Motiv, welches homolog zu einer Protease-Inhibitor-Domäne des Kunitz-Typs (KPI) ist und durch Exon 7 kodiert wird. (Panegyres et al., 2000). Die KPI-Domäne spielt eine Rolle bei der Blutkoagulation. *In vitro* Versuche zeigen diesbezüglich eine Inhibition des Faktors XI durch die KPI-Region von APP (Smith et al., 1990). Durch Spleißen von Exon 15 des APP-Gens entsteht eine Bindestelle für Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykane (Pangalos et al., 1995), was auf eine Funktion des Proteins bei der Zelladhäsion hindeutet. Der Ektodomäne von APP können aufgrund der Primärsequenzen und struktureller Studien verschiedene Unterdomänen zugeordnet werden (Reinhard et al., 2005). Zu diesen gehören die E1 Domäne, bestehend aus der N-terminalen Wachstumsfaktor-ähnlichen Domäne (GFLD) und das Metall- (Kupfer und Zink) Bindemotiv, ein sauer-anionischer Bereich, die bereits beschriebene KPI Domäne und die E2 Domäne, welche die RERMS Sequenz und die extrazellulären Matrixkomponenten (Heparin, Kollagen und Laminin) einschließt. Die Bezeichnung des cysteinreichen Abschnittes der E1 Domäne erfolgte aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu bekannten Wachstumsfaktoren (Rossjohn et al., 1999). Die APP Ektodomäne hat eine Funktion als Zelloberflächenrezeptor (Selkoe & Kopan, 2003; Park et al., 2006) und ist über die E-Regionen, welche ECM-Proteine sowie Heparansulfatproteoglykane binden (Small et al., 1999), an der Zelladhäsion beteiligt. Darüber hinaus ist eine MMP-2 (Kap. 1.10.1.2, S. 26)-Inhibitionsdomäne innerhalb der Metalloregion von APP lokalisiert, mittels der das Zelladhäsionsmolekül durch Bindung der katalytischen Domäne von MMP-2 die Enzymfunktion blockieren kann (Miyazaki et al., 1993). Es wird eine E1-vermittelte Homo- oder auch Heterodimer-Formation der APP Familienmitglieder vermutet, wobei die *trans*-Dimerisierung Zell-Zelladhäsionen begünstigt (Soba et al., 2005). Diese adhäsiven Möglichkeiten tragen eventuell zu der neurotrophen und synaptogenen Rolle der APP extrazellulären Domäne bei, die sowohl für das gesamte Protein als auch für das durch Proteolyse entstandene lösliche Fragment bekannt sind (Moya et al., 1994). Die Transmembrandomäne von APP enthält das Dimerisierungsmotiv GxxxA (Gorman et al., 2008). Bereits frühere Studien zeigen eine Sekretasespaltung eines APP-Dimers, sowohl durch die β -Sekretase (Multhaup, 2006) als auch durch den γ -Sekretasekomplex (Scheuermann et al., 2001). Der hohe Konservierungsgrad der intrazellulären Domäne von APP, APLP1 und

APLP2 lässt eine kritische Domäne vermuten, die APP Funktionen reguliert. Wie erwartet hat der zytoplasmatische Teil viele wichtige Funktionen, vor allem beim Transport entlang des Axons (Stokin et al., 2005) und der Signalweiterleitung (Ma et al., 2008), aber auch bei Protein-Protein Interaktionen (Koo, 2002; King & Scott Turner, 2004), Zellmigration und Synapsenaufbau (Sabo et al., 2003) sowie Apoptose (Bertrand et al., 2001). Diese Domäne enthält unter anderem die NPxY-Konsensussequenz, wie sie für die Clathrin-vermittelte Endozytose beschrieben wurde (Chen et al., 1990) und das YENPTY-Motiv, welches von PTB-Domänen-enhaltenden Proteinen gebunden werden kann (King & Scott Turner, 2004). Eine 2006 veröffentlichte Studie von Zheng und Koo sowie die 2007 erschienene Publikation von Wolfe und Gunette liefern einen Überblick der Struktur des Amyloid Precursor Proteins und beschreiben die entsprechenden möglichen Funktionen im Detail (Zheng & Koo, 2006; Wolfe & Gunette, 2007).

Der Bereich des A β -Peptides liegt zum einen Teil in der Ektodomäne und zum anderen Teil in der Transmembrandomäne. Die proteolytische Prozessierung des vollständig glykosylierten APPs erfolgt auf zwei alternativen Wegen, von denen nur einer das toxische Peptid hervorbringt, und ist in der einen oder anderen Richtung durch entsprechende Mutationen des APP-Gens begünstigt.

1.4 Prozessierung von APP

Die proteolytische Spaltung des Amyloid Precursor Proteins wird nach dem Mechanismus der regulierten intramembranen Proteolyse (RIP, Ebinu und Yankner, 2002) auf dem nicht-amyloidogenen oder dem amyloidogenen Weg von den sogenannten Sekretasen durchgeführt, welche sich entsprechend des Weges teilweise unterscheiden. RIP ist ein konservierter, von drei unterschiedlichen integralen Membranproteasen vermittelter Mechanismus, der eine wichtige Rolle in der Zellsignalweiterleitung spielt. Dabei handelt es sich um eine regulierte Spaltung von Typ 1 Transmembranproteinen, ausgelöst durch Ligandenbindung oder Ektodomänenprozessierung, mit der Funktion, verschiedene zelluläre Wege durch lösliche Effektoren oder Entfernen bestimmter Transmembranbereiche zu regulieren. Für APP bedeutet dies die γ -Sekretase- bzw. Presenilin-vermittelte Spaltung in der Membran, nachdem ein definierter Teil der Ektodomäne bereits proteolytisch prozessiert worden ist, um so die intrazelluläre Domäne und verschiedene extrazelluläre Fragmente zur Signalweiterleitung zu generieren (Landman & Kim, 2004). Die Abb. 1.3, S. 8 stellt beide alternative APP-Prozessierungswege, die in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden, dar und gibt einen Überblick über die jeweiligen APP-Fragmente.

1.4.1 Der nicht-amyloidogene Weg

90% der APP-Prozessierung verläuft über den sekretorischen Weg (Bandyopadhyay et al., 2007), bei dem α -Sekretasen (ADAM9, ADAM10, ADAM17 (TACE)) aus der ADAM (*a Di-*

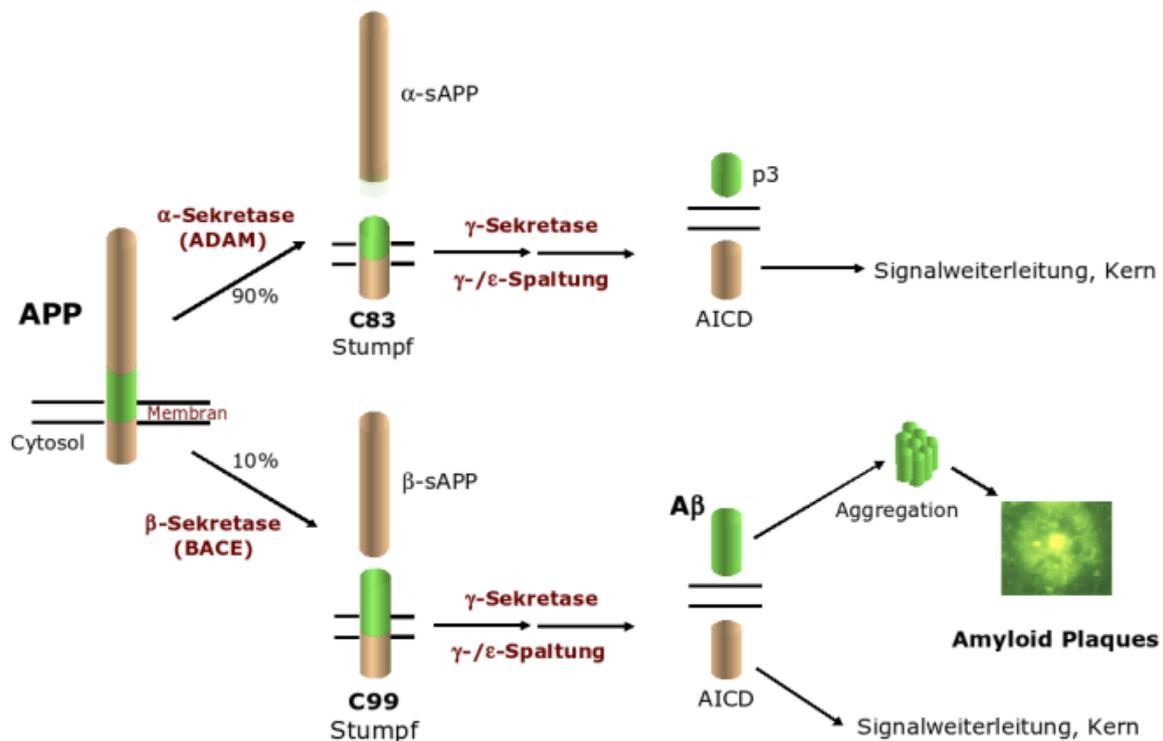


Abb. 1.3: Die Prozessierung von APP durch Sekretasen

Die Proteolyse von APP erfolgt zu 90% auf dem nicht-amyloidogenen Weg durch die α - und die γ -Sekretase, wodurch zunächst das lösliche α -sAPP sowie der aus 83 Aminosäure bestehende membranassoziierte APP-Stumpf (C83) entstehen, der anschließend aufgrund der γ - und ϵ -Spaltung als Substrat zur Produktion des kleinen extrazellulären p3-Fragment sowie der APP intrazellulären Domäne (AICD), die weitere Signalleitung vermittelt und wahrscheinlich in den Kern transportiert wird, führt. Der zu 10% stattfindende amyloidogene Prozessierungsweg von APP verläuft über β -Sekretasespaltung zu dem löslichen β -sAPP sowie dem 99 Aminosäure langen membranassoziierte APP-Stumpf (C99). Darauf folgende γ - und ϵ -Proteolyse des C99 ergibt wieder die zur weiteren Signalleitung freierwerdende AICD sowie das amyloide A β -Peptid, das durch Aggregation zu den für die Alzheimer-Krankheit charakteristischen Amyloid Plaques führt.

sintegrin And Metalloprotease; Kap. 1.10.1.1, S. 24)-Familie (Kojro and Fahrenholz, 2005) das Protein zwischen Aminosäure 16 und 17 innerhalb des A β -Bereiches spalten (Anderson et al., 1991). Dabei entstehen ein großes, lösliches N-terminales APP-Fragment (α -sAPP, ~100-120kDa) und ein in der Membran verankertes 10kDa C-terminales Fragment, das die Bezeichnung CTF α , α -Stumpf oder C83 trägt (Schubert et al., 1989; Weidemann et al., 1989). Die α -Sekretase-Proteolyse erfolgt intrazellulär, hauptsächlich nach N- und O-Glykosylierung sowie Sulfatierung in einem späten Kompartiment des sekretorischen Transportweges sowie extrazellulär an der Zellmembran. Alternativ kann membrangebundenes APP an der Zelloberfläche durch sein NPxY-Motiv in der zytoplasmatischen Domäne wieder internalisiert werden. Vom ~10kDa C83 spaltet die γ -Sekretase vermutlich in den frühen Endosomen ein weiteres Peptid p3 ab, das sezerniert wird (Haass and Selkoe, 1993).

1.4.2 Der amyloidogene Weg

Etwa 10% der gesamten Prozessierung von APP erfolgt auf dem amyloidogenen Weg (Abb. 1.3, S. 8) durch den oben beschriebenen Mechanismus der regulierten Intramembranspaltung (RIP) und beinhaltet aufeinanderfolgende Proteolysen des Amyloid Vorläuferproteins durch die β -Sekretase (BACE; Kap. 1.6, S. 10) sowie den γ -Sekretasekomplex (Kap. 1.7, S. 11). BACE (a Beta-site APP-cleaving enzyme) ist eine membrangebundene Aspartylprotease, die APP im luminalen Teil bzw. innerhalb der Ektodomäne, N-terminal der $A\beta$ -Region, zwölf Aminosäuren vor der Transmembranregion spaltet (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999). Dadurch entsteht ein analog zur ADAM-Spaltung lösliches β -sAPP sowie ein amyloidogenes C-terminales Fragment von ~ 12 kDa Größe, das als CTF β , β -Stumpf oder C99-APP bezeichnet wird (Sparvero et al., 2007). Für die löslichen Fragmente α - sowie β -sAPP wurden neuroprotektive und neuritotrophische Eigenschaften *in vitro* beschrieben (Mattson et al., 1993; Mattson, 1994). Das transmembrane 99 Aminosäuren lange APP Fragment wird anschließend mittels der γ -Sekretase prozessiert, was letztendlich zur Produktion des löslichen $A\beta$ -Peptids und der ~ 6 kDa großen intrazellulären Domäne führt (Chen et al., 2002; Hebert et al., 2006). Der Sekretasekomplex kann sowohl nahe der zytoplasmatischen Domäne ($A\beta 49$, ϵ -Spaltung) als auch an unterschiedlichen Stellen in der Mitte der Membran ($A\beta 40/42$, γ -Spaltung) spalten und so C-Termini von Amyloid-Peptiden unterschiedlicher Länge generieren (Zhao et al., 2005). Es wird vermutet, dass die Größe des Peptids proportional zu dessen Aggregationsbereitschaft und Toxizität ist (Selkoe et al., 2001). Neueste Studien identifizieren mit der ζ -Spaltstelle ($A\beta 46$) eine weitere zwischen den schon bekannten (Zhao et al., 2007), was zu der Annahme führt, dass APP innerhalb der Transmembrandomäne durch eine Serie aneinandergereichter γ -Sekretasespaltungen - zuerst ϵ -, dann ζ - und zuletzt die γ -Spaltung - prozessiert wird (Zhao et al., 2005). Die Regulation erfolgt jedoch unabhängig voneinander, möglicherweise aufgrund einer unterschiedlichen Komplexzusammensetzung oder veränderter Enzymaktivität (Kume & Kametani, 2006; Grimm et al., 2008; Kametani, 2008). Die amyloidogene APP-Prozessierung findet hauptsächlich endosomal und weniger an der Zelloberfläche statt (Pasternak et al., 2004), wobei das jeweils produzierte $A\beta$ sekretiert wird und so in den extrazellulären Raum gelangt. Neben den genannten Faktoren nehmen auch definierte Mutationen des APP-Gens einen entsprechenden Einfluss auf die Prozessierung des Proteins.

1.5 Mutationen des Amyloid Precursor Proteins

Bisher sind mehr als 160 Mutationen des PS1-, 11 des PS2- und 27 des APP-Gens identifiziert worden, die sich fast alle gewissermaßen in einem AD-Phänotyp (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>) ausdrücken und insbesondere in Zusammenhang mit den familiären Formen der Erkrankung stehen (FAD) (Armstrong et al., 2004). Bei allen bisher identifizierten Mutationen handelt es sich um Punktmutationen, die innerhalb des $A\beta$ -Peptids oder in unmittelba-

rer Nähe der Sekretase-Schnittstellen liegen und somit die Prozessierung von APP beeinflussen. (Oakley et al., 2006). Während N-terminale Mutationen zur Erhöhung der Gesamtmenge sekretierten $A\beta$ s führen, wie es z.B. bei der schwedischen Doppelmutation der Fall ist (SW; Mullan et al., 1992), beeinflussen C-terminale Mutationen die γ -Sekretasespaltung, wodurch es zu einer Erhöhung des relativen Anteils von $A\beta_{42}$ kommt (Florida-/London-Mutation; Selkoe, 1996). Neue Studien zeigen außerdem einen Zusammenhang zwischen der SW-Mutation und einer reduzierten Proteinsynthese auf (Kim et al., 2007). Die Abb. 1.4, S. 10 gibt einen Überblick der verschiedenen APP-Mutationen sowie ihrer Lokalisation und Bezeichnung.

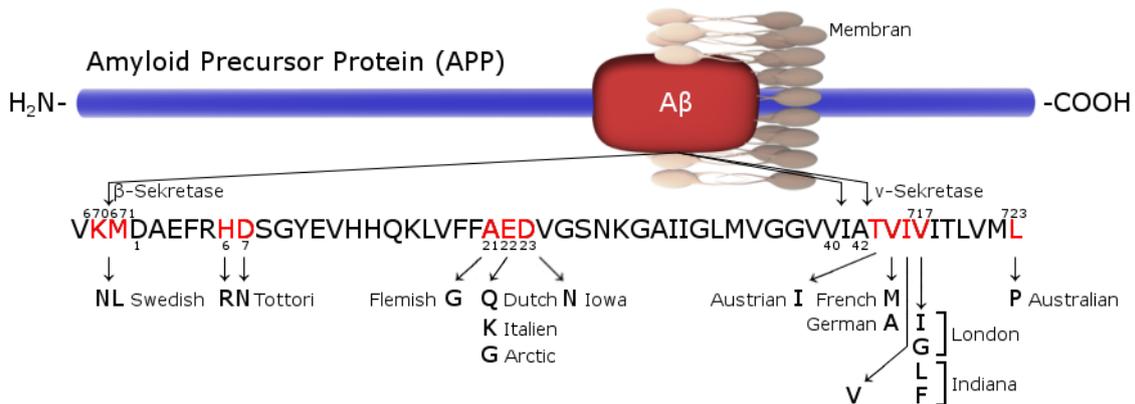


Abb. 1.4: Mutationen des APP-Gens im Bereich des $A\beta$ -Peptids

Moduläre Struktur von APP, Aminosäure(AS)-Sequenz der $A\beta$ -Region (AS 1-42) und mutierte AS (rot, Nummerierung), die Pfeile kennzeichnen die ersetzenden AS (schwarz) sowie deren Bezeichnung.

1.6 β -Sekretase

1999 identifizierten Vassar und Kollegen BACE (*a β -site cleaving enzyme*) als möglichen Kandidaten für die β -Sekretase (Vassar et al., 1999) und darauf folgende *in vivo*-Studien bestätigten diese Vermutung. So weisen die Gehirne von BACE-1 $-/-$ Mäusen kaum $A\beta_{42}$ und keine Akkumulation der C-terminalen APP-Fragmente (CTF) C99/C83 auf (Pastorino et al., 2004), während die Gehirne von BACE-1 transgenen Mäusen charakterisiert sind durch erhöhte $A\beta_{42}$ -Konzentrationen und Ansammlungen der CTF (Bodendorf et al., 2002).

BACE, auch als Memapsin-2 bezeichnet, ist ein 70kDa Typ 1-Transmembranprotein bestehend aus einer großen Ektodomäne, einer integralen Membran- sowie einer kurzen zyttoplasmatischen Domäne (ICD) und existiert als zwei Isoformen (Abb. 1.5, S. 11). BACE-1 gehört zur Pepsinfamilie der Aspartylproteasen, wobei die beiden katalytisch aktiven Aspartatreste in der extrazellulären Domäne lokalisiert sind. Die ICD beinhaltet eine Sortierungssequenz (DISLL), von der insbesondere das Dileuzin (LL)-Motiv an der Lokalisation sowie dem Transport des Proteins beteiligt ist (Parsons et al., 2007) und drei palmitoylierbare Cysteinreste, welche die Membranassoziation fördern (Benjannet et al., 2001). BACE weist zahlreiche N-

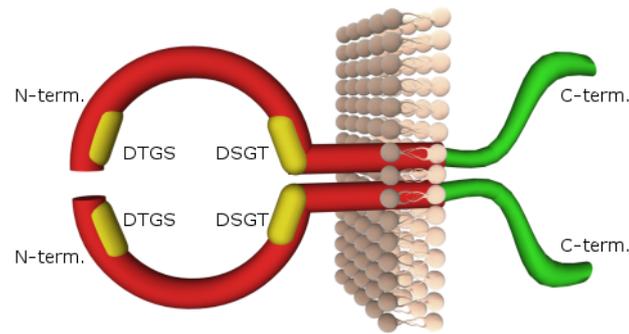


Abb. 1.5: BACE-Dimer mit möglichen katalytisch aktiven Stellen

Die Aminosäuresequenz des *alpha* *beta*-site cleaving enzymes beinhaltet zwei katalytisch aktive Motive, die charakteristisch für Aspartylproteasen sind, weshalb das Protein das erste Beispiel einer transmembranen Aspartylprotease mit kurzem zytoplasmatischen Teil repräsentiert. Die Oligomerisierung von BACE findet hauptsächlich durch die transmembrane und zytoplasmatische Domäne statt. Das C-terminal aktive Motiv ist DSGT anstelle von DTGS innerhalb der Pepsin-Familie. Das Enzym könnte in seiner aktiven Form als Homodimer unter Verwendung zweier DTGS Motive des Dimers anstelle eines DSGT- sowie eines DTGS-Motives derselben Kette agieren. Demnach könnte der Mechanismus einen evolutionären Link zwischen alten homodimeren Enzymen und einzelnen Polypeptidketten eukaryotischer Aspartylproteasen, wie bei Renin und Kathepsinen, aufzeigen (in Anlehnung an Schmechel et al., 2004).

Glykosylierungs- und einige Sulfatierungsstellen auf (Sidera et al., 2005), gelangt auf dem sekretorischen Weg in die Membran und wird lysosomal degradiert (Koh et al., 2005). Das BACE-Homodimer ist 30 mal aktiver im Vergleich zum Monomer, wobei von beiden ein breites Substratprofil geschildert wird (Westmeyer et al., 2004). Obwohl APP scheinbar kein geeignetes Substrat für diese Aspartylprotease ist (Grüninger-Leitch et al., 2002), wird es doch als das bevorzugte vermutet (Marcinkiewicz & Seidah, 2000). Das pH-Optimum für die β -Spaltung liegt bei etwa pH 5,0 (He et al., 2003), was wiederum eine Lokalisation im *trans*-Golginetzwerk (TGN) bestätigt (Walter et al., 2001). Darüber hinaus kommt BACE auch in neutralen Kompartimenten, wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und in geringer Anzahl in Cholesterol-reichen Mikrodomänen innerhalb der Zellmembran (*rafts*) vor (Kinoshita et al., 2003).

1.7 γ -Sekretase

Die von der γ -Sekretase durchgeführte Spaltung ist der kritische Schritt der Freigabe von $A\beta$ aus der Membran und von daher ungewöhnlich, weil es sich um eine Proteolyse innerhalb einer hydrophoben Umgebung handelt. Der heterotetramere Membrankomplex wird ubiquitär von vielen Zelltypen exprimiert, welche wiederum zahlreiche Substrate vom Signalrezeptor bis zu an der Zell-Kommunikation beteiligten Komplexen produzieren. Die Entstehung von $A\beta$ -Peptiden unterschiedlicher Länge deutet auf ein gewisses Fehlen einer Sequenzspezifität hin. Der Enzymkomplex scheint jedoch konformationsspezifisch zu agieren, da selektiv helikale Substrate (Lichtenthaler et al., 1999) in Abhängigkeit der Länge ihrer Transmembrandomäne (TMD) (Lichtenthaler et al., 2002) gespalten werden. Darüber hinaus spielt auch

die der Membran angrenzende (Juxtamembran-) Domäne (Ren et al., 2007) sowie die Konzentration des Substrates (Yin et al., 2007) bei der Regulation der γ -Sekretase eine Rolle (Beel & Sanders, 2008). Neben der γ -Spaltung vermittelt der Komplex zudem die Freilassung der AICD (APP intrazellulären Domäne) durch Proteolyse des C99/C83, 40 Aminosäuren C-terminal der $A\beta_{40}$ -Stelle (ϵ -Spaltung; Weidemann et al., 2002). Die Prozessierung der APP-TMD erfolgt vom C-Terminus ausgehend durch mehrere aneinandergereihte Schritte, wobei jede Spaltung auf der gleichen Seite der Aminosäurekette (α -Helixstruktur) stattfindet.

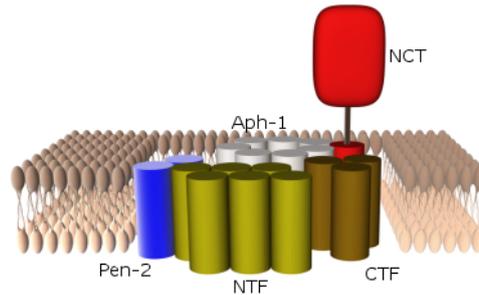


Abb. 1.6: Komponenten und Zusammenbau der γ -Sekretase

Der in der Membran eingebettete Kernenzymkomplex besteht aus vier Komponenten: Presenilin-N- und C-terminales Fragment (NTF und CTF), Nicastrin (NCT), *Anterior pharynx defective-1* (Aph-1) sowie *Presenilin enhancer-2* (Pen-2) (Wolfe, 2006)

Biochemische und genetische Studien identifizieren Presenilin (PS), Nicastrin (Nct), *Anterior pharynx defective-1* (Aph-1) und *Presenilin enhancer-2* (Pen-2) als die Hauptkomponenten des aktiven γ -Sekretasekomplexes. Bisher weiß man von sechs Variationen des Komplexes, die durch verschiedene Kombinationen von zwei PS- und drei Aph-1-Isoformen zustande kommen, und welche aufgrund anderer Binde- und Kupplungsstellen sowie Lokalisationen des aktiven Zentrums eine unterschiedliche Substratspezifität aufweisen (Wolfe et al., 2006). Intensive Forschung über einen Zeitraum von 20 Jahren führen zu dem gegenwärtigen, den Zusammenbau der γ -Sekretase beschreibenden, Modell. Demnach bildet sich zuerst im ER bzw. einem frühen sekretorischen Kompartiment ein Komplex aus Nct und Aph-1, der das PS-Holoprotein stabilisiert (Shirovani et al., 2004). Direkt nach dem Hinzukommen der letzten Komponente Pen-2 erfolgt die Endoproteolyse von PS (Steiner et al., 1998; Dries & Yu, 2008) und die aktive γ -Sekretase wird in die späten sekretorischen Kompartimente, einschließlich der Zellmembran, entlassen (Capell et al., 2005). Es sind sowohl viele verschiedene Substrate des Enzymkomplexes als auch bereits mehr als 30 mit PS bzw. der γ -Sekretase interagierenden Proteine bekannt, wobei die genaue Bedeutung der jeweiligen Interaktion teilweise unklar ist. Dabei haben die diesbezüglichen Bindungen der entsprechenden Proteine zahlreiche, von der amyloidogenen Prozessierung von APP unterschiedliche Funktionen, eingeschlossen Apoptoseregulation, endosomales Recycling, Proteasom-vermittelter Proteinabbau (McCarty, 2005), Ubiquitinylierung (Thomas et al., 2006), Vesikeltransport (Suga et al., 2005), und Kalziumregulation (Jo et al., 2005). Eines dieser weiteren Substrate des Enzymkomplexes, das in einem APP-ähnlichen Vorgang der regulierten Intramembranspaltung (RIP) von der

γ -Sekretase prozessiert wird, ist das Zelladhäsionsmolekül L1 (Maretzky et al., 2005), auf das im Kap. 1.8, S. 17 näher eingegangen wird.

1.7.1 Presenilin

Die Preseniline (PS) wurden ursprünglich durch ihre genetische Verbindung zur Alzheimer-Krankheit (Kap. 1.1, S. 1) gefunden (Sherrington et al., 1995). Heute weiß man, dass beide in Säugetieren vorkommenden Isoformen die katalytische Untereinheit des γ -Sekretasekomplexes bilden und für die Mehrheit der FAD (*early onset familial alzheimer's disease*)-Fälle verantwortlich sind, wobei PS1 den weitaus größeren Anteil daran hat (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>). In Tiermodellen ohne PS1-, jedoch nicht in solchen ohne PS2-Expression, ist die Konzentration von A β stark verringert (Mastrangelo et al., 2005), was auch auf die vorrangige Rolle der Isoform 1 bezüglich einer Regulation der γ -Sekretaseaktivität hindeutet. Die humanen PS-Gene (PS1/PS2) sind kodierend für ~50kDa große komplexe Membranproteine und gehören zu einer wachsenden Familie von Homologen verschiedener Spezies, in welchen sie hoch konserviert sind (Annaert & De Strooper, 2002). Kurz nach ihrer Entdeckung wurden die Preseniline durch ihre Funktion der Membranproteolyse in Verbindung mit Notch-Signalweiterleitung in *C.elegans* gebracht (Levitan & Greenwald 1995), gefolgt von zahlreichen Publikationen bezüglich einer PS-Beteiligung an Signalprozessen (zusammengefasst in Venezia, 2007; Wolfe, 2008), apoptotischen Ereignissen (Yukioka, 2008) und Ca²⁺-*signaling* (Nelson et al., 2007). Trotz intensiver topologischer Studien ist man sich über die genaue Struktur des Proteins nicht einig.

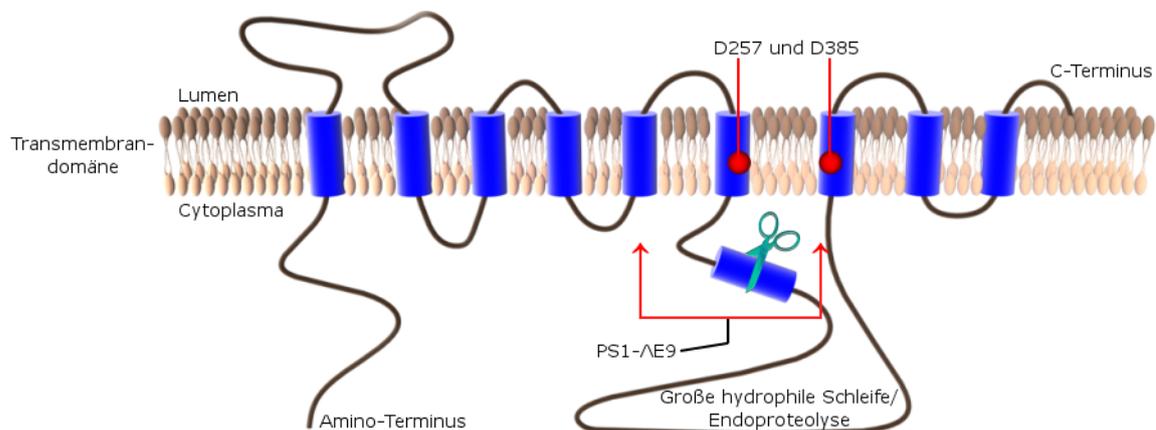


Abb. 1.7: Endoproteolyse von Presenilin

Das aus neun Transmembrandomänen (TMD) bestehende Presenilin1 wird autokatalytisch innerhalb des Exon 9 ($\Delta E9$) vor der großen hydrophilen Schleife (*large hydrophilic loop*) zwischen der TMD6 und TMD7, welche an den Stellen 257 sowie 385 je ein katalytischen Aspartatrest besitzen (D, rote Punkte) in ein aminoterminales (NTF) und carboxyterminales (CTF) Fragment gespalten, die anschließend in einem heterodimeren Komplex verbleiben (rote Pfeile)

Das 50kDa Holoprotein PS1 wird, ausgelöst durch die vollständige Zusammensetzung des Enzymkomplexes, durch Endoproteolyse innerhalb des Exon 9 aktiviert, resultierend in einem

stabilen N- und etwas kleineren C-terminalen Fragment (Abb. 1.7, S. 13; Massey et al., 2005). NTF und CTF bleiben in einem heterodimeren Komplex verbunden und beinhalten je einen katalytisch aktiven Aspartatrest (D257/D385; Kimberly et al., 2000). Während Deletionen dieser Aspartatreste zu einem Verlust der Proteolyseaktivität führen, demonstriert die die Exon 9-Domäne (delta-exon9) auslöschende FAD-Mutation, dass eine Endoproteolyse von PS diesbezüglich nicht notwendig ist. (Steiner et al., 1999). Der Aspartatrest der Transmembrandomäne (TMD) 7 liegt innerhalb eines, zwischen den Homologen konservierten, GxGD-Motives (Steiner et al., 2000) und definiert so Presenilin als GxGD-Aspartylproteasefamilie-zugehörig. Gemäß des Kyte-Doolittle-Graphs (Kap. 3.4.1.1, S. 89) beinhaltet diese Aspartylprotease zehn hydrophobe Regionen (HR; Annaert & De Strooper, 2002), von denen jedoch die Anzahl der Transmembrandomänen (TMD) unklar ist (Kim & Schekman, 2004). Ein akzeptiertes Modell schlägt ein Protein mit acht TMD (HR I bis VI, VIII, IX) vor, dessen N- und C-Terminus sowie die hydrophile Schleife zwischen TMD6 und TMD7 im Zytosol lokalisiert sind (Li & Greenwald, 1998). Alle publizierten Modelle stimmen darin überein, dass es sich bei den ersten sechs HR um TMD handelt und bestätigen somit die Topologie des PS1-NTF (Lehmann et al., 1997; Dewji et al., 2004). Darüber hinaus scheinen TMD 6 und 7 an der Ausbildung einer für die Proteolysefunktion wichtigen hydrophilen Pore beteiligt zu sein (Sato et al., 2006). Neuere Studien von PS1 und dem PS-CTF identifizieren eine weitere TMD und dessen Lage auf der *luminalen* bzw. extrazellulären Seite, jedoch in das Protein oder den Bindepartner gefaltet (Oh & Turner, 2005; Wolfe, 2006; Abb. 1.8, S. 14). Viele der Modelle sind schwierig in Einklang zu bringen mit den verschiedenen physiologischen Funktionen, die Presenilin zugeordnet werden, wie z.B. eine Lokalisation der Aspartatreste in HR VI und VIII oder die für β -Catenin-Bindung notwendige zytosolisch-orientierte Schleifendomäne (Kang et al., 2002; Wolfe & Kopan, 2004).

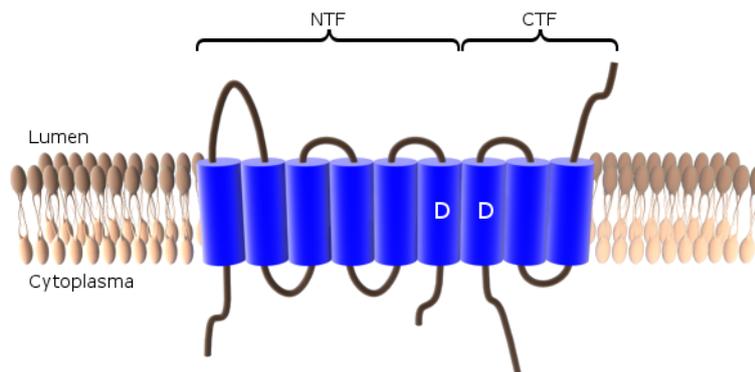


Abb. 1.8: Eine mögliche Struktur von Presenilin1

Die aktive Protease ist ein heterodimerer Komplex, bestehend aus N-terminalem (NTF) und C-terminalem (CTF) Fragment, die je einen katalytisch aktiven Aspartatrest beinhalten (D). Während der N-Terminus im Zytosol lokalisiert ist, reicht der C-Terminus in den luminalen bzw. extrazellulären Raum.

Presenilin gelangt als Komponente der γ -Sekretase über den sekretorischen Weg zur Zelloberfläche, wo der Enzymkomplex zu einem geringen Anteil verbleibt, während er hauptsächlich

lich endozytiert wird und in endosomal-lysosomalen Kompartimenten lokalisiert ist (Dries & Yu, 2008). Neben APP und dem Zelladhäsionsmolekül L1 (Kap. 1.8, S. 17) sind, wie unter Kap. 1.7, S. 11 bereits erwähnt, zahlreiche Substrate des Enzyms sowie mehr als dreißig mit PS-interagierender Proteine bekannt, deren Interaktionen mit dem Protein Funktionen in u.a. der Zellfettregulation, Zell-Zell-Adhäsion, Regulation der Ionenleitung sowie Transkriptionsregulation haben (zusammengefasst in Parks & Curtis, 2007). Dabei ist es sehr wahrscheinlich, dass viele dieser PS-Bindepartner das Vorkommen bzw. Aktivität von PS sowie die damit verbundene Stabilität des Enzymkomplexes regulieren. so kann z.B. das Kalzium-bindende Protein Calnenin die γ -Sekretase-vermittelte Spaltung von Notch und APP fördern (Jo et al., 2005). Außerdem haben einige Interaktionen dieser Proteine mit Presenilin Funktionen, die unabhängig der Proteolyseaktivität sind, eingeschlossen der Regulation des entsprechenden intrazellulären Transports (zusammengefasst in Selkoe & Wolfe, 2007; Parks & Curtis, 2007).

1.7.2 Nicastrin

Nicastrin (NCT) ist ein etwa 130kDa Typ 1 transmembranes Glykoprotein (Abb. 1.9, S. 15).

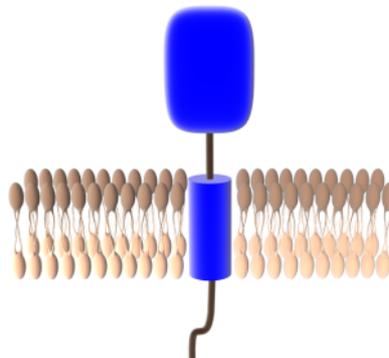


Abb. 1.9: Struktur von Nicastrin

Nicastrin Nct besteht aus einer globulären Ektodo- und einer singulären Transmembrandomäne sowie einem kurzen zytoplasmatischen Teil

Es wurde als mit Presenilin interagierendes Protein in Säugetierzellen identifiziert, welches die APP-Prozessierung beeinflusst (Yu et al., 2000). Außerdem zeigen genetische Studien in *C.elegans*, dass NCT einen Einfluss auf Notch-Signalwege hat (Goutte et al., 2000) und SEL-12 (suppressor and/or enhancer of lin-12), ein *C.elegans* PS-Homolog (Levitan et al., 2001), bindet. Nicastrin gelangt über den sekretorischen Weg zur komplex glykosylierten Form, die in der aktiven γ -Sekretase vorliegt (Tomita et al., 2002; Yang et al., 2002) und die mit dem PS1-CTF durch den N-terminalen Teil der Transmembrandomäne (TMD) interagiert (Capell et al., 2003; Kaether et al., 2004). Die Aufreinigung des aktiven Komplexes identifiziert Nct eindeutig als eine der integralen Komponenten (Esler et al., 2002). Studien bezüglich der Funktion

des Glykoproteins zeigen, dass PS und Nct einander zur vollständigen Reifung benötigen (Selkoe & Kopan, 2003), wodurch es eine wichtige Rolle in der Aktivierung und Regulation der γ -Sekretase einnimmt. Darüber hinaus sind konservierte Aminosäurereste in der neben der Ektodomäne gelegenen Region essentiell für die Komplexbildung (Walker et al., 2006). Shah und Mitarbeiter identifizieren die extrazelluläre Domäne von Nct als Bindepartner der bereits geschnittenen APP-Stümpfe (Shah et al., 2005), was auf eine mögliche Funktion des Proteins als eine Art Substratregulator schließen lässt (De Strooper, 2005). Nicastrin gelangt nach dem Erreichen der Zelloberfläche über Endozytose in endosomale Kompartimente, wird jedoch sowohl durch das Proteasom als auch lysosomal degradiert (He et al., 2007).

1.7.3 Aph-1 und Pen-2

Aph-1 und Pen-2 wurden bei genetischen *screenings* von *C. elegans* bezüglich Mutationen, die einen Defekt in der Notch-Signalleitung verstärken, gefunden (Francis et al., 2002; Goutte et al., 2000). Neben ihren Funktionen hinsichtlich des γ -Sekretasekomplexes scheinen die beiden Proteine eine anti-apoptotische Rolle in dem p53-vermittelten Zelltod zu spielen (Dunys et al., 2007).

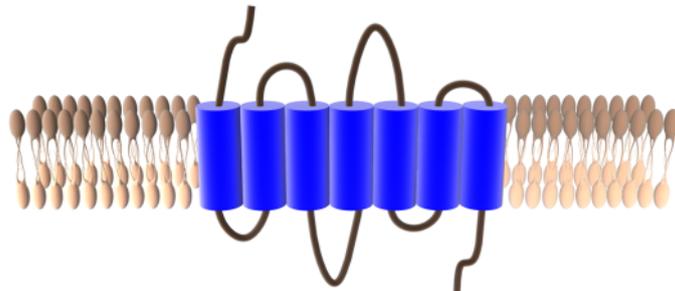


Abb. 1.10: Struktur des Anterior pharynx defective-1

Aph-1 ist ein sieben-Transmembranprotein, dessen N-Terminus luminal bzw. extrazellulär und C-Terminus zytosolisch lokalisiert ist.

Aph-1 ist ein sieben-Transmembranprotein (Fortna et al., 2004; Abb. 1.10, S. 16) und wird durch ein Gen kodiert, dessen Deletion in dem Fadenwurm zu einer Hypoplasie der Pharynx anterior führt. In Säugetierzellen gibt es zwei stark homologe Aph-1 Proteine, Aph-1a und Aph-1b, die sich hauptsächlich in ihren C-terminalen Enden unterscheiden, wobei von Aph-1a mit Aph-1aS und Aph-1aL darüber hinaus zwei, durch alternatives Spleißen eines einzigen *Transkripts* entstandene, Isoformen existieren (Wolfe et al., 1999; Goutte et al., 2000; Luo et al., 2003). Obwohl allein Aph-1a und Aph-1b aus etwa 56% gleichen Aminosäuren aufgebaut sind, gliedern sich die jeweiligen Homologe in unterschiedliche PS-Komplexe (Kap. 1.6, S. 12) ein (Hebert et al., 2004; Shirotani et al. 2004). Es ist jedoch noch unklar, ob es sowohl Unterschiede in der Komplexaktivität gibt als auch, ob die jeweiligen Komplexe Substratspezifitäten aufweisen. Aph-1a übernimmt dabei eine essentielle Rolle in der Stabilisation sowie

Formation der γ -Sekretase, da es sowohl mit dem PS Holoprotein und unreifem Nicastrin sowie dem aktiven Heterodimer als auch den anderen Komponenten des Enzymkomplexes interagiert (Lee et al., 2004; Ma et al., 2005; Serneels et al., 2005). Neuere Studien diskutieren einen Abbau von Aph-1 durch Caspasen und den klassischen Ubiquitin-Proteasomweg, dem die Proteine anscheinend *in vitro* und *in vivo* standhalten (He et al., 2006; Dunys et al., 2007).

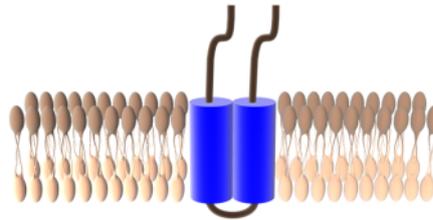


Abb. 1.11: Struktur des *Presenilin enhancer-2*

Pen-2 besteht aus zwei Transmembrandomänen, wobei sowohl N- als auch C-Terminus luminal bzw. extrazellulär lokalisiert

Pen (Presenilin enhancer)-2 ist ein kleines (10kDa) Membranprotein, bestehend aus zwei Transmembrandomänen sowie je einem, im Lumen bzw. Zytosol gelegenen, N- und C-Terminus. (Abb. 1.11, S. 17). Es wurde gezeigt, dass Pen-2 eine wichtige Rolle bei der Initiation der PS-Endoproteolyse übernimmt (Takasugi et al., 2003), eine essentielle Funktion bei der Stabilisation des PS-Heterodimerkomplexes hat und außerdem mit der C-terminalen Domäne an der Reifung von Nicastrin beteiligt ist (Hasegawa et al., 2004; Prokop et al., 2004). Dabei assoziiert das Protein im Endoplasmatischen Retikulum durch Bindung an die TMD 4 von PS1 (Watanabe et al., 2005) als letzte Komponente mit der noch unreifen γ -Sekretase und scheint sowohl deren Reifung als auch den Transport zur Zellmembran zu regulieren. Darüber hinaus übt der N-terminus von Pen-2 einen direkten Einfluss auf die Presenilin-vermittelte APP-Proteolyse und die Spezies der produzierten A β -Peptide aus (Isoo et al., 2007). Auch Pen-2 scheint einem Abbau durch Caspasen sowie dem Proteasom standzuhalten (Dunys et al., 2007).

1.8 Das Zelladhäsionsmolekül L1

L1 gehört zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie der Kalzium-unabhängigen Zelladhäsionsmoleküle (CAMs, Kap. 1.3, S. 5). Die Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch eine ähnliche extrazelluläre Struktur, bestehend aus einer variablen Anzahl Ig-ähnlicher Domänen und häufig vorhandener Fibronectin (Fn)-Typ-(III)-Wiederholungen (*repeats*), aus. Das erstmals 1985 im extrazellulären Matrix (ECM)-Molekül Fibronectin gefundene Motiv (Kornblihtt et al., 1985) konnte später jedoch auch in weiteren ECM-Molekülen nachgewiesen werden (Engel, 1991). Fibronectin-Typ-(III)-*repeats* haben Funktionen in verschiedenen Bereichen, eingeschlossen der Interaktionsvermittlung zwischen Zellen und der ECM (Ruoslahti

& Pierschbacher, 1987), Förderung des Neuritenwachstum (Dorries et al., 1996; Xiao et al., 1996) und Signalleitung (Bencharit et al., 2007).

Das transmembrane Zellerkennungsmolekül L1 war eines der ersten isolierten sowie charakterisierten CAMs (Rathjen & Schachner, 1984), von dem Homologe in zahlreichen Spezies existieren (Hortsch, 2000). Es ist der Begründer einer neuronalen Subgruppe der Ig-Superfamilie mit vier Mitgliedern innerhalb der Wirbeltiere - L1, Neurofascin, NrCAM (*neural-glia cell adhesion molecule related cell adhesion molecule*) und CHL1 (*Close Homolog of L1*) sowie zwei Vertretern der Invertebraten - Neuroglian und Tractin (Brümmendorf et al., 1998). Alle Mitglieder der L1-Familie zeigen große Ähnlichkeiten in der Struktur und der Konformation ihrer Proteine. Sie bestehen aus sechs N-terminalen Ig-ähnlichen Domänen, vier bis fünf Fibronectin (Fn)-III-Wiederholungen (*repeats*, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einem kurzen, phylogenetisch hoch konservierten zytoplasmatischen Teil am C-Terminus (Abb. 1.12, S. 18; Brümmendorf & Rathjen, 1995).

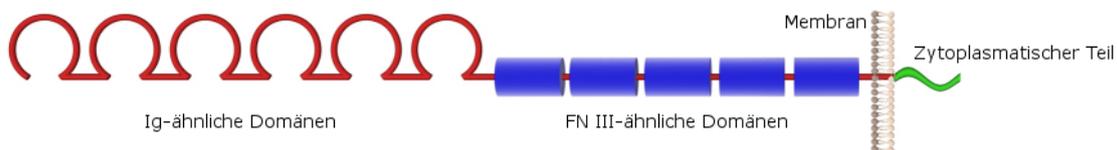


Abb. 1.12: Moduläre Struktur von L1

Das Mitglied der L1-Familie besteht aus sechs Ig-ähnlichen Domänen (Ig), 5 (Fibronectin-Typ-(III)-Domänen (Fn), einer integralen Membranregion (TMD) und einem kurzen zytoplasmatischen Teil (ICD)

L1 ist ein 200-220kDa großes phosphoryliertes Typ1 transmembranes Glykoprotein. Aufgrund von Deglykosylierungsstudien, die den Gewichtsanteil der Glykane an L1 mit etwa 25% bestimmen (Lindner et al., 1983; Rathjen & Schachner, 1984), weiß man von den in der Ektodomäne befindlichen, zahlreichen N- sowie O-Glykosylierungsstellen (Faissner et al., 1985). Das Protein wird durch ein Gen auf dem *q28* Band des menschlichen X-Chromosoms, welches homolog zu der *A-6B* Region des murinen X-Chromosoms ist, kodiert (Djabali et al., 1990). Es enthält 29 Exons, von denen ein Exon 5'-untranslatierte Sequenzen (Exon 1a) beinhaltet und die übrigen dem Protein entsprechen (1b-28) (Kallunki et al., 1997) und kodiert für 1260 Aminosäuren (AS), bestehend aus einem 19 AS Signalpeptid sowie dem reifen L1-CAM mit 1241 AS (Moos et al., 1988). Das integrale Membranprotein L1 kann durch verschiedene Spaltungen in verschiedene lösliche oder membran-assoziierte Fragmente überführt werden (Kalus et al., 2003). Die 140kDa sowie 80kDa Proteine resultieren aus der *in vitro* Trypsin-, Plasmin- oder Proteinkonvertase PC5A- vermittelten Proteolyse innerhalb der dritten Fn-(III)-Domäne (Kalus et al., 2003), wobei die Plasmin-ausgeführte Prozessierung die Multimerisierung sowie RGD-unabhängige Integrinbindung reduziert (Silletti et al., 2000). Mitglieder der ADAM-Familie (Kap. 1.10.1.1, S. 24) hydrolysieren die 200kDa- und 80kDa-Form von L1 in der Nähe der Membran und produzieren so ein 180kDa bzw. 50kDa Fragment (Beer et al., 1999). Dieser Vorgang wird als notwendig für die L1-vermittelte Zellmigration vermutet (Gutwein et al., 2000). Darüber hinaus ist das Typ1-Transmembranprotein

ein weiteres Substrat von ADAMs (ADAM10 und ADAM17) sowie der γ -Sekretase bzw. Presenilin, die L1 gemäß des Mechanismus der regulierten Intramembranproteolyse (RIP) zuerst in der Ektodomäne und anschließend innerhalb der Membran spalten (Maretzky et al., 2005). Dieses neuronale Zellerkennungsmolekül wird ubiquitär im Nervensystem exprimiert und ist an zahlreichen entwicklungsbezogenen Prozessen, eingeschlossen neuronaler Differenzierung, Axon-Wachstum, -Zielsuche, axonaler Faszikulation, Myelinummantelung und synaptischer Plastizität beteiligt (Panicker et al., 2003). Bisher sind ca. 140 verschiedene pathogene Mutationen in fast allen Regionen des L1-Gens identifiziert worden, wobei alle Arten von Mutationen, eingeschlossen *missens*, *nonsense* und *frame shift*, Deletionen, Duplikationen, Insertionen und Spleißstellen-Mutationen beim Menschen aufgetreten sind. Einige dieser Genveränderungen sind verantwortlich für bestimmte Dysfunktionen des Nervensystems und drücken sich durch den, unter dem Begriff CRASH (*Corpus callosum hypoplasia, Retardation, Adducted thumbs, Spasticity and Hydrocephalus*; Fransen et al., 1995)-Syndrom zusammengefassten, Phänotyp aus (Yamasaki et al., 1997).

Es lassen sich Parallelen zwischen der, aufgrund von Mutationen und mittels Sekretasen vermittelten, Prozessierung des Amyloid Vorläuferproteins und der ähnlich begründeten Proteolyse von L1 feststellen, die sich entsprechend mit der Alzheimer-Krankheit und dem CRASH-Syndrom in einem pathologisch-neuronalen Phänotyp zeigen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass allgemeine, an den übergeordneten Prozessen beider Verläufe, wie die nach dem RIP-Mechanismus durchgeführte Sekretasespaltung, beteiligten Moleküle sowohl mit APP als auch mit L1 interagieren können.

1.9 APP-Bindepartner

Seit der Identifikation wurde APP aufgrund seiner transmembranen Struktur eine Funktion als Rezeptor zugeordnet (Kang et al., 1987). Es liegt die Vermutung nahe, dass das Protein als Notch-Analog (Mumm & Kopan, 2000) einen ähnlichen Signalweg vermittelt, wobei durch den Mechanismus der regulierten Intramembranspaltung zuerst ein C-terminales APP-Fragment generiert wird, dass mittels der γ -Sekretase die intrazelluläre Domäne für weitere intrazelluläre Signalwege freigibt (Chan & Jan, 1998). Für diese Theorie gibt es sowohl zustimmende (Cao and Sudhof, 2001; Kinoshita et al., 2002) als auch widersprechende (Hebert et al., 2006) Argumente. Obwohl zahlreiche zytoplasmatische APP-Bindepartner identifiziert wurden, die mögliche *downstream*-Wege beschreiben, eingeschlossen G₀, APP-Bindeprotein 1 (APP-BP1), Mitglieder der X11- und Fe65- Familien sowie c-Jun N-terminal-Kinase interagierendes Protein 1 (JIP-1), (Kerr & Small, 2005; Wolfe & Kopan, 2006), bleibt der genaue Mechanismus der eventuellen Signalweiterleitung unklar.

Auch für die extrazellulären Teile von APP wurden nach über einer Dekade intensiver Forschung einige direkt oder indirekt interagierende Partner gefunden, darunter extrazelluläre Matrixkomponenten, eingeschlossen Heparansulfat, Kollagen und Fibulin 1, Zink- und Kupferionen, die Lipoproteinrezeptoren Scanagerrezeptor A sowie LRP. Weitere extrazelluläre

Proteine, die eine Interaktion mit APP eingehen können sind F-Spondin, FASII aus *Drosophila*, BRI2 (ITM2B), APLP1, APLP2, APP selbst, Notch Familienmitglieder, LRRTM3 und NgR (RTN4R) (referenziert in Osterfield et al., 2008). Eben diese Studie identifiziert eine funktionelle Bindung von Kontaktinen sowie NgCAM, dem L1CAM Homolog des Huhns, und APP im retinotektalen System (Osterfield et al., 2008). Die aufgezählten Interaktionen sind im allgemeinen noch nicht charakterisiert hinsichtlich der Affinität oder Spezifität verwandter Rezeptor-Ligand-Interaktionen, direkter Bindungen und möglicher intrazellulärer oder der Entwicklung des Nervensystems entsprechender Funktionen.

Die Diplombiologin Helen Strekalova identifizierte im Rahmen ihrer Doktorarbeit mittels β - und γ -Spaltstellen repräsentierender Peptide weitere APP-bindende Proteine (Strekalova, 2004). Auf die an die β -Spaltstelle bindene Kreatinkinase und das mit der γ -Spaltstelle interagierende Calretikulin wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

1.9.1 Kreatinkinase

Die Kreatinkinase (CK) gehört zur Familie der Phosphagen (Guanidino)-Kinasen und katalysiert die reversible Phosphoryltransfer-Reaktion zwischen ATP und Kreatin, durch die ein ADP sowie Phosphokreatin (CK-P) produziert werden (Eppenberger et al., 1967). Phosphokreatin wird im Skelettmuskel, Herz und Gehirn als Reserve von hoch-energetischem Phosphat für stark energiebedürftige Prozesse gebraucht. Im Allgemeinen gibt es vier Kreatinkinase-Isoenzyme, welche hinsichtlich der Unterschiede ihrer Gene, Aminosäuresequenz, Gewebelokalisation und immunogenen Aktivität bereits charakterisiert worden sind (Wallimann & Hemmer, 1994). Die zwei zytosolischen CK-Isoformen, Gehirn- (B-Kette; Bong et al., 2008) und Muskel- (M-Kette) Typ, können sowohl Homo- (CK-MM/CK-BB) als auch Heterodimere (CK-MB) bilden, während die zwei mitochondrialen Isoformen, ubiquitäre uMtCK_a (Gehirn) und sarkomerspezifische uMtCK_b (Muskel), als Oktamere vorliegen (Eder et al., 2000). Beide in dem mitochondrialen Zwischenmembranraum lokalisierten Kreatinkinasen können intramitochondrial entstandenes ATP zur Bildung von Phosphokreatin transphosphorylieren, welches als Energiebote zwischen intrazellulärer ATP-Produktionsstelle und den Orten des ATP-Verbrauches dient. Das CK/CK-P Shuttlesystem fungiert sowohl als Energietransport als auch als eine Art der Energiepufferung. Die CK-BB Isoform existiert hauptsächlich im Gehirn und der Retina (Lahiri et al., 2002) und ist mit Ionentransportpumpen im Gehirn assoziiert (Kaldis et al., 1996). CK-BB spielt eine Schlüsselrolle im Energiemetabolismus, wodurch sie eine wichtige Funktion für die am meisten energieverbrauchenden Prozesse in Neuronen, die Ionentransporte der Natrium-/Kalium-ATPase (Guerrero et al., 1997) und der ATP-gesteuerten Kaliumkanäle (Crawford et al., 2002) ($\sim 50\%$ der Gesamtenergie), hat. Schon frühe Studien zeigten eine Disregulation der Kreatinkinase in Verbindung mit der Alzheimer-Krankheit (Aksenov et al., 1997; David et al., 1998). Später fand man heraus, dass die Kreatinkinase in Gehirnen von Alzheimerpatienten durch Oxidation inaktiviert ist und neuronale Kreatinablagerungen im Hippocampus auftreten (Bürklen et al., 2006), während die mitochondriale Isoform das A β -Peptid bindet (Li et al., 2006).

1.9.2 Calretikulin

Calretikulin (CRT) wurde erstmals 1974 durch Ostwald und MacLennan isoliert (Ostwald & MacLennan, 1974), 1989 molekular kloniert (Smith & Koch, 1989) und seitdem ausgiebig studiert (Michalak et al., 1992; Krause & Michalak, 1997; Johnson et al., 2001; Gelebart et al., 2005). CRT ist ein hoch konserviertes, 46kDa ubiquitär exprimiertes Protein, welches im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) Kalzium mit einer hohen Kapazität und Affinität bindet (puffert) und zusammen mit Calnexin und Erp57 den sogenannten *Calretikulin/Calnexin-Zyklus* bildet, der für die Qualitätskontrolle und Faltung neu synthetisierter (Glyko-) Proteine verantwortlich ist (Trombetta, 2003).

Calretikulin besitzt eine N-terminale, abspaltbare Aminosäure-Signalsequenz (Fliegel et al., 1989) sowie ein C-terminales KDEL-Retentionssignal (Michalak et al., 1999) und besteht aus drei deutlichen strukturellen sowie funktionalen Domänen (Abb. 1.13, S. 22). Es sind sowohl eine N-Glykosylierungsstelle als auch drei konservierte Cysteinreste in der N-terminalen Domäne (Michalak et al., 1992) identifiziert, von denen zwei Disulfidbrückenbindungen ausbilden (Matsuoka et al., 1994). Abbildung Abb. 1.13, S. 22B zeigt ein von Gelebart und Kollegen (Gelebart et al., 2005) entwickeltes Modell Calretikulins, welches aus der Röntgenstruktur löslichen Calnexins (Schrag et al., 2001) und NMR-Strukturanalyse der CRT-P Domäne (Ellgaard et al., 2001) abgeleitet worden ist.

Die *N-Domäne* von Calretikulin (AS 1-180) formt eine globuläre Struktur bestehend aus einer extrem konservierten AS-Sequenz. Diese N-terminale Region bindet Zn^{2+} und interagiert *in vitro* sowohl mit anderen ER Chaperonen als auch mit der DNS-bindenden Domäne von Kernrezeptoren sowie mit Nukleinsäuren (Michalak et al., 1999). Eine Studie von Guo und Kollegen zeigt, dass nur ein Histidinrest (His¹⁵³) innerhalb der N-Domäne für die durch die N+P-Domänen vermittelte Chaperonfunktion von Calretikulin verantwortlich ist (Guo et al., 2003). Vier der Histidinreste sind an der Schwermetallbindung beteiligt (Baksh et al., 1995). Darüber hinaus inhibiert die N-Domäne von CRT die Proliferation von Endothelzellen und supprimiert Angiogenese (Pike et al., 1998).

Die *P-Domäne* (AS 181-290) beinhaltet eine Prolin-reiche Region und formt eine Arm-ähnliche Struktur (Abb. 1.13, S. 22), von der vermutet wird, dass sie die Substratbindung vermittelt (Schrag et al., 2001). Diese Region von Calretikulin bindet Kalzium mit einer hohen Affinität, an deren Vermittlung wahrscheinlich die Wiederholungen (Abb. 1.13, S. 22A) beteiligt sind (Vassilakos et al., 1998) und interagiert mit PDI, Perforin sowie anderen Chaperonen des ER-Lumens.

Die *C-Domäne* (AS 291-400) ist stark sauer, bindet Ca^{2+} mit einer hohen Kapazität und ist an der Kalziumeinlagerung in das Lumen des ERs beteiligt (Nakamura et al., 2001). Weitere Funktionen dieser C-terminalen Region von Calretikulin sind Bindung von Blutgerinnungsfaktoren (Kuwabara et al., 1995) und die Regulation der Interaktion mit anderen Proteinen (Corbett et al., 1999). Bisher sind jedoch keine strukturellen Informationen bezüglich dieser Domäne vorhanden. Von diesem, durch ein auf Chromosom 19 lokalisiertes Gen, kodierten Protein existiert zudem eine weitere Isoform mit 53% bzw. 49% Homologie zum

entsprechend huamen bzw. murinen CRT (Persson et al., 2002).

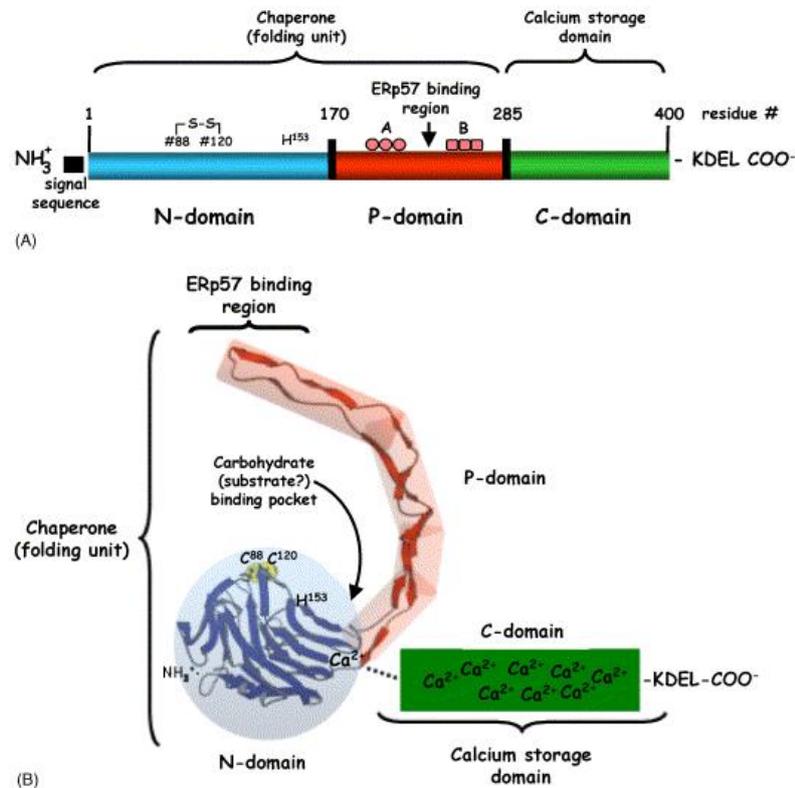


Abb. 1.13: Struktur von Calretikulin

(A) Lineare Darstellung der CRT-Domänen. Das Protein besitzt eine N-terminale Aminosäure (AS)-Signalsequenz (schwarze Box) sowie ein C-terminales KDEL-ER Retentionssignal. Die Wiederholungen A (AS-Sequenz PxxIxDPDaxKPEDWDE) und B (AS Sequenz GxWxPPxIxNPxYx) sind jeweils durch Kreise bzw. Quadrate angezeigt. (B) 3D-Modell der N- und P-Domäne von CRT (Ellgaard et al., 2001) und kristallographische Studien von Calnexin (1JHN) (Schrag et al., 2001). Calretikulin besteht aus einer globulären N-Domäne (blau) und einer zentralen, eine charakteristische Schleife formenden, Prolin-reichen P-Domäne (rot). Die N/P-Domänen sind verantwortlich für die Chaperonfunktion des Proteins, während die C-terminale C-Domäne eine große Anzahl negativ geladener AS enthält und an der hochkapazitiven Kalziumbindung beteiligt ist. Die Lokalisationen des essentiellen His¹⁵³, der möglichen Kohlenhydratbindetasche sowie der Erp57-Bindestelle sind angezeigt (Ellgaard et al., 2002) (aus Gelebart et al., 2005).

Calretikulin werden zahlreiche zellesentielle Funktionen in verschiedenen Bereichen zugeschrieben, eingeschlossen der Regulation der Ca²⁺-Homeostase und Ca²⁺-abhängiger Signalwege (Michalak et al., 2002), der Lektin-ähnlichen Chaperonaktivität (Trombetta, 2003), Modulation der Genexpression (Michalak et al., 1999), Modulation von Zelladhäsion (Johnson et al., 2001), Immunabwehr und Apoptose (Jia et al., 2008). Neben einem Vorkommen im ER tritt das Protein auch in vielen anderen Zellkompartimenten und an der Zelloberfläche auf, wo es Ektocalretikulin genannt wird (Michalak et al., 1992, 1999). Die Zelloberflächenform scheint an der Zelladhäsion, Zell-Zell-Kommunikation sowie der Apoptose beteiligt zu sein. Calretikulin kann durch Interaktion mit dem Faktor C1q den klassischen Komplementweg inhibieren, und vermittelt, indem es an Integrin (Zhu et al., 1997), MBL (Pagh et al., 2008), LRP, CD40 Ligand, TRAIL und Fas Ligand (Duus et al., 2007) bindet, diverse Signalwege.

So ist es z.B. direkt an der Integrin-abhängigen Aktivierung und Sekretion der Gelatinase A (MMP-2) beteiligt (Ito et al., 2001). Neueste Studien identifizieren Calretikulin darüber hinaus als $A\beta_42$ -bindendes Protein (Duus et al., 2008).

1.10 Proteasen

Die Produktion des, wahrscheinlich zur Entstehung der Alzheimer-Krankheit beitragenden, $A\beta$ -Peptides resultiert aus der, von Proteasen vermittelten, Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins. Ein tieferes Verständnis dieser Krankheit im Hinblick auf eine mögliche Prophylaxe oder Therapie erfordert die Aufklärung der APP-Proteolyse, eingeschlossen möglicher noch unbekannter Spaltstellen und eventueller Parallelitäten zu Proteinen ähnlicher Struktur und Funktion. Dieser und die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit der Familie der Proteasen, insbesondere der Metzinkine, der auch die als α -Sekretase bezeichneten ADAMs angehören.

Proteasen zählen zu der Enzymklasse der Hydrolasen und sind demnach in der Lage, Proteine durch Einbau eines Wassermoleküls in Peptide bzw einzelne Aminosäuren (AS) zu zerlegen. Dieser enzymatisch katalysierte Prozess wird als Proteolyse oder Prozessierung bezeichnet. Proteasen werden aufgrund der ihr katalytisches Zentrum bildenden, für die Katalysefunktion essentiellen, AS in Serin-, Cystein-, und Aspartylproteasen unterteilt. Presenilin, die enzymatisch aktive Komponente des γ -Sekretasekomplexes, besitzt zwei katalytisch essentielle Aspartatreste in den Transmembranregionen 6 und 7 (Kap. 1.7.1, S. 13) und gehört daher zur Familie der Aspartylproteasen. Außerdem werden Proteasen als Metalloproteinasen bezeichnet, wenn die von ihnen vermittelte Proteolyse ein im aktiven Zentrum des Proteins koordiniertes Metall (Zink)-Ion erfordert (Bode et al., 1999). Jahrzehnte intensiver Forschung konnten die Prozessierung von APP besonders hinsichtlich des amyloidogenen Weges (Kap. 1.4.2, S. 9) weitgehend aufklären (Ling et al., 2003; Hooper, 2005; Menndez-Gonzlez et al., 2005; Vetrivel & Thinakaran, 2006; Nathalie & Jean-Nol, 2008). Es stellt sich jedoch die Frage nach der physiologischen, möglicherweise durch die nicht-amyloidogene Proteolyse vermittelten, Funktion von APP sowie nach eventuell noch unentdeckten Prozessierungswegen. Die durch ADAMs repräsentierte α -Sekretase gehört zu der im Folgenden beschriebenen Superfamilie der Metzinkine.

1.10.1 Metzinkine

Die Metzinkine beinhalten neben den Serralysinen, den Astacinen, den Matrix Metalloproteinasen (Matrixine) auch die Proteinfamilie der Reprolysine (Adamalysine). Die Familie der Reprolysine besteht ihrerseits wieder aus zwei Unterfamilien, den Metalloproteinasen aus Schlangengiften (SVMPs, *snake venom metalloproteases*) und den für diese Arbeit relevanten Disintegrin-Metalloproteinasen der ADAM-Familie (*a disintegrin and metalloprotease*)

(Bode et al., 1993; Wolfsberg und White, 1996). Metzinkine sind zinkabhängige Metalloproteinasen, die durch eine Konsensussequenz (HExxHxxGxxHZ) im katalytischen Zentrum charakterisiert werden (Schlöndorff & Blobel, 1999; Blobel, 2000), deren drei Histidinreste an der Koordination des katalytisch essentiellen Zinkions beteiligt sind (Bode et al., 1999). In den folgenden zwei Abschnitten werden die ADAMs sowie die MMPs weiter erläutert.

1.10.1.1 ADAMs

Die Familie der *A Disintegrin And Metalloproteinasen* (ADAMs) umfasst etwa vierzig Typ1 transmembrane Glykoproteine, die sich durch eine charakteristische Domänenstruktur auszeichnen, aufgrund derer sie auch als MDCs (Metalloprotease-/ Disintegrin-/ Cystein-reiche Proteine) bezeichnet werden (Black & White, 1998). Neben der Signalsequenz findet man eine Pro-, eine Metalloprotease-, eine Disintegrin-ähnliche, eine Cystein-reiche, eine EGF-ähnliche (epidermaler Wachstumsfaktor), eine Transmembran- und eine zytoplasmatische Domäne (Wolfsberg et al., 1993; 1995; Abb. 1.14, S. 24). Die ADAMs sind neben physiologischen (Fertilisation, Neurogenese, Adipogenese) auch an pathologischen Prozessen (Arteriosklerose, Alzheimer-Krankheit, Onkogenese, Diabetes mellitus, Asthma bronchiale) beteiligt (Blobel, 2000; Yang et al., 2006). Zu den Substraten dieser *Sheddases* gehören nicht nur membrangebundene oder Zelloberflächen-assoziierte Proteine, sondern auch Bestandteile der EZM wie Fibronectin und Kollagen (Primakoff & Myles, 2000; White, 2003). Es konnte bisher keine übereinstimmende Erkennungs- und Spaltsequenz für die Mitglieder der ADAM-Familie identifiziert werden, wobei die Substratspezifität durch etwa 8 - 10 ungefaltete Aminosäuren um die zu spaltende Peptidbindung sowie durch den Abstand der Spaltstelle zu der Membran bestimmt zu werden scheint (Schlöndorff & Blobel, 1999).

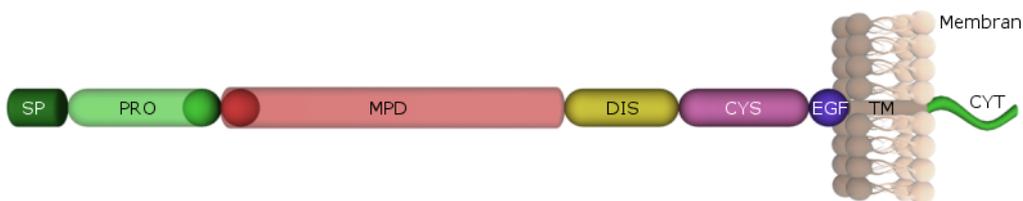


Abb. 1.14: Domänenstruktur der ADAMs

SP = Signalpeptid, PRO = Prodomäne, MPD = Metalloprotease-Domäne, DIS = Disintegrin-ähnliche Domäne, CYS = Cystein-reiche Domäne, EGF = epidermaler Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne, TM = Transmembran-Domäne, CYT = cytoplasmatische Domäne

Die ADAMs werden zunächst als inaktive Vorläufer synthetisiert (Seals & Courtneidge, 2003) und durch Abspaltung der Prodomäne aktiviert. Neben dieser inhibitorischen Wirkung auf die katalytische Aktivität des Enzyms ist die Prodomäne auch an der Reifung und dem intrazellulären Transport des Proteins beteiligt (Loechel et al., 1998; Roghani et al., 1999) Viele ADAMs, eingeschlossen ADAM9, besitzen am Ende ihrer Prodomäne die Furin-Erkennungssequenz RxK/RR, was auf die Entfernung der Prodomäne durch Proprotein-

Konvertasen, wie zum Beispiel Furin, schließen lässt (Roghani et al., 1999; Lum et al., 1998). Bei anderen hingegen, wie ADAM8, erfolgt die Abspaltung der Prodomäne mittels Metalloproteinasen (Schlomann et al., 2002). In ihrer katalytisch aktiven Metalloproteasedomäne enthalten die ADAMs das schon erwähnte charakteristische Zinkbindungsmotiv HExxHxxGxxH, welches nicht bei allen Familienmitgliedern vollständig und somit funktionell ist (Wolfsberg et al., 1995; Wolfsberg und White, 1996). Die Mitglieder mit einer intakten Zinkbindungsstelle enthalten in ihrer Prodomäne einen konservierten Cystein-Rest und können vermutlich über einen Cystein-Switch-Mechanismus aktiviert werden (Loechel et al., 1998; 1999). Über ihre Disintegrindomäne (*disruption of integrin binding*) können ADAMs Integrine erkennen, binden und deren Funktion inhibieren (Gupta et al., 2000), so dass diese Domäne eine essentielle Rolle bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten spielen könnte (White, 2003). Die Funktion der Cystein-reichen Domäne (CRD) konnte bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden. Aufgrund der vielen Cystein-Reste liegt die Vermutung nahe, dass diese Domäne durch die Bildung von Disulfidbrücken strukturelle sowie adhäsive Funktionen übernimmt, indem sie die Orientierung der Domänen zueinander und damit deren Funktion beeinflusst (Fox & Bjarnason, 1996; Seals & Courtneidge, 2003). Ferner wäre eine Wechselwirkung der CRD mit dem Substrat denkbar, um durch diese intramolekulare Kooperation die Funktion und Spezifität der Metalloproteasedomäne zu verstärken (Smith et al., 2002). Darüber hinaus besitzen einige ADAMs, so auch ADAM9, in dieser Domäne einen, einem viralen Fusionspeptid ähnlichen, Bereich (Wolfsberg & White, 1996), der bei Zellfusionsprozessen eine Rolle spielen könnte sowie eine C-terminale EGF-ähnliche Region (Huovila et al., 1996; Bigler et al., 1997). Die zytoplasmatische Domäne der ADAMs ist im Bezug auf ihre Sequenz und Länge sehr variabel (Seals & Courtneidge, 2003). Viele der ADAMs, einschließlich ADAM9, ADAM10 und ADAM17 enthalten Prolin-reiche Sequenzen, die als Bindungsstellen für Signalmoleküle mit SH3-Domänen dienen können (Pawson, 1995). Ferner sind potentielle Phosphorylierungsstellen vorhanden. So kann zum Beispiel ADAM9 mit der katalytischen Domäne der Proteinkinase C assoziieren und durch sie *in vitro* phosphoryliert werden (Inzumi et al., 1998; Seals & Courtneidge, 2003). In dieser Arbeit wird mit ADAM8 sowie ADAM9 gearbeitet, auf deren spezifische Funktionen im Folgenden weiter eingegangen wird.

Die *Sheddase* ADAM9 (MDC9 bzw. Meltrin- γ) ist für die Freisetzung des löslichen Heparin-bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktors aus seiner membrangebundenen Vorstufe verantwortlich (Inzumi et al., 1998). Außerdem konnte für dieses Mitglied der ADAM-Familie eine, durch Phorbol ester aktivierte, α -Sekretase-Aktivität gezeigt werden (Koike et al., 1999), wobei das Amyloid Precursor Protein jedoch nicht an der spezifischen α -Sekretase-Spaltstelle gespalten wird (Roghani et al., 1999).

ADAM8 (CD 156a) wird hauptsächlich in Zellen des Immunsystems exprimiert, scheint jedoch auch in pathologische und neurologische Prozesse verwickelt zu sein (Schlomann et al., 2000; King et al., 2004). Als *Sheddase* kann es membrangebundene CD23 (Fourie et al., 2003) und anscheinend auch das neuronale Protein CHL1 in die lösliche Form überführen (Naus et al., 2004).

1.10.1.2 MMPs

Die auch als Matrixine bezeichneten Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie Zink- und Kalzium-abhängiger Metalloendopeptidasen mit charakteristischer, konservierter Domänenstruktur (Abb. 1.15), S. 26. Die mehr als 20 Mitglieder der MMPs bestehen aus der Propeptid-, der katalytischen und der Hämpexin-ähnlichen Domäne und teilweise (MT-MMPs) zusätzlich aus der C-terminalen membrangebundenen (*membran type*, MT) Domäne. Basierend auf der jeweiligen Struktur, der Substratspezifität sowie der zellulären Lokalisation der Proteasen werden sie in fünf verschiedene Klassen unterteilt: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Membran-Typ MMPs (MT-MMPs) und andere (Beaudeux et al., 2004).

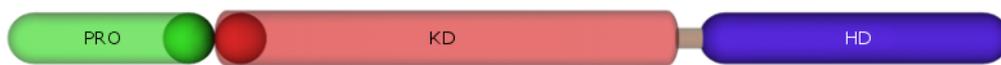


Abb. 1.15: Domänenstruktur der MMPs

PRO = Propeptiddomäne, KD = Katalytische Domäne, LI = Linker-Region, HLD = Hemopexin-ähnliche Domäne führt (*Cystein-Switch-Mechanismus*)

MMPs sind verantwortlich für die Degradierung extrazellulärer Matrix (ECM)-Komponenten sowie der Basalmembran verschiedener Gewebe (Khasigov et al., 2001). Neben dieser Funktion spielen sie eine essentielle Rolle bei zahlreichen physiologischen Vorgängen, wie Embryonalentwicklung und im Bereich der Regeneration, aber auch bei pathologischen Prozessen, eingeschlossen der Tumorausbreitung (Flannery, 2006; Malesud, 2006). Im adulten Organismus ist die Aktivität verhältnismäßig niedrig, kann jedoch durch Umgestaltung von Bindegewebsstrukturen entsprechend stimuliert werden (Johnson et al., 1998). Die Vertreter dieser Familie sind an der regulierten Proteolyse von Membranproteinen (RIP, Kap. 1.4.2, S. 9) beteiligt. Zu ihren Substraten zählen u.a. Kollagen, Gelatin, Elastin, Fibrinogen, Vitronektin, Aggrecan, Laminin und Tenascin C (Brinckerhoff & Matrisian, 2002; Khasigov et al., 2001). Die Regulation der MMP-Aktivität ist ein komplexer, in drei Bereichen stattfindender, Prozess: veränderte Transkription, extrazelluläre Aktivierung von Proenzymen und Inhibition der aktivierten Proteasen durch TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) (Curran & Murray, 1999; Visse & Nagase, 2003). Ist dieses so geschaffene Gleichgewicht zwischen Inhibition und Aktivierung gestört, kann es zur Entstehung verschiedener Erkrankungen, wie der Onkogenese, Arthritis, Periodontitis und Arteriosklerose (Johnson et al., 1998) oder Neurodegeneration (Rathke-Hartlieb et al., 2000) kommen. Der Einfluss der MMPs auf die Alzheimer-Krankheit kann dementsprechend negativ (Bellucci et al., 2007), wie auch positiv (Caragounis et al., 2007) ausfallen. In dieser Arbeit wird mit den Gelatinasen (MMP-2/MMP-9) gearbeitet, für die durch das Auftreten von MMP-9 im amyloiden Hirngewebe von Alzheimer-Patienten eine Rolle in der Pathogenität der Krankheit vermutet wurde (Lorenzl et al., 2003).

Gelatinasen Die Gelatinasen besitzen im Gegensatz zu den übrigen MMPs drei zusätzliche Fibronektin-Typ-II-Regionen innerhalb der katalytischen Domäne mittels derer sie Kollagen,

Laminin und, was namensgebend war, Gelatin (Murphy et al., 1989; Patterson et al., 2001) binden können (Abb. 1.16, S. 27). Die 92kDa Gelatinase B (MMP-9) unterscheidet sich von der ansonsten sehr homologen 72kDa Gelatinase A (MMP-2) durch eine, aus 54 Aminosäuren bestehende, Prolin-reiche Region, die eine hohe Sequenzähnlichkeit mit helikalen Kollagen-domänen aufweist (Allan et al., 1995).

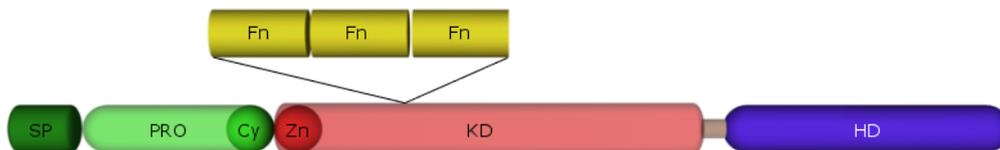


Abb. 1.16: Domänenstruktur der Gelatinasen (MMP-2 / MMP-9)

Im Unterschied zu den anderen MMPs besitzen die beiden Gelatinasen Fibronectin-II-Regionen, die mit Collagen, Gelatin und Laminin interagieren können. Die Zink-Cystein Bindung zwischen dem Zink (Zn) im katalytischen Zentrum und dem Cystein (Cy) im Propeptid (Pro) stabilisiert das Enzym in seiner inaktiven Form. Die Aktivierung erfolgt durch eine Dissoziation des Cystein vom Zink, was zur Freilegung des katalytischen Zentrums führt (*Cystein-Switch-Mechanismus*)

MMP-2/MMP-9 sind in cerebrovaskulären Krankheiten aktiviert (Fatar et al., 2005), während nur wenig über ihre Funktion bei der neuronalen Plastizität bekannt ist (Szklarczyk et al., 2002). Expression und Aktivität sowohl der Gelatinase A als auch der Gelatinase B sind in CRT-defizienten Zellen verändert (Wu et al., 2007). Neuere Studien demonstrieren die grundlegende Wichtigkeit der MMP-9-Aktivität bei der Modulation von synaptischer Plastizität im Hippocampus von Ratten während des Lernens und der Erinnerung (Nagy et al., 2006). Außerdem zeigen *Microarray*-Experimente eine massive Hochregulation der MMP-9 Transkripte im Hypothalamus (Hindmarch et al., 2006). Ebenfalls 2006 publizierten Yan und Kollegen eine Studie, die belegt, dass MMP-9 das amyloide A β -Peptid binden und so zu einem Abbau der, für die Alzheimer-Krankheit typischen, Amyloid-Plaques (Kap. 1.2, S. 3) führen kann (Yan et al., 2006). A β erhöht integrinvermittelt die Gelatinase B-Sekretion, während diese in der Lage ist, durch eine α -Sekretase-ähnliche Aktivität APP695 (Kap. 1.3, S. 5) zu prozessieren und so die Konzentration des produzierten APP-Peptides zu reduzieren (Talamagas et al., 2007). Im Gegensatz dazu wird MMP-2 durch das Amyloid Vorläufer Protein in seiner Aktivität reguliert. Die Ektodomäne von APP enthält eine, für MMP-2 spezifische, Inhibierungsregion, die mit der Gelatinase A wahrscheinlich über die katalytische Domäne interagiert (Higashi & Miyazaki, 2003; 2008).

1.11 Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung der Arbeit war, nach möglicher Identifikation weiterer Bindepartner der APP- γ -Spaltstelle die Interaktion dieser sowie der bereits von Helen Strekalova entdeckten Bindeproteine und APP hinsichtlich dessen γ -Sekretase-vermittelten Prozessierung und der sich dadurch ergebenden Funktion zu charakterisieren. Außerdem sollte die Metalloprotease-vermittelte Spaltung der Zelladhäsionsmoleküle und Substrate des γ -Sekretasekomplexes, APP und L1, am Beispiel von zwei ADAMs sowie der Gelatinasen verglichen werden. Das allgemeine Ziel der Arbeit bestand darin, anhand der Ergebnisse das Verständnis der Entstehung der Alzheimer-Krankheit und der Funktion des Amyloid Vorläuferproteins, pathologischer wie auch physiologischer Art, zu vervollständigen, um so einer Therapiemöglichkeit der bisher noch nicht behandelbaren Krankheit einen Schritt näher zu kommen.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden folgende Arbeitsschritte geplant:

1. Identifikation neuer Bindepartner der APP- γ -Spaltstelle
2. Charakterisierung der Interaktion der sowohl neu gefundenen als auch bereits entdeckten Proteine und APP hinsichtlich dessen γ -Sekretase-vermittelten Prozessierung
3. Eventuell: Überprüfen einer möglichen allgemeinen Funktion der identifizierten Proteine in der γ -Spaltung von Transmembranproteinen mittels des Substrats und Zelladhäsionsmoleküls L1
4. Analyse der Proteolyse von APP und L1 mittels ADAM8, ADAM9 und der Gelatinasen MMP-2/MMP-9

2 Material

2.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Chemikalien sowie deren Hersteller sind in der folgenden Tabelle (Tab. 2.1, S. 30) aufgelistet und wurden mindestens mit analysenreiner (pro analysis, p.a.) Qualität bezogen. Spezielle Chemikalien, Verbrauchsmittel und verwendete Lösungen werden am Anfang jeder Methodenbeschreibung aufgeführt. Alle Lösungen wurden mit sterilem deionisiertem Wasser (dH_2O) angesetzt.

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Merck (Darmstadt)
Acrylamid 30%	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Coomassie-Brilliantblue	Serva (Heidelberg)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Mallinckroth Baker (Griesheim)
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Gelatine	Roth (Karlsruhe)
Glyzerin	Roth (Karlsruhe)
Glyzerol	Fluka (Neu-Ulm)
Glyzin	Roth (Karlsruhe)
Harnstoff	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Mallinckroth Baker (Griesheim)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kalziumchlorid ($\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka (Neu-Ulm)
Magermilchpulver	Frema Reform (Lüneburg)
Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka (Neu-Ulm)
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	Roth (Karlsruhe)

Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Mallinckroth Baker (Griesheim)
Natriumazid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Roth (Karlsruhe)
Pepton aus Casein	Merck (Darmstadt)
Phosphatidylcholin	Fluka (Neu-Ulm)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Sucrose, 98%	Sigma (München)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka (Neu-Ulm)
Trizin	Sigma (Heidelberg)
Tris	Serva (Heidelberg)
Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇ * H ₂ O)	Merck (Darmstadt)

Tabelle 2.1: Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Häufig verwendete Materialien wurden verwendet von:

- Bio-Rad (München)
- Calbiochem (La Jolla)
- Eppendorf (Hamburg)
- Falcon / Becton Dickinson (Heidelberg)
- Greiner (Solingen)
- Invitrogen (Karlsruhe)
- PAA Laboratories (Cölbe)
- Serva (Heidelberg)
- Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.2 Reaktionskits und Enzyme

Reaktionskits und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt:

- Amersham Biosciences UK Limited (Buckinghamshire, UK)
- Invitrogen (Karlsruhe)

NEB (Frankfurt am Main)
 QIAGEN (Hilden)
 Roche (Mannheim)
 Invitrogen (Karlsruhe)
 Mallinckroth Baker (Griesheim)
 Stratagene (San Diego, USA)

2.3 Antibiotika

Die Antibiotika wurden den Nährmedien vor Gebrauch aus sterilfiltrierten Stammlösungen zugesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten erfolgte die Zugabe der Antibiotika nach dem Autoklavieren der Medien bei einer Temperatur von 45°C oder weniger. Die folgende Tabelle (Tab. 2.2, S. 31) liefert eine Übersicht über die verwendeten Antibiotika, ihre eingesetzte Konzentration und Herkunft.

Antibiotikum	Endkonzentration	Herkunft
Ampicillin	100 mg/ml	Roche Diagnostics (Mannheim)
G418	200 - 1000 mg/ml	PAA (Cölbe)
Hygromycin B	400 mg/ml	Invitrogen (Karlsruhe)
Zeocin	200 mg/ml	Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 2.2: Verwendete Antibiotika

2.4 Detergenzien

Die verwendeten Detergenzien sind der Tab. 2.3, S. 31 zu entnehmen.

Bezeichnung	Hersteller
CHAPS	Roth (Karlsruhe)
CHAPSO	Sigma (München)
N-oktyl- β -D-Glukopyranosid (NoGP)	Merck (Darmstadt)
NP-40	Calbiochem (La Jolla)
TritonX-100	Fluka (Neu-Ulm)
Tween20	Merck (Darmstadt)

Tabelle 2.3: Verwendete Detergenzien

2.5 Inhibitoren

Die in den Experimenten eingesetzten Inhibitoren und ihre Eigenschaften sind der Tab. 2.4, S. 32 zu entnehmen.

Name	Endkonzentration	Herkunft
Complete EDTA free	eine Tablette / 50ml	Roche Diagnostics (Mannheim)
Leupeptin	10 μ M	Calbiochem (Bad Soden)
Natriumfluorid NaF	1mM	Merck (Darmstadt)
Natriumvanadat Na ₃ VO ₄	2mM	Merck (Darmstadt)

Tabelle 2.4: Verwendete Inhibitoren

2.6 Zelllinien

2.7 Basiszelllinien

Die verwendeten Basiszelllinien und deren Eigenschaften sind in der Tab. 2.5, S. 32 aufgeführt.

Zelllinie	Herkunft	Referenz
B103	Humane APP defiziente Neuroblastomzelllinie	Schubert et al. 1974; Cummins & Glover, 1978
<i>Chinese Hamster ovary</i> (CHO)	Dehydrofolatreduktase - defiziente Hamsterzelllinie	Stanley & Siminovitch, 1977
<i>Human Embryonic Kidney</i> (HEK) 293	Transformation humaner embryonaler Nierenzellen mit DNS-Teilen des Adenovirus 5, hypotriploide Epithelzelllinie	Schein et al., 1962; Hausen, 1967
K41	Murine embryonale Fibroblastenzelllinie	Nakamura et al., 2000
K42	Murine embryonale Fibroblastenzelllinie, CRT defizient	Nakamura et al., 2000
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomzelllinie	Biedler et al., 1973; 1978

Tabelle 2.5: Verwendete Basiszelllinien und ihre Eigenschaften

2.8 Stabil transfizierte Zelllinien

Die folgende Tabelle (Tab. 2.6, S. 33) liefert einen Überblick über die, im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten, stabil transfizierten Zelllinien, ihre Beschaffenheit und Herkunft.

Zelllinie	Vektor	Referenz
B103/APP695	pcDNA3 (Hygro) APP695	Schmidt, 2002 (unverffentl.)
B103/APP751	pcDNA3 (Hygro) APP751	Schmidt, 2002 (unverffentl.)
CHO/APP696	pcDNA3 (Hygro) APP695	Schmidt, 2002 (unverffentl.)
HEK/PS1/SW-D385N-10	pcDNA3-APP695 swedish FAD double mutation (aa 595/596) pcDNA3.1/Zeo-E9-D385A-PS1	Citron et al., 1992; Wolfe et al., 1999
HEK/PS1/SW-WT23	pcDNA3-APP695 swedish FAD double mutation (aa 595/596) pcDNA3.1/Zeo-PS1	Citron et al., 1992; Wolfe et al., 1999
K42/CRT	pcDNA3 Kaninchen Calretikulin	Nakamura et al. 2001
K42/CRT-NP	pcDNA3 Kaninchen CRT-NP-Domäne	Nakamura et al. 2001

Tabelle 2.6: Verwendete stabil transfierte Zelllinien

Die HEK-Zelllinien PS1/SW-WT23 und -D385N-10 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. C. Haass (Stoffwechselbiochemie, LMU, München) zur Verfügung gestellt. Die K42-Zelllinien CRT und CRT-NP, sowie die K41-Zelllinie wurden mit hilfreicher Unterstützung von Prof. Dr. M. Michalak (Canadian Institutes of Health Research Group in Molecular Biology of Membranes and the Departement of Biochemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada) zugesendet.

2.9 Kultivierung und Langzeitlagerung von Zellen

Für die Kultivierung und Langzeitlagerung der *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zelllinie wurde Ham's F12 verwendet. Diesem Basalmedium wurden die der Tab. 2.7, S. 33 zu entnehmenden Zusätze zugegeben.

Zusatz	Konzentration	Herkunft
Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	10% (v/v)	PAA Laboratories (Cölbe)
G418	1 mg/ml	PAA Laboratories (Cölbe)
Ham's F12 Medium	1x	PAA Laboratories (Cölbe)
L-Glutamin (200mM)	1mM	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumpyruvat (100mM)	1mM	PAA Laboratories (Cölbe)

Tabelle 2.7: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der CHO-Zelllinie

Für die Kultivierung und Langzeitlagerung der B103-Zelllinie wurde *Dulbeccos Modified Eagle*

(DME)-Medium (PAA Laboratories, Cölbe) verwendet. Das Basalmedium wurde durch die der Tab. 2.8, S. 34 zu entnehmenden Zusätze supplementiert.

Zusatz	Konzentration	Herkunft
DME-Medium (hoher Glucosegehalt 4,5 g/l)	1x	PAA Laboratories (Cölbe)
	10% (v/v)	PAA Laboratories (Cölbe)
Hygromycin B	400µg/ml x	Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin (200mM)	1mM	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumpyruvat (100mM)	1mM	PAA Laboratories (Cölbe)

Tabelle 2.8: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der B103-Zelllinie

Für die Kultivierung und Langzeitlagerung der *Human Embryonic Kidney* (HEK)-Zelllinien wurde ebenfalls das DME-Medium verwendet. Diesem Basalmedium wurden die der Tab. 2.9, S. 34 zu entnehmenden Zusätze hinzugefügt.

Zusatz	Konzentration	Herkunft
DME-Medium (hoher Glucosegehalt 4,5 g/l)	1x	PAA Laboratories (Cölbe)
Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	10% (v/v)	PAA Laboratories (Cölbe)
G418	200µg/ml x	PAA Laboratories (Cölbe)
L-Glutamin (200mM)	1mM	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumpyruvat (100mM)	1mM	PAA Laboratories (Cölbe)
Zeocin	200µg/ml	Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 2.9: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der HEK-Zelllinie

Die Kultivierung und Langzeitlagerung der untransfizierten HEK- und SY5Y-Zelllinien erfolgte in dem oben beschriebenen Medium, jedoch ohne den Zusatz von G418 und Zeocin. Für die Kultivierung und Langzeitlagerung der K41- und K42-Zelllinien wurde *Dulbeccos Modified Eagle* (DME)-Medium (PAA Laboratories, Cölbe) verwendet. Das Basalmedium wurde durch die der Tab. 2.10, S. 35 zu entnehmenden Zusätze supplementiert.

Zusatz	Konzentration	Herkunft
DME-Medium	1x	PAA Laboratories (Cölbe)
(hoher Glucosegehalt 4,5 g/l)	10% (v/v)	PAA Laboratories (Cölbe)
L-Glutamin (200mM)	1mM	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumpyruvat (100mM)	1mM	PAA Laboratories (Cölbe)
Penicillin (10,000 Units/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) (100 x)	1x	Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 2.10: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der K41- und K42-Zelllinie

2.9.1 Kultivierung

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei einer Temperatur von 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90%. Die für die Kultivierung der Zelllinien verwendeten Kulturflaschen mit einer Größe von 75cm² wurden von der Firma Greiner (Söding) bezogen. Die Passage der Zellen erfolgte bei 80 - 90%-iger Konfluenz derselben. Dafür wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit HBSS (*Hanks buffered saline solution*) (PAA Laboratories, Cölbe) gewaschen. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflaschen erfolgte bei einer Temperatur von 37°C durch eine 2-5-minütige Inkubation derselben mit Trypsin-EDTA (1x, PAA Laboratories, Cölbe). Den abgelösten Zellen wurde Kulturmedium (Kap. 2.9, S. 33) hinzugefügt und diese durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die in der Zellsuspension enthaltenen Zellen wurden durch Zentrifugation für 5min bei 100 * g und RT sedimentiert, wieder in Kulturmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:3 ausgesät.

2.9.2 Langzeitlagerung

Für die Lagerung der Zellen über einen längeren Zeitraum wurden die einer konfluenten Kulturflasche, wie in Kap. 2.9.1, S. 35 beschrieben, mit HBSS gewaschen, durch Inkubation mit Trypsin-EDTA (PAA Laboratories, Cölbe) vom Boden der Kulturflasche abgelöst und durch Zentrifugation sedimentiert. Im Anschluss an den Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in 10% DMSO-haltigem Kulturmedium (Kap. 2.9, S. 33) resuspendiert und Proben von 1ml Volumen abgefüllt. Die Aliquots der einzufrierenden Zellen wurden in speziellen Einfrierbehältern in Isopropanol langsam auf eine Temperatur von -80°C heruntergekühlt und dann ebenfalls bei -80°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen der eingefrorenen Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad oder in der Hand.

2.10 *E.coli*-Stämme

Die folgende Tabelle (Tab. 2.11, S. 36) liefert einen Überblick über die verwendeten *E.coli*-Stämme und deren Eigenschaften.

Stamm	Genotyp und relevanter Phänotyp	Herkunft / Referenz
-------	---------------------------------	---------------------

<i>E. coli</i> DH5 α	SupE44 <i>Dlac169</i> (f80 <i>lacZ</i> DM15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Clontech (Heidelberg)
<i>E. coli</i> Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 2.11: Verwendete *E. coli*-Stämme und ihre Eigenschaften

2.10.1 Stammhaltung und Kultivierung von *E. coli*

Für die Stammhaltung und Kultivierung wurde LB-Medium (Kap. 2.18, S. 44) verwendet. Bei rekombinanten *E. coli*-Stämmen wurde dem LB-Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

2.10.1.1 Stammhaltung

Für die Stammhaltung von *E. coli* über einen längeren Zeitraum wurden Glycerin-Stocks angelegt. Zur Herstellung von Glycerin-Stocks wurde eine, in der stationären Phase befindliche Übernachtskultur im Verhältnis 1:1 mit Glycerin (80% (w/v)) gemischt und dadurch beim Einfrieren langsam herunter gekühlt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.10.1.2 Kultivierung

Zum Beimpfen von Flüssigkulturen wurden unter anderem auch Stammkulturen auf LB-Agar (Kap. 2.18, S. 44), der im Fall rekombinanter Stämme mit den entsprechenden Antibiotika versetzt wurde, angelegt. Die beimpften Agarplatten wurden über Nacht (ü.N.) bei 37°C inkubiert und bei 4°C bis zu 8 Wochen gelagert. Für die Anzucht von 2-5ml Flüssigkulturen wurden Einzelkolonien von Agarplatten in Flüssigkulturen überimpft, die im Fall von rekombinanten *E. coli*-Stämmen ebenfalls mit den entsprechenden Antibiotika versetzt wurden. Die Inkubation der angeimpften Flüssigkulturen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei 37°C und 225rpm ü.N. in einem Schüttelinkubator.

2.11 Vektoren

Die den Expressionskonstrukten (Tab. 2.13, S. 38) und *E. coli*-Stämmen zugrunde liegenden Plasmide und ihre Eigenschaften sind der Tab. 2.12, S. 37 zu entnehmen. Die entsprechenden Plasmidkarten sind im Anhang aufgeführt.

Plasmide	Charakteristika	Herkunft/Referenz
pcDNA3 (5446 bp)	CMV-Promotor; SP6-Promotor; BGH pA; SV40-Promotor, origin und polyA; Neomycin ORF; Ampicillin ORF; ColE1 origin	Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA3.1/Flag-His A (5493 bp)	pcDNA3.1/myc-His (myc durch Flag ersetzt (ZMNH)); CMV-Promotor; myc-Epitop; fl-origin; BGH reverse priming site und pA; Neomycinresistenz-Gen; Ampicillinresistenz-Gen; SV40-Promotor, origin und Polyadenylierungssignal, pUC origin	Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA3.1/Hygro (+) (5597 bp)	CMV-Promotor; fl-origin; BGH reverse priming site und pA; Hygromycinresistenz-Gen; Ampicillinresistenz-Gen; SV40-Promotor, origin und Polyadenylierungssignal, pUC origin	Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA3.1/Zeo (+) (5015 bp)	CMV-Promotor; fl-origin; BGH reverse priming site und pA; Zeocinresistenz-Gen; Ampicillinresistenz-Gen; SV40-Promotor, origin und Polyadenylierungssignal, EM7-Promotor, pUC origin, bla-Promotor	Invitrogen (Karlsruhe) (PvD Dr. Kins, ZMBH, Heidelberg)
pGEM-T Easy (3015 bp)	T7 RNA Polymerase transcription initiation site und Promotor; SP6 RNA Polymerase Promotor und Transcription initiation site; pUC/M13 Reverse und Forward Sequencing PBS; lacZ start codon; lac operator; beta-lactamase coding Region	Promega (Mannheim)
PGEX-3X	Glutathione S-transferase Gen; tac-Promoter; lac-operator; Ribosomenbindestelle für GST; Startcodon (ATG) für GST; Coding region für Faktor Xa Spaltung; Beta-lactamase-Gen; lacIq Gen; PRR; Sequenzierungsprimer	GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden)

Tabelle 2.12: Verwendete Plasmide und ihre Charakteristika

2.12 Expressionskonstrukte

Die verwendeten Expressionskonstrukte und ihre Eigenschaften sind der Tab. 2.13, S. 38 zu entnehmen.

Insert	Spezies	Vektor	Größe des Inserts	Klonierungsstelle (5')	Klonierungsstelle (3')	Referenz
Calretikulin	Kaninchen	pcDNA3	401bp	EcoRI	XhoI	Nakamura et al., 2001
Calretikulin	Kaninchen	pcDNA3.1/myc-His	401bp	HindIII	StuI	Nakamura et al., 2001; Strekalova, 2003 (unverffentl.)
Calretikulin	Kaninchen	pGEX-3X	401bp	EcoRI	EcoRI	Smith & Johnson, 1988; Baksh and Michalak, 1991
CRT-C	Kaninchen	pcDNA3.1/myc-His	71bp (330-401 CRT) eingeschl. CRT-SP/KDEL, ER-Retentionssignal	HindIII	StuI	Nakamura et al., 2001; Strekalova, 2003 (unverffentl.)

CRT-C	Kaninchen	pGEX-3X	71bp (330-401 CRT) eingeschl. CRT-SP/KDEL, ER-Retentionssignal	BamHI	BamHI	Smith & Johnson, 1988; Baksh & Michalak, 1991
CRT-NP	Kaninchen	pcDNA3	287bp (1-287 CRT), eingeschl. CRT SP/KDEL, ER-Retentionssignal	EcoRI	KpnI	Nakamura et al., 2001
CRT-NP	Kaninchen	pcDNA3.1/myc-His	290bp (1-290 CRT), eingeschl. CRT-SP/KDEL, ER-Retentionssignal	HindIII	EcoRI	Nakamura et al., 2001; Strekalova, 2003 (unverffentl.)
CRT-NP	Kaninchen	pGEX-3X	290bp (1-290 CRT), eingeschl. CRT-SP/KDEL, ER-Retentionssignal	EcoRI	EcoRI	Smith & Johnson, 1988; Baksh & Michalak, 1991
CRT-P	Kaninchen	pcDNA3.1/myc-His	108bp (182-290 CRT) eingeschl. CRT-SP/KDEL, ER-Retentionssignal	HindIII	EcoRI	Nakamura et al., 2001; Strekalova, 2003 (unverffentl.)
CRT-P	Kaninchen	pGEX-3X	108bp (182-290 CRT) eingeschl. CRT SP/KDEL, ER-Retentionssignal	BclI	BamHI	Smith & Johnson, 1988; Baksh & Michalak, 1991
L1 (Qiagen)	Maus	pcDNA3	3873bp	EcoRI	EcoRI	Schnegelsberg, 1998 (unverffentl.)
L1-30kDa + SP	Maus	pcDNA3.1/Flag-His	425bp + 57bp	EcoRI + HindIII	XhoI + EcoRI	Stemmer/Wolters, 2008 (unverffentl.)
L1-ICD	Maus	pcDNA3.1/Flag-His	344bp	HindIII	XhoI	Stemmer/Wolters, 2008 (unverffentl.)
SP, myc, APP/SPA4C	Kaninchen	pcDNA3.1/Zeo(+)	SP 65bp + 6bp + SPA4CT 960bp	SP, myc XbaI (SPA4CT)	ApaI (SPA4CT)	Dyrks et al., 1992

Tabelle 2.13: Verwendete Expressionskonstrukte und ihre Charakteristika

Sowohl die bakteriellen als auch die Calretikulin-Expressionskonstrukte wurden, z.T. in den entsprechenden Systemen, mit freundlicher Unterstützung von Prof. M. Michalak (Dept. of Biochemistry, Med. Sci. Bldg., University of Alberta, Edmonton, Alberta) zur Verfügung gestellt. Der APP/SPA4CT enthaltende Vektor wurde freundlicherweise von PhD Dr. S. Kins (ZMBH, Heidelberg) zugesendet. Die pcDNA3/L1-ICD und /L1-30kDa-Konstrukte wurden zusammen mit Gerrit Wolters (ZMNH) durch PCR von murinem L1, Klonierung des aufgereinigten Fragmentes in pGEM-T Easy, Restriktion und Ligation in pcDNA3.1/myc-His A erhalten.

2.13 Antikörper

2.13.1 Primärantikörper

Die Tab. 2.14, S. 42 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primärantikörper und ihre Charakteristika.

Bezeichnung	Spezies	Spezifität	Verdünnung / Konzentration	Herkunft / Referenz
14-3-3 β (H-8)	Maus mc	14-3-3 β N-Terminus (Maus, Ratte, Mensch)	1:200(IB); 1-2 μ g/ml/100-500g Gesamtprotein(IP)	Santa Cruz Biotechnology; Morrison et al., 1994
anti-D-IgG (γ -Spaltstelle APP)	Kaninchen pc	D-Peptid, APP- γ -Spaltstelle	1:1000(IB)	Plöger (D-Peptid); Strekalova, Stemmer
Aph-1a 434G	Kaninchen pc	APH1aL 265 C-Terminus (21AS)	1 μ g/ml(IB); 1 μ g/ml(IP)	Prokop et al., 2004
APP 22734	Kaninchen pc	APP-ED, Immunisierung mit sAPP α	5 μ l/ml(IP); 1:25(DC)	Mulhaupt (ZMBH, Heidelberg); Scheuermann et al., 2001)
APP 22C11	Maus mc	AS66-80 N-terminal	1:1000-1:10000(IB); 1:100-1:200(IH)	Chemicon int. (Temecula); Hilbich et al., 1993; Mönning et al., 1990
APP 2D8	Ratte mc	A β 1-16	1 μ g/ml	(Shirovani et al., 2007)
APP B63.4	Kaninchen pc	Säugetiere, APP-ICD	1:1000-1:5000(WB/IP)	Cupers et al., 2001 De Strooper et al., 1995
APP poly	Kaninchen pc	nicht humane Säugetiere, APP-ED	1:1000-1:5000(IB)	GenWay Biotech (San Diego); Ando et al. 2001; Kamenetz et al., 2003; Liu et al., 2003
APP W02	Maus	AS1-16 d. A β Peptids	1:1000(IB); 1:100(IP)	A β GmbH (Heidelberg)
c-Myc (9E10)	Maus mc	c-Myc-C-Terminus (AS408-439)	1:200(IB)	Santa Cruz Biotechnology; Alitalo et al., 1983
Calregulin (C-17)	Ziege pc	Maus CRT-C-Terminus	1:200(IB)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.; David et al., 1993; Tjoelker et al., 1994
Calregulin (T-19)	Ziege pc	Maus CRT N-Terminus,	1:200(IB); 1:10(IH)	Santa Cruz Biotechnology; David et al., 1993; Tjoelker et al., 1994
CHL1	Kaninchen pc	CHL1-ED	1:10000(IB)	Pineda (Berlin); Karl (ZMNH)

CRT-KDEL	Kaninchen mc	QAKDEL-Peptid, CRT-C-Terminus	1:500-1:1000(IB); 1:50(IH)	Andrin et al., 1998
DNM I (D5)	Maus mc	Dynamin I (AS1-750)	1:200(IB); 1-2µg/ml/100-500g GP(IP)	Santa Cruz Biotechnology; Sontag et al., 1994
GAPDH	Kaninchen pc	Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel,	1:200(IB)	Chemicon int. (Temecula); Kots et al., 1992
GST	Ziege pc	Glutathion-S-Transferase	1:2000(IB)	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg)
HXK1 (N-19)	Ziege pc	Hexokinase Typ1-N-Terminus	1:200(IB); 1-2µg/ml/100-500g GP(IP)	Santa Cruz Biotechnology; Katzen et al., 1965
His (4D11)	Maus mc	N-terminal <i>His-tagged</i> und <i>truncated</i> TRAP Protein (AS 26-248, <i>P.falciparum/E.coli</i>)	1:100(IB)	Upstate (New York); Robson et al., 1995
IgG	Ziege, Kaninchen, Maus, Ratte	unkonjugiert, Serum	NK, entspr. d. eingesetzt. Menge Antikörper(IP)	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)
CK-B (C-17)	Ziege pc	Kreatinkinase B-Kette, C-Terminus	1:200(IB); 1:50(IP)	Santa Cruz Biotechnology; Haas et al., 1989
L1 555	Ratte mc	L1-ED, 2. bis 3. Fn-Domäne	1:5000-1:10000(IB)	Schachner (ZMNH); Appel et al., 1995
L1 ICD 172-R	Maus mc	Säugetiere, bei T1172/Y1176 (L1)	1:2000(IB/IP)	Hiss Diagnostics (Freiburg i.Br.); Kamiguchi et al., 1998
L1 poly	Kaninchen pc	Säugetier L1-ED	1:4000(IB); 1:500(IP)	Strekalova (ZMNH)
L1 UJ 127 (Abcam)	Maus mc	hL1 (Immunogen: föt. Gehirn), bindet Tumore neuroektoderm./glialen Urspr., bindet n. in kindl./erwachs. Gehirn.	1:100-1:200(IB/IP)	Abcam Inc. (Cambridge); Kemshead et al., 1983
Na ⁺ -/K ⁺ -ATPase α3 (C-16)	Ziege pc	int. Na ⁺ -/K ⁺ -ATPase α3-Region	1:200(IB); 1-2µg/ml(IP)	Santa Cruz Biotechnology; Pu et al., 2001
Na ⁺ -/K ⁺ -ATPase AB150	Ziege pc	Na ⁺ -/K ⁺ -ATPase d. Kaninchenniere	1:12,500 Endpunkt gegen 1µg/ml (ELISA)	Chemicon int. (Temecula)
NCT N1160	Kaninchen pc	NCT-C-Terminus, synthet. Peptid (AS693-709)	1:1000(IB); 1:100(IP)	Sigma (Missouri); Yu et al., 2000

Pen-2 1638	Kaninchen pc	Pen-2 N-Terminus (AS4-15)	1:500-1:1000(IB); 1:60-1:100(IP)	Steiner et al., 2002
PS1 2953	Kaninchen mc	MBP/Presenilin1-N-Terminus (AS2-8)	1:500(IB); 1:300(IP); 1:200-1:500(IH)	Grunberg et al., 1998; Walter et al., 1997
PS1N (Nixon)	Kaninchen mc	Presenilin1-N-Terminus GST- Fusionsprot.	1:1000(IB); 1:500(IP)	Capell et al., 1997; Mathews et al., 1996
PS2 BII.HF5c	Kaninchen mc	PS2-Schleife, Fusionsprot. (AS297- 356)	1:3000(IB); 1:500(IP)	Steiner et al., 1999

Tabelle 2.14: Verwendete Primärantikörper und ihre Charakteristika (mc, monoklonal; pc, ployklonal; ED, Ektodomäne; ICD, interzelluläre Domäne; AS, Aminosäure; GP, Gesamtprotein; IB, Immunoblot; IP, Immunpräzipitation; IH, Immun-Histochemie)

Der anti-A β Antikörper 2D8, die anti-PS1-Antikörper 2953 und Nixon sowie der anti-Pen-2, der anti-Nicastrin und der anti-Aph-1a Antikörper wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Steiner und Prof. Dr. Haass (Stoffwechselbiochemie, LMU, München) zur Verfügung gestellt. Der Antikörper gegen Calretikulin KDEL wurde mit hilfreicher Unterstützung von Prof. Dr. M. Michalak (Canadian Institutes of Health Research Group in Molecular Biology of Membranes and the Departement of Biochemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada), der anti-APP 22C11 Antikörper ebenso von Dr. Kins (ZMBH, Heidelberg) zugesendet. Der anti-APP Antikörper 22734 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Mulhaupt (ZMBH, Heidelberg), genau wie der PS2 BI.HF5c von Dr. Kostka (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH) zur Verfügung gestellt. Die Antikörper gegen L1, CHL1, GAPDH und 14-3-3 waren im ZMNH vorhanden und wurden mit hilfreicher Unterstützung von Arbeitsgruppenkollegen abgegeben.

2.13.2 Sekundärantikörper

Die für die Immunoblot-Analyse (Kap. 3.1.5, S. 52), für Immunhistochemie (Kap. 3.3.5, S. 88) und für ELISA-Experimente (Kap. 3.1.16, S. 67) verwendeten Sekundärantikörper wurden von Dianova (Hamburg) bzw. Jackson Immuno Research (Suffolk, UK) bezogen und sind in der folgenden Tabelle Tab. 2.15, S. 43 aufgeführt:

Bezeichnung /Kopplung	Spezies	Spezifität	Verdünnung	Herkunft / Referenz
Cy2	Ziege	Maus	1:100(IH)	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)

Cy3	Ziege	Maus	1:100(IH)	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)
Cy5	Ziege	Maus	1:100(IH)	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)
Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Ziege, Esel	Ratte, Kaninchen, Maus, Ziege	1:10000-1:20000(IB); 1:5000 (ELISA)	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)

Tabelle 2.15: Sekundärantikörper (IH, Immunhistochemie; IB, Immunoblot)

2.14 Metalloproteasen

Die in den Spaltexperimenten verwendeten Metalloproteasen, ihr Zustand sowie die Herkunft gehen aus der Tab. 2.16, S. 43 hervor.

Bezeichnung	Zustand/Herkunft
ADAM8, Maus	aktiv/Prof. Frey (BCII, Uni Bielefeld)
ADAM9, Maus	aktiv/Prof. Frey (BCII, Uni Bielefeld)
Gelatinase A (MMP-2, EC 3.4.24.24), human	inaktiv/Prof. Frey (BCII, Uni Bielefeld)
Gelatinase B (MMP-9, EC 3.4.24.34), human	autoaktiv (mut)/ Prof. Kaczmarek (Nencki Institute, Warschau)
	Michaluk et al., 2007

Tabelle 2.16: Verwendete Metalloproteasen

2.15 Peptide

Die bei der ELISA-Studie eingesetzten Peptide und ihre Sequenz bzw. Herkunft ergeben sich aus der Tab. 2.17, S. 43.

Bezeichnung	Sequenz/Herkunft
Adenosine 5'-Triphosphatase (Na-/K-aktiviert)	Sigma (Steinheim)
APP1 (APP- γ -Spaltstelle)	Biotin-SNKGAIIGLMVGGVVIATVIVITLVMLKKKC-OH
APP2 (APP- β -Spaltstelle)	Biotin-TNIKTEEISEVKMDAIEFGHDSGFEVRHQKC-OH

Tabelle 2.17: Verwendete Peptide

2.16 GST-Proteine

Die in den *pulldown*- sowie *in vitro*- γ -Sekretase-Untersuchungen verwendeten GST-Proteine wurden aus freundlicher Weise von Prof Michalak (Uni, Alberta) zugesendeten *E. coli*-Kulturen

aufgereinigt und sind in der Tab. 2.18, S. 44 aufgelistet.

Bezeichnung	Protein	Konstrukt (Tab. 2.13, S. 38)
GST	GST- <i>Tag</i>	pGEX-3X
GST-C	CRT-C-Domäne, GST- <i>Tag</i>	pGEX-3X,C,SP
GST-CRT	CRT Gesamtprotein, GST- <i>Tag</i>	pGEX-3X,CRT,SP
GST-NP	CRT-NP-Domäne, GST- <i>Tag</i>	pGEX-3X,NP,SP
GST-P	CRT-P-Domäne, GST- <i>Tag</i>	pGEX-3X,P,SP

Tabelle 2.18: Verwendete GST-Proteine

2.17 Molekulargewicht-Standards

Die benutzten Standards, ihre Spezifität und Herkunft sind in der Tab. 2.19, S. 44 aufgelistet.

Bezeichnung	Spezifität	Herkunft / Referenz
1kb + DNA Ladder	zehn Banden (0,5kb-10kb)	New England Biolabs (Ipswich)
100bp DNA Ladder	zwölf (100bp-1517bp)	New England Biolabs (Ipswich)
All Blue (Precision Plus Protein™Standards)	zehn Banden (10kDa-250kDa; 25kDa/50kDa/75kDa rot)	Bio-Rad (München)
Bench Mark™	zehn Banden (10kDa-180kDa; je nach Charge leicht verändert)	Invitrogen (Karlsruhe)
Dual Color (Precision Plus Protein™Standards)	zehn Banden (10kDa-250kDa; 25kDa/75kDa rot)	Bio-Rad (München)

Tabelle 2.19: Molekulargewicht Standards

2.18 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

Homogenisierungspuffer	1mM CaCl ₂ 1mM MgCl ₂ 50mM Tris, pH 7,5 0,32M Saccharose
LB-Medium	10g Bacto-Trypton 5g Hefeextrakt 10g NaCl ad 1l dH ₂ O

LB-Agar	pH 7,5 Zusammensetzung s. LB-Medium, zusätzlich 1% (w/v) Agar
PBS	8g NaCl 0,2g KCl 1,15g Na ₂ HPO ₄ 0,2g KH ₂ PO ₄ ad 1l mit dH ₂ O
Probenpuffer für SDS-PAGE (5x Laemmli-Puffer)	pH 7,3 0.312M Tris/HCl pH 6.8 5% (w/v) SDS 20% Glycerol 0,0005% (w/v) Bromphenolblau 4% (w/v) DTT oder β -Mercaptoethanol
TBS	0,1mM Tris/HCl 1,5mM NaCl pH 7,5

3 Methoden

3.1 Biochemische Methoden

3.1.1 Eindimensionale SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

(Laemmli, 1970)

Lösungen

Acrylamid-Bisacrylamid 29:1	30% (w/v) in dH ₂ O
APS	10% (w/v) APS in dH ₂ O
Laufpuffer (1x)	3,0g Tris 14,4g Glycin 1g SDS ad 1l mit dH ₂ O
Probenpuffer für SDS-PAGE	(Kap. 2.18, S. 44)
Puffer (Sammelgel)	1M Tris/HCl, pH 6,8
Puffer (Trenngel)	1M Tris/HCl, pH 8,8
SDS	20% (w/v) in dH ₂ O
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethan-1,2-diamin (TEMED)	p.a.

Durchführung Zur Analyse des Vorkommens und Molekulargewichtes einzelner Proteine wurden die Proteingemische eindimensional in reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelen, unter Verwendung des Mini-Protean III Elektrophoresesystems (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers, elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden Gele von 0,75mm bis 1,5mm Dicke mit entweder zehn oder 15 Taschen verwendet. Die Laufstrecke betrug 0,8cm im Sammelgel und 4,5cm im Trenngel. Die Konzentration des im Gel enthaltenen Prozentsatzes an Acrylamid verhält sich antiproportional zu dem Größenoptimum der aufzutrennenden Proteine. Es wurden 8%-ige, 10%-ige, 12%-ige, 14%-ige und 16%-ige Gele verwendet. Die genaue Zusammensetzung ist der Tab. 3.1, S. 47 zu entnehmen.

Zusammensetzung	Trenngel					Sammelgel
	8%	10%	12%	14%	16%	5%
H ₂ O [ml]	2,1	1,7	1,3	0,9	0,4	1,6
30%Acrylamid/0,8%Bis [ml]	1,6	2,0	2,4	2,8	3,3	0,4
10% APS [µl]	15					15
10% SDS[µl]	60					30
TEMED [µl]	6					6
1M Tris/HCl pH8,8 [ml]	2,3					pH 6,8 0,3

Tabelle 3.1: Zusammensetzungen von Sammel- und Trenngellösungen, 1 SDS-PA-Gel, 1mm

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5min oder 65°C für 10min erhitzt und kurz zentrifugiert. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Gels wurde die Kammer gemäß des Protokolls zusammgebaut und die Taschen entsprechend ihrer Größe mit 15µl bis 40µl Probe beladen. Als Größenvergleich diente ein zusätzlich aufgetragener Proteinmarker (BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder (Gibco-BRL Life Technologies, Karlsruhe)). Die Spannung der Elektrophorese für das Sammelgel betrug 80V und wurde beim Übergang der Lauffront in das Trenngel auf 130V erhöht. Nach der elektrophoretischen Auftrennung können die Proteine sowohl unspezifisch und direkt auf dem Gel angefärbt (Coomassie- Kap. 3.1.4.1, S. 50 oder Silberfärbung Kap. 3.1.4.2, S. 51) oder mittels der Immunoblot-Analyse Kap. 3.1.5, S. 52 unter Verwendung eines entsprechenden Antikörpers spezifisch und indirekt nachgewiesen werden.

3.1.2 Trizin-SDS-PAGE

(Schägger, 2006)

Lösungen

Anodenpuffer	0,1M Tris/HCl, pH8,9
Gelpuffer (3x)	3M Tris
	1M HCl
	0,3% SDS, pH8,45
Kathodenpuffer	0,1M Tris/HCl
	0,1M Trizine
	0,1% SDS, pH8,25

Trizine-Probenpuffer (5x)	60µl 1M Tris/HCl pH8,0 320µl 80% Glycerol 200µl 10% SDS 0,25% β -Mercaptoethanol ad 1l dH ₂ O
---------------------------	--

Durchführung Zum Nachweis sehr kleinen Proteinen wurden die jeweiligen Proteingemische eindimensional in reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelen unter Verwendung des Mini-Protean III Elektrophoresesystems (BioRad, München) gemäß des Schaggerprotokolls elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Durchführung der Trizin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden Gele von 1,0mm Dicke mit 15 Taschen verwendet. Die Laufstrecke betrug 0,8cm im Sammelgel und 4,5cm im Trenngel, wobei Acrylamid einen Anteil von 4% für das Sammelgel und 14% für das Trenngel ausmachte. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist der Tab. 3.2, S. 48 zu entnehmen.

	Trenngel	Sammelgel
Zusammensetzung	14%	4%
30%Acrylamid/0,8%Bis [ml]	4	0,5
Gelpuffer (3x) [ml]	5	1,5
Glycerol [ml]	1,5	-
ad H ₂ O [ml]	15	6
10% APS [µl]	60	45
TEMED [µl]	7	4,5

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngellösungen, Trizin-SDS-Gel (3 Gele 1mm; 2 Gele 1,5mm)

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit Trizin-Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5min oder 65°C für 10min erhitzt und kurz zentrifugiert. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Gels, wurde die Kammer gemäß dem Protokoll zusammengebaut und die Taschen entsprechend ihrer Größe mit 15µl oder 40µl Probe beladen. Als Größenvergleich diente ein zusätzlich aufgetragener Proteinmarker (BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder (Gibco-BRL Life Technologies, Karlsruhe)). Die Spannung der Elektrophorese für das Sammelgel betrug 80V und wurde beim Übergang der Lauffront in das Trenngel auf 130V erhöht. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mittels der Immunoblot-Analyse (Kap. 3.1.5, S. 52) unter Verwendung eines entsprechenden Antikörpers nachgewiesen.

3.1.3 Zymographie

(Troeberg & Nagase, 2004)

Lösungen

Acrylamid-Bisacrylamid 29:1	30% (w/v) in dH ₂ O
APS	10% (w/v) APS in dH ₂ O
Entwicklungspuffer	50mM Tris 200mM NaCl 5mM ZnCl ₂ 5mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O 0,02% NaN ₃ ad dH ₂ O pH7.5 mit HCl und auf 1l mit Wasser aufgefüllt
Gelatine	(Merck, Darmstadt)
Laufpuffer (1x)	3,0g Tris 14,4g Glycin 1g SDS ad 1l mit dH ₂ O
Probenladepuffer	2% (w/v) SDS 0,1% Bromphenolblau 40% (w/v) Glycerol ad 100% (w/v) Laufpuffer
Puffer (Sammelgel)	1M Tris/HCl, pH6,8
Puffer (Trenngel)	1M Tris/HCl, pH8,8
Renaturierungspuffer	2,5% (v/v) Triton X-100 in Entwicklungspuffer
SDS	20% (w/v) in dH ₂ O
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED) PA	

Durchführung Zum Nachweis der Aktivität bzw. der Form der Gelatinasen wurden die jeweiligen Proben eindimensional in reduzierenden, Gelatine enthaltenden SDS-Polyacrylamidgelen, unter Verwendung des Mini-Protean III Elektrophoresesystems (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend . Für die Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden 12%ige Gele von 0,75mm Dicke mit 15 Taschen verwendet und die Laufstrecke betrug 0,8cm im Sammel- und 4,5cm im Trenngel, dem 0,1% Gelatine beigeügt wurden. Die weitere Zusammensetzung ist der Tab. 3.1, S. 47 zu entnehmen. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Gels wurde die Kammer gemäß des Protokolls zusammengebaut und die Taschen entsprechend ihrer Größe mit 15µl

der mit Probenladepuffer versetzten Proben beladen. Als Größenvergleich diene ein zusätzlich aufgetragener Proteinmarker (BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe)). Die Spannung der Elektrophorese für das Sammelgel betrug konstant 150V. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel viermal 15min bei RT mit Renaturierungspuffer auf dem Schüttler gewaschen (Gesamtzeit des Waschvorgangs etwa 1 Stunde). Durch diesen Prozeß erfolgte ein Austausch des im Gel enthaltenen SDS gegen das nichtionische Detergenz, wodurch eine Rückfaltung der Gelatinase erleichtert worden ist. Zur Durchführung der Enzymreaktion wurde das Gel anschließend über Nacht bei 37°C in Entwicklungspuffer inkubiert und mittels Coomassie gefärbt (Kap. 3.1.4.1, S. 50). Die den aktiven Gelatinaseformen entsprechenden Banden erscheinen aufgrund der verdauten Gelatine in hell auf dem sonst blau gefärbten Gel.

3.1.4 SDS-Gelfärbung

3.1.4.1 Coomassie-Färbung

(kolloidale Färbung Roti[®]-Blue (Carl Roth))

Lösungen

Fixierungslösung	79ml dH ₂ O 1ml o-Phosphorsäure 85% 20ml Methanol
Färbelösung	60ml H ₂ O 20ml dH ₂ O 20ml Roti-Blue (5x Konz., kräftig geschüttelt)
Waschlösung	25ml MeOH 75ml dH ₂ O
Stabilisierungslösung	20g Ammoniumsulfat ad 100ml dH ₂ O
Trocknerlösung	10ml Glycerin 20ml Ethanol 70ml dH ₂ O

Durchführung Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das Gel für mindestens 1h in der Roti-Blue-Färbelösung inkubiert, anschließend in eine neue Färbeschale überführt und überschüssige Farbe durch Schütteln in der Waschlösung und mehrmaliges Wechseln dieser entfernt. Zur Aufbewahrung konnte das Gel in der Stabilisierungslösung einige Tage gelagert werden oder zur Langzeitlagerung nach 30minütiger Inkubation in der Trocknerlösung zwischen Cellophan getrocknet werden. Roti-Blue ist eine kolloidale Coomassie Brilliant Blue G (CBBG)-250 Färbung für Proteine in Polyacrylamidgelen. Die Sensitivität von Roti-Blue ist mit der von Silberfärbungen vergleichbar (< 30ng/Protein) und geeignet für die anschließende Analyse der angefärbten Proteinbanden mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) (Jensen et al., 1997; Mortz et al., 1994).

3.1.4.2 Silberfärbung

(Heukeshoven & Dernick, 1988)

Lösungen

Aufbewahrungslösung	30% (v/v) Ethanol 2% (v/v) Glycerol
Entwicklungslösung	7,5g Kaliumcarbonat 31,3l Natriumthiosulfat-pentahydrat (10% w/v) 75l Formaldehyd (37% w/v) ad 250ml dH ₂ O
Fixierungslösung	300ml Ethanol 100ml Essigsäure ad 600ml dH ₂ O
Imprägnierungslösung	0,5g Silbernitrat
Sensibilisierungslösung	750mg Kaliumtetrathionat (3% w/v) 12,3g Kaliumacetat (0,5M) 75ml Ethanol (30%) ad 250ml dH ₂ O
Stop-Lösung	10g Tris 5ml Eisessig ad 250ml dH ₂ O

Durchführung Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das Gel für 1h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht in der Fixierungslösung inkubiert, wobei die Lösung 2 bis 4 mal gewechselt wurde. Im Anschluss erfolgte die Sensibilisierung für 45min in der entsprechenden Lösung. Daraufhin wurde das Gel für jeweils 10min sechsmal mit Wasser gewaschen und eine

Inkubation mit der Imprägnierungslösung für einen Zeitraum von 1h bis 2h angeschlossen. Nach einem kurzen Waschschrift (max. 15sec.) mit dH₂O wurden die in dem Gel aufgetrennten Proteine mit Hilfe der Entwicklungslösung sichtbar gemacht, wobei die Entwicklungszeit durchschnittlich 3min - 10min beträgt. Die Reaktion wurde dann durch Austausch der Entwicklungslösung gegen die Stop-Lösung und 45minütige Inkubation darin beendet. Zur Aufbewahrung konnte das Gel in der entsprechenden Lösung einige Tage gelagert werden oder zur Langzeitlagerung nach kurzer Inkubation in 2% (v/v) Glycerol getrocknet werden. Diese Art der Silberfärbung wurde optimiert für eine Proteinmenge von $\geq 100\mu\text{g}$ und anschließende Analyse der aufgetrennten Proteine mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) (Jensen et al., 1997; Mortz et al., 1994).

3.1.5 Immunoblot-Analyse

(Burnette, 1981; Towbin et al., 1979)

3.1.5.1 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

(Towbin et al., 1979)

Lösungen

Blotpuffer	3g Tris/HCl 14,4g Glycin ad 1l mit dH ₂ O
PBST	PBS (Kap. 2.18, S. 44) 0,1% TWEEN 20
Blockierungslösung	4% Magermilchpulver (Tab. 2.1, S. 30) in PBS-T

Durchführung Bei der Immunoblot-Analyse werden die durch SDS-Gelelektrophorese (Kap. 3.1.1, S. 46; Kap. 3.1.2, S. 47) aufgetrennten Proteine vom SDS-Gel auf eine Membran (Nitrocellulose bzw. PVDF) transferiert. Für den elektrophoretischen Transfer von SDS-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen (Protran Nitrocellulosemembran, Schleicher & Schuell, Daßel) wurden MINI TRANSBLOT-Apparaturen von BioRad (München) verwendet. Aus zwei Whatman-Filtern (Whatman BIOMETRA, Göttingen), dem SDS-Gel, der Nitrocellulose-Membran und nochmals zwei Whatman-Filtern wurde, nachdem die einzelnen Bestandteile vor dem Gebrauch in Blotpuffer eingeweicht worden sind, das Transfer-Sandwich zusammengesetzt und nach den Angaben des Herstellers in die Blotting-Apparatur eingesetzt. Der Transfer dauerte in der Regel 1h 30min bis 2h 30min bei einer Stromstärke von 400mA. Nach

dem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungen eine Stunde bei RT mit 4% Blockierungslösung inkubiert.

3.1.5.2 Immunreaktion

(Ausubel et al., 1996)

Lösungen

PBST	PBS (Kap. 2.18, S. 44) 0,1% TWEEN 20
Blockierungslösung	4% Magermilchpulver (Tab. 2.1, S. 30) in PBST

Durchführung Nach Absättigung der Membran mit 4% Blockierungslösung wurde diese für 120min bei RT bzw. ü.N. bei 4°C mit dem Erstantikörper [verdünnt in 4% Blockierungslösung] inkubiert. Die nun folgenden Inkubationsphasen wurden bei RT durchgeführt. Nach vier 10minütigen Waschschritten mit PBST wurde die Membran für 1h mit dem Zweitantikörper [verdünnt in 4% Blockierungslösung] inkubiert und wiederum vier Waschschrritte 10min mit PBST angeschlossen. Die anschließende Nachweisreaktion ist in dem folgenden Abschnitt Kap. 3.1.5.3, S. 53 beschrieben. Die verwendeten Erstantikörper und ihre Charakteristika sind im Kapitel Material in der Tab. 2.14, S. 42 aufgeführt.

3.1.5.3 ECL-Reaktion

Die Nachweisreaktion erfolgte über die an den Zweitantikörper kovalent gebundene Meerrettichperoxidase, die katalytisch chemilumineszente Substrate umsetzt.

Durchführung Nach Beendigung der Waschschrritte wurden die zuvor im Verhältnis 1:1 gemischten Chemilumineszenzlösungen [ECLTM *Western Blotting detection reagents*, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg) bzw. *Super Signal West Dura Extended Duration Substrate*, Pierce (Bonn)] auf die Membran gegeben und für ca. 1min inkubiert. Nach Einbetten der Membran zwischen zwei Klarsichtfolien und Positionieren in eine Filmkassette, konnte in der Dunkelkammer mit Hilfe eines Röntgenfilms [Kodak BioMax Light Film, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)] durch Auflegen, Exponierung und Entwicklung ein Bild der spezifischen Proteinbanden gemacht werden.

3.1.6 Proteinfällung

3.1.6.1 Proteinfällung nach Wessel

(Wessel & Flügge, 1984)

Lösungen

Methanol

Chloroform

Probenpuffer für SDS-PAGE (Kap. 2.18, S. 44)

Durchführung Die zu fällende Proteinlösung wurde in der Reihenfolge mit vier Volumina Methanol, einem Volumen Chloroform und drei Volumina dH₂O versetzt und nach Zugabe einer jeden Lösung gemischt. Anschließend wurde der Ansatz für 3min bei 16000 * g zentrifugiert und der methanollösliche Überstand abgenommen. Zu der das Protein enthaltenden Interphase und der chloroformlöslichen Phase wurden drei Volumina Methanol gegeben, der Ansatz wiederum gut gemischt und erneut bei 16000 * g für 3min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Sediment an der Luft getrocknet und anschließend in Probenpuffer für SDS-PAGE aufgenommen. Die Proben wurden mit Hilfe der SDS-PAGE und Immunoblot-Analyse (Kap. 3.1.5, S. 52) untersucht.

3.1.6.2 Acetonfällung

Lösungen

Aceton

Probenpuffer für SDS-PAGE (Kap. 2.18, S. 44)

Durchführung Zur Fällung von Proteinlösungen wurde die Probe mit sieben Volumina eiskaltem Aceton vermischt und für mehr als 24h bei -20 C eingefroren. Die ausgefallenen Proteine wurden für 30min bei 3000 * g und 4°C sedimentiert, der Überstand verworfen und das an der Luft getrocknete Sediment in Probenpuffer für SDS-PAGE aufgenommen. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE (Kap. 3.1.1, S. 46) und Immunoblot-Analyse (Kap. 3.1.5, S. 52).

3.1.7 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration (BCA-Test)

(Smith et al., 1985)

Lösungen

BCA-Reagent A	1% (w/v) Bicincholinsäure di-Natriumsalz
	1.7% (w/v) Na ₂ CO ₃ x H ₂ O
	0.16% (w/v) Natriumtartrat
	0.4% (w/v) NaOH
	0.95% (w/v) NaHCO ₃ pH11.25
BCA-Reagent B	4% (w/v) CuSO ₄ x 5 H ₂ O

Durchführung Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Proben wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Reagent Kits der Firma Pierce (Bonn) in Mikrotiter-Streifen der Nunc GmbH (Wiesbaden) im Vergleich mit einer selbst erstellten Standardreihe, bestehend aus 0µg/ml - 1000µg/ml BSA (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000µg/ml), durchgeführt. Zur Herstellung der BCA-Lösung wurden Reagenz A und B in dem Verhältnis 50:1 gemischt. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 210µl. 10µl der zu analysierenden Probe wurden mit 200µl BCA-Lösung versetzt, der Ansatz gemischt und für 30min bei 37°C inkubiert. Zur Erhöhung der Genauigkeit wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Nach der Inkubation erfolgte die Messung der Extinktion bei 562nm (ELISA-Reader, Micronaut Skan, Roche Diagnostics, Mannheim), anhand derer die Proteinkonzentration mit Hilfe der linearen Regression ermittelt werden konnte.

3.1.8 Zellfraktionierung

Als Versuchstiere für die Zellfraktionierung wurden adulte Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J von unterschiedlichem Alter und Geschlecht verwendet. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Tierstall bei Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Sie erhielten die Standarddiät und Wasser *ad libitum*. In der folgenden Tab. 3.3, S. 56 sind die allgemein verwendeten Lösungen aufgeführt.

Lösung	Sucrosepuffer	Homogenisierungspuffer	1.2M Sucrose	1M Sucrose	0,85M Sucrose	0,65M Sucrose
Sucrose (80%) [ml]	-	34,5	76,9	85,5	9,1	6,9
1M MgCl ₂ [µl]	100	250	150	200	25	25
1M CaCl ₂ [µl]	100	250	150	200	25	25
1M NaHCO ₂ [µl]	100	250	150	200	25	25
1M Tris/HCl pH7,5 [ml]	0,5	1,25	0,75	1	0,175	0,175
dH ₂ O [ml]	ad 100	213,8	74,4	112,9	15,7	17,9

Tabelle 3.3: Verwendete Saccharoselösungen

Die Saccharoselösungen wurden ausgehend von einer 80%igen Saccharoselösung (2,34M Saccharose in dH₂O) hergestellt.

3.1.8.1 Herstellung eines Mausgehirn-Homogenates

Lösungen

Homogenisierungspuffer (Tab. 3.3, S. 56)

Durchführung Die Tötung der Tiere erfolgte durch Vergasung mit CO₂. Direkt im Anschluss wurde die Schädeldecke entfernt, das Gehirn entnommen und in 3ml 4°C kalten Homogenisierungspuffer gegeben. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Mit Hilfe eines Glashomogenisators erfolgte die Homogenisierung der Gehirne durch zwölfmaliges Auf- und Abziehen des Teflonpistills. Das so erhaltene Gesamthomogenat wurde als Ausgangsmaterial für Immunpräzipitationen oder als Positivkontrolle für die SDS-PAGE verwendet. Um Zellkerne und Zelltrümmer zu sedimentieren, wurde eine Zentrifugation des Homogenates für 15min bei 1000 * g und 4°C angeschlossen. Der so erhaltene Überstand wurde mit dem der 17000 * g Zentrifugation zur löslichen Fraktion S1 vereinigt und zur weiteren Analyse mittels Immunpräzipitation (Kap. 3.1.15, S. 66) oder SDS-PAGE (Kap. 3.1.1, S. 46) verwendet. Das in Homogenisierungspuffer gelöste und homogenisierte Sediment wurde zur Isolierung von Fraktionen angereichert mit Synaptosomen von Moosfasern (Kap. 3.1.8.3, S. 57) herangezogen.

3.1.8.2 Herstellung der löslichen Fraktion S1 und des „17000 * g“ - Sedimentes3 aus Mausgehirn-Homogenat

Lösungen

Homogenisierungspuffer (Tab. 3.3, S. 56)

Durchführung Die Tötung der Tiere erfolgte durch Vergasung mit CO₂. Die Schädeldecke wurde eröffnet und das Gehirn entnommen. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Präparation der einzelnen Gehirne erfolgte schrittweise. Je ein Gehirn wurde in 3ml Homogenisierungspuffer aufgenommen und in einem Glashomogenisator durch zwölfmaliges Auf- und Abziehen des Teflonpistills homogenisiert. Die erhaltenen Homogenate wurden vereinigt und für 10min bei 1000 * g und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Sediment1 wurde in Homogenisierungspuffer resuspendiert und wieder für 15min bei 700 * g und 4°C zentrifugiert, wodurch das Sediment2 gewonnen wurde. Dieses wurde für die Isolierung der Membranfraktionen einschließlich der Fraktion Synaptosomen von Moosfasern verwendet. Durch Vereinigung der Überstände1 und 2 beider Zentrifugationsschritte und anschließende Zentrifugation für 20min bei 17000 * g und 4°C ergab sich das Sediment3 und die gesamte lösliche Fraktion S1. Diese wurde nach Abnahme einer Kontrollprobe verworfen oder mittels Immunoblot (Kap. 3.1.5, S. 52) bezüglich des Vorkommens verschiedener Proteine hin untersucht. Das in Homogenisierungspuffer gelöste und homogenisierte 17000 * g-Sediment3 wurde zur Isolierung von Fraktionen, angereichert mit Synaptosomen, Mitochondrien und Zellkernen (Kap. 3.1.8.3, S. 57), verwendet.

3.1.8.3 Isolierung von Fraktionen, angereichert mit Synaptosomen, Myelin, Axolemma und Mitochondrien

(Taupin et al., 1994)

Lösungen

Homogenisierungspuffer (Tab. 3.3, S. 56)

0,65M Saccharoselösung (Tab. 3.3, S. 56)

0,85M Saccharoselösung (Tab. 3.3, S. 56)

1,0M Saccharoselösung (Tab. 3.3, S. 56)

1,2M Saccharoselösung (Tab. 3.3, S. 56)

1 x PBS (Kap. 2.18, S. 44)

Probenpuffer für SDS-PAGE (Kap. 2.18, S. 44)

Durchführung Für die Isolierung von Fraktionen, angereichert mit u.a. Synaptosomen und kompaktem Myelin wurde das 17.000 * g-Sediment3 (Kap. 3.1.8.2, S. 57) und für die Aufreinigung der Membranfraktionen einschließlich der Synaptosomen von Moosfasern, „rohem“ Myelin sowie Ranvier'sche Schnürringen wurde das „700 * g“-Sediment2 (Sed2) verwendet. Dieses wurde in Homogenisierungspuffer resuspendiert, homogenisiert und mit der 80% igen Saccharoselösung auf eine Molarität von 1,0M Saccharose eingestellt. Der Ansatz wurde mit Hilfe eines diskontinuierlichen Saccharosegradienten in Fraktionen aufgetrennt, die mit Synaptosomen, Mitochondrien und Zellkernen angereichert waren. Der Gradient setzte sich wie folgt zusammen (vom Boden zur Öffnung des Zentrifugationsröhrchens, Abb. 3.1, S. 59): 1,2M Saccharose-Lösung, Probe in 1,0M Saccharose-Lösung und Homogenisierungspuffer. Der Gradient wurde daraufhin einem Zentrifugationsschritt für eine Zeit von 2 Stunden bei 100000 * g und 4°C unterzogen. Die zwischen den Phasen der verschiedenen Saccharoselösungen angereicherten Organellen (Sediment (Sed1): Zellkerne und Mitochondrien, SynMF: Synaptosomen von Moosfasern, RV: Ranvier'sche Schnürringe My1: rohes Myelin) wurden von der Öffnung zum Boden des Zentrifugationsröhrchens abgenommen. Zur Anreicherung der Synaptosomen wurde die Interphase zwischen der 1M und 1,2M Sucroselösung (Syn) in 1M Sucrose resuspendiert, ein gleicher Gradient hergestellt und ein Zentrifugationsschritt für eine Zeit von 1h bei 100000 * g bei 4°C angeschlossen. Die erhaltenen Fraktionen wurden mit Homogenisierungspuffer in einem Verhältnis von 1:2 gemischt und die darin enthaltenen Organellen durch Zentrifugation für 30min bei 100000 * g und 4°C sedimentiert. Die angereicherten Organellen der einzelnen Sedimente wurden in 1 x PBS aufgenommen, zur Affinitätschromatographie oder Immunpräzipitation verwendet oder mit Probenpuffer für PAGE versetzt und mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (Kap. 3.1.5, S. 52) untersucht.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von synaptosomalen Membranen sowie kompaktem Myelin wurde statt dem 700 * g-Sediment das aus der Zentrifugation des Gehirnhomogenates resultierende 17.000 * g-Sediment 3 (Kap. 3.1.8.2, S. 57) verwendet. Nach Resuspendierung in Homogenisierungspuffer und anschließender Homogenisierung wurde auch dieser Ansatz mit Hilfe eines diskontinuierlichen Saccharosegradienten in die einzelnen Fraktionen aufgetrennt, wobei sich der Gradient wie folgt zusammensetzt (vom Boden zur Öffnung des Zentrifugationsröhrchens, Abb. 3.1, S. 59): 1,2M Saccharose-Lösung, 1,0M Saccharose-Lösung, 0,85M Saccharose-Lösung, 0,65M Saccharose-Lösung und Probe in Homogenisierungspuffer. Die Isolierung der Fraktionen und weitere Analyse erfolgte nach dem, in diesem Kapitel beschriebenen, Protokoll. Die in den verschiedenen Interphasen angereicherten Organellen setzten sich wie folgt zusammen: Sediment (Sed2): Mitochondrien, Syn: synaptosomale Membranen, A: Axolemma, PA: Periaxolemma, My2: kompaktes Myelin. Auch die durch diesen Gradienten erhaltene Synaptosomenfraktion (Syn) wurde vor Resuspendierung in 1 x PBS durch erneute Gradientenzentrifugation an Synaptosomen angereichert.

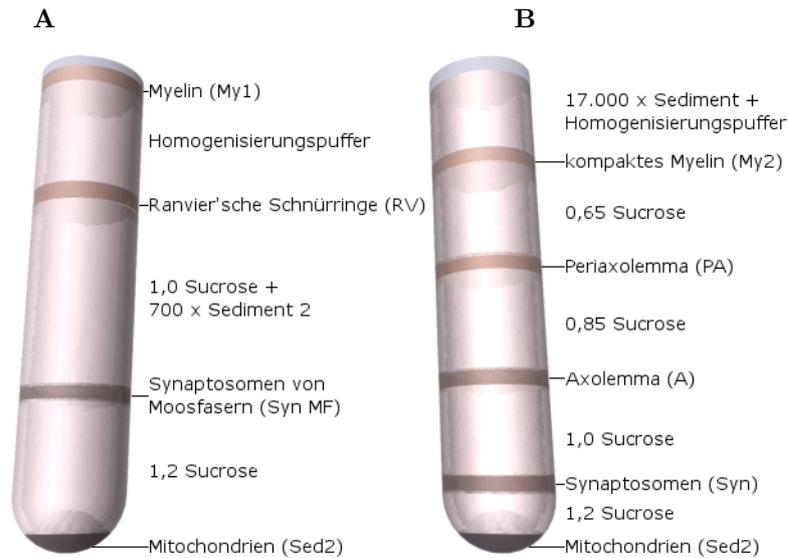


Abb. 3.1: Aufbau eines diskontinuierlichen Saccharosegradienten

Zur Aufreinigung von (A) synaptosomalen Moosfasern/rohem Myelin/Ranvier'sche Schnürringen und (B) synaptosomalen Membranen/kompaktem Myelin wurden verschiedene molare Saccharoselösungen sowie das der vorangegangenen Zentrifugation von Mausgehirnen entsprechende Sediment übereinander geschichtet. Die Auftrennung der in dem Sediment enthaltenen Organellen erfolgte durch einem weiteren Zentrifugations-schritt für 2h bei 100000 * g, worauf diese in den jeweiligen Saccharoseinterphasen angereichert waren.

3.1.9 Lösen von Membranbestandteilen

Lösungen

PBS (Kap. 2.18, S. 44)

Lysepuffer
 20mM Tris, pH8,0
 150mM NaCl
 1mM EDTA

Detergenz
 TritonX-100
 CHAPS
 NP40
 NoGP

Probenpuffer für SDS-PAGE Kap. 2.18, S. 44)

Durchführung Die synaptosomalen Membranfraktionen SynMF und Syn wurden mit PBS oder Lysepuffer in einem Verhältnis von 1:2 verdünnt und in der Gegenwart von 1% Detergenz für 1h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für eine Zeit von 20min bei 17000

* g und 4°C zentrifugiert und das resultierende Sediment wieder in Lysepuffer aufgenommen. Sowohl eine Probe des resuspendierten Sedimentes als auch des Überstandes wurden mit Probenpuffer für SDS-PAGE versetzt, 5min bei 95°C inkubiert und durch SDS-PAGE (Kap. 3.1.1, S. 46) und Immunoblot-Analyse (Kap. 3.1.5, S. 52) die Wirksamkeit des eingesetzten Detergens in Bezug auf das zu untersuchende Protein überprüft. Der die gelösten Membranproteine enthaltende Überstand wurde für die Immunpräzipitation (Kap. 3.1.15, S. 66) oder Affinitätschromatographie (Kap. 3.1.13, S. 64) verwendet.

3.1.10 Aufreinigung des anti-D-Antikörpers

3.1.10.1 Isolierung des anti-D-IgG mit Hilfe des DEAE Kit (Bio-Rad)

Lösungen

Waschlösung	0.1M Essigsäure, pH3.0 1.4M NaCl 40% (v/v) Isopropanol
Equilibrierungslösung	0.02M Tris/HCl, pH8.0 0.028M NaCl 0.02% NaN ₃
Probenpuffer	0.02M Tris/HCl, pH8.0 0.028M NaCl 0.02% NaN ₃
Elutionspuffer	0.1M Zitronensäure pH3.0
Neutralisationspuffer	1M Tris, pH9.5

Durchführung Für die Isolierung der anti-D-IgG Fraktion wurde das DEAE Affi-Gel Blue Gel Kit (Bio-Rad) entsprechend der Gebrauchsanleitung verwendet. Nach Präparation einer Säule mit DEAE Affi-Gel Blue Gel mit einem Bettvolumen von 7ml Gel pro Milliliter des aufzubereitenden Serums, wurde das Gel mit fünf Bettvolumina Waschlösung gewaschen und durch zwölf Bettvolumina der entsprechenden Lösung equilibriert. Das den anti-D IgG enthaltende Kaninchenserum wurde gegen Probenpuffer dialysiert, auf die vorbereitete Säule gegeben und ungebundenes Material durch Spülen des Gels mit Probenpuffer entfernt. Die Elution erfolgte mit entsprechendem Puffer und anschließender Neutralisation durch 1M Tris, pH9,5. Die den aufgereinigten anti-D-IgG enthaltenden Elutionsfraktionen, wie anhand der photometrischen Messung der Absorption bei 280nm ermittelt, wurden vereinigt und die Proteinkonzentration unter Verwendung des BCA-Tests (Kap. 3.1.7, S. 55) bestimmt.

3.1.10.2 Isolierung des anti-D-IgG durch Protein A

Material und Lösungen

gefriergetrocknete Protein A gekoppelte Sepharose	
PBS	(Kap. 2.18, S. 44)
Elutionspuffer	0,1M Zitronensäure, pH3,0
Neutralisationslösung	1M Tris/HCl, pH8,0

Durchführung Eine definierte Menge der gefriergetrockneten Protein A gekoppelten Sepharose wurde entsprechend des Volumens der verwendeten Säule und gemäß der Gebrauchsanleitung in PBS quellen gelassen und vorsichtig in die Säule gegeben. Diese Protein A Säule wurde dann mit PBS und einer Flussrate von 0,25ml/min equilibriert und anschließend das mit PBS in einem Verhältnis von 1:2 verdünnte und das anti-D-IgG enthaltende Kaninchenserum aufgetragen. Das Waschen erfolgte bei gleicher Geschwindigkeit mit PBS. Die gebundenen Immunglobuline wurden mit dem Elutionspuffer eluiert, direkt neutralisiert und entweder gegen PBS dialysiert oder unter Verwendung der Amiconröhrchen (Kap. 3.1.11, S. 61) konzentriert.

3.1.11 Konzentration einer Probe

Material und Lösungen

Amicon Zentrifugationsröhrchen	(6ml/20ml); Ausschlussgröße 5kDa-50kDa (Millipore, Schwalbach)
PBS	(Kap. 2.18, S. 44)

Durchführung Entsprechend des zu konzentrierenden Proteins wurde ein passendes Amiconröhrchen ausgewählt und die Membran zweimal mit PBS durch Zentrifugation bei 3000 * g und 4°C gewaschen. Die Konzentration der Probe erfolgte bei gleicher Umdrehungszahl und Temperatur bis ca. zu einem Volumen von 1ml. Anschließend wurde sie mehrmals mit gleichem Volumen 4°C kaltem PBS gewaschen und schließlich bis zu einem Endvolumen von 200µl einkonzentriert. Die Konzentration der Proben wurden mit Hilfe des BCA-Testes (Pierce) (Kap. 3.1.7, S. 55) bestimmt.

3.1.12 Herstellung einer Säule für die Affinitätschromatographie

3.1.12.1 Kopplung des anti-D IgG an die Matrix einer CarboLink Säule

(<http://www.piercenet.com/files/1983dh5.pdf>)

Material und Lösungen

CarboLink Säule (2ml)	50% Gemisch von 6% quervernetzter Agarosekügelchen in 0.05% NaN ₃
CarboLink Kopplungspuffer, 60ml	0.1M Na ₂ PO ₄ 0.05% NaN ₃ (w/v) pH7.0
Waschlösung (25ml)	1M NaCl 0.05% NaN ₃
Oxidierungsreagenz (5mg)	Natrium-meta-periodat (MW = 213.89)
Zeba Desalt Spin Säule (5ml)	5,000 MW Porengröße
BupH PBS Pack	0.1M Phosphat 0.15M NaCl pH7.2 ad 500ml dH ₂ O
Säulenzubehör	2 Dichtungen 2 weiße Kappen Harzseparator and Säulenextender

Durchführung Das Koppeln des aufgereinigten anti-D-IgGs erfolgte mittels des CarboLink Kits (Pierce) gemäß der Gebrauchsanleitung.

Probenvorbereitung Bevor der Antikörper an die Matrix der Säule gekoppelt werden konnte, mussten dessen Kohlenhydratgruppen oxidiert werden. Dazu wurden 5mg (1ml) des anti-D-IgG in 1ml Kopplungspuffer resuspendiert, das Oxidierungsreagenz hinzugefügt und die Lösung für eine Zeit von 30min bei RT inkubiert. Nach erfolgter Equilibration der Zeba De-salt Spin Säule durch 2ml des Kopplungspuffers wurde die oxidierte Antikörperlösung langsam auf die Säule aufgetragen und mit 0,1ml des Puffers nachgespült. Die durch Zentrifugation erhaltene Fraktion enthält den oxidierte anti-D-IgG. Es wurden 1ml Kopplungspuffer zugegeben, eine Probe für die Bestimmung der Kopplungseffizienz behalten und mit der Kopplung fortgefahren.

Kopplung Vor dem Auftragen der vorbereiteten Antikörperlösung auf die CarboLink Säule wurde diese mit zweimal 2ml Kopplungspuffer equilibriert. Die Inkubation erfolgte bei mit den Kappen verschlossenen Enden rotierend über Nacht bei 4°C und für eine weitere Zeit von 30min bei RT und mit richtiger Orientierung. Von dem Durchfluss wurde wiederum eine Probe zur Bestimmung der Kopplungseffizienz behalten und entweder mit der Affinitätschromatographie (Kap. 3.1.13, S. 64) oder der Lagerungsvorbereitung fortgefahren.

Lagerung Zur Lagerung wurde die Säule mit dreimal 2ml Kopplungspuffer und zweimal 2ml Waschlösung gespült und anschließend mit dreimal 2ml entgastem PBS equilibriert. Dann wurden 2ml PBS + 0,05% NaN₃ aufgetragen, die Enden verschlossen und die Säule mit richtiger Orientierung bei 4°C gelagert.

3.1.12.2 Kopplung des anti-D-IgG an CNBr-aktivierte Sepharose-4B

Lösungen

Quelllösung	1mM HCl
Kopplungspuffer	100mM NaHCO ₃ 500mM NaCl pH8,3
Blockierungspuffer	200mM Glycin 500mM NaCl pH8,0
Waschpuffer	A 100mM NaAc 500mM NaCl pH4,0 B 100mM NaHCO ₃ 500mM NaCl, pH8,3 (Kopplungspuffer) C 1 x PBS (Kap. 2.18, S. 44)

Durchführung

Matrixvorbereitung Für ein Endvolumen von 2ml Matrix wurden 600mg gefriergetrocknete CNBr-aktivierte Sepharose-4B in 10ml Quelllösung aufgenommen und für eine Zeit von 15min bei 4°C inkubiert. Nach einem 5minütigen Zentrifugationsschritt von 200 * g und 4°C erfolgte das Waschen mit 5ml Quelllösung rotierend für eine Zeit von 15min Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde die Sepharoselösung ebenfalls rotierend 15min mit 5ml Kopplungspuffer inkubiert und dann abzentrifugiert.

Kopplung Zu 2ml des vorbereiteten Gels wurden 10mg in Kopplungspuffer gelöster anti-D-IgG gegeben und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für eine Zeit von 5min bei 200 * g und 4°C diente eine Probe des Überstandes zur Bestimmung der Kopplungseffizienz. Das Waschen des Gels erfolgte mit 10ml Kopplungspuffer und anschließender Zentrifugation und das Blockieren noch aktiver Gruppen durch Inkubation mit 10ml Blockierungspuffer über Nacht, rotierend und bei 4°C. Am nächsten Tag wurden drei Waschzyklen mit wechselndem pH-Wert, d.h. abwechselndes Waschen mit Waschpuffer A und Kopplungspuffer für je 15min, durchgeführt. Dann wurde das Gel zweimal mit PBS gespült, abzentrifugiert, in PBS aufgenommen und vorsichtig in die Säule gegeben, um das Entstehen von Luftblasen in der Matrix zu verhindern. Das Waschen der Säule erfolgte mit PBS und einer Flussrate von 0,5ml/min.

3.1.13 Affinitätschromatographie

Lösungen

Detergenz	TritonX-100 CHAPS
	n-octyl- β -D-Glucopyranosid (Tab. 2.3, S. 31)
Waschpuffer	A 25mM Tris 150mM NaCl 5mM EDTA, pH8,0
	B 25mM Tris 150mM NaCl 1% Detergenz 0,02% NaN ₃ , pH7,4

	C	25mM Tris 500mM NaCl 0,1% Detergenz 0,02% NaN ₃ , pH7,4
Elutionspuffer 1 (CarboLink Säule)		0,1M Glycine, pH2,5
Elutionspuffer 2 (CNBr-aktivierte Sepharose 4B Säule)		50mM Ethanolamin 150mM NaCl 0,2%Detergenz, pH11,5
Neutralisationslösung 1 (CarboLink Säule)		1M Tris/HCl, pH9,5
Neutralisationslösung 2 (CNBr-aktivierte Sepharose 4B Säule)		1M Tris/HCl, pH5,8
Dialysierungslösung		50mM Tris/HCl 150mM NaCl, pH7,2
Regenerationspuffer	A	0,1 Tris/HCl 500mM NaCl, pH8,5
	B	0,1M NaAc 500mM NaCl, pH4,5
	C	PBS, 0,02%NaN ₃

Durchführung Um die Affinitätschromatographie (System Controller und Pumpe, Econo, Bio-Rad (München)) besser verfolgen und die Elutionsfraktionen sammeln zu können, wurde die jeweilige Säule an einen Schreiber (Econo UV Monitor und Recorder Model 1327, Bio-Rad (München)) angeschlossen und so lange mit PBS gewaschen, bis die Basislinie konstant blieb. Anschließend wurde die Matrix mit 20ml des Waschpuffers A und einer Flussrate von 0,5ml/min gespült. Das Auftragen der Probe erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0,25ml/min sowie das nachfolgende Waschen mit je 20ml des Puffers C. Dabei wurden von jedem Durchfluss Proben aufgefangen, um diese später durch SDS-PAGE bezüglich der Bindungseffizienz verschiedener Proteine zu untersuchen. Nach erfolgter Elution mit dem entsprechenden Puffer und einer Flussrate von ebenfalls 0,25ml/min, wurden die Elutionsfraktionen mit einem ca. zehnfach kleineren Volumen Neutralisationslösung neutralisiert und über Nacht bei 4°C gegen die Dialysierungslösung dialysiert. Die Proben wurden anschließend oder direkt nach der Neutralisation mit Hilfe von Amiconröhrchen (Kap. 3.1.11, S. 61) konzentriert.

3.1.14 Probenvorbereitung für die Sequenzanalyse

Durchführung Nachdem die zu analysierenden Proteine mittels SDS-PAGE (Kap. 3.1.1, S. 46) aufgetrennt worden sind, wobei zwei identische Gele mit den gleichen Proben in derselben Anordnung laufen gelassen wurden, erfolgte einerseits das Anfärben der Proteinbanden durch Silber (Kap. 3.1.4.2, S. 51) oder kolloidales Coomassie (Kap. 3.1.4.1, S. 50) und andererseits das Sichtbarmachen dieser mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (Kap. 3.1.5, S. 52). Das gefärbte Gel wurde auf eine sterile Glasplatte gelegt und die entsprechenden Banden im Vergleich mit dem entsprechenden Bild der Immunoblot-Analyse mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in autoklavierte 1,5ml Gefäße überführt. Die Analyse erfolgte unter Verwendung der MALDI-Massenspektrometrie (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*)(Jensen et al., 1997; Mortz et al., 1994).

3.1.15 Immunpräzipitation

Lösungen

RIPA-Puffer	50mM Tris 150mM NaCl 1% NP40, complete protease inhibitor (Roche, Mannheim), pH7,4 z.T. zusätzlich 2mM Na_3VO_4 /1mM NaF (Tab. 2.4, S. 32)
PBS	(Kap. 2.18, S. 44)
Detergenz	TritonX-100 CHAPS CHAPSO NP40 NoGP (Kap. 2.3, S. 31)
Protein A/G-Suspension	Agarosekügelchen (Santa Cruz Biotechnology); magnetische Kügelchen (Pierce)
Probenpuffer für SDS-PAGE	(Kap. 2.18, S. 44)

Durchführung Immunpräzipitationen wurden entweder mit kultivierten Zellen oder mit Gehirnhomogenat bzw. -fraktionen von WT Mäusen durchgeführt. Im Falle der Zellen wurden diese vorab dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann, wie die Gehirnfractionen, mit RIPA-Puffer für eine Zeit von 30min bei 4°C inkubiert. Anstelle des Puffers erfolgte die Inkubation auch mit PBS, versetzt mit einem Prozent Detergenz und Proteaseinhibitoren (Roche, Mannheim). Anschließend wurden die Proben bei 1000 * g zentrifugiert und der erhaltene Überstand mit der entsprechenden Protein A/G Suspension für 30min vorinkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der resultierende Überstand mit dem entsprechenden Antikörper für eine Zeit von 3h rotierend bei 4°C inkubiert und die Inkubation nach Zugabe von 50µl der Protein A/G Suspension über Nacht fortgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Kügelchen entweder durch Zentrifugation bei 1000 * g oder durch Magneten vom Überstand getrennt und dreimal mit eiskaltem PBS, welches mit 0,5% des entsprechenden Detergenz versetzt war sowie einmal nur mit PBS gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch Inkubation mit Probenpuffer für SDS-PAGE, entweder für 5min bei 95°C oder für 15min bei 65°C. Die Kügelchen wurden abgetrennt und der Überstand mittels SDS-PAGE (Kap. 3.1.1, S. 46) analysiert.

3.1.16 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Lösungen

TBS	(Kap. 2.18, S. 44)
Blockierungslösung 1	1% BSA in TBS
TBST	TBS + 0,05% TWEEN 20
Blockierungslösung 2	1% BSA 1mM CaCl ₂ 1mM MgCl ₂ in TBST
ABTS-Lösung	250µl 2% ABTS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in dH ₂ O 3,5µl H ₂ O ₂ (30% w/v) ad 4,75ml Natriumacetat, pH5,0

Durchführung Für das Überprüfen der Interaktion zwischen der γ -Spaltstelle von APP und der Natrium-Kalium-ATPase, $\alpha 3$ -Untereinheit wurden ELISA-Studien durchgeführt. Dafür wurden sowohl eine kommerziell erhältliche Natrium-Kalium ATPase Mischung, bezogen von der Firma Sigma (Adenosine 5'-Triphosphatase, Sodium and Potassium-Activated), als auch ein biotinyliertes Peptid, welches der γ -Spaltstelle von APP entspricht (APP2, Tab. 2.17,

S. 43), verwendet. Als Kontrolle dienten BSA und ein biotinyliertes Peptid, welches die α -Spaltstelle von APP (APP1, Tab. 2.17, S. 43) wiedergibt. Beide möglichen Bindungspartner wurden auf der Polyvinylchlorid-beschichteten Oberfläche einer 96-well Microtiter-Platte (Nunc-Immunomodule Maxisorb, Nunc, Wiesbaden) durch Inkubation mit einer 10 μ g/ml enthaltenden Na^+/K^+ -ATPase-Lösung und mit einer 5 mg/ml enthaltenen APP2-Lösung, beides gelöst in dH_2O , ü.N bei 4°C auf einem Schüttler immobilisiert. Nicht gebundenes Protein oder Peptid wurde durch fünf aufeinanderfolgende Waschschrte mit TBS entfernt. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation mit der Blockierungslösung 1 für eine Stunde bei RT auf einem Schüttler abgesättigt. Nach drei weiteren Waschschrten mit TBST wurde eine Inkubation von immobilisierter Na^+/K^+ -ATPase bzw. APP2 mit den jeweils entgegengesetzten potentiellen Bindungspartnern für 2h bei RT auf einem Schüttler angeschlossen. Diese Proteine bzw. Peptide wurden in Blockierungslösung 2 gelöst. Ein versuchter Nachweis der spezifischen Bindung der beiden Komponenten erfolgte über die Inkubation mit einem Primärantikörper für 1,5h bei RT auf einem Schüttler. Für den Nachweis der Na^+/K^+ -ATPase wurde der anti- Na^+/K^+ -ATPase-Antikörper pan (Tab. 2.14, S. 42) in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Für die Detektion des APP-Peptides wurde der anti-APP-Antikörper B63.4 (Tab. 2.14, S. 42) in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die Primärantikörper wurden in Blockierungslösung verdünnt. Nach drei weiteren Waschschrten mit TBST folgte eine einstündige Inkubation bei RT auf einem Schüttler mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in der Blockierungslösung 2 eingesetzt. Der ELISA wurde weiteren drei Waschschrten mit TBST unterzogen und ein vierter Waschschrte mit TBS angeschlossen. Der Nachweis der Bindungseffizienz erfolgte mit einer, von dem an den Sekundärantikörper (Tab. 2.15, S. 43) gekoppelten Nachweisenzym (HRP), katalysierten Farbreaktion. Das Enzym HRP setzt ein in der applizierten ABTS-Lösung enthaltenes Substrat zu einem grünen Farbniederschlag um, der nach 15min und nach 30min bei 405 nm mit Hilfe eines ELISA-Readers (Micronaut Skan, Roche Diagnostics, Mannheim) gemessen wurde.

3.1.17 Aufreinigung der GST-Proteine

Lösungen

LBamp-Agar	LB-Agar (Kap. 2.18, S. 44) 100 mg/ml Ampicillin
LBamp-Medium	LB-Medium (Kap. 2.18, S. 44) 100 mg/ml Ampicillin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid, 100 mg/ml
GST-Sepharoseemulsion	(BD Bioscience, Pharmingen)

PBS	(Kap. 2.18, S. 44)
TritonX-100	(Tab. 2.3, S. 31)
Elutionslösung	20mM reduziertes Glutathion

Durchführung Die GST-Proteine exprimierenden Bakterien wurden auf LBamp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Am folgenden Tag wurde je eine isolierte Bakterienkolonie in 3ml LBamp-Medium gegeben, auch über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag zum Animpfen von 1 l LBamp-Medium verwendet. Das Bakterienwachstum erfolgte bei 37°C im Schüttler über einen Zeitraum von etwa 5h bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,6-0,8. Die Expression der GST-Proteine wurde durch Zugabe von IPTG in einer Verdünnung von 1:1000 induziert, für 3h fortgeführt und dann durch 20minütige Zentrifugation bei 6000rpm und 4°C beendet. Die sedimentierten Bakterien wurden anschließend in PBS mit 1% TritonX-100 resuspendiert und mit Hilfe der *French Press* aufgebrochen. Das Abtrennen der gelösten Proteine von Zelltrümmern und Kernbestandteilen erfolgte durch eine Zentrifugation für eine Zeit von 10min bei 10000 * g und 4°C. Dem Überstand wurde 1ml der GST-Sepharoseemulsion zugegeben und die Lösung rotierend bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Sepharosekügelchen zweimal mit PBS + 0,5% TritonX-100 und zweimal nur mit PBS gewaschen. Die Elution erfolgte durch je 2ml der entsprechenden Lösung in drei Schritten, wobei die resultierenden Elutionsfraktionen vereint wurden. Die enthaltenen GST-Proteine konnten dann durch die Methode der Proteinkonzentration (Kap. 3.1.11, S. 61) in einem Volumen von ca. 0,5ml angereichert werden.

3.1.18 pulldown-Untersuchung

Lösungen

PBS	(Kap. 2.18, S. 44)
Lysispuffer	50mM Tris 150mM NaCl 1% NP40, <i>complete protease inhibitor</i> (Roche) 1M CaCl ₂ 1M MgCl ₂
GST-Proteine	GST-CRT, GST-NP, GST-P, GST-C, GST
GST-Agarosekügelchen	(Santa Cruz Biotechnology)
Elutionspuffer	40mM Glutathion
Probenpuffer für SDS-PAGE	(Kap. 2.18, S. 44)

Durchführung Für diese Untersuchung wurden die mit APPSW und PS1 stabil transfizierten *Human-Embryonic-Kidney*-Zellen, HEK/PS1/SW-WT23 (Tab. 2.6, S. 33), verwendet (pro Ansatz eine 75 cm² Flasche (Greiner Bio-one, Frickenhausen)). Alle Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 0,5ml des entsprechenden Puffers für eine Zeit von 30min lysiert und das Lysat 10min bei 1000 * g und 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und auf 1mM CaCl₂ und 1mM MgCl₂ eingestellt. Dann erfolgte die Zugabe der GST-Proteine gleicher Mengen und die Inkubation der rotierenden Ansätze für eine Zeit von 2h bei 4°C. Anschließend wurden 100µl der GST-Agarosekügelchen/Gefäß zugegeben und diese über Nacht rotierend bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die jeweiligen Kügelchen dreimal mit Lysispuffer und einmal mit PBS für eine Zeit von je 10min gewaschen und wie gehabt von dem Überstand getrennt. Die Elution des anti-D-IgG erfolgte durch Zugabe von 40µl 5x Probenpuffer für SDS-PAGE (Kap. 2.18, S. 44) und 15minütige Inkubation bei 65°C. Die Ansätze wurden für eine Zeit von 30 sec bei 14000 * g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE (Kap. 3.1.1, S. 46) verwendet.

3.1.19 γ -Sekretasekomplex Isolierung

(Haas et al., unveröffentl.)

Lösungen

PBS	(Kap. 2.18, S. 44)
MOPS Puffer	10mM MOPS 10mM KCl, pH7.0
CHAPSO Lysepuffer	150mM Natriumzitat 1% CHAPSO, Proteaseinhibitor Cocktail (Roche), pH6,4
Protein A/G-Agarose	(Santa Cruz Biotechnology)
CHAPSO Waschpuffer	150mM Natriumcitrat 0,5% CHAPSO, pH6,4
Probenpuffer für SDS-PAGE	(Kap. 2.18, S. 44)

Durchführung Presenilinkomplexe wurden gemäß des Protokolls aus HEK-Zellen isoliert, welche sowohl stabil mit mutiertem oder Wildtyp PS1 als auch mit mutiertem APP SW transfiziert sind (HEK PS1 SW WT23 und HEK/PS1/SW-D385N-10, Tab. 2.6, S. 33). Dazu wurden diese nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS in MOPS Puffer bei 4°C homogenisiert und anschließend zwei Zentrifugationsschritten bei 4°C unterzogen: der erste erfolgte für eine Zeit von 10min bei 1000 * g und der folgende mit dem erhaltenen Überstand 45 Minuten lang bei 100000 * g. Die sedimentierten Membranen wurden in CHAPSO Lysepuffer

aufgenommen, für eine Zeit von 30min auf Eis inkubiert und wieder für 30min bei 100000 * g und 4°C zentrifugiert. Nach einer Vorinkubation mit der Protein A/G-Agarose wurde dem Überstand der monoklonale anti-Presenilin1 Antikörper "Nixon" (Tab. 2.14, S. 42) und die Protein A/G Emulsion zugegeben und die Lösung für 2h bei 4°C belassen. Das Gewinnen der Immunkomplexe erfolgte durch 5minütige Zentrifugation bei 2000 * g und 4°C sowie viermaliges Waschen mit CHAPSO Waschpuffer. Die an die Protein A/G-Agarose gebundenen Presenilinkomplexe wurden in Probenpuffer für SDS-PAGE, z.T. mit 4M Harnstoff, aufgenommen, für 10 Minuten bei 65°C inkubiert und auf ein SDS-Gel geladen, welches in dem Fall des harnstoffhaltenden Probenpuffers auch mit Harnstoff in einer Konzentration von 8 mol/l angesetzt worden ist. Die weitere Untersuchung erfolgte mittels SDS-PAGE (Kap. 3.1.1, S. 46) und Immunoblot-Analyse (Kap. 3.1.5, S. 52).

3.1.20 γ -Sekretase Aktivitätsbestimmung

(γ -Sekretase-Aktivitätskit, R&D Systems)

Lösungen

PBS	(Kap. 2.18, S. 44)
Extraktionspuffer	R&D Systems
Reaktionspuffer	2x, R&D Systems
Substrate	APP-Peptid GVVVIV, EDANS/DABCYL Reportersystem

Durchführung Die γ -Sekretaseaktivität des Komplexes in HEK/PS1/SW-WT23-Zellen (Tab. 2.6, S. 33) in Abhängigkeit von Calretikulin wurde mit Hilfe des γ -Sekretase Activity Kits von R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt) gemäß des Protokolls ermittelt. Im Detail wurden die zuvor mit den unterschiedlichen CRT-Konstrukten sowie dem Leervektor als Negativkontrolle transfizierten Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, mittels eines Zellschabers abgelöst, in PBS aufgenommen und durch Zentrifugation sedimentiert. Die Lyse erfolgte durch eine der Zellzahl entsprechende Menge an Extraktionspuffer und 10minütige Inkubation. Das Lysat wurde anschließend 1 Minute bei 10000 * g zentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstandes mit Hilfe des BCA-Testes (Kap. 3.1.7, S. 55) ermittelt, um diese für die enzymatische Reaktion zur Bestimmung der γ -Sekretaseaktivität angleichen zu können. Die Reaktion erfolgte in Mikrotitergefäßen der Firma Nunc GmbH & Co.KG (Wiesbaden) durch Mischen gleicher Volumina des Zellysates und Reaktionspuffers sowie Substrat. Die Platten wurden vor Lichteinwirkung geschützt, für eine Zeit von 1 bis 2h bei 37°C inkubiert und anschließend mittels des Quant™ Mikroplate-Spektralphotometers von Bio-Tek bei Excitationswellenlänge von 335nm-355nm und einer Emissionwellenlänge von

495nm-510nm gemessen. Die Berechnung erfolgte mit dem zugehörigen Programm KC Junior unter Berücksichtigung aller Kontrollen.

3.1.21 *in vitro* γ -Sekretaseaktivitätsuntersuchung

(Capell et al., 2003; Erbauer et al., 2003; Kimberly et al., 2003)

Lösungen

PBS	(Kap. 2.18, S. 44)
CHAPSO	Lysepuffer 150mM Natriumzitat 1% CHAPSO <i>complete protease inhibitor</i> (Roche), pH6,4
Untersuchungsbedingungen	150mM Natriumzitat 0.25% CHAPSO 0.5mg/ml Phosphatidylcholin 10mM DTT 0.1mg/ml BSA vollständiger Protease Inhibitor (Roche), pH6,4
CHAPSO Waschpuffer	150mM Natriumcitrat 0,5% CHAPSO, pH6,4
APP-C100-His6	
GST-Proteine	Calretikulin, NP-, P-, C- Domäne, GST
Protein A/G Sepharose (PAS)	(Santa Cruz Biotechnology)
Probenpuffer für Tricin-SDS-PAGE	(Kap. 3.1.2, S. 47)

Durchführung Für die *in vitro* γ -Sekretaseaktivitätsuntersuchung wurden HEK/PS1/SW-WT23Zellen (Tab. 2.6, S. 33) verwendet. Ein Ansatz umfasste eine 10cm Schale. Gleich mit welcher Variante fortgefahren wurde, musste zuerst die Membranfraktion gewonnen werden. Dazu wurden die Zellen, nachdem sie zweimal mit kaltem PBS gewaschen worden sind, mit dem CHAPSO Lysepuffer von den Schalen abgelöst, aufgenommen und homogenisiert. Dann erfolgte ein 30minütiger Zentrifugationsschritt bei 100000 * g und 4°C zum Abtrennen von Zelldetritus und unlöslichem Material. Mit dem Überstand wurde entsprechend der Variante fortgefahren.

Variante A: mit Immunpräzipitation Nachdem der Überstand mit PAS, um unspezifische Bindungen zu vermeiden, für eine Zeit von 30min inkubiert worden ist, wurde der PS1-Komplex mit dem anti-PS1 Antikörper 2953 (Tab. 2.14, S. 42) immunpräzipitiert (2h und 4°C). Das Waschen des an die PAS gebundenen Komplexes erfolgte durch den Waschpuffer in vier Schritten und einer Gesamtzeit von etwa 1h. Nachdem der Überstand vorsichtig und vollständig entfernt worden ist, wurde die Sepharose in einem Puffer mit den angegebenen Untersuchungsbedingungen aufgenommen, ca. 0,8µg APP C100-His6 pro 20µl Ansatz sowie die gleiche Menge an GST-Protein (je Ansatz eins) zugegeben und die Lösung über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde Probenpuffer für Trizin-SDS-PAGE addiert, die Proben für eine Zeit von 5min auf 95°C erhitzt und auf ein Trizingel geladen. Die weitere Untersuchung erfolgte mittels Tricin-SDS-PAGE (Kap. 3.1.2, S. 47) und Immunoblotanalyse (Kap. 3.1.5, S. 52). Dabei musste die Nitrocellulosemembran, um eine Bindung des verwendeten 6E10 oder W02 Antikörpers (Tab. 2.14, S. 42) zu ermöglichen, zuvor in PBS 5min gekocht werden.

Variante B: ohne Immunpräzipitation Der Überstand wurde mit den entsprechenden Lösungen durch Zugabe oder Verdünnung auf die oben genannten Versuchsbedingungen eingestellt und wieder 0,8µg/20µl Ansatz APP-C100-His6 sowie die gleiche Menge an GST-Protein (je Ansatz eins) addiert. Das weitere Vorgehen entspricht dem in Variante A beschriebenen.

3.1.22 Oberflächenbiotinylierung

Lösungen

PBS ²⁺	PBS (Kap. 2.18, S. 44) 0,5mM CaCl ₂ 2mM MgCl ₂
Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce)	
Quenchinglösung	20mM Glyzin in PBS ²⁺
RIPA-Puffer	
Streptavidin Emulsion (Pierce)	
Probenpuffer für SDS-PAGE	(Kap. 2.18, S. 44)

Durchführung Alle Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Die verwendeten Zellen wurden zweimal mit PBS²⁺ gewaschen und zweimal für eine Zeit von 10min mit 0,5mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin in PBS²⁺ inkubiert (Abb. 3.2, S. 74).

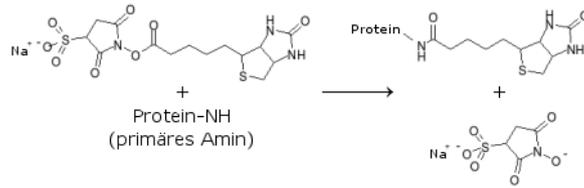


Abb. 3.2: Mechanismus der Oberflächenbiotinylierung

Der *N*-Hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS)-Ester von Biotin unterscheidet sich von Sulfo-NHS-LC-Biotin nur durch die Länge der Kohlenwasserstoffkette. Das so aktivierte Biotin reagiert sehr effizient mit primären Aminogruppen (-NH₂) unter Ausbildung stabiler Amidbindungen zu den jeweils biotinylierten Aminogruppen und *N*-Hydroxysulfosuccinimide. Die noch reaktiven Moleküle werden in einer Folgereaktion durch Glyzin deaktiviert.

Zum Absättigen der freien Bindungen wurden die Zellen anschließend 5min bei 20mM Glyzin belassen und erneut vorsichtig zweimal mit PBS²⁺ gewaschen. Die Lyse erfolgte mit RIPA-Puffer für 30min und die folgende 10minütige Zentrifugation bei 700 * g trennte Zellkerne und Detritus ab. Von dem Überstand wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Test (Kap. 3.1.7, S. 55) ermittelt, währenddessen die Streptavidinkügelchen zweimal mit RIPA-Puffer gewaschen worden sind. Dann wurden entsprechend gleiche Proteinkonzentrationen mit der gewaschenen Steptavidinemulsion rotierend über Nacht bei 4°C inkubiert und diese am folgenden Tag dreimal mit RIPA-Puffer und einmal mit PBS gewaschen. Die Elution erfolgte mittels Probenpuffer für SDS-PAGE durch eine Inkubation für eine Zeit von 5min bei 95°C. Die so erhaltenen Proben wurden zur Untersuchung mit Hilfe SDS-PAGE (Kap. 3.1.1, S. 46) und Immunoblotanalyse (Kap. 3.1.5, S. 52) verwendet.

3.1.23 *in vitro*-Spaltexperimente

In den *in vitro*-Spaltexperimenten wurden mit die Fc-Proteine APP- sowie L1-Ektodomäne eingesetzt.

3.1.23.1 ADAM-vermittelte Spaltung von Fc-Proteinen

Lösungen

ADAM-Spaltpuffer	25mM NH ₄ HCO ₃
	2,5µM ZnCl ₂ pH8

Durchführung Zum Überprüfen einer ADAM-vermittelten Spaltung von Fc-Proteinen wurden 300ng ADAM8 bzw. ADAM9 (Tab. 2.16, S. 43) ADAM-Spaltpuffer mit 1µg Fc-Protein für 2h bei 37°C inkubiert. Der Nachweis der jeweiligen Spaltprodukte erfolgte mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-Fc- sowie der entsprechend spezifischen Antikörper.

3.1.23.2 Aktivierung von MMP-2

(Nagase et al., 1992; Troeberg & Nagase, 2004)

Lösungen

APMA	20mM <i>4-aminophenylmercuric acetate</i> (ICN Biochemicals) in NaOH
Tris	(Kap. 2.18, S. 44)

Durchführung Die freundlicherweise von Prof. Frey zur Verfügung gestellte Gelatinase A (MMP-2, Tab. 2.16, S. 43) befand sich bei Zusendung in einem durch Zymographie (Kap. 3.1.3, S. 49) detektierten, inaktiven Zustand. Die Proform wurde durch Inkubation von 2,5µg MMP-2 in Gegenwart von 1mM APMA/Tris für eine Zeit von 2,5 Stunden bei 37°C in die aktive Form überführt. Der Nachweis der etwa 62kDa großen aktivierten MMP-2 erfolgte mittels Zymographie (Kap. 3.1.3, S. 49).

3.1.23.3 MMP-vermittelte Spaltung von Fc-Proteinen

(Kalus et al., 2005)

Lösungen

MMP-Spaltpuffer	20mM Tris/HCL pH7,5 100mM NaCl 5mM CaCl ₂
-----------------	--

Durchführung Zum Überprüfen einer MMP-vermittelten Spaltung von Fc-Proteinen wurden 10µl der aktivierten Gelatinasen (Tab. 2.16, S. 43) in MMP-Spaltpuffer mit 1µg Fc-Protein für 6h bei 37°C inkubiert. Der Nachweis der jeweiligen Spaltprodukte erfolgte mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-Fc- sowie der entsprechend spezifischen Antikörper.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 PCR

Lösungen	eingesetzte Konzentration
10x PCR-/Pfu-Puffer	5µl
dNTPs	200µmol bzw. 10mM je Nukleotid
Oligonukleotid 1 0,1-1,0	0,1-1,0µM
Oligonukleotid 2 0,1-1,0	0,1-1,0µM
DNS Matritze	1µg
Polymerase	1U bzw. 1,25U
ddH ₂ O	ad 50µl

Tabelle 3.4: Verwendete PCR-Reagenzien sowie die eingesetzten Konzentrationen

Lösungen

Durchführung Die Amplifikation von DNS erfolgte in 50µl Ansätzen. Dazu wurden die in der Tab. 3.4, S. 76 aufgelisteten Reagenzien auf Eis zusammenpipettiert und die DNS je nach Anwendung entweder mit Hilfe der Taq- (Life Technologies), der Pfu- (Invitrogen) oder der PhusionTM Hot Start-Polymerase (Finnzymes Biolabs) vervielfältigt. Die Reaktionen wurden in MJ Research PTC-200 Thermocyclern durchgeführt. Bei Verwendung von Oligonukleotiden mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen (T_m) erfolgte die PCR bei der niedrigeren T_m .

3.2.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

(QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen)

Lösungen

Puffer PBI gelb, pH \leq 7,5

Puffer PE

Durchführung Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das QIAquick PCR Aufreinigungskit von Qiagen verwendet und dabei gemäß des Protokolls mittels Mikrozentrifuge verfahren. Im Detail wurden zu einem Volumen des PCR-Ansatzes fünf Volumina des Puffers PBI gegeben, die Mischung auf die bereitgestellte Säule gegeben und diese für 1min bei $12000 \times g$ und RT zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde verworfen, die Matrix mit 750 μ l des Puffers PE gewaschen und anschließend durch erneute Zentrifugation getrocknet. Die Elution erfolgte mit 10 μ l dH₂O.

3.2.3 Restriktionsverdau

(Sambrook & Gething, 1989)

Durchführung Die Restriktion der DNS erfolgte unter den, von den Herstellern empfohlenen, Temperatur- und Pufferbedingungen. Für analytische Zwecke wurde einem Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 10 μ l nach Angaben des Herstellers pro μ g DNS 1U Restriktionsendonuklease und gegebenenfalls 1 μ l 10x BSA (New England Biolabs, Frankfurt am Main) hinzugefügt. Bei der Restriktion mit zwei verschiedenen Endonukleasen wurde der Puffer verwendet, in dem beide Enzyme nach Angaben des Herstellers mindestens eine Aktivität von 75% aufwiesen. Der Ansatz wurde für 1h bis 2h bei 37°C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 3.2.4, S. 77) und analysiert. Verwendete Restriktionsendonukleasen:

HindIII	10 U/ μ l
EcoRI	10 U/ μ l
NotI	10 U/ μ l
XhoI	10 U/ μ l

Die oben genannten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

3.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS

(Sambrook & Gething, 1989)

Lösungen

5x DNS-Probenpuffer	50% (v/v) Glycerin
	1x Spatelspitze orange G, ad dH ₂ O
50x TAE-Puffer	2M Tris-Acetat, pH8,0
	100mM EDTA, ad dH ₂ O

Durchführung Die durch PCR-Reaktionen oder nach Restriktionsspaltungen erhaltenen DNS-Fragmente wurden zu analytischen Zwecken durch Elektrophorese in horizontalen 1-2%igen Agarosegelen (SubCellGT Elektrophoresekammern, BioRad, München) aufgetrennt. Die Herstellung der Agarosegele erfolgte durch Lösung von 1% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/5 Volumen DNS-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert sowie ein zusätzlicher Größenmarker (DNA-Leiter 1kb, Gibco BRL, Karlsruhe) zur Abschätzung der Molekülgröße. Die Elektrophorese wurde bei 100V durchgeführt. Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Gel zur Sichtbarmachung der DNS in einer Ethidiumbromid-haltigen Lösung (0,5g/ml in 1x TAE Puffer) für 30min gefärbt und mittels eines Imagesystems (E.A.S.Y. RH Imager, HERoLAB, Wiesloh) unter UV-Licht analysiert.

3.2.5 Ligation von DNS

Lösungen

Plasmid-DNS	xmol
Insert-DNS	3x-6xmol
T ₄ -Ligase	1U
10 x Ligasepuffer	1µl
ddH ₂ O	ad 10µl

Durchführung Für die Ligation wurde eine bestimmte Menge Plasmid-DNS mit einem drei- bis fünffachen Überschuss an Insert-DNS versetzt und mit den in Lösungen genannten Reagenzien auf Eis zusammenpipettiert. Die Reaktionszeit betrug 1-4h bei RT oder über Nacht bei 4°C.

3.2.6 Transformation von Bakterien

(Sambrook & Gething, 1989)

Lösungen

LB-Medium Kap. 2.18, S. 44

LB-Agar Kap. 2.18, S. 44

Durchführung Zur chemischen Transformation von Bakterien der *E. coli*-Stämme DH5 α und Top10 wurden 10ng - 100ng Plasmid-DNS mit 100 μ l einer Suspension der langsam aufgetauten chemokompetenten Bakterien gemischt und für 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 90s auf 42°C erwärmt und nach dem Hitzeschock wiederum für 2min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde nach Zugabe von 800 μ l LB-Medium für 1h bei 37°C inkubiert, kurz abzentrifugiert, 700 μ l des Überstandes verworfen und die Bakterien in den verbleibenden 200 μ l resuspendiert. Die Lösung wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen auf Selektivagar ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

3.2.7 Minipräparation von Plasmid-DNS aus E.coli-Bakterienkulturen

(PureLinkTM Quick Plasmid Miniprep Kit)

Lösungen

Resuspensionspuffer	R3
Lysepuffer	L7
Präzipitationspuffer	N4
Waschpuffer	W10
	W9
dH ₂ O	

Durchführung Die Plasmidisolierung im analytischen Maßstab erfolgte aus 2ml über-Nacht-Kulturen mit Hilfe des PureLinkTM Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Im Detail wurden die Bakterien der ü.N.-Kultur durch Zentrifugation für 1min bei 12000 * g und RT sedimentiert, in 250µl Resuspensionspuffer aufgenommen, 5min inkubiert und dann 250µl Lysepuffer zugegeben. Nach Addition von 350µl Präzipitationpuffer erfolgte die Sedimentation der DNS durch 10minütiges zentrifugieren bei 12000 * g und RT. Der resultierende Überstand wurde auf die bereitgestellte Säule geladen und der, nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erhaltene, Durchlauf verworfen. In gleicher Weise wurde die Matrix der Säule mit den Waschpuffern W10 (500µl) und W9 (700µl) gewaschen, durch Zentrifugation getrocknet und die DNS schlussendlich mit 10µl-50µl dH₂O eluiert.

3.2.8 Maxipräparation von Plasmid-DNS aus E.coli-Bakterienkulturen

(QIAfilter Plasmid Maxi Kit, Qiagen)

Lösungen

Resuspensionspuffer	P1
Lysepuffer	P2
Präzipitationspuffer	P3
Equilibrierungspuffer	QBT
Waschpuffer	QC
dH ₂ O	

Durchführung Die Plasmidisolierung im präparativen Maßstab erfolgte aus 250ml - 500ml über-Nacht-Kulturen mit Hilfe des Maxipräparationskits QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Im Detail wurden die Bakterien der ü.N.-Kultur durch 15minütige Zentrifugation bei 6000rpm und 4°C sedimentiert, in 10ml des Puffers P1 resuspendiert, nach Zugabe von weiteren 10ml des Puffers P2 vorsichtig durch Invertieren des Gefäßes lysiert und schließlich durch Addition von 10ml des Puffers P3 präzipitiert. Das Lysat wurde in die mitgelieferten QIAfiltereinsätze gegeben und für 10min bei RT inkubiert. In dieser Zeit konnte die bereitgestellte QIAGEN-tip 500 Säule durch Zugabe von 10ml des Puffers QBT equilibriert werden. Anschließend wurde das Bakterienlysat durch den QIAfilter von allen festen Bestandteilen befreit, die resultierende Lösung auf die Säule geladen und die Matrix zweimal mit 30ml des Puffers QC gewaschen. Die Elution der DNS erfolgte mit 15ml des Puffers QF. Durch Zugabe von 10,5ml (0,7 Volumenanteile) Isopropanol wurde die eluierte DNS präzipitiert, durch Zentrifugation für eine Zeit von 30min bei 15000 * g und 4°C sedimentiert und dann mit 5ml 70%igen Ethanol gewaschen, ohne das DNS-Pellet zu

zerstören. Nachdem dieses für 5 bis 10min an der Luft getrocknet worden ist, erfolgte die Aufnahme der DNS in 100µl - 200µl dH₂O.

3.2.9 DNS-Isolation aus Agarosegelen

(QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen)

Lösungen

Puffer QG gelb, pH $\leq 7,5$

Isopropanol

Puffer PE

Durchführung DNS-Fragmente aus Restriktionsansätzen oder PCR-Reaktionen wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels des QIAquick Gel Extraction Kits gemäß des Protokolls aus dem Gel eluiert. Im Detail wurden drei Volumina des Puffers QG zu einem Volumen DNS-Gelstück gegeben (100mg entsprechen 100µl), die Mischung bei einer Temperatur von 50°C unter Schütteln inkubiert bis sich die Agarose komplett gelöst hat (ca. 10min) und dann ein Gelvolumen Isopropanol addiert. Nach Mischen der Lösung durch Invertierung des Gefäßes wurde diese auf die Säule geladen und der Durchlauf nach einem Zentrifugationsschritt von 1min 12000 * g und RT verworfen. Dann wurde die Matrix der Säule mit 500µl des Puffers QG und 750µl des Puffers PE gewaschen und anschließend durch Zentrifugation getrocknet. Die Elution erfolgte mit 10µl-50µl dH₂O.

3.2.10 DNS-Reinheitsanalyse und -Konzentrationsbestimmung

Die Reinheit und Konzentration von DNS wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt. DNS-Präparationen mit einer Ratio A₂₆₀/A₂₈₀ zwischen 1,8 und 2,0 wurden für ausreichend rein befunden und für weitere Versuche eingesetzt.

3.2.11 DNS-Sequenzierung

(Step-by-Step protocols for DNA-sequencing with Sequenase-Version 2.0, 5th ed., USB, 1990)

Die Sequenzierung von DNS erfolgte in der Sequenzierabteilung des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH). Hierzu wurde 1µg DNS (1µl) in 6µl dH₂O gelöst und mit 1µl des entsprechenden Sequenzierprimers (10pM) versetzt.

3.3 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei einer Temperatur von 37°C, einem CO₂ Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90%. Die für die Kultivierung von Zellen verwendeten Plastikgefäße wurden von der Firma Nunc (Wiesbaden) bezogen.

3.3.1 Transiente Transfektion

Zum zeitlich begrenzten Einbringen von Fremd-DNA in Zellen wurden sowohl verschiedene Transfektionsmethoden als auch unterschiedliche Zelllinien und Vektoren verwendet. Die verwendeten Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in einem Verhältnis von 2:3 (v/v) zum Kulturmedium in Platten mit sechs Vertiefungen von je 3,5cm Durchmesser (10mm² - 6-well-Platten) ausgesät und nach ca. 18h-24h bei einer Zelldichte von 50% bis 80% (je nach Methode) transfiziert. Die Tab. 3.5, S. 82 gibt einen Überblick über die Transfektionsmethoden sowie die entsprechenden Zelllinien und Vektoren.

Zelllinie	Vektor	Transfektionsmethode
CHO/APP695	CRT, NP-,P-,C-Domäne/pcDNA TM 3.1/myc-His; PS1/pcDNA3; APP/SPA4CT	FuGENE / Lipofektamin
B103/APP695	CRT, NP-,P-,C-Domäne/pcDNA TM 3.1/myc-His	Lipofektamin
HEK	L1-SP30kDa/L1-ICD	MATra

Tabelle 3.5: Transfektionsmethoden in Beziehung zu Zelllinien und Vektoren

3.3.1.1 Transfektion mit Lipofektamin

Lösungen

Kulturmedium mit und ohne Serum (Kap. 2.9, S. 33)

Plus Reagenz

Lipofektamin

Durchführung Die transiente Transfektion der B₁₀₃/APP695 und zum Teil der CHO/APP695 Zellen (Tab. 2.6, S. 33) wurde mit Hilfe des Transfektionskits *Lipofectamine Reagent*TM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei dieser chemischen Methode wird die Fremd-DNS mit Hilfe von kationischen Lipidvesikeln durch Fusion mit der Membran in die Zelle eingebracht.

Nach dem Erreichen einer Zelldichte von 70-80% wurde das Kulturmedium (Kap. 2.9, S. 33) gegen serumfreies Kulturmedium ausgetauscht. Die Transfektion der Zellen erfolgte pro *well* mit 1-2µg DNS. Im Detail wurde die DNS mit 100µl serumfreiem Medium vermischt, 6µl Plus Reagenz zugegeben und 15min bei RT inkubiert. Dann wurden je 4µl Lipofectamin in 100µl des Mediums suspendiert, diese Lösung addiert, alles nach kurzem Durchmischen 30min bei RT belassen, anschließend auf die Zellen gegeben und 800µl serumfreies Medium zugefügt. Nach 5-6-stündiger Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz wurde die Transfektion durch Zugabe von serum- und antibiotikahaltigem Kulturmedium gestoppt. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen direkt für Immunpräzipitationsexperimente (Kap. 3.1.15, S. 66) oder Durchflusszytometrie-Analyse (Kap. 3.3.3, S. 85) verwendet oder das Kulturmedium gegen serumfreies Kulturmedium ausgetauscht und die Zellkulturüberstände sowie die Zellen nach einer Kultivierung für weitere 24h getrennt voneinander aufgearbeitet (Kap. 3.3.2, S. 84). Die Transfektionseffizienz wurde durch Immunoblot-Analyse (Kap. 3.1.5, S. 52) ermittelt.

3.3.1.2 Transfektion mit FuGENE

Lösungen

Kulturmedium mit und ohne Serum (Kap. 2.9, S. 33)

FuGENE 6-Transfektionsreagenz

Durchführung Die transiente Transfektion der CHO/APP695 Zellen (Tab. 2.6, S. 33) mit den Calretikulin-Konstrukten (Tab. 2.13, S. 38) wurde mit Hilfe des Transfektionsreagenz FuGENE 6 (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Fremd-DNS mit Hilfe des aus mehreren Komponenten bestehenden Transfektionsreagenz auf Lipidbasis auf nicht liposomalen Wege in die Zelle eingebracht. Ein wesentlicher Vorteil ist die geringe Zytotoxizität.

Nach dem Erreichen einer Zelldichte von 50% bis 80% wurde das Kulturmedium (Kap. 2.9, S. 33) abgenommen und pro *well* durch 2ml frisches Medium ersetzt. Die Transfektion der Zellen erfolgte genau wie bei der Lipofektamin-Methode (Kap. 3.3.1.1, S. 82) mit 1-2µg DNS/*well*. Im Detail wurden DNS und FuGENE 6-Transfektionsreagenz in einem Verhältnis von 1:3, 2:3 oder 1:6 in serumfreiem Medium mit einem Endvolumen von 100µl für 30min inkubiert, wobei Reagenz und Medium zuvor 5min ohne DNS belassen worden sind. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe des Transfektionsansatzes zu den 2ml Medium über den jeweiligen Zellen. Nach kurzem Mischen des Überstandes wurden die Zellen für 1-2Tage wie gehabt kultiviert und konnten dann entweder direkt für Immunpräzipitationsexperimente (Kap. 3.1.15, S. 66) verwendet werden oder nach Austausch des Kulturmediums gegen

serumfreies Kulturmedium und einer weiteren Inkubation von 24h getrennt von den Zellkulturüberständen aufgearbeitet werden (Kap. 3.3.2, S. 84).

Die Transfektionseffizienz wurde durch Immunoblot-Analyse (Kap. 3.1.5, S. 52) ermittelt.

3.3.1.3 Magnet Assisted Transfection (MATra)

Material und Lösungen

Kulturmedium mit und ohne Serum (Kap. 2.9, S. 33)

MATra-A Reagenz

Magnetplatte

Durchführung Die transiente Transfektion der HEK-Zellen (Tab. 2.5, S. 32) wurde mit Hilfe der Magnet Assisted Transfection, kurz MATra (IBA, Göttingen), nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Fremd-DNS mit den magnetischen Kügelchen des MATra-A Reagenz komplexiert und dann mit Hilfe eines Magneten in die Zelle eingebracht. Vorteile hierbei sind eine geringe Zytotoxizität und Zelldichte (30-60%).

Die Transfektion der Zellen erfolgte pro well mit 3µg DNS. Im Detail wurde die DNS mit serumfreiem Medium zu einem Endvolumen von 200µl vermischt, 3µl MATra-A Reagenz zugegeben und 20min bei RT inkubiert. Während der Inkubationsphase wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Anschließend erfolgte die Zugabe des Transfektionsansatzes zu den 2ml Medium auf den Zellen. Nach kurzem Mischen wurde das Ganze für eine Zeit von 15min auf die Magnetplatte gestellt, nach optionalem Mediumwechsel für 1 bis 2 Tage wie gehabt kultiviert und konnte dann entweder direkt für Immunpräzipitationsexperimente (Kap. 3.1.15, S. 66) verwendet werden oder nach Austausch des Kulturmedium gegen serumfreies Kulturmedium und einer weiteren Inkubation von 24h getrennt von den Zellkulturüberständen aufgearbeitet werden (Kap. 3.3.2, S. 84). Die Transfektionseffizienz wurde durch Immunoblot-Analyse (Kap. 3.1.5, S. 52) ermittelt.

3.3.2 Aufarbeitung von Zellen und Zellkulturüberständen

Lösungen

PBS (Kap. 2.18, S. 44)

Probenpuffer für SDS-PAGE (Kap. 2.18, S. 44)

Durchführung Für die biochemische Analyse von transient transfizierten Zellen (Kap. 3.3.1, S. 82) wurden die Zellkulturüberstände und Zellen getrennt voneinander aufgearbeitet. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Die Zellkulturüberstände wurden abgenommen, gesammelt und durch Zentrifugation für 1h bei 100000 * g und 4°C von abgestorbenen Zellen und Zelldebris getrennt. Daraufhin wurden die in den Überständen der Zentrifugation enthaltenen Proteine durch Acetonfällung (Kap. 3.1.6.2, S. 54) konzentriert und anschließend mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (Kap. 3.1.5, S. 52) untersucht. Die behandelten Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, abgeschabt oder trypsiniert und homogenisiert. Zur Abtrennung der Zellkerne wurde das Zelllysate anschließend für eine Zeit von 10min bei 1000 * g und 4°C zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und ebenfalls mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (Kap. 3.1.5, S. 52) untersucht.

3.3.3 Durchflusszytometrie

Lösungen

Puffer 1	PBS (Kap. 2.18, S. 44) 1mM EDTA 0,05% NaN ₃
Puffer 2	Puffer 1 mit 5% FCS

Durchführung Die Durchführung dieser Methode erfolgte in freundlicher Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe BCII (Prof. Frey, Uni Bielefeld). Zur durchflusszytometrischen Messung wurden CHO/APP695-Zellen (Tab. 2.6, S. 33) verwendet, wobei die zuvor teilweise mittels Lipofektamin transient transfiziert worden sind (Kap. 3.3.1.1, S. 82). Ein Ansatz bestand jeweils aus einer 75 mm² Zellkulturflasche (Greiner). Die CHO/APP695-Zellen wurden mit 2ml Puffer 1 für eine Zeit von 10min bei 37 °C inkubiert, 5min bei 980rpm zentrifugiert und das resultierende Sediment in 2ml Puffer 2 zur anschließenden Zellzählung aufgenommen. Dann erfolgte die Inkubation von $2 \cdot 10^5$ Zellen in 100µl Puffer 2 mit dem Erstantikörper für eine Stunde rotierend bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen und jeweiligen Sedimentieren durch 5minütige Zentrifugation bei 980rpm wurden die Zellen mit dem entsprechenden Zweitantikörper (anti-Maus-Cy2) in 100µl Puffer 2 mit einer Verdünnung von 1:200 für eine Zeit von 45min rotierend bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Sedimentation der Zellen wurden diese in 250µl Puffer 1 aufgenommen und mittels des Durchflusszytometers analysiert. Die Messung erfolgte unter fachkundlicher und freundlicher Anweisung von Dr. Simon Mügge (BCII, Uni Bielefeld). Nach Bestimmung der Autofluoreszenz der verwendeten Zellen, Setzen

eines Meßfensters, das die Population der lebenden Zellen umfasst, während die der toten Zellen nicht berücksichtigt wird, und Abgleich der ermittelten Fluoreszenzintensität mit dem Nullwert, wurden die entsprechend vobehandelten Zellen hinsichtlich der von den jeweiligen Antikörpern vermittelten Fluoreszenz der in dem Messfenster enthaltenden Zellen analysiert. Es wurden immer 10000 Zellen ausgezählt, wobei die Auswertung mittels des Programms jeweils zwei Diagramme ergab. In dem einen wurden FSC (*forward scatter*, x-Achse) gegen SSC (*sidewards scatter*, y-Achse) aufgetragen, wodurch die lebenden von toten Zellpopulationen unterschieden werden konnten. Das andere Diagramm zeigt die entsprechend des Messfensters ermittelte Verteilung der Fluoreszenzintensität (Cy2-vermittelt, x-Achse) gegen die jeweilige Anzahl der zugehörigen gezählten Zellen (*counts*, y-Achse) und verdeutlicht so die Konzentration Oberflächenmarkierung der eingesetzten Antikörper, die u.a. in dem berechneten Mittelwert (*GeoMean*) ausgedrückt wurde.

3.3.4 Primärzellkultur

3.3.4.1 Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin (PLL)

Lösungen

PBS	(Kap. 2.18, S. 44)
poly-L-Lysin-Lösung	0,01% PLL (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ad PBS

Durchführung Die Deckgläschen (Durchmesser: 15mm²) wurden für eine halbe Stunde in einem Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler mit Aceton gewaschen. Es wurden drei Waschschritte mit entionisiertem Wasser angeschlossen, um das Aceton zu entfernen. Die Beschichtung der Deckgläschen mit poly-L-Lysin erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Dazu wurden diese in einer 0,01%igen poly-L-Lysin-Lösung über den ganzen Zeitraum belassen. Nach der Inkubation wurden die Deckgläschen erneut dreimal mit Wasser gewaschen und im Anschluss unter der Sterilbank in einer, zuvor mit UV-Licht bestrahlten und mit Alu-Folie ausgelegten, Wanne für 1,5h bis 2h getrocknet. Nach 15-minütiger Bestrahlung der getrockneten Deckgläschen mit UV-Licht wurden diese unter sterilen Bedingungen aufbewahrt.

3.3.4.2 Einzelzellkulturen von hippocampalen Neuronen

(Lochter et al., 1991; Brewer et al., 1993)

Lösungen

HBSS	(PAA Laboratories, Cölbe)
Präparationslösung	0,72 g BSA (Boehringer, Mannheim) 0,347g MgSO ₄ ad 240ml HBSS
Lösung für Verdau	800mg NaCl 37mg KCl 99mg Na ₂ HPO ₄ 595mg HEPES 35mg NaHCO ₃ ad 100ml dH ₂ O, pH7,4
Trypsin/DNase-Lösung	6mg Trypsin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 1,5mg Dnase I (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ad 1,8ml Lösung für Verdau
Trypsininhibitorlösung	2,4mg Trypsininhibitor (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ad 4ml Lösung für Verdau
Serum	Pferdeserum (PAA Laboratories, Cölbe)
DNase-Lösung	1mg DNase I (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ad 2,5ml Präparationslösung (2) Trypanblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Kulturmedium	500mg D-Glucose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 100µg/ml Transferrin (Calbiochem, Bad Soden) 0,025mg/ml Insulin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 2mM Glutamax I (Life Technologies, Karlsruhe) 5mg/ml Gentamycin (Life Technologies, Karlsruhe)

Durchführung Kulturen von primären Hippocampusneuronen als Einzelzellsuspension wurden von gerade neugeborenen bis drei Tage alten Wildtyp-Mäusen (P0 - P3) des Stammes C57Bl/6J durch eine Kombination von enzymatischer (Trypsin/DNase) und mechanischer Dissoziation erhalten (Keilhauer et al., 1985; Dityatev et al., 2000).

Die Präparation wurde nach einer modifizierten Methode von Banker & Cowan, 1977, erst von G. Dityateva und später auch selbst, durchgeführt. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Die Mäuse wurden durch Dekapitierung getötet, die Schädeldecke eröffnet und das Gehirn in Präparationslösung überführt. Dann erfolgte die Teilung in linke und rechte Gehirnhälfte sowie die vorsichtige, aber schnelle Präparation des jeweiligen Hippocampus. Das Gewebe wurde in 1mm dicke Stücke geteilt und dreimal mit Präparationslösung und im Anschluss einmal mit HBSS-Lösung gewaschen. Daraufhin wurde dem Gewebe Trypsin-DNase I-Lösung

hinzugefügt und eine Inkubation für 5min angeschlossen. Nach weiteren zwei Waschschritten mit Präparationslösung wurde der Ansatz für 5min mit Trypsininhibitorlösung versetzt, das Gewebe erneut mit Präparationslösung gewaschen und für 10min mit einer Mischung aus Präparationslösung und Serum (Verhältnis 1:5) inkubiert. Der Ansatz wurde erneut mit Trypsininhibitorlösung versetzt und die nachfolgenden Arbeitsschritte, wie oben beschrieben, durchgeführt. Daraufhin wurden zwei Waschschrritte mit Präparationslösung angeschlossen, DNase I-Lösung hinzugefügt und die Gewebestücke mit Hilfe einer abgerundeten Glaspasteurpipette mit abnehmendem Durchmesser durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren zu einer homogenen Zellsuspension verarbeitet. Der Zellsuspension wurde Präparationslösung hinzugefügt und für 15min bei $80 \times g$ und $4^{\circ}C$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden ein weiteres Mal in Präparationslösung gewaschen. Die nach der Zentrifugation sedimentierten Zellen wurden in Präparationslösung aufgenommen und in einer Dichte von 1000Zellen/ mm^2 ausgesät. In den ersten drei Tagen wurden die Zellen in Kulturmedium mit 10% Serum kultiviert. Am dritten Tag und jeweils zwei Tage später wurde die Hälfte des Mediums entfernt und durch Kulturmedium mit den Zusätzen 5% Serum, 2% B-27 supplement (Life Technologies, Karlsruhe) und $5\mu M$ AraC (Cytosine β -D-Arabinofuranosid, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ersetzt. Die hippocampalen Neurone wurden anschließend zur immunhistochemischen Analyse (Kap. 3.3.5, S. 88) verwendet.

3.3.5 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Analyse der Co-Lokalisierung von APP, Calretikulin und Pre-senilin wurden primäre Hippocampusneuronen (Kap. 3.3.4.2, S. 86) und transient transfizierte CHO/APP695 (Kap. 3.3.1, S. 82) Zellen verwendet.

Lösungen

Kulturmedium	(Kap. 2.9, S. 33)
PBS	(Kap. 2.18, S. 44)
Fixierungslösung	4% PFA (<i>para</i> -Formaldehyd in PBS)
PBST	0,3% TritonX-100 in PBS
Blockierungslösung	0,1% BSA in PBST

Durchführung Zellen der Zelllinie CHO/APP695 wurden in einem Verhältnis von 1:3 in 15mm *well*-Platten (Nunc, Wiesbaden) auf mit poly-L-Lysin (PLL)-beschichteten Deckgläschen (Kap. 3.3.4.1, S. 86) ausgesät und in Kulturmedium kultiviert. Nach 24h wurde das Medium durch serumfreies Kulturmedium ersetzt und die Zellen nach weiteren 24h sowie die primären Hippocampusneuronen für 1h bei RT mit 4% *para*-Formaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Rückstände des PFA wurden im Anschluss durch drei Waschschrritte von jeweils 10min

mit PBS entfernt. Nach Absättigung unspezifischer Bindungen durch eine 40-minütige Inkubation der Zellen bei RT mit Blockierungslösung wurde eine Inkubation der Zellen mit den Antikörpern APP 22C11, CRT (T-19) und PS1 2953 (Tab. 2.14, S. 42) in einer Konzentration von 1:1000, 1:10 und 1:100 in PBS für 1,5h bei RT angeschlossen. Die Zellen wurden im Anschluss dreimal mit PBS 10min gewaschen und für maximal 1h bei RT mit dem, mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy2, Cy3 und Cy5 gekoppelten, Zweitantikörpern (Tab. 2.15, S. 43) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten a 10min mit PBS wurden die Zellen mit Aqua Poly/Mount Medium (Polysciences Inc., Warrington, USA) eingebettet. Die Präparate wurden mit Hilfe des LSM (*Laser Scanning Microscope*) analysiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

3.4 Theoretische Analyse

3.4.1 Komplementäre Hydrophathie

Die Theorie der Komplementären Hydrophathie bildet das grundlegende Konzept des ersten Teils dieser Arbeit. Dabei resultiert die Idee der Suche nach APP-Bindepartnern mittels *antisense*-Peptiden aus der dem Kyte-Doolittle-Hydrophathie-Profil folgenden Theorie der molekularen Grundlage komplementärer Peptidinteraktionen.

3.4.1.1 Kyte-Doolittle Hydrophathie-Profil

Das Konzept der Komplementären Hydroptahie basiert auf den grundlegenden Überlegungen von Kyte & Doolittle über den hydrophathischen Charakter von Aminosäuren hinsichtlich der Struktur von Proteinen und deren mögliche Vorhersage (Kyte & Doolittle, 1982; <http://gcat.davidson.edu/rakarnik/KD.html>). Demnach bestimmt die durch die jeweils variable Seitenkette der Aminosäure (AS) festgelegte Hydrophobizität bzw. Hydrophilie (Hydrophathie) deren Lokalisation in der finalen Proteinstruktur. So werden die hydrophilen AS von globulären Proteinen nach außen gedrängt, während die hydrophoben im Inneren der Struktur verbleiben und integrale Membranproteine besitzen immer eine Strecke von 18-20 wasserabweisenden AS, die das hydrophobe Innere der Lipiddoppelschicht durchqueren können.

Aminosäure	EBK	HW	Aminosäure	EBK	HW
Isoleuzin	I	4,5	Serin	S	-0,8
Valine	V	4,2	Tyrosin	Y	-1,3
Leuzin	L	3,8	Prolin	P	-1,6
Penylalanin	F	2,8	Histidin	H	-3,2
Cystein	C	2,5	Glutaminsäure	E	-3,5
Methionine	M	1,9	Glutamat	Q	-3,5
Alanin	A	1,8	Asparaginsäure	D	-3,5
Glyzin	G	-0,4	Asparagin	N	-3,5
Threonin	T	-0,7	Lysin	K	-3,9
Tryptophan	W	-0,9	Arginin	R	-4,5

Tabelle 3.6: Aminoäure-Hydropathiewerte (EBK, Ein-Buchstaben-Kode; HW, Hydropathiewert)

Zuerst haben Kyte und Doolittle den AS einen ihrer Hydrophobizität entsprechenden Hydropathiewert (Tab. 3.6, S. 90) im Bereich von 4,6 (am meisten hydrophob) bis -4,6 (am meisten hydrophil) gegeben. Die Determination der Hydrophobizität und nicht Hydrophilie beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass das Interesse vorrangig bei hydrophoben Proteinabschnitten lag, ausgehend von denen die finale Proteinstruktur, sozusagen “von innen nach außen”, ermittelt wird. Zur Erstellung des Kyte-Doolittle-Profiles wird anschließend eine Fenstergröße definiert, wobei diese die Anzahl der AS darstellt, deren Hydropathiewerte nach Mittelung jeweils der ersten AS des Fensters zugeteilt werden. Das von den beiden entwickelte Computerprogramm beginnt mit dem ersten AS-Fenster und berechnet den Mittelwert aller Hydropathiewerte darin. Dann springt es zu der darunter gelegenen AS und berechnet den Mittelwert aller Hydrophobizitätswerte des entsprechend zweiten Fensters. Nach diesem Muster wird vom N-Terminus bis zum C-Terminus des Proteins verfahren, so dass die gemittelten Werte eines jeden Fensters der jeweils ersten AS darin zugeteilt worden sind.

Demnach wird ein Fenster von 7 definiert als:



Abb. 3.3: Hydropathiefenster

Die graphische Darstellung der berechneten Mittelwerte erfolgt durch Auftragen der Hydropathiewerte (y-Achse) gegen die Fensterzahl (x-Achse). In das Diagramm wird neben der Kurve der einzelnen Hydropathiewerte in Abhängigkeit zur Lokalisation der entsprechenden AS auch der GRAVY-Wert als rote Linie aufgetragen (Abb. 3.4, S. 91). Der GRAVY-Wert berechnet sich aus dem durchschnittlichen Hydropathiewert aller AS des entsprechenden Proteins und ist bei integralen Membranproteinen typischerweise größer als bei globulären Pro-

teinen.

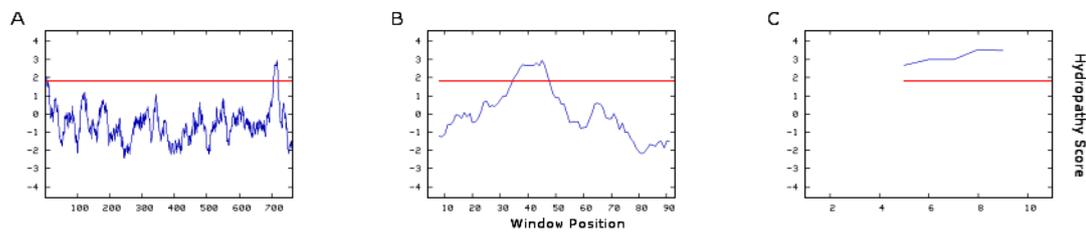


Abb. 3.4: Kyte-Doolittle-Hydrophobie-Profil

Die Hydrophobie-Diagramme von (A) APP, (B) APP C99 und (C) des synthetischen, zur Immunisierung verwendeten, die APP γ -Spaltstelle repräsentierenden APP Peptides lassen die weit im Positiven liegende, hydrophobe Transmembranregion gut erkennen; x-Achse, Hydrophobiewerte; y-Achse, Fensterzahl. Der Mittelwert der Hydrophobiewerte aller Aminosäuren (GRAVY-Wert) ist jeweils als rote Linie eingetragen.

Durch Verändern der Parameter der Tests von Proteinen bereits bekannter Struktur konnten Kyte und Doolittle die zur entsprechenden Proteinstruktur-Vorhersage am besten geeigneten Parameter herausfinden. Bei der Betrachtung von Oberflächenregionen globulärer Proteine ergibt eine Fenstergröße von 9 die besten Ergebnisse, während für die Strukturvorhersage transmembraner Bereiche eines Proteins eine Fenstergröße von 19 (Spitzen mit Werten größer 1,6) benötigt wird. Mittels des so ermittelten Kyte-Doolittle-Profiles können Vorhersagen für Proteinstrukturen sowie deren Funktionen erstellt werden.

3.4.1.2 Theorie der molekularen Grundlage komplementärer Peptidinteraktionen

Basierend auf den Überlegungen von Kyte und Doolittle entwickelten Blalock und Smith zwei Jahre später die Hypothese der Komplementarität von Aminosäuren (AS) aufgrund deren genetischen Kodes (Blalock & Smith, 1984; Blalock & Bost, 1986). Bei ihren Betrachtungen der Interaktion von *sense*-Peptiden, kodiert durch 5'→3' gelesene mRNS, und in 3'→5' -Richtung kodierten *antisense*-Peptiden fanden sie heraus, dass diese mit einer hohen Spezifität sowie Effizienz aneinander binden. Genauer gesagt werden Kodons für hydrophobe bzw. hydrophile AS auf dem einen Strang der DNS durch solche für entsprechend hydrophobe bzw. hydrophile auf dem anderen DNS-Strang komplementiert (Tab. 3.7, S. 92) und Kondons für ungeladene (leicht hydrophile) AS haben die Tendenz durch die gleichen ergänzt zu werden (Blalock & Smith, 1984).

Kodierender Strang			Nicht kodierender Strang				
Kodon	Aminosäure	HW	Kodon	Aminosäure	MW		MW-Änderung
					Ind.	MW	
AUU	Isoleuzin	+4,5	AAU	Aspartat	-3,5		
AUC	Isoleuzin		AAU	Saparaginsäure	-3,5	-2,8	-7,3
AUA	Isoleuzin		AAU	Tyrosin	-1,1		
GUU	Valin	+4,2	AAC	Aspartat	-3,5		
GUC	Valin		GAC	Saparaginsäure	-3,5	-2,9	-7,1
GUG	Valin		CAC	Histidin	-3,2		
GUA	Valin		UAC	Tyrosin	-1,3		
CUU	Leuzin	+3,7	AAG	Lysin	-3,9		
CUC	Leuzin		GAG	Glutaminsäure	-3,5		
UUG	Leuzin		AAG	Glutamat	-3,5	-3,6	-7,3
CUG	Leuzin		AAG	Glutamat	-3,5		
UUU	Phenylalanin	+2,7	AAA	Lysin	-3,9	-3,7	-6,4
UUC	Phenylalanin		GAA	Glutaminsäure	-3,5	-3,7	-6,4
UGU	Cystein	+2,5	ACA	Threonin	-0,7	+0,6	-1,9
UGC	Cystein		GCA	Alanin	+1,8	+0,6	-1,9
AUG	Methionin	+1,9	CAU	Hietidin	-3,2	-3,2	-5,1
GCG	Alanin	+1,8	CGC	Arginin	-4,5		
GCU	Alanin		AGC	Serin	-0,9		
GCC	Alanin		GGC	Glycin	-0,4	-0,8	-2,6
GCA	Alanin		UGC	Cystein	+2,5		

Tabelle 3.7: Hydropathiewerte der zu hydrophoben AS komplementären AS (AS, Aminosäure; HW, Hydropathiewert; MW, Mittelwert)

Diese Hypothese eines molekularen Erkennungskodes wurde hinsichtlich einer definierten Erklärung kritisch aufgenommen und auf Reproduzierbarkeit durch verschiedene Studien geprüft. Blalock und Kollegen selbst vermuteten, dass zwei komplementäre Nukleinsäuren repräsentierende Peptide gerade die Konformationen annehmen, die zu einer spezifischen und hochaffinen Bindung des Paares führt (Bost et al., 1985a). Im Einklang mit dieser Idee ist die Identifikation von Regionen sich ergänzender Nukleotide, welche spezifisch mit Rezeptoren und den entsprechenden Liganden assoziiert sind (Bost et al., 1985b), wobei die jeweiligen Sequenzen die Kontaktstellen des Bindepaares darstellen (Weigent et al., 1986; Kuo & Robb, 1986). Diese Beobachtung ließ die Vermutung zu, dass möglicherweise eine ähnliche Beziehung hinsichtlich des Immunsystems bestehen könnte, besonders da Erlanger zeigen konnte, dass bestimmte anti-idiotypische Antikörper gegen anti-Hormon-Immunglobuline die Aktivität der Hormone mimikrieren (Erlanger, 1985; zusammengefasst in Erlanger, 1989). Weitere Studien verifizieren sowohl die Ligand/Rezeptor-Beziehungen von durch komplementären

täre Nukleinsäuren kodierter Peptide (Blalock & Bost, 1988; Sloodstra & Roubos, 1991) als auch die Vermutung hinsichtlich der Verbindung zum Immunsystem und der Wirkung anti-idiotypischer Antikörper (Smith et al., 1987; Smith & Blalock, 1988; Bost & Blalock, 1989). Bretani erklärt diese Komplementarität durch eine Art Ko-Evolution interagierender Proteine sich entsprechend ergänzender Exons, welche eine Beschleunigung der eigentlichen Evolution zur Folge hat (Brentani, 1988). Dabei könnten Rezeptor und Hormon von demselben einzelnen DNS-Molekül abstammen, von dem ein Strang den Rezeptor und der andere das Hormon kodiert (Sloodstra & Roubos, 1991). Trotzdem bleibt der genaue Mechanismus unklar und bedarf weiterer Forschung (Brentani, 1990). Obwohl bis heute immer noch nicht alle Grundlagen der sogenannten komplementären Hydropathie geklärt sind, konnten zahlreiche Studien die molekulare Grundlage von sich ergänzenden (*antisense*) Peptidinteraktionen belegen (Markus et al., 1989; Kohler & Murali, 2001), diese molekulare Erkennungstheorie in *in vivo*-Experimenten verifizieren (Stambuk et al., 2005) und durch sie Rezeptoren (Martins et al., 1997) sowie Bindestellen (de Souza & Bretani, 1992; Milton et al., 2001) und Bindepertner (Williams et al., 2005) identifizieren.

3.4.2 Sequenzanalyse

Computer-basierte Sequenzanalysen und Vergleichsstudien von DNS- und Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des Lasergenprogramms durchgeführt (DNASTAR, Inc., www.dnastar.com). Es wurden die folgenden Datenbanken benutzt: der Medline-, BLASTN- und BLASTP-Server des National Centers für Biotechnologische Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov).

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse gliedern sich in zwei Teile. Teil A beschäftigt sich mit der Identifikation neuer APP-Bindepartner sowie der Charakterisierung dieser und schon bekannter hinsichtlich der γ -Sekretase-vermittelten Spaltung. Während Studie 1 die Ergebnisse der Suche nach an die APP- γ -Spaltstelle bindenden Proteine darstellt, zeigen Studie 2 (Kreatinkinase-B) und Studie 3 (Calretikulin) Resultate der näheren Beschreibung der jeweiligen Interaktion mit APP und bezüglich des Calretikulin mit PS1 sowie anderen Komponenten der γ -Sekretase im Vergleich mit dem Zelladhäsionsmolekül L1. Teil B des Ergebnisteils dieser Arbeit zeigt die Resultate der Proteolyse von APP und L1 durch die Metalloproteinase ADAM8, ADAM9 und die Gelatinasen.

4.1 Identifikation APP-bindender Proteine - Charakterisierung der Interaktion hinsichtlich der Funktionen sowie der amyloidogenen Prozessierung von APP

Das *Amyloid Precursor Protein* (APP) ist ein Typ 1-Transmembran-Glykoprotein von 695-770 Aminosäuren Länge bzw. ~ 110 kDa (Price und Sisodia, 1998; Gong et al. 2003), wird ubiquitär an der Zelloberfläche exprimiert und ist zwischen den Spezies hoch konserviert (De Strooper & Annaert, 2000). Es gelangt über den sekretorischen Weg in endosomale Kompartimente und wurde auch in Mitochondrien gefunden (Anandatheerthavarada et al., 2007). Im Gehirn kommen überwiegend drei Isoformen vor, wobei APP695 hauptsächlich von Neuronen (Agca et al., 2008), APP751 und APP770 hingegen von Glia- und anderen nicht-neuronalen Zellen exprimiert werden (Small et al., 1996; Wilson et al., 1999). APP ist funktionell am Neuritenwachstum, der Zelladhäsion, synaptosomalen Funktionen und der Apoptoseinduktion beteiligt (Koo, 2002; Zheng und Koo, 2006). Es hat seinen Namen erhalten, da es das Vorläuferprotein des in amyloiden Plaques enthaltenen $A\beta$ Peptids ($A\beta$) ist. $A\beta$ ist maßgeblich an der Entstehung der Alzheimer-Krankheit beteiligt (Findeis, 2007; Spencer et al. 2007; Sundelöf et al., 2008). Die Prozessierung des Amyloid Vorläuferproteins erfolgt auf zwei Wegen nach dem Mechanismus der regulierten intramembranen Proteolyse (RIP, Ebinu und Yankner, 2002), wobei der eine jeweils den anderen ausschließt. Der amyloidogene Weg führt durch β -Sekretase-Spaltung erst zu den Produkten $s\beta$ APP (löslich) und C99 (99 Aminosäuren, Stumpf in der Membran). Die anschließende Proteolyse des C99-APP durch die γ -Sekretase resultiert in der Bildung von $A\beta$ und des CTF (intrazelluläres Fragment, AICD, Verdile et al., 2007). Eine Identifikation von Proteinen, die an der γ -Proteolyse von APP beteiligt sind, könnte helfen, die Alzheimer-Krankheit, deren Entstehung und Verlauf

zu verstehen und möglicherweise eine geeignete Therapie zu entwickeln.

Konzept und Synthese des *antisense*(D)-Peptids und des anti-D-Antikörpers

Mit dem Ziel, Bindepartner der APP- γ -Spaltstelle zu identifizieren, und in Anlehnung an das Konzept der Komplementären Hydrophathie (Kap. 3.4.1, S. 89) wurde ein *Antisense*-Peptid von 15 Aminosäuren Länge (Tab. 4.1, S. 95) hergestellt, das zu der γ -Spaltstelle von APP komplementär ist (D-Peptid). Sowohl das Konzept des D-Peptids, das zur Herstellung des anti-D-Antikörpers verwendet worden ist, als auch die Vorarbeiten zu dessen Synthese erfolgten von Dr. F. Plöger (ZMNH, Hamburg).

APP Sequenz																
N	M	V	G	G	V	V	I	A	T	V	I	V	I	T	L	C
5'	atg	gtg	ggc	ggt	gtt	gtc	ata	gcg	aca	gtg	atc	gtc	atc	acc	ttg	3'
3'	tac	cac	ccg	cca	caa	cag	tat	cgc	tgt	cac	tag	cag	tag	tgg	aac	5'
C	H	H	A	T	N	D	Y	R	C	H	D	D	D	G	Q	N
komplementäre (D Peptid) Sequenz																

Abb. 4.1: Aminosäure-/DNS-Sequenz der APP- γ -Spaltstelle und des D-Peptids

Entsprechend des Konzeptes der Komplementären Hydrophathie (Kap. 3.4.1, S. 89) komplementiert das D-Peptid den entsprechenden APP-Bereich (Schlüssel-Schloß-Prinzip) und kann so den interagierenden Teil von funktionellen Bindepartnern der APP- γ -Spaltstelle darstellen. Erwartungsgemäß sollten Antikörper, die durch Immunisierung von Kaninchen mit diesem Peptid erhalten werden, Liganden oder Interaktionspartner von APP erkennen (Abb. 4.2, S. 95).

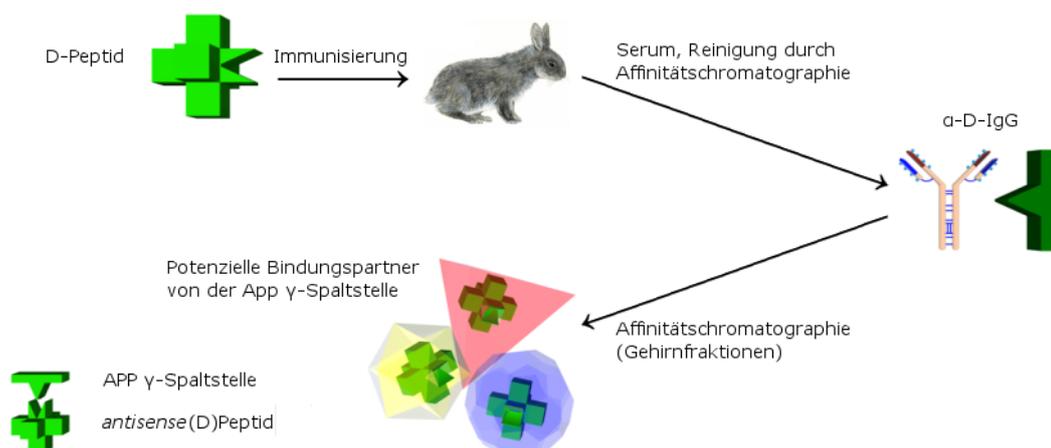


Abb. 4.2: Konzept der Identifikation von an die APP- γ -Spaltstelle bindender Proteine

Die durch Immunisierung eines Kaninchens mit dem D-Peptid erhaltenen anti-D-Antikörper repräsentieren die APP- γ -Spaltstelle und können daher mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung geeigneter Mausgehirnfractionen potentielle APP-bindende Proteine identifizieren.

4.1.1 Studie 1: Identifizierung neuer Bindepartner der APP γ -Spaltstelle

4.1.1.1 Charakterisierung der anti-D-Antikörper

Die Immunglobulinfraktion des Serums des zuvor mit dem D-Peptid immunisierten Kaninchens wurde mit der Affinitätschromatographie unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Säulen erhalten. Einerseits erfolgte die Aufreinigung des anti-D-IgGs mit Hilfe des Bio-Rad DEAE Affi-Gel Blue Gel Kits durch Entfernen von Albumin und anderen Serumproteinen (Kap. 3.1.10.1, S. 60). Andererseits wurde die Isolierung mittels einer Protein A Säule durchgeführt (Kap. 3.1.10.2, S. 61). Der gereinigte und konzentrierte anti-D-Antikörper wurde zur Charakterisierung und Bestimmung der einer geeigneten Fraktion für die weitere Analyse jeweils mittels SDS-PAGE und Immunoblot-Analyse gegen Mausgehirnhomogenat und verschiedene mit den entsprechend unterschiedlichen Organellen angereicherten Gehirnfractionen getestet. Die Herstellung dieser Fraktionen erfolgte durch Zentrifugation des Gesamtgehirnhomogenats von Wildtypmäusen bei 1000 * g und anschließend bei 17000 * g. Die jeweiligen Sedimente wurden durch Ultrazentrifugation mittels verschiedener Sucrosegradienten aufgetrennt (Abb. 3.1, S. 59) und die verschiedenen Fraktionen gesammelt. Aus dem 1000 * g Sediment konnten so Fraktionen, angereichert mit Synaptosomen von Moosfasern (SynMF), Ranvier'sche Schnürringe (RV) sowie Myelin (My1) erhalten werden und aus dem 17000 * g Sedimentes wurden Fraktionen mit Synaptosomen (Syn), Axolemma (A), Periaxolemma (PA) sowie kompaktem Myelin (My2) isoliert (Taupin et al., 1994). Darüber hinaus ist eine Probe des 17000 * g Überstandes (S1) zum Testen des anti-D-IgG mit auf das SDS-Gel aufgetragen worden (Abb. 4.3, S. 96).

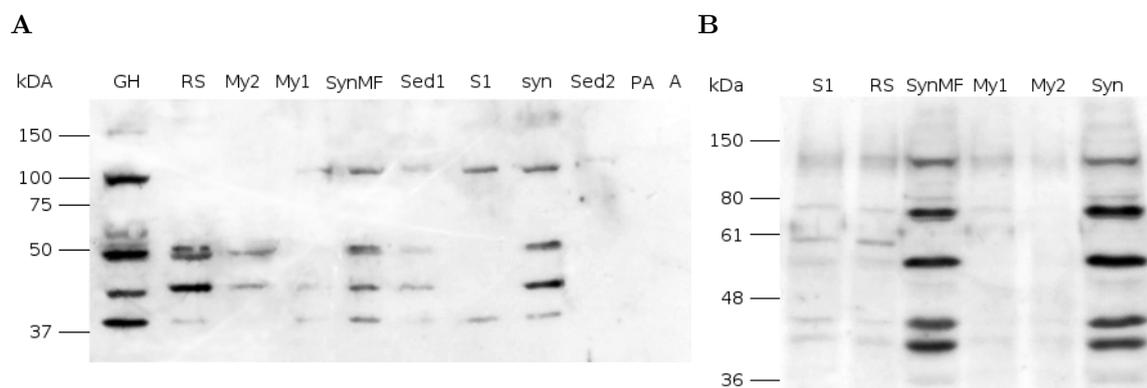


Abb. 4.3: Spezifität des anti-D-Antikörpers

Immunoblot-Analyse verschiedener Mausgehirnfractionen nach Sucrosegradientenzentrifugation unter Verwendung des anti-D-IgGs nach Aufreinigung mittels des Bio-Rad DEAE Affi-Gel Blue Gel Kits (A) und nach Protein A-Aufreinigung (B)

Die Immunoblot-Analyse des gesamten Gehirnhomogenates (GH), SynMF und Syn zeigen unter Verwendung des mittels des *Kits* aufgereinigten anti-D-IgGs mindestens vier Banden

im Bereich von 40kDa bis 100kDa, von denen nur je zwei Banden in der Spur RV und My2 (40kDa/50kDa) und in der Spur S1 (40kDa/100kDa) auftreten (Abb. 4.3, S. 96A). Die Immunoblot-Analyse unter Verwendung des mit Hilfe der Protein A-Säule erhaltenen Antikörpers zeigt fünf Banden in dem gleichen Größenbereich (40kDa-100kDa), die jedoch ausschließlich in den Spuren der Synaptosomen-Fraktionen (SynMF/Syn) auftreten (Abb. 4.3, S. 96B). Helen Strelakova konnte im Rahmen ihrer Doktorarbeit bereits an die γ -Spaltstelle-bindende Proteine mit einem Molekulargewicht von 50kDa-60kDa identifizieren (Strelakova, 2004), weshalb besonders auf das Vorhandensein von anti-D-IgG-erkannten Proteinen außerhalb dieses Bereichs (30kDa/40kDa/100kDa) geachtet wurde. Deshalb, und weil der die APP- γ -Spaltstelle repräsentierende Antikörper nach beiden Aufreinigungsmethoden die meisten Proteine in den Fraktionen SynMF und Syn erkannt hat, wurden diese zur weiteren Verwendung ausgewählt.

4.1.1.2 Expression von APP in den verschiedenen Gehirnfractionen

Um zu überprüfen, ob diese Fraktionen (SynMF/Syn) eine ausreichende Menge APP enthalten und demnach zur Identifizierung von APP-Bindepartnern geeignet ist, wurde die Expression des Amyloid Vorläuferproteins ebenfalls in den entsprechenden Gehirnfractionen mittels Immunoblot-Analyse untersucht.



Abb. 4.4: Expression von APP in verschiedenen Mausehirnfractionen

Immunoblot-Analyse der Fraktionen nach Sucrosegradientenzentrifugation unter Verwendung des 22C11 anti-APP Antikörpers

Die für APP typische Doppelbande im Bereich von 110kDa, die dem nicht komplett (unreifen) und dem vollständig (reifen) glykosylierten Protein entspricht, ist für alle Fraktionen erkennbar. Die Immunfärbung in der Spur des Gesamthomogenates hat erwartungsgemäß die höchste Signalintensität. Im Vergleich mit den anderen Fraktionen ist die der Spuren SynMF/Syn neben RV und My1/My2 am stärksten. Das lässt auf eine der von anti-D-IgG erkannten Proteinen ähnliche Verteilung der APP-Expression schließen. Für alle weiteren Versuche werden daher die Synaptosomen-Fractionen SynMF sowie Syn verwendet.

4.1.1.3 Charakterisierung der vom anti-D-IgG erkannten Proteine

Es stellte sich nun die Frage, ob die vom anti-D-IgG erkannten Proteine löslich oder membran-gebunden sind. Da es sich um mögliche Bindepartner der APP γ -Spaltstelle handelt, liegt die

Vermutung nahe, dass es zumindest membranassoziierte Proteine sind. Um diese Frage zu klären, wurden die Synaptosomen-Fractionen vereinigt und in Gegenwart von 10mM Tris/HCl, pH8,0 sowie 2,5mM EDTA inkubiert und anschließend durch Zentrifugation bei 17000 * g in Sediment und Überstand getrennt.

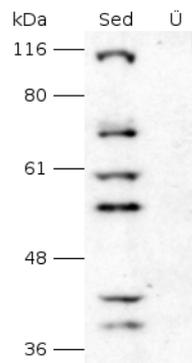


Abb. 4.5: Charakterisierung der vom anti-D-IgG erkannten Proteine (Löslichkeit)

Immunoblot-Analyse der synaptosomalen Fraktionen nach Inkubation mit 10mM Tris/HCl, pH8,0 und 2,5mM EDTA; Sediment (Sed); Überstand (Ü)

Die Immunoblot-Analyse der resultierenden Proben lässt klar erkennen, dass die charakteristischen vom anti-D-IgG erkannten Banden ausschließlich dem Sediment zuzuordnen sind (Abb. 4.5, S. 98). Demnach sind alle vom α -*antisense*-Antikörper erkannten, möglicherweise APP-bindenden Proteine membranassoziiert oder -gebunden.

Um diese Proteine in Lösung zu überführen, wurden Detergenzien (Tab. 2.3, S. 31) verwendet und ihr entsprechendes Lösungsverhalten bezüglich der Proteine miteinander verglichen. In PBS aufgenommene Synaptosomen-Fractionen wurden mit je 1% TritonX-100, NoGP oder CHAPS versetzt und nach einer Inkubation von 1Stunde bei 4°C bei 17000 * g zentrifugiert. (Kap. 3.1.9, S. 59). Die resultierenden Überstände sowie Sedimente wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot unter Verwendung des anti-D-IgGs analysiert. TritonX-100 ist ein nichtionisches Tensid aus der Gruppe der Octylphenoethoxylate, schwer dialysierbar, aber gut geeignet, um Membranproteine in ihrer nativen Konformation aus Membranen herauszulösen. Auch NoGP ist nichtionisch, unterscheidet sich aber von TritonX-100 durch seine Milde und gute Dialysierbarkeit. Bei CHAPS handelt es sich um ein zwitterionisches, gut dialysierbares Detergenz, welches die Membranproteine mittels Denaturierung in Lösung bringt.

Die Analyse des Lösungsverhaltens der vom anti-D-IgG erkannten Proteine zeigt bei einer Verwendung von TritonX-100 im Vergleich mit NoGP und CHAPS die meisten Banden in der Spur des Überstands (Abb. 4.6, S. 99A-C). TritonX-100 ist in der Lage, die entsprechenden Proteine zu lösen, wobei jedoch etwa die Hälfte davon im Sediment verbleibt. Sowohl NoGP als auch CHAPS können die möglichen APP-Bindepartner nicht ausreichend in die lösliche Fraktion überführen. In beiden Fällen lösen sich hauptsächlich die Proteine um 60kDa, mit welchem Molekulargewicht bereits Proteine identifiziert worden sind (Helen Strelakova, 2004). Da die für diese Studie interessanten, unbekannt Proteine um 40kDa und 100kDa von TritonX-100 zu einem großen Teil von den Membranen abgelöst werden konnten, wurde

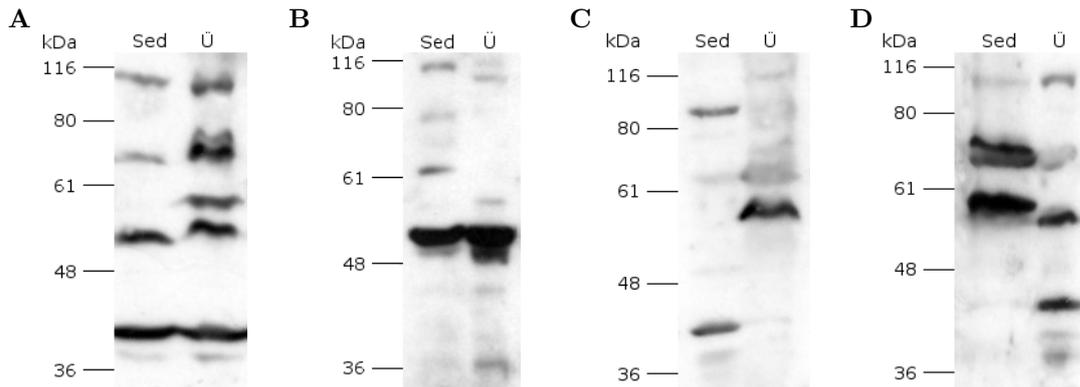


Abb. 4.6: Lösungsverhalten der möglichen APP-Bindepartner

Verwendung von 1% TritonX-100 (A), n-octyl β -D-Glucopyranosid (NoGP) (B), CHAPS (C) und des modifizierten Lysepuffers mit 1% CHAPS (D)

dieses Detergenz für erste Affinitätschromatographieversuche eingesetzt. Allerdings stellte die nicht durchführbare Dialysierbarkeit von TritonX-100 ein nicht zu überwindendes Problem dar. Das Volumen der die möglichen APP-Bindepartner enthaltenden Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie musste zur Anreicherung der entsprechenden Proteinmengen nach Austausch des Elutionspuffers gegen PBS eingengt werden, damit die anti-D-IgG-erkannten Proteine in ausreichender Konzentration in den Proben vorhanden waren und so mittels Coomassie sichtbar gemacht und zur weiteren Analyse aus den jeweiligen SDS-Gelen ausgeschnitten werden konnten. TritonX-100 konnte aber weder dialysiert werden noch war es möglich, die das Detergenz enthaltenden Proben einzuengen. Zudem erschwert TritonX-100 eine Regeneration der Säule und löste vermehrt Antikörper von der Matrix. Daher wurde ein CHAPS enthaltender Lysepuffer (20mM Tris/HCl, pH8,0, 150mM NaCl, 5mM EDTA) eingesetzt, durch den sowohl die interessanten Proteine im Bereich von 40kDa und 100kDa in Lösung überführt, als auch die Säulen nicht geschädigt wurden (Abb. 4.6, S. 99D).

4.1.1.4 Affinitätschromatographie

Es wurden zwei verschiedene Säulen mit dem isolierten und gereinigten anti-D-IgG präpariert. Die Kopplung der Antikörper an CNBr-aktivierte Sepharose 4B erfolgt kovalent und ungerichtet und wird aufgrund einer geringen Stabilität bei mehrfachem Gebrauch der Säule wieder gebrochen (Kap. 3.1.12.2, S. 63). Im Gegensatz dazu werden die Antikörper mittels des CarboLink Kits über oxidierte Zuckerreste des Fc-Teils in gerichteter Orientierung an die Matrix gebunden, wodurch deren Epitope zur Bindung freibleiben. (Kap. 3.1.12.1, S. 62). Die synaptosomalen Gehirnfractionen wurden nach Lyse durch den entsprechenden Puffer auf die Säulen geladen. Die Säulen wurden mit den durch den entsprechenden Puffer lysierten, Synaptosomen-Fractionen von WT-Mausgehirnen beladen und mindestens zweimal mit Waschlösung steigender Salzkonzentration und/oder unterschiedlichem pH-Wert gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte im Fall der CNBr-aktivierten Matrix mit einer Elutionslösung von 20mM Ethanolamin, 150mM NaCl, 0,2% Detergenz und einem pH-

Wert von 11,5. Bei der CarboLink Säule wurden die möglichen APP-Bindepartner mittels 0,1M Glycin, pH2,5 durch einen pH-Shift eluiert. Die aufgefangenen Elutionsfraktionen wurden direkt mit der entsprechenden Lösung neutralisiert (Kap. 3.1.13, S. 64), konzentriert (Kap. 3.1.11, S. 61) und unter Verwendung von SDS-PAGE (Kap. 3.1.1, S. 46) in die einzelnen Proteine aufgetrennt. Im Vergleich mit dem Muster der Immunoblot-Analyse war es möglich, einzelne, von dem anti-D-Antikörper erkannte Banden aus den Coomassie- und silbergefärbten Gelen (Kap. 3.1.4, S. 50) auszuschneiden (Abb. 4.7, S. 100)

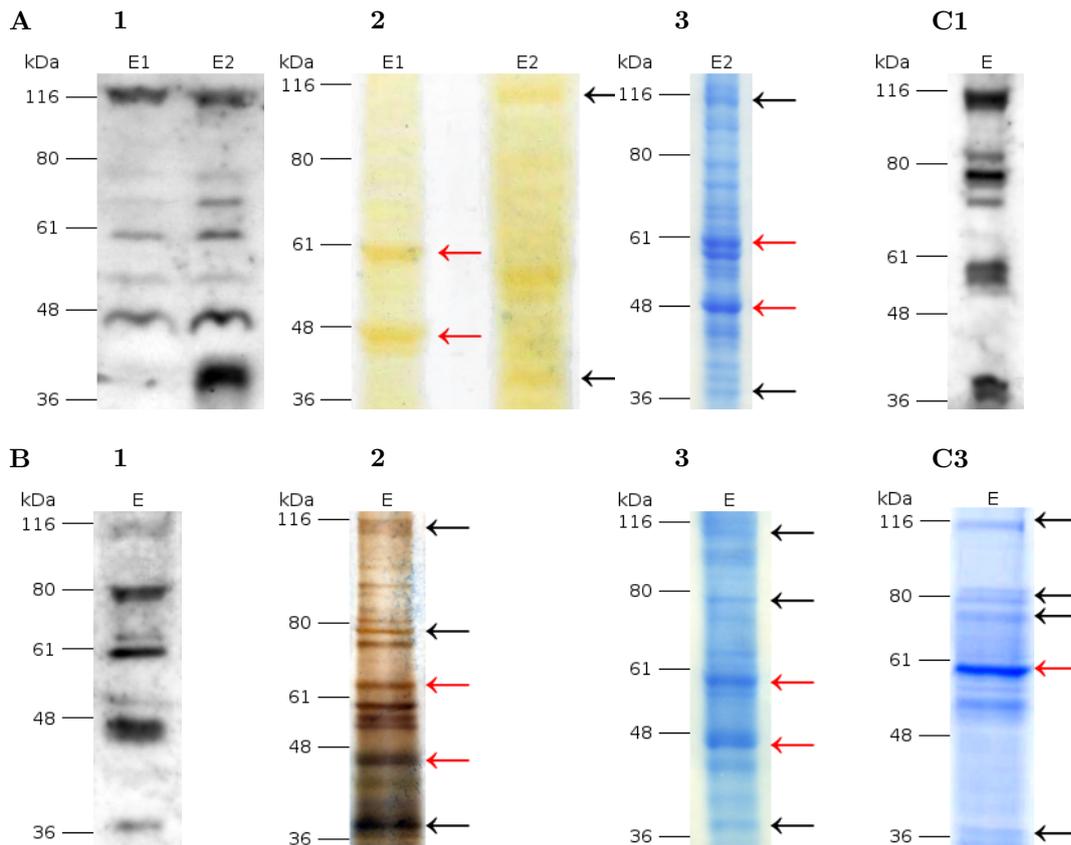


Abb. 4.7: Affinitätschromatographie der Synaptosomen von WT-Mäusen

Die mit immobilisiertem anti-D-Antikörper präparierten Säulen (A:CNBr-aktivierte Sepharose-4B; B/C:CarboLink) wurden mit den lysierten Synaptosomen-Fractionen von Mausgehirnhomogenat beladen, mehrfach gewaschen und gebundene Proteine mit der entsprechenden Lösung eluiert. Nach direkter Neutralisation erfolgte die Konzentration der Elutionsfraktionen, die Auftrennung der enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE und das Sichtbarmachen derselben durch Coomassie- oder Silberfärbung. Im Vergleich mit der entsprechenden Immunoblot-Analyse konnten die vom anti-D- Antikörper erkannten Banden mit einem Molekulargewichtes möglicher neuer (schwarze Pfeile) und bereits identifizierter APP-Bindeproteine (rote Pfeile) identifiziert, aus den jeweiligen Gelen ausgeschnitten und zur Sequenzanalyse mittels Massenspektrometrie gegeben werden.

Es wurden sowohl SDS-Banden im Bereich von 100kDa, 40kDa und 28-30kDa ausgeschnitten als auch Proteine mit einem Molekulargewicht von 50kDa bzw. 55kDa. Diesem Größenbereich zugehörig sind bereits zwei Proteine als APP Bindepartner entdeckt und bestätigt worden (Kap. 4.1.2, S. 113; Kap. 4.1.3, S. 116; Strelakova, 2004). Der im Verlauf dieser Studie aufgereinigte polyklonale anti-D-Antikörper könnte jedoch aufgrund der unterschiedlichen Methode der Aufreinigung auch innerhalb dieses Bereichs neue potentielle Bindeproteine der APP

γ -Spaltstelle identifizieren.

4.1.1.5 Sequenzanalyse der ausgeschnittenen Proteinbanden

Die mittels Coomassiefärbung und mit Silber sichtbar gemachten und auch vom anti-D-Antikörper erkannten Proteinbanden wurden aus den jeweiligen SDS-Gelen ausgeschnitten (Kap. 3.1.14, S. 66) und mittels der MALDI-Massenspektrometrie (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) (Jensen et al., 1997; Mortz et al., 1994) untersucht. Die Analyse und folgende Auswertung der Daten erfolgte von Dr. F. Buck und Herrn S. Harder vom Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie, UKE Hamburg. Die ermittelten Aminosäuresequenzen ließen die in folgender Tabelle (Tab. 4.1, S. 101) aufgeführten Proteine als mögliche Bindepartner der APP γ -Spaltstelle zu.

Größe der ausgeschnittenen SDS-Bande [kDa]	Ergebnis der Sequenzanalyse	Größe des Proteins [kDa]
100	α -Actinin	100
	Dynamin I	100
	Endoplasmin (GRP94 / gp96)	90 - 100
	Hexokinase Typ1	100
	<i>myelin-associated glycoprotein</i> (MAG)	100
	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase α_3 (, α_1 , α_2)-Untereinheit	105 - 110
50 - 55	Kreatinkinase, B Isoform	42 - 47
	α -II-Spectrin	52
	<i>glyceraldehyd-3-P-dehydrogenase</i> (GAPDH)	37
40	Zitratsynthase	45
28 - 30	14-3-3, diverse Proteine	~28
	ATP-Synthase, diverse Untereinheiten,	14 - 54
	C1q-Bindeprotein (Ektocalreticulin)	33 - 47
	<i>dihydropyrimidinase-related Protein 2</i> (DRP-2, CRMP-2)	64
	vakuoläre ATP-Synthase, Untereinheit E1	21 - 28

Tabelle 4.1: Mögliche Bindepartner der APP γ -Spaltstelle (Erhalten durch Affinitätschromatographie und massenspektrometrische Analyse der ausgeschnittenen SDS-Banden)

Die Tab. 4.2, S. 103 gibt einen kurzen Überblick der jeweiligen Vorkommen und Funktionen.

Protein	Funktion / Vorkommen	Referenz
α -Actinin	strukturelle und regulatorische Funktionen bezüglich des Zytoskeletts, Regulation verschiedener Ionenkanäle	Dixson et al., 2003; Li et al., 2005; Lu et al., 2007
Dynamin I	gehirnspezifische, präsynaptische GTPase, beteiligt an der Endozytose synaptischer Vesikel	Shpetner et al., 1989; Smillie & Cousin, 2005
GRP94	Ca ²⁺ -bind. Chaperon d. ER Lumens/Zelloberfläche, Apoptosegegenspieler	Koch et al., 1985; Ni & Lee, 2007
Hexokinase Typ 1	Enzym der Glykolyse, bindet an die äußere Mitochondrienmembran (VDAC), Apoptoseregulation	Wilson, 1984; Gottlob et al., 2001; Azoulay-Zohar et al., 2004
MAG	transmembranes Glycoprotein in Gliazellen, beteiligt an der Ausbildung der Myelinscheide	Barton et al., 1987; Quarles, 2007
Na ⁺ -/K ⁺ -ATPase	Ionenpumpe in der Zellmembran, vermittelt Signaltransduktion, beteiligt an Genregulation und Zellwachstum	Skou, 1957; Nakagawa, 1992; Liu et al., 2000
Kreatinkinase-B (CK-B)	zytosol., gehirnspezifische Isoform, reguliert ATP Level in subzell. Kompartimenten, beteiligt an synapt. Funktionen + der Kalziumhomeostase	Eppenberger et al., 1967; Wallimann & Hemmer, 1994; Bürklen et al., 2006
α -II-Spectrin	Aktin-bindendes und -vernetzendes Protein, vermehrt in PSD, bindet NMDA Rezeptoruntereinheiten	Hsu et al., 1979; Wechsler et al., 1998; De Matteis & Morrow, 2000
GAPDH	Enzym der Glykolyse, multiple Funktionen im Zytosol und Nukleus	Racker & Krimsky, 1952; Sirover et al., 2005
Zitratsynthase	innere Mitochondrienmembran, Enzym des Citrat-Zyklus	Weigand et al., 1986; Remington, 1992

14-3-3	konservierte Proteinfamilie, binden multiple funktionell verschiedene Signalproteine	Boston et al., 1982; Aitken, 2006
ATP-Synthase	Protonenpumpe der inneren Mitochondrien- oder Zellmembran, ATP Synthese	Godinot & Pietro, 1986; Chi & Pizzo, 2006
Ektocalreticulin	Zelloberflächenform von Calretikulin, bindet den Komplementfaktor C1q	Lynch et al., 2002; McGreal et al., 2002
DRP-2/CRMP-2	intrazelluläre Signaltransduktion während der Entwicklung des Nervensystems	Goshima et al., 1995; Arimura et al., 2000
Vakuoläre ATP-Synthase	Protonenpumpe in Endo- oder Zellmembran, Aufrechterhaltung des pH Wertes	Stevens & Forgac, 1997; Nishi & Forgac, 2002

Tabelle 4.2: mögliche APP-Bindepartner - Funktion, Vorkommen und Referenz

Nicht alle aufgrund der massenspektrometrischen Untersuchung vorgeschlagenen Proteine scheinen auf den ersten Blick geeignet, als mögliche, im Bereich der γ -Spaltstelle bindenden, APP-Interaktionspartner. Es gibt jedoch einige Moleküle, die mit der Alzheimer-Krankheit bzw. APP in Verbindung gebracht werden können und mit dem C1q-Bindeprotein ein Resultat, welches auch ein Ergebnis der ähnlichen Studie von Helen Strekalova (Strekalova, 2004) war, und als an die γ -Spaltstelle von APP-bindend bestätigt wurde. Im Folgenden werden diese eventuell mit APP interagierenden Proteine kurz hinsichtlich ihres Vorkommens, der Struktur und Funktion eingeleitet. Dabei bilden die beiden schon bestätigten Ergebnisse (CRT/CK-B; Strekalova, 2004) den Anfang, gefolgt von den im Rahmen dieser Studie nicht behandelten Proteinen. Abschließend werden die Proteine beschrieben, die durch weitere Experimente bezüglich ihrer Bindung an APP überprüft worden sind.

Das lösliche, Kalzium-bindende Chaperon *Calretikulin* (CRT) wurde bereits im ersten Teil dieser Arbeit als APP-Interaktionspartner eingeführt (Kap. 1.9.2, S. 21) und bildet das zentrale Protein der dritten Studie des Ergebnisteils dieser Arbeit (Kap. 4.1.3, S. 116). CRT wird ubiquitär exprimiert, hat multiple Funktionen (Johnson et al., 2001) und hat als Zelloberflächenform die Bezeichnung Ektocalreticulin oder C1q-Bindeprotein, da es den Komplementfaktor C1q binden und so den klassischen Komplementweg inhibieren kann (Lynch et al., 2002).

Auch die in der Einleitung schon beschriebene *Kreatinkinase-B* (Kap. 1.9.1, S. 20) konnte durch Helen als APP-bindend mittels Co-Immunpräzipitation bestätigt werden, nachdem es jedoch mittels des die β -Spaltstelle von APP repräsentierenden anti-C-IgGs identifiziert worden war (Strekalova, 2004). Auf eine mögliche Interaktion der beiden Proteine sowie weitere diesbezügliche Experimente wird im nächsten Ergebnisteil (Kap. 4.1.2, S. 113) genauer ein-

gegangen.

Auf die nun folgenden sieben als Bindepertner der APP- γ -Spaltstelle vermuteten Proteine wurde nicht weiter eingegangen. α -Actinine gehören zu der Familie der Spectrine und sind Actin-bindende und -bündelnde Proteine mit strukturellen und regulatorischen Funktionen im Bereich des Zytoskeletts und der Muskelkontaktion (Broderick & Winder, 2005; Dixon et al., 2003). Darüber hinaus regulieren sie eine Vielzahl verschiedener Ionenkanäle (Krupp et al., 1999; Li et al., 2005; Lu et al., 2007) und sind an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt (Hansen & Beckerle, 2008).

Das Transmembranprotein *Endoplasm*in (GRP94, gp96) ist ein Kalzium-bindendes Chaperon des ER-Lumens (Koch et al., 1985; Kang & Welch, 1991; Soldano et al., 2003) und wichtig für Reifung vieler Proteine, eingeschlossen Integrine sowie Immunglobuline, ist (Melnick et al., 1994; Randow & Seed, 2001). Das als Dimer auftretende Paralog zu dem cytosolischen Hsp90 (Dollins et al., 2007) kommt auch in der Zellmembran vor, hat anti-apoptotische Funktionen (Lee et al., 2008) und spielt eine Rolle bei der Prion-Krankheit sowie bei Autoimmunerkrankungen (Ni & Lee, 2007). Darüber hinaus ist GRP94 durch oxidativen Stress verändert und beteiligt an anti-Tumor-Impfungen (Srivastava, 1996).

Spectrin ist ein zentrales Protein der ubiquitären und komplexen Verbindung zwischen Membranen und dem Zytosol und wurde zuerst als Stütze der Plasmamembran von Erythrozyten entdeckt (Hsu et al., 1979). Es ist in der Lage, gleichzeitig Transmembranproteine, zytosolische Proteine, bestimmte Phospholipide und Filamente direkt oder über Adapterproteine zu binden und dadurch ein Netz verbundener Mosaike zu erstellen (De Matteis & Morrow, 2000). α -II-Spectrin ist die Gehirn-spezifische Spectrin-Isoform, eine der Hauptkomponenten der postsynaptischen Dichte (PSD) und bindet in Neuronen an die zytoplasmatische Domäne des NMDA-Rezeptors (Wechsler & Teichler, 1998).

Die *Zitratsynthase* kommt in nahezu allen lebenden Organismen vor und spielt eine Schlüsselrolle im Zitratzyklus, in dem sie als einziges Enzym eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung bilden kann (Beard et al., 2008). In eukaryotischen Zellen ist die Zitratsynthase vorwiegend auf der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Weigand et al., 1986; Remington, 1992). Sie wird häufig als Marker für die Funktionalität von Mitochondrien verwendet (Figueiredo et al., 2008; Del Prete et al., 2008).

Die *ATP-Synthase* ist ein sich in der inneren Mitochondrien- und der Zellmembran befindender Transmembrankomplex mit den Funktionen einer Protonenpumpe und ATPase (Godinot & Pietro, 1986; Chi & Pizzo, 2006). Dabei fungiert der lösliche Teil der Synthase als eine Art molekularer rotierender Motor, der durch ATP-Hydrolyse angetrieben wird. Dieser mechanische Prozess scheint hochreguliert (Furuike et al., 2008), aber ist bisher noch nicht komplett verstanden (Kramarova et al., 2008). Die α -Untereinheit dieser auch F_0F_1 genannten Synthase ist im Hippocampus mit dem Amyloid Vorläuferprotein co-lokalisiert, bindet wahrscheinlich an die Ektodomäne von APP und reguliert dadurch den extrazellulären ATP-Gehalt (Schmidt et al., 2007).

Die DRP (*Dihydropyrimidinase Related Protein*)-2-, auch *CRMP-2*, Familie wird hauptsächlich im sich entwickelnden Nervensystem exprimiert. *CRMP-2* (*collapsin response mediator*

protein-2), ist eine von fünf Isoformen und wurde als Mediator des Semaphorin induzierten Wachstumskegelzusammenbruchs identifiziert (Goshima et al., 1995). Darüber hinaus ist das etwa 65kDa Protein ein Substrat sowohl der Rho-Kinase (Arimura et al., 2000) als auch von CDK-5 (Brown et al., 2004) und beteiligt an der Axogenese durch Aufbau und Aufrechterhaltung der neuronalen Polarität (Arimura et al., 2004).

Die *vakuoläre ATPase* (vATPase) ist ein in Aufbau und Funktion der F_0F_1 -ATPase ähnlicher Enzymkomplex, welcher sich in der Membran vieler Zellorganellen und an der Zelloberfläche befindet. Der Komplex besteht aus mindestens einer 100kDa und einer 40kDa Untereinheit, sowie drei 16-21kDa großen Proteolipiden und generiert in Lysosomen den niedrigen pH-Wert (Stevens & Forgac, 1997; Nishi & Forgac, 2002). Darüber hinaus ist die vATPase maßgeblich beteiligt an der Migration und Invasion von Tumoren (Sennoune et al., 2004) und kann mit $A\beta$ co-präzipitiert werden (Verdier et al., 2005).

Die nun folgenden fünf möglicherweise an die APP- γ -Spaltstelle bindenden Proteine wurden durch weitere Experimente bezüglich dieser Bindung überprüft. Die präsynaptische 100kDa GTPase *Dynamamin* (DNM) wurde 1989 als ein Mikrotubuli bindendes Protein entdeckt (Shpetner et al., 1989) und ist ein Mitglied einer großen Familie von dynaminähnlichen Proteinen (Urrutia et al., 1997), von der drei Isoformen in Säugetieren existieren. DNM1 ist ein modulares Protein mit vier identifizierten Domänen (Abb. 4.8, S. 105), wird ausschließlich im Gehirn exprimiert und ist in den Nervenenden angereichert, in denen synaptische Vesikel endozytiert werden (SVE) (Smillie & Cousin, 2005).

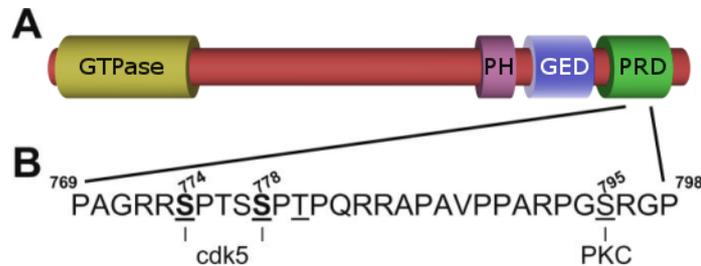


Abb. 4.8: Dynamamin 1: Domänenstruktur und Phosphorylierungsstellen

(A) modulares Protein Dynamamin 1 (DNM1): Die PH Domäne interagiert mit $PI(4,5)P_2$ und ist, wie die GTPase Domäne essentiell für SVE. Die GED kontrolliert sowohl die DNM1 Zusammensetzung als auch die Aktivierung der GTPase Domäne. Die C-terminale PRD interagiert mit vielen Proteinen, eingeschlossen endozytische Proteine, wie Amphiphysin 1 und 2, Endophilin und Syndapin, und Signalweiterleitung/Zytoskelett-Proteine wie P85, Grb-2, $PLC\gamma$, Actinfilament bindendes Protein, Profilin, Cortactin, Intersectin und Calcineurin. (B) Lokalisation der *in vitro* und *in vivo*-Phosphorylierungsstellen der DNM1-PRD. Die Aminosäuresequenz entspricht den Resten 769 bis 798 dieser Domäne. Die fettgedruckten, unterstrichenen Serine (774/778) zeigen die endogenen cdk5 Phosphorylierungsstellen an, während das nur unterstrichene Serin (795) ausschließlich *in vitro* von der PKC phosphoryliert wird.

Das glykolytische Enzym *Hexokinase* wurde bereits 1948 aus Hefe aufgereinigt (Bailey & Webb, 1948), katalysiert, unter ATP-Verbrauch, die Reaktion von Glukose zu Glukose-6-Phosphat, besitzt eine hohe Affinität für Glukose, folgt der Michaelis-Menten Kinetik und wird durch das Produkt der katalysierten Reaktion inhibiert (Weil-Mahlherbe & Bone, 1951). Es existieren drei Isoformen in Säugetieren, von denen die aus der zwei Regionen bestehende HXK TypI (Abb. 4.9, S. 106) das katalytische Zentrum möglicherweise im C-terminalen Teil

hat (Andreoni et al., 2005) und im Gegensatz zu den anderen den Glukose-Katabolismus fördert (Wilson, 2003). Die auch an der Zelloberfläche vermutete HXKI (Claeyssen et al., 2006) bindet VDAC (*voltage-dependent anion channel*)-vermittelt an die äußere Mitochondrienmembran (Abu-Hamad et al., 2008). Eine Inhibition sowohl der HXK-Aktivität als auch der VDAC-Bindung inhibiert das Neuritenwachstum in kultivierten Neuronen erwachsener Ratten (Wang et al., 2008).

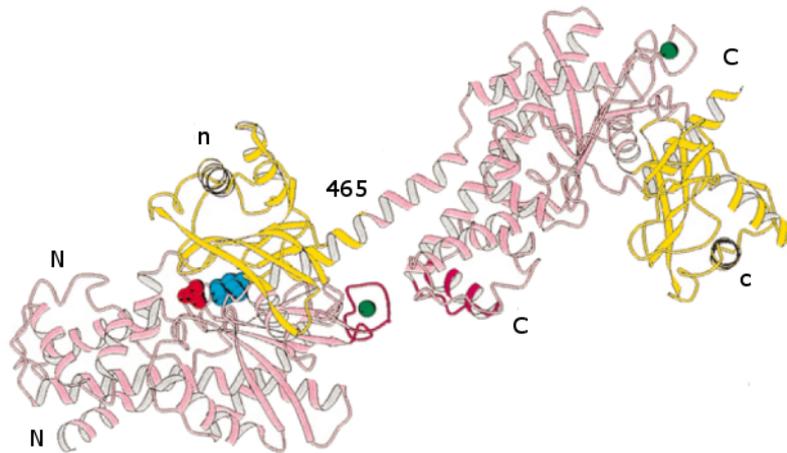


Abb. 4.9: Struktur der Glukose- und Phosphat-bindenden Hexokinase Typ I

Aminosäure (AS) 465 teilt das Protein in die N- und C-terminale Region. Die Farbgebung gilt wie folgt: gelb, kleine Domänen (AS75 bis 209; 448 bis 465 und AS 523 bis 657; 896 bis 913); flieder, große Domänen (AS 13 bis 74, 210 bis 447 und AS 466 bis 522, 658 bis 895); violett, Segmente, die an der Ausbildung von Salzverknüpfungen zwischen den Polypeptidketten beteiligt sind (AS 242 bis 250, 796 bis 813); blau, gebundene Glukose; rot, gebundenes Phosphat, grün, gebundene Metallionen. Hergestellt mittels MOLSKRIPT (Kraulis, 1991 [Aleshin et al., 1998])

1957 wurde die Na^+/K^+ -ATPase bereits als ein in der Zellmembran verankerter 100kDa Komplex charakterisiert, der unter Hydrolyse von ATP Natriumionen aus und Kaliumionen

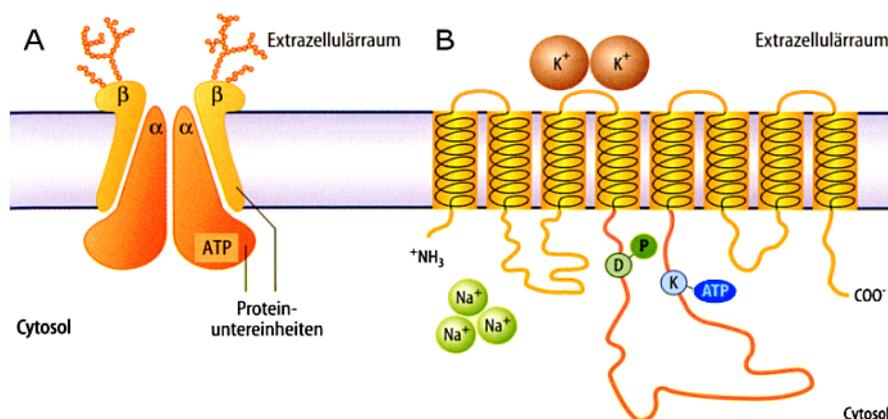


Abb. 4.10: Struktur und Funktion der Na^+/K^+ -ATPase

Die transmembrane Na^+/K^+ -ATPase besteht aus zwei die ATP-Hydrolyse katalysierende α - sowie zwei glykosylierten β -Untereinheiten (A). Die α -Untereinheit besitzt acht Transmembrandomänen und hat sowohl den N- und C-Terminus als auch die Schleife, wo ATP gebunden wird, im Zytosol. Die ATP-Bindung erfolgt durch einen Lysinrest (K) in Folge von Aspartat-Phosphorylierung (D) und führt zur Ausschleusung drei Na^+ -Ionen aus und zum aktiven Transport von zwei K^+ -Ionen in die Zelle (B).

gegen den Konzentrationsgradienten in die Zelle transportiert (Skou, 1957). Dieser Transmembrankomplex (Abb. 4.10, S. 106) besteht aus zwei β - und zwei α -Untereinheiten, von der zahlreiche, Zelltyp- sowie Gewebe-spezifische Isoformen existieren. Im Gehirn wird die α_3 -Isoform ubiquitär exprimiert, während die α_1 -Untereinheit hauptsächlich in Granulazellen und die α_2 -Untereinheit in Astrozyten vorkommt (Dobretsov & Stimers, 2005). Die Na^+/K^+ -ATPase hat außerdem wichtige Funktionen im Bereich der Signaltransduktion, der Genexpression und dem Zellwachstum und wird durch $\text{A}\beta$ inhibiert (Gu et al., 2004). Eine Bindung von Ouabain an die Ionenpumpe verändert die Interaktion mit benachbarten Membranproteinen und induziert die Bildung von multiplen Signalmodulen (Nakagawa, 1992; Liu et al., 2000; Xie, 2003).

Das *Myelin-assoziierte Glykoprotein* (MAG, Siglec-4; Abb. 4.11, S. 107) ist ein ausschließlich in periaxonalen Schwann'schen- und oligodendroglialen Zellmembranen von Myelinscheiden lokalisiertes 100kDa transmembranes Zelladhäsionsmolekül, was dessen Funktion in glia-axonalen Interaktionen sowohl des PNS als auch des ZNS vermuten lässt. Darüber hinaus ist es wichtig für die Bildung und die Aufrechterhaltung der Myelinummantelung von Axonen (Quarles, 2007). Das zur *sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin* (siglec)-Untergruppe der Ig-Familie gehörende Protein besteht aus fünf extrazellulären Ig-ähnlichen, einer Transmembran- sowie einer zytoplasmatischen Domäne, existiert in zwei Isoformen, die sich nur in der Größe der intrazellulären Domäne unterscheiden und ist ein funktioneller Ligand des Rezeptors NOGO-66 (Barton et al., 1987; Quarles, 2007).

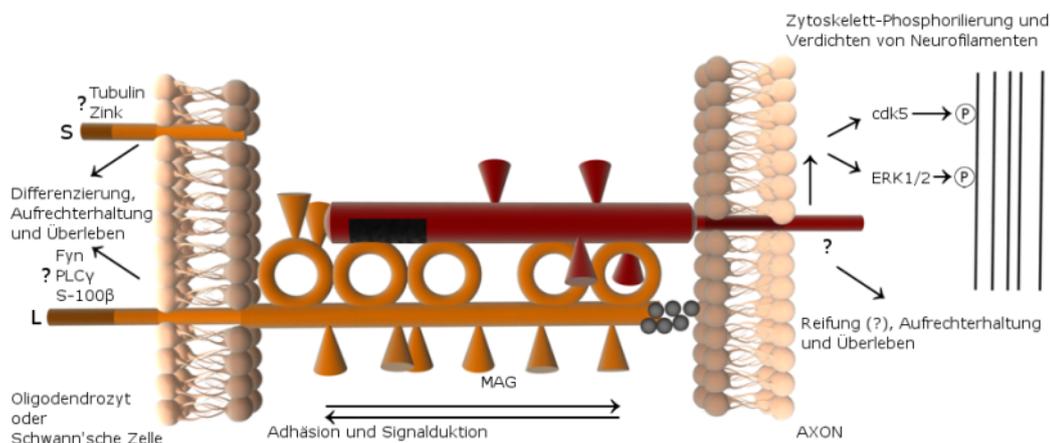


Abb. 4.11: Struktur und Funktion von MAG

MAG (braun) besitzt fünf Ig-ähnliche Domänen (Kreise), acht N-verbundene Oligosaccharide (Dreiecke), eine Transmembrandomäne und zwei verschiedene C-Termini, aufgrund der die L (*long*)- und die S (*small*)-Isoform ihre Bezeichnung haben. MAG kann in beide Richtungen agieren, wobei sowohl die Komponenten nur vermutet werden als auch die Signalwege noch unklar sind. Die extrazelluläre Domäne vermittelt Axon-gliale Interaktionen aufgrund der Bindung an eine unbekannte Komponente mit Lektineigenschaften (rot) auf der Axonmembran oder möglicherweise nur an ein spezifisches Peptid (schwarzes Rechteck). Die Signalkaskade aktiviert die Zyklinabhängige Kinase-5 (cdk5) sowie die extrazellulär-signalregulierte Kinase 1 & 2 (ERK1/2) und führt zur stärkeren Expression von phosphorylierten Neurofilamenten, was den Axondurchmesser vergrößert. Es besteht auch eine reverse Signaltransduktion im ZNS mit MAG als Rezeptor, welcher die Kapazität von Oligodendrozyten, Myelin auszubilden und zu erhalten, erhöht. Die L- und S-Isoformen scheinen besonders wichtig für die Signalleitung in Oligodendrozyten zu sein.

Kalziumaktivierte sowie -abhängige Proteolyse des vollständigen Proteins mittels Calpain- und Cathepsin-ähnlicher Aktivitäten führt zu dem löslichen, die transmembrane und zytoplasmatische Domäne entbehrenden Fragment dMAG (Päiväläinen et al., 2003). Matrixmetalloproteasen (MMP-2, MMP-7, MMP-9) spalten MAG nahe der Transmembrandomäne, wodurch lösliche Fragmente, unter anderem ein etwa 37kDa großes, entlassen werden, die in der Lage sind, das Wachstum von DRG (*dorsal root ganglion*)-Neuronen zu inhibieren (Milward et al., 2008). Wenn sich das Glykoprotein auf Myelin verletztem Nervengewebe befindet, bindet es an axonale Rezeptoren und inhibiert so Axonwachstum und die funktionale Regeneration (Mehta et al., 2007).

Das glykolytische 37kDa Enzym *Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase* (GAPDH; Abb. 4.12, S. 108) katalysiert die Umwandlung von Glyceraldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Bei dieser Reaktion wird eine energiereiche ATP-Bindung aufgebaut und ein NAD^+ zu NADH/H^+ umgewandelt (Racker & Krimsky, 1952). Darüber hinaus ist die Rolle von GAPDH weitaus komplexer: es wurde in Verbindung mit Mikrotubuli gefunden (Durrieu et al., 1987) und ist beteiligt an multiplen anderen Funktionen, eingeschlossen Endozytose, Membranfusion, Vesikeltransport, nukleärer tRNS-Transport, DNS-Replikation and -Reparatur, Translationskontrolle, Apoptose sowie neurodegenerativen Krankheiten (Berry, 2004; Sirover et al., 2005). Außerdem bindet GAPDH an $\text{A}\beta$ mit einer vermutlich pathogenen Funktion (Verdier et al., 2005; 2008).

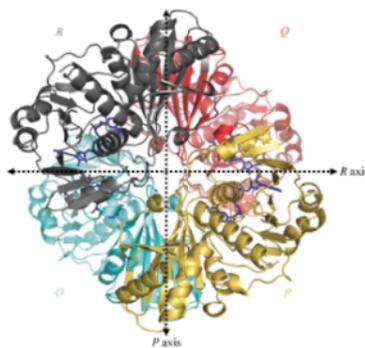


Abb. 4.12: Gesamtstruktur des GAPDH Homotetramers aus menschlicher Leber

Die Untereinheiten O, P, Q und R sind in jeweils blau, gelb, rot und grau gezeigt. Jedes Monomer bindet ein NAD^+ Molekül (blau). Die Symmetrieachsen sind durch gepunktete Pfeile dargestellt, wobei die Q-Achse senkrecht zur Betrachtungsebene steht. Diese Abbildung wurde mittels des PyMOL Programms (DeLano Scientific LLC) angefertigt (Ismail & Park, 2005).

Die *14-3-3 Proteine* sind eine Familie konservierter regulatorischer Moleküle, die in allen eukaryotischen Zellen exprimiert werden und ein Molekulargewicht von etwa 28kDa als Monomer sowie ~50kDa als Dimer (Abb. 4.13, S. 109) aufweisen.

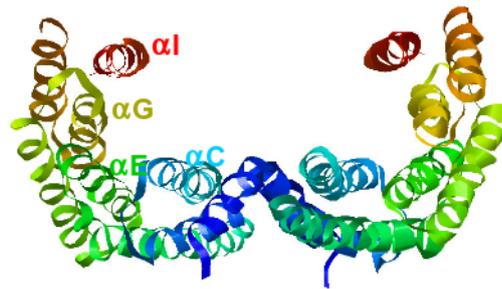


Abb. 4.13: Struktur des ζ - 14-3-3 Dimers

Das 14-3-3 Monomer setzt sich aus einem hochkonservierten N-Terminus und einem variableren C-Terminus zusammen. Der N-Terminus enthält die Dimerisierungszone und die α - Helices C, E, G, I, welche durch Formen einer amphiphatischen Grube (hydrophobe und basische Aminosäurenbe, Hauptmediator der Interaktion mit Liganden) die Hauptbindestelle erzeugen. Der C-Terminus hat eine inhibitorische Funktion bei der Vermittlung der Ligandeninteraktion und verhindert so ungeeignete 14-3-3 Interaktionen (bearbeitet von Ralph Pantophlet (TSRI, La Jolla) aus Liu et al., 1995).

Diese Proteine haben die Möglichkeit, eine Vielzahl funktional unterschiedlicher Signalproteine, eingeschlossen Kinasen, Phosphatasen und Transmembranrezeptoren, zu binden. Es sind bisher mehr als hundert Liganden identifiziert worden (Boston et al., 1982; Aitken, 2006), zu denen auch die intrazelluläre Domäne von APP gehört, die mit 14-3-3 γ und Fe65 einen trimeren Komplex bildet (Sumioka et al., 2005).

4.1.1.6 Überprüfen des Vorkommens der identifizierten Proteine in den, durch die Affinitätschromatographie erhaltenen, Elutionsfraktionen

Zur Bestätigung, ob die durch den anti-D Antikörper aufgereinigten Fraktionen (Eluate), die mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine enthalten, wurden die Elutate mit Hilfe von SDS-PAGE und Immunoblot unter Verwendung der spezifischen Antikörper analysiert. Als Positivkontrolle und Molekulargewichtsvergleich diente die zur Affinitätschromatographie verwendete Synaptosomen-Fraktion (Input). Von den im Rahmen dieser Studie überprüften möglichen APP-Bindepartnern konnten alle in den Elutionsfraktionen mittels der spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 4.14, S. 110).

Die Analyse der Eluate mittels der spezifischen Antikörper zeigt für die überprüften Proteine Dynamin I, Hexokinase Typ1, Na⁺-/K⁺-ATPase, MAG, GAPDH und 14-3-3 Banden der entsprechenden, auch in den synaptosomalen Fraktionen (Input) auftretenden, Molekulargewichte. Die Immunoblot-Analyse mittels des anti-14-3-3 Antikörpers lässt in beiden Spuren sowohl die Bande der monomeren, als auch der dimeren Form erkennen. Auch durch den anti-MAG Antikörper werden in der Spur der Elutionsfraktion sowie des Inputs jeweils zwei Banden sichtbar gemacht, wobei die obere (100kDa) dem Gesamtprotein und die bei etwa 37kDa liegende einem, durch MMP-Proteolyse entstandenen, MAG-Fragment entspricht.

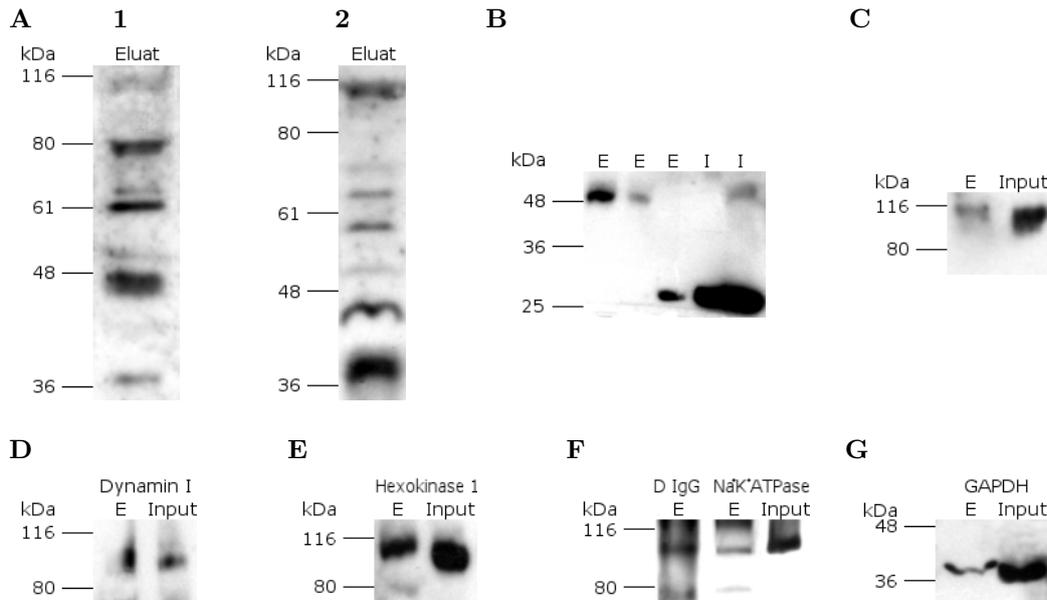


Abb. 4.14: Überprüfen der Elutionsfraktionen mit Hilfe der spezifischen Antikörper

Immunoblot-Analyse der Elutionsfraktionen unter Verwendung (A) des anti-D-IgG-Antikörpers (mittels (1) Protein A und (2) der CarboLink-Säule), (B) des H-8 14-3-3-, (c) des MAG-, (D) des D-5 Dynamin I-, (E) des N-19 Hexokinase Typ 1-, (F) des AB150 Na^+/K^+ -ATPase- und (G) des polyklonalen GAPDH-Antikörpers.

4.1.1.7 Überprüfen einer möglichen Interaktion der identifizierten Proteine und APP mittels Co-Immunpräzipitation

Die löslichen Extrakte der Synaptosomen-Fraktion der Gehirne von Wildtypmäusen wurden mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Als Negativkontrolle erfolgte die Präzipitation mit unspezifischen Immunglobulinen der gleichen Spezies. Die Immunkomplexe wurden mit Hilfe von Protein A/G-Agarose isoliert und bezüglich einer Co-Immunpräzipitation analysiert.

Als Positivkontrolle diente ein löslicher Extrakt der Synaptosomen-Fraktion (Input) (Abb. 4.15, S. 111).

Die Analyse der Immunkomplexe mit anti-APP-Antikörper zeigt nach Präzipitation der Na^+/K^+ -ATPase, der Hexokinase Typ1 und von Dynamin I deutliche Banden bei etwa 110kDa, ähnlich der des Inputs, welche jedoch bei der Negativkontrolle ausbleiben. Demnach konnte APP mit diesen identifizierten Proteinen co-isoliert werden, während eine Co-Immunpräzipitation mit den spezifischen Antikörpern der drei möglicherweise APP-bindenden Proteine ohne Erfolg blieb (nicht gezeigt). Nach Präzipitation mit dem polyklonalen anti-APP-Antikörper und anschließender Analyse unter Verwendung des 14-3-3-Antikörpers war eine Bande bei 50kDa zu erkennen, die auch im Input auftrat, jedoch in der Negativkontrolle fehlte. Die im Input ebenfalls auftretende Bande um 25kDa war in der Reihe des Immunkomplexes nicht ersichtlic. Daraus lässt sich schließen, dass allein die dimere Form von 14-3-3 mit APP co-präzipitiert, die monomere Form dagegen nicht. Die Analyse der Immunkom-

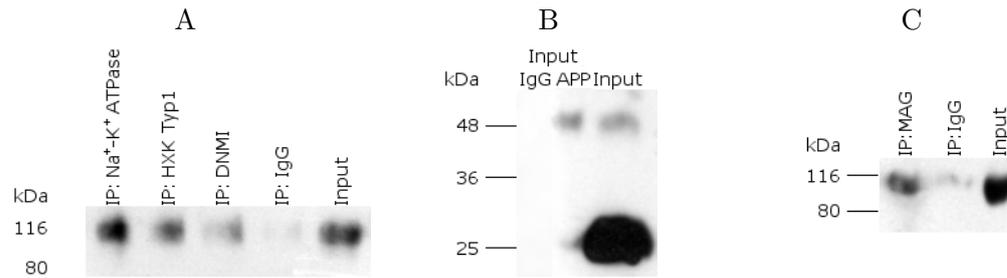


Abb. 4.15: Analyse der Co-Immünpräzipitation der identifizierten Proteine und APP

Die löslichen Extrakte der Synaptosomen-Fractionen wurden mit Antikörpern gegen (A) Na⁺-/K⁺-ATPase (AB150), Hexokinase Typ1 (N-19), Dynamin I (D-5) sowie mit unkonjugiertem Ziegen-IgG als Negativkontrolle und (C) mit dem anti-MAG Antikörper sowie unkonjugiertem Kaninchen-IgG inkubiert, Immunkomplexe durch Protein A/G-Agarose isoliert und die Eluate mittels SDS-PAGE und Immunoblot unter Verwendung des monoklonalen 22C11 Antikörpers gegen APP analysiert. Der lösliche Extrakt der Synaptosomen-Fraktion (Input) diente als Positivkontrolle. (B)/(C) Die löslichen Extrakte der Synaptosomen-Fractionen wurden mit dem Antikörper gegen APP (B63.4) und mit unspezifischem Kaninchen IgG inkubiert. Der weitere Vorgang entspricht dem zuvor beschriebenen. Zur Detektion wurde der H-8 Antikörper gegen 14-3-3 (B) sowie der gegen MAG (C) benutzt.

plexen mit anti-MAG zeigt nach Präzipitation von APP eine deutliche Bande sowohl in der Spur des Eluates als auch des Input bei etwa 100kDa, die in der Spur kaum zu erkennen ist. Demnach kann das MAG-Gesamtprotein mit APP co-isoliert werden. In beiden Fällen blieb die Co-Immünpräzipitation mit den spezifischen Antikörpern und Immunoblot-Analyse der Präzipitate unter Verwendung des anti-APP-Antikörpers erfolglos (nicht gezeigt). GAPDH und APP konnten weder mit anti-APP noch mit anti-GAPDH-Antikörper co-isoliert werden (nicht gezeigt).

4.1.1.8 Überprüfen einer Bindung der Na⁺-/K⁺-ATPase und APP mittels ELISA

Um eine direkte Interaktion der Na⁺-/K⁺-ATPase und APP zu überprüfen, wurden die synthetischen, biotinylierten Peptide APP1 bzw. APP2, welche die γ - bzw. die β -Spaltstelle von APP repräsentieren und eine kommerziell erhältliche Mischung der ATPase-Isoformen verwendet. Es wurden Plastikoberflächen sowohl mit den Peptiden als auch der Ionenpumpe beschichtet und diese anschließend mit den jeweils zu überprüfenden Proteinen inkubiert. Dabei diente APP2 in dem einen Fall als Negativkontrolle, in dem umgekehrten war es BSA. Die Detektion der möglichen Interaktion erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern bzw. mit HRP gekoppeltem Streptavidin. Unter Verwendung der eingesetzten Peptide, Proteine und Antikörper konnte keine direkte Bindung der Na⁺-/K⁺-ATPase und APP nachgewiesen werden.

Trotz dieser nicht bestätigten Interaktion der beiden Proteine kann eine Beteiligung der Na⁺-/K⁺-ATPase an dem Vorgang der γ -Spaltung nicht ausgeschlossen werden

4.1.1.9 Überprüfen einer Bindung der möglichen APP-Bindepartner und Presenilin mittels Co-Immunpräzipitation

Als katalytisch aktives Mitglied der γ -Sekretase ist Presenilin, hauptsächlich PS1, zu geringen Anteilen auch PS2, am wahrscheinlichsten die Komponente, mit der die Bindepartner bei einer möglichen Beteiligung an der γ -Spaltung von APP interagieren. Demnach wurden lösliche Extrakte der synaptosomalen Mausgehirnfraktionen mit den entsprechenden Antikörpern (PS1/PS2) inkubiert, die Immunkomplexe mit Hilfe der Protein A/G-Agarose isoliert und bezüglich einer Co-Immunpräzipitation analysiert. Als Negativkontrolle erfolgte die Präzipitation mit unspezifischen Immunglobulinen der gleichen Spezies und als Positivkontrolle diente jeweils die synaptosomale Fraktion (Input).



Abb. 4.16: Analyse der Co-Immunpräzipitation der Na^+/K^+ -ATPase und PS

Lösliche Extrakte der Synaptosomen-Fractionen wurden mit Antikörpern gegen PS1 (2953) und PS2 (BII.HF5c) sowie mit unkonjugiertem Kaninchen IgG als Negativkontrolle inkubiert, die Immunkomplexe mit Hilfe von Protein A/G-Agarose isoliert und mittels SDS-PAGE und Immunoblot unter Verwendung des Antikörpers gegen die Na^+/K^+ -ATPase (AB150) analysiert. Als Positivkontrolle diente ein löslicher Extrakt der Synaptosomen-Fraktion

Es konnte keine Interaktion der Hexokinase, des Dynamins, MAGs und der 14-3-3 Proteine mit Presenilin mittels Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Die Analyse der Immunkomplexe hinsichtlich der Na^+/K^+ -ATPase zeigt auch keine Bande des entsprechenden Molekulargewichtes bezüglich PS1 sowie des unspezifischen IgGs, wobei erstaunlicherweise eine Bande in der PS2-zugehörigen Spur in gleicher Höhe wie in der des Input ersichtlich ist (Abb. 4.16, S. 112). Demnach kann die Na^+/K^+ -ATPase nicht mit Presenilin 1, jedoch aber mit Presenilin 2 co-präzipitiert werden, was auf eine mögliche Interaktion der beiden Proteine schließen läßt.

4.1.2 Studie 2: Charakterisierung der Interaktion von APP und der CK-B

Die als APP-Bindepartner in der Einleitung erwähnte Kreatinkinase-B (Kap. 1.9.1, S. 20) ist die gehirnspezifische Isoform einer Proteinfamilie, die als Homo- oder Heterodimere den ATP-Gehalt subzellulärer Kompartimente regulieren. Die zytosolischen Enzyme werden gewebespezifisch mit einer mitochondrialen Isoform (uMtCK) co-exprimiert (Eppenberger et al., 1967; Wallimann & Hemmer, 1994), die an die intrazelluläre Domäne von APP bindet (Li et al., 2006). Darüber hinaus hat die CK-B energetische Funktionen während der Entwicklung des Gehirns und im Bereich der Synapsen. In Gehirnen von Alzheimerpatienten ist die Kreatinkinase durch Oxidation inaktiviert und man findet neuronale Kreatinablagerungen im Hippocampus (Bürklen et al., 2006). Helen Strelakova identifizierte dieses Enzym im Rahmen ihrer Dissertation als Bindepartner der APP- β -Spaltstelle (Strelakova, 2004). Es besteht demnach sowohl eine Verbindung zwischen dem Kreatinmetabolismus und der Alzheimer-Krankheit, als auch zwischen der Kreatinkinase-B und APP. Allerdings interagiert die CK-B entweder mit mehreren Stellen von APP oder es handelt sich um eine unspezifische Bindung.

4.1.2.1 Co-Immunpräzipitation der Kreatinkinase-B und APP

Um die Interaktion von APP und der Kreatinkinase-B sowohl bezüglich der Arbeit von Helen Strelakova (Strelakova, 2004), als auch hinsichtlich der eigenen unter Studie 1 beschriebenen Ergebnisse (Kap. 4.1.1, S. 96) zu bestätigen bzw. zu überprüfen, wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Lösliche Extrakte von synaptosomalen Mausgehirnfraktionen wurden mit Antikörpern gegen APP, die Kreatinkinase-B sowie entsprechend unspezifischen IgGs inkubiert. Die Immunkomplexe wurden mittels Protein A/G-Agarose isoliert und unter Verwendung der jeweiligen Antikörper analysiert (Abb. 4.17, S. 113)

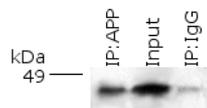


Abb. 4.17: Analyse der Co-Immunpräzipitation von APP und der Kreatinkinase-B

Lösliche Extrakte Synaptosomen-Fractionen von WT-Mäusen wurden mit dem B63.4 anti-APP-Antikörper sowie unspezifischen Kaninchen-IgG als Negativkontrolle inkubiert, die Immunkomplexe mittels Protein A/G-Agarose isoliert und unter Verwendung des C-17 anti-CK-B-Antikörpers mit Hilfe Immunoblot analysiert. Als Positivkontrolle diente ein löslicher Extrakt der Synaptosomen-Fraktion (Input).

Die Analyse der Co-Immunpräzipitate zeigt deutliche Banden im Bereich von 43kDa in allen Spuren, wobei die der Negativkontrolle kaum ersichtlich ist. Während die Co-Isolierung von APP mittels des anti-Kreatinkinase-Antikörpers nicht möglich war (nicht gezeigt), konnte diese demnach mit APP zusammen präzipitiert werden. Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass die Kreatinkinase-B sowohl bei der Suche nach Bindepartnern sowohl β - als auch der

γ -Spaltstelle von APP herauskam, reichte dieses Ergebnis jedoch nicht aus, um der möglichen Interaktion der beiden Proteine weiter nachzugehen.

4.1.2.2 Oberflächenbiotinylierung

Nachdem die Bindung der beiden Proteine als möglicherweise unspezifisch abgehandelt worden ist, wurde im Rahmen eines Oberflächenbiotinylierungsexperiments mit schon häufig geteilten (*alten*) APP695-überexprimierenden B103-Zellen (B103/APP), bei dem die Kreatinkinase als weitere Negativkontrolle dienen sollte, das Auftreten dieser an der Zelloberfläche beobachtet. Der gleiche Versuch mit seltener geteilten (*jungen*) B103/APP- sowie *jungen* B103-Wildtyp (B103/WT)-Zellen zeigte in beiden Fällen kein Oberflächenvorkommen des Proteins. Daher wurden sowohl beide Zelltypen (APP/WT) als auch beide "Altersstufen" (T12, *jung*/T32, *alt*) bezüglich ihrer Kreatinkinase-B (CK-B)-Zelloberflächenexpression miteinander verglichen. Die Oberflächenproteine der jeweiligen B103-Zellen wurde zuerst biotinyliert und dann mittels Streptavidin isoliert und mittels Immunoblot unter Verwendung des anti-CK-B-Antikörpers analysiert (Abb. 4.18, S. 114).

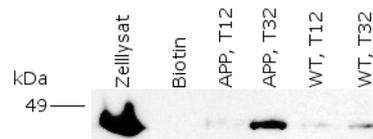


Abb. 4.18: B103-Zelloberflächenvorkommen der Kreatinkinase-B

Zelloberflächenbiotinylierung *jüngerer* (Teilung 12) sowie *älterer* (Teilung 32) B103/Wildtyp (WT)- und B103/APP695 überexprimierender (APP)-Zellen und Immunoblot-Analyse der Streptavidin-gebundenen Präzipitate unter Verwendung des anti-Kreatinkinase-B-Antikörpers (C-17). Als Positivkontrolle wurde Zellysat von B103/WT-Zellen eingesetzt und die Negativkontrolle ist ein WT-Ansatz ohne Biotin.

Ausgenommen der Negativkontrolle sind in den anderen Spuren Banden des der CK-B entsprechenden Molekulargewichtes (~ 43 kDa) zu erkennen. Dabei ist die Signalintensität der Bande der *alten* B103/APP-Zellen stärker als die der *jungen* Zellen gleicher Art sowie als die beider B103/WT-Zellen. Diese Zellen zeigen ebenfalls eine schwächere Signalintensität der Banden nach wenigen Teilungen im Vergleich zu den häufiger geteilten.

Anhand des Diagramms (Abb. 4.19, S. 115), welches der Vergleich graphisch darstellt, ist deutlich zu erkennen, dass bezüglich beider Zellen die Konzentration der biotinylierten CK-B der *alten* Zellen größer ist als die der *jungen*. Während die B103/APP-Zellen im Vergleich mit den B103/WT-Zellen nur eine gering höhere CK-B-Konzentration an der Zelloberfläche der *jungen* Zellen besitzen ist die der *alten* Zellen der B103/APP um einen Faktor von 5,5 und die der B103/WT nur um einen Faktor von 2 erhöht. Daraus lässt sich schließen, dass die Konzentration der biotinylierten Kreatinkinase-B in Abhängigkeit des Alters und, gravierender, der APP-Expression verändert ist.

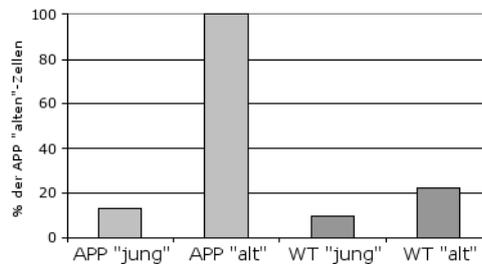


Abb. 4.19: Graphische Darstellung der Menge an biotinylierter CK-B unterschiedlicher B103-Zellen

B103/APP695 überexprimierende (APP) sowie Wildtyp (WT) Zellen wurden jeweils nach 12 Teilungen (*jung*) und nach 32 Teilungen (*alt*) Oberflächen-biotinyliert, mittels Streptavidin isoliert und unter Verwendung des C-17 anti-CK-B Antikörpers analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Tina-Programms und Microsoft Excel. Sowohl B103/APP- als B103WT-Zellen zeigen eine Erhöhung der APP-Konzentration an der Zelloberfläche bei den *alten*-Zellen im Vergleich zu den *jungen*, wobei der Faktor des Konzentrationsunterschieds der B103/APP-Zellen bei etwa 5,5 und der der B103/WT-Zellen bei ca. 2 liegt.

4.1.3 Studie 3: Charakterisierung der Interaktion von CRT und APP hinsichtlich APP- γ -Spaltung

Eine frühere Studie der gleichen Art, wie die zuvor beschriebene, durchgeführt von Helen Strelakova (Strelakova, 2004), identifizierte Calretikulin *in-vitro* als Bindepartner der γ -Spaltstelle des Amyloid Vorläuferproteins (APP) und konnte auch eine Co-Lokalisation in hippocampalen Neuronen zeigen. Dieses Ca^{2+} -bindende, ubiquitär exprimierte Protein tritt hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum (ER), aber auch in vielen anderen Zellkompartimenten und an der Zelloberfläche auf, wo es Ektocalretikulin genannt wird (Michalak et al., 1992, 1999). Calretikulin (CRT) ist beteiligt an multiplen, für die Zelle essentiellen Funktionen wie Proteinfaltung, Ca^{2+} -Signaltransduktion und -Homeostase, Genexpression, Immunabwehr und Apoptose (Jia et al., 2008). Das Chaperon ist zwischen den Spezies hoch konserviert und besteht aus der neutralen N-Domäne, der Prolin-reichen, einem ausgestreckten Arm-ähnlichen P-Domäne sowie der sauren C-Domäne (Abb. 4.20, S. 116). Sowohl die für die Chaperonfunktion verantwortliche P- als auch die weniger erforschte C-Domäne weisen eine Ca^{2+} -Bindestelle auf.



Abb. 4.20: Domänenstruktur von Calretikulin

Das Protein besteht aus der globulären N-Domäne, der armartigen P-Domäne und der sauren C-Domäne. CRD, Kohlenhydraterkennungs-Domäne (*carbohydrate recognition domain*)

Helen Strelakova konnte die, durch Affinitätschromatographie und massenspektrometrische Analyse vorgeschlagene, Interaktion von CRT und APP mittels Co-Immunpräzipitation, Colokalisationsexperimente sowie ELISA-Bindungsstudien bestätigen und identifizierte die CRT-C-Domäne als die die Bindung vermittelnde (Strelakova, 2004).

4.1.3.1 Bestätigung der Bindung von CRT und APP mittels Co-Immunpräzipitation

Da von Helen Strelakova nur APP mit Calretikulin co-präzipitiert wurde (nicht gezeigt), ist der Versuch der Co-Isolation von CRT mit anti-APP-Antikörpern sowohl eine Möglichkeit der Bestätigung der Bindung beider Proteine als auch der vorangegangenen Arbeit. Lösliche Extrakte der Synaptosomen-Fraktion der Gehirne von Wildtypmäusen wurden mit anti-APP-Antikörper und unspezifischen Kaninchen-IgG als Negativkontrolle inkubiert. Die Immunkomplexe wurden mit Hilfe von Protein A/G-Agarose isoliert und im Hinblick auf co-präzipitiertes CRT analysiert. Als Positivkontrolle diente ein löslicher Extrakt der Synaptosomen-Fraktion (Input) (Abb. 4.21, S. 117).

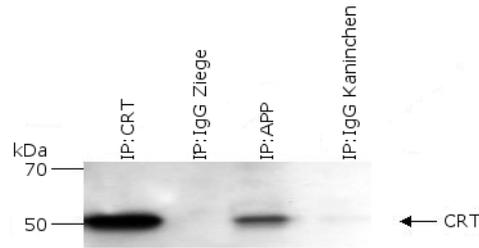


Abb. 4.21: Analyse der Co-Immunpräzipitation von CRT und APP

Lösliche Extrakte der Synaptosomen-Fractionen wurden mit Antikörpern gegen APP (B63.4), CRT (C-17) als Positiv- und sowohl unkonjugiertem Ziegen- als auch Kaninchen-IgG als jeweilige Negativkontrolle inkubiert. Die Isolation der entsprechenden Immunkomplexe erfolgte durch Protein A/G-Agarose und die Analyse der Eluate mittels SDS-PAGE und Immunoblot unter Verwendung des T-19 gegen CRT.

Die Analyse der Immunkomplexe lässt für beide Präzipitationen Banden mit dem im Vergleich zur Positivkontrolle, gleichen Molekulargewicht erkennen, während keine in den Spuren der Negativkontrollen zu sehen sind (Abb. 4.21, S. 117). Die Doppelbande des co-präzipitierten APP entspricht der vollständig glykosylierten (reifen) und der nur N-glykosylierten (unreifen) Form (Abb. 4.22, S. 117), an die CRT beide als Oligosaccharid-erkennendes Chaperon binden kann (Johnson et al., 2001). Die Co-Immunpräzipitation zeigt eine Interaktion von CRT und APP. Es ist jedoch nicht geklärt, ob CRT dabei an die APP- γ -Spaltstelle oder ein repräsentierende Peptid binden kann, das keine Oberflächen-Oligosaccharide besitzt.

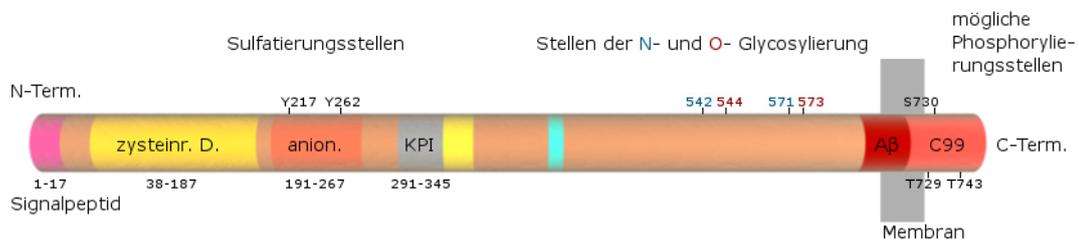


Abb. 4.22: schematische Proteinstruktur von APP

Unterschiedliche Domänen oder Strukturen sind farblich getrennt, Sulfatierungs-, Glykosylierungs- und mögliche Phosphorylierungsstellen mit der entsprechenden Aminosäure gekennzeichnet. Das, das A β -Peptid und die C-terminale Domäne umfassende, C99-APP ist dunkel gekennzeichnet. N-Term., N-Terminus, C-Term., C-Terminus, cysteinr. D., cysteinreiche Domäne, anion., anionische Domäne, KPI, Kunitz Protease Inhibitions-ähnliche Domäne.

4.1.3.2 Überprüfen einer Bindung von CRT und C99-APP mittels Co-Immunpräzipitation

Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden CHO-Zellen mit dem β -geschnittenen APP-Stumpf C99 (Abb. 4.23, S. 118) transient transfiziert und eine Immunpräzipitation bezüglich CRT angeschlossen. Membranfraktionen der Zellen wurden mit anti-CRT-Antikörper inkubiert, die Immunkomplexe mittels Protein A/G-Agarose isoliert und hinsichtlich C-terminalen Fragments von APP analysiert (Abb. 4.24, S. 118).

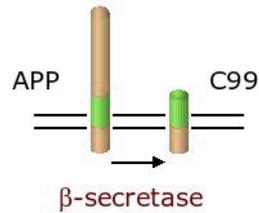


Abb. 4.23: Schematische Darstellung der β -Spaltung von APP

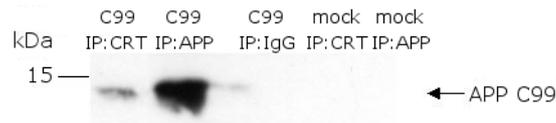


Abb. 4.24: Analyse der Co-Immunpräzipitation von CRT und C99-APP

CHO-Zellen wurden mit dem C99-APP und dem leeren Vektor als Negativkontrolle (mock) transfiziert und die löslichen Extrakte der Membranfraktionen anschließend mit Antikörpern gegen CRT (C-17) und APP (B63.4) als Positivkontrolle sowie mit unkonjugiertem Ziegen-IgG (Negativkontrolle der Co-IP) inkubiert. Die Isolation der entsprechenden Immunkomplexe erfolgte durch Protein A/G-Agarose und die Analyse der Eluate mittels SDS-PAGE und Immunoblot unter Verwendung des W02 Antikörpers gegen APP.

Die Analyse der präzipitierten Proteine zeigt eine deutliche Bande bei 12kDa in der Spur der Positivkontrolle sowie in der Spur der CRT-Präzipitation nach C99-Transfektion, während in den übrigen Spuren keine Banden ersichtlich sind (Abb. 4.24, S. 118). Daraus lässt sich schließen, dass das \sim 12kDa β -geschnittene APP-Fragment mit Calretikulin co-präzipitierbar ist. CRT bindet nicht nur an das komplette Amyloid Vorläuferprotein, sondern auch an das membranständige, die γ -Spaltstelle enthaltende APP-C99, wobei diese Interaktion nicht Oligosaccharid-vermittelt sein kann und somit nicht der Chaperonfunktion von CRT entspricht. Dadurch wird das Ergebnis der Affinitätschromatographie bzw. eine Bindung von Calretikulin und der APP- γ -Spaltstelle bestätigt. Es stellt sich nun die Frage, mit welcher Domäne Calretikulin an dieser Bindung beteiligt ist.

4.1.3.3 Charakterisierung der Bindung von CRT und C99-APP durch Pulldown-Untersuchungen

Zur Identifikation der mit APP-interagierenden CRT-Domäne wurden GST-Fusionsproteine mit vollständigem CRT, der NP-, der P- und der C-Domäne sowie GST allein mit dem Lysat von Zellen, welche zuvor transient mit APP-C99 transfiziert worden sind, inkubiert, die Proteinkomplexe mittels Glutathion-Sepharose isoliert und im Hinblick auf das membranständige Fragment von APP analysiert (Abb. 4.25, S. 119).

Die Analyse der eluierten Proteine zeigt zwei Banden im Bereich von 12kDa, von denen eine in der Spur des kompletten CRT- und eine in der des CRT-C Fusionsproteins auftritt. Die Spuren der übrigen Fusionsproteine sowie die der Negativkontrolle zeigen keine Banden.

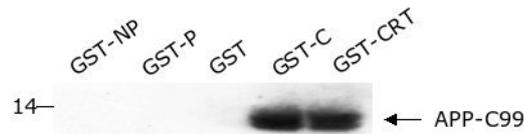


Abb. 4.25: Analyse der *pull-down*-Experimente der CRT-GST-Proteine und APP-C99

Das Lysat von mit APP-C99 transfizierten CHO-Zellen wurde mit den GST-Fusionsproteinen CRT, NP-, P- und C-Domäne sowie GST allein als Negativkontrolle inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden mit Hilfe von GST-Sepharose isoliert und mittels Immunoblot unter Verwendung des W02 anti-APP Antikörpers analysiert.

Demnach bindet Calretikulin mit der C-Domäne an den C99-Stumpf von APP bzw. die APP- γ -Spaltstelle. Dieses Ergebnis bestätigt vorangegangene Experimente von Helen Strekalova, durch welche sie die CRT-C-Domäne als die an das APP-Gesamtprotein-bindende identifiziert hat. Es liegt nun die Vermutung nahe, dass Calretikulin an dem Vorgang der γ -Spaltung beteiligt ist und/oder mit dem γ -Sekretasekomplex (Abb. 4.26, S. 119) interagiert.

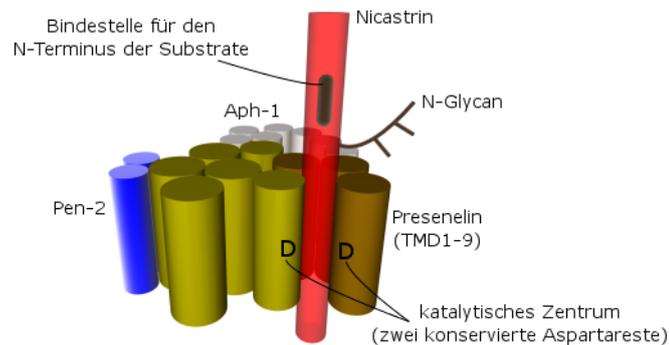


Abb. 4.26: Aufbau der γ -Sekretase

Der γ -Sekretasekomplex besteht aus Presenilin, Nicastrin, Aph-1 und Pen-2. Das katalytische Zentrum wird durch zwei konservierte Aspartatreste (D) innerhalb Presenilins, die jeweils unterschiedlichen Fragmenten des Protein (NTF/CTF) zuzuordnen sind, gebildet. Nicastrin enthält eine Bindestelle für den N-Terminus von Substraten und ist N-glykosyliert. TMD: Transmembrandomäne

4.1.3.4 Überprüfen einer Bindung von CRT und PS1 durch Co-Immunpräzipitation

Presenilin (PS) ist die enzymatisch aktive Komponente des γ -Sekretasekomplexes. Das aus mehreren Transmembrandomänen bestehende Protein wird nach vollständiger Zusammensetzung der Sekretase durch Endoproteolyse aktiviert und bildet anschließend einen heterodimeren Komplex aus dem N- und dem C-terminalen Fragment (Abb. 4.27, S. 120; Wolfe, 2008).

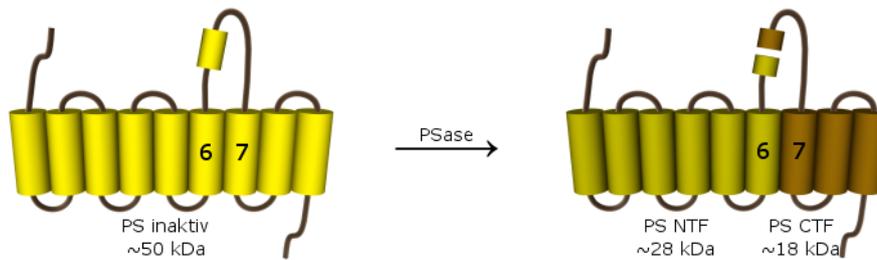


Abb. 4.27: Autoproteolyse von Presenilin1

Das inaktive 50kDa Presenilin 1 bildet nach Autoproteolyse zwischen der Transmembrandomäne 6 und 7 einen heterodimeren Komplex aus dem N- (28kDa) und dem C-terminalen Fragment (18kDa), wobei jedes Fragment ein katalytische aktiven Aspartatrest besitzt.

Lösliche Extrakte der Synaptosomen-Fractionen von WT-Mäusen wurden mit Antikörpern gegen Calretikulin bzw. Presenilin 1 inkubiert, die Immunkomplexe mittels Protein A/G-Agarose isoliert und im Hinblick auf eine Co-Immunopräzipitation von PS1 bzw. CRT analysiert (Abb. 4.28, S. 120).

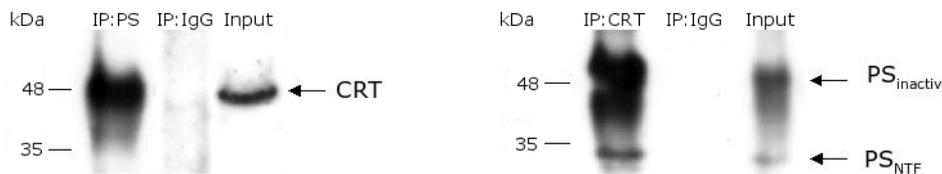


Abb. 4.28: Analyse der Co-Immunopräzipitation von CRT und PS1

Lösliche Extrakte der Synaptosomen-Fractionen wurden mit Antikörpern gegen (A) PS1 (2953) sowie unkonjugiertem Kaninchen IgG (Negativkontrolle) und gegen (B) CRT (C-17) sowie unkonjugiertem Ziegen-IgG (Negativkontrolle) inkubiert. Die Isolation der entsprechenden Immunkomplexe erfolgte durch Protein A/G-Agarose und die Analyse der Eluate mittels SDS-PAGE und Immunoblot unter Verwendung des (A) C-17 Antikörpers gegen CRT sowie (B) des 2953 Antikörpers gegen PS1. Der Input ist ein löslicher Extrakt der Synaptosomen-Fraktion.

Die Analyse der Immunkomplexe lässt für beide Co-Präzipitationen Banden des im Vergleich mit der Positivkontrolle gleichen Molekulargewichts erkennen, während die Spuren der Negativkontrollen keine Banden aufweisen (Abb. 4.28, S. 120). CRT und PS1 können sowohl mit anti-CRT- als auch mit anti-PS1-Antikörper zusammen isoliert werden. Dabei bindet Calretikulin sowohl an die inaktive Form von Presenilin 1 (~50kDa) als auch an das N-terminale Fragment (~28kDa). Obwohl das Ergebnis der Co-Immunopräzipitation auf eine mögliche Interaktion der beiden Proteine schließen lässt, ist es sinnvoll, dieses mit einer weiteren Methode zu bestätigen. Außerdem stellt sich so wieder die Frage nach der Domäne von CRT, die diese Bindung vermittelt.

4.1.3.5 Bestätigung einer Interaktion von APP, CRT und PS1 mittels Co-Lokalisations-Experimenten

Um die durch Co-Immunpräzipitation gezeigte Bindung von CRT und APP sowie CRT und PS1 zu bestätigen, wurden Primärkulturen hippocampaler Neuronen neugeborener Mäuse präpariert und über eine Zeit von einer Woche *in vitro* belassen. Die Inkubation der Primär- und mit Cy2-, Cy3- und Cy5-markierten Sekundärantikörpern erfolgte nach Fixierung der Kulturen. Leider ließ die Auswertung mittels *Laser scanning microscopes* (LSM) keine ausreichende Schlußfolgerung zu (Abb. 4.29, S. 121).

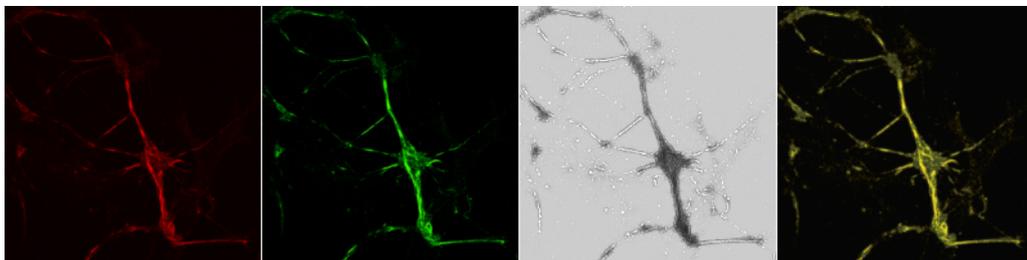


Abb. 4.29: Co-Lokalisation von APP und CRT in hippocampalen Primärkulturen

hippocampale Neuronenkulturen von P0-Mäusen wurden nach einer Woche *in vitro* fixiert und mit Antikörpern gegen APP (22C11, rot), CRT (N-19, grün) und PS1 (2953, blau, nicht gezeigt) co-immungefärbt. Das Phasenkontrastbild (grau) zeigt die zellulären Strukturen und das Übereinanderlegen der Bilder die Co-Lokalisation in gelb. Vergrößerung, 20x .

Das Sichtbarmachen von PS1 gelang unabhängig der Markierung des Zweitantikörpers (Cy2/Cy3/Cy5) nur unzureichend und ist möglicherweise auf den Primärantikörper zurückzuführen. Das Bild der anti-APP immungefärbten Neuronen zeigt eine breite Verteilung des Proteins entlang der Axone, der Oberfläche des Zellkörpers und, weniger intensiv, im Zytoplasma, während der Kern weitgehend frei bleibt. Die Immunfärbung mittels anti-CRT-Antikörpers ist im Bereich der gesamten Zelle sehr intensiv und lässt auf eine ubiquitäre Lokalisation des Chaperons schließen (Abb. 4.29, S. 121). Sowohl die hohe CRT-Konzentration als auch die unzureichende PS1-Immunfärbung machen eine Aussage über eine Co-Lokalisation, und darüber hinaus über definierte Orte des gemeinsamen Vorkommens schwer möglich.

Daher wurde das Experiment mit CHO/APP695-Zellen (Tab. 2.6, S. 33) wiederholt. Diese mit APP695 stabil transfizierten CHO-Zellen wurden auf PLL-*coverslips* ausgesät und 1 bis 2 Tage wachsen gelassen. Die weitere Behandlung entspricht der oben beschriebenen. Leider ergab auch diese Auswertung mittels LSM (nicht gezeigt) keine eindeutige Aussage bezüglich einer APP/CRT/PS1-Co-Lokalisation. PS1 konnte zwar ausreichend sichtbar gemacht werden, es war jedoch aufgrund der intensiven Immunfärbung sowohl der anti-APP- als auch der anti-CRT-Antikörper im gesamten Zellbereich eine Co-Lokalisation schwer möglich zu erkennen.

4.1.3.6 Charakterisierung der Bindung von CRT und PS1 durch pulldownUntersuchungen

Trotz der fehlenden Bestätigung einer APP/CRT/PS1-Interaktion mittels Co-Lokalisationsexperimente blieb die Frage nach der CRT-Domäne, mit der das Chaperon an Presenilin 1 bindet, noch unbeantwortet. Lösliche Extrakte der Synaptosomen-Fractionen von mit PS1 und APP stabil transfizierten HEK-Zellen wurden mit GST-Proteinen, eingeschlossen GST-CRT, der -NP, der -P und -C sowie GST allein, inkubiert, die Proteinkomplexe mittels Glutathion-Sepharose isoliert und bezüglich PS1 analysiert (Abb. 4.30, S. 122).

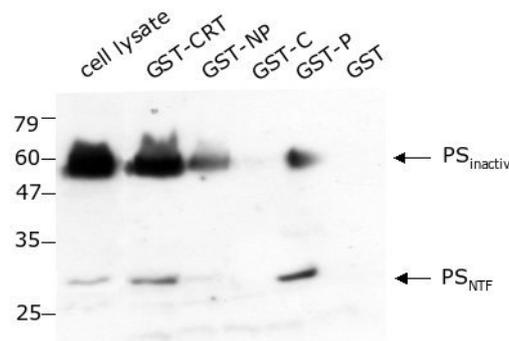


Abb. 4.30: Analyse der pulldown-Untersuchung mit der GST-CRT-Proteinen und PS1

Lösliche Extrakte der Synaptosomen-Fractionen von mit PS1 und APP stabil transfizierten HEK-Zellen wurde mit den GST-Proteinen CRT-, NP-, P- und C-GST sowie GST allein als Negativkontrolle inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden mittels GST-Sepharose isoliert und mit Hilfe von Immunoblot unter Verwendung des 2953 anti-PS1 Antikörpers analysiert. Als Positivkontrolle diente das Zelllysate der eingesetzten HEK-Zellen.

Die Analyse der eluierten Proteine zeigt zwei Banden in den Spuren des CRT-Gesamtproteins, der NP- und P-Domäne sowie in der Spur der Positivkontrolle bei etwa 50kDa und ca. 30kDa, die jedoch nur sehr schwach in der Spur der CRT-NP-Domäne auftritt, während die Spuren der CRT-C-Domäne und der Negativkontrolle keine Banden aufweisen. Demnach bindet Calretikulिन mit der P-Domäne sowohl an die inaktive Form von Presenilin 1 als auch an das N-terminale Fragment. Die Interaktion der NP-Domäne von CRT mit PS1 scheint durch die CRT-P-Domäne vermittelt zu sein. Da CRT an die γ -Spaltstelle von APP bindet und auch mit PS1 interagiert, besteht die Vermutung, dass es sich möglicherweise um eine weitere Komponente des γ -Sekretasekomplexes handelt.

4.1.3.7 Isolierung des γ -Sekretasekomplexes

Die γ -Sekretase wurde gemäß eines, von Dr. Steiner freundlicherweise zur Verfügung gestellten, Protokolls aus, mit APP^{sw} (*swedish mutated*) und PS1 stabil transfizierten, HEK-Zellen isoliert. Zur Komplexisolation wurden sowohl HEK-Zellen, die Wildtyp-PS1 (PS1/SW/WT23) als auch welche, die im aktiven Zentrum mutiertes PS1 (PS1/SW/D385N-10) überexprimieren, verwendet (Tab. 2.6, S. 33). Lösliche Extrakte der Membranfraktionen wurden mit anti-PS1-Antikörper inkubiert, der PS1-Komplex mittels Protein A/G-Agarose isoliert und in

Gegenwart bzw. Abwesenheit von Harnstoff hinsichtlich PS1 und CRT analysiert (Abb. 4.31, S. 123).

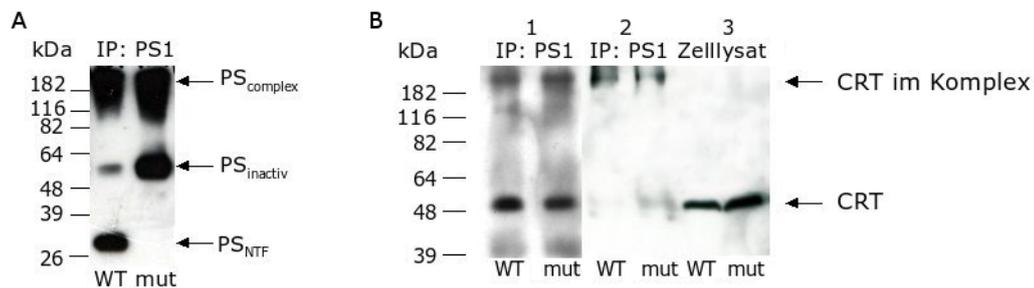


Abb. 4.31: Analyse der Immunpräzipitation des γ -Sekretasekomplexes

Lösliche Extrakte der Membranfraktionen von PS1/SW/WT23 (WT) und PS1/SW/D385N-10 (mut) HEK-Zellen wurden mit anti-PS1 Antikörper (2953) inkubiert, die Immunkomplexe mittels Protein A/G-Agarose isoliert und sowohl in Gegenwart von Harnstoff (1) als auch in Abwesenheit von Harnstoff (2) mittels Immunoblot unter Verwendung (A) des 3487 anti-PS1- und (B) des C-17 anti-CRT-Antikörpers analysiert. Als Positivkontrolle diente jeweils das entsprechende Zellysat.

Die Analyse der isolierten Proteine zeigt für PS1 die charakteristischen Banden im Bereich von 50kDa und 30kDa für beide von dem N-terminalen Antikörper erkannten PS1-Formen in der Spur der Wildtypzellen sowie nur eine Bande bei 50kDa in der Spur der PS1-mutierten Zellen, die der inaktiven PS1-Form zuzuordnen ist. Darüber hinaus ist in beiden Fällen eine Bande größer als 200kDa zu erkennen, die dem gesamten γ -Sekretasekomplex entsprechen könnte. Die Analyse der co-präzipitierten Proteine mittels des anti-Calretikulin-Antikörpers zeigt für die Isolierung mit Harnstoff in den Spuren beider Zellen Banden des im Vergleich mit dem Zellysat gleichen Molekulargewichts von ~ 50 kDa, während diese bei der Isolierung ohne Harnstoff nicht zu erkennen sind. Außerdem treten in allen Fällen ebenfalls Banden mit einem Molekulargewicht über 200kDa auf, was darauf schließen lässt, dass CRT zumindest transient sowohl mit dem aktiven als auch dem inaktiven γ -Sekretasekomplex verbunden ist. Trotz dieser Ergebnisse kann eine unspezifische oder indirekte Bindung von CRT an die γ -Sekretase nicht ausgeschlossen werden, da es sich im Prinzip um eine einfache Co-Immunpräzipitation mit Presenilin handelt.

4.1.3.8 Aufreinigung der γ -Sekretase in vier Schritten

Die Arbeitsgruppe von Prof. Haass (LMU München) hat eine wesentlich genauere Aufreinigung der γ -Sekretase in vier Schritten etabliert. Hierbei handelt es sich um ein bisher nicht publiziertes Protokoll, welches das Zusammenwirken von Immunpräzipitation, Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie beschreibt. Ein löslicher Extrakt der Membranfraktion der HEK/PS1/SW/WT23-Zellen (Tab. 2.6, S. 33) wurde entsprechend behandelt und von Prof. Steiner (LMU München) nach Zusendung des entsprechenden Antikörpers bezüglich einer Gegenwart von CRT analysiert (nicht gezeigt). Die Analyse der schrittweisen Komplexisolierung unter Verwendung des anti-CRT-Antikörpers zeigt je eine Bande im Bereich von 55kDa in

den Spuren der ersten beiden Aufreinigungsschritte. CRT konnte jedoch nicht mit der endogenen γ -Sekretase aus den entsprechenden HEK-Zellen isoliert werden (Harald Steiner, LMU München, persönliche Mitteilung). Dieses Ergebnis lässt jedoch eine transiente Verbindung des Chaperons mit dem Komplex vermuten. Daher besteht die Möglichkeit, dass CRT nicht nur mit PS1 sondern auch mit den übrigen Komponenten der γ -Sekretase interagiert.

4.1.3.9 Überprüfen einer Bindung von CRT und NCT, APH-1 sowie PEN-2 mittels Co-Immunpräzipitation

Lösliche Extrakte der Membranfraktionen von WT-Mäusen und HEK/PS1/SW-WT23Zellen (Tab. 2.6, S. 33) wurden mit Antikörpern gegen NCT, APH-1 und PEN-2 sowie CRT inkubiert, die Immunkomplexe mittels Protein A/G-Agarose isoliert und im Hinblick auf eine entsprechende Co-Präzipitation analysiert.



Abb. 4.32: Analyse der Co-Immunpräzipitation von CRT und NCT

Lösliche Extrakte von Synaptosomen-Fractionen von WT-Mausgehirnen wurden mit Antikörpern gegen (A) NCT (N1660) und (B) CRT (C-17) sowie den entsprechenden unspezifischen Immunglobulinen (IgG) als Negativkontrolle inkubiert. Die Isolation der jeweiligen Immunkomplexe erfolgte durch Protein A/G-Agarose und die Analyse der Eluate mittels SDS-PAGE und Immunoblot wurde unter Verwendung des (A) C-17 Antikörpers gegen CRT sowie (B) des N1660 gegen NCT durchgeführt.

Die Analyse der Proteinkomplexe zeigt sowohl eine Calretikulin entsprechende Bande für die Isolation mittels anti-NCT-Antikörper, als auch eine mit dem Molekulargewicht von Nicastrin hinsichtlich der Präzipitation mit anti-CRT-Antikörper, während die Spuren der Negativkontrollen (IgG) jeweils frei bleiben (Abb. 4.32, S. 124). Diese positive Co-Immunpräzipitation von Calretikulin und Nicastrin lässt auf eine Interaktion der beiden Proteine schließen. Die Analyse der Immunkomplexe hinsichtlich einer CRT/APH-1 bzw. CRT/PEN-2 Interaktion zeigt in keinem Fall eine Bande des erwarteten, der jeweiligen Proteine entsprechenden Molekulargewichts (nicht gezeigt). Demnach kann auf diese Weise keine Interaktion des Chaperons mit APH-1 sowie PEN-2 nachgewiesen werden.

4.1.3.10 Charakterisierung der Interaktion von CRT und NCT durch Pulldown-Untersuchungen

Zur Charakterisierung der Bindung von NCT und CRT bezüglich der beteiligten CRT Domäne wurden GST-Proteine, eingeschlossen des CRT-Gesamtproteins, der NP-, der P- und der C-Domäne sowie GST allein, mit der Membranfraktion von HEK/PS1/SW/WT23-Zellen (Kap. 2.6, S. 33) inkubiert, die Proteinkomplexe mittels Glutathion-Sepharose isoliert und im Hinblick auf NCT, sowie APH-1 und PEN-2 analysiert (Abb. 4.33, S. 125).

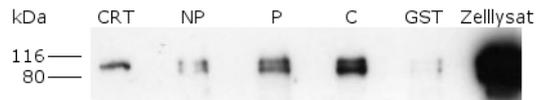


Abb. 4.33: Analyse der *pull-down*-Untersuchung mit den GST-CRT-Proteine und NCT

Lösliche Extrakte der Membranfraktionen von HEK PS1 SW WT23-Zellen wurden mit den GST-Fusionsproteinen CRT, NP-, P- und C-Domäne sowie GST allein als Negativkontrolle inkubiert. Die Proteinkomplexe wurden mittels GST-Sepharose isoliert und unter Verwendung des 1660 anti-NCT-Antikörpers analysiert. Als Positivkontrolle diente das Zellylsat der verwendeten HEK-Zellen.

Die Analysen bezüglich einer Interaktion der GST-CRT-Fusionsproteine und APH-1 bzw. PEN-2 zeigen keine Banden mit den entsprechenden Molekulargewichten der Proteine (nicht gezeigt), so dass man davon ausgehen kann, dass hier keine Bindung besteht. Die Analyse der Proteinkomplexe mit anti-NCT-Antikörper lässt jedoch Banden im Bereich von ~ 100 kDa in den Spuren aller Fusionsproteine erkennen, während die der Negativkontrolle keine dergleichen aufweist (Abb. 4.33, S. 125). Während in der Spur des CRT-Gesamtproteins nur eine Bande zu erkennen ist, sind es in den Spuren der NP- (schwach), P- und C-Domäne Doppelbanden. Aufgrund der geringeren Signalintensität der Bande der NP-Spur scheint CRT mit der P- und der C-Domäne an zwei Formen von NCT, die möglicherweise unterschiedlichen Glykosylierungsstufen entsprechen, zu binden. Die mit der CRT-Gesamtprotein-assoziierte NCT-Form scheint nur die höher-molekulare zu sein.

4.1.4 Analyse eines Einflusses von CRT auf die γ -Spaltung von APP

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse, d.h. wenn Calretikulin sowohl mit dem Amyloid Vorläufer Protein als auch mit der γ -Sekretase interagiert, ergibt sich die Frage nach einer möglichen Beeinflussung der Prozessierung von APP durch CRT. Helen Strekalova hat im Rahmen ihrer Arbeit (nicht publiziert) die $A\beta$ -Konzentration im Medium von zuvor mit unterschiedlichen CRT-Konstrukten transfizierten CHO/APP-Zellen (Tab. 2.6, S. 33) bestimmt. Demnach verringert eine Transfektion des Gesamtproteins die extrazelluläre Konzentration des Amyloid-peptids, während die Transfektion der einzelnen CRT-P-Domäne die $A\beta$ -Konzentration, besonders der $A\beta_{40}$ -Isoform, erhöht. Diese Veränderung der $A\beta$ -Konzentration könnte auf den Einfluss von CRT an der γ -Spaltung von APP zurückzuführen sein, vorausgesetzt die Zelloberflächenkonzentration des Zelladhäsionsproteins bleibt unabhängig der Transfektion konstant.

4.1.4.1 Analyse der Zelloberflächenkonzentration von APP mittels Oberflächenbiotinylierung

Um zu untersuchen, ob es sich bei der von Helen Strekalova ermittelten erhöhten Konzentration der $A\beta$ -Isoform in Abhängigkeit einer Transfektion der CRT-P-Domäne um eine wirkliche

Steigerung der $A\beta$ -Konzentration oder um eine Folge von durch die Transfektion der Domäne ausgelösten ER-Stress handelt, wurden mit APP695 stabil transfizierten CHO-Zellen (CHO/APP695, Kap. 2.6, S. 33) verwendet. CHO/APP695-Zellen wurden transient mit dem CRT-Gesamtprotein, der CRT-NP-, CRT-N-, CRT-P-Domäne, und dem leeren Vektor als Negativkontrolle transfiziert, eine Oberflächenbiotinylierung angeschlossen und die mit Biotin isolierten Proteine hinsichtlich APP analysiert (Abb. 4.34, S. 126).

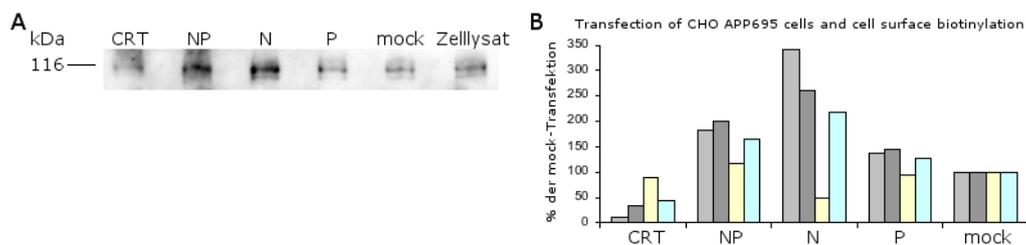


Abb. 4.34: Analyse der APP-Oberflächenkonzentration mittels Oberflächenbiotinylierung
CHO/APP695-Zellen wurden mit den CRT-Konstrukten CRT, NP, N, P sowie dem pcDNA3-Vektor (mock) als Negativkontrolle transfiziert und nach Oberflächenbiotinylierung mittels Immunoblot unter Verwendung des 22C11 anti-APP Antikörpers analysiert. (A) zeigt den Film, der unter (B) mit Hilfe des Tina-Programms ausgewertet wurde und als dunkelgraues Balkendiagramm dargestellt ist. Während die beiden Grautöne sowie die helle Farbe unterschiedliche Experimente repräsentieren, stellen die grünen Balken (rechte Balken) den jeweiligen Mittelwert dar.

Anhand der graphischen Darstellung der einzelnen Experimente lässt sich erkennen, dass zwar kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden konnte, wie besonders durch die große Abweichung der Werte der CRT-N-Domäne (jeweils die ersten drei Balken, grau/hell) gezeigt wird, der Mittelwert (jeweils rechter Balken, grün) jedoch eine für CRT geringere sowie für die einzelnen CRT-Domänen erhöhte APP-Konzentration an der Zelloberfläche im Vergleich mit der GST-Kontrolle aufweist. Da diese Methode nur eine Tendenz des Vorkommens von APP an der Zelloberfläche in Abhängigkeit von der CRT-Transfektion aufzeigt, aber keine definierte Aussage über die mögliche Beeinflussung der APP-Prozessierung durch CRT zulässt, wurde dieses Ergebnis anhand einer weiteren Methode überprüft.

4.1.4.2 Analyse der Zelloberflächenkonzentration von APP mittels Durchflusszytometrie

Die Analyse mittels des Durchflusszytometers erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Frey (BCII, Uni Bielefeld). Zu Beginn der Versuchsreihe musste ein für die Durchflusszytometrie der CHO/APP695-Zellen (Kap. 2.6, S. 33) geeigneter Primärantikörper gefunden und dessen optimale Verdünnung bestimmt werden, wobei der 22C11 sowie der 22734 anti-APP Antikörper zur Auswahl standen. Die Zellen wurden mit dem entsprechenden Primärantikörper in unterschiedlichen Verdünnungsstufen sowie anschließend mit dem Cy2-markierten Sekundärantikörper als auch nur mit diesem (Negativkontrolle) inkubiert und mittels Durchflusszytometer analysiert. Die Messungen bezüglich der Ermittlung des geeigneten Primärantikörpers sowie der entsprechenden Verdünnung zeigten, dass ausschließlich der 22734 anti-APP-Antikörper

mit einer Verdünnung von 1:25 eingesetzt werden konnte (nicht gezeigt). Anschließend wurde die Auswirkung der Transfektion des CRT-Gesamtproteins im Vergleich mit der CRT-P-Domäne anhand dieser Versuchsbedingungen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 4.35, S. 127).

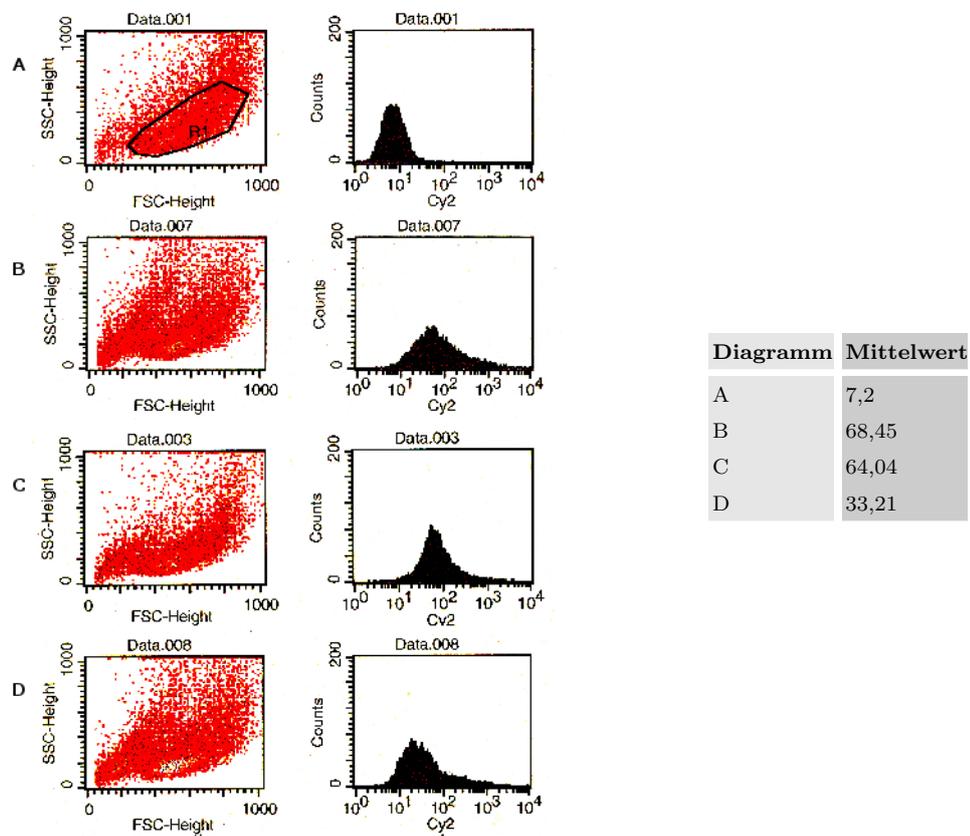


Abb. 4.35: Analyse der APP-Oberflächenkonzentration mittels Durchflusszytometrie

CHO/APP695-Zellen wurden nach mock-Transfektion (A)/(B) sowie Transfektion des CRT-Gesamtproteins (C) und der CRT-P-Domäne (D) mit Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper (A) sowie zusätzlich mit dem 22734 anti-APP-Antikörper mit (B)-(D) inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression von APP analysiert. In den jeweils linken Diagrammen ist das Seitwärtsstreulicht (SSC, *Sidewards Scatter*) gegen das Vorwärtsstreulicht ((FSC, Forward Scatter) aufgetragen und stellt somit Zellen unterschiedlicher Größe und Granularität an verschiedenen Stellen dar. Das die Population der lebenden Zellen umfassende Messfenster (R1) beschreibt den Bereich der zu analysierenden Zellen, deren Fluoreszenzintensität im rechten Diagramm gegen die Verteilung der Anzahl der gezählten Zellen aufgetragen ist (*counts*). Diese ist proportional zur Oberflächenmarkierung des durch den Primärantikörper erkannten Proteins (APP) und u.a. durch mittels des zugehörigen Programms berechneten Mittelwert (Tabelle) beschrieben. Eine Messung umfasste die Auswertung jeweils 10000 Zellen.

Anhand der linken Diagramme ist zu erkennen, dass die Population der lebenden Zellen (Messfenster, R1) immer größer als die der toten ist, obwohl eine Transfektion sowohl von CRT als auch der CRT-P-Domäne die Verteilung in Richtung der toten Zellen verschoben hat (Abb. 4.35, S. 127(C)/(D)). Daraus ist ersichtlich, dass sich die Transfektion der CRT-Konstrukte gleichermaßen negativ auf die CHO/APP695-Zellen auswirkt, während die Transfektion nur des Vektors keine diesbezüglichen Folgen erkennen lässt (Abb. 4.35, S. 127(B)). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei die Transfektionseffizienz mit GFP überprüft worden ist und bezüglich der drei gezeigten Transfektionen in etwa gleich

war (nicht gezeigt). Während die Analyse der Negativkontrolle einen Fluoreszenz-bezogenen Mittelwert von etwa 7 zeigt, liegen die der Durchflusszytometrischen Untersuchung nach mock- sowie CRT-Transfektion bei 68 bzw. 64 und der Mittelwert nach Transfektion der CRT-P-Domäne bei ca. 33. Demnach verändert eine Überexpression des CRT-Gesamtproteins die APP-Oberflächenkonzentration nicht, während die Transfektion nur der CRT-P-Domäne das Vorkommen von APP an der Zelloberfläche um die Hälfte verringert. Das bedeutet, dass die von Helen Strelakova ermittelten unterschiedlichen $A\beta$ -Konzentrationen nach den jeweiligen Transfektionen keine Folge von ER-Stress, sondern eine reale Veränderung der APP-Prossierung ist. Mit diesem Ergebnis steht die Durchflusszytometrieanalyse genau entgegengesetzt zu der Tendenz der mit dem gleichen Ziel durchgeführten Oberflächenbiotinylierungsexperimenten. Aufgrund dieser unterschiedlichen Resultate kann keine genaue Aussage über eine Beeinflussung der APP-Oberflächenexpression durch Transfektion der verschiedenen CRT-Konstrukte gemacht werden. Es wird jedoch aufgrund der reproduzierbaren Resultate der durchflusszytometrischen Analysen sowie Anzahl der durchgeführten Kontrollen mehr auf diese Methode als die der Oberflächebiotinylierung vertraut.

Um der Frage nach einer möglichen Beteiligung von Calretikulin an der γ -Spaltung von APP weiter nachzugehen, wurde der Einfluss des Chaperons auf die Aktivität des Enzymkomplexes untersucht.

4.1.4.3 γ -Sekretase-Aktivitätsbestimmung mittels ELISA

Zuerst wurde die γ -Sekretaseaktivität in mit Presenilin1 und APPSW stabil sowie CRT transient transfizierten HEK-Zellen (KEK/PS1/SW/WT23, Tab. 2.6, S. 33) mittels eines *Kits* bestimmt. Die HEK/PS1/SW/WT23-Zellen wurden mit den CRT-Konstrukten CRT, N-, P-Domäne sowie dem Leervektor als Negativkontrolle transfiziert, nach einem Tag ly-siert und durch Anbieten eines entsprechenden Substrats mittels meßbarer Farbreaktion auf ihre Sekretaseaktivität hin untersucht. Die Auswertung der Daten zeigte keine signifikante Veränderung der Spaltaktivität an (nicht gezeigt). Es konnte eine Tendenz zur Steigerung der $A\beta$ -Konzentration nach Transfektion der CRT-P-Domäne sowie der CRT-N-Domäne in geringerem Ausmaß festgestellt werden.

4.1.4.4 *in vitro*- γ -Sekretase-Aktivitätsuntersuchung

Gemäß eines von Prof. Steiner (LMU, München) zur Verfügung gestellten Protokolls wurde die γ -Sekretaseaktivität in Abhängigkeit von CRT mit einer weiteren Methode in zwei Variationen analysiert. Es wurden ebenfalls HEK/PS1/SW-WT23-Zellen (Tab. 2.6, S. 33) eingesetzt. Während Variante A eine PS1-Immünpräzipitation (IP) mit nachfolgender, in den geeigneten Versuchsbedingungen stattfindender Enzymreaktion beschreibt, kommt Variante

B ohne die IP aus. Der Einfluss von Calretikulin wird durch die jeweils einzeln der Enzymreaktion beigefügten GST-Proteine, eingeschlossen CRT, NP, P, C und nur GST als Negativkontrolle, vermittelt. Die Analyse der *in vitro*- γ -Sekretase-Aktivitätsuntersuchung zeigt jedoch kein eindeutiges Ergebnis (nicht gezeigt). Es besteht wieder lediglich die Tendenz zur Steigerung der $A\beta$ -Konzentration nach Zugabe der GST-NP- sowie GST-P-Proteine im Vergleich mit der GST-Negativkontrolle, wobei die CRT-P-Domäne den größten Einfluss auf die Sekretaseaktivität ausübt. Das GST-CRT-Protein scheint keinen oder nur einen gering reduzierenden Einfluss auf die Komplexaktivität zu haben. Demnach besteht die gleiche Tendenz wie mit der γ -Sekretase-Aktivitätsbestimmung mittels ELISA erhaltenen Ergebnisse.

Zusammengefasst kann man keine eindeutige Aussage bezüglich eines Einflusses von CRT bzw. der einzelnen Domänen auf die γ -Sekretase-vermittelte APP-Prozessierung treffen, sondern nur die Vermutung anstellen, dass die CRT-P-Domäne die Produktion des $A\beta$ -Peptids steigert, während das CRT-Gesamtprotein die Konzentration von $A\beta$ nicht oder nur leicht verringert. Vielleicht wirkt sich aber auch, andersherum gesehen, eine veränderte Presenilin-komplex-Aktivität auf die Expression und Lokalisation von Calretikulin aus.

4.1.4.5 Analyse des PS1-Einflusses auf CRT

Zur Untersuchung, ob sich eine veränderte Aktivität von PS1 bzw. der γ -Sekretase auf das Vorkommen und die Verteilung von Calretikulin auswirkt, wurde das CRT-Zelloberflächenvorkommen sowie die -Gesamtkonzentration in Abhängigkeit der stabilen Überexpression eines aktiven sowie inaktiven γ -Sekretasekomplexes bestimmt. HEK/PS1/SW/WT23- und solche im aktiven Zentrum von Presenilin 1-mutierte Zellen (D385N-10, Tab. 2.6, S. 33) wurden Oberflächen-biotinyliert, die mit Biotin-markierten Proteine mittels Streptavidin isoliert und mittels Immunoblot hinsichtlich des Vorkommens von Calretikulin analysiert (Kap. 4.36, S. 129).

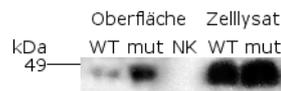


Abb. 4.36: Analyse der CRT-Expression in Abhängigkeit der PS1-Aktivität

Immunoblot-Analyse der mittels Oberflächenbiotinylierung isolierten sowie der im Gesamtlysate von HEK/PS1/SW-WT23 (WT) und HEK/PS1/SW/D385N-10 (mut) enthaltenden Proteine unter Verwendung des C-17 anti-CRT-Antikörpers.

Die Analyse sowohl der Oberflächenkonzentration als auch der Gesamtkonzentration von Calretikulin zeigt einen deutlichen Unterschied der beiden verwendeten Zelllinien. Während das Gesamtvorkommen des Proteins im Vergleich zu der CRT-Zelloberflächenkonzentration bezüglich beider Zellen größer ist, sind jedoch sowohl die Ektocalretikulin-Konzentration als auch die des Gesamtproteins der WT-Zellen entsprechend geringer, als die der Zellen mit mutiertem Presenilin 1. Die Auswertung der Signalintensität der Banden dieser nur einmal reproduzierten und damit noch sehr vorläufigen Daten stellt genau diese Verteilung dar (Kap. 4.37, S. 130).

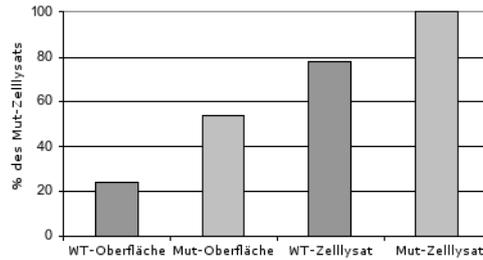


Abb. 4.37: Auswertung der Analyse der CRT-Expression in Abhängigkeit der PS1-Aktivität

Die Auswertung der Immunoblot-Analyse der CRT-Expression der WT- sowie PS1-mutierten-HEK/PS1/SW-Zellen (WT/Mut) erfolgte mittels des Tina Programms und Microsoft Excel. Das Diagramm stellt die Bandenintensität und somit CRT-Konzentration der entsprechenden Proben in Bezug auf den größten Wert da (HEK/PS1/SW/D385N-10 (Mut), Gesamtkonzentration).

Wie zu erwarten, ist die CRT-Gesamtkonzentration jeweils höher (WT, ~80; mut, 100) als die des Ektocalretikulins (WT, 23; mut, 55), wobei die WT-Zellen jedoch in beiden Fällen eine entsprechend geringere CRT-Konzentration aufweisen. Demnach scheint in Zellen, die einen inaktiven γ -Sekretasekomplex überexprimieren, mehr Calretikulin insgesamt und an der Zelloberfläche vorhanden zu sein, wobei die Differenz des Oberflächenvorkommens (WT/mut; 1/2,4) etwa doppelt so groß ist als die der gesamten Zellen (WT/mut; 1/1,25). Da es sich bei CRT um ein lösliches Protein handelt, muss das mittels Oberflächenbiotinylierung isolierte ein mit einem oder mehreren anderen Proteinen komplexiertes und somit indirekt präzipitiertes Ektocalretikulin sein. Es bleibt trotzdem die Frage, ob CRT dabei an APP, PS1, beide oder ein anderes Protein gebunden war und der Einfluss des Proteins auf die Sekretaseaktivität ein direkter oder ein über weitere Komponenten vermittelter ist.

Unabhängig dessen ist nicht geklärt, was für eine Rolle Calretikulin bei der γ -Sekretase-vermittelten-Spaltung spielt. Es könnte ausschließlich an der APP-bezogenen Prozessierung beteiligt sein oder aber auch eine generelle Funktion unabhängig des Substrats besitzen. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde eine mögliche Beziehung von CRT zu einem weiteren γ -Sekretasesubstrat, dem Zelladhäsionsmolekül L1, untersucht.

4.1.4.6 Überprüfen einer Interaktion von CRT und L1 mittels Co-Immünpräzipitation

Lösliche Gesamthomogenatextrakte von WT-Mäusen wurden mit anti-L1-Antikörper sowie unspezifischen IgG als Negativkontrolle inkubiert und die isolierten Immunkomplexe mittels Immunoblot unter Verwendung des anti-CRT-Antikörpers analysiert. Als Positivkontrolle diente ein löslicher Extrakt des Mausgehirnhomogenats (Abb. 4.38, S. 131).

Die Analyse der Immunpräzipitate zeigt eine Bande des CRT-entsprechenden Molekulargewichts (~50kDa) in der Spur der L1-Präzipitation sowie der der Positivkontrolle, während keine Bande in der Spur der Negativkontrolle zu erkennen ist. Demnach kann Calretikulin zusammen mit L1 co-isoliert werden. Da diese Interaktion jedoch Oligosaccharid-vermittelt bzw. der Chaperonfunktion von CRT zugeteilt werden kann, bleibt unklar, ob CRT auch an das von der γ -Sekretase prozessierte, zuvor α geschnittene L1-Fragment bindet.

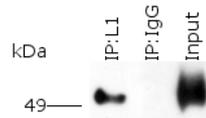


Abb. 4.38: Analyse der Immunpräzipitation von L1 und CRT

Immunoblot-Analyse der mit polyklonalem L1 sowie unspezifischen Kaninchen-IgG (Negativkontrolle) präzipitierten Proteine durch Immunfärbung mit dem anti-CRT C-17-Antikörper im Vergleich mit dem eingesetzten Mausgehirnextrakt.

4.1.4.7 Charakterisierung der Interaktion von CRT und L1 mittels Co-Immunpräzipitation

Möglicherweise wird der Anteil von komplexierten L1-C-terminalen Fragmenten unter Verwendung eines intrazellulär-gerichteten anti-L1-Antikörpers erhöht. Eine mögliche Co-Isolation von CRT würde demnach die Vermutung stützen, dass das Chaperon auch mit dem α -geschnittenen L1-Fragment assoziiert ist. Nachdem die Co-Immunpräzipitation von L1 und CRT unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antikörpers eine Interaktion der beiden Proteine zeigen konnte, wurde das Experiment mit dem Antikörper, der gegen die intrazelluläre Domäne von L1 gerichtet ist (L1-ICD), wiederholt. Da dieser ausschließlich das humane Zelladhäsionsmolekül erkennt, wurde der Versuch unter Verwendung einer humanen Zelllinie, die darüber hinaus ausreichend L1 exprimiert, durchgeführt. Lösliche Extrakte dieser SY5Y-Zellen wurden mit anti-L1-ICD sowie dem unkonjugierten IgG als Negativkontrolle inkubiert. Die Isolation der Immunkomplexe erfolgte durch Protein A/G-Agarose und die anschließende Analyse mittels Immunoblot sowie dem anti-CRT-Antikörper. Als Positivkontrolle diente eine Probe des löslichen SY5Y-Extrakts (Abb. 4.39, S. 131).

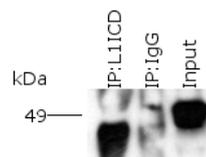


Abb. 4.39: Charakterisierung der CRT/L1-Interaktion mittels Co-Immunpräzipitation

Lösliche Extrakte von SY5Y-Zellen wurden mit Antikörper gegen die L1-intrazelluläre Domäne (L1-ICD, 172-R) sowie unkonjugiertem Maus-IgG inkubiert. Die Isolation der Immunkomplexe erfolgte mittels Protein A/G-Agarose und die Analyse der eluierten Proteine mit Hilfe von Immunoblot unter Verwendung des anti-CRT C-17-Antikörpers. Als Positivkontrolle wurde der lösliche Zellextrakt eingesetzt.

Die Analyse der Immunkomplexe zeigt eine Bande bei ca. 50kDa in der Spur des Inputs und in der Spur der Co-IP mit L1-ICD-Antikörper eine Bande bei \sim 47kDa, jedoch keine Banden der entsprechenden Molekulargewichte in der Spur der Negativkontrolle. Die zuerst bestehende Annahme, dass es sich bei der Bande in der Spur der L1-ICD-Co-Immunpräzipitation um die der schweren Antikörperkette handelt, wurde aufgrund des fehlenden Auftretens einer entsprechenden Bande in der Spur der Negativkontrolle verworfen. Demnach handelt es sich wahrscheinlich um einen, im folgenden Kapitel beschriebenen *Shift* des Molekulargewichts (Kap. 4.2.1, S. 134), der durch verschiedene Gründe auftreten kann, oder ein Artefakt des

verwendeten SDS-Gels darstellt. Daher ist davon auszugehen, dass CRT auch mit dem L1-ICD-Antikörper co-isoliert werden kann.

Um eindeutig zu klären, ob Calretikulin an das membranständige von der γ -Sekretase-gespaltene L1-Fragment (L1-30kDa), sowie die intrazelluläre Domäne des Zelladhäsionsmolekül (L1-ICD) bindet, wurden diese Proteine jeweils mit einem His- sowie Flag-Tag kloniert, SY5Y-Zellen transient mit diesen Konstrukten transfiziert und nach Überprüfen der Transfektion wieder mittels Co-Immunpräzipitation durch den anti-His-Antikörper auf eine Co-Isolation von CRT hin untersucht (nicht gezeigt). Die Analyse der Immunpräzipitate zeigt keine Banden des Molekulargewichts von CRT, ausgenommen in der Spur der Positivkontrolle. Es treten jedoch hochmolekulare Banden (~ 200 kDa) auf, die nicht in den Spuren der Negativkontrollen zu sehen sind und bisher nicht erklärt werden können. Daraus lässt sich schließen, dass CRT sowohl mit dem polyklonalen L1- als auch vermutlich mit dem L1-ICD-Antikörper co-präzipitiert werden kann und eine Bindung an die L1-Fragmente L1-30kDa sowie L1-ICD noch fraglich ist. Demnach scheint eine Beteiligung von Calretikulin an der γ -Sekretase-vermittelten L1-Prozessierung nicht unwahrscheinlich. Diese Annahme wurde durch weitere Versuche überprüft.

4.1.4.8 Analyse eines CRT-Einflusses auf die Expression und Lokalisation von L1

Bei den folgenden beiden Versuchen handelt es sich um noch vorläufige, nur einmal reproduzierte Ergebnisse, die jedoch bereits eine Tendenz erkennen lassen. Zur Überprüfung, ob CRT einen Einfluss auf die Verteilung und das Vorkommen von L1 nimmt, wurden humane SY5Y-Zellen mit CRT sowie dem Leervektor als Negativkontrolle transient transfiziert und anschließend mittels Oberflächenbiotinylierung und Immunoblot der präzipitierten Proteine sowie des L1-Gesamtvorkommens und der löslichen L1-Form (180kDa), die ins Medium abgegeben wurden, analysiert (Abb. 4.40, S. 132). Dabei sind immer entsprechend gleiche Proteinmengen der jeweiligen Paare (CRT/Vektor) auf das SDS-Gel aufgetragen worden.

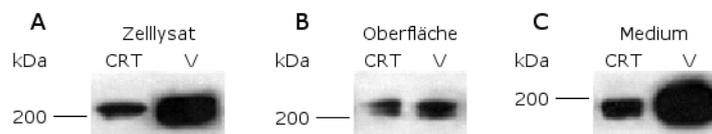


Abb. 4.40: Analyse des entsprechenden L1-Vorkommens in Abhängigkeit zu CRT

Lösliche Extrakte von mit CRT sowie pcDNA3 (V) transient transfizierter SY5Y-Zellen wurden nach erfolgter Oberflächenbiotinylierung (B, Oberfläche), ohne diese (A, Zellysat) sowie der Kulturüberstand (C, Medium) mittels Immunoblot unter Verwendung des anti-L1-Antikörpers (Abcam) analysiert, wobei immer gleiche Proteinmengen der jeweiligen Kompartimente auf das SDS-Gel aufgetragen worden sind.

Die Analyse des L1-Vorkommens mittels Immunoblot zeigt eindeutig schwächere Banden in den Spuren der CRT-transfizierten Zellen im Vergleich mit der Vektorkontrolle bezüglich des Gesamtlysates und des Kulturüberstandes. Die Signalintensität der CRT-zugehörigen Bande in der Spur der Oberflächen-biotinylierten Zellen ist geringfügig schwächer im Vergleich mit den pcDNA3-transfizierten Zellen. Demnach scheint durch eine Überexpression von Calretikulin

die Gesamtmenge an L1 verringert und es wird auch weniger L1 in den Überstand abgegeben, während die Zelloberflächenkonzentration nur leicht geringer ist.

Um diese Tendenz zu überprüfen erfolgte die Analyse des L1-Vorkommens in Abhängigkeit von CRT noch mittels einer weiteren Zelllinie. Die freundlicherweise von Prof. Michalak (Uni Alberta) zur Verfügung gestellten K415/V7-Zellen sind murine Fibrinoblasten, wie auch die Calretikulin-defizienten K425/V20-Zellen. Bei der Zelllinie K425/NP handelt es um mit der CRT-NP-Domäne stabil transfizierten K425V/20-Zellen. Lösliche Extrakte der jeweiligen Zelllysate wurden mittels Immunoblot auf die Expression von L1 hin untersucht (Abb. 4.41, S. 133). Eine Oberflächenbiotinylierung hat wahrscheinlich aufgrund einer zu geringen Proteinmenge zu keinem Ergebnis geführt, während auch die Konzentration von L1 im Kulturüberstand nicht nachweisbar war (nicht gezeigt).

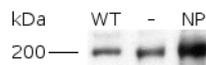


Abb. 4.41: Analyse der L1-Gesamtkonzentration in Abhängigkeit von CRT in K-Zellen

Lösliche Extrakte von K415/V7 (WT)-, K425/V20 (CRT defizient, -)- und K425/NP (NP)-Zellen wurden mittels Immunoblot unter Verwendung des anti-L1555-Antikörpers analysiert.

Die Analyse der L1-Gesamtkonzentration der K-Zellen zeigt in allen Spuren eine Bande des L1-entsprechenden Molekulargewichtes. Während die Signalintensität der Bande in der Spur der CRT-NP-transfizierten Zellen wesentlich intensiver als die der anderen beiden ist (WT, CRT defizient), besteht zwischen denen nur ein geringer Unterschied in der Hinsicht, dass die der CRT-defizienten Zellen eine etwas stärkere Signalintensität der entsprechenden Bande aufweist. Daraus lässt sich schließen, dass die L1-Gesamtkonzentration der CRT-enthaltenen WT-Zellen etwas geringer ist im Vergleich mit K-Zellen, die kein CRT exprimieren. Beide Zelllinien weisen jedoch deutlich weniger L1 auf, als die mit der CRT-NP-Domäne retransfizierten Zellen. Demnach bestätigt sich die Tendenz des vorherigen Versuches für die Gesamtproteinkonzentration. In Bezug auf einzelne Domänen sowie andere Kompartimente, wie die Zelloberfläche oder der Zellkulturüberstand, kann keine Aussage gemacht werden.

4.2 Prozessierung der Zelladhäsionsmoleküle APP und L1

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Spaltung der Fc-Proteine APP und L1 im Vergleich durch die Metalloproteasen ADAM8, ADAM9 sowie die Gelatinasen (Tab. 2.16, S. 43) gezeigt.

4.2.1 ADAM vermittelte Spaltung

Es wurden zwei Vertreter, mADAM8 und mADAM9 (Tab. 2.16, S. 43), der auch die α -Sekretase repräsentierenden ADAMs im Hinblick auf eine Spaltung von APP und L1 analysiert. Beide Proteasen wurden jeweils mit den Fc-Proteinen, der APP- sowie der L1-Ektodomäne, inkubiert und nach 2 Stunden auf die entstandenen Reaktionsprodukte hin analysiert. (Kap. 4.42, S. 134).

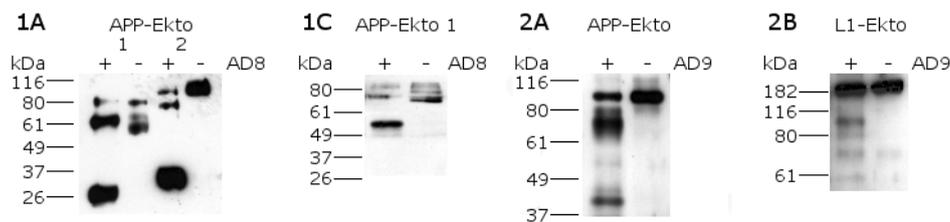


Abb. 4.42: Analyse der ADAM8- und ADAM9-vermittelten Spaltung von APP und L1

Die entsprechenden Fc-Proteine APP- (A)/(C) und L1-Ektodomäne (B) (+) wurden mit ADAM8 (1) und ADAM9 (2) und ohne diese (-) für eine Zeit von zwei Stunden inkubiert. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mittels Immunoblot unter Verwendung des anti-Fc- (A)/(B) sowie des polyklonalen anti-APP-Antikörpers (C). Die Zahlen unter 1A stellen zwei verschiedene Chargen des aufgereinigten APP-Fc-Proteins dar.

Die Analyse der Reaktionsprodukte nach ADAM8-vermittelter Spaltung des APP-Ekto-Fc-Proteins zeigt einen deutlichen *Shift* der Banden in Abhängigkeit der jeweiligen Probe (Abb. 4.42, S. 134). Die berechnete Größe des Proteins liegt bei knapp 80kDa, tritt aber, die zweite Charge betreffend, bei einem deutlich größeren Molekulargewicht auf. Auch die durch Enzyminkubation produzierten Spaltprodukte weisen wahrscheinlich aufgrund des Fc-*Tags* einen dementsprechenden *Shift* von etwa 15kDa auf. Während die Spur der Probe ohne Enzym keine oder nur Degradation-bedingte Banden zeigt, sind in der Spur mit ADAM8 eine Bande im Bereich von 55-60kDa und eine bei 26kDa zu erkennen. Das kleine Fragment wird nicht von spezifischen anti-APP Antikörpern erkannt und entspricht demnach dem Fc-*Tag*. Dagegen kann das etwa 55kDa Spaltprodukt mit dem polyklonalen Antikörper gegen APP sichtbar gemacht werden und somit dem verbleibenden Teil von APP, der α -geschnittenen Ektodomäne, entsprechen. Bei der vom anti-Fc-Antikörper erkannten Bande bei etwa 60kDa kann es sich aufgrund des fehlenden *Tags* nicht um die Ektodomäne von APP handeln, sondern entspricht vielleicht einem Degradationsprodukt, da eine entsprechende Bande auch in der Spur der Probe ohne MMP-9 bei längerer Exposition des Films auftaucht (nicht gezeigt). Eine Prozessierung des Zelladhäsionsproteins L1 durch ADAM8 kann nicht nachgewiesen werden.

Die Analyse der Produkte nach der Proteolyse der Fc-Proteine durch ADAM9 lässt für die extrazelluläre Domäne von APP unter Berücksichtigung des bereits beschriebenen Molekulargewichts-*Shifts* ein der ADAM8-Spaltung ähnliches Spaltmuster mit zwei Banden bei etwa 26kDa und 60kDa erkennen, von denen nur die größere von spezifischem anti-APP-Antikörper erkannt wird und das kleine Fragment demnach wieder dem Fc-*Tag* entspricht. Die diesbezügliche Prozessierung der L1-Ektodomäne ergibt nur eine spezifische Bande im Bereich von 100kDa, die sowohl von dem anti-Fc- als auch von dem 555-anti-L1-Antikörper erkannt wird und demnach dem von Ina Kalus postulierten, membranständigen L1-80kDa Fragment entspricht (Kalus, 2005).

4.2.2 Gelatinasespaltung

Während sowohl für APP (Talamagas et al., 2007) als auch für L1 eine MMP-9 (Kalus, 2005) vermittelte Spaltung vermutet wird, ist hinsichtlich MMP-2 keine diesbezügliche Proteaseaktivität bekannt. Im Gegensatz dazu enthält die Ektodomäne von APP eine Region, die als MMP-2-Inhibitor fungiert (Higashi & Miyazaki, 2008). Vor Beginn der Versuchsreihe musste die Aktivität der Gelatinasen mittels Zymographie überprüft und gegebenenfalls entsprechend induziert werden. Die aufgereinigte MMP-9 (Kap. 4.42, S. 134) lag in einem aktiven Zustand vor. MMP-2, ebenfalls nicht kommerziell (Kap. 4.42, S. 134), musste jedoch durch Inkubation mit APMA (*p-Amino phenylmercuric acetate*) von der Prodomäne befreit und somit aktiviert werden (Kap. 4.43, S. 135).



Abb. 4.43: Überprüfung der Gelatinaseaktivität

Zymographische Analyse der Aktivität von (A) MMP-2, vor und nach APMA-Inkubation (aktiv), und von (B) MMP-9

Die zymographische Analyse von MMP-2 zeigt nach APMA-Inkubation eine deutliche Bande im Bereich von 63kDa, die vor der Aktivierung des Enzyms nicht zu sehen war. Sie steht für die aktive MMP-2-Form und unterscheidet sich von dem 72kDa Proenzym durch Fehlen der Prodomäne. Die Zymographie der bereits aktiv vorliegenden MMP-9 stellt ebenfalls die Bande des aktiven Enzyms (~83kDa) dar, während die übrigen Banden wahrscheinlich Degradationsprodukte repräsentieren. Die aktivierten Gelatinasen wurden anschließend mit den jeweiligen Fc-Proteinen, eingeschlossen der APP- und L1-Ektodomäne sowie L1-Ig1-6- und L1-Fn1-5- Domänen, inkubiert. Nach Abbruch der Reaktion erfolgte die Analyse der Produkte mittels Immunoblot unter Verwendung der entsprechenden Antikörper (Kap. 4.44, S. 136).

Die Analyse der MMP-9 vermittelten Spaltung von APP zeigt in der Spur nach Enzyminkubation zwei Banden, von denen nur die obere von dem poly-anti-APP-Antikörper erkannt

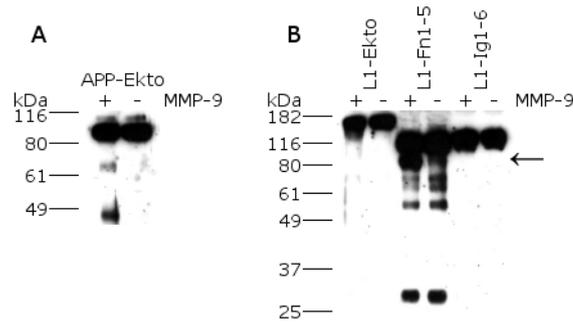


Abb. 4.44: Analyse der MMP-9 vermittelten Spaltung von APP und L1

Die entsprechenden Fc-Proteine (A) APP-Ektodomäne und (B) L1-Ektodomäne sowie L1-Fn1-5 und L1-Ig1-6 wurden sowohl mit (+) als auch ohne (-) aktiver MMP-9 für eine Zeit von sechs Stunden inkubiert und die Reaktionsprodukte nach Abbruch der Reaktion mittels Immunoblot unter Verwendung des anti-Fc-Antikörpers analysiert.

wird (nicht gezeigt). Da das gesamte Protein eine theoretische Masse von ~ 50 kDa hinsichtlich der APP-Ektodomäne plus ~ 26 kDa für den Fc-Tag besitzt, es bezüglich dieser Untersuchung jedoch bei ca. 90 kDa auftritt, ist davon auszugehen, dass auch die übrigen Banden aufgrund des Tags einen, bereits oben erwähnten Shift durchlaufen haben. Demnach könnten die Produkte eine theoretische Masse von 55 kDa und etwa 30 kDa haben, wobei es sich bei dem kleinen vom anti-Fc-Antikörper erkannten Fragment um den α -geschnittenen Fc-Teil handelt und das etwa 55 kDa von spezifischen anti-APP-Antikörpern erkannte APP-Fragment der verbleibenden Ektodomäne von APP entsprechen könnte. Allerdings wird die entsprechende Bande auch von dem anti-Fc-Antikörper sichtbar gemacht und ist wieder bei längerer Exposition des Films auch in der Spur der zugehörigen Negativkontrolle zu erkennen. Daher wird bei dem etwa 55 kDa APP-Fragment eher ein Degradationsprodukt vermutet. Trotzdem bestätigen diese Ergebnisse die bereits publizierten Annahme, dass APP in einem der α -Spaltung-ähnlichen Prozess durch MMP-9 prozessiert wird.

Die Analyse der Produkte der L1-Fc-Proteine mittels MMP-9 lässt bezüglich der Ektodomäne sowie der Ig1-6-Domänen keine Spaltprodukte erkennen. Wiederum bei längerer Exposition des Films tritt eine 80 kDa große Bande in der Spur des mit Enzym inkubierten L1-Ekto-Fc-Proteins auf, die der in der Spur mit aktiver MMP-9 belassenen L1Fn1-5-Domäne entspricht (Pfeil). Die übrigen beiden zu sehenden Banden der Spuren dieses Fc-Proteins repräsentieren wahrscheinlich Degradationsprodukte. Diese 80 kDa-Bande wurde auch durch den 555 anti-L1-Antikörper, dessen Epitop zwischen der dritten und vierten Fn-Domäne liegt, erkannt. Dieses Ergebnis bestätigt das von Kalus bereits entdeckte L1-Spaltprodukt und die Lokalisation der MMP-9-Prozessierung innerhalb der Fn-Domänen (Kalus, 2005).

Es stellte sich nun die Frage nach der genauen Sequenz, zumal bereits Vermutungen über den definierten Ort der Spaltung sowie ein mögliches Motiv gemacht worden sind (Kalus, 2005). Daher wurde versucht dieses 80 kDa an den 555-L1-Antikörper bindende Protein mittels Co-Immünpräzipitationen aus Mausgehirnhomogenat und Myllin-angereicherten Fraktionen sowie durch Affinitätschromatographie unter Verwendung einer mit dem Antikörper gekoppelten Säule aufzureinigen und nach Auftrennung aus dem entsprechenden Coomassiegele zur

weiteren Analyse auszuschneiden (Abb. 4.45, S. 137).



Abb. 4.45: Analyse der Elutionsfraktion der 555-L1-Affinitätschromatographie

Die Analyse der durch Affinitätschromatographie mit dem 555-L1-Antikörper erhaltenen Elutionsfraktion (E) erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung im Vergleich zu der verwendeten Mausgehirnfraktion (I, Input)

Leider blieben alle Versuche bisher erfolglos. Es konnte zwar eine 80kDa Bande in der Spur der Elutionsfraktion nachgewiesen werden, jedoch war die enthaltene Proteinmenge zu gering, um eine Analyse mittels Edman-Abbau anzuschließen.

5 Diskussion

Die Diskussion gliedert sich in fünf Teile. Zunächst werden die Ergebnisse der Suche nach APP-Bindepartnern im Hinblick auf deren Funktion und der von APP sowohl physiologisch als auch bezüglich der Alzheimer-Krankheit diskutiert. Anhand der Ergebnisse der Kreatinkinase wird anschließend auf die zugrunde liegenden Methoden sowie mögliche Fehlerquellen des Ansatzes eingegangen.

Der dritte Teil dieses Kapitels behandelt die Interaktion von APP, CRT und dem γ -Sekretasekomplex sowie L1 und diskutiert eine mögliche generelle Rolle des Chaperons an dem Vorgang der Sekretase-vermittelten Spaltung.

Die Proteolyse der Zelladhäsionsmoleküle L1 und APP durch Metalloproteinasen im Vergleich an definierten Beispielen sowie deren daraus ersichtliche Möglichkeiten hinsichtlich eines Verständnisses noch ungeklärter Vorgänge bildet das Thema des vierten Kapitels des Diskussionsteils dieser Arbeit. Der letzte Teil beschäftigt sich mit der Relevanz der erhaltenen Ergebnisse für das Verständnis der Ursachen und der Therapie der Alzheimer-Krankheit.

5.1 Diskussion der möglichen Bindepartner von APP und der daraus ersichtlichen Funktionen

Das erste Ziel der Arbeit war die Identifikation neuer APP-Interaktionspartner, die im Bereich der γ -Spaltstelle binden und demnach vielleicht an dem Vorgang der APP-Proteolyse durch die γ -Sekretase und der Entstehung des $A\beta$ -Peptids beteiligt sind. Es wurden mittels eines die γ -Spaltstelle repräsentierenden Antikörpers und der eingesetzten Methoden, eingeschlossen Affinitätschromatographie und massenspektrometrischer Analyse, insgesamt fünfzehn mögliche APP-Bindepartner erhalten. Die bereits in dem Ergebnisteil eingeführten Proteine (Kap. 4.1.1.5, S. 101), ihre Größe sowie die Lokalisation und Funktionen sind in der Tabelle (Tab. 5.1, S. 139) noch einmal kurz aufgeführt.

Ergebnis der Sequenzanalyse	Lokalisation/Funktion
C1q-Bindeprotein (C1qR, Ektocalreticulin)	Zelloberflächenform von CRT / Komplementbindung
Kreatinkinase, B-Kette (CK-B)	Zytosol / ATP-Level, synapt. Funktionen, Kalziumhomeostase
Endoplasmin (GRP94 / gp96)	ER-Lumen, Zelloberfläche / Ca^{2+} -bindendes Chaperon, Apoptosegegenspieler
α -Actinin	strukturelle/regulatorische Funktionen des Zytoskeletts/verschiedener Ionenkanäle

α -II-Spectrin	Zytosol, vermehrt in PSD / Aktin-Vernetzung, NMDA-Rezeptorbindung
Zitratsynthase	innere Mitochondrienmembran / Citrat-Zyklus
ATP-Synthase	innere Mitochondrien-, Zellmembran / Protonenpumpe, ATP-Synthese
<i>Dihydropyrimidinase-Related Protein 2</i> (DRP-2, CRMP-2)	Zytosol / Signaltransduktion
vakuoläre ATP-Synthase (vATP-Synthase)	Endosomen-, Zellmembran / Protonenpumpe, pH-Wert
Dynamin I	präsynaptische GTPase / Endozytose
Hexokinase Typ 1 (HXK 1)	äußere Mitochondrienmembran / Glykolyseenzym, Apoptoseregulation
<i>Myelin-Associated Glycoprotein</i> (MAG)	gliales Zelladhäsionsmolekül / Myelinaufbau
Na^+ - K^+ -ATPase	Zellmembran / Ionenpumpe, Signaltransduktion (Genregulation, Zellwachstum)
<i>Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase</i> (GAPDH)	Zytosol, Nukleus / Glykolyse, multiple Funktionen
14-3-3	Zytosol / Bindung von unterschiedlichen Signalproteinen

Tabelle 5.1: Mögliche Bindeproteine der APP- γ -Spaltstelle (PSD, postsynaptische Dichte; NMDA, N-Methyl-D-Aspartat)

Sowohl Ektocalretikulin (C1qR) bzw. Calretikulin (CRT) als auch die Kreatinkinase-B (CK-B) sind bereits durch die Arbeit von Helen Strekalova gefunden worden, wobei sie CRT als ein an die γ - und CK-B als ein an die β -Spaltstelle des Amyloid Vorläuferproteins (APP) bindendes Protein identifizierte (Strekalova, 2004). Auf beide Proteine sowie eine mögliche Interaktion mit APP wird in den folgenden Teilen dieser Diskussion (Kap. 5.2, S. 149, Kap. 5.3, S. 151) eingegangen.

Von den verbleibenden dreizehn eventuellen an APP im Bereich der γ -Spaltstelle bindenden Proteinen wurden sieben nicht weiter behandelt und sechs durch Folgeexperimente bezüglich einer Interaktion mit dem Zelladhäsionsprotein überprüft. Hier werden zunächst die sieben nicht-untersuchten Proteine, der Grund des Ausschlusses sowie eine mögliche Funktion bezüglich APP diskutiert und dann auf die sechs überprüften APP-Interaktionspartner eingegangen.

α -Actinin. Die α -Actinine sind eine lang bekannte Proteinfamilie mit strukturellen sowie regulatorischen Funktionen des Zytoskeletts (Dixson et al., 2003) und verschiedener Ionenkanäle, eingeschlossen Ca^{2+} -, K^+ - und TRPP (*Transient Receptor Potential Polycystin*)-Kanälen sowie dem NMDA (*N-Methyl-D-Aspartat*)-Rezeptor (Krupp et al., 1999; Marouka et al., 2000; Sadedhi et al., 2002; Li et al., 2005; Lu et al., 2007).

Darüber hinaus rekrutieren die Actin-bindenden Proteine LRP (*low density Lipoprotein Receptor-related Protein*) zu Zell-Zell-Verbindungen und sind somit an interzellulären Kontakten (Hansen & Beckerle, 2008) beteiligt, wie es auch für das Zelladhäsionsmolekül APP postuliert wird (Zheng & Koo, 2006). Außerdem bindet dessen intrazelluläre Domäne LRP direkt und FE65-vermittelt, was zu einer Steigerung der amyloidogenen Prozessierung von APP führt (Lakshmana et al., 2008). Vor dem Hintergrund dieser Tatsachen und mit dem Wissen, dass

Gehirne von gesunden Wildtyp-Mäusen zur Analyse verwendet worden sind, scheint eine Interaktion von α -Actinin und dem Amyloid Vorläuferprotein eher indirekt stattzufinden. Es ist jedoch bekannt, dass es während des Verlaufs der Alzheimer-Krankheit zu Umordnungen im Bereich des Zytoskeletts kommt (Pollak et al., 2003), wobei die Frage offen bleibt, ob dies eine Ursache oder Folge der Krankheit darstellt. Demnach ist eine α -Actinin/APP-Bindung nicht ganz abwegig und könnte sowohl dem Bereich von Zell-Zell- als auch von zytoskelettären Funktionen zuzuordnen sein, obwohl die Anhaltspunkte im Bereich dieser Studie nicht zur weiteren Bearbeitung des massenspektrometrischen Ergebnisses ausgereicht haben.

GRP94. Genau wie CRT ist das Glykoprotein Endoplasmin (GRP94) ein Chaperon des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und ein Kalzium-bindendes Protein, das auch an der Zelloberfläche vorkommt und an dem Vorgang der Apoptose beteiligt ist (Reddy et al., 1999; Liu et al., 2003), wobei es möglicherweise antiapoptotisch wirkt (Fu & Lee, 2006).

Eine CRT-entsprechende Interaktion von GRP94 mit APP ist nicht auszuschließen, zumal man bezüglich CRT auch lange nichts von dem ubiquitären Vorkommen und den zahlreichen Funktionen gewusst hat. Eine dertartige Verbindung ist aber wahrscheinlich doch eher Oligosaccharid-vermittelt und somit der Chaperonfunktion des ER-Homologs von Hsp90 (*heat shock protein90*) zuzuordnen.

Während GRP94 stressbedingt in Prion-Protein-infizierten Neuroblastomazellen (Hetz et al., 2003) hochreguliert ist sowie bei Autoimmunerkrankungen mitwirkt (Liu et al., 2003), wurde diesbezüglich bei der Alzheimer-Krankheit keine Veränderung publiziert. Eine Bindung von GRP94 an die sich in der Membran befindende APP- γ -Spaltstelle und ein möglicher Einfluss auf die amyloidogene Prozessierung des Proteins scheint vor diesem Hintergrund nicht wahrscheinlich. Es ist jedoch eine Interaktion mit dem aus der Membran entlassenen A β -Peptid vorstellbar, wobei GRP94 als Chaperon die Struktur des Peptids stabilisieren könnte. Aufgrund der wenigen Hinweise einer Verbindung von Endoplasmin und APP wurde dieses Protein nicht mit in die weitere Studie einbezogen.

α -II-Spectrin. Spectrin bindet zahlreiche unterschiedliche Moleküle und stellt so eine komplexe Verbindung zwischen der Zellmembran und dem Zytoplasma her (De Matteis & Morrow, 2000). Die Gehirn-spezifische Isoform α -II-Spektrin bindet neuronal an die intrazelluläre Domäne des NMDA-Rezeptors und tritt vermehrt in der postsynaptischen Dichte (PSD) auf (Wechsler & Teichler, 1998).

Bekannterweise korreliert eine synaptische Dysfunktion mit einem frühen Stadium der Alzheimer-Krankheit, wobei Almeida und Kollegen *in vitro* zeigen konnten, dass APP^{sw} (*swedish mutated*) grundlegende Veränderungen in den prä- und postsynaptischen Kompartimenten im Vergleich zum Wildtyp auslöst (Almeida et al., 2005). Dewachter und Kollegen publizieren diesbezüglich eine, jedoch *in vivo*, gestörte Regulation der NMDA-Rezeptorfunktion sowie

eine dadurch ausgelöste Signalweiterleitung in Abhängigkeit von mutiertem APP (Dewachter et al., 2007).

Es bestehen zwar zahlreiche indirekte Verbindungen zwischen α -II-Spectrin und dem Amyloid Vorläuferprotein, wie auch die Tatsache, dass beide Proteine ein Substrat der Caspase-3 darstellen (Davoli et al., 2002), zeigt. Es bleibt allerdings die Frage, ob es sich dabei nicht um ein zufälliges Aufeinandertreffen zweier neuronaler Moleküle handelt. Wie bei den α -Actininen ist eine Bindung des Proteins an das Amyloid Vorläuferprotein nicht ausgeschlossen, findet aber möglicherweise nur indirekt oder gar nicht statt. Eine Beteiligung an der Pathologie der Alzheimer-Krankheit, insbesondere der γ -Spaltung von APP scheint eher unwahrscheinlich. Demnach wurde diesem Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der ausgeschnittenen SDS-Banden nicht weiter nachgegangen.

Zitratsynthase. Die Zitratsynthase ist ein schwer zu akzeptierendes Resultat der Suche nach einem Bindepertner der APP- γ -Spaltstelle. Dieses Schlüsselenzym des Zitratzyklus ist hauptsächlich an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Remington, 1992) und wird häufig als Marker für die Funktionalität der Mitochondrien verwendet, auch weil sie in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten nicht verändert ist (Canevari et al., 1999), obwohl eine mitochondriale Dysfunktion bereits in frühen Stadien der Krankheit bekannt ist (Hauptmann et al., 2008).

Zwar wird APP in Mitochondrien vermutet (Anandatheerthavarada & Devi, 2007) und $A\beta$ dort nachgewiesen (Chen & Yan, 2006), wobei eine Interaktion mit der Zitratsynthase stattfinden könnte. Das Peptid würde jedoch das Enzym in von der Krankheit-befallenen Gehirnen nicht in seiner Konzentration sowie Funktion im Vergleich zu gesunden Gehirnen verändern, wodurch einer derartigen Verbindung nur eine physiologische Funktion zukommen kann. Aufgrund dieser Vermutungen und wenigen Gemeinsamkeiten der beiden Proteine wurde auch die Zitratsynthase als eventueller APP-Bindepertner verworfen.

ATP-Synthase. Eine mögliche Interaktion der ATP-Synthase (F_0F_1 -ATPase) und der extrazellulären Domäne des Amyloid Vorläuferproteins mit der Funktion der ATP-Regulation wurde bereits von Schmidt und Kollegen publiziert. Darüber hinaus kann eine Co-Lokalisation der beiden Proteine im murinen Hippocampus *in vitro* gezeigt werden (Schmidt et al., 2007). Der als Protonenpumpe sowie ATPase fungierende und sowohl in der Mitochondrienmembran als auch an der Zelloberfläche vorkommende Enzymkomplex (Chi & Pizzo, 2006) bindet laut dieser Studie eventuell an die γ -Spaltstelle des Zelladhäsionsmoleküls. Demnach scheint die Bindung entweder nicht sehr spezifisch zu sein oder in einem die γ -Spaltstelle und den C-terminalen Abschnitt der Ektodomaäne umfassenden Bereich stattzufinden. Aufgrund dieser Daten und der bereits geleisteten Arbeit innerhalb der Arbeitsgruppe wurde auf dieses

Ergebnis nicht weiter eingegangen.

CRMP-2. Das *Collapsin Mediator Protein-2* (CRMP-2, *Dihydropyrimidinase-Related Protein-2*, DRP-2) ist eine von fünf hoch phosphorylierten und entwicklungsbedingt regulierten Isoformen (Byk et al., 1998), von denen CRMP-2 als *downstream*-Mediator von Semaphorin A das Mikrotubuli-Zusammenkommen fördert und dadurch axonales Wachstum beeinflusst (Arimura et al., 2004).

Darüber hinaus interagiert das auch *Dihydropyrimidinase-related protein-2* genannte Protein mit Neurofibromin 1 (NF1) (Patrakitkomjorn et al., 2008), von dem vermutet wird, dass es mit APP komplexiert ist (Donarum et al., 2006). Außerdem steigert $A\beta$ die Phosphorylierung von CRMP-2 und beeinflusst somit das Neuritenwachstum (Petratos et al., 2008). Diese Daten zeigen bereits eine indirekte NF1-vermittelte Interaktion von CRMP-2 und APP mit einer Funktion bezüglich der synaptischen Plastizität sowie möglicherweise des Lernens und der Erinnerung. Gerade diese Bereiche sind im Verlauf der Alzheimer-Krankheit zunehmend gestört, weshalb eine Beteiligung von CRMP-2 an der Pathologie der Demenz nicht ausgeschlossen ist.

Die durch Affinitätschromatographie mittels des anti-D-IgG erhaltene, aus dem entsprechenden SDS-Gel ausgeschnittene und massenspektrometrisch analysierte Bande hatte eine Größe von 30kDa, während CRMP-2 jedoch 64kDa groß ist. Trotz der Hinweise einer Interaktion der Proteine wurde besonders aufgrund des widersprüchlichen Molekulargewichts auf eine weitere Untersuchung der möglichen Bindung von CRMP-2 an die APP- γ -Spaltstelle verzichtet.

vATP-Synthase. Auch ein nicht weiter behandeltes Protein ist die vakuoläre ATP-Synthase (vATPase), ein der bereits beschriebenen F_0F_1 -ATPase sehr ähnlicher Komplex mit der Funktion einer Protonenpumpe und ATPase. Zudem ist die hauptsächlich in endosomalen Membranen vorkommende vATPase für die Aufrechterhaltung der niedrigen lysosomalen pH-Werte verantwortlich (Nishi & Forgac, 2002) und an der Ausbreitung von Tumoren beteiligt (Sennoune et al., 2004).

Die 1997 publizierte Co-Lokalisation des transmembranen Komplexes und APP zeigt nur einen Transport des Zelloberflächenproteins über Clathrin-umhüllte Vesikel in endosomale Kompartimente, in deren Membran die vATPase vorkommt (Marquez-Sterling et al., 1997). Trotzdem und auch aufgrund der bereits postulierten Interaktion der ähnlichen ATP-Synthase und APP ist eine entsprechende Bindung nicht abwegig und eine damit verbundene Funktion hinsichtlich der ATP-Regulation möglich. Eine Interaktion der beiden Proteine kann nur durch Folgeexperimente überprüft werden, die zu dem Zeitpunkt der Identifikation der eventuellen APP-Bindepartner aufgrund der großen Anzahl dieser zugunsten anderer auf einen späteren Zeitpunkt verschoben worden sind.

Die nun folgenden sechs Ergebnisse der Suche nach neuen Bindepartnern des Amyloid Vor-

läuferproteins, insbesondere dessen γ -Spaltstelle, wurden sowohl mittels Immunoblot-Analyse der jeweiligen Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie unter Verwendung der spezifischen Antikörper als auch teilweise durch Co-Immunpräzipitation bestätigt. Dabei bilden Dynamin I, die Hexokinase Typ 1 und die Na^+/K^+ -ATPase (α_3) die erste Gruppe der Resultate nach langem Versuch und wurden aufgrund dessen schon durch Folgeexperimente in ihrer Bindung an APP getestet. Sowohl *Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase* (GAPDH) als auch 14-3-3 sind Proteine, deren jeweilige Interaktion mit Zelladhäsionsmolekülen (u.a. L1, NCAM), auch in derselben Arbeitsgruppe, weitgehend studiert worden sind. Daher gab es schon eine Verbindung dieser Proteine und dem auch zur Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle gehörenden APP, die hinsichtlich einer jeweiligen Assoziation bereits vermutet wurde (ZMNH, persönliche Mitteilungen) Auch mit dem Glykoprotein MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*) wurde laborintern gearbeitet und eine Interaktion mit dem Amyloid Vorläuferprotein nicht ausgeschlossen.

Dynamin I. Die GTPase Dynamin I (DNMI) ist eine von drei in Säugetieren vorkommenden Isoformen, wird ausschließlich im Gehirn exprimiert und tritt vermehrt am Ort der Endozytose synaptischer Vesikel auf (Smillie & Cousin, 2005).

Wie bereits erwähnt, wird APP durch Clathrin-umhüllte Vesikel von der Zelloberfläche endozytiert, woran DNMI maßgeblich beteiligt ist, und gelangt so in Endosomen, eingeschlossen lysosomaler Kompartimente (Marquez-Sterlin et al., 1997). Die in der Membran liegende γ -Spaltstelle von APP befindet sich in diesem durch DNMI-vermittelten Prozeß sowohl in der Zell- als auch in einer entsprechend endosomalen Membran und könnte im Laufe dessen mit der GTPase interagieren. Darüber hinaus bestätigt eine Co-Immunpräzipitation zwar eine Komplexierung zweier Proteine, jedoch keine direkte Bindung. Demnach ist auch eine indirekte Interaktion möglich und hinsichtlich der jeweiligen Funktionen wahrscheinlicher. Eine Beteiligung von DNMI an einem γ -Sekretase- bzw. Presenilin-vermittelten Vorgang findet in Anlehnung an die DNMI-verwandte GTPase Opa1 (*Optic atrophy 1*) Bestätigung. Opa1 ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, fördert die Membranfusion und, in Abhängigkeit von Parl1 (*Presenilin-associated rhomboid-like 1*), die Organisation der Kristalle. Eine Störung des Gleichgewichts von Presenilin/Parl1 und Parl1/Opa1 ist beteiligt an der Apoptoseinduktion (Pellegrini & Scorrano, 2007). Diese sehr hypothetische Vermutung einer Verbindung geht von nur einer indirekten Interaktion von DNMI mit Presenilin aus, die zudem keine Funktion bei der APP-Prozessierung hätte, sondern γ -Sekretase-unabhängig wäre. Es konnte eine Assoziation von DNMI und APP, nicht aber von DNMI und PS1, mittels Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden, was die bereits beschriebene Annahme einer Beteiligung der GTPase an der Endozytose des Zelladhäsionsmoleküls, einem physiologischen Prozeß, unterstützt.

Hexokinase Typ1. Bei dem glykolytischen Enzym Hexokinase Typ1 (HXK1) handelt es sich um die gehirnspezifische Isoform des den ersten Schritt des Glukosemetabolismus katalysierenden und somit eine hohe Affinität für Glukose besitzenden Proteins (Wilson, 2003). HXK1 ist hauptsächlich über *Voltage-Dependent Anion Channel* (VDAC) an die äußere Mitochondrienmembran gebunden (Nakashima et al., 1986) und nutzt intramitochondriales ATP als Substrat, wodurch ein konstanter Fluss des Energiespeichers und dadurch eine hohe Glykolyserate ermöglicht wird (Pedersen et al., 2002). Außerdem wirkt Hexokinase Typ1 durch diese Interaktion dem Apoptose-induzierten Zelltod entgegen (Abu-Hamad et al., 2008), wobei sowohl eine Blockade der HXK-Aktivität, als auch der genannten Verbindung das Neuritenwachstum *in vitro* zu inhibieren scheint (Wang et al., 2008).

Eine direkte Bindung des Amyloid Vorläuferproteins und des glykolytischen Enzyms scheint aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation und Funktionen der Proteine eher unwahrscheinlich. Eine diesbezügliche Interaktion mit dem auch in Mitochondrien nachgewiesenen sowie die γ -Spaltstelle teilweise enthaltenden löslichen A β -Peptid (Eckert et al., 2008) könnte jedoch stattfinden und so zu der die Alzheimer-Krankheit begleitenden mitochondrialen Dysfunktion und der damit verbundenen Apoptose führen. Darüber hinaus wurde ein aktiver γ -Sekretasekomplex in diesem Zellkompartiment identifiziert (Hansson et al., 2004), wodurch auch das Vorkommen von APP nicht auszuschließen und bereits postuliert worden ist (Anandatheerthavarada, 2003). Liguri und Kollegen publizierten bereits 1990 eine erhöhte Enzymaktivität in Gehirnen von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Gehirnen gesunder Patienten (Liguri et al., 1990), konnten jedoch nicht ausschließen, daß diese Veränderung *postmortem* stattgefunden hat. Außerdem stellt sich hier wieder die Frage nach dem auslösenden Vorgang. Es konnte zwar eine Komplexierung des Enzyms mit APP, jedoch keine mit den γ -Sekretase bildenden Proteinen mittels Co-Immunpräzipitation gezeigt werden. Demnach scheint die HXK1 nicht in den Vorgang der amyloidogenen Prozessierung von APP durch den Enzymkomplex verwickelt zu sein. Ähnlich dem Dynamin ist eine Beteiligung an einem physiologischen Prozeß, möglicherweise eine Funktion des mitochondrialen ATP-Metabolismus oder der Apoptoseinduktion, wahrscheinlicher.

Na⁺-/K⁺-ATPase. Die Na⁺-/K⁺-ATPase ist ein in der Zellmembran-verankerter Komplex, der neben dem entsprechenden Ionentransport auch wichtige Funktionen im Bereich der Genexpression, Signaltransduktion und dem Zellwachstum hat (Xie & Xie, 2005). Die zuerst als APP-bindend identifizierte α_3 -Untereinheit wird ausschließlich von Neuronen und Purkinjezellen exprimiert, während die später auch als Resultat der massenspektrometrischen Analyse aufgetretene α_2 -Isoform vorrangig in Astrozyten sowie die α_1 -Form in Granulazellen vorkommt (Dobretsov & Stimers, 2005).

Allein aufgrund der Lokalisation des Amyloid Vorläuferproteins an der Zelloberfläche sowie einer Beteiligung an Vorgängen der Signaltransduktion ist eine Interaktion mit der Na⁺-/K⁺-ATPase im Bereich der Membran nicht auszuschließen. Darüber hinaus ist eine Bindung des

A β -Peptids und der Ionenpumpe sowie deren Inhibition in Folge dessen publiziert (Gu et al., 2004). Das Co-Immunpräzipitationsergebnis verifiziert eine derartige Verbindung, während die negativen ELISA-Studien auf eine indirekte Interaktion hindeuten. Da die eingesetzten synthetischen Peptide jedoch keine dem aufgereinigten Protein entsprechenden Modifikationen aufwiesen und die Na⁺-/K⁺-ATPase keine isolierte α -Untereinheit, sondern ein Gemisch aller dem Komplex zugehörigen Komponenten war, ist auch eine direkte Bindung der beiden Proteine nicht auszuschließen. Zur Klärung dieses Sachverhaltes ist es notwendig, die Bindungsstudien mit veränderten Ausgangsmaterialien zu wiederholen. Hinsichtlich der Alzheimer-Krankheit publizierten Dickey und Kollegen eine Reduktion der Aktivität der Ionenpumpe durch direkte Interaktion mit A β in APP- und PS1-transgenen Mäusen (Dickey et al., 2005). Während die Na⁺-/K⁺-ATPase jedoch nicht mit PS1 co-isoliert werden konnte, ergab diese Studie bezüglich PS2 ein positives Ergebnis. Obwohl PS1 und PS2 die katalytische Komponente der γ -Sekretase in wahrscheinlich unterschiedlichen Komplexen bilden können, scheint PS2 nur einen geringen oder keinen Einfluss auf die APP-Prozessierung zu besitzen (Mastrangelo et al., 2005), sondern den TRPC6 (*Transient Receptor Potential Cation Channel C6*)-vermittelten Ca²⁺-Einstrom *in vitro* zu regulieren (Lessard et al., 2005). Demnach kann die Na⁺-/K⁺-ATPase durch A β -Interaktion mit der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht werden, scheint aber ansonsten nichts mit der amyloidogenen Prozessierung des Amyloid Vorläuferproteins zu tun zu haben. Welche Bedeutung die Verbindung der Ionenpumpe mit APP und PS2 zukommt, muss durch eine weitere Charakterisierung des Zusammenspiels geklärt werden. Möglicherweise finden diese Interaktionen unabhängig voneinander statt und sind von physiologischer Funktion. Eine Bindung von PS2 an die Ionenpumpe könnte regulatorischer Art sein, so wie dies bereits für den TRPC6-Kanal sowie für den Ryanodinrezeptor publiziert worden ist (Hayrapetyan et al., 2008).

Die Na⁺-/K⁺-ATPase/APP-Interaktion könnte auch eine Funktion in der Neurogenese (Ma et al., 2008) und Zell-Zell-Kommunikation besitzen. Es ist bekannt, dass die Ionenpumpe in Myelinscheiden lokalisiert ist (Alberti et al., 2007) und durch Konzentration an *septate*-Verbindungen an neural-glialen Interaktionen beteiligt sein könnte (Genova & Fehon, 2003). Darüber hinaus ist die α_3 - besonders in Schwann'schen Zellen sowie die α_2 -Untereinheit in Gliazellen in Phasen der Myelinausbildung hochreguliert (Knapp et al., 2000), was auf eine Funktion der Ionenpumpe eventuell in Assoziation an APP im Bereich sowohl der Ausbildung von Zellkontakten als auch der Myelinummantelung von Axonen schließen lässt. Eine Beteiligung der γ -Sekretase an der Myelinierung, ausgelöst durch Notch-Signaltransduktion, ist bereits publiziert (Jurynczyk et al., 2008).

MAG. Genauso ist das hoch glykosylierte Zelladhäsionsmolekül MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*) wahrscheinlich in glia-axonalen Interaktionen involviert und maßgeblich an dem Aufbau und der Aufrechterhaltung der Myelinscheiden von Axonen beteiligt (Quarles et al., 2007). Während ähnliche Funktionen auch APP zugeschrieben werden, binden beide

Zellerkennungsmoleküle den Nogo66-Rezeptor (Park & Stritmatter, 2007; Williams et al., 2008) und werden durch Metalloproteasen gespalten, wodurch verschiedene lösliche Fragmente entstehen (Milward et al., 2008). Darüber hinaus kommt es in *Abcd1 (ATP-binding cassette, subfamily d,1)*/MAG Doppelknockout Mäusen verstärkt zur Axondegeneration und APP- Akkumulation im Vergleich zu den einfach mutierten Mäusen (Dumser et al., 2007). Aufgrund der vielen Parallelen der Zelladhäsionsmoleküle scheint eine Bindung mit einer Funktion hinsichtlich Zell-Zell-Interaktionen und Axonwachstum bzw. -regeneration möglich und wurde durch entsprechende Co-Immünpräzipitation bestätigt. Obwohl die Art der Assoziation nicht geklärt ist, kann man davon ausgehen, dass die beiden Proteine direkt binden, zumal die mit MAG interagierende axonale Komponente bisher nicht bekannt ist. Hinsichtlich der Alzheimer-Krankheit besteht jedoch kein Grund zur Annahme, dass dieses Zelladhäsionsmolekül grundsätzlich beteiligt ist bzw. die γ -Sekretase-vermittelte Spaltung von APP beeinflusst. Auch in diesem Fall scheint eine physiologische Verbindung der beiden Proteine mit den bereits beschriebenen Funktionen oder auch bezüglich der Neurogenese wahrscheinlicher. Diese Vermutung wird durch eine negative Co-Isolation von MAG mit den Kernkomponenten des γ -Sekretasekomplexes verstärkt.

GAPDH. Das glykolytische Enzym *Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase* (GAPDH) hat neben der Beteiligung am ATP-Metabolismus eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen in u.a. Endozytose, Vesikeltransport, Apoptose sowie neurodegenerativen Erkrankungen (Sirover et al., 2005). Diesbezüglich entspricht es vielen der bereits beschriebenen möglicherweise APP-bindenden Proteine. Dabei stellt wahrscheinlich die publizierte Veränderung der Aktivität sowie der subzellulären Lokalisation des Enzyms im Verlauf der Alzheimer-Krankheit (Mazzola & Sirover, 2003) eher wieder eine Folge der Krankheit als eine Ursache dar.

Es wurde bereits gezeigt, dass das $A\beta$ -Peptid an GAPDH bindet, vermutlich mit einer pathogenen Funktion (Verdier et al., 2008). Vor dem Hintergrund dieser Tatsachen schien eine Bindung des Enzyms an die γ -Spaltstelle von APP möglich, zumal die Sequenz von $A\beta$ einen Teil der Spaltstelle enthält. Während es noch in der Elutionsfraktion der mittels des anti-D-Antikörpers durchgeführten Affinitätschromatographie nachweisbar war, konnte GAPDH nicht unter Verwendung des C-terminalen anti-APP-IgGs zusammen mit dem Amyloid Vorläuferprotein co-isoliert werden. Dieses Ergebnis schließt jedoch nicht aus, dass unter anderen Versuchsbedingungen eine Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden kann.

14-3-3. Weitere mögliche Bindepartner der APP- γ -Spaltstelle sind die 14-3-3 Proteine, diverse Untereinheiten. Diese konservierte Familie regulatorischer Moleküle hat die Möglichkeit, zahlreiche unterschiedliche Signalproteine zu vernetzen (Aitken, 2006). Sie treten sowohl als Monomere als auch als Dimere auf, wobei die Ursache des entsprechenden Vorkommens bisher nicht geklärt ist.

Eine Komplexbildung der APP intrazellulären Domäne (AICD), 14-3-3 und dem multimodularen auch LRP bindenden Adapterprotein Fe65 wurde bereits publiziert (Sumioka et al., 2005). Demnach ist eine physiologische Verbindung von 14-3-3 mit dem Amyloid Vorläuferprotein aufgrund der komplexen Funktionen der regulatorischen Proteine und wenig bekannten Aufgaben des Zelladhäsionsmoleküls vorstellbar und, wie erwähnt, für die AICD mit der Funktion veränderter Fe65-vermittelter Genexpression bekannt. Im Verlauf der Alzheimer Krankheit werden die β - und ζ -Isoform von 14-3-3 oxidativ beschädigt (Santpere et al., 2007). Darüber hinaus vermuten Miller und Kollegen einen Zusammenhang zwischen der Proteinfamilie und der Alzheimer-Krankheit (Miller et al., 2008), was auf eine Interaktion von 14-3-3 und APP mit einer pathologischen Funktion hindeutet. Es konnten beide Formen von 14-3-3 (Monomer/Dimer) in den entsprechenden Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie nachgewiesen werden, während nur das Proteindimer mit APP co-isoliert worden ist. Möglicherweise war die auf das Gel aufgetragene Proteinkonzentration zum Nachweis der monomeren Form zu gering, obwohl ein Vergleich mit den vom Input gegebenen Banden diese Vermutung nicht stützt. Daraus lässt sich schließen, dass eine Interaktion von 14-3-3 und APP bestätigt werden konnte, wobei nicht geklärt ist, ob es sich bei der an der Bindung beteiligten Domäne um die intrazelluläre oder transmembrane oder vielleicht auch beide handelt. Außerdem ist noch unklar, welche Funktion die unterschiedlichen Formen der regulatorischen Proteine besitzen und aufgrund dessen auch die Aufgabe, die APP und der Verbindung der beiden Formen zukommt. Bezüglich einer 14-3-3/PS-Bindung ist in der Literatur bisher nichts bekannt, obwohl aufgrund der zahlreichen Funktionen beider Proteine besonders der physiologischen Art eine Verbindung nicht abwegig ist. Da die 14-3-3 Proteine jedoch nicht mit den Komponenten der γ -Sekretase co-präzipitiert werden konnten, scheint eine Beteiligung an der amyloidogenen Prozessierung von APP nicht wahrscheinlich. Es ist jedoch bekannt, dass die ζ -Isoform an β -Catenin bindet, das wiederum ein Interaktionspartner von Presenilin 1 ist (Mackie & Aitken, 2005), was eine indirekte Verbindung zwischen 14-3-3 und der γ -Sekretase herstellt.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die meisten der Ergebnisse der Suche nach Bindepartnern der APP- γ -Spaltstelle sinnvoll zu erklären sind und teilweise auch bestätigt werden konnten. Demnach sind die eingesetzte Affinitätschromatographie sowie die massenspektrometrische Analyse der ausgeschnittenen SDS-Banden Methoden, die in Verbindung mit der geeigneten Vorarbeit (Komplementäre Hydropathie) zur Identifikation möglicher Bindepartner eines Proteins geeignet sind. Natürlich sind falsch positive Ergebnisse nicht ganz auszuschließen, worauf im nächsten Kapitel dieser Diskussion näher eingegangen wird, werden aber durch die notwendigen Folgeexperimente als solche identifiziert und von der weiteren Studie ausgeschlossen.

Viele der möglichen APP-Bindepartner haben Funktionen in der Zell-Zell-Kommunikation, Endozytose, dem Energiemetabolismus, endosomalen bzw. mitochondrialen Vorgängen oder der Apoptose. So kommen CRT, Actinin, eventuell GRP94, Spectrin, die ATP-Synthase,

möglicherweise CRMP-2, Dynamin, die Na^+/K^+ -ATPase, 14-3-3 und MAG genau wie das Amyloid Vorläuferprotein im Bereich der Zellmembran vor und sind beteiligt an der Zell-Zell-Adhäsion, -Interaktion und damit auch der Neurogenese und Signalleitung. Ein weiteres Zellkompartiment, in dem auffällig viele der identifizierten Proteine sowie APP lokalisiert sind, ist das Mitochondrium. Dort befinden sich sowohl die Kreatinkinase, Zitratsynthase, ATP-Synthase, HXK 1 als auch GAPDH mit einer Funktion im Glukose-, Kreatin- oder ATP-bzw. zusammengefasst im Energie-Metabolismus. Auch Proteine in endosomalen Kompartimenten (vATPase/DNMI) sowie dem Endoplasmatischen Retikulum (CRT/GRP94) bilden ein Ergebnis dieser Studie und beschreiben Orte, an denen auch APP auftritt. Funktionen einer derartigen Interaktion können sowohl die Reifung als auch den Transport des Zelladhäsionsmoleküls betreffen.

Kurz: Die identifizierten Proteine und ihre jeweiligen Aufgaben entsprechen sowohl der Lokalisation als auch den bisher postulierten physiologischen Aufgaben des Amyloid Vorläuferproteins, wobei die genaue Funktion der jeweiligen Interaktion noch nicht geklärt ist. Der von Wolfe und Guenette publizierte Review gibt diesbezüglich eine gute Übersicht und graphische Darstellung (Wolfe & Guenette, 2007; Abb. 5.1, S. 148).

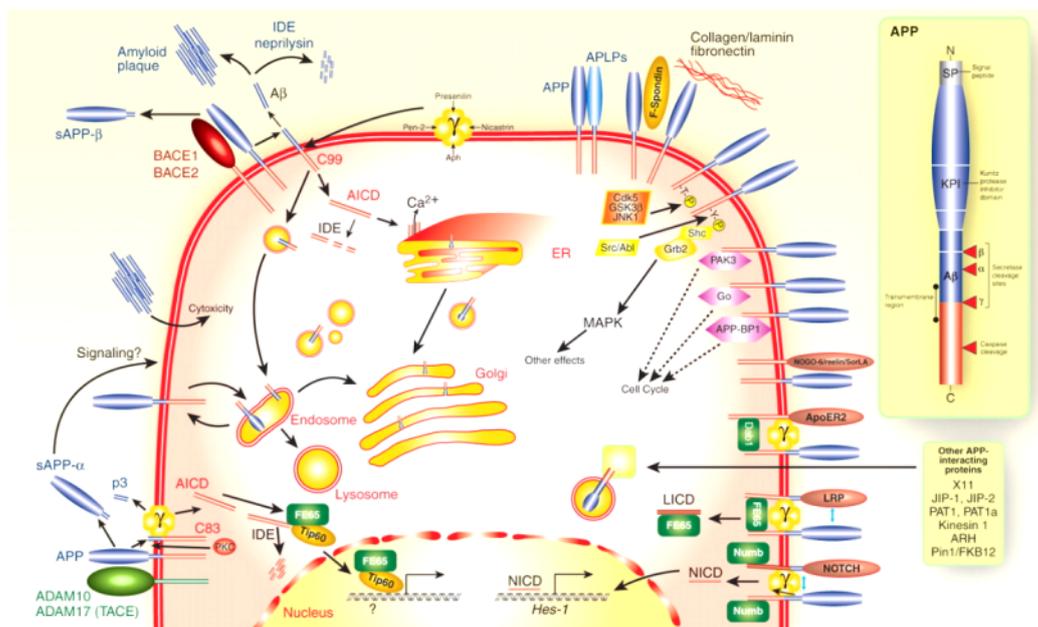


Abb. 5.1: APP im Überblick

Schematische Darstellung der Struktur, Lokalisation und entsprechenden Funktionen des Amyloid Vorläuferproteins (Wolfe & Guenette, 2007).

Pathologisch betrachtet sind die möglichen Interaktionen und Veränderungen der jeweiligen Vorkommen oder Aktivitäten der entsprechenden Proteine oft wahrscheinlich, wie bereits geschrieben, eher eine Folge der Alzheimer-Krankheit oder im Verlauf dieser entstanden als eine grundsätzliche Ursache darzustellen. Es ist bekannt und weitgehend studiert, dass schon in frühen Stadien der Krankheit ein gestörter Energiemetabolismus auftritt (Bürklen et al., 2006) sowie eine durch erhöhten oxidativen Stress ausgelöste mitochondriale Dysfunktion

(Sompol et al., 2008) und ein veränderter Kalziummetabolismus (Ferreiro et al., 2008), wobei das amyloide A β -Peptid, wenn nicht der auslösende Faktor zumindest mitverantwortlich ist. So wird vermutet, dass A β entweder heterogene Ionenkanäle in der Zellmembran formen kann und so eine zelluläre Degeneration auslöst oder sich in Form von Oligomeren in die Lipiddoppelschicht einlagert und eine Dysfunktion von Ionenkanälen oder Pumpen durch Bindung dieser bewirkt sowie oxidative Modifikationen von Membranproteinen induziert (Sultana & Butterfield, 2008). Auf diese Weise kann z.B. eine Interaktion mit der Na⁺-/K⁺-ATPase oder der ATP-Synthase zustande kommen. Demnach können die an diesen Vorgängen teilnehmenden Proteine auch erst im Verlauf der Alzheimer-Krankheit mit APP oder A β in Berührung kommen und eventuell so ein definiertes Stadium der Krankheit repräsentieren bzw. beschreiben, wie weit die Pathologie dieser bereits vorangeschritten ist.

Eine direkte Beteiligung an der amyloidogenen Prozessierung von APP scheint schwer vorstellbar, während jedoch eine Verbindung mit der γ -Sekretase bzw. mit Presenilin durchaus möglich ist. Allerdings haben die diesbezüglichen Funktionen ähnlich wie bei APP eher einen physiologischen bzw. nicht die Krankheit-betreffenden Charakter. PS besitzt neben der Aufgabe als katalytisch aktive Komponente des Enzymkomplexes weitaus mehr Funktionen, die mit dem Metabolismus der identifizierten Proteine sowie den Vorgängen, in die sie verwickelt sind, besser in Einklang zu bringen sind.

5.2 Kreatinkinase-B: ein APP-Bindepertner? - Kritische Einschätzung der angewandten Methoden

Helen Strekalova identifizierte die gehirnspezifische Isoform der Kreatinkinase (CK-B) im Rahmen ihrer Doktorarbeit als möglichen Bindepertner der APP- β -Spaltstelle, konnte jedoch keine direkte Interaktion des Enzyms und des synthetischen, die Spaltstelle repräsentierenden APP-C-Peptids mittels ELISA-Experimenten nachweisen (Strekalova, 2004). CK-B wurde auch bei der Suche nach an die γ -Spaltstelle des Amyloid Vorläuferproteins bindenden Proteinen (Kap. 4.1.1, S. 96) gefunden.

Während die bereits in der Einleitung beschriebene zytosolische Form des für den neuronalen Energiemetabolismus wichtigen Enzyms (Kap. 1.9.1, S. 20) in funktioneller Verbindung mit der in der Zellmembran vorkommenden Na⁺-/K⁺-ATPase steht (Guerrero et al., 1997), interagiert die mitochondriale Isoform (uMtCK) mit dem zytoplasmatischen Teil des Amyloid Vorläuferproteins (Li et al., 2006). Unabhängig von den jeweiligen Spaltstellen könnte auch eine Bindung der CK-B-Kette an APP stattfinden und eine Funktion im Energiemetabolismus haben. Die Ergebnisse sowohl der von Helen (Strekalova, 2004) als auch im Verlauf der Studie 2 durchgeführten Co-Immünpräzipitationen (CK-B/APP) bestätigen diese Vermutung (Abb. 4.17, S. 113). Zudem könnte eine Interaktion der beiden Proteine indirekt, vermittelt durch andere Proteine, wie z.B. die Na⁺-/K⁺-ATPase, von der eine Assoziation mit APP bereits gezeigt wurde (Abb. 4.15, S. 111), stattfinden.

Die den Studien zugrunde liegende Theorie der komplementären Hydropathie (Blalock &

Smith, 1984; Blalock & Bost, 1986; Kap. 3.4.1, S. 89) bildet eine geeignete Grundlage zur Identifikation von Bindepartnern bekannter Proteine und ist, wenn auch nicht vollständig geklärt, doch mehrfach bestätigt worden (Williams et al., 2005). Dieses Konzept der molekularen Peptidinteraktionen schlägt co-evolutionär-bedingte Sequenzen wahrscheinlich interagierender Peptide vor, deren Bindungen innerhalb von Proteinen, die meistens posttranslational modifiziert sind, durch Folgeexperimente bestätigt werden müssen. Dabei können unterschiedliche Vorgehensweisen zu verschiedenen Ergebnissen führen, wie die Charakterisierung der zwei mittels anderer Säulen aufgereinigten anti-D-(*antisense*)-Antikörper verdeutlicht (Abb. 4.3, S. 96). Auch die Affinitätschromatographie mittels des anti-D-IgGs sowie die massenspektrometrische Analyse der ausgeschnittenen SDS-Banden weisen Fehlerquellen auf und ergeben somit immer einen geringen Anteil an falsch positiven Resultaten.

Die hydrophobe Sequenz des *antisense*-Peptids, welche die in der Membran lokalisierte APP- γ -Spaltstelle repräsentiert, resultiert bei Generierung eines Antikörpers mittels des D-Peptids in einem entsprechend hydrophoben Epitop des anti-D-IgGs, welches die Tendenz hat, aufgrund dieser Hydrophobizität sehr "klebrig" zu sein bzw. einige Proteine möglicherweise unspezifisch zu binden. Darüber hinaus wird die Zusammensetzung und Menge der in den jeweiligen Fraktionen eluierten Proteine durch die Stringenz der Waschvorgänge mitbestimmt. Die massenspektrometrische Analyse der in SDS-Banden enthaltenen Proteine liefert auch kein auf das Gesamtprotein bezogenes Ergebnis, sondern nur kurze Aminosäuresequenzen, die durch geeignete Programme sowie viel Erfahrung der entsprechend ausführenden Personen bestimmten Molekülen zugeordnet werden, die dann in Abhängigkeit der jeweiligen Trefferhäufigkeit die verschiedenen Vorschläge für definierte Proteine bilden. So gibt auch die abschließende massenspektrometrische Analyse nur einen Hinweis auf einen möglichen APP-Bindepartner, dessen Interaktion mit APP durch weitere Experimente erst noch bestätigt werden muss. Zusammengefasst besteht zwar bei jeder der einzelnen Untersuchungen die Möglichkeit eines falsch positiven Resultats, welche jedoch durch das Zusammenwirken der verschiedenen Methoden minimiert wird.

Das Auftreten der Kreatinkinase an der Zelloberfläche war eigentlich nicht zu erwarten. Die unter Verwendung der neuronalen Zelllinie B103 durchgeführten Oberflächenbiotinylierungsexperimente zeigen jedoch ein Zellmembran-assoziiertes Vorkommen der Kreatinkinase-B in Abhängigkeit sowohl des "Alters" der Zellen als auch der APP-Expression (Abb. 4.18, S. 114). Demnach tritt umso mehr CK-B an der Zelloberfläche auf je häufiger sich die Zellen geteilt haben und je mehr APP sie exprimieren. Dieses Ergebnis kann einerseits auf eine erhöhte Empfindlichkeit der stabil transfizierten im Vergleich mit der B103/WT-Zelllinie sowie den "älteren" Zellen im Unterschied zu den weniger geteilten zurückzuführen. Mit dieser auch zunehmenden Anfälligkeit steigt die Zellmembranpermeabilität bzw. kann die Membran äußeren Einflüssen weniger stand halten, wodurch vermehrt Biotin bei der entsprechenden Inkubation der Zellen ins Zytosol gelangt und die dort enthaltenen Proteine bindet. Daher könnte es sein, dass derartig beschaffene B103-Zellen durch den Anteil an möglicherweise biotinyliertem zytosolischem Enzym eine größere Gesamtkonzentration an mit Biotin-assoziiertes mittels Streptavidin isolierter Kreatinkinase-B aufweisen.

Andererseits kann aber das Ergebnis der Oberflächenbiotinylierungsexperimente auch auf eine reale Abhängigkeit des Oberflächenvorkommens der Kreatinkinase-B sowohl von der APP-Expression als auch von dem "Alter" der entsprechenden Zellen hindeuten. Daß zytosolische Proteine auch an der Zelloberfläche vorkommen können ist bekannt und wird schon durch die Studie 3 dieser Arbeit mit Calretikulin bewiesen (Kap. 4.1.3, S. 116). Demnach könnte auch CK-B unter bestimmten Umständen an in der Membran-verankerte Moleküle binden und somit nachgewiesen werden. Ein möglicher Bindepartner ist das Zelladhäsionsmolekül APP, mit dem die CK-B mittels Immunopräzipitation co-isoliert werden konnte (Abb. 4.17, S. 113) und wodurch die generell höhere Oberflächenkonzentration des Enzyms auf B103/APP- im Vergleich zu den B103/WT-Zellen erklärt wird. Es ist allerdings noch unklar, ob der starke Anstieg des CK-Vorkommens auf der Oberfläche von B103/APP-Zellen mit dem Alter, welcher in keiner Relation zu der CK-Konzentrationserhöhung auf "alten" B103/WT-Zellen steht, auf ein ebenso vermehrtes APP-Zelloberflächenvorkommen oder eine häufiger stattfindende Bindung der Proteine zurückzuführen ist.

5.3 Charakterisierung der Interaktion von APP und CRT hinsichtlich der γ -Spaltung sowie einer generellen CRT-Beteiligung an dem Sekretasekomplex

Dieser sich mit der Interaktion von Calretikulin (CRT) und dem Amyloid Vorläuferprotein (APP) beschäftigende Teil der Arbeit (Kap. 4.1.3, S. 116) war auch eines der Hauptziele derselben und beruht auf der Doktorarbeit von Helen Strelakova (Strelakova, 2004), wobei ihre Ansätze weiter ausgeführt wurden.

Das bereits in der Einleitung vorgestellte Chaperon tritt sowohl ubiquitär innerhalb der Zelle als auch an der Zelloberfläche auf (Michalak et al., 1999) und besitzt zahlreiche Funktionen, u.a. in der Zell-Zell-Interaktion, der Apoptose, im Ca^{2+} -Metabolismus sowie der -Signaltransduktion (Johnson et al., 2001; Jia et al., 2008). Außerdem vermittelt CRT durch Bindung an verschiedene Proteine, zu denen auch das mit APP assoziierte LRP gehört (Dusus et al., 2007; Lakshmana et al., 2008), zahlreiche Signalwege. Die Struktur des löslichen Proteins besteht aus drei Domänen (Abb. 4.20, S. 116), wobei die N-terminale Zn^{2+} bindet und maßgeblich verantwortlich ist für die von der N- und P-Domäne vermittelte Chaperonfunktion des Proteins (Guo et al., 2003). Die einem ausgestreckten Arm ähnliche P-Domäne ist wahrscheinlich für die Proteinbindung verantwortlich (Schrag et al., 2001) und kann wie die stark saure sowie hydrophobe C-terminale Domäne Ca^{2+} -binden (Nakamura et al., 2001). Außerdem wird für die C-Domäne eine Funktion in der Regulation von Proteininteraktion vermutet (Corbett et al., 1999).

Im Rahmen ihrer Arbeit entdeckte Helen Strelakova Calretikulin als Bindepartner der APP- γ -Spaltstelle, konnte eine direkte Bindung mittels ELISA bestätigen und die CRT-C-Domäne

als die mit APP interagierende identifizieren. Obwohl die Chaperonfunktion von CRT den anderen beiden Domänen und die Proteinbindung der P-Domäne zugeordnet worden sind, bestand zuerst die Vermutung, dass diese Interaktion Oligosaccharid-vermittelt ist und damit der zuerst entdeckten Funktion des Chaperons entspricht sowie demnach im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sein musste. Co-Immunpräzipitations- und *pulldown*-Experimente mit CHO-Zellen nach transienter Transfektion des C99-APP-membranständigen Fragments widerlegen jedoch diese Annahme (Abb. 4.24, S. 118; Abb. 4.25, S. 119). Einerseits besitzt APP-C99 keine Zuckerreste auf der Oberfläche und andererseits handelt es sich dabei um das β -Sekretase-geschnittene APP-Fragment, wodurch die Bindung von CRT an die γ -Spaltstelle des Amyloid Vorläuferproteins bestätigt wird und was auf eine mögliche Beteiligung des löslichen Proteins an der γ -Sekretase vermittelten APP-Prozessierung hindeutet. Auch Helen Strelakova hat eine diesbezügliche Verbindung vermutet und bereits den Einfluss von Calretikulin auf die A β -Produktion untersucht (Strelakova, unpublished). Es konnte sowohl eine Komplexierung von CRT und Presenilin1 (PS1) mittels Co-Immunpräzipitation gezeigt (Abb. 4.28, S. 120) als auch die CRT-P-Domäne als die mit dem N-terminalen Fragment von PS1 assoziiert identifiziert werden (Abb. 4.30, S. 122). Eine Oligosaccharid-vermittelte Bindung des Chaperons an PS1 konnte aufgrund der fehlenden N-Glykosylierung des Enzyms ausgeschlossen werden (Selkoe, 1998). Demnach bilden APP, CRT und PS1 zumindest kurzzeitig einen Komplex, der vielleicht gerade deswegen bisher mittels Co-Lokalisation nicht nachgewiesen werden konnte (Kap. 4.1.3.5, S. 121). Die Frage, ob CRT primär mit dem Substrat oder dem Enzymkomplex verbunden ist, wurde bereits ansatzweise durch eine Co-Isolation des Proteins mit der γ -Sekretase geklärt (Abb. 4.31, S. 123) und lässt durch die von Steiner und Kollegen etablierte, wesentlich genauere Methode eine transiente Beteiligung des Proteins an dem Komplex vermuten (Kap. 4.1.3.8, S. 123).

Sicher ist jedoch, dass CRT nicht zu der aus PS, Nicastrin (NCT), PEN-2 und APH-1 bestehenden Kerneinheit der Sekretase gehört, da es nach den vier Aufreinigungsschritten nicht mehr in der Präparation zu erkennen war. Darüber hinaus konnte das auch APP-bindende Protein nicht zusammen mit dem für die Aktivierung von PS notwendigen Pen-2 und dem an der Stabilisation sowie Formation des Komplexes beteiligten APH-1 isoliert werden (Kaether et al., 2006), was die Annahme stützt, dass Calretikulin nur transient, möglicherweise Substratgebunden mit der γ -Sekretase assoziiert ist.

Im Gegensatz dazu konnte eine Bindung des Chaperons an das als Substratrezeptor (Shah et al., 2005) und *gatekeeper* (De Strooper, 2005) fungierende Nicastrin mittels Co-Immunpräzipitation (Abb. 4.32, S. 124) nachgewiesen sowie eine Beteiligung mindestens der P- und C-Domäne festgestellt werden (Abb. 4.33, S. 125). Aufgrund der hohen Glykosylierung von NCT liegt die Vermutung jedoch nahe, dass diese Interaktion Oligosaccharid-vermittelt ist und daher der ursprünglichen Chaperonfunktion von CRT entspricht. Andererseits könnte eine CRT-bezogene Lektinbindung des Typ1-Transmembranproteins auch vor dessen Komplexierung mit APH-1 sowie PS und PEN-2 stattfinden und eine davon unabhängige Funktion im Bereich der Ca²⁺-Signaltransduktion besitzen, wie sie bereits für Calnexin und ERGIC-53 (*ER-Golgi intermediate compartment-53*) bei einer Beteiligung von mehr als einer N-

Glykosylierungsstelle vermutet worden ist (Morais et al., 2006). Diese Vermutung wird durch die Beteiligung von mindestens zwei CRT-Domänen an der CRT/NCT-Interaktion gestützt. Wie schon erwähnt untersuchte Helen Strekalova den möglichen Einfluss von Calretikulin bzw. der einzelnen CRT-Domänen auf die extrazelluläre Produktion von $A\beta$ und konnte nach transienter Transfektion des Gesamtproteins eine im Vergleich mit der Negativkontrolle geringere Peptidkonzentration, dagegen aber ein in Folge einer Überexpression der CRT-P-Domäne höheres $A\beta$ -Vorkommen im Medium von CHO/APP695-Zellen feststellen. Diese Konzentrationsunterschiede des durch die amyloidogene Prozessierung von APP entstandenen Peptids können einerseits auf eine veränderte Aktivität der γ -Sekretase in Abhängigkeit von dem CRT-Gesamtprotein bzw. der einzelnen Domänen zurückzuführen sein, andererseits aber auch Ausdruck einer diesbezüglich veränderten Oberflächenexpression des Amyloid Vorläuferproteins sein. Da die subzelluläre Lokalisation von APP unter Stressbedingungen merklich gestört ist (Domingues et al., 2007) und das multifunktionale, ubiquitär vorkommende Calretikulin in einer Überexpressionssituation als Gesamtprotein höchstwahrscheinlich einen anderen Einfluss auf die Zelle nimmt, als nur die einzelnen CRT-Domänen, ist nicht auszuschließen, dass eine entsprechende Transfektion unterschiedliche Auswirkungen hat. Mittels der eingesetzten Methoden konnte dieser Sachverhalt zwar nicht eindeutig geklärt, jedoch zumindest eine Vermutung entwickelt werden. Die Oberflächenbiotinylierungsexperimente (Abb. 4.34, S. 126) zeigen die Tendenz einer verringerten APP-Oberflächenexpression nach Transfektion des CRT-Gesamtproteins, während das APP-Vorkommen auf CHO-Zellen, die zuvor mit den einzelnen CRT-Domänen transfiziert worden sind, erhöht war, besonders nach Transfektion der N-Domäne. Diese Tendenz spiegelt sich zumindest bezüglich des CRT-Gesamtproteins und der CRT-NP-Domäne in der von Helen nachgewiesenen $A\beta$ -Produktion wider. Allerdings identifizierten ihre Ergebnisse die CRT-P-Domäne und nicht die CRT-N-Domäne als die die extrazelluläre Konzentration von $A\beta$ am stärksten erhöhende. Demnach würde eine Transfektion der jeweiligen CRT-Konstrukte die Oberflächenexpression von APP derart verändern, dass die in Folge der Transfektion gemessene unterschiedliche $A\beta$ -Konzentration nur eine Auswirkung von diesbezüglich induziertem ER-Stress und keine real veränderte γ -Sekretaseaktivität wäre. Zusammengefasst konnte aber, auch unter Berücksichtigung der im zweiten Teil dieser Diskussion (Kap. 5.2, S. 149) bereits behandelten möglichen Fehlerquellen einer Oberflächenbiotinylierung, nicht auf diese Ergebnisse vertraut werden, weshalb diese Fragestellung mittels der Durchflusszytometrie zu beantworten versucht wurde. Den durchflusszytometrischen Experimente nach, die leider nur einmal wiederholt werden konnten, bleibt das Zelloberflächenvorkommen von APP nach der Transfektion von CRT konstant, ist jedoch, nachdem die Zellen mit der CRT-P-Domäne transfiziert worden sind, um die Hälfte verringert (Abb. 4.35, S. 127). Diese Ergebnisse, in Zusammenhang mit den von Helen Strekalova bestimmten $A\beta$ -Konzentrationen, zeigen eine Beeinflussung der amyloidogenen APP-Prozessierung bzw. der Aktivität der γ -Sekretase in Abhängigkeit von den verschiedenen CRT-Konstrukten. Demnach verringert CRT das extrazelluläre Vorkommen des amyloiden Peptids und inhibiert somit möglicherweise den Enzymkomplex, während nur die CRT-P-Domäne eine starke Erhöhung der $A\beta$ -Konzentration zur Folge hat und somit eventuell die

Aktivität der Sekretase fördert oder den inhibierenden Effekt des CRT-Gesamtproteins aufhebt. Sowohl die mittels ELISA direkt ermittelte Spaltaktivität des Komplexes (Kap. 4.1.4.3, S. 128) als auch die *in vitro*- γ -Sekretaseaktivitätsuntersuchung (Kap. 4.1.4.4, S. 128) in mit Presenilin 1 und APP_{sw} stabil transfizierten HEK-Zellen (Tab. 2.6, S. 33) zeigen keine signifikante Änderung der Aktivität in Folge der Transfektion der entsprechenden CRT-Konstrukte, lassen jedoch eine Tendenz der Steigerung der γ -Sekretaseaktivität bzw. der Erhöhung der Konzentration der Spaltprodukte in Abhängigkeit von der einzelnen CRT-P- sowie CRT-N-Domäne erkennen, wobei der Effekt der CRT-P-Domäne stärker ist, während das Gesamtprotein keinen oder nur einen gering entgegengesetzten Effekt hat. Durch diese Ergebnisse wird die Vermutung des beschriebenen Einflusses von CRT bzw. der CRT-P-Domäne hinsichtlich der Sekretase-vermittelten APP-Proteolyse zwar nicht eindeutig bestätigt, aber gefestigt.

Andersherum scheint auch die veränderte Aktivität von PS1 Auswirkungen auf die Expression von CRT zu haben (Kap. 4.1.4.5, S. 129). Hierbei handelt es sich zwar um ein vorläufiges Ergebnis, aber eine Tendenz ist bereits deutlich zu erkennen. Während im aktiven Zentrum mutiertes PS1-exprimierende HEK-Zellen (Mut, HEK/PS1/SW-D385N-10, Tab. 2.6, S. 33) im Vergleich zu den WT-Zellen generell mehr CRT besitzen, ist der Zelloberflächenanteil jedoch nochmal erhöht (WT, $\sim 1/4$; Mut, $\sim 1/2$; Kap. 4.1.4.5, S. 129). Demnach ist Calretikulin in HEK-Zellen, die einen inaktiven Sekretasekomplex überexprimieren, doppelt so häufig an der Zelloberfläche vertreten, als in solchen, die eine aktive γ -Sekretase besitzen. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf die Beteiligung des Chaperons an dem Vorgang der Sekretase-vermittelten APP-Prozessierung zurückzuführen, kann aber auch die Folge einer davon unabhängigen Funktion sein. CRT könnte einerseits den gebundenen C99- β -geschnittenen Stumpf von APP in einer Art gerichtetem Transport an das aktive Zentrum der γ -Sekretase heranzuführen, kurz mit dieser über PS1 assoziiert sein, eventuell sogar auch zur Stabilisation als Lektin mit den N-Glykosylierungen von Nicastrin, welches bekanntlich als Substratazeptor fungiert, interagieren und direkt nach dem Spaltvorgang allein oder in Begleitung des β -Peptids den Komplex wieder verlassen. Eine Inaktivierung der γ -Sekretase hätte demnach ein längeres Verweilen des Chaperons sowohl in Assoziation mit dem Substrat als auch innerhalb des Enzymkomplexes zur Folge, wodurch es an die Membran gebunden und daher vermehrt dort nachweisbar wäre. Diese Hypothese wird durch die nur transiente Lokalisation von CRT in Verbindung mit der γ -Sekretase und die bereits publizierte Interaktion des Proteins mit dem A β -Peptid gestützt (Duus et al., 2008). Demnach würde aber die CRT-P-Domäne diesen Vorgang durch PS1-Bindung inhibieren, während das Gesamtprotein eine Steigerung der A β -Produktion zur Folge hätte. Dem widerspricht die Tendenz der Ergebnisse sowohl der Oberflächenbiotinylierungsbestimmung als auch der durchflusszytometrischen Untersuchungen der APP-Konzentration von CHO/APP-Zellen nach Transfektion der Zellen mit den unterschiedlichen CRT-Konstrukten, die eher auf eine die APP-Prozessierung inhibierende Funktion des Gesamtproteins und einen entgegengesetzten dominant-negativen Effekt der nur PS1-bindenden CRT-P-Domäne hindeuten. Auch bei einer dem Nicastrin-zugedachten ähnlichen *gatekeeper*-Aufgabe von CRT würde das Chaperon nicht lange in dem Enzymkomplex verweilen, sondern nur durch Bindung genau der Spaltstelle von APP, die

prozessiert werden soll, einen dementsprechenden Vorgang verhindern, wohingegen nur die P-Domäne von CRT diese Interaktion nicht ausführen könnte und demnach der "Schutz" vor der γ -Spaltung aufgehoben wäre.

Allerdings könnte die Verbindung von APP, CRT und PS1 auch eine nicht direkt mit der APP-Prozessierung verbundene Funktion in der Signaltransduktion oder Zell-Adhäsion haben. Sowohl für Presenilin als auch für Nicastrin und APH-1 sind γ -Sekretase-unabhängige Aufgaben z.B. in der Organisation von Zell-Verbindungen publiziert (Doglio et al., 2006) und die Fähigkeit der Presenilone, für Kalzium durchlässige Poren zu bilden sowie deren Beeinflussung durch FAD-Mutationen und Stress ist schon länger bekannt (Tu et al., 2006; Nelson et al., 2007; Lu et al., 2007).

Darüber hinaus interagieren sowohl APP und LRP (Yoon et al., 2007), CRT und LRP (Gardai et al., 2005) als auch PS1 und LRP (Liu et al., 2007) mit Funktionen in der Signaltransduktion, wobei das *Low density lipoprotein receptor-related protein* mit APP um die Bindestelle kompetiert (Leo et al., 2005). LRP wurde bereits im ersten Kapitel des Diskussionsteils als Interaktionspartner des eventuell an APP bindenden α -Actinins und eine Funktion in der Zell-Zell-Kommunikation diskutiert. Aber auch eine apoptotische Aufgabe, wie die des CRT/LRP-Komplexes ist vorstellbar.

Zusammengefasst überwiegen jedoch die Argumente der zuerst vorgestellten Hypothese einer CRT-Funktion als eine Art *gatekeeper* der γ -Prozessierung von APP und es stellte sich die Frage, ob Calretikulin diesbezüglich spezifisch agiert oder eine generelle Rolle innerhalb der γ -Sekretase vermittelten Spaltung übernimmt.

Die Fragestellung wurde mittels des auch als Substrat des Enzymkomplexes bekannten Zelladhäsionsmoleküls L1 (Maretzky et al., 2005) versucht zu beantworten. CRT konnte sowohl mit dem L1-Gesamtprotein (Abb. 4.38, S. 131) als wahrscheinlich auch mit dem gegen die L1-intrazelluläre Domäne (ICD) gerichteten Antikörper (Abb. 4.39, S. 131) co-isoliert werden, womit noch keine Beteiligung des Chaperons an der Prozessierung von L1 durch die γ -Sekretase bestätigt ist. Die Co-Immunpräzipitation der L1-ICD und der dem C99-APP entsprechenden L1-30kDa Fragment (Kap. 4.1.4.7, S. 131) ergaben keine eindeutigen Ergebnisse. Zwar waren mittels Immunoblot-Analyse der Proteinkomplexe in den Spuren der Präzipitationsexperimente keine Banden des CRT-entsprechenden Molekulargewichts, jedoch aber Banden höhermolekularer Komplexe zu sehen, die bisher nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Demnach wurde mit den L1-Fragmenten ICD und 30kDa ein vom CRT-Antikörper erkannter Proteinkomplex von etwa 200kDa co-präzipitiert, der eventuell eine Verbindung des Chaperons mit einem Polymer der jeweiligen Fragmente sein könnte. Unabhängig dieser Spekulationen kann eine Interaktion von CRT und dem α -geschnittenen L1-Fragment nicht ausgeschlossen werden. Um dennoch eine Aussage über die Funktion von CRT bei der γ -Sekretase-vermittelten Proteolyse treffen zu können, wurde die L1-Konzentration in Abhängigkeit einer CRT-Expression in verschiedenen Zellkompartimenten untersucht (Kap. 4.1.4.8, S. 132). Sowohl in SY5Y-Zellen als auch der murinen Fibroblastenzelllinie (K), obwohl weniger ausgeprägt, ist die L1-Gesamtproteinkonzentration in Gegenwart von CRT im Vergleich zu einem geringeren CRT-Vorkommen oder dem kompletten Fehlen des Proteins niedriger,

während sie an der Oberfläche von SY5Y-Zellen nur gering erniedrigt ist. Auch der Überstand dieser Zellen weist nach CRT-Transfektion eine deutlich geringere Menge an L1 auf, während die nur die CRT-NP-Domäne exprimierenden K42-Zellen im Gegensatz dazu eine erhöhte Konzentration des Zelladhäsionsmoleküls aufweisen. Diese Ergebnisse stützen die zuerst für die Interaktion von CRT, APP und der γ -Sekretase aufgestellte Hypothese einer Substrattransportfunktion von CRT. Wenn CRT vorhanden ist, gelangt das Substrat in den Bereich des Enzymkomplexes, kann von Nicastrin gebunden sowie von PS gespalten werden und tritt deswegen verringert in voller Länge in den jeweiligen Kompartimenten auf, wohingegen nur die CRT-P-Domäne die PS-Bindung blockiert ohne mit dem Substrat interagieren zu können und daher eine Erhöhung der L1-Konzentration zu sehen ist. Der geringe Unterschied an der Zelloberfläche kann darauf zurückzuführen sein, dass die Sekretase-vermittelte Spaltung zu einem großen Teil in vielen verschiedenen subzellulären Kompartimenten stattfindet und die Zusammensetzung sowie die Aktivität des Komplexes von der jeweiligen Mikroumgebung abhängig ist (Stoeck et al., 2006; Morais et al., 2008; Spasic & Annaert, 2008). Dadurch kann auch die anscheinend kaum veränderte Aktivität der Sekretase an der Zelloberfläche in Abhängigkeit der CRT-Expression bezüglich des Amyloid Vorläuferproteins erklärt werden. Das für den Export bestimmte A β gelangt maßgeblich durch endosomale Proteolyse innerhalb des sekretorischen Transportweges an die Zelloberfläche und wird nur minimal durch eine Aktivität des Enzymkomplexes an der Oberfläche der Zelle beeinflusst. Demnach könnte sogar eine Beteiligung von LRP durch Rekrutierung der in den Vorgang verwickelten Proteine in bestimmte *lipid rafts* zu erklären sein (Wu & Gonias, 2005; Hur et al., 2008).

Zusammengefasst scheint CRT zwar generell bzw. hinsichtlich APP und L1 an der γ -Sekretase-vermittelten Spaltung der beiden Proteine beteiligt zu sein, jedoch substratspezifisch unterschiedlich zu agieren. Demnach fördert das Chaperon die Proteolyse des Substrats L1 und stellt damit eine Art Transport- oder Geleitprotein für das Zelladhäsionsmolekül dar, das dieses bindet und an das aktive Zentrum der γ -Sekretase heranführt. Dagegen blockiert die nur mit PS-assoziierte P-Domäne die Bindestelle im Enzymkomplex und übt somit eine entgegengesetzte Funktion aus. Ist jedoch APP das Substrat, so fungiert CRT eher als eine Art *gatekeeper*, eine Funktion die auch NCT zugeordnet wird. Möglicherweise ist NCT der generelle Substratazeptor, während das Chaperon proteinspezifisch agiert. So könnte CRT das Amyloid Vorläuferprotein vor der amyloidogenen Proteolyse "schützen" bis es, vielleicht ausgelöst durch eine Konformationsänderung in Folge von Kalziumbindung oder einem ähnlichen aktivierenden Prozeß, die γ -Spaltstelle von APP freigibt und der generelle Vorgang der γ -Sekretase-vermittelten Proteolyse stattfinden kann, so wie es bei einer Bindung nur der CRT-P-Domäne bereits geschehen ist, da diese nicht in der Lage ist die APP- γ -Spaltstelle zu protektieren. Dieses noch sehr vage, aber durch zahlreiche Ergebnisse gestützte Modell der CRT-Beteiligung an dem Vorgang der γ -Spaltung von Typ 1 Transmembranproteinen wird in der Abb. (Abb. 5.2, S. 157) am Beispiel von APP schematisch dargestellt.

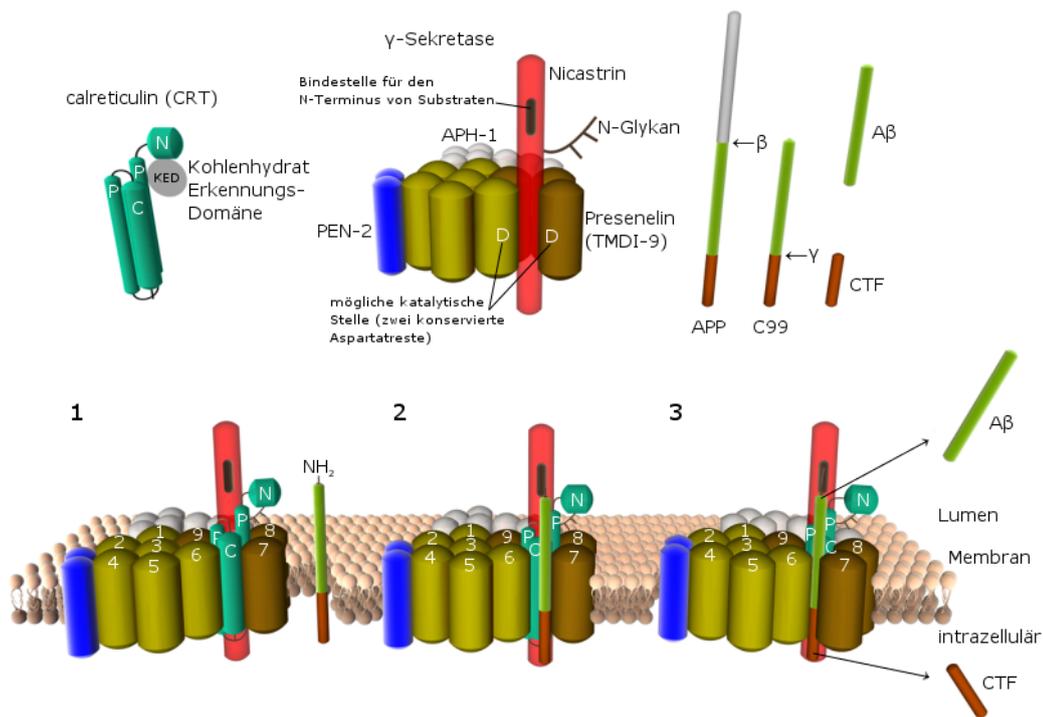


Abb. 5.2: Modell der möglichen inhibierenden Funktion von CRT bei der γ -Sekretase-vermittelten Spaltung von APP

CRT interagiert sowohl durch die CRT-C-Domäne mit der γ -Spaltstelle von APP, als auch CRT-P-Domänenvermittelt mit dem PS-N-terminalen Fragment und möglicherweise durch die Kohlenhydraterkennungsregion mit den N-Glykanen auf NCT und ist so in der Lage, die γ -Proteolyse von APP zu verhindern (1) bis aufgrund eines möglicherweise die Konformation von CRT verändernden Vorgangs das Chaperon die APP- γ -Spaltstelle freigibt (2) und der Prozeß der γ -Sekretase-vermittelten Proteolyse von APP stattfindet, wodurch die intrazelluläre Domäne (AICD) und das amyloidogene A β -Peptid entstehen (3).

5.4 Metalloprotease-vermittelte Spaltung der Zelladhäsionsmoleküle APP und L1 am Beispiel der Gelatinasen sowie ADAM8 und ADAM9

Das Ziel dieses Teils der Arbeit war es, die Spaltung der Zelladhäsionsmoleküle APP und L1 durch Metalloproteasen im Vergleich an Beispielen vor dem Hintergrund der bereits bekannten Tatsachen zu betrachten und weiter auszuführen. Sowohl APP als auch L1 sind Typ 1 Transmembranproteine und werden durch den Mechanismus der regulierten Intramembranspaltung (RIP, Kap. 1.4, S. 7) prozessiert (Maretzky et al., 2005; Ebinu & Yanker, 2002), wobei in beiden Fällen diese Proteolyse mitunter zu der Entstehung einer schweren neurodegenerativen Erkrankung führt, die bisher nicht behandelbar ist (Fransen et al., 1995; Govaerts et al., 2007). Zur Durchführung der Proteolyseexperimente wurden bewusst die *a disintegrin and metallo*-Proteasen ADAM8 und ADAM9 sowie die Gelatinasen MMP-2 (A) und MMP-9 (B) gewählt. Zum einen, da bei diesen Enzymen für eines der Zelladhäsionsmoleküle eine Spaltung aufgeklärt ist, während das andere nicht analysiert worden ist, und zum anderen

aufgrund der von Ina Kalus begonnenen Studie bezüglich L1 (Kalus, 2005), die im Verlauf dieser Arbeit fortgeführt werden sollte.

Die ADAMs werden bereits durch die Vertreter ADAM10 und ADAM17 und deren Funktion als α -Sekretase mit APP in Verbindung gebracht (Bandyopadhyay et al., 2006), wobei auch für ADAM9 eine diesbezügliche Aufgabe identifiziert worden ist (Deuss et al., 2008) und eine ADAM8-vermittelte Proteolyse der Ektodomäne von APP unter pathologischen Bedingungen vermutet wird (Naus et al., 2006). L1 wird zwar in einem der α -Sekretase-Prozessierung von APP entsprechenden Vorgang von ADAM10 nahe der Membran gespalten (Gutwein et al., 2003), hinsichtlich einer Proteolyse mittels ADAM8 oder ADAM9 ist bisher nichts bekannt. Auch die Beziehung der Gelatinase A und APP ist bereits charakterisiert, jedoch durch die in der Ektodomäne von APP enthaltene MMP-2-Inhibierungsdomäne (Higashi & Miyazaki, 2008) von einer gegensätzlichen Funktion, wobei über eine Verbindung mit L1 nichts publiziert ist. Die Prozessierung des Zelladhäsionsmoleküls L1 durch MMP-9 war ein Inhalt der Arbeit von Ina Kalus, im Rahmen derer sie u.a. ein durch MMP-9-Spaltung produziertes etwa 80kDa großes L1-Fragment, das sowohl mit dem anti-Fc- als auch mit dem 555-L1-Antikörper erkannt wird (Kalus, 2005), identifizieren konnte. Hinsichtlich APP ist bekannt, dass die Gelatinase B $A\beta$ binden kann und mittels einer α -Sekretase-ähnlichen Funktion in der Lage ist, die Amyloid Plaques abzubauen (Nalivaeva et al., 2008).

Während unter Verwendung des eingesetzten Proteolyseansätze die L1-Ektodomäne nicht durch ADAM8 gespalten worden ist, sind durch eine diesbezügliche Prozessierung der an Fc-gebundenen Ektodomäne von APP zwei Fragmente mit einer Größe von 26kDa und ungefähr 60kDa aufgetreten, von denen nur das größere unter Verwendung des polyklonalen anti-APP-Antikörpers erkannt werden konnte (Abb. 4.42, S. 134). Darüber hinaus wurde ein wahrscheinlich in Abhängigkeit des Fc-Tags aufgetretener *Shift* hinsichtlich des Molekulargewichts der entsprechenden Banden beobachtet, der die Einschätzung der objektiven Größe der entstandenen APP-Fragmente erschwerte. Anhand der verwendeten Antikörper sind die Banden eindeutig dem Fc-Tag (26kDa) und wahrscheinlich der extrazellulären Domäne (~ 55 kDa) zuzuordnen. Da eine der Ektodomäne entsprechende Bande auch mit dem anti-Fc-Antikörper detektierbar war, ist die Vermutung eines Degradationsproduktes nicht ganz abwegig, obwohl es sich auch um ein N-terminal gespaltenes APP-Fragment handeln könnte. Die genaue Lokalisation der Stelle, an der der Fc-Tag bzw. die Transmembrandomäne gespalten wird, ist nicht geklärt. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine α -Sekretase-ähnliche Prozessierung der Ektodomäne von APP handelt und bestätigt somit die von Naus und Kollegen publizierte Annahme (Naus et al., 2006). Im Hinblick auf ADAM8 besteht demnach keine Parallele zwischen den Zelladhäsionsmolekülen APP und L1. Die ADAM9-vermittelte Spaltung der Proteine zeigt jedoch in beiden Fällen das Entstehen von diesbezüglich proteolytisch entstandenden Fragmenten (Abb. 4.42, S. 134). Hinsichtlich der APP-Proteolyse durch ADAM9 entsprechen die Produkte unter Berücksichtigung des beschriebenen Molekulargewichts-Shifts genau denen der ADAM8-Spaltung, wodurch die bereits publizierte α -Sekretasefunktion der Metalloprotease hinsichtlich APP bestätigt ist. Die Prozessierung von L1 durch ADAM9 resultiert in einer spezifischen sowohl von dem anti-Fc- als

auch dem 555-anti-L1-Antikörper erkannten Bande im Bereich von 100kDa und könnte mit der von Ina Kalus postulierten auch für MMP-9 geltenden Spaltstelle im Bereich der ersten Fibronectin-Domäne ähnlich sein. Diese Vermutung wird zudem durch die Übereinstimmung der ADAM9- und MMP-9-Spaltmuster des Amyloid Vorläuferproteins gestützt.

Während weder eine Proteolyse von APP noch von L1 durch die Gelatinase A mittels dieses Ansatzes nachweisbar war, resultierte die Gelatinase B-Prozessierung von APP in dem auch durch ADAM-Spaltung erhaltenen Spaltmuster (unter Berücksichtigung des *Shifts* des Molekulargewichtes) mit wahrscheinlich ähnlichen Fragmenten von ~26kDa (*Fc-Tag*) und ~55kDa (möglicherweise die Ektodomäne), das jedoch auch wieder von dem anti-Fc-Antikörper erkannt wurde und demnach auch ein Degradationsprodukt sein könnte, zumal eine diesbezügliche Bande nach längerer Exposition des entsprechenden Films auch eine Bande in der Negativkontrolle erkennen ließ. Die MMP-9-vermittelte Spaltung der L1-Fn1-5-Domäne ergab ein 80kDa Fragment (Abb. 4.44, S. 136; Kalus, 2005). Verwunderlich war, dass ein entsprechendes L1-Fragment nicht bzw. nur sehr schwach nach MMP-9 Prozessierung der kompletten Ektodomäne von L1 zu erkennen war. Dies könnte einerseits auf eine geringere Affinität des Enzyms für die größere und vielleicht sterisch ungeeignere extrazelluläre Domäne zurückzuführen sein und andererseits an einer möglichen Inaktivierung der Gelatinase B aufgrund von Degradation, wie bereits leicht in dem Bild der Zymographie ersichtlich ist (Abb. 4.43, S. 135), liegen. Das von Ina Kalus im Rahmen ihrer Doktorarbeit identifizierte L1-80kDa-Fragment (Kalus, 2005) wurde versucht mittels einer 555-anti-L1-gekoppelten Säule anzureichern, um es nach Ausschneiden aus dem entsprechenden Coomassie-gefärbten Gel (Abb. 4.45, S. 137) zur Sequenzanalyse durch Edman-Abbau zu schicken, um so die genaue MMP-9 Konsensussequenz identifizieren zu können. Aufgrund einer zu geringen Konzentration des Fragments im Ausgangsmaterial (Gehirnhomogenat von Wildtyp-Mäusen) und eventuell einer unzureichenden Bindungseffizienz der eingesetzten Antikörper wurde dieses Vorhaben bisher nicht erreicht. Es wurde jedoch die durch Sucrosegradientenzentrifugation (Abb. 3.1, S. 59) erhaltene Myelinfraktion der Gehirne von WT-Mäuse als die mit der L1-80kDa-angereicherten identifiziert(nicht gezeigt) und eine Aufreinigung neuen 555 anti-L1-IgGs begonnen, um diesen Versuch mit einer geeigneteren Ausgangssituation zu wiederholen.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass abgesehen von den Ergebnissen bezüglich ADAM8 eine generelle Ähnlichkeit der Spaltmuster der Zelladhäsionsmoleküle APP und L1 hinsichtlich ihrer hier diskutierten Proteolyse durch Metalloproteasen besteht. Diese Parallelen spiegeln sich möglicherweise auch in den resultierenden neurodegenerativen Krankheiten, Alzheimer-Krankheit und CRASH-Syndrom, wider und können demnach helfen, ein generelles Verständnis sowohl der physiologischen Funktionen der Proteine als auch der Entstehung der pathologischen Vorgänge, an denen sie beteiligt sind, zu erlangen.

5.5 Allgemeine Einschätzung der Ergebnisse für das Verständnis der Ursachen und Therapie der Alzheimer-Krankheit

Es binden viele Proteine unterschiedlicher Struktur und Aufgaben an das Amyloid Vorläuferprotein, wobei die jeweiligen Interaktionen selten direkt etwas mit der γ -Sekretase-vermittelten Proteolyse des glykosylierten Zelladhäsionsproteins sowie der Produktion von $A\beta$ zu tun haben. Wie am Beispiel der Na^+/K^+ -ATPase und des Myelin-assoziierten Glykoproteins (MAG) diskutiert (Kap. 5.1, S. 144; Kap. 5.1, S. 145), sind diesbezügliche Funktionen im Bereich der Zell-Zell-Kommunikation, Neurogenese und Myelinausbildung wahrscheinlicher und könnten auch, wie es durch das Zusammenspiel von Calretikulin, APP und Presenilin verdeutlicht wird (Kap. 5.3, S. 151), der Kalziumsignaltransduktion oder Qualitätskontrolle entsprechen. Allein diese Vielzahl noch ungeklärter Vorgänge macht deutlich, dass ein Verständnis der physiologischen Aufgaben von APP eine bedeutende Grundlage für das Erkennen der Ursachen und damit für das Entwickeln einer Therapie der Alzheimer-Krankheit ist.

Darüber hinaus scheint der Vorgang der γ -Sekretasespaltung weitaus komplexer zu sein, als bisher angenommen und unter der Beteiligung von mehr als nur den vier Kernkomplexkomponenten stattzufinden (Kap. 5.3, S. 151) sowie in unterschiedlicher Zusammensetzung in Abhängigkeit von noch nicht identifizierten Faktoren aufzutreten (Spasic & Annaert, 2008). Zu Beachten ist, dass, wenn man sich an dem ähnlichen Metabolismus des Zelladhäsionsmoleküls L1 orientiert (Kap. 5.4, S. 157), die γ -Proteolyse neben dem $A\beta$ -Peptid auch immer die intrazelluläre Domäne (Schultheis et al., 2007) freigibt, die in den Zellkern geht und wichtige Funktionen im Bereich von Signaltransduktion und Genexpression hat (Gerrit Wolters, unveröffentlichte Ergebnisse).

Außerdem sind bereits Interaktionen des $A\beta$ -Peptids mit einigen der als APP-Bindepartner identifizierten Proteine bekannt (ATP-Synthase, Schmidt et al., 2007; GAPDH, Verdier et al., 2008; 14-3-3, Sumioka et al., 2005; CRT, Duus et al., 2008), die mehr einer Folge der Krankheit oder einer physiologischen Funktion zuzuordnen sind, als einen Auslöser der pathologischen Abläufe zu bilden. Dementsprechend würde eine an der γ -Spaltung oder dem β -Peptid ansetzende Therapie der Alzheimer-Krankheit, wie es bereits mit Sekretase-Blockern und der $A\beta$ -Immunisierung durchgeführt wird, gleichzeitig sowohl für die Zelle als auch die interzelluläre Kommunikation sowie für die Neurogenese essentielle Vorgänge inhibieren und könnte daher problematisch sein. Sinnvoller ist es wahrscheinlich, die Aggregation der $A\beta_{42}$ -Isoform zu verhindern oder speziell den Abbau der Amyloid Plaques zu fördern.

Zusammengefasst zeigt dieses Zusammenwirken zahlreicher Ansätze, bei denen noch viele Fragen offen bleiben und die weitere Arbeit erfordern, gerade dadurch, wie komplex und bisher wenig verstanden der Vorgang der APP-Prozessierung und die genaue Aufgabe der entstehenden Produkte einerseits sowie die physiologischen Funktionen der beteiligten Proteine andererseits sind.

Literatur

Abu-Hamad S, Zaid H, Israelson A, Nahon E, Shoshan-Barmatz V (2008). Hexokinase -i protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: Mapping the site of binding. *J Biol Chem*, page Epub ahead of print.

Agca C, Fritz JJ, Walker LC, Levey AI, Chan AW, Lah JJ, Agca Y (2008). Development of transgenic rats producing human beta amyloid precursor protein as a model for alzheimer's disease, transgene and endogenous app genes are regulated tissue-specifically. *BMC Neurosci*, 9(1):28, Epub ahead of print.

Aitken A (2006). 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol*, 16(3):162–172, Review, Epub 2006 Apr 1.

Aksenov MY, Aksenova MV, Payne RM, Smith CD, Markesbery WR, Carney JM (1997). The expression of creatine kinase isoenzymes in neocortex of patients with neurodegenerative disorders: Alzheimers and picks disease. *Exp Neurol*, (146):458–465.

Alberti S, Gregorio EA, Spadella CT, Cojocel C (2007). Localization and irregular distribution of na,k-atpase in myelin sheath from rat sciatic nerve. *Tissue Cell*, 39(3):195–201, Epub 2007 May 15.

Aleshin AE, Zeng C, Bartunik HD, Fromm HJ, Honzatko RB (1998). Regulation of hexokinase i: crystal structure of recombinant human brain hexokinase complexed with glucose and phosphate. *J Mol Biol*, 282(2):345–357.

Alitalo K, Schwab M, Lin CC, Varmus HE, Bishop JM (1983). Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80(6):1707–1711.

Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G (1995). Binding of gelatinases a and b to type-i collagen and other matrix components. *Biochem J*, (309):299–306.

Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM (2003). Adams family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res*, 74(3):342–352, Review.

Almeida CG, Tampellini D, Takahashi RH, Greengard P, Lin MT, Snyder EM, Gouras GK (2005). Beta-amyloid accumulation in app mutant neurons reduces psd-95 and glur1 in synapses. *Neurobiol Dis*, 20(2):187–198.

Alzheimer A (1907). über eine eigenartige erkrankung der hirnrinde. *Allg Z Psychiat Psych-Gerichtl Med*, 64(1-2):146–148.

Anandatheerthavarada HK, Devi L (2007). Amyloid precursor protein and mitochondrial dysfunction in alzheimer's disease. *Neuroscientist*, 13(6):626–638, Review, Epub 2007 Oct 2.

Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin MA, Avadhani NG (2003). Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol*, 161(1):41–54.

- Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Lieberburg I, Robakis NK** (1991). Exact cleavage site of alzheimer amyloid precursor in neuronal pc-12 cells. *Neurosci Lett*, (128):126–128.
- Ando K, Iijima KI, Elliott JI, Kirino Y, Suzuki T** (2001). Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with fe65 affects the production of beta-amyloid. *J Biol Chem*, 276(43):40353–40361, Epub 2001 Aug 21.
- Andreoni F, Serafini G, Laguardia ME, Magnani M** (2005). Bovine hexokinase type i: full-length cDNA sequence and characterisation of the recombinant enzyme. *Mol Cell Biochem*, 268(1-2):9–18.
- Andrin C, Pinkoski MJ, Burns K, Atkinson EA, Krahenbuhl o, Hudig D, Fraser SA, Winkler U, Tschopp J, opas M, Bleackley RC, Michalak M** (1998). Interaction between a ca²⁺-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic t-cell granules. *Biochemistry*, 37(29):10386–10394.
- Annaert W, De Strooper B** (2002). A cell biological perspective on alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, (18):25–51, Review, Epub 2002 Apr 2.
- Appel F, Holm J, Conscience JF, von Bohlen und Halbach F, Faissner A, James P, Schachner M** (1995). Identification of the border between fibronectin type iii homologous repeats 2 and 3 of the neural cell adhesion molecule 11 as a neurite outgrowth promoting and signal transducing domain. *J Neurobiol*, 28(3):297–312.
- Arimura N, Inagaki N, Chihara K, Menager C, Nakamura N, Amano M, Iwamatsu A, Goshima Y, Kaibuchi K** (2000). Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by rho-kinase. evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *J Biol Chem*, (275):23973–23980.
- Arimura N, Menager C, Fukata Y, Kaibuchi K** (2004). Role of crmp-2 in neuronal polarity. *J Neurobiol*, 58(1):34–47, Review.
- Armstrong J, Boada M, Rey MJ, Vidal N, Ferrer I** (2004). Familial alzheimer disease associated with a713t mutation in app. *Neurosci Lett*, 370(2-3):241–243.
- Ausubel LJ, Kwan CK, Sette A, Kuchroo V, Hafler DA** (1996). Complementary mutations in an antigenic peptide allow for crossreactivity of autoreactive t-cell clones. *Proc Natl Acad Sci USA*, (93):15317–15322.
- Azoulay-Zohar H, Israelson A, Abu-Hamad S, Shoshan-Barmatz V** (2004). *Biochem J*(377):347–355.
- Bürklen TS, Schlattner U, Homayouni R, Gough K, Rak M, Szeghalmi A, Wallimann T** (2006). The creatine kinase/creatine connection to alzheimer's disease: Ck-inactivation, app-ck complexes and focal creatine deposits. *J Biomed Biotechnol*, 2006(3):35936.
- Baiden-Amissah K, Joashi U, Blumberg R, Mehmet H, Edwards AD, Cox PM** (1998,). Expression of amyloid precursor protein (beta-app) in the neonatal brain following hypoxic ischaemic injury. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 24(5):346–352.
- Bailey K, Webb EC** (1948). Purification of yeast hexokinase and its reaction with betabeta'-dichlorodiethyl sulphide. *Biochem J*, 42(1):60-8.
- Baksh S, Michalak M** (1991). Expression of calreticulin in escherichia coli and identification of its ca²⁺ binding domains. *J Biol Chem*, 266(32):21548–21465.
- Baksh S, Burns K, Andrin C, Michalak M** (1995). Interaction of calreticulin with protein disulfide isomerase. *J Biol Chem*, 270(52):31338–31344.
- Bandyopadhyay S, Goldstein LE, Lahiri DK, Rogers JT** (2007). Role of the app non-amyloidogenic signaling pathway and targeting alpha-secretase as an alternative drug target for treatment of alzheimer's disease. *Curr Med Chem*, 14(27):2848–2864.

- Bandyopadhyay S, Hartley DM, Cahill CM, Lahiri DK, Chattopadhyay N, Rogers JT** (2006). Interleukin-1alpha stimulates non-amyloidogenic pathway by alpha-secretase (adam-10 and adam-17) cleavage of app in human astrocytic cells involving p38 map kinase. *J Neurosci Res*, 84(1):106–118.
- Barrantes A, Rejas MT, Bentez MJ, Jimnez JS** (2007). Interaction between alzheimer's abeta1-42 peptide and dna detected by surface plasmon resonance. *J Alzheimers Dis*, 12(4):345–355.
- Barton DE, Arquint M, Roder J, Dunn R, Francke U** (1987). The myelin-associated glycoprotein gene: mapping to human chromosome 19 and mouse chromosome 7 and expression in quivering mice. *Genomics*, 1(2):107–112.
- Beard DA, Vinnakota KC, Wu F** (2008). Detailed enzyme kinetics in terms of biochemical species: study of citrate synthase. *PLoS ONE*, 3(3):e1825.
- Beaudeux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ** (2004). Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med*, 42(2):121–131, Review.
- Beel AJ, Sanders CR** (2008). Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases. *Cell Mol Life Sci*, page Epub ahead of print.
- Beer S, Oleszewski M, Gutwein P, Geiger C, Altevogt P** (1999). Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of 11 adhesion molecule. *J Cell Sci*, 112(Pt 16):2667–2675.
- Bellucci C, Lilli C, Baroni T, Parnetti L, Sorbi S, Emiliani C, Lumare E, Calabresi P, Balloni S, Bodo M** (2007). Differences in extracellular matrix production and basic fibroblast growth factor response in skin fibroblasts from sporadic and familial alzheimer's disease. *Mol Med*, 13(9-10):542–550.
- Bencharit S, Cui CB, Siddiqui A, Howard-Williams EL, Sondak J, Zuobi-Hasona K, Aukhil I** (2007). Structural insights into fibronectin type iii domain-mediated signaling. *J Mol Biol*, 367(2):303–309, Epub 2006 Oct 11.
- Benjannet S, Elagoz A, Wickham L, Mamarbachi M, Munzer JS, Basak A, Lazure C, Cromlish JA, Sisodia S, Checler F, Chrtien M, Seidah NG** (2001). Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. the pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J Biol Chem*, 276(14):10879–10887, Epub 2001 Jan 10.
- Berry MD** (2004). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a target for small-molecule disease-modifying therapies in human neurodegenerative disorders. *J Psych Neurosci*, (29):337–345.
- Bertram L, Hiltunen M, Parkinson M, et al** (2005). Family-based association between alzheimer's disease and variants in ubqln1. *N Engl J Med*, 352(9):884–894.
- Bertrand E, Brouillet E, Caille I, Bouillot C, Cole GM, Prochiantz A, Allinquant B** (2001). A short cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis in vitro and in vivo. *Mol Cell Neurosci*, (18):503–511.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA** (1973). Morphology and growth, tumorigenicity and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, (33):2643–2652.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS** (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*, (38):3751–3757.
- Bigler D, Chen M, Waters S, White JM** (1997). A model for sperm-egg binding and adams and integrins. *Trends Cell Biol*, (7):220–225.
- Black RA, White JM** (1998). Adams: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol*, 10(5):654–659, Review.

Blalock JE, Bost KL (1986). Binding of peptides that are specified by complementary rnas. *Biochem J*, 234(3):679–683.

Blalock JE, Bost KL (1988). Ligand receptor characteristics of peptides encoded by complementary nucleic acids: implications for a molecular recognition code. *Recent Prog Horm Res*, (44):199–222, Review, No abstract available.

Blalock JE, Smith EM (1984). Hydropathic anti-complementarity of amino acids based on the genetic code. *Biochem Biophys Res Commun*, 121(1):203–207.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*, 368(9533):387–403, Review.

Blobel CP (2000). Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr Opin Cell Biol*, 12(5):606–612, Review.

Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K (1999). Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci*, (55):639–652.

Bode W, Gomis-Rth FX, Steckler W (1993). Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett*, 27;331(1-2):134–40.

Bodendorf U, Danner S, Fischer F, Stefani M, Sturchler-Pierrat C, Wiederhold KH, Staufenbiel M, Paganetti P (2002). Expression of human beta-secretase in the mouse brain increases the steady-state level of beta-amyloid. *J Neurochem*, 80(5):799–806.

Bong SM, Moon JH, Jang EH, Lee KS, Chi YM (2008). Overexpression, purification, preliminary x-ray crystallographic analysis of human brain-type creatine kinase. *J Microbiol Biotechnol*, 18(2):295–298.

Bost KL, Blalock JE (1989). Production of anti-idiotypic antibodies by immunization with a pair of complementary peptides. *J Mol Recognit*, 1(4):179–183.

Bost KL, Smith EM, Blalock JE (1985a). Similarity between the corticotropin (acth) receptor and a peptide encoded by an rna that is complementary to acth mrna. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82(5):1372–1375.

Bost KL, Smith EM, Blalock JE (1985b). Regions of complementarity between the messenger rnas for epidermal growth factor, transferrin, interleukin-2 and their respective receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 128(3):1373–1380.

Boston PF, Jackson P, Kynoch PA, Thompson RJ (1982). Purification, properties, immunohistochemical localisation of human brain 14-3-3 protein. *Neurochem*, 38(5):1466–1474.

Bracco L, Gallato R, Grigoletto F, Lippi A, Lepore V, Bino G, Lazzaro MP, Carella F, Piccolo T, Pozzilli C, et al. (1994) Factors affecting course and survival in Alzheimer's disease. A 9-year longitudinal study. *Arch Neurol*, 51(12):1213–9.

Brümmendorf T, Rathjen FG (1995). Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile*, 2(9):963–1108, Review, No abstract available.

Brümmendorf T, Kenwrick S, Rathjen FG (1998). Neural cell recognition molecule 11: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr Opin Neurobiol*, 8(1):87–97, Review.

Brentani RR (1988). Biological implications of complementary hydropathy of amino acids. *J Theor Biol*, 135(4):495–499.

Brentani RR (1990). More about complementary hydropathy. *Trends Biotechnol*, 8(10):281–282, No abstract available.

- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ** (1993). optimized survival of hippocampal neurons in b27-supplemented neurobasal. a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res*, 35(5):567–576.
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM** (2002). Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol*, (3):207–214.
- Broderick MJ, Winder SJ** (2005). Spectrin, alpha-actinin, dystrophin. *Adv Protein Chem*, (70):203–246, Review.
- Brown M, Jacobs T, Eickholt B, Ferrari G, Teo M, Monfries C, Qi RZ, Leung T, Lim L, Hall C** (2004). Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse. *J Neurosci*, 13;24(41):8994-9004.
- Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR** (2005). Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect*, 113(9):1250–1256, Review.
- Burnette WN** (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein a. *Anal Biochem*, 112(2):195–203.
- Bush AI, Pettingell WH Jr, de Paradis M, Tanzi RE, Wasco W** (1994). The amyloid beta-protein precursor and its mammalian homologues. evidence for a zinc-modulated heparin-binding superfamily. *J Biol Chem*, 269(43):26618–26621.
- Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R** (2007). Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of alzheimer’s disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med*, 43(5):658–677, Review, Epub 2007 Jun 13.
- Byk T, Ozon S, Sobel A** (1998). The ulip family phosphoproteins–common and specific properties. *Eur J Biochem*, 254(1):14–24.
- Canevari L, Clark JB, Bates TE** (1999). beta-amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex iv activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett*, 457(1):131–134.
- Cao X, Sudhof TC** (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of app with fe65 and histone acetyltransferase tip60. *Science*, (293):115–120.
- Cao X, Sudhof TC** (2004). Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem*, (279):24601–24611.
- Capell A, Beher D, Prokop S, Steiner H, Kaether C, Shearman MS, Haass C** (2005). Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway. *J Biol Chem*, 280(8):6471–6478, Epub 2004 Dec 10.
- Capell A, Kaether C, Edbauer D, Shirotani K, Merkl S, Steiner H, Haass C** (2003). Nicotinic acetylcholine receptor interacts with gamma-secretase complex components via the n-terminal part of its transmembrane domain. *J Biol Chem*, 278(52):52519–52523, Epub 2003 Nov 5.
- Capell A, Saffrich R, olivo JC, Meyn L, Walter J, Grünberg J, Mathews P, Nixon R, Dotti C, Haass C** (1997). Cellular expression and proteolytic processing of presenilin proteins is developmentally regulated during neuronal differentiation. *J Neurochem*, 69(6):2432–2440.
- Caragounis A, Du T, Filiz G, Laughton KM, Volitakis I, Sharples RA, Cherny RA, Masters CL, Drew SC, Hill AF, Li QX, Crouch PJ, Barnham KJ, White AR** (2007). Differential modulation of alzheimer’s disease amyloid beta-peptide accumulation by diverse classes of metal ligands. *Biochem J*, 407(3):435–450.
- Chan YM, Jan YN** (1998). Roles for proteolysis and trafficking in notch maturation and signal transduction. *Cell*, (94):423–426.

- Chen F, Gu Y, Hasegawa H, Ruan X, Arawaka S, Fraser P, Westaway D, Mount H, St George-Hyslop P** (2002). Presenilin 1 mutations activate gamma 42-secretase but reciprocally inhibit epsilon-secretase cleavage of amyloid precursor protein (app) and s3-cleavage of notch. *J Biol Chem*, 277(39):36521–36526, Epub 2002 Jul 15.
- Chen JX, Yan SD** (2007). Amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction. *J Alzheimers Dis*, 12(2):177–184, Review.
- Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS** (1990). Npxy, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*, (265):3116–3123.
- Chen X, Yan SD** (2006). Mitochondrial abeta: a potential cause of metabolic dysfunction in alzheimer's disease. *IUBMB Life*, 58(12):686–694, Review.
- Chi SL, Pizzo SV** (2006). Cell surface fllo atp synthase: a new paradigm? *Ann Med*, 38(6):429–438, Review.
- Chromy BA, Nowak RJ, Lambert MP, Viola KL, Chang L, Velasco PT, Jones BW, Fernandez SJ, Lacor PN, Horowitz P, Finch CE, Krafft GA, Klein WL** (2003,). Self-assembly of abeta(1-42) into globular neurotoxins. *Biochemistry*, 42(44):12749–12760.
- Chyung JH, Selkoe DJ** (2003). Inhibition of receptor-mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid beta-protein at the cell surface. *J Biol Chem*, 278(51):51035–51043, Epub 2003 oct 2.
- Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S, Holtzman DM** (2008). Abstract endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron*, 58(1):42–51.
- Citron M, oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ** (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*, 360(6405):672–674.
- Claeyssen E, Wally O, Matton DP, Morse D, Rivoal J** (2006). Cloning, expression, purification, properties of a putative plasma membrane hexokinase from solanum chacoense. *Protein Expr Purif*, 47(1):329–339, Epub 2005 Dec 5.
- Corbett EF, Oikawa K, Francois P, Tessier DC, Kay C, Bergeron JJ, Thomas DY, Krause KH, Michalak M** (1999). Ca²⁺ regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *J Biol Chem*, 274(10):6203–6211.
- Cotman CW, Hailer NP, Pfister KK, Soltesz I, Schachner M** (1998). Cell adhesion molecules in neural plasticity and pathology: similar mechanisms, distinct organizations? *Prog Neurobiol*, (55):659–669.
- Coulson EJ, Paliga K, Beyreuther K, Masters CL** (2000). What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int*, (36):175–184.
- Crawford RM, Ranki HJ, Botting CH, Budas GR, Jovanovic A** (2002). Creatine kinase is physically associated with the cardiac atp-sensitive k⁺ channel in vivo. *FASEB J*, (16):102–104.
- Cummins CJ, Glover RA** (1978). Propagation and histological characterization of a homotypic population of astrocytes derived from neonatal rat brain. *J Anat*, 125(Pt 1):117–125.
- Cupers P, Orlans I, Craessaerts K, Annaert W, De Strooper B** (2001). The amyloid precursor protein (app)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. *J Neurochem*, (5):1168–1178.
- Curran S, Murray GI** (1999). Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol*, (189):300–308.

- David S, Shoemaker M, Haley BE** (1998). Abnormal properties of creatine kinase in alzheimers disease brain: Correlation of reduced enzyme activity and active site photolabeling with aberrant cytosol-membrane partitioning. *Mol Brain Res*, (54):276–287.
- David V, Hochstenbach F, Rajagopalan S** (1993). Brenner mb interaction with newly synthesized and retained proteins in the endoplasmic reticulum suggests a chaperone function for human integral membrane protein ip90 (calnexin). *J Biol Chem*, 268(13):9585–9592.
- Davoli MA, Fourtounis J, Tam J, Xanthoudakis S, Nicholson D, Robertson GS, Ng GY, Xu D** (2002). Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and dna fragmentation following transient focal ischemia in the rat. *Neuroscience*, 115(1):125–136.
- Del Prete A, Zaccagnino P, Di Paola M, Saltarella M, Oliveros Celis C, Nico B, Santoro G, Lorusso M** (2008). Role of mitochondria and reactive oxygen species in dendritic cell differentiation and functions. *Free Radic Biol Med*, 44(7):1443–1451, Epub 2008 Jan 11.
- Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J** (2006). Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci*, (26):60118.
- Deuss M, Reiss K, Hartmann D** (2008). Part-time alpha-secretases: The functional biology of adam 9, 10 and 17. *Curr Alzheimer Res*, 5(2):187–201.
- Dewachter I, Filipkowski RK, Priller C, Ris L, Neyton J, Croes S, Terwel D, Gysemans M, Devijver H, Borghgraef P, Godaux E, Kaczmarek L, Herms J, Van Leuven F** (2007). Deregulation of nmda-receptor function and down-stream signaling in app[v717i] transgenic mice. *Neurobiol Aging*, page Epub ahead of print.
- Dewji NN, Valdez D, Singer SJ** (2004). The presenilins turned inside out: implications for their structures and functions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(4):1057–1062, Epub 2004 Jan 19.
- De Ferrari GV, Papassotiropoulos A, Biechele T, et al** (2007). Common genetic variation within the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 and late-onset alzheimer’s disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(22):9434–9439.
- De Matteis MA, Morrow JS** (2000). Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J Cell Sci*, (113):2331–2343.
- de Souza SJ, Brentani R** (1992). Collagen binding site in collagenase can be determined using the concept of sense-antisense peptide interactions. *J Biol Chem*, 267(19):13763–13767.
- De Strooper B** (2005). Nicastrin: gatekeeper of the gamma-secretase complex. *Cell*, 122(3):318–320, Review.
- De Strooper B, Annaert W** (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci*, 113(Pt 11):1857–1870, Review.
- De Strooper B, Simons M, Multhaup G, Van Leuven F, Beyreuther K, Dotti CG** (1995). Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence. *EMBo J*, 14(20):4932–4938.
- Diaz-Nido J, Wandosell F, Avila J** (2002). Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases. *Peptides*, (23):1323–1332.
- Dickey CA, Gordon MN, Wilcock DM, Herber DL, Freeman MJ, Morgan D** (2005). Dysregulation of na⁺/k⁺ atpase by amyloid in app+ps1 transgenic mice. *BMC Neurosci*, 6(1):7.
- Dityatev A, Dityateva G, Schachner M** (2000). Synaptic strength as a function of post- versus presynaptic expression of the neural cell adhesion molecule ncam. *Neuron*, (26):207–217.
- Dixon M, Needham DM, van Heyningen R** (1946). *J gen Physiol*, (30):185.

Dixson JD, Forstner MJ, Garcia DM (2003). The alpha-actinin gene family: a revised classification. *J Mol Evol*, 56(1):1–10.

Djabali M, Mattei MG, Nguyen C, Roux D, Demengeot J, Denizot F, Moos M, Schachner M, Goridis C, Jordan BR (1990). The gene encoding I1, a neural adhesion molecule of the immunoglobulin family, is located on the x chromosome in mouse and man. *Genomics*, 7(4):587–593.

Dobretsov M, Stimers JR (2005). Neuronal function and alpha3 isoform of the na/k-atpase. *Front Biosci*, (10):2373–2396, Review.

Doglio LE, Kanwar R, Jackson GR, Perez M, Avila J, Dingwall C, Dotti CG, Fortini ME, Feiguin F (2006). gamma-cleavage-independent functions of presenilin, nicastrin, aph-1 regulate cell-junction organization and prevent tau toxicity in vivo. *Neuron*, 50(3):359–375, Retraction in: Dotti CG, Feiguin F, Fortini ME. *Neuron*. 2007 Feb 1, 53(3), 463.

Dollins DE, Warren JJ, Immormino RM, Gewirth DT (2007). Structures of grp94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. *Mol Cell*, 28(1):41–56.

Domingues SC, Henriques AG, Wu W, Da Cruz e Silva EF, Da Cruz e Silva OA (2007). Altered subcellular distribution of the alzheimer's amyloid precursor protein under stress conditions. *Ann N Y Acad Sci*, (1096):184–195.

Donarum EA, Halperin RF, Stephan DA, Narayanan V (2006). Cognitive dysfunction in nfl knock-out mice may result from altered vesicular trafficking of app/drd3 complex. *BMC Neurosci*, (7):22.

Dorries U, Taylor J, Xiao Z, Lochter A, Montag D, Schachner M (1996). Distinct effects of recombinant tenascin-c domains on neuronal cell adhesion, growth cone guidance, neuronal polarity. *J Neurosci Res*, (43):420–438.

Dries DR, Yu G (2008). Assembly, maturation, trafficking of the gamma-secretase complex in alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 5(2):132–146.

Dumser M, Bauer J, Lassmann H, Berger J, Forss-Petter S (2007). Lack of adrenoleukodystrophy protein enhances oligodendrocyte disturbance and microglia activation in mice with combined abcd1/mag deficiency. *Acta Neuropathol*, 114(6):573–586, Epub 2007 Sep 9.

Dunys J, Kawarai T, Giaime E, Wilk S, Herrant M, Auberger P, St George-Hyslop P, Alves da Costa C, Checler F (2007). Study on the putative contribution of caspases and the proteasome to the degradation of aph-1a and pen-2. *Neurodegener Dis*, 4(2-3):156–163.

Durrieu, C, Bernier-Valentin F, Rousset B (1987). Microtubules bind glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and modulate its enzyme activity and quaternary structure. *Arch Biochem Biophys*, (252):32–40.

Duus K, Hansen PR, Houen G (2008). Interaction of calreticulin with amyloid beta peptide 1-42. *Protein Pept Lett*, 15(1):103–107.

Duus K, Pagh RT, Holmskov U, Hjrurup P, Skov S, Houen G (2007). Interaction of calreticulin with CD40 ligand, TRAIL and Fas ligand. *Scand J Immunol*, 66(5):501-7.

Dyrks T, Dyrks E, Masters C, Beyreuther K (1992). Membrane inserted app fragments containing the beta a4 sequence of alzheimer's disease do not aggregate. *FEBS Lett*, 309(1):20–24.

Ebinu Jo, Yankner BA (2002). A rip tide in neuronal signal transduction. *Neuron*, 34(4):499–502, Review.

Eckert A, Hauptmann S, Scherping I, Rhein V, Müller-Spahn F, Götz J, Müller WE (2008). Soluble beta-amyloid leads to mitochondrial defects in amyloid precursor protein and tau transgenic mice. *Neurodegener Dis*, 5(3-4):157–159, Epub 2008 Mar 6.

- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C** (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol*, 5(5):486–488.
- Eder M, Fritz-Wolf K, Kabsch W, Wallimann T, Schlattner U** (2000). Crystal structure of human ubiquitous mitochondrial creatine kinase. *Proteins*, (39):216–225.
- Ellgaard L, Bettendorff P, Braun D, Herrmann T, Fiorito F, Jelesarov I et al** (2002). Nmr structures of 36 and 73-residue fragments of the calreticulin p-domain. *Journal of Molecular Biology*, (322):pp. 773–784.
- Ellgaard L, Riek R, Herrmann T, Guntert P, Braun, D, Helenius A et al** (2001). Nmr structure of the calreticulin p-domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (98):pp. 3133–3138.
- Engel J** (1991). Domains in proteins and proteoglycans of the extracellular matrix with functions in assembly and cellular activities. *Int J Biol Macromol*, (13):147–151.
- Eppenberger HM, Dawson DM, Kaplan No** (1967). The comparative enzymology of creatine kinases. i. isolation and characterization from chicken and rabbit tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, (242):204–209.
- Erlanger BF** (1985). Anti-idiotypic antibodies: what do they recognize? *Immunol Today*, (6):10.
- Erlanger BF** (1989). Auto-anti-idiotypy, autoimmunity and some thoughts on the structure of internal images. *Int Rev Immunol*, 5(2):131–137, Review.
- Esler WP, Kimberly WT, Ostaszewski BL, Ye W, Diehl TS, Selkoe DJ, Wolfe MS** (2002). Activity-dependent isolation of the presenilin- gamma -secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(5):2720–2725, Epub 2002 Feb 26.
- Faissner A, Teplow DB, Kbler D, Keilhauer G, Kinzel V, Schachner M** (1985,). Biosynthesis and membrane topography of the neural cell adhesion molecule 11. *EMBO J*, 4(12):3105–3113.
- Fatar M, Stroick M, Griebe M & Hennerici M** (2005). Matrix metalloproteinases in cerebrovascular diseases. *Cerebrovasc Dis*, (20):141–151.
- Ferreiro E, Oliveira CR, Pereira CM** (2008). The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurobiol Dis*, page Epub ahead of print.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M** (2005). Global prevalence of dementia: a delphi consensus study. *Lancet*, (366):2112–2117.
- Figueiredo PA, Ferreira RM, Appell HJ, Duarte JA** (2008). Age-induced morphological, biochemical, functional alterations in isolated mitochondria from murine skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 63(4):350–359.
- Filiz G, Price KA, Caragounis A, Du T, Crouch PJ, White AR** (2008). The role of metals in modulating metalloprotease activity in the ad brain. *Eur Biophys J*, 37(3):315–321, Epub 2008 Feb 13.
- Findeis MA** (2007). The role of amyloid beta peptide 42 in alzheimer's disease. *Pharmacol Ther*, 116(2):266–286, Review, Epub 2007 Jul 17.
- Flannery CR** (2006). Mmps and adamtss: functional studies. *Front Biosci*, (11):544–569, Review.
- Fliegel L, Burns K, MacLennan DH, Reithmeier RA, Michalak M** (1989). Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 264(36):21522–21528.

- Fortna RR, Crystal AS, Morais VA, Pijak DS, Lee VM, Doms RW** (2004). Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of aph-1, a component of the γ -secretase complex. *J Biol Chem*, (279):3685–3693.
- Fourie AM, Coles F, Moreno V, Karlsson L** (2003). Catalytic activity of adam8, adam15 and mdc-1 (adam28) on synthetic peptide substrates and in ectodomain cleavage of cd23. *J Biol Chem*, (278):30469–30477.
- Fox JW, Bjarnason JB** (1996). The reprotolysins: a family of metalloproteinases defined by snake venom and mammalian metalloproteinases, in zinc metalloproteinases in health and disease (hooper nm, hrsg). *Taylor & Francis, London*, pages 47–81.
- Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, Nicoll M, Maxwell M, Hai B, Ellis MC, Parks AL, Xu W, Li J, Gurney M, Myers RL, Himes CS, Hiebsch R, Ruble C, Nye JS, Curtis D** (2002). aph-1 and pen-2 are required for notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaapp, presenilin protein accumulation. *Dev Cell*, 3(1):85–97.
- Fransen E, Lemmon V, Van Camp G, Vits L, Coucke P, Willems PJ** (1995). Crash syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, 11. *Eur J Hum Genet*, 3(5):273–284, Review, Erratum in: *Eur J Hum Genet* 1996, 4(2), 126.
- Furuike S, Adachi K, Sakaki N, Shimo-Kon R, Itoh H, Muneyuki E, Yoshida M, Kinoshita K** (2008). Temperature dependence of the rotation and hydrolysis activities of f1-atpase. *Biophys J*, page Epub ahead of print.
- Fu Y, Lee AS** (2006). Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther*, (5):741–744.
- Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenburg PA, Michalak M, Henson PM** (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of lrp on the phagocyte. *Cell*, 123(2):321–334.
- Gardberg AS, Dice LT, Ou S, Rich RL, Helmbrecht E, Ko J, Wetzel R, Myszka DG, Patterson PH, Dealwis C** (2007). Molecular basis for passive immunotherapy of alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(40):15659–15664, Epub 2007 Sep 25.
- Gelebart P, Opas M, Michalak M** (2005). Calreticulin, a ca^{2+} -binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(2):260–266, Review.
- Genova JL, Fehon RG** (2003). Neuroglian, gliotactin, the na^{+}/k^{+} atpase are essential for septate junction function in drosophila. *J Cell Biol*, 161(5):979–989, Epub 2003 Jun 2.
- Glenner GG, Wong CW** (1984). Alzheimer's disease and down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*, (122):1131–1135.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al.** (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311):704–706.
- Godinot C, Di Pietro A** (1986). Structure and function of the atpase-atp synthase complex of mitochondria as compared to chloroplasts and bacteria. *Biochimie*, 68(3):367–374, Review.
- Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL** (2003). Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric a beta ligands (addls) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(18):10417–10422.
- Gorman PM, Kim S, Guo M, Melnyk RA, McLaurin J, Fraser PE, Bowie JU, Chakrabarty A** (2008). Dimerization of the transmembrane domain of amyloid precursor proteins and familial alzheimer's disease mutants. *BMC Neurosci*, (9):17.

- Goshima Y, Nakamura F, Strittmatter P, Strittmatter SM** (1995). Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to unc-33. *Nature*, 376(6540):509–514.
- Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N** (2001). *Genes, Dev*(15):1406–1418.
- Goutte C, Hepler W, Mickey KM, Priess JR** (2000). aph-2 encodes a novel extracellular protein required for glp-1-mediated signaling. *Development*, (127):2481–2492.
- Govaerts L, Schoenen J, Bouhy D** (2007). Pathogenesis of alzheimer's disease: molecular and cellular mechanisms. *Rev Med Liege*, 62(4):209–216, Review.
- Grimm Mo, Grimm HS, Tomic I, Beyreuther K, Hartmann T, Bergmann C** (2008). Independent inhibition of alzheimer's disease beta - and gamma -secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J Biol Chem*, pages , Epub ahead of print.
- Grüninger-Leitch F, Schlatter D, Küng E, Nelböck P, Döbeli H** (2002). Substrate and inhibitor profile of bace (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases. *J Biol Chem*, 277(7):4687–4693, Epub 2001 Dec 7.
- Grunberg J, Walter J, Loetscher H, Deuschle U, Jacobsen H, Haass C** (1998,). Alzheimer's disease associated presenilin-1 holoprotein and its 18-20 kda c-terminal fragment are death substrates for proteases of the caspase family. *Biochemistry*, 37(8):2263–2270.
- Guerrero ML, Beron J, Spindler B, Groscurth P, Wallimann T, Verrey F** (1997,). Metabolic support of na⁺ pump in apically permeabilized a6 kidney cell epithelia: Role of creatine kinase. *Am J Physiol*, (272):C697–C706.
- Guo L, Groenendyk J, Papp S, Dabrowska M, Knoblach B, Kay C et al** (2003). Identification of an n-domain histidine essential for chaperone function in calreticulin. *Journal of Biological Chemistry*, (278):pp. 50645–50653.
- Gupta S, Li H, Sampson NS** (2000). Characterization of fertilin beta-disintegrin binding specificity in sperm-egg adhesion. *Bioorg Med Chem*, 8(4):723–729.
- Gutwein P, Mechttersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Gast D, Joumaa S, Zentgraf H, Fogel M, Altevogt DP** (2003). Adam10-mediated cleavage of l1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J*, 17(2):292–294, Epub 2002 Dec 3.
- Gutwein P, Oleszewski M, Mechttersheimer S, Agmon-Levin N, Krauss K, Altevogt P** (2000). Role of src kinases in the adam-mediated release of l1 adhesion molecule from human tumor cells. *J Biol Chem*, 275(20):15490–15497.
- Gu QB, Zhao JX, Fei J, Schwarz W** (2004). Modulation of na(+),k(+) pumping and neurotransmitter uptake by beta-amyloid. *Neuroscience*, 126(1):61.67.
- Haas RC, Korenfeld C, Zhang ZF, Perryman B, Roman D, Strauss AW** (1989). Isolation and characterization of the gene and cDNA encoding human mitochondrial creatine kinase. *J Biol Chem*, 264(5):2890–2897, Erratum in: *J Biol Chem* 1989 Sep 25, 264, 27, 16332.
- Haass C, Selkoe DJ** (1993). Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*, (75):1039–1042.
- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ** (1991). Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J Neurosci*, (11):3783–3793.
- Hansen MD, Beckerle MC** (2008). alpha-actinin links lpp, but not zyxin, to cadherin-based junctions. *Biochem Biophys Res Commun*, page Epub ahead of print.

- Hansson CA, Frykman S, Farmery MR, Tjernberg LO, Nilsberth C, Pursglove SE, Ito A, Winblad B, Cowburn RF, Thyberg J, Ankarcrona M** (2004). Nicastrin, presenilin, aph-1, pen-2 form active gamma-secretase complexes in mitochondria. *J Biol Chem*, 279(49):51654–51660, Epub 2004 Sep 28.
- Hardy J** (1997). Amyloid, the presenilins and alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, (20):154–159.
- Harvey M** (1962). Schein et al: Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures, morphology and growth characteristics. *PNAS*, (48):1164–1172.
- Hasegawa H, Sanjo N, Chen F, Gu YJ, Shier C, Petit A, Kawarai T, Katayama T, Schmidt SD, Mathews PM, Schmitt-Ulms G, Fraser PE, St George-Hyslop P** (2004). 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):46455–46463.
- Hauptmann S, Scherping I, Dröse S, Brandt U, Schulz KL, Jendrach M, Leuner K, Eckert A, Müller WE** (2008). Mitochondrial dysfunction: An early event in alzheimer pathology accumulates with age in ad transgenic mice. *Neurobiol Aging*, page Epub ahead of print.
- Hayrapetyan V, Rybalchenko V, Rybalchenko N, Koulen P** (2008). The n-terminus of presenilin-2 increases single channel activity of brain ryanodine receptors through direct protein-protein interaction. *Cell Calcium*, page Epub ahead of print.
- Hebert SS, Serneels L, Dejaegere T, Horre K, Dabrowski M, Baert V, Annaert W, Hartmann D, De Strooper B** (2004). Coordinated and widespread expression of -secretase in vivo: evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiol Dis*, (17):260–272.
- Hebert SS, Serneels L, Tolia A, Craessaerts K, Derks C, Filippov MA, Mller U, De Strooper B** (2006). Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO Rep*, 7(7):739–745, Epub 2006 May 19.
- Hetz C, Russelakis-Carneiro M, Maundrell K, Castilla J, Soto C** (2003). Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J*, (22):5435–5445.
- Heukeshoven J, Dernick R** (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in phast-system development unit. i. staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, 9(1):28–32.
- He G, Qing H, Cai F, Kwok C, Xu H, Yu G, Bernstein A, Song W** (2006). Ubiquitin-proteasome pathway mediates degradation of aph-1. *J Neurochem*, 99(5):1403–1412, Epub 2006 Oct 24.
- He G, Qing H, Tong Y, Cai F, Ishiura S, Song W** (2007). Degradation of nicastrin involves both proteasome and lysosome. *J Neurochem*, 101(4):982–992, Epub 2007 Feb 26.
- He X, Zhu G, Koelsch G, Rodgers KK, Zhang XC, Tang J** (2003). Biochemical and structural characterization of the interaction of memapsin 2 (beta-secretase) cytosolic domain with the vhs domain of gga proteins. *Biochemistry*, 42(42):12174–12180.
- Higashi S, Miyazaki K** (2003). Novel processing of beta-amyloid precursor protein catalyzed by membrane type 1 matrix metalloproteinase releases a fragment lacking the inhibitor domain against gelatinase A. *Biochemistry*, 3;42(21):6514–26.
- Higashi S, Miyazaki K** (2008). Identification of amino acid residues of the matrix metalloproteinase-2 essential for its selective inhibition by beta-amyloid precursor protein-derived inhibitor. *J Biol Chem*, 11;283(15):10068–78.
- Hilbich C, Mnnig U, Grund C, Masters CL, Beyreuther K** (1993). Amyloid-like properties of peptides flanking the epitope of amyloid precursor protein-specific monoclonal antibody 22c11. *J Biol Chem*, 268(35):26571–26577.

- Hindmarch C, Yao S, Geighton G, Paton J & Murphy D** (2006). A comprehensive description of the transcriptome of the hypothalamoneurohypophyseal system in euhydrated and dehydrated rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, (103):1609–1614.
- Hooper NM** (2005). Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 2):335–338, Review.
- Hortsch M** (2000). Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol Cell Neurosci*, 15(1):1–10. Review.
- Hsu CJ, Lemay A, Eshdat Y, Marchesi VT** (1979). Substructure of human erythrocyte spectrin. *J Supramol Struct*, 10(2):227–239.
- Hung AY, Selkoe DJ** (1994). Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J*, (13):534–542.
- Huovila A-PJ, Almeida EAC, White JM** (1996). Adams and cell fusion. *Curr Opinion Cell Biol*, (8):692–699.
- Hur JY, Welander H, Behbahani H, Aoki M, Frnberg J, Winblad B, Frykman S, Tjernberg LO** (2008). Active gamma-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain. *FEBS J*, 275(6):1174–1187, Epub 2008 Feb 6.
- Inzumi Y, Hirata M, Hasuwa H, Iwamoto R, Umata T, Miyado K, Kurisaki T, Sehara-Fujisawa A, Ohno S, Mekada E** (1998). A metalloprotease-disintegrin, mdc9/meltrin-g/adam 9 and pkcd are involved in tpa-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding egf-like growth factor. *EMBO J*, (17):7260–7272.
- Irvine GB, El-Agnaf OM, Shankar GM, Walsh DM** (2008). Protein aggregation in the brain - the molecular basis for alzheimer's and parkinson's diseases. *Mol Med*, page Epub ahead of print.
- Ismail SA, Park HW** (2005). Structural analysis of human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 61(Pt 11):1508–1513, Epub 2005 Oct 19.
- Isoo N, Sato C, Miyashita H, Shinohara M, Takasugi N, Morohashi Y, Tsuji S, Tomita T, Iwatsubo T** (2007). Abeta42 overproduction associated with structural changes in the catalytic pore of gamma-secretase: common effects of pen-2 n-terminal elongation and fenofibrate. *J Biol Chem*, 282(17):12388–12396, Epub 2007 Feb 28.
- Ito H, Seyama Y, Kubota S** (2001). Calreticulin is directly involved in anti-alpha3 integrin antibody-mediated secretion and activation of matrix metalloprotease-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 4;283(2):297–302.
- Jellinger KA, Janetzky B, Attems J, Kienzl E** (2008). Biomarkers for early diagnosis of alzheimer disease: älzheimer associated gene a new blood biomarker? *J Cell Mol Med*, page Epub ahead of print.
- Jensen oN, Podtelejnikov AV, Mann M** (1997). Identification of the components of simple protein mixtures by high-accuracy peptide mass mapping and database searching. *Anal Chem*, 69(23):4741–4750.
- Jia L, Xu M, Zhen W, Shen X, Zhu Y, Wang W, Wang X** (2008). Novel anti-oxidative role of calreticulin in protecting A549 human type II alveolar epithelial cells against hypoxic injury. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294(1):C47–55.
- Jo DG, Jang J, Kim BJ, Lundkvist J, Jung YK** (2005). Overexpression of calsenilin enhances gammasecretase activity. *Neurosci Lett*, 378: 59–64.
- Johnson LL, Dyer R, Hupe DJ** (1998). Matrix metalloproteinases. *Curr Opin Chem Biol*, (2):466–471.

- Johnson S, Michalak M, opas M, Eggleton P** (2001). The ins and outs of calreticulin: from the er lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol*, (11):122–129.
- Jurynczyk M, Jurewicz A, Bielecki B, Raine CS, Selmaj K** (2008). Overcoming failure to repair demyelination in eae: gamma-secretase inhibition of notch signaling. *J Neurol Sci*, 265(1-2):5–11, Epub 2007 Oct 18.
- Kaether C, Capell A, Edbauer D, Winkler E, Novak B, Steiner H, Haass C** (2004). The presenilin c-terminus is required for er-retention, nicastrin-binding and gamma-secretase activity. *EMBO J*, 23(24):4738–4748, Epub 2004 Nov 18.
- Kaether C, Haass C, Steiner H** (2006). Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener Dis*, 3(4-5):275–283, Review.
- Kaldis P, Hemmer W, Zanolla E, Holtzman D, Wallimann T** (1996). Hot spots of creatine kinase localization in brain: Cerebellum, hippocampus and choroid plexus. *Dev Neurosci*, (18):542–554.
- Kallunki P, Edelman GM, Jones FS** (1997). Tissue-specific expression of the l1 cell adhesion molecule is modulated by the neural restrictive silencer element. *J Cell Biol*, 138(6):1343–1354.
- Kalus I** (2005). Untersuchung zu der Entstehung und Bedeutung löslicher Fragmente der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle L1 und Ncam im zentralen Nervensystem der Maus. *Dissertation*.
- Kalus I, Schnegelsberg B, Seidah NG, Kleene R, Schachner M** (2003). The proprotein convertase pc5a and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule l1. *J Biol Chem*, 278(12):10381–10388, Epub 2003 Jan 15.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R** (2003). App processing and synaptic function. *Neuron*, 37(6):925–937.
- Kametani F** (2008). epsilon-secretase: Reduction of amyloid precursor protein epsilon-site cleavage in alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 5(2):165–171.
- Kamiguchi H, Long KE, Pendergast M, Schaefer AW, Rapoport I, Kirchhausen T, Lemmon V** (1998). The neural cell adhesion molecule l1 interacts with the ap-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J Neurosci*, 18(14):5311–5321.
- Kang DE, Soriano S, Xia X, Eberhart CG, De Strooper B, Zheng H, Koo EH** (2002). Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis. *Cell*, 110(6):751–762.
- Kang HS, Welch WJ** (1991). Characterization and purification of the 94-kda glucose-regulated protein. *J Biol Chem*, (266):5643–5649.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B** (1987). The precursor of alzheimer's disease amyloid a4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, (325):733–736.
- Katzen HM, Schimke RT** (1965). Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, properties. *Proc Natl Acad Sci USA*, 54(4):1218–1225.
- Katzman R** (1986). Differential diagnosis of dementing illnesses. *Neurol Clin*, (4):329–340.
- Keilhauer G, Faissner A, Schachner M** (1985). Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by l1, l2 and n-cam antibodies. *Nature*, (316):728–30.
- Kelly BL, Ferreira A** (2007). Beta-amyloid disrupted synaptic vesicle endocytosis in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, 147(1):60–70, Epub 2007 May 17.

- Kemshead JT, Fritschy J, Garson JA, Allan P, Coakham H, Brown S, Asser U** (1983). Monoclonal antibody uj 127:11 detects a 220,000-240,000 kdal. glycoprotein present on a sub-set of neuroectodermally derived cells. *Int J Cancer*, 31(2):187–195.
- Kerr ML, Small DH** (2005). Cytoplasmic domain of the beta-amyloid protein precursor of alzheimer's disease: function, regulation of proteolysis, implications for drug development. *J Neurosci Res*, (80):151–159.
- Khasigov PZ, Podobed OV, Ktzoeva SA, Gatagonova TM, Grachev SV, Shishkin SS, Berezov TT** (2001). Matrix metalloproteinases of normal human tissues. *Biochemistry (Mosc)*, (66):130–140.
- Kim HS, Choi Y, Shin KY, Joo Y, Lee YK, Jung SY, Suh YH, Kim JH** (2007). Swedish amyloid precursor protein mutation increases phosphorylation of eif2alpha in vitro and in vivo. *J Neurosci Res*, 85(7):1528–1537.
- Kim J, Schekman R** (2004). The ins and outs of presenilin 1 membrane topology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(4):905–906, Epub 2004 Jan 19. No abstract available.
- Kimberly WT, Esler WP, Ye W, ostaszewski BL, Gao J, Diehl T, Selkoe DJ, Wolfe MS** (2003). Notch and the amyloid precursor protein are cleaved by similar gamma-secretase(s). *Biochemistry*, 42(1):137–144.
- Kimberly WT, Xia W, Rahmati T, Wolfe MS, Selkoe DJ** (2000). The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem*, 275(5):3173–3178.
- King GD, Scott Turner R** (2004). Adaptor protein interactions: modulators of amyloid precursor protein metabolism and alzheimer's disease risk? *Exp Neurol*, (185):208–219.
- Kinoshita A, Fukumoto H, Shah T, Whelan CM, Irizarry MC, Hyman BT** (2003). Demonstration by fret of bace interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J Cell Sci*, 116(Pt 16):3339–3346, Epub 2003 Jun 26.
- Kinoshita A, Whelan CM, Smith CJ, Berezovska O, Hyman BT** (2002). Direct visualization of the gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein: association with fe65 and translocation to the nucleus. *J Neurochem*, (82):839–847.
- Klyubin I, Betts V, Welzel AT, Blennow K, Zetterberg H, Wallin A, Lemere CA, Cullen WK, Peng Y, Wisniewski T, Selkoe DJ, Anwyl R, Walsh DM, Rowan MJ** (2008). Amyloid beta protein dimer-containing human csf disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci*, 28(16):4231–4237.
- Knapp PE, Itkis OS, Mata M** (2000). Neuronal interaction determines the expression of the alpha-2 isoform of na, k-atpase in oligodendrocytes. *Brain Res Dev Brain Res*, 125(1-2):89–97.
- Koch GLE, Smith MJ, Mortara RA** (1985). An abundant, ubiquitous glycoprotein (gp100) in nucleated mammalian cells. *FEBS Lett*, (179):294–298.
- Koh YH, von Arnim CA, Hyman BT, Tanzi RE, Tesco G** (2005). Bace is degraded via the lysosomal pathway. *J Biol Chem*, 280(37):32499–32504, Epub 2005 Jul 20.
- Kohler H, Murali R, Kieber-Emmons T** (2001). The hidden code in genomics: a tool for gene discovery. *J Mol Recognit*, 14(5):269–272, Review.
- Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, Okuyama A, Fujisawa-Sehara A, Ohno S, Suzuki K, Ishiura S** (1999). Membrane-anchored metalloprotease mdc9 has an alpha.secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J*, (343):371–375.
- Kojro E, Fahrenholz F** (2005). The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell Biochem*, (38):105–127.

- Koo EH** (2002). The beta-amyloid precursor protein (app) and alzheimer's disease: does the tail wag the dog? *Traffic*, 3(11):763–770, Review.
- Kornblihtt AR, Umezawa K, Vibe-Pedersen K, Baralle FE** (1985). Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J*, (4):1755–1759.
- Kots AY, Skurat AV, Sergienko EA, Bulargina TV, Severin ES** (1992). Nitroprusside stimulates the cysteine-specific mono(adp-ribosylation) of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *FEBS Lett*, 300(1):9–12.
- Kraepelin E** (1910). Klinische psychiatrie., *Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. Leipzig: Johann Ambrosius Barth.*
- Kramarova TV, Shabalina IG, Andersson U, Westerberg R, Carlberg I, Houstek J, Nedergaard J, Cannon B** (2008). Mitochondrial atp synthase levels in brown adipose tissue are governed by the c-fo subunit p1 isoform. *FASEB J*, 22(1):55–63, Epub 2007 Jul 31.
- Kraulis PJ** (1991). Similarity of protein g and ubiquitin. *Science*, 254(5031):581–582, No abstract available.
- Krause KH, Michalak M** (1997). Calreticulin. *Cell*, 88(4):439–443, Review, No abstract available.
- Krupp JJ, Vissel B, Thomas CG, Heinemann SF, Westbrook GL** (1999). Interactions of calmodulin and alpha-actinin with the nr1 subunit modulate ca²⁺-dependent inactivation of nmda receptors. *J. Neurosci*, (19):1165–1178.
- Kume H, Kametani F** (2006). Abeta 11-40/42 production without gamma-secretase epsilon-site cleavage. *Biochem Biophys Res Commun*, 349(4):1356–1360, Epub 2006 Sep 11.
- Kuo LM, Robb RJ** (1986). Structure-function relationships for the il 2-receptor system. i. localization of a receptor binding site on il 2. *J Immunol*, 137(5):1538–1543.
- Kuwabara K, Pinsky DJ, Schmidt AM, Benedict C, Brett J, Ogawa S, Broekman MJ, Marcus AJ, Sciacca RR, Michalak M, et al** (1995). Calreticulin, an antithrombotic agent which binds to vitamin k-dependent coagulation factors, stimulates endothelial nitric oxide production, limits thrombosis in canine coronary arteries. *J Biol Chem*, 270(14):8179–8187.
- Kyte J, Doolittle R** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, (157):105–132.
- Löffler G, Petrides P** (1998). Biochemie und pathobiochemie 6. auflage. *Springer-Verlag.*
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 15;227(5259):680-5.
- Lahiri SD, Wang PF, Babbitt PC, McLeish MJ, Kenyon GL, Allen KN** (2002). The 2.1 structure of torpedo californica creatine kinase complexed with the adp-mg²⁺-no³⁻ creatine transition-state analogue complex. *Biochemistry*, (41):13861–13867.
- Lakshmana MK, Chen E, Yoon IS, Kang DE** (2008). C-terminal 37 residues of lrp promote the amyloidogenic processing of app independent of fe65. *J Cell Mol Med*, page Epub ahead of print.
- Landman N, Kim TW** (2004). Got rip? presenilin-dependent intramembrane proteolysis in growth factor receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15(5):337–351, Review.
- Lawler AM Slunt HH Kitt CA Kearns WG Pearson PL Price DL Gearhart JD Lamb BT, Sisodia SS** (1993). Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]. *Nat Genet*, (5):22–30.

- Lee SF, Shah S, Yu C et al** (2004). A conserved gxxxg motif in aph-1 is critical for assembly and activity of the γ -secretase complex. *J Biol Chem*, (279):4144–4152.
- Lee SH, Song R, Lee MN, Kim CS, Lee H, Kong YY, Kim H, Jang SK** (2008). A molecular chaperone glucose-regulated protein 94 blocks apoptosis induced by virus infection. *Hepatology*, 47(3):854–866.
- Lehmann S, Chiesa R, Harris DA** (1997). Evidence for a six-transmembrane domain structure of presenilin 1. *J Biol Chem*, 272(18):12047–12051.
- Lessard CB, Lussier MP, Cayouette S, Bourque G, Boulay G** (2005). The overexpression of presenilin2 and alzheimer's-disease-linked presenilin2 variants influences trpc6-enhanced Ca^{2+} entry into hek293 cells. *Cell Signal*, 17(4):437–445.
- Levitan D, Greenwald I** (1995). Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a caenorhabditis elegans s182 alzheimer's disease gene. *Nature*, 377(6547):351–354.
- Levitan D, Yu G, St George Hyslop P, Goutte C** (2001). Aph-2/nicastrin functions in lin-12/notch signaling in the caenorhabditis elegans somatic gonad. *Dev Biol*, (240):654–661.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, et al** (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial alzheimer's disease locus. *Science*, 269(5226):973–977.
- Lichtenthaler SF, Behr D, Grimm HS, Wang R, Shearman MS, Masters CL, Beyreuther K** (2002). The intramembrane cleavage site of the amyloid precursor protein depends on the length of its transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(3):1365–1370, Epub 2002 Jan 22.
- Lichtenthaler SF, Wang R, Grimm H, Uljon SN, Masters CL, Beyreuther K** (1999). Mechanism of the cleavage specificity of alzheimer's disease gamma-secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(6):3053–3058.
- Liguri G, Taddei N, Nassi P, Latorraca S, Nediani C, Sorbi S** (1990). Changes in Na^{+}, K^{+} -atpase, Ca^{2+} -atpase and some soluble enzymes related to energy metabolism in brains of patients with alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 112(2-3):338–342.
- Lindner J, Rathjen FG, Schachner M** (1983). L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature*, 305(5933):427–430.
- Ling Y, Morgan K, Kalsheker N** (2003). Amyloid precursor protein (app) and the biology of proteolytic processing: relevance to alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(11):1505–1535, Review.
- Liu CX, Ranganathan S, Robinson S, Strickland DK** (2007). gamma-secretase-mediated release of the low density lipoprotein receptor-related protein 1b intracellular domain suppresses anchorage-independent growth of neuroglioma cells. *J Biol Chem*, 282(10):7504–7511, Epub 2007 Jan 16.
- Liu D, Bienkowska J, Petosa C, Collier RJ, Fu H, Liddington R** (1995). Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature*, 376(6536):191–4.
- Liu F, Su Y, Li B, Zhou Y, Ryder J, Gonzalez-DeWhitt P, May PC, Ni B** (2003,). Regulation of amyloid precursor protein (app) phosphorylation and processing by p35/cdk5 and p25/cdk5. *FEBS Lett*, 547(1-3):193–196.
- Liu J, Tian J, Haas M, et al** (2000). ouabain interaction with cardiac Na^{+}/K^{+} -atpase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na^{+} and Ca^{2+} . *J Biol Chem*, (275):27838–27844.
- Li Q, Montalbetti N, Shen PY, Dai XQ, Cheeseman CI, Karpinski E, Wu G, Cantiello HF, Chen XZ** (2005). Alpha-actinin associates with polycystin-2 and regulates its channel activity. *Hum. Mol. Genet*, (14):1587–1603.

- Li X, Greenwald I** (1998). Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for *Caenorhabditis elegans* and human presenilins. *Proc Natl Acad Sci USA*, (95):7109–7114.
- Li X, Bürklen T, Yuan X, Schlattner U, Desiderio DM, Wallimann T, Homayouni R** (2006). Stabilization of ubiquitous mitochondrial creatine kinase preprotein by app family proteins. *Mol Cell Neurosci*, 31(2):263–272, Epub 2005 Nov 2.
- Li Y, Grupe A, Rowland C, et al** (2006). Dapk1 variants are associated with Alzheimer's disease and allele-specific expression. *Hum Mol Genet*, 15(17):2560–2568.
- Li Y, Nowotny P, Holmans P, et al** (2004). Association of late-onset Alzheimer's disease with genetic variation in multiple members of the gapd gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(44):15688–15693, published correction appears in *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(16), 6411.
- Lleo A, Waldron E, von Arnim CA, Herl L, Tangredi MM, Peltan ID, Strickland DK, Koo EH, Hyman BT, Pietrzik CU, Berezovska O** (2005). Low density lipoprotein receptor-related protein (lrp) interacts with presenilin 1 and is a competitive substrate of the amyloid precursor protein (app) for gamma-secretase. *J Biol Chem*, 280(29):27303–27309, Epub 2005 May 25.
- Lochter A, Vaughan L, Kaplony A, Prochiantz A, Schachner M, Faissner A** (1991). J1/tenascin in substrate-bound and soluble form displays contrary effects on neurite outgrowth. *J Cell Biol*, 113(5):1159–1171.
- Loechel F, Gilpin BJ, Engvall E, Albrechtsen R, Wewer UM** (1998). Human adam 12 (meltrin a) is an active metalloprotease. *J Biol Chem*, (273):16993–16997.
- Loechel F, Overgaard MT, Oxvig C, Albrechtsen R, Wewer U** (1999). Regulation of human adam 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch. *J Biol Chem*, (274):13427–13433.
- Lorenz S, Albers DS, Relkin N, Ngyuen T, Hilgenberg SL, Chirichigno J, Cudkowicz ME, Beal MF** (2003). Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, (43):191–196.
- Lum L, Reid MS, Blobel CP** (1998). Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin mdc15. *J Biol Chem*, (273):26236–26247.
- Luo WJ, Wang H, Li H, Kim BS, Shah S, Lee HJ, Thinakaran G, Kim TW, Yu G, Xu H** (2003). Pen-2 and aph-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem*, (278):7850–7854.
- Lu L, Zhang Q, Timofeyev V, Zhang Z, Young JN, Shin HS, Knowlton AA, Chiamvimonvat N** (2007). Molecular coupling of a Ca²⁺-activated K⁺ channel to L-type Ca²⁺ channels via alpha-actinin2. *Circ. Res*, (100):112–120.
- Lyckman AW, Confaloni AM, Thinakaran G, Sisodia SS, Moya KL** (1998). Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily proteins in the central nervous system. *J Biol Chem*, 273(18):11100–11106.
- Lynch NJ, Schneider H, Sim RB, Bickel U, Schwaeble WJ** (2002). In vivo pharmacokinetics of calreticulin s-domain, an inhibitor of the classical complement pathway. *Int Immunopharmacol*, 2(4):415–422.
- Märtz E, Vorm O, Mann M, Roepstorff P** (1994). Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search. *Biol Mass Spectrom*, 23(5):249–261.
- Mackie S, Aitken A** (2005). Novel brain 14-3-3 interacting proteins involved in neurodegenerative disease. *FEBS J*, 272(16):4202–4210.
- Malemud CJ** (2006). Matrix metalloproteinases (mmps) in health and disease: an overview. *Front Biosci*, (11):1696–1701, Review.

- Marcello E, Epis R, Di Luca M** (2008). Amyloid flirting with synaptic failure: Towards a comprehensive view of alzheimer's disease pathogenesis. *Eur J Pharmacol*, page Epub ahead of print.
- Marcinkiewicz M, Seidah NG** (2000). Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase bace and alpha-secretase adam10 in mouse and human brain. *J Neurochem*, 75(5):2133–2143.
- Maretzky T, Schulte M, Ludwig A, Rose-John S, Blobel C, Hartmann D, Altevogt P, Saftig P, Reiss K** (2005). L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, neurite outgrowth. *Mol Cell Biol*, 25(20):9040–9053.
- Markus G, Tritsch GL, Parthasarathy R** (1989). A model for hydrophobic-based peptide interactions. *Arch Biochem Biophys*, 272(2):433–439.
- Marquez-Sterling NR, Lo AC, Sisodia SS, Koo EH** (1997). Trafficking of cell-surface beta-amyloid precursor protein: evidence that a sorting intermediate participates in synaptic vesicle recycling. *J Neurosci*, 17(1):140–151.
- Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, de Souza SJ, Mercadante AF, Veiga SS, Zanata SM, Neto VM, Brentani RR** (1997). Complementary hydrophobic identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med*, 3(12):1376–1382.
- Maruoka ND, Steele DF, Au BP, Dan P, Zhang X, Moore ED, Fedida D** (2000). Alpha-actinin-2 couples to cardiac kv1.5 channels, regulating current density and channel localization in hek cells. *FEBS Lett*, (473):188–194.
- Massey LK, Mah AL, Monteiro MJ** (2005). Ubiquitin regulates presenilin endoproteolysis and modulates gamma-secretase components, pen-2 and nicastrin. *Biochem J*, 391(Pt 3):513–525.
- Mastrangelo P, Mathews PM, Chisti MA, Schmidt SD, Gu Y, Yang J, Mazzella MJ, Coomaraswamy J, Horne P, Strome B, Pelly H, Levesque G, Ebeling C, Jiang Y, Nixon RA, Rozmahel R, Fraser PE, George-Hyslop PSt, Carlson GA, Westaway D** (2005). *Proc Natl Acad Sci USA*, (102):8972.
- Mathews P, Kao B, Qin X, Cataldo A, Nixon R** (1996). Presenilin exists in vivo predominantly as processed forms. *Mol Biol Cell*, (7):651.
- Matsuoka K, Seta K, Yamakawa Y, Okuyama T, Shinoda T, Isobe T** (1994). Covalent structure of bovine brain calreticulin. *Biochem J*, 298(Pt 2):435–442.
- Mattson MP** (1994). Calcium and neuronal injury in alzheimer's disease. contributions of beta-amyloid precursor protein mismetabolism, free radicals, metabolic compromise. *Ann N Y Acad Sci*, (747):50–76, Review.
- Mattson MP, van Praag H** (2008). Tagging app constrains neurogenesis. *Nat Cell Biol*, 10(3):249–250, No abstract available.
- Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE** (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein neuron. *J Neurosci*, 13(2):243–254.
- Mazzola JL, Sirover MA** (2003). Subcellular alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in alzheimer's disease fibroblasts. *J Neurosci Res*, 71(2):279–285.
- Ma G, Li T, Price DL, Wong PC** (2005). Aph-1a is the principal mammalian aph-1 isoform present in gamma-secretase complexes during embryonic development. *J Neurosci*, (25):192–198.
- Ma QH, Futagawa T, Yang WL, Jiang XD, Zeng L, Takeda Y, Xu RX, Bagnard D, Schachner M, Furley AJ, Karagogeos D, Watanabe K, Dawe GS, Xiao ZC** (2008,). A tag1-app signalling pathway through fe65 negatively modulates neurogenesis. *Nat Cell Biol*, 10(3):283–294, Epub 2008 Feb 17, Erratum in: *Nat Cell Biol*, 2008 Apr, 10, 4, 497.

- McCarthy JV** (2005). Involvement of presenilins in cell-survival signalling pathways. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 4): 568-72.
- McGreal E, Gasque P** (2002). Structure-function studies of the receptors for complement c1q. *Biochem Soc Trans*, 30(Pt 6):1010–1014, Review.
- Mehta NR, Lopez PH, Vyas AA, Schnaar RL** (2007). Gangliosides and Nogo receptors independently mediate myelin-associated glycoprotein inhibition of neurite outgrowth in different nerve cells. *J Biol Chem*, 282(38):27875-86.
- Melnick J, Dul JL, Argon Y** (1994). Sequential interaction of the chaperones bip and grp94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature*, (370):373–375.
- Menendez-Gonzalez M, Perez-Pinera P, Martinez-Rivera M, Calatayud MT, Blazquez Menes B** (2005). App processing and the app-kpi domain involvement in the amyloid cascade. *Neurodegener Dis*, 2(6):277–283, Review.
- Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M** (1999). Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J*, 344 Pt 2:281-92. Review.
- Michalak M, Milner RE, Burns K, Opas M** (1992). Calreticulin. *Biochem J*, 285 (Pt 3):681-92. Review.
- Michalak M, Robert Parker JM, Opas M** (2002). Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, 32(5-6):269-78. Review.
- Michaluk P, Kolodziej L, Mioduszevska B, Wilczynski GM, Dzwonek J, Jaworski J, Gorecki DC, Ottersen OP, Kaczmarek L** (2007). Beta-dystroglycan as a target for MMP-9, in response to enhanced neuronal activity. *J Biol Chem*, 282(22):16036-41.
- Miller JA, Oldham MC, Geschwind DH** (2008). A systems level analysis of transcriptional changes in alzheimer's disease and normal aging. *J Neurosci*, 28(6):1410–1420.
- Milton NG, Mayor NP, Rawlinson J** (2001). Identification of amyloid-beta binding sites using an antisense peptide approach. *Neuroreport*, 12(11):2561–2566.
- Milward E, Kim KJ, Szklarczyk A, Nguyen T, Melli G, Nayak M, Deshpande D, Fitzsimmons C, Hoke A, Kerr D, Griffin JW, Calabresi PA, Conant K** (2008,). Cleavage of myelin associated glycoprotein by matrix metalloproteinases. *J Neuroimmunol*, 193(1-2):140–148, Epub 2007 Dec 11.
- Miyazaki K, Hasegawa M, Funahashi K, Umeda M** (1993). A metalloproteinase inhibitor domain in Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature*, 362(6423):839-41.
- Mehta NR, Lopez PH, Vyas AA, Schnaar RL** (2007). Gangliosides and Nogo receptors independently mediate myelin-associated glycoprotein inhibition of neurite outgrowth in different nerve cells. *J Biol Chem*, 282(38):27875-86.
- Mönning U, Knig G, Prior R, Mechler H, Schreiter-Gasser U, Masters CL, Beyreuther K** (1990). Synthesis and secretion of alzheimer amyloid beta a4 precursor protein by stimulated human peripheral blood leucocytes. *FEBS Lett*, 277(1-2):261–266.
- Monji A, Yoshida I, Tashiro K, Hayashi Y, Matsuda K, Tashiro N** (2000). Inhibition of a beta fibril formation and a beta-induced cytotoxicity by senile plaque-associated proteins. *Neurosci Lett*, (278):81–84.
- Moos M, Tacke R, Scherer H, Teplow D, Frh K, Schachner M** (1988). Neural adhesion molecule I1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature*, 334(6184):701–703.

- Morais VA, Brito C, Pijak DS, Crystal AS, Fortna RR, Li T, Wong PC, Doms RW, Costa J** (2006). N-glycosylation of human nicastrin is required for interaction with the lectins from the secretory pathway calnexin and ergic-53. *Biochim Biophys Acta*, 1762(9):802–810, Epub 2006 Jul 26.
- Morais VA, Leight S, Pijak DS, Lee VM, Costa J** (2008). Cellular localization of nicastrin affects amyloid beta species production. *FEBS Lett*, 582(3):427–433, Epub 2008 Jan 15.
- Morrison D** (1994). 14-3-3: modulators of signaling proteins? *Science*, 266(5182):56–57, Review.
- Mortz E, Vorm o, Mann M, Roepstorff P** (1994). Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search. *Biol Mass Spectrom*, 23(5):249–261.
- Mousa SA** (2008). Cell adhesion molecules: potential therapeutic & diagnostic implications. *Mol Biotechnol*, 38(1):33–40, Review, Epub 2007 Aug 15.
- Moya KL, Benowitz LI, Schneider GE, Allinquant B** (1994). The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis. *Dev Biol*, (161):597–603.
- Mullan M, Crawford F, Houlden H, Axelman K, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L** (1992). A pathogenic mutation for probable alzheimer's disease in the app gene at the n-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*, (1):345–347.
- Multhaup G** (2006). Amyloid precursor protein and bace function as oligomers. *neurodegener dis*. 3(4-5):270–274, Review, BACE spaltet APP dimer als oligomer.
- Mumm JS, Kopan R** (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol*, 15;228(2):151-65. Review.
- Murphy G, Ward R, Hembry RM, Reynolds JJ, Khn K, Tryggvason K** (1989). Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. a metalloproteinase resembling tumour type iv collagenase. *Biochem J*, 258(2):463–472.
- Nagase H, Suzuki K, Morodomi T, Enghild JJ, Salvesen G** (1992). Activation mechanisms of the precursors of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3. *Matrix Suppl*, (1):237–244.
- Nagy V, Bozdagi O, Matynia A, Balcerzyk M, Okulski P, Dzwonek J, Costa RM, Silva AJ, Kaczmarek L & Huntley GW** (2006). Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J Neurosci*, (26):1923–1934.
- Nakagawa Y, Rivera V, Larner AC** (1992). A role for the na⁺/k⁺-atpase in the control of human c-fos and c-jun transcription. *J Biol Chem*, (267):8785–8788.
- Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Goping IS, opas M, Bleackley RC, Green DR, Michalak M** (2000). Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol*, 150(4):731–740.
- Nakamura K, Zuppini A, Arnaudeau S, Lynch J, Ahsan I, Krause R, Papp S, De Smedt H, Parys JB, Muller-Esterl W, Lew DP, Krause KH, Demaurex N, opas M, Michalak M** (2001). Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol*, 154(5):961–972, Epub 2001 Aug 27, Erratum in: *J Cell Biol*, 2001 Dec 10, 155 (6), 1083.
- Nakashima RA, Mangan PS, Colombini M, Pedersen PL** (1986). Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: evidence from n,n'-dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of the pore-forming protein vdac. *Biochemistry*, 25(5):1015–1021.
- Nalivaeva NN, Fisk LR, Belyaev ND, Turner AJ** (2008). Amyloid-degrading enzymes as therapeutic targets in alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 5(2):212–224.
- Nathalie P, Jean-Nol O** (2008). Processing of amyloid precursor protein and amyloid peptide neurotoxicity. *Curr Alzheimer Res*, 5(2):92–99.

- Naus S, Reipschläger S, Wildeboer D, Lichtenthaler SF, Mitterreiter S, Guan Z, Moss ML, Bartsch JW** (2006). Identification of candidate substrates for ectodomain shedding by the metalloprotease-disintegrin adam8. *Biol Chem*, 387(3):337–346.
- Naus S, Richter M, Wildeboer D, Moss M, Schachner M, Bartsch JW** (2004). Ectodomain shedding of the neural recognition molecule ch11 by the metalloprotease-disintegrin adam8 promotes neurite outgrowth and suppresses neuronal cell death. *J Biol Chem*, (279):16083–16090.
- Nelson O, Tu H, Lei T, Bentahir M, de Strooper B, Bezprozvanny I** (2007). Familial alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt ca2+ leak function of presenilin 1. *J Clin Invest*, 117(5):1230–1239, Epub 2007 Apr 12.
- Nielsen HM, Londos E, Minthon L, Janciauskiene SM** (2007). Soluble adhesion molecules and angiotensin-converting enzyme in dementia. *Neurobiol Dis*, 26(1):27–35, Epub 2007 Jan 31.
- Nishi T, Forgac M** (2002). The vacuolar (h+)-atpases–nature’s most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(2):94–103, Review.
- Ni M, Lee AS** (2007). Er chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett*, 581(19):3641–3651, Epub 2007 Apr 25, Review.
- No authors listed, Translated by Jarvik L, Greenson H** (1987). About a peculiar disease of the cerebral cortex. by alois alzheimer 1907. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 1(1):3–8, English, German. No abstract available.
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R** (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, neuron loss in transgenic mice with five familial alzheimer’s disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*, 26(40):10129–10140.
- Oh YS, Turner RJ** (2005). Topology of the c-terminal fragment of human presenilin 1. *Biochemistry*, (44):11821–11828.
- Okamoto N, Del Maestro R, Valero R, Monros E, Poo P, Kanemura Y, Yamasaki M** (2004). Hydrocephalus and hirschsprung’s disease with a mutation of 11cam. *J Hum Genet*, 49(6):334.337, Epub 2004 May 18.
- Olsson A, Csajbok L, Ost M, Höglund K, Nylm K, Rosengren L, Nellgrd B, Blennow K** (2004). Marked increase of beta-amyloid(1-42) and amyloid precursor protein in ventricular cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. *J Neurol*, 251(7):870–876.
- Osterfield M, Egelund R, Young LM, Flanagan JG** (2008). Interaction of amyloid precursor protein with contactins and ngcam in the retinotectal system. *Development*, 135(6):1189–1199, Epub 2008 Feb 13.
- Ostwald TJ, MacLennan DH** (1974). Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 249(3):974–979, No abstract available.
- Päiväläinen S, Suokas M, Lahti O, Heape AM** (2003). Degraded myelin-associated glycoprotein (dMAG) formation from pure human brain myelin-associated glycoprotein (MAG) is not mediated by calpain or cathepsin L-like activities. *J Neurochem*, 84(3):533-45.
- Pagh R, Duus K, Laursen I, Hansen PR, Mangor J, Thielens N, Arlaud GJ, Kongerslev L, Hjrup P, Houen G** (2008). The chaperone and potential mannan-binding lectin (MBL) co-receptor calreticulin interacts with MBL through the binding site for MBL-associated serine proteases. *FEBS J*, 275(3):515-26.
- Panegyres PK, Zafiris-Toufexis K, Kakulas BA** (2000). Amyloid precursor protein gene isoforms in alzheimer’s disease and other neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci*, 173(2):81–92.
- Pangalos MN, Shioi J, Robakis NK** (1995). Expression of the chondroitin sulfate proteoglycans of amyloid precursor (appican) and amyloid precursor-like protein 2. *J Neurochem*, (65):762–769.

- Panicker AK, Buhusi M, Thelen K, Maness PF** (2003). Cellular signalling mechanisms of neural cell adhesion molecules. *Front Biosci*, (8):d900–911, Review.
- Park JH, Strittmatter SM** (2007). Nogo receptor interacts with brain app and abeta to reduce pathologic changes in alzheimer's transgenic mice. *Curr Alzheimer Res*, 4(5):568–570, Review.
- Park JH, Gimbel DA, GrandPre T, Lee JK, Kim JE, Li W, Lee DH, Strittmatter SM** (2006). Alzheimer precursor protein interaction with the nogo-66 receptor reduces amyloid-beta plaque deposition. *J Neurosci*, (26):1386–1395.
- Park JH, Widi GA, Gimbel DA, Harel NY, Lee DH, Strittmatter SM** (2006). Subcutaneous nogo receptor removes brain amyloid-beta and improves spatial memory in alzheimer's transgenic mice. *J Neurosci*, 26(51):13279–13286.
- Parks AL, Curtis D** (2007). Presenilin diversifies its portfolio. *Trends Genet*, 23(3):140–150, Review, Epub 2007 Feb 5.
- Parsons RB, Austen BM** (2007). Protein-protein interactions in the assembly and subcellular trafficking of the bace (beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme) complex of alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 5):974–979, Review.
- Pasternak SH, Callahan JW, Mahuran DJ** (2004). The role of the endosomal/lysosomal system in amyloid-beta production and the pathophysiology of alzheimer's disease: reexamining the spatial paradox from a lysosomal perspective. *J Alzheimers Dis*, 6(1):53–65, Review.
- Pastorino L, Ikin AF, Lamprianou S, Vacaresse N, Revelli JP, Platt K, Paganetti P, Mathews PM, Harroch S, Buxbaum JD** (2004). Bace (beta-secretase) modulates the processing of aplp2 in vivo. *Mol Cell Neurosci*, 25(4):642–649.
- Patrakitkomjorn S, Kobayashi D, Morikawa T, Wilson MM, Tsubota N, Irie A, Ozawa T, Aoki M, Arimura N, Kaibuchi K, Saya H, Araki N** (2008). Neurofibromatosis type 1 (nfl) tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neuronal differentiation of pc12 cells via its associating protein, crmp-2. *J Biol Chem*, 283(14):9399–9413, Epub 2008 Jan 23.
- Patterson ML, Atkinson SJ, Knauper V, Murphy G** (2001). Specific collagenolysis by gelatinase a, mmp-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett*, (503):158–162.
- Pawson T** (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature*, 373(6515):573–80. Review.
- Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF, Ko YH** (2002). Mitochondrial bound type ii hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta*, 1555(1-3):14–20.
- Pellegrini L, Scorrano L** (2007). A cut short to death: Parl and opa1 in the regulation of mitochondrial morphology and apoptosis. *Cell Death Differ*, 14(7):1275–1284, Review, Epub 2007 Apr 20.
- Persson S, Rosenquist M, Sommarin M** (2002). Identification of a novel calreticulin isoform (crt2) in human and mouse. *Gene*, (297):pp. 151–158.
- Petratos S, Li QX, George AJ, Hou X, Kerr ML, Unabia SE, Hatzinisiriou I, Maksel D, Aguilar MI, Small DH** (2008). The beta-amyloid protein of alzheimer's disease increases neuronal crmp-2 phosphorylation by a rho-gtp mechanism. *Brain*, 131(Pt 1):90–108, Epub 2007 Nov 13.
- Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Teruya-Feldstein J, Wirth P, Gupta G, Tosato G** (1998). Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med*, 188(12):2349–2356.
- Pollak D, Cairns N, Lubec G** (2003). Cytoskeleton derangement in brain of patients with down syndrome, alzheimer's disease and pick's disease. *J Neural Transm Suppl*, (67):149–158.

- Prada CM, Garcia-Alloza M, Betensky RA, Zhang-Nunes SX, Greenberg SM, Bacskai BJ, Frosch MP** (2007). Antibody-mediated clearance of amyloid-beta peptide from cerebral amyloid angiopathy revealed by quantitative in vivo imaging. *J Neurosci*, 27(8):1973–1970.
- Price DL, Tanzi RE, Borchelt DR, Sisodia SS** (1998). Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. *Annu Rev Genet*, (32):461–493.
- Priller C** (2006). Funktion des amyloid precursor proteins und dessen spaltprodukten bei der synaptischen bertragung dissertation.
- Primakoff P, Myles DG** (2000). The adam gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet*, (16):83–87.
- Prokop S, Shirotani K, Edbauer D, Haass C, Steiner H** (2004). Requirement of pen-2 for stabilization of the presenilin n-/c-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex. *J Biol Chem*, 279(22):23255–23261, Epub 2004 Mar 23.
- Pu HX, Cluzaud F, Goldshleger R, Karlsh SJ, Farman N, Blostein R** (2001,). Functional role and immunocytochemical localization of the gamma a and gamma b forms of the na,k-atpase gamma subunit. *J Biol Chem*, 276(23):20370–20378, Epub 2001 Mar 15.
- Quarles RH** (2007). Myelin-associated glycoprotein (mag): past, present and beyond. *J Neurochem*, 100(6):1431–1448, Epub 2007 Jan 4, Review.
- Racker E, Krimsky I** (1952). Mechanism of action of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Nature*, 169(4312):1043–1045.
- Randow F, Seed B** (2001). Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nat Cell Biol*, (3):891–896.
- Rathjen FG, Schachner M** (1984). Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (11 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J*, 3(1):1–10.
- Rathke-Hartlieb S, Budde P, Ewert S, Schlomann U, Staeger MS, Jockusch H, Bartsch JW, Frey J** (2000). Elevated expression of membrane type 1 metalloproteinase (mt1-mmp) in reactive astrocytes following neurodegeneration in mouse central nervous system. *FEBS Lett*, 481(3):227–234.
- Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT** (1993). Apolipoprotein e in sporadic alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron*, 11(4):575–580.
- Reddy RK, Lu J, Lee AS** (1999). The endoplasmic reticulum chaperone glycoprotein grp94 with ca²⁺-binding and antiapoptotic properties is a novel proteolytic target of calpain during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, (274):28476–28483.
- Reinhard C, Hebert SS, De Strooper B** (2005). The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *Embo J*, (24):3996–4006, Epub 2005 Oct 27.
- Remington SJ** (1992). Structure and mechanism of citrate synthase. *Curr Top Cell Regul*, (33):209–229, Review.
- Ren Z, Schenk D, Basi GS, Shapiro IP** (2007). Amyloid beta-protein precursor juxtamembrane domain regulates specificity of gamma-secretase-dependent cleavages. *J Biol Chem*, 282(48):35350–35360, Epub 2007 Sep 21.
- Rhein V, Eckert A** (2007). Effects of alzheimer's amyloid-beta and tau protein on mitochondrial function – role of glucose metabolism and insulin signalling. *Arch Physiol Biochem*, 113(3):131–141, Review.
- Rigoard P, Tartarin F, Buffenoir K, Chaillou M, Fares M, D'Houtaud S, Wager M, Giot JP, Quellard N, Fernandez B, Lapierre F, Maixent JM** (2007). The na, k-atpase alpha3-isoform specifically localizes in the schmidt-lanterman incisures of human nerve. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, (53 Suppl):OL1003–1009.

- Robson KJ, Frevert U, Reckmann I, Cowan G, Beier J, Scragg IG, Takehara K, Bishop DH, Pradel G, Sinden R, et al** (1995). Thrombospondin-related adhesive protein (trap) of *Plasmodium falciparum*: expression during sporozoite ontogeny and binding to human hepatocytes. *EMBO J*, 14(16):3883–3894.
- Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, et al** (2007). The neuronal sortilin-related receptor sorl1 is genetically associated with alzheimer disease. *Nat Genet*, 39(2):168–177.
- Roghani M, Becherer JD, Moss ML, Atherton RE, Erdjument-Bromage H, Arribas J, Blackburn RK, Weskamp G, Tempst P, Blobel CP** (1999). Metalloprotease-disintegrin mdc9: Intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem*, (274):3531–3540.
- Roher AE, Palmer KC, Yurewicz EC, Ball MJ, Greenberg BD** (1993). Morphological and biochemical analyses of amyloid plaque core proteins purified from alzheimer disease brain tissue. *J Neurochem*, 61(5):1916–1926.
- Rossjohn J, Cappai R, Feil SC, Henry A, McKinsty WJ, Galatis D, Hesse L, Multhaup G, Beyreuther K, Masters CL, Parker MW** (1999). Crystal structure of the n-terminal, growth factor-like domain of alzheimer amyloid precursor protein. *Nat Struct Biol*, (6):327–331.
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD** (1987). New perspectives in cell adhesion: Rgd and integrins. *Science*, (238):491–497.
- Russ WP, Engelman DM** (2000). The gxxxg motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol*, 296(3):911–919.
- Sabo SL, Ikin AF, Buxbaum JD, Greengard P** (2003). The amyloid precursor protein and its regulatory protein, fe65, in growth cones and synapses in vitro and in vivo. *J Neurosci*, (23):5407–5415.
- Sadeghi A, Doyle AD, Johnson BD** (2002). Regulation of the cardiac l-type ca²⁺ channel by the actin-binding proteins alphaactinin and dystrophin. *Am J Physiol*, (282):C1502–C1511.
- Sambrook J, Gething MJ** (1989). Protein structure, chaperones, paperones. *Nature*, (342):224–225.
- Santpere G, Puig B, Ferrer I** (2007). oxidative damage of 14-3-3 zeta and gamma isoforms in alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *Neuroscience*, 146(4):1640–1651, Epub 2007 Apr 19.
- Sato C, Morohashi Y, Tomita T, Iwatsubo T** (2006). Structure of the catalytic pore of gamma-secretase probed by the accessibility of substituted cysteines. *J Neurosci*, 26(46):12081–12088.
- Schägger H** (2006). Tricine-sds-page. *Nat Protoc*, 1(1):16–22.
- Schein CJ, Stern WZ, Jacobson HG** (1962). The hepatic ductal system: a correlation of endoscopic and roentgenographic findings. *Surgery*, 51:718-23.
- Scheuermann S, Hambsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Behr D, Bayer TA, Beyreuther K, Multhaup G** (2001). Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 276(36):33923–33929, Epub 2001 Jul 3.
- Schlomann U, Rathke-Hartlieb S, Yamamoto S, Jockusch H, Bartsch JW** (2000,). Tumor necrosis factor induces a metalloprotease-disintegrin, adam8 (cd156): implications for neuron-glia interactions during neurodegeneration. *J Neurosci*, (20):7964–7971.
- Schlomann U, Wildeboer D, Webster A, Antropova O, Zeuschner D, Knight CG, Docherty AJ, Lambert M, Skelton L, Jockusch H, Bartsch JW** (2002). The metalloprotease disintegrin adam8. processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *J Biol Chem*, (277):48210–48219.

Schlöndorff J, Blobel CP (1999). Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci*, 112(Pt 21):3603–3617.

Schmechel A, Strauss M, Schlicksupp A, Pipkorn R, Haass C, Bayer TA, Multhaup G (2004). Human bace forms dimers and colocalizes with app. *J Biol Chem*, 279(38):39710–39717, Epub 2004 Jul 9.

Schmidt C, Lepsverdize E, Chi SL, Das AM, Pizzo SV, Dityatev A, Schachner M (2007). Amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide bind to atp synthase and regulate its activity at the surface of neural cells. *Mol Psychiatry*, page Epub ahead of print.

Schmidtke K (2005). Demenzen. in: Neurologie. diagnostik und therapie in klinik und praxis pp. *Urban & Fischer bei Elsevier*, pages 662–681.

Schrag JD, Bergeron JJM, Li Y, Borisova S, Hahn M, Thomas DY et al (2001,). The structure of calnexin, an er chaperone involved in quality control of protein folding. *Molecular Cell*, (8):pp. 633–644.

Schubert D, Heinemann S, Carlisle W, Tarikas H, Kimes B, Patrick J, Steinbach JH, Culp W, Brandt BL (1974). Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature*, 249(454):224–227.

Schubert D, Jin LW, Saitoh T, Cole G (1989). The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron*, (3):689–694.

Schultheis M, Diestel S, Schmitz B (2007). The role of cytoplasmic serine residues of the cell adhesion molecule 11 in neurite outgrowth, endocytosis, cell migration. *Cell Mol Neurobiol*, 27(1):11–31, Epub 2006 Dec 7.

Seals DF, Courtneidge SA (2003). The adams family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & Dev*, (17):7–30.

Selkoe D, Kopan R (2003). Notch and presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci*, (26):565–597, Epub 2003 Apr 18. Review.

Selkoe DJ (1993). Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, (16):403–409.

Selkoe DJ (1996). Amyloid beta-protein and the genetics of alzheimer's disease. *J Biol Chem*, (271):18295–18298.

Selkoe DJ (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in alzheimer's disease. *Nature*, 399(6738 Suppl):A23–31, Review.

Selkoe DJ (2001). Alzheimers disease: genes, proteins, therapy. *Physiol Rev*, (81):741–766.

Selkoe DJ (2008). Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res*, page Epub ahead of print.

Selkoe DJ, Wolfe MS (2007). Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell*, 131(2):215–221, Review.

Sennoune SR, Bakunts K, Martnez GM, Chua-Tuan JL, Kebir Y, Attaya MN, Martnez-Zaguiln R (2004). Vacuolar h⁺-atpase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286(6):C1443–1452, Epub 2004 Feb 4.

Serneels L, Dejaegere T, Craessaerts K, Horre K, Jorissen E, Tousseyn T, Hebert S, Coolen M, Martens G, Zwijsen A, Annaert W, Hartmann D, De Strooper B (2005). Differential contribution of the three aph1 genes to gamma-secretase activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, (102):1719–1724.

- Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, Ball H, Dann CE, 3rd, Sudhof T, Yu G** (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell*, (122):435–447.
- Shalova IN, Cechalova K, Rehakova Z, Dimitrova P, Ognibene E, Caprioli A, Schmalhausen EV, Muronetz VI, Saso L** (2007). Decrease of dehydrogenase activity of cerebral glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in different animal models of alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1770(5):826–832, Epub 2007 Feb 4.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, et al** (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial alzheimer's disease. *Nature*, (375):754–760.
- Shirotani K, Edbauer D, Kostka M, Steiner H, Haass C** (2004). 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):1520–1527.
- Shirotani K, Tomioka M, Kremmer E, Haass C, Steiner H** (2007). Pathological activity of familial alzheimer's disease-associated mutant presenilin can be executed by six different gamma-secretase complexes. *Neurobiol Dis*, 27(1):102–107, Epub 2007 May 6.
- Shpetner HS, Vallee RB** (1989). Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell*, 59(3):421–432.
- Sidera C, Parsons R, Austen B** (2005). Post-translational processing of beta-secretase in alzheimer's disease. *Proteomics*, 5(6):1533–1543.
- Silletti S, Mei F, Sheppard D, Montgomery AM** (2000). Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of 11-cell adhesion molecule (cam) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment. *J Cell Biol*, 149(7):1485–1502.
- Simakova O, Arispe NJ** (2007). The cell-selective neurotoxicity of the alzheimer's abeta peptide is determined by surface phosphatidylserine and cytosolic atp levels. membrane binding is required for abeta toxicity. *J Neurosci*, 27(50):13719–13729.
- Sinha S, Lieberburg I** (1999). Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(20):11049–11053, Review.
- Sirover MA** (2005). New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J. Cell. Biochem*, (95):45–52.
- Skou JC** (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys, Acta*(23):394–401.
- Slootstra JW, Roubos EW** (1991). Two receptor binding regions of human fsh show sense-antisense similarity to the human fsh receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 179(1):266–271.
- Small DH, Clarris HL, Williamson TG, Reed G, Key B, Mok SS, Beyreuther K, Masters CL, Nurcombe V** (1999). Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, (1):275–285.
- Small DH, Williamson T, Reed G, Clarris H, Beyreuther K, Masters CL, Nurcombe V** (1996). The role of heparan sulfate proteoglycans in the pathogenesis of alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, (777):316–321, Review.
- Smillie KJ, Cousin MA** (2005). Dynamin i phosphorylation and the control of synaptic vesicle endocytosis. *Biochem Soc Symp*, (72):87–97, Review.
- Smith DB, Johnson KS** (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in escherichia coli as fusions with glutathione s-transferase. *Gene*, 67(1):31–40.
- Smith EM, Blalock JE** (1988). A molecular basis for interactions between the immune and neuroendocrine systems. *Int J Neurosci*, 38(3-4):455–464, Review.

- Smith KM., Gaultier A, Cousin H, Alfandari D, White JM, DeSimone DW** (2002,). The cysteine-rich domain regulates adam protease function in vivo. *J Cell Biol*, (159):893–902.
- Smith LR, Bost KL, Blalock JE** (1987). Generation of idiotypic and anti-idiotypic antibodies by immunization with peptides encoded by complementary rna: a possible molecular basis for the network theory. *J Immunol*, 138(1):7–9, No abstract available.
- Smith MJ, Koch GL** (1989). Multiple zones in the sequence of calreticulin (crp55, calregulin, hacbp), a major calcium binding er/sr protein. *EMBO J*, 8(12):3581–3586.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1):76-85. Erratum in: *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279.
- Smith RP, Higuchi DA, Broze GJ, JR** (1990). Platelet coagulation factor xia-inhibitor, a form of alzheimer amyloid precursor protein. *Science*, (248):1126–1128.
- Soba P, Eggert S, Wagner K, Zentgraf H, Siehl K, Kreger S, Lower A, Langer A, Merdes G, Paro R, Masters CL, Muller U, Kins S, Beyreuther K** (2005). Homo- and heterodimerization of app family members promotes intercellular adhesion. *Embo J*, (24):3624–3634, Epub 2005 Sep 29.
- Soldano KL, Jivan A, Nicchitta CV, Gewirth DT** (2003). Structure of the n-terminal domain of grp94. basis for ligand specificity and regulation. *J Biol Chem*, 278(48):48330–48338, Epub 2003 Sep 11.
- Sompol P, Ittarat W, Tangpong J, Chen Y, Doubinskaia I, Batinic-Haberle I, Abdul HM, Butterfield DA, St Clair DK** (2008). A neuronal model of alzheimer's disease: An insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. *Neuroscience*, 153(1):120–130, Epub 2008 Feb 7.
- Sontag JM, Fykse EM, Ushkaryov Y, Liu JP, Robinson PJ, Sdhof TC** (1994). Differential expression and regulation of multiple dynamins. *J Biol Chem*, 269(6):4547–4554.
- Sotthibundhu A, Sykes AM, Fox B, Underwood CK, Thangnipon W, Coulson EJ** (2008). Beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci*, 28(15):3941–3946.
- Sparks MB** (2008). Inpatient care for persons with alzheimer's disease. *Crit Care Nurs Q*, 31(1):65–72, Review.
- Sparvero LJ, Patz S, Brodsky JL, Coughlan CM** (2007). Proteomic analysis of the amyloid precursor protein fragment c99: expression in yeast. *Anal Biochem*, 370(2):162–170, Epub 2007 Aug 10.
- Spasic D, Annaert W** (2008). Building gamma-secretase: the bits and pieces. *J Cell Sci*, 121(Pt 4):413–420.
- Spencer B, Rockenstein E, Crews L, Marr R, Masliah E** (2007). Novel strategies for alzheimer's disease treatment. *Expert opin Biol Ther*, 7(12):1853–1867, Review.
- Srivastava PK** (1996). Do human cancers express shared protective antigens? Or the necessity of remembrance of things past. *Semin Immunol*, (8):295–302.
- Stambuk N, Konjevoda P, Boban-Blagaic' A, Pokric' B** (2005). Molecular recognition theory of the complementary (antisense) peptide interactions. *Theory Biosci*, 123(4):265–275.
- Stanley P, Siminovitch L** (1977). Complementation between mutants of cho cells resistant to a variety of plant lectins. *Somatic Cell Genet*, 3(4):391–405.

Steiner H, Capell A, Pesold B, Citron M, Kloetzel PM, Selkoe DJ, Romig H, Mendla K, Haass C (1998). Expression of alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. *J Biol Chem*, 273(48):32322–32331.

Steiner H, Kostka M, Romig H, Basset G, Pesold B, Hardy J, Capell A, Meyn L, Grim MG, Baumeister R, Fichtler K, Haass C (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, Romig H, Grim MG, Philipp U, Pesold B, Citron M, Baumeister R, Haass C (1999). The biological and pathological function of the presenilin-1 exon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J Biol Chem*, (274):7615–7618.

Steiner H, Winkler E, Edbauer D, Prokop S, Basset G, Yamasaki A, Kostka M, Haass C (2002). Pen-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem*, 277(42):39062–39065, Epub 2002 Aug 26.

Stevens TH, Forgac M (1997). Structure, function and regulation of the vacuolar (h⁺)-atpase. *Annu Rev Cell Dev Biol*, (13):779–808, Review.

Stoeck A, Keller S, Riedle S, Sanderson MP, Runz S, Le Naour F, Gutwein P, Ludwig A, Rubinstein E, Altevogt P (2006). A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of I1 and cd44. *Biochem J*, 393(Pt 3):609–618.

Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS, Goldstein LS (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of alzheimer's disease. *Science*, (307):1282–1288.

Storey E, Cappai R (1999). The amyloid precursor protein of alzheimer's disease and the abeta peptide. *Neuropathol Appl Neurobiol*, (25):81–97.

Strekalova H (2004). Alzheimer disease: Identification and characterization of the putative binding partners of amyloid precursor protein (APP) and cell adhesion molecules as biochemical markers. *Dissertation*.

Strittmatter WJ, Roses AD (1995). Apolipoprotein e and alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, (92):4725–4727.

Suga K, Saito A, Tomiyama T, Mori H, Akagawa K (2005). Syntaxin 5 interacts specifically with presenilin holoproteins and affects processing of betaAPP in neuronal cells. *J Neurochem*, 94: 425–39.

Sultana R, Butterfield DA (2008). Alterations of some membrane transport proteins in alzheimer's disease: role of amyloid beta-peptide. *Mol Biosyst*, 4(1):36–41, Epub 2007 Nov 28.

Sumioka A, Nagaishi S, Yoshida T, Lin A, Miura M, Suzuki T (2005). Role of 14-3-3gamma in fe65-dependent gene transactivation mediated by the amyloid beta-protein precursor cytoplasmic fragment. *J Biol Chem*, (280):42364–42374.

Sundar PD, Feingold E, Minster RL, DeKosky ST, Kamboh MI (2007). Gender-specific association of atp-binding cassette transporter 1 (abca1) polymorphisms with the risk of late-onset alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 28(6):856–862.

Sundelöf J, Giedraitis V, Irizarry MC, Sundström J, Ingelsson E, Rönnemaa E, Arnlöv J, Gunnarsson MD, Hyman BT, Basun H, Ingelsson M, Lannfelt L, Kilander L (2008). Plasma beta amyloid and the risk of alzheimer disease and dementia in elderly men: a prospective, population-based cohort study. *Arch Neurol*, 65(2):256–263.

Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994). An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta app717) mutants. *Science*, (264):1336–1340.

- Szklarczyk A, Lapinska J, Rylski M, McKay RD & Kaczmarek L** (2002). Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J Neurosci*, (22):920–930.
- Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T** (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature*, 422(6930):438–441, Epub 2003 Mar 16.
- Talamagas AA, Efthimiopoulos S, Tsilibary EC, Figueiredo-Pereira ME, Tzinia AK** (2007). Abeta(1-40)-induced secretion of matrix metalloproteinase-9 results in sAPPalpha release by association with cell surface APP. *Neurobiol Dis*, 28(3):304-15
- Tampellini D, Magran J, Takahashi RH, Li F, Lin MT, Almeida CG, Gouras GK** (2007). Internalized antibodies to the abeta domain of app reduce neuronal abeta and protect against synaptic alterations. *J Biol Chem*, 282(26):18895–18906, Epub 2007 Apr 27.
- Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, George-Hyslop PSt, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL** (1987). Amyloid beta protein gene: cdna, mrna distribution, genetic linkage near the alzheimer locus. *Science*, (235):880–884.
- Taupin P, Zini S, Cesselin F, Ben-Ari Y, Roisin MP** (1994). Subcellular fractionation on percoll gradient of mossy fiber synaptosomes: morphological and biochemical characterization in control and degranulated rat hippocampus. *J Neurochem*, 62(4):1586–1595.
- Terry RD, Masliah E, Hansen LA** (1999). The neuropathology of alzheimer disease and the structural basis of its cognitive alterations. *Alzheimer disease*, pages 187–206.
- Thomas AV, Herl L, Spoelgen R, Hiltunen M, Jones PB, Tanzi RE, Hyman BT, Berezhovska O** (2006). Interaction between presenilin 1 and ubiquitin 1 as detected by fluorescence lifetime imaging microscopy and a high-throughput fluorescent plate reader. *J Biol Chem*, 281: 6400-7.
- Tjoelker LW, Seyfried CE, Eddy RL Jr, Byers MG, Shows TB, Calderon J, Schreiber RB, Gray PW** (1994). Human, mouse, rat calnexin cdna cloning: identification of potential calcium binding motifs and gene localization to human chromosome 5. *Biochemistry*, 33(11):3229–3236.
- Tomita T, Katayama R, Takikawa R, Iwatsubo T** (2002). Complex n-glycosylated form of nicastrin is stabilized and selectively bound to presenilin fragments. *FEBS Lett*, 520(1-3):117–121.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(9):4350–4354.
- Troeberg L, Nagase H** (2004). Zymography of metalloproteinases. *Curr Protoc Protein Sci*, Chapter 21(Unit 21.15).
- Trombetta ES** (2003). The contribution of n-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology*, (13):pp. 77R91.
- Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, Wang Z, Lee SF, Hao YH, Serneels L, De Strooper B, Yu G, Bezprozvanny I** (2006). Presenilins form er ca2+ leak channels, a function disrupted by familial alzheimer's disease-linked mutations. *Cell*, 126(5):981–993.
- Urrutia R, Henley JR, Cook T, McNiven MA** (1997). The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related gtpases? *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(2):377–384, Review.
- Van Vickle GD, Esh CL, Kokjohn TA, Patton RL, Kalback WM, Luehrs DC, Beach TG, Newel AJ, Lopera F, Ghetti B, Vidal R, Castao EM, Roher AE** (2008). Presenilin-1 280glu->ala mutation alters c-terminal app processing yielding longer abeta peptides: Implications for alzheimer's disease. *Mol Med*, 14(3-4):184–194.

- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999). Beta-secretase cleavage of alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease bace. *Science*, 286(5440):735–741.
- Vassilakos A, Michalak M, Lehrman MA, Williams DB (1998). Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry*, 37(10):3480–3490.
- Vawter MP (2000). Dysregulation of the neural cell adhesion molecule and neuropsychiatric disorders. *Eur J Pharmacol*, 405(1-3):385–395, Review.
- Venezia V, Nizzari M, Carlo P, Corsaro A, Florio T, Russo C (2007). Amyloid precursor protein and presenilin involvement in cell signaling. *Neurodegener Dis*, 4(2-3):101–111, Review.
- Verdier Y, Földi I, Sergeant N, Fülöp L, Penke Z, Janky T, Szücs M, Penke B (2008). Characterization of the interaction between abeta 1-42 and glyceraldehyde phosphodehydrogenase. *J Pept Sci*, page Epub ahead of print.
- Verdier Y, Huszr E, Penke B, Penke Z, Woffendin G, Scigelova M, Fülöp L, Szucs M, Medzihradzsky K, Janky T (2005). Identification of synaptic plasma membrane proteins coprecipitated with fibrillar beta-amyloid peptide. *J Neurochem*, 94(3):617–628, Epub 2005 Jul 7.
- Verdile G, Gandy SE, Martins RN (2007). The role of presenilin and its interacting proteins in the biogenesis of alzheimer's beta amyloid. *Neurochem Res*, 32(4-5):609–623, Review, Epub 2006 Aug 31.
- Verdile G, Gnjec A, Miklossy J, Fonte J, Veurink G, Bates K, Kakulas B, Mehta PD, Milward EA, Tan N, Lareu R, Lim D, Dharmarajan A, Martins RN (2004,). Protein markers for alzheimer disease in the frontal cortex and cerebellum. *Neurology*, 63(8):1385–1392.
- Vetrivel KS, Thinakaran G (2006). Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology*, 66(2 Suppl 1):69–73, Review.
- Visse R, Nagase H (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, biochemistry. *Circ Res*, 92(8):827–839, Review.
- Walker ES, Martinez M, Wang J, Goate A (2006). Conserved residues in juxtamembrane region of the extracellular domain of nicastrin are essential for gamma-secretase complex formation. *J Neurochem*, 98(1):300–309.
- Wallimann T, Hemmer W (1994). Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem*, (133-134):193–220, Review.
- Walsh DM, Minogue AM, Sala Frigerio C, Fadeeva JV, Wasco W, Selkoe DJ (2007). The app family of proteins: similarities and differences. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 2):416–420.
- Walter J, Fluhrer R, Hartung B, Willem M, Kaether C, Capell A, Lammich S, Multhaup G, Haass C (2001). Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem*, 276(18):14634–14641, Epub 2001 Jan 29.
- Walter J, Grünberg J, Capell A, Pesold B, Schindzielorz A, Citron M, Mendla K, George-Hyslop PS, Multhaup G, Selkoe DJ, Haass C (1997). Proteolytic processing of the alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase c. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(10):5349–5354.
- Wang Z, Gardiner NJ, Fernyhough P (2008). Blockade of hexokinase activity and binding to mitochondria inhibits neurite outgrowth in cultured adult rat sensory neurons. *Neurosci Lett*, 434(1):6–11, Epub 2008 Jan 31.
- Waring SC, Rosenberg RN (2008). Genome-wide association studies in alzheimer disease. *Arch Neurol*, 65(3):329–334.

- Wasco W, Bupp K, Magendantz M, Gusella JF, Tanzi RE, Solomon F** (1992). Identification of a mouse brain cdna that encodes a protein related to the alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*, (89):10758–10762.
- Wasco W, Gurubhagavatula S, Paradis MD, Romano DM, Sisodia SS, Hyman BT, Neve RL, Tanzi RE** (1993). Isolation and characterization of *aplp2* encoding a homologue of the alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet*, (5):95–100.
- Watanabe N, Tomita T, Sato C, Kitamura T, Morohashi Y, Iwatsubo T** (2005). Pen-2 is incorporated into the gamma-secretase complex through binding to transmembrane domain 4 of presenilin 1. *J Biol Chem*, 280(51):41967–41975, Epub 2005 Oct 18.
- Wechsler A, Teichberg VI** (1998). Brain spectrin binding to the nmda receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin. *EMBo J*, 17(14):3931–3939.
- Weidemann A, Eggert S, Reinhard FB, Vogel M, Paliga K, Baier G, Masters CL, Beyreuther K, Evin G** (2002). A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with notch processing. *Biochemistry*, 41(8):2825–2835.
- Weidemann A, Konig G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K** (1989). Identification, biogenesis, localization of precursors of alzheimer's disease a4 amyloid protein. *Cell*, (57):115–126.
- Weigand G, Remington SJ** (1986). Citrate synthase: Structure, control, mechanism. *Annu Rev Biophys Chem*, (15):97–117.
- Weigent DA, Hoeprich PD, Bost KL, Brunck TK, Reiher WE 3rd, Blalock JE** (1986). The *htlv-iii* envelope protein contains a hexapeptide homologous to a region of interleukin-2 that binds to the interleukin-2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 139(1):367–374.
- Weil-Mahlherbe H, Bone AD** (1951). Studies on hexokinase. 1. the hexokinase activity of rat-brain extracts. *Biochem J*, 49(3):339–347, No abstract available.
- Wessel D, Flgge UI** (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, 138(1):141–143.
- Westmeyer GG, Willem M, Lichtenthaler SF, Lurman G, Multhaup G, Assfalg-Machleidt I, Reiss K, Saftig P, Haass C** (2004). Dimerization of beta-site beta-amyloid precursor protein-cleaving enzyme. *J Biol Chem*, 279(51):53205–53212, Epub 2004 Oct 12.
- White JM** (2003). Adams: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol*, 15(5):598–606, Review.
- Williams G, Eickholt BJ, Maison P, Prinjha R, Walsh FS, Doherty P** (2005). A complementary peptide approach applied to the design of novel semaphorin/neuropilin antagonists. *J Neurochem*, 92(5):1180–1190.
- Williams G, Wood A, Williams EJ, Gao Y, Mercado ML, Katz A, Joseph-McCarthy D, Bates B, Ling HP, Aulabaugh A, Zaccardi J, Xie Y, Pangalos MN, Walsh FS, Doherty P** (2008). Ganglioside inhibition of neurite outgrowth requires nogo receptor function; identification of interaction sites and development of novel antagonists. *J Biol Chem*, page Epub ahead of print.
- Wilson CA, Doms RW, Lee VM** (1999). Intracellular app processing and a beta production in alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58(8):787–794, Review.
- Wilson JE** (1984). Regulation of mammalian hexokinase activity. in regulation of carbohydrate metabolism. *Beitner, Florida: CRC Press*, 1:45–85.
- Wilson JE** (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol*, 206(Pt 12):2049–2057, Review.

- Winblad B, Wimo A, Jonsson L** (2006). The worldwide direct costs and costs of informal care of dementia. *Alzheimer's Dem*, 2(3 Suppl):19–20.
- Wisniewski T, Frangione B** (1992). Apolipoprotein e: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett*, (135):235–238.
- Wolfe MS** (2006). The gamma-secretase complex: membrane-embedded proteolytic ensemble. *Biochemistry*, 45(26):7931–7939, Review.
- Wolfe MS** (2008). Gamma-secretase: structure, function, modulation for alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem*, 8(1):2–8, Review.
- Wolfe MS, Gunette SY** (2007). App at a glance. *J Cell Sci*, 120(Pt 18):3157–3161, Review, No abstract available.
- Wolfe MS, Kopan R** (2004). Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science*, 305(5687):1119–1123, Review.
- Wolfe MS, Xia W, ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ** (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*, 398(6727):513–517.
- Wolfsberg TG, White JM** (1996). Adams in fertilization and development. *Dev Biol*, (180):389–401.
- Wolfsberg TG, Bazan JF, Blobel CP, Myles DG, Primakoff P, White JM** (1993,). The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloproteinase and a disintegrin domain: Structural, functional and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, (90):10783–10787.
- Wolfsberg TG, Straight PD, Gerena RL, Huovila A-PJ, Primakoff P, Myles DG, White JM** (1995). Adam, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloproteinase domain. *Dev Biol*, (169):378–383.
- Wu L, Gonias SL** (2005). The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts. *J Cell Biochem*, 96(5):1021–1033.
- Wu M, Massaeli H, Durston M, Mesaeli N** (2007) Differential expression and activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the calreticulin deficient cells. *Matrix Biol*, 26(6):463-72
- Xiao ZC, Taylor J, Montag D, Rougon G, Schachner M** (1996). Distinct effects of recombinant tenascin-r domains in neuronal cell functions and identification of the domain interacting with the neuronal recognition molecule f3/11. *Eur J Neurosci*, (8):766–782.
- Xie Z** (2003). Molecular mechanisms of na/k-atpase-mediated signal transduction. *Ann N Y Acad Sci*, (986):497–503, Review.
- Xie Z, Xie J** (2005). The na/k-atpase-mediated signal transduction as a target for new drug development. *Front Biosci*, (10):3100–3109, Review.
- Yamasaki M, Thompson P, Lemmon V** (1997). Crash syndrome: mutations in llcam correlate with severity of the disease. *Neuropediatrics*, 28(3):175–178.
- Yan P, Hu X, Song H, Yin K, Bateman RJ, Cirrito JR, Xiao Q, Hsu FF, Turk JW, Xu J, Hsu CY, Holtzman DM, Lee JM** (2006). Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *J Biol Chem*, 25:281(34):24566-74.
- Yang DS, Tandon A, Chen F, Yu G, Yu H, Arawaka S, Hasegawa H, Duthie M, Schmidt SD, Ramabhadran TV, Nixon RA, Mathews PM, Gandy SE, Mount HT, St George-Hyslop P, Fraser PE** (2002). Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its binding to presenilins. *J Biol Chem*, 277(31):28135–28142, Epub 2002 May 24.

Yang P, Baker KA, Hagg T (2006). The adams family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. *Prog Neurobiol*, 79(2):73–94, Review, Epub 2006 Jul 7.

Yin YI, Bassit B, Zhu L, Yang X, Wang C, Li YM (2007). gamma-secretase substrate concentration modulates the abeta42/abeta40 ratio: Implications for alzheimer disease. *J Biol Chem*, 282(32):23639–23644, Epub 2007 Jun 7.

Yoon IS, Chen E, Busse T, Repetto E, Lakshmana MK, Koo EH, Kang DE (2007,). Low-density lipoprotein receptor-related protein promotes amyloid precursor protein trafficking to lipid rafts in the endocytic pathway. *FASEB J*, 21(11):2742–2752, Epub 2007 Apr 26.

Yukioka F, Matsuzaki S, Kawamoto K, Koyama Y, Hitomi J, Katayama T, Tohyama M (2008). Presenilin-1 mutation activates the signaling pathway of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Neurochem Int*, 52(4-5):683–687.

Yu G, Chen F, Nishimura M, Steiner H, Tandon A, Kawarai T, Arawaka S, Supala A, Song YQ, Rogaeva E, Holmes E, Zhang DM, Milman P, Fraser P, Haass C, St George-Hyslop P (2000). Mutation of conserved aspartates affect maturation of presenilin 1 and presenilin 2 complexes. *Acta Neurol Scand Suppl*, (176):6–11.

Zhao G, Cui MZ, Mao G, Dong Y, Tan J, Sun L, Xu X (2005). gamma-cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain. *J Biol Chem*, 280(45):37689–37697, Epub 2005 Sep 12.

Zhao G, Tan J, Mao G, Cui MZ, Xu X (2007). The same gamma-secretase accounts for the multiple intramembrane cleavages of app. *J Neurochem*, 100(5):1234–1246, Epub 2007 Jan 11.

Zheng H, Koo EH (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener*, (1):5.

Zhu XF, Suzuki K, Saito T, Okada K, Tanaka K, Nakagawa T, Matsuda H, Kawamukai M (1997). Geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoded by the newly isolated gene GGPS6 from *Arabidopsis thaliana* is localized in mitochondria. *Plant Mol Biol*, 35(3):331–41.

Zur Hausen H (1967). Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus typ 12 in human embryonic kidney cells. *Journal of Virology*, 1(6):1174–1185.

DNASTAR, Inc., www.dnastar.com.

<http://gcat.davidson.edu/rakarnik/KD.html>.

<http://www.alzforum.org>.

<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>.

<http://www.piercenet.com/files/1983dh5.pdf>.

Anhang A Akzessionsnummer

Protein	Organismus	Akzessionsnummer
APP	Maus	P12023
CRT	Kaninchen	P15253
L1	Maus	X12875

Tabelle .2: Akzessionsnummern

Anhang B Oligonukleotide

Nr.	Primer	Sequenz
1	HindIII Kozak Start L1-SP _{for}	GAA GCT TTA GCC ACC ATG GCT ATG GTC GTG ATG CTG CGG TAC
2	EcoRI L1-SP _{rev}	GAA TTC GAG CAG GCA GGG GCT GCA GAG
3	EcoRI L1-30kDa _{for}	GAA TTC TTT GCC TCC GAG GGC TGG TTC
4	HindIII Kozak Start L1-ICDs _{for}	GAA GCT TTA GCC ACC ATG GCT AAA CGC AGC AAG GGT GGC AAA
5	XhoI L1-30kDa/ICDs _{rev}	CTC GAG TTC TAG GGC TAC TGC AGG ATT
6	T7 Promotor	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
7	SP6 reverse	TAG TGT CAC CTA

Tabelle .3: Verwendete Primer (SP, Signalpeptid; ICDs, intrazelluläre Domäne löslich (*soluble*); *for*, *forward* (vorwärts); *rev*, *reverse* (rückwärts))

Anhang C Plasmide

Zur Klonierung der L1-Fragmente die Vektoren pcDNA3.1/ Flag-His (Myc durch Flag ersetzt) und pGem (Kap. .3, S. 196) eingesetzt.

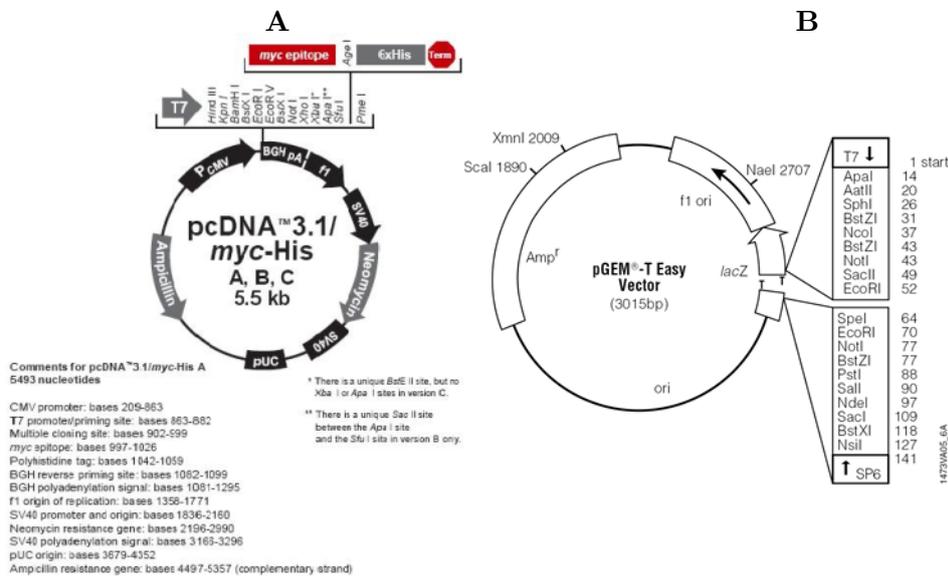


Abb. .3: Verwendete Vektoren

pcDNA3.1 myc-His (Invitrogen, Karlsruhe) (A) und pGem-T Easy (B)

L1-30kDa

Die L1-Signalpeptid (SP) wurde mit den Primern 1 und 2 anhand L1-pcDNA3 mittels PCR amplifiziert und die Restriktionsstellen eingeführt. Das L1-SP wurde nach dem Verdau mit den entsprechenden Enzymen (HindIII/EcoRI) in den pGEM-T Easy Vektor kloniert. Anschließend wurde das Konstrukt wieder unter Verwendung der genannten Enzyme in den Expressionsvektor psDNA3.1 Flag-His überführt und das L1-30kDa (P3/P5, EcoRI/XhoI) nach Restriktion aus dem pGEM-T Easy in denselben Vektor ligiert.

L1-ICD

Die intrazelluläre Domäne (ICD) von L1 wurde mit den Primern 4 und 5 gleichermaßen amplifiziert, mittels HindIII und XhoI geschnitten, zuerst in pGEM kloniert und nach erneuter entsprechender Restriktion in den pcDNA3.1-Vektor ligiert.

Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro (10^{-6})
g	g-Kraft
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
α	alpha
A	Adenin
Abcd	<i>ATP-binding cassette, subfamily d</i>
AD	<i>Alzheimer's disease</i>
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
AICD	APP-intrazelluläre Domäne
Amp	Ampicillin
APH-1	<i>Anterior Pharynx-1</i>
APLP	<i>Amyloid Precursor-like Proteins</i>
APMA	4-aminophenyl-Silberazetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AraC	<i>Cytosine β-D-Arabinofuranosid</i>
ATP	Adenosintriphosphat
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
AS	Aminosäure
β	beta
B103	murine Neuroblastoma-Zelllinie
BACE	<i>a β-site cleaving enzyme</i>
BCII	Biochemie II
BCA	Bicinchoninsäure Dinatriumsalz
bp	Basenpaare
BP	Bindeprotein
BRI2	<i>British Dementia protein-2</i>
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propansulfonat
CHAPSO	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-Propansulfonat
CHL1	<i>close homologue of L1</i>
CHO	Chinesische-Hamster-Ovarzellen
CK	Kreatinkinase
CK-P	Phosphokreatin
CMV	Cytomegalievirus
CRASH	<i>Corpus callosum hypoplasia, Retardation, Adducted thumbs, Spasticity and Hydrocephalus</i>
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>
CRMP	<i>Collapsin Response Mediator Protein</i>
CRT	Calretikulin
CRT-N	Calretikulin-N-Domäne
CRT-NP	Calretikulin-NP-Domäne
CRT-P	Calretikulin-P-Domäne
CRT-C	Calretikulin-C-Domäne
CTF	Carboxy -Terminales Fragment
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
dATP	2-Desoxyadenosintriphosphat

DME	<i>Dulbeccos Modified Eagle</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNM	Dynamamin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxyribonukleotidtriphosphat
DRP	<i>Dihydropyrimidinase Related Protein</i>
DTT	Dithiothreitol
ε	epsilon
E	Eluat
EBK	Ein-Buchstaben-Kode von AS
EBSS	<i>Earle's balanced salt solution</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
E. coli	Escherichia coli
ED	Ektodomäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
EMEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERGIC-53	ER-Golgi intermediate compartment-53
FAD	<i>early onset familial Alzheimer's disease</i>
FAS II	Fasciclin II
F _c	kristallisierbares Fragment
FCS	fötale Kälberserum
Flag	Flag-Oktapeptid
F _n	Fibronektin
FSC	<i>forward scatter</i>
G418	Genetizin
γ	gamma
g	Gramm
G	Guanosin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GRAVY	<i>grand average of hydropathicity</i>
GRP94	gp96, Endoplasmin
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Ham's F12	EMEM (EBSS) (1:1)
HBSS	Hanks gepufferte Natriumchloridlösung
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	histidin tag
HRP	Meerrettich Peroxidase
Hsp	<i>heat shock protein</i>
HW	Hydrophatiewert
HXK	Hexokinase
Hygro	Hygromyzin
ICD	intrazelluläre Domäne
IgG	Immunglobulin Klasse G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
ITM2B	integrales Membranprotein 2B
K-Zelllinie	murine Fibroblasten
kb	Kilobasenpaare
KPI	Kunitz Protease Inhibitions-ähnliche Domäne
l	Liter
L1	neurales Zelladhäsionsmolekül L1
LB	Luria Bertani
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LRP	<i>Low-Density Lipoprotein Receptor</i>
LRRTM	<i>leucine rich repeat transmembrane neuronal</i>

LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i>
m	milli (10^{-3})
M	Molarität, mol/l
MAG	<i>Myelin-Associated Glycoprotein</i>
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
mc	monoklonal
MEM	Minimum Essential Medium
MF	Mossfasern
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MOPS	(4-(N-Morpholino)-propan)-sulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MT-MMP	Membran-Typ Matrixmetalloproteinase
Mut	mutiert
My	Myelin
myc	<i>Myc-Tag</i>
n	nano (10^{-9})
N2A	Maus-Neuroblastom Zelllinie 2A
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NCT	Nicastrin
NF1	Neurofibromin 1
NgCAM	<i>neuron-glia cell adhesion molecule</i>
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NoGP	N-octyl- β -D-Glukopyranosid
NP-40	Tergitol-type NP-40
NrCAM	<i>neural-gial cell adhesion molecule related cell adhesion molecule</i>
Nt	Nukleotid(e)
NTF	Amino (N)-Terminales Fragment
ODx	optische Dichte
Opa1	<i>Optic atrophy 1</i>
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Par11	<i>Presenilin-associated rhomboid-like 1</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pc	polyklonal
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEN-2	<i>Presenilin-Enhancer-2</i>
PFA	<i>para</i> -Formaldehyd
pH	podus hydrogenii, $-\lg a_{H}^{+}$
PLL	Poly-L-Lysin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Presenilin
PSD	postsynaptische Dichte
RIP	regulierte Proteolyse innerhalb der Membran
RIPA	Radioimmunopräzipitation
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTN4R	Nogo-Rezeptor-1, NgR
RV	Ranvier'sche Schnürringe
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Signalpeptid
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
SSC	<i>side scatter</i>
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimide
SW	<i>swedish mutant</i>
Syn	Synaptosomen
SY5Y	humane Neuroblastoma-Zelllinie

T	Thymin
TACE	<i>Tumour necrosis factor alpha converting enzyme</i>
TABS	(N-Tris-(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropan-sulfonsäure
TAE	Tris Azetat EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylenamin
Tet	Tetracyclin
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
T _m	Schmelztemperatur
TMD	Transmembradomäne
TRPC	<i>Transient Receptor Potential Cation</i>
TRPP	<i>Transient Receptor Potential Polycystin</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TritonX-100	C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n
Tween20	Polysorbate 20
ü.N.	über Nacht
U	enzymatische Einheit
uMtCK	mitochondriale Isoform der Kreatinkinase
UV	Ultraviolett
V	Volt
vATPase	vakuoläre ATPase
VDCA	<i>Voltage-Dependent Anion Channel</i>
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
ζ	zeta
ZMBH	Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg
ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

1.1	A. Alzheimer & die Originalaufnahme des Gehirns seiner Patientin Auguste D.	2
1.2	Strukturelle und funktionelle Domänen des Amyloid Precursor Proteins . . .	5
1.3	Die Prozessierung von APP durch Sekretasen	8
1.4	Mutationen des APP-Gens im Bereich des A β -Peptids	10
1.5	BACE-Dimer mit möglichen katalytisch aktiven Stellen	11
1.6	Komponenten und Zusammenbau der γ -Sekretase	12
1.7	Endoproteolyse von Presenilin	13
1.8	Eine mögliche Struktur von Presenilin1	14
1.9	Struktur von Nicastrin	15
1.10	Struktur des Anterior pharynx defectice-1	16
1.11	Struktur des <i>Presenilin enhancer-2</i>	17
1.12	Moduläre Struktur von L1	18
1.13	Struktur von Calretikulin	22
1.14	Domänenstruktur der ADAMs	24
1.15	Domänenstruktur der MMPs	26
1.16	Domänenstruktur der Gelatinasen (MMP-2 / MMP-9)	27
3.1	Aufbau eines diskontinuierlichen Saccharosegradienten	59
3.2	Mechanismus der Oberflächenbiotinylierung	74
3.3	Hydrophathiefenster	90
3.4	Kyte-Doolittle-Hydrophathie-Profil	91
4.1	Aminosäure-/DNS-Sequenz der APP- γ -Spaltstelle und des D-Peptids	95
4.2	Konzept der Identifikation von an die APP- γ -Spaltstelle bindender Proteine .	95
4.3	Spezifität des anti-D-Antikörpers	96
4.4	Expression von APP in verschiedenen Mausgehirnfraktionen	97
4.5	Charakterisierung der vom anti-D-IgG erkannten Proteine (Löslichkeit) . . .	98
4.6	Lösungsverhalten der möglichen APP-Bindepartner	99
4.7	Affinitätschromatographie der Synaptosomen von WT-Mäusen	100
4.8	Dynamin 1: Domänenstruktur und Phosphorylierungsstellen	105
4.9	Struktur der Glukose- und Phosphat-bindenden Hexokinase TypI	106
4.10	Struktur und Funktion der Na ⁺ -/K ⁺ -ATPase	106
4.11	Struktur und Funktion von MAG	107
4.12	Gesamtstruktur des GAPDH Homotetramers aus menschlicher Leber	108
4.13	Struktur des ζ - 14-3-3 Dimers	109
4.14	Überprüfen der Elutionsfraktionen mit Hilfe der spezifischen Antikörper . . .	110
4.15	Analyse der Co-Immunpräzipitation der identifizierten Proteine und APP . .	111
4.16	Analyse der Co-Immunpräzipitation der Na ⁺ -/K ⁺ -ATPase und PS	112
4.17	Analyse der Co-Immunpräzipitation von APP und der Kreatinkinase-B . . .	113
4.18	B103-Zelloberflächenvorkommen der Kreatinkinase-B	114
4.19	Graphische Darstellung der Menge an biotinylierter CK-B unterschiedlicher B103-Zellen	115

4.20	Domänenstruktur von Calretikulin	116
4.21	Analyse der Co-Immunpräzipitation von CRT und APP	117
4.22	schematische Proteinstruktur von APP	117
4.23	Schematische Darstellung der β -Spaltung von APP	118
4.24	Analyse der Co-Immunpräzipitation von CRT und C99-APP	118
4.25	Analyse der <i>pulldown</i> -Experimente der CRT-GST-Proteine und APP-C99 . .	119
4.26	Aufbau der γ -Sekretase	119
4.27	Autoproteolyse von Presenilin1	120
4.28	Analyse der Co-Immunpräzipitation von CRT und PS1	120
4.29	Co-Lokalisation von APP und CRT in hippocampalen Primärkulturen	121
4.30	Analyse der <i>pulldown</i> -Untersuchung mit der GST-CRT-Proteinen und PS1 .	122
4.31	Analyse der Immunpräzipitation des γ -Sekretasekomplexes	123
4.32	Analyse der Co-Immunpräzipitation von CRT und NCT	124
4.33	Analyse der <i>pulldown</i> -Untersuchung mit den GST-CRT-Proteine und NCT .	125
4.34	Analyse der APP-Oberflächenkonzentration mittels Oberflächenbiotinylierung	126
4.35	Analyse der APP-Oberflächenkonzentration mittels Durchflusszytometrie . .	127
4.36	Analyse der CRT-Expression in Abhängigkeit der PS1-Aktivität	129
4.37	Auswertung der Analyse der CRT-Expression in Abhängigkeit der PS1-Aktivität	130
4.38	Analyse der Immunpräzipitation von L1 und CRT	131
4.39	Charakterisierung der CRT/L1-Interaktion mittels Co-Immunpräzipitation .	131
4.40	Analyse des entsprechenden L1-Vorkommens in Abhängigkeit zu CRT	132
4.41	Analyse der L1-Gesamtkonzentration in Abhängigkeit von CRT in K-Zellen .	133
4.42	Analyse der ADAM8- und ADAM9-vermittelten Spaltung von APP und L1 .	134
4.43	Überprüfung der Gelatinaseaktivität	135
4.44	Analyse der MMP-9 vermittelten Spaltung von APP und L1	136
4.45	Analyse der Elutionsfraktion der 555-L1-Affinitätschromatographie	137
5.1	APP im Überblick	148
5.2	Modell der möglichen inhibierenden Funktion von CRT bei der γ -Sekretase- vermittelten Spaltung von APP	157
.3	Verwendete Vektoren	196

Tabellenverzeichnis

2.1	Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	30
2.2	Verwendete Antibiotika	31
2.3	Verwendete Detergenzien	31
2.4	Verwendete Inhibitoren	32
2.5	Verwendete Basiszelllinien und ihre Eigenschaften	32
2.6	Verwendete stabil transfizierte Zelllinien	33
2.7	Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der CHO-Zelllinie	33
2.8	Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der B103-Zelllinie	34
2.9	Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der HEK-Zelllinie	34
2.10	Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der K41- und K42-Zelllinie	35
2.11	Verwendete <i>E.coli</i> -Stämme und ihre Eigenschaften	36
2.12	Verwendete Plasmide und ihre Charakteristika	37
2.13	Verwendete Expressionskonstrukte und ihre Charakteristika	38
2.14	Verwendete Primärantikörper und ihre Charakteristika (mc, monoklonal; pc, ployklonal; ED, Ektodomäne; ICD, interzelluläre Domäne; AS, Aminosäure; GP, Gesamtprotein; IB, Immunoblot; IP, Immunpräzipitation; IH, Immun-Histochemie)	42
2.15	Sekundärantikörper (IH, Immunhistochemie; IB, Immunoblot)	43
2.16	Verwendete Metalloproteasen	43
2.17	Verwendete Peptide	43
2.18	Verwendete GST-Proteine	44
2.19	Molekulargewicht Standards	44
3.1	Zusammensetzungen von Sammel- und Trenngellösungen, 1 SDS-PA-Gel, 1mm	47
3.2	Zusammensetzung der Sammel- und Trenngellösungen, Trizin-SDS-Gel (3 Gele 1mm; 2 Gele 1,5mm)	48
3.3	Verwendete Saccharoselösungen	56
3.4	Verwendete PCR-Reagenzien sowie die eingesetzten Konzentrationen	76
3.5	Transfektionsmethoden in Beziehung zu Zelllinien und Vektoren	82
3.6	Aminoäure-Hydropathiewerte (EBK, Ein-Buchstaben-Kode; HW, Hydropathiewert)	90
3.7	Hydropathiewerte der zu hydrophoben AS komplementären AS (AS, Aminosäure; HW, Hydropathiewert; MW, Mittelwert)	92
4.1	Mögliche Bindepartner der APP γ -Spaltstelle (Erhalten durch Affinitätschromatographie und massenspektrometrische Analyse der ausgeschnittenen SDS-Banden)	101
4.2	mögliche APP-Bindepartner - Funktion, Vorkommen und Referenz	103
5.1	Mögliche Bindeproteine der APP- γ -Spaltstelle (PSD, postsynaptische Dichte; NMDA, N-Methyl-D-Aspartat)	139
.2	Aksessionsnummern	195

.3 Verwendete Primer (SP, Signalpeptid; ICDs, intrazelluläre Domäne löslich (*soluble*); *for*, *forward* (vorwärts); *rev*, *reverse* (rückwärts)) 195

Danksagung

Frau Prof. Dr. Melitta Schachner danke ich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die interessante Themenstellung sowie ihr Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jürgen Frey danke ich für die außerordentlich nette und unkomplizierte Betreuung während der gesamten Zeit meiner Arbeit sowie für die Bereitstellung seines Labores und Unterstützung bei den Proteolyse-/Durchflusszytometer-Experimenten.

Mein besonderer Dank gilt sowohl Herrn PD Dr. Ralf Kleene als auch Herrn Dr. Carsten Schmidt für viele hilfreiche Diskussionen und Anregungen sowie für die gute Betreuung dieser Arbeit.

Dr. Helen Strekalova und Dr. Ina Kalus danke ich für all die Experimente und Ergebnisse, die es möglich gemacht haben, die Arbeit darauf aufbauend weiter fortzuführen.

Ich danke Gerrit Wolters, dem “wahren Wissenschaftler”, für die Hilfe beim klonieren der L1-Fragmente.

Außerdem danke ich Dr. Simon Mügge und Christina Geerds sowie der restlichen Arbeitsgruppe BCII der Universität Bielefeld für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung bei den Spaltansätzen und durchflusszytometrischen Messungen.

Besonders möchte ich mich bei Stefan Rattai und seinen Kollegen aus der EDV bedanken, die mir bei meinen Laptop betreffenden Problemen, besonders als er meinte sich verabschieden zu müssen, mit Rat und Tat zur Seite standen. Auch Fritz und Torsten aus der Werkstatt haben in den doch oft aufgetretenen technischen Notsituationen immer aushelfen können und ich möchte ihnen daher meinen Dank zukommen lassen.

Ein spezieller Dank gilt Daniel “Dansen” Novak, der mir immer sowohl fachlich als auch moralisch zur Seite gestanden und die unendlich vielen Rechtschreib- sowie Zeichensetzungsfehler aufgedeckt hat. Ich danke Ingo Meier für all die hilfreichen Gespräche und dass er nicht aufgegeben hat, mich zum Klettern zu bewegen sowie Iva Apostolova für die vielen Kletterstunden. Sandra Nickel und Isabel Köhlitz danke ich für die vielen schönen, ausgleichenden Momente, sei es im Urlaub, beim Einkaufen oder einfach nur beim Quatschen.

Ute Bork, Ute Eicke-Kohlmorgen, Peggy Putthof, Gabi Loers (vielen Dank für die Hilfestellung im Laboralltag), Nicole Karl, Aparna Shetty, Vasudharani Devanathan, Mounir Mzoughi, Janinne Schmid, Alex Eder - danke für die gute Stimmung im Labor, die viel zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterialien und Geräten sowie für hilfreiche Diskussionen möchte ich den folgenden Kooperationspartnern danken:

- Herrn Prof. Dr. Harald Steiner und Prof. Dr. Haas, Adolf-Butenandt-Institut (LMU) München, Deutschland
- Prof. Dr. Marek Michalak, Departement of Biochemistry (University of Alberta) Edmonton, Kanada
- Prof. Dr. Leszek Kaczmarek, Laboratory of Molecular Neurobiology (Nencki Institute) Warschau, Polen
- Dr. Stefan Kins, (ZMBH) Heidelberg, Deutschland

Ich danke Torsten Schulz. Unsere Verbindung - besonders und ohne Worte.

In gesondertem Maße möchte ich mich bei meinen Eltern und bei meinen Brüdern Kai und Robin bedanken, die immer für mich da waren, stets ein offenes Ohr für mich hatten und mich nach allen Kräften unterstützt haben, auch von ganz weit her. Ein ganz besonderer Dank gilt dabei Robin, der mir in stundenlanger bzw. nächtelanger Arbeit bei allen Latex-spezifischen Fragen und den Renderings zur Seite gestanden hat; ohne den ich nicht den Mut aufgebracht hätte, meine Arbeit mit diesem Programm zu verfassen und nie so weit gekommen wäre.