

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Neuropathologie

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Paulus -

**Expression von potentiell AICD-abhängigen Kandidatengen in  
transgenen Mausmodellen der Alzheimer-Erkrankung und in  
humanem Autopsiegewebe**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Heide Vogel

aus Göttingen

2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

---

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

I. Berichterstatter/in: Univ.-Prof. Dr. Werner Paulus

II. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. Rupert Egensperger

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Neuropathologie

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Paulus -

### **Zusammenfassung**

Expression von potentiell AICD-abhängigen Kandidatengenen in transgenen Mausmodellen der Alzheimer-Erkrankung und in humanem Autopsiegewebe

Heide Vogel

Das Amyloid Precursor Protein (APP) spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Morbus Alzheimer. APP ist ein Transmembranprotein, dessen extrazelluläre Domäne Hauptbestandteil der mit der Alzheimer-Erkrankung assoziierten Plaques ist und dessen durch Beta- und Gamma-Sekretase entstandene intrazelluläre Domäne (AICD) einen trimeren Komplex mit dem Adaptorprotein Fe65 und Tip60 bildet. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass AICD transaktivierendes Potential besitzt, jedoch sind die durch AICD regulierten Gene bisher weitgehend unbekannt.

In Vorarbeiten war das Transkriptom von für AICD und den Koaktivator Fe65 induzierbaren Neuroblastom-Zelllinien im Vergleich zu nicht-induzierbaren Neuroblastomzellen untersucht worden. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde nun die mRNA-Expression einer Reihe identifizierter Kandidatengene auch in transgenen Mausmodellen der Alzheimer-Erkrankung sowie in Hirngewebe von Alzheimer-Patienten mittels real-time PCR im Vergleich zu gesunden Kontrollen untersucht.

Hierbei ergab sich nicht nur in den untersuchten Mausmodellen sondern auch im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen eine differentielle Expression des für das Insulin-Growth Factor Binding Protein 3 kodierenden Gens *IGFBP3*. Mittels ELISA konnte zudem im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten eine Überexpression von Insulin-Growth Factor Binding Protein 3 auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Rolle von IGFBP3 in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung hin.

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2009

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1	Die Alzheimer-Erkrankung	7
1.2	Das Amyloid Precursor Protein (APP)	13
1.3	Die Intrazelluläre Domäne des Amyloid Precursor Proteins (AICD)	17
1.4	Transgene Mausmodelle der Alzheimer Erkrankung	20
1.5	Der Arbeit zugrunde liegende Vorarbeiten	23
1.6	Zielsetzung der Arbeit	24
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
2.1	Untersuchungsmaterial und Materialgewinnung	25
2.2	RNA-Arbeitstechniken	26
2.3	Proteinanalytik	32
2.4	Statistik	33
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
3.1	Real-time PCR Analysen im Fe65- sowie AICD+Fe65-transgenen Mausmodell	34
3.2	Real-time PCR Analysen des transgene Mausmodells APP23 mit der Mutation K670/M671L („swedish“-Mutation)	38
3.3	IGFBP3 mRNA-Expression in Autopsie-Gewebe von Alzheimer-Patienten	43
3.4	IGFBP3 Proteinexpression in Autopsie-Gewebe von Alzheimer-Patienten	44
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>46</b>
4.1	Funktionalität der untersuchten Modelle	48
4.2	Heterogene Ergebnisse der APP-abhängigen Genregulation von Kandidatengene	49
4.3	Das signifikant regulierte Gen Insulin-Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3)	52
4.4	Ausblick	55
<b>5</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>57</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>70</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abbildung 1	Prozessierung von APP	15
Abbildung 2	Expression von AICD in Hippocampus, Frontalhirn und Cerebellum Fe65- sowie AICD+Fe65-transgener Mäuse.	35
Abbildung 3:	Expression von Fe65 in Hippocampus, Frontalhirn und Cerebellum Fe65- sowie AICD+Fe65-transgener Mäuse.	36
Abbildung 4:	Expression von IGFBP3 in Hippocampus, Frontalhirn und Cerebellum Fe65- sowie AICD+Fe65-transgener Mäuse.	37
Abbildung 5:	Expression aller untersuchter Gene im Frontalhirnin Fe65- sowie AICD+Fe65-transgener Mäuse.	38
Abbildung 6:	Expression von humanem APP im Hippocampus 3 Monate und 6 Monate alter transgener APP23-Mäuse.	39
Abbildung 7:	Expression von IGFBP3 im Hippocampus 3 Monate und 6 Monate alter transgener APP23-Mäuse.	40
Abbildung 8:	Expression von Fe65 im Hippocampus 3 Monate und 6 Monate alter transgener APP23-Mäuse.	41
Abbildung 9:	Expression aller untersuchter Gene im Hippocampus drei Monate alter transgener APP23-Mäuse.	42
Abbildung 10:	Expression von IGFBP3 in Frontalhirn und Cerebellum von Alzheimer-Patienten.	44
Abbildung 11:	Expression von IGFBP3 Protein im Frontalhirn von Alzheimer-Patienten und Kontrollen..	45

## TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 1:	Primer für die real-time PCR im transgenen Mausmodell.	29
Tabelle 2:	Primer für die für die real-time PCR im humanen Autopsiegewebe.	30
Tabelle 3:	Charakteristika des Autopsiegewebes. Alter und Post-mortem-Zeit bei Alzheimer-Patienten (n=6) und Kontrollpersonen [n=5, Mittelwert (Bereich)].	43

## ABKÜRZUNGEN

---

AD	Alzheimer Disease
AICD	APP-intrazelluläre Domäne
APP	Amyloid Precursor Protein
ApoE	Apolipoprotein E
AS	Aminosäure
$\beta$ A4	Beta-Amyloid-Protein
CERAD	<i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>
CTF	C-terminales Fragment
FAD	<i>Familial Alzheimer Disease</i>
HBP	Hirnperizyten
IGFBP3	Insulin-Growth Factor Binding Protein 3
NFT	Neurofibrilläre Tangles
RIP	Regulated Intramembrane Proteolysis
RT	Raumtemperatur
IGF	Insulin-like growth factor

# 1 EINLEITUNG

---

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist ein Proteinfragment, der zytoplasmatische Anteil des Amyloid Precursor Proteins (APP), das im Rahmen der Geschichte der Erforschung der Alzheimererkrankung entdeckt wurde und an der Regulation der Transkription von Genen beteiligt sein soll. Einführend wird die Alzheimer-Erkrankung von der Entdeckung bis hin zu modernen molekularbiologischen Hypothesen des Pathomechanismus von Morbus Alzheimer beschrieben.

## 1.1 Die Alzheimer-Erkrankung

### 1.1.1 Epidemiologie, Symptome, Diagnostik, Risikofaktoren

Kaum ein Gegenstand hat in der derzeitigen Biomedizin ein solches Interesse gleichsam auf gesellschaftlicher wie auf wissenschaftlicher Seite erregt, wie diese mit über 70% häufigste Ursache einer Demenz. Ein Indikator für die wachsende Aufmerksamkeit sind die über 20000 wissenschaftlichen Veröffentlichungen zwischen 1991 und 1999 mit einer jährlichen Steigerungsrate der Publikationen von 10% (RKI statistisches Bundesamt Demenzheft).

Der medizinhistorisch erste, durch Alzheimer beschriebene Fall der Auguste D. liegt über 100 Jahre zurück. Er war es auch, der erstmals die Symptome als distinkte Entität identifizieren sollte und die Erkrankung nicht als seelische, sondern als organische Erkrankung erkannte. In der „Allgemeinen Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin“ aus dem Jahr 1907 / Bd. 64 (S.146-148) ist „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ zu lesen:

*Eine Frau von 51 Jahren zeigte als erste auffällige Krankheitserscheinung Eifersuchtsideen gegen den Mann. Bald machte sich eine rasch zunehmende Gedächtnisschwäche bemerkbar, sie fand sich in ihrer Wohnung nicht mehr zurecht, schleppte die Gegenstände hin und her, versteckte sie, zuweilen glaubte sie, man wolle sie umbringen und begann laut zu schreien. In der Anstalt trug ihr ganzes Gebaren den Stempel völliger Ratlosigkeit. Sie ist zeitlich und örtlich gänzlich desorientiert(...).*

Alzheimer beschrieb eine bereits im fortgeschrittenen Stadium erkrankte Frau, die aus heutiger Sicht an einer präsenilen Form der Erkrankung litt.

Als erstes Krankheitssymptom treten bei der Alzheimer-Erkrankung häufig kleinere Vergesslichkeiten auf, die initiale Befundpräsentation kann jedoch äußerst heterogen sein. Bereits früh kommt es bei dieser Demenzform zu einer Einbuße der kognitiven Fähigkeiten. Der progrediente Verlust des Kurzzeitgedächtnisses führt in der Regel zu Orientierungsschwierigkeiten. Alzheimer äußerte bezeichnenderweise aufgrund der ausgeprägten Aphasie in dem geschilderten historischen Fall der Auguste D. die Verdachtsdiagnose einer „anamnestischen Sprachstörung“. Die Aphasie und andere neuropsychologische Symptome stellen eine bekannte Krankheitserscheinung dar. Die Persönlichkeit kann im Gegensatz zu anderen Demenzformen relativ lange erhalten bleiben. Im Verlauf der durchschnittlichen Krankheitsdauer von 7-10 Jahren benötigen die Betroffenen eine Vollzeitpflege, werden zunehmend immobil und erliegen der Erkrankung in der Regel durch internistische Komplikationen.

Die durchschnittliche Lebenserwartung eines 1870 geborenen Kindes betrug 37 Lebensjahre. Der dramatische Anstieg der Lebenserwartung und der annähernd exponentielle Anstieg der Alzheimer-Erkrankung mit wachsendem Alter von weniger als 2 % bei den 65- bis 69-jährigen auf über 30 % bei den 90-jährigen verdeutlicht die sozioökonomische Problematik. Ca. 1 Millionen Menschen sind derzeit in Deutschland von der Krankheit betroffen; die Inzidenz beträgt 200000 pro Jahr (RKI Statistisches Bundesamt Alterdemenz). Eine effektive, möglicherweise gar kausale Therapie dieser Erkrankung ist derzeit Utopie.

Noch immer gibt es keinen biologischen Marker, der die Alzheimer-Erkrankung mit absoluter Gewissheit bestätigen kann; die Diagnose stützt sich weiterhin im wesentlichen auf die klinische Untersuchung, die eine Diagnosestellung mit einer Sicherheit von ca. 90% erlaubt (Jellinger et. al. 1992).

Unterstützend kann in der Bildgebung kernspintomographisch eine stadienabhängige Volumenminderung der Hirnrinde nachgewiesen werden; die Positronen-Emissions-Tomographie, die eine valide Differenzierung zu der Lewy-Körperchen-Demenz erlaubt, zeigt temporale und parietale Veränderungen des Glukosemetabolismus. Im

Liquor sind Erniedrigungen von Abeta 41-42, Erhöhungen von Abeta 1-40 und Tau-Protein zu verzeichnen.

Der Goldstandard bleibt jedoch die autoptische Untersuchung des Gehirns, wobei diagnostisch der Nachweis seniler Plaques und neurofibrillärer Tangles von besonderer Relevanz sind. Das CERAD-Protokoll von 1993, bei dem ein altersabhängiger Plaque-Score ermittelt wird, ist international anerkannt.

Neben der noch ungeklärten Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung sind die Krankheitsursachen und Risikofaktoren, abgesehen von den wenigen genetisch bestimmten Formen, ebenfalls weitgehend unbekannt. Wie aus den epidemiologischen Daten zu vermuten, stellt höheres Lebensalter den wichtigsten Risikofaktor dar.

Für die sporadischen Alzheimerfälle wurde 1993 ein erster genetischer Risikofaktor identifiziert: Saunders et al. (1993) konnten nachweisen, dass eine Isoform des Apo E, das „ε4“, bei Alzheimer Patienten signifikant (38%) häufiger auftritt, als bei Gesunden (12%). ApoE scheint für synaptische Plastizität und Regeneration wichtig zu sein; das ε4-Allel geht mit verminderter Kompensationsfähigkeit einher (C. Bancher et al.).

### 1.1.2 Von der Neuropathologie zur Molekularbiologie

Wie Alzheimer 1907 im Tübinger Referat veröffentlichte, ergab sich bei der Sektion der fünf Jahre nach dem oben erwähnten Interview verstorbenen Auguste D. der Befund von

*merkwürdig veränderten Neurofibrillen. (...) Über die ganze Rinde zerstreut (...) findet man miliare Herdchen, welche durch Einlagerung eines eigenartigen Stoffes in die Hirnrinde bedingt sind (...).*

Es handelt sich um die Krankheit mikroskopisch auszeichnende intrazelluläre neurofibrilläre Tangles und Amyloid-Plaques.

Während kortikale Plaques bereits 1898 als morphologisches Korrelat der senilen Demenz durch den Wiener Neuropathologen Emil Redlich beschrieben worden waren, stellten die von Alzheimer entdeckten neurofibrillären Tangles ein Novum dar. Hierbei handelt es sich um Zytoskelettaggregate in Neuronen, die als Hauptbestandteil das Mikrotubuli-assoziierte hyperphosphorylierte Protein Tau und das Stressprotein

Ubiquitin enthalten. Im physiologischen Zustand dient Tau der Stabilität der Mikrotubuli, die wiederum für Transportvorgänge der Zelle notwendig sind (Mandelkow et al. 1996). Als typisches mikrotubuli-assoziiertes Protein wird Tau phosphoryliert. Der hyperphosphorylierte Zustand des Proteins führt zur Bildung von „paired helical filaments“, welche schließlich zu der Formation neurofibrillärer Tangles innerhalb des Somas von Neuronen führt. An einer großen Serie von Gehirnen konnten Braak und Braak 1991 zeigen, dass die Neurofibrillenbündel in einem stereotypen Muster mit hierarchischer Ausbreitung angeordnet sind, die im Gegensatz zu den Amyloidplaques mit dem Schweregrad der Demenz gut korrelieren. Im Braak-Stadium I-II treten NFTs zunächst im transentorhinalen Kortex auf; es folgt im Stadium III-IV der gesamte entorhinale Kortex, das Ammonshorn und andere limbische Strukturen; in den letzten Stadien V und VI sind sämtliche isokortikalen Assoziationskortexe betroffen (Braak et al. 1991).

Als zweites Charakteristikum und für die Diagnose entscheidend sind die neuritischen Plaques – konzentrische Ablagerungen im Neuropil, die aus einem zentralen Amyloidkern und einem peripheren Kranz aus degenerierten Neuriten und Astrozytenfortsätzen bestehen. Die hauptsächlich extrazellulär lokalisierten Plaques lagern sich in frühen Stadien als diffuse, amorphe Plaques ab, sind nicht mit dem klinischen Bild einer Demenz verbunden und vermutlich benigne (Joachim et al. 1989); später infiltrieren sie als organisierte neuritische Plaques das Hirnparenchym. Der Großteil des fibrillären Abeta der neuritischen Plaques besteht aus 42 Aminosäuren (Abeta 42); verglichen mit Abeta 40 wird dem Abeta 42 eine besondere Neigung zur Aggregation zugesprochen (Jarrett et al. 1993). Wie lange es dauert, bis sich aus den präamyloiden diffusen Plaques die neuritischen Plaques entwickeln, ist nicht bekannt. Für den Einsatz von APP-transgenen Tiermodellen mit unterschiedlichen APP-Mutationen ist das Alter der Entstehung von Plaques bei der Erforschung der Alzheimerpathologie relevant.

Sowohl beim Menschen als auch im transgenen Mausmodell ist besonders die Hippocampusregion von der Abeta-Akkumulation und Plaquebildung betroffen; das Kleinhirn entwickelt keine signifikanten Amyloidablagerungen (Irizarry 2001, Pratico 2001).

Der Vortrag Alzheimers im Jahre 1907 blieb zunächst praktisch ohne Konsequenzen. Trotz weiterer neuropathologischer Untersuchungen begegnete die Ärzteschaft in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts bis weit in die 60-er Jahre sämtlichen neurodegenerativen Erkrankungen mit einem gewissen Nihilismus. Erst als zu Beginn der 60-er Jahre Michael Kidd und Robert Terry elektronenmikroskopisch die Ultrastruktur der Plaques und Tangles beschreiben konnten, vollzog sich ein Wandel auf wissenschaftlicher Seite.

In den 70er Jahren rückte ein Neurotransmittersystem in den Brennpunkt wissenschaftlichen Interesses. Der Schwund cholinergischer Neuronen besonders im basalen Frontalhirn sowie in den subcorticalen Nuclei und das mit diesem einhergehende acetylcholinerge Defizit stellte eine erste Hypothese der Alzheimergenese dar. Diese war mit der Hoffnung verbunden, durch medikamentöse Substitution der fehlenden Substanz eine Therapie zu etablieren. Auch wenn noch immer Acetylcholinergika für eine temporäre Verbesserung der Symptome eingesetzt werden, blieb der durchschlagende Effekt aus. Schon bald wurde offensichtlich, dass, anders als bei Morbus Parkinson, bei der Alzheimer-Erkrankung nicht vorwiegend nur *ein* Transmittersystem gestört ist.

Rückbesinnend auf die klassischen Alzheimerläsionen konnten, nachdem 1984 Allsod, Landon und Kidd eine Methode zur Isolierung von Plaques einführten, die Amerikaner Glenner und Wong 1984 ein Protein mit 4,2 kDa identifizieren, das beta-Amyloid-Protein. Die heute für den Hauptbestandteil der senilen Plaques geläufige Abkürzung  $\beta A4$  ist durch die Erkenntnisse Beyreuthers et al. zustande gekommen. Diese erkannten eine *Beta*faltblattstruktur in dem Protein. Das Molekulargewicht beträgt 4 kDa. Erst vier Jahre nachdem bereits das N-terminale Spaltprodukt  $\beta A4$  identifiziert wurde, gelang es Kang und seiner Arbeitsgruppe das gesamte Protein APP zu isolieren und zu sequenzieren (Kang et al. 1987). Es wurde offensichtlich, dass APP ein Vorläuferprotein von Abeta, daher „*Amyloid-Precursor-Protein*“, darstellt. Vergleichsweise jung ist dagegen die Entdeckung der zytoplasmatischen Domäne des Vorläufermoleküls AICD, die durch ihre funktionelle Domäne und ihre damit verbundene potentielle Bedeutung in der intrazellulären Signalkaskade zunehmend Interesse erregt.

### 1.1.3 *Konkurrierende Hypothesen zur Entstehung der Alzheimererkrankung*

Die Bedeutung der Amyloid-Akkumulation und der Tangle-Bildung in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung wird ausgiebig diskutiert; es haben sich zwei Lager gebildet, die häufig als „ $\beta$ -aptisten“ und „Tau-isten“ bezeichnet werden. Erstere sehen in Abeta den Hauptverantwortlichen für die AD-Pathogenese, letztere halten das hyperphosphorylierte Tau und die NFTs für die primären Verursacher der Erkrankung (Janus et al. 1999). In einer weiteren Theorie komplementär zu der Amyloid-Hypothese wird postuliert, dass APP auf noch unklare Weise die Signalkaskade in der Zelle modifiziert und an der Regulation der Transkription bestimmter Gene beteiligt ist. Diese führen möglicherweise zu Zellzyklusveränderungen, Apoptose, Amyloidformation und schließlich Demenz. Die Hypothese basiert auf der Beobachtung, dass APP mit diversen, in die Signaltransduktion involvierten Proteinen interagiert.

### 1.1.4 *Hereditäre Alzheimer Erkrankung (Familial Alzheimer Disease (FAD))*

Es liegen eine Reihe von Hinweisen vor, die Abeta als kausales Agens der Alzheimer-Erkrankung implizieren. Historisch interessant ist die Tatsache, dass die erste Mutation der mit 5-10% seltenen Form der autosomal dominant vererbten familiären Alzheimer-Erkrankung (FAD) (Vgl. RKI Heft 28 Altersdemenz) im APP-Gen entdeckt wurde (Haas et. al, 1995). Diese Mutation wurde nach dem ethnischen Ursprung der Familie, in der sie erstmalig entdeckt wurde, als Mutation vom „Dutch-Typ“ bezeichnet. Bei der für die vorliegende Arbeit relevanten sogenannten „Swedish APP Mutation“ handelt es sich um eine Doppelmutation zweier unmittelbar auf die Beta-Sekretaseschnittstelle folgender Aminosäuren, bei der es durch eine verstärkte Beta-Sekretaseprozessierung zu einer vermehrten Akkumulation von Abeta 40-42 kommt (Selkoe 1994). Es konnten bis dato acht weitere Mutationen nachgewiesen werden, die zu einem Anstieg der Abeta-Produktion. Neben Veränderungen der Aminosäuresequenz durch Mutationen im Bereich des auf dem langen Arm des Chromosom 21 (21q21) gelegenen APP Gens wird auch bei der Trisomie 21 eine vermehrte Plaquebildung beobachtet, als deren Ursache die erhöhte Gendosis vermutet wird (Selkoe 2002). Tatsächlich extrahierten und sequenzierten Masters et al. (1985) sowie Kang et al. (1987) Abeta ursprünglich aus Gehirnen von Patienten mit Trisomie 21. Deren Gehirne weisen in der Regel noch vor dem dreißigsten Lebensjahr Alzheimer-typische neuropathologische Veränderungen auf (Lemere et al 1996).

Punktmutation und Duplikation von APP sind für nur eine Untergruppe der early-onset familiären Alzheimer-Erkrankung verantwortlich. Den größeren Teil der heterogenen Gruppe autosomal dominant vererbter Alzheimer-Erkrankungen bilden Missense-Mutationen in Presenilin 1 und 2 (PS-1, PS-2). Diese an der APP-Prozessierung beteiligten Proteine verursachen ebenso wie die APP-Mutationen eine verstärkte Abeta-Akkumulation und stützen ebenfalls die Amyloid-Hypothese. Die Presenilin 1-Mutationen auf dem Chromosom 14 führt zu den frühesten, meist vor dem 50. Lebensjahr einsetzenden und aggressivsten Formen der AD. Nur wenige Familien zeigen eine Mutation von Presenilin 2 auf dem Chromosom 1 (Hardy et al. 1997).

## 1.2 Das Amyloid Precursor Protein (APP)

Das Amyloid Precursor Protein ist ein Typ1-Transmembranprotein und ähnelt mit seiner langen extrazellulären Region, der transmembranären Region (TMR) und dem kurzen zytoplasmatischen Schwanz der Struktur eines Zelloberflächen-Rezeptors. Es umfasst eine heterogene Gruppe ubiquitär exprimierter Polypeptide, die in der Gelelektrophorese zwischen 110 und 140 kDa wandern (Selkoe et al., 1988). Die Vielfältigkeit entsteht durch alternatives Splicen und postrtranslationale Modifizierung (Oltersdorf et al., 1990). Alternatives Splicen der mRNA resultiert in mindestens acht Isoformen (Bayer et al., 1999), mit den Hauptgruppen der Länge von 695, 751 und 770 Aminosäuren. Die beiden Letzteren werden überwiegend in Geweben nicht-neuronalen Ursprungs exprimiert. Die in der Alzheimerpathogenese entscheidende und vorwiegend in neuronalen Zellen exprimierte Isoform ist das kürzere 695 AS lange Peptid (NP\_958817; Exon 1-6, 9-18, nicht 13a), welches in dieser Arbeit eingesetzt wird. Der Unterschied zwischen der in Neuronen vorliegenden und den erwähnten nicht-neuronalen Isoformen ist das Fehlen der Information der Exone 7 und 8 in APP695. Exon 7 kodiert für ein Motiv homolog der Kunitz-Inhibitor-Domäne. Exon 8 kodiert für eine MRC OX2 Antigen-Homologie. Die Signifikanz dieses gewebespezifischen alternativen Splicens ist bislang unzureichend verstanden (Zheng 2006).

Das humane APP-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 21 und umfasst 240 kb mit mindestens 18 Exons (Goldgaber et al., 1987, Kang et al., 1987, Yoshikai 1990, Lamb 1993). Wie für Rezeptorproteine typisch wird APP im Endoplasmatischen

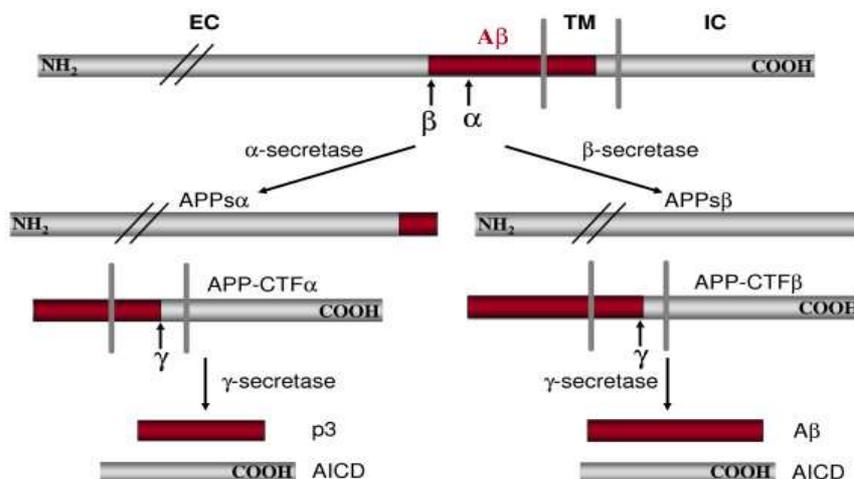
Reticulum synthetisiert, postranslational im Golgi-Apparat mittels Sulfatierung, N-/O-Glykosylierung und Phosphorylierung modifiziert und gelangt über den sekretorischen Weg zur Zelloberfläche. Es wird zudem endozytiert und im endosomal-lysosomalen Pfad prozessiert (Kang et al., 1987, Russo et al., 2001, Thinakaran et al., 1995).

APP ist ein in der Evolution hoch konserviertes Protein und wird in allen untersuchten Säugetieren exprimiert. Es ist Mitglied einer großen Genfamilie von Typ1 Membranproteinen, die Amyloid Precursor-Like Proteine (APLPs) (Slunt et al., 1994), zu der APL-1 in *C.elegans*, APPL in *Drosophila*, APL1 in Wurm (Koo, Edward 2002), APP, APLP1 und 2 (APP-Like Protein 1 und 2) in Säugetieren (Wasco et al., 1992 und 1994, Rosen et al., 1989) gehören. Diese Proteine teilen konservierte Motive, wie die E1 und E2 Domäne der extrazellulären Sequenzen und die intrazelluläre Domäne. Für die Alzheimer-Erkrankung von Bedeutung ist die nicht-konservierte, einzigartige amyloidogene Aβ-Sequenz von APP.

Trotz intensiver Forschungsarbeit ist die physiologische Funktion von APP noch immer nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise, dass das Holoprotein APP an Zell-zu-Zell Interaktion, an der Zell-Adhäsion, als Protease-Inhibitor und am neuritischen Wachstum beteiligt ist (Breen et al., 1991, Salinero et al., 2000, Schubert et al., 1993, Yamazaki et al., 1997). Auch ist APP offensichtlich für den axonalen Transport von Bedeutung (Gunawardena und Goldstein, 2001). Wie Hung et al. und Bibel et al. nachwiesen, ist APP während der neuronalen Entwicklung und Differenzierung hochreguliert. Untersuchungen am transgenen Tiermodell zeigten, dass Knock-out Mäuse für APP, APLP2 oder APLP1 und APLP2 bereits früh postpartal sterben (Heber et al., 2000). Über das neurotrophische und synaptogene Potential wird von allen diskutierten Funktionen des APPs mit der größten Konsistenz berichtet (Zheng, 2006).

### 1.2.1 Prozessierung von APP

APP kann mittels Alpha- und Gamma-Sekretase auf nicht-amyloidogene Weise gespalten werden; ein anderer, durch die Beta- und Gamma-Sekretase vermittelter Prozessierungsweg mündet in der Produktion von Aβ. In beiden Fällen entstehen zytoplasmatische Fragmente (AICD) von unterschiedlicher Länge.



**Abbildung 1** **Prozessierung von APP** Prozessierungsmodi von APP. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die amyloide Prozessierung von APP dargestellt. EC: extrazellulär, TM: transmembranös, IC: intrazellulär. Die Abeta Domäne ist rot gekennzeichnet; es ist jeweils nur eine Schnittstelle für ein Enzym dargestellt. Abbildung übernommen von Zheng & Koo (2006) *The amyloid precursor protein: beyond amyloid*. Mol Neurodegen 1.5 doi10.1186/1750-1326—1-5.

APP wird physiologisch überwiegend durch die Alpha-Sekretase (bestehend aus ADAM10 und TACE-ADAM17) mit einer Schnittstelle innerhalb der Abeta-Sequenz gespalten (Hardy, 1992; Ikezu et al., 1998). Bei diesem Prozessierungsschritt kann folglich kein Abeta entstehen. Das in der Membran verbliebene C83-Fragment kann durch den hochmolekularen Gammasekretasekomplex, bestehend aus Presenilin 1 und 2, Nicastrin, -aph1- pen2 erneut gespalten werden (King et al. 2003).

Alternativ, bei der sogenannten amyloiden Prozessierung, findet der initiale Schritt durch die Betasekretase am Aminoterminus von Abeta statt. Das entstandene Membran-gebundene C99 Fragment kann subsekutiv an der Gammasekretase-Schnittstelle durch den Gamma-Sekretasekomplex in der Mitte der TMR (Transmembranregion) gespalten werden; er generiert auf diese Weise ein kleines hydrophobes extrazelluläres Peptid, das Abeta Peptid.

Durch die amyloide APP-Prozessierung entstehen hauptsächlich zwei Abeta-Peptide, Abeta40 und das weniger verbreitete und mutmaßlich stärker pathogene

Abeta42. Es konnten eine Vielfalt weiterer Abeta Spezies identifiziert werden, wie Abeta39, deren Bedeutung und Funktion bis dato weitgehend unbekannt sind (Koo, 2002).

Eine weitere Schnittstelle der Gammasekretase, die epsilon-Schnittstelle, liegt drei AS innerhalb der zytoplasmatischen Membrangrenze. Sowohl die Gamma- als auch Epsilon-Spaltung resultiert in einem intrazellulären Fragment, der AICD (APP-intrazelluläre Domäne). Die Prozessierung nach Val636 führt zu einem 59 Aminosäure langen AICD-Peptid; hinter Ala638 entsteht AICD57; hinter Leu645 ein 50 Aminosäure langes Fragment (Sastre et al., 2001 ; Yu et al., 2001).

Der Mechanismus der Prozessierung von APP basiert auf der sogenannten „regulated intramembrane proteolysis“ (RIP). Ursprünglich diente dieser Ausdruck der Beschreibung der Synthese eines zytoplasmatischen Fragments, das im Anschluss an seine Befreiung aus der Membran in den Zellkern transloziert und die Transkription seiner Zielgene modifiziert. Die RIP ist also einer der Kontrollpunkte, durch welche die Transkription reguliert werden kann (Brown et al., 2000). Die RIP hat einen für Membranankerproteine stereotypen Ablauf, der als erste Aktion eine Abspaltung des sperrigen extrazellulären Anteils vorsieht. Das aus der Zellmembran herausragende Peptid wird so auf eine Länge von weniger als 30 AS gekürzt. Der nächste Schritt führt schließlich zu dem für die Signalvermittlung notwendigen Peptid. Die RIP wurde erstmalig im Zusammenhang mit der Regulation des Cholesterinstoffwechsels und dem sterol regulatory element binding protein (SREBP) beschrieben (Koo, 2002).

Kurze Zeit später konnte gezeigt werden, dass auch ein anderes Protein, Notch, auf die beschriebene Weise in einem Presenilin-abhängigen Prozess zur Bildung einer intrazellulären Domäne fähig ist (De Strooper et al., 1999). Die Notchfamilie kodiert für große Typ I Transmembranrezeptoren, in der Struktur dem APP ähnlich, die u.a. eine entscheidende Rolle bei der Zellentwicklung während der Embryogenese spielen. Nach Liganden-Bindung an den Rezeptor wird, vermittelt durch die RIP, die Notch-intrazelluläre Domäne (NICD) generiert. NICD gelangt in den Zellkern, um dort mit Proteinen der CSL-Familie zu interagieren und die Transkription einer Vielzahl von Genen zu regulieren (Koplan, 2000; Selkoe 2003). APP vollzieht ebenso eine RIP, so dass sich die Analogie zu Notch geradezu aufdrängt und De Strooper et al., 1999 und

Schroeter et al., 1998 zu der Annahme kamen, dass auch AICD als Regulator der Transkription bestimmter Gene fungiert.

### 1.3 Die intrazelluläre Domäne des Amyloid Precursor Proteins (AICD)

#### 1.3.1 Struktur und Funktion von AICD

Die intrazelluläre Domäne des Amyloid Precursor Proteins (AICD) Domäne besteht aus 47 Aminosäuren. Sie ist unter den Spezies hochgradig konserviert, so dass dieser kurze Abschnitt aus evolutionstheoretischer Sicht vermutlich unter starkem Selektionsdruck steht und höchstwahrscheinlich essentielle Funktionen vermittelt. Bezogen auf die Isoform 695 werden im folgenden die wichtigsten Strukturmerkmale von AICD beschrieben und die gegenwärtig diskutierten Funktionen der AICD dargestellt. An dieser Stelle wird hauptsächlich die Rolle von AICD als Modulator der Transkription erörtert.

AICD besitzt drei für die Sekretion, Endozytose und Transaktivierung entscheidende Bindungsdomänen:

- Das VTPEER-Motiv besitzt Phosphorylierungsstellen (s.u.) und ist unter anderem für die Regulation des Neuritenwachstums notwendig (Ando et al., 1999).
- Das in dem zytoplasmatischen Schwanz von APP lokalisierte NPTY-Motiv ist ein von Integrinen, dem Tyrosinkinase-Rezeptor und anderen Membranproteinen bekanntes Internalisierungsmotiv. An dieses Motiv binden unterschiedliche Interaktionspartner von APP/AICD (Koo and Squazzo, 1994).
- Das YTSI-Motiv (Aminosäure 653-656) ist ein Internalisierungs- und basolaterales Sortierungssignal (Zhen et al., 1998).

#### 1.3.2 Die Degradation von AICD

Die schnelle Degradation findet in den Proteasomen statt (Nunan, et al., 2003) oder durch das Insulin-degrading Enzym (Erdbauer et al., 2002).

Die Kombination des -YTSI- und YENPTY-Motiv, wie sie in der AICD entdeckt wurden, ist unabdingbar für die schnelle Degradation von APP im lysosomalen Kompartiment (Lai et al., 1998). Findet in diesem Bereich eine Mutation statt, verlagert sich der

Schwerpunkt des Alpha-Sekretase-Metabolismus zum AD-relevanten Betasekretase-Metabolismus (Tomita et al., 1998). Die kurze Lebenszeit von AICD erschwert die Detektion dieses Peptids (Daly et al., 1998; Cupers et al., 2001).

### 1.3.3 *Phosphorylierung von AICD*

AICD wird an verschiedenen Aminosäuren phosphoryliert. In kultivierten Zellen findet durch die Abl Tyrosinkinase eine Phosphorylierung an Tyrosin 682 statt (Minopoli et al., 2006). Die durch verschiedene Arbeitsgruppen untersuchte Phosphorylierung von Thr668 durch GSK3beta, c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) und cyklin-dependent kinase-1 (CDK-5) (Muresan et al., 2005, Kimberly et al., 2005, Lijima et al., 2000) hat offensichtlich die Aufgabe der Regulation der Lokalisation von APP im Wachstumskegel und in Neuriten (Ando et al., 1999, Muresan et al., 2005); das statistisch gehäufte Vorkommen der phosphorylierten Form von Thr668 in AD-Hirnen macht eine Funktion bei der Abeta-Entstehung möglich (Lee et al., 2003). Für die vorliegende Arbeit entscheidender ist der vermutete Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und der Interaktion möglicher Adaptorproteine. Es existieren Hinweise, die vermuten lassen, dass die oben erwähnte Phosphorylierung zu einer Konformationsänderung führt, so dass die Bindung des für die transkriptionsmodulierende Wirkung von AICD entscheidenden Adaptorproteins Fe65 verhindert wird (Ando et al., 2001; Ramelot et al., 2001).

### 1.3.4 *AICD als neurotoxisches Peptid*

Neben funktionellen Aufgaben wurde beschrieben, dass AICD über ein neurodegeneratives Potential verfügt. Die Ergebnisse bisheriger Studien sind inkonsistent. Überexpression von AICD (C100) ist nach Oster-Granite et al. (1996) in transgenen Mäusen neurotoxisch. Eine Studie von Yanker et al. 1989 weist zytotoxische Eigenschaften insbesondere für die aus der Betasekretase-Prozessierung resultierenden CTFs nach (Yanker et al., 1989). Asp 664 stellt eine bekannte Caspase-abhängige Schnittstelle dar (Zheng, 2006). Galvan et al. (2006) konnten zeigen, dass in APP-transgenen Mäusen mit mutierter und dadurch nicht mehr spaltbarer Caspase-Schnittstelle Alzheimer-typische Veränderungen ausblieben. Die Caspase-vermittelte Prozessierung des 99 AS langen AICDs in kleinere Fragmente (C31) vermittelt gemäß dieser Studie neurodegenerative Prozesse.

### 1.3.5 AICD als funktionelle Domäne von APP

Die Interaktion von AICD mit zytoplasmatischen und nukleären Proteinen ist eine essentielle Voraussetzung für die differentielle Genregulation durch AICD. Das YENPTY-Motiv stellt eine Konsensus-Sequenz dar, die notwendig zur Interaktion mit Adaptorproteinen ist. Sie besitzt eine Phosphotyrosin-Binde-Domäne (PTD), über die eine Bindung mit dem Großteil der Interaktionspartner von AICD wie Fe65, X11  $\alpha$  (MINT1) und der JIP Familie ermöglicht wird (Borg et al., 1996). Proteine der Familie X11 scheinen APP zu stabilisieren und verhindern die Abeta-Entstehung. Abl, Grb2 und Src interagieren dagegen nicht über die PTB-Domäne (Minopoli et al., 2007).

### 1.3.6 Das Multiadaptor-Protein Fe65

Das 97 kDa große Fe65 ist ein Adaptorprotein mit drei Protein-Protein-Interaktionsdomänen: Einer WW-Domäne und zwei PTB-Domänen. PTBI interagiert mit der Histonacetyltransferase Tip60 (Tat-interactive Protein, 60 kDa) (Yang et al., 2004) und mit LRP (LDL-Rezeptor related Protein) (Trommsdorff et al., 1998); PTBII interagiert mit AICD (Yang et al., 2004.). Die WW-Domäne bindet u. a. Mena, ein am Umbau des Zytoskeletts involviertes Protein (Ermekova et al., 1997). Durch die Interaktion von AICD über Fe65 mit Mena ist AICD an der Zellmigration und einem „remodeling“ von Synapsen beteiligt (Sabo et al., 2001). Von Bedeutung für AICD als Regulator der Transkription ist die Interaktion von Fe65 mit dem Transkriptionsfaktor CP2/LSF (Zambrano et al., 1998). Wie Delatour et al. 2001 zeigten, verändert sich die hippocampale Immunreaktivität von Fe65 im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung, so dass eine Zusammenhang zwischen der Erkrankung und Fe65 postuliert wurde.

### 1.3.7 Modelle zur Modifikation der Transkription durch AICD

Wie Kimberly et al. 2001 zeigen konnten, wird AICD durch Fe65 stabilisiert und transloziert in den Zellkern, analog dem intrazellulären Fragment von Notch, für das eine transkriptional-aktivierende Funktion bereits nachgewiesen wurde (Kimberly et al., 2001, Artavanis-Tsakonas et al.). Gao et al. und Sudhof et al. zeigten im gleichen Jahr an heterogenen Reportersystemen, dass AICD mit dem oben beschriebenen Adaptorprotein Fe65 und der Histon Acetyltransferase Tip60 einen transkriptional aktiven Komplex bildet. Die Bindung des aus 14 Untereinheiten bestehenden Tip60, einem Protein (Yamamoto et al., 1997) mit DNA-Helicase- und DNA-Binde-Eigen-

schaften (Cao et.al. 2001, Ikura et al., 2001) findet intranukleär statt. Der trimere AICD, Fe65 und Tip60 Komplex ist befähigt, an spezifische Promotoren zu binden und die Transkription entsprechender Proteine zu beeinflussen.

Fe65, das als Multiadaptorprotein auch die Transkriptionsfaktoren CP2/LSF/LPB1 binden kann, könnte wiederum mit AICD und einer noch unbekannt Gruppe von transkriptionsmodifizierenden Proteinen einen Komplex binden und weitere Gene beeinflussen.

Das beschriebene Modell ist, wie neuere Studien nahe legen, vermutlich noch nicht vollständig. Ergebnisse einer Folgestudie von Cao et al. aus dem Jahr 2004 zeigen, dass AICD womöglich nicht in den Zellkern translozieren muss, sondern sein transaktivierendes Potential indirekt über Fe65 vermittelt. Membranbefreites, im Zytoplasma kursierendes AICD führt extranukleär zu einer Konformationsänderung von Fe65, so dass Fe65 in den Zellkern translozieren kann und dort auf die Transkription spezifischer Gene regulierenden Einfluss ausübt. Die Diskussion über die genauen Wirkmechanismen der differentiellen Genregulation reichen so weit, dass Fe65 als unabhängiger und eigentlicher Akteur postuliert wird (Yang et al. 2006).

#### 1.3.8 *Potentielle Zielgene der differentiellen Genregulation von AICD*

Die ersten differentiell durch AICD regulierten Gene entstammen aus Studien mit Reportergenkonstrukten. Potentielle Zielgene konnten in unterschiedlichen Studien mit transgenen Mausmodellen nur zum Teil verifiziert werden. Zu den in der Literatur beschriebenen Genen gehören KAI1, ein Tumor-Suppressor Gen (durch Baek et al.2002 und Ryan 2005 als reguliert identifiziert, Heber et al.2006 konnte die Ergebnisse nicht bestätigen), GSK3beta (glykogen synthased kinase –3 beta) (durch Kim et al., 2003 als reguliert identifiziert, konnte durch Heber et al., nicht bestätigt werden.), Tip60 und BACE (von Rotz et al 2004), Nepilysin (Pardossi-Piquard et al., 2006).

### 1.4 **Transgene Mausmodelle der Alzheimer Erkrankung**

Der Großteil der Erkenntnisse über AICD als potentielltem Regulator der Genexpression stammt aus Untersuchungen von Zelllinien. Die Analyse induzierbarer Zelllinien als statisches *in vitro* System ist hinsichtlich der Übertragbarkeit auf die Alzheimer-Erkrankung jedoch beschränkt. In Anbetracht der wachsenden Bedeutung der Alzheimer-Erkrankung bestand zunehmend das Bedürfnis auch *in vivo* Modelle zu

etablieren, in denen einerseits Einzelaspekte der Pathogenese, andererseits die Erkrankung als komplexes Ganzes untersucht werden kann.

Bei den ersten einfach-transgenen Mausmodellen standen FAD-assozierte Mutationen im Mittelpunkt. So entwickelten Games et al. im Jahre 1995 ein transgenes Mausmodell, in welchem das humane mutierte APP (V717F) mit der *Indiana*-Mutation exprimiert wird. Diese Tiere bilden ab dem sechsten Monat Abeta-Plaques (Meziane et al. 1998). Es wurden weitere Tiermodelle mit der *swedish*-(K670N/M671L) und der *London*-(V717I) Variante konstruiert. Wie Sturchler-Pierrat et al. 1997 formuliert, ist der Grad der Pathologie abhängig vom Expressionslevel und der spezifischen Mutation. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der einzelnen Studien ist aufgrund der eingesetzten unterschiedlichen Promoterkonstrukte, APP-Isoformen und FAD-Mutationen schwierig bzw. mit systematischen Messfehlern belastet. Dennoch ist es verlockend, das Überschreiten eines bestimmten Grenzwertes der Expression des hAPP mit der FAD-assozierten Mutation als Trigger für Plaque-ähnliche Pathologien verantwortlich zu machen.

#### 1.4.1 Grenzen der einfach-transgenen Maus-Modelle

Die Mäuse, die mutierte mit FAD-assozierte Gene tragen, zeigen im Gegensatz zu der humanen Erkrankung keine neurofibrillären Tangles (NFTs). Diese Tiere sind aus diesem Grund ein vielleicht unzureichendes Modell zur Erforschung der pathologischen Prozesse der AD, dennoch aber ein exzellentes Modell für das Verständnis, wie das Gehirn beispielsweise mit hohen Abeta-Konzentrationen überlebt, sich adaptiert und was für Kompensationsmechanismen stattfinden.

Janus (2000) formulierte Kriterien, die ein Mausmodell zur Erforschung der Alzheimer-Erkrankung erfüllen sollte: Die Tiere sollten progredient die anerkannten neuropathologischen Veränderungen wie Amyloidplaques, NFTs sowie den Verlust cholinergischer Neurone aufweisen und sie sollten zudem kognitive Defizite zeigen. Um die vielschichtigen Zusammenhänge der Alzheimer-Erkrankung besser widerzuspiegeln, wurden doppeltransgene Mausmodelle etabliert, wie das Tg APP/PS1-Modell. Erst später, 2003, wurde durch triple-transgene Mäuse mit Mutationen im humanen APP, PS1 und dem Tau-Protein (Tau p301I) der Rolle von Tau-Protein in der Pathogenese von Morbus Alzheimer Rechnung gezollt (Oddo et al. 2003). Im Vordergrund dieser

Arbeit stehen die Auswirkungen des Amyloid Precursor Proteins. Es werden Effekte von AICD untersucht, so dass sich ein transgenes Modell mit APP, AICD oder weiteren für die Rolle von AICD notwendigen Proteinen anbietet. In dem folgenden Abschnitt werden dieser Studie zugrunde liegende transgene Modelle ausführlicher beschrieben.

#### 1.4.2 *TgAPP23-Tiermodell (Swedish-Mutation, K670N/M671L)*

TgAPP23 Mäuse enthalten APP751 cDNA, die nicht-neuronale Isoform, mit der „Swedish Familial AD“ Mutation, welche unter der Kontrolle des neuron-spezifischen Thy-1 promotor steht. Sie exprimieren das Transgen in 7-fach höherem Level als endogenes APP. Mäuse mit dieser Mutation weisen im Alter von sechs Monaten, verglichen mit gleichaltrigen Wildtypen als Kontrollen, signifikant mehr amyloidogene Ablagerungen auf.

K670N/M671L ist assoziiert mit einer durch Stimulation der Betasekretase bedingten Überproduktion von Abeta. Es akkumuliert hauptsächlich Abeta1-40 (G.Thinakaran, D.B. Teplow, R.Siman, B. Greenberg, S.S. Sisodia, J. Biol. Chem. 271 (1996) 9390-9397). Betroffene Hirnareale mit Plaquemorphologie sind der Hippocampus und der Neocortex (Janus 2000). Wie in „Pathogenic Mechanism of AD analyzed in the APP23 Transgenic Mouse Model“ 2000 von Sturchler-Pierrat und Staufenbiel erörtert, produzieren APP22-Tg-Mäuse in SDS-Puffer lösliche Amyloidplaques. Im Gegensatz dazu sind im Hirn von Alzheimerpatienten unlösliche Amyloidplaques nachweisbar. Diese Ansammlungen zeigen in ihrer initialen Erscheinungsform Charakteristika wie die Dense Cores der Alzheimerschen Plaques beim Menschen. Es gibt jedoch keinen graduellen Fortschritt von diffusen zu dichten Ablagerungen. Obwohl weitere charakteristische Pathologien der Alzheimer-Erkrankung wie reaktive Astroglie, Mikrogliose, mikrogliale Aktivierung, cerebrovaskuläre Amyloidose und Neuronenverlust vorliegen, berechtigt doch u. a. das unterschiedliche Lösungsverhalten der Plaques zu der Frage, ob das komplexe spezie-spezifische Milieu der menschlichen Erkrankung nicht genau wiedergegeben werden konnte. Zur Erforschung AICD-abhängiger Genregulation ist der genannte Aspekt jedoch nicht entscheidend.

### 1.4.3 *AICD- und Fe65-transgenes Tiermodell*

Bei dem von der Arbeitsgruppe Ryan et al. 2005 etablierten doppelt-transgenen Mausmodell wurden AICD 59 und Fe65 exprimierende Plasmide im Verhältnis 1:1 vermischt. Das linearisierte Plasmid wurde in eine Oozyte der C57BL/6 Maus injiziert, welche daraufhin in eine pseudoschwangere Maus implantiert wurde. Die Aktivität des eingesetzten Promotor CaMKIIalpha sollte nach zwei Wochen postpartal einsetzen und ist auf das Frontalhirn und Hippocampus beschränkt (Abel, 1997). Wie oben beschrieben, fungiert Fe65 als für die transaktivierende Wirkung von AICD möglicherweise essentielles Adaptorprotein. Um die von der ebenfalls in der Literatur beschriebenen alleine durch Fe65 verursachten differentiellen Expressionregulation von der durch AICD und Fe65 in Kombination bedingten zu unterscheiden, wurde eine Fe56-einfach-transgenes Mausmodell etabliert und in dieser Arbeit eingesetzt.

## 1.5 **Der Arbeit zugrunde liegende Vorarbeiten**

Die vorliegende Arbeit basiert auf den Ergebnissen der Analyse von Transkriptomveränderungen in AICD-, AICD und Fe65- in Kombination, und Fe65- induzierbaren Neuroblastomzellen verglichen mit nicht-induzierbaren Neuroblastomzellen (Dissertation von Thorsten Müller (2005) sowie Müller et al., (2007)). In diesen Arbeiten zur Identifizierung AICD-abhängiger Zielgene waren Genexpressionsprofile von AICD und Fe65-induzierbaren Neuroblastomzellen sowie von Fe65-induzierbaren Neuroblastomzellen mit Mikroarrays erstellt worden. Hierbei stellten sich 182 potentielle Zielgene als differentiell reguliert heraus, von denen eine Reihe mittels real-time PCR validiert wurden, nämlich ACTA2, CLU, FN1, ID3, IGFBP3, MICAL2, NRG1, PRKC, RAB3B, SLC7A5, TAGLN, TPM1.

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Validierung von AICD-abhängig regulierten Kandidatengene in transgenen Mausmodellen der Alzheimer Erkrankung. Die bestätigten Gene sollten in Autopsiegewebe von Alzheimerpatienten hinsichtlich ihrer Relevanz bei Morbus Alzheimer überprüft werden. Zunächst wurde die mRNA-Expression AICD-abhängiger Kandidatengene mittels quantitativer real-time PCR in einem transgenen Fe65- und AICD+Fe65-Mausmodell sowie in einem APP23-Mausmodell untersucht. Im Anschluss wurden jene Gene, die im Tiermodell eine differentielle Expression zeigten, in humanem Autopsiegewebe auf mRNA- und Proteinebene untersucht.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.1 Untersuchungsmaterial und Materialgewinnung

In der vorliegenden Arbeit wurde Hirngewebe von Mäusen des transgenen Mausmodells APP23 und doppelt-transgenen (AICD und Fe65-) Mausmodells, Autopsiegewebe von Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen verwendet.

#### 2.1.1 *Das doppelt-transgene (AICD und Fe65-) Mausmodell und das transgene Mausmodell APP23 mit der Mutation K670/M671L („swedish“-Mutation)*

Die Gewebeproben des doppelt-transgenen Mausmodells wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe K. A. Ryan und S. W. Pimplikar bereitgestellt: Bei dem von der Arbeitsgruppe Ryan (Ryan et al. 2005) etablierten doppelt-transgenen Mausmodell wurden AICD 59 und Fe65 exprimierende Plasmide im Verhältnis 1:1 vermischt. Das linearisierte Plasmid wurde in eine Oozyte der C57BL/6 Maus injiziert, welche daraufhin in eine pseudoschwangere Maus implantiert wurde. Die Aktivität des eingesetzten Promotor CaMKIIalpha setzt nach zwei Wochen postpartal ein und ist auf das Frontalhirn und den Hippocampus beschränkt (Abel, 1997).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben handelt es sich um Kleinhirn-, Hippocampus- und Frontalhirn-Proben von sieben Monate alten Mäusen. Verglichen wird die Gruppe der Wildtypen (zwei männlich, zwei weiblich), die Gruppe der einfach-Fe65 transgenen Mäuse (fünf weiblich) und die Gruppe der doppelt-transgenen Mäuse (drei männlich, zwei weiblich).

Die Gewebeproben des transgenen Mausmodells APP23 mit der Mutation K670/M671L („swedish“-Mutation) stammen von der Firma Novartis. Die drei und sechs Monate alten transgenen Mäuse werden mit gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen verglichen. TgAPP23 Mäuse enthalten APP751 cDNA, die nicht-neuronale Isoform, mit der „Swedish familial AD“ Mutation, welche unter der Kontrolle des neuron-spezifischen *Thy-1* promotor steht. Die Fallzahl pro Gruppe beträgt n=5.

### 2.1.2 *Analyse von humanem Gehirngewebe von Alzheimerpatienten und Kontrollen*

Die Autopsieproben der Alzheimerfälle und Kontrollen wurden am Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Münster gesammelt und wurden im Einverständnis mit den Angehörigen der Patienten für Forschungszwecke freigegeben. Die neuropathologische Diagnostik der Alzheimer-Erkrankung basiert auf allgemein akzeptierten Kriterien (Braak und Braak, 1991; Mirra et al., 1991). Es wurde die RNA aus gefrorenem postmortalem Gewebe der grauen Substanz des Frontalhirns mittels TRIzol Reagenz (Invitrogen®) extrahiert.

## 2.2 **RNA-Arbeitstechniken**

Als Vorbereitung für die real-time PCR Analyse wurde die RNA aus den Zell-Lysaten der Maus-Gehirne und humanem Hirngewebes der Brainbank extrahiert und in cDNA umgeschrieben.

### 2.2.1 *RNA-Extraktion (Kit, Phenol-Extraktion)*

Die Gesamt-RNA aus Maushirnen und Zelllinien wurde mit dem „RNeasy Kit“ (Qiagen) oder „Nucleospin RNA II Kit“ (Machery Nagel) nach Herstellerangaben isoliert. Im Rahmen dieses Protokolls wird standardmäßig eine DNase I Behandlung durchgeführt. RNA aus humanem Autopsiegewebe wurde mit Trizol nach Angaben des Herstellers isoliert. Zur Homogenisierung von humanem cerebralem Gewebe wurde ein Mikro-Dismembrator eingesetzt. Die RNA-Extraktion durch TRIzol wurde verwendet, da eine gleichzeitige Proteinextraktion durch Phasentrennung möglich ist:

- Mittels Skalpell wird ein Gewebestück von ca. 100 mg der grauen Materie des entsprechenden Hirnareals gewonnen, und in einem Eppendorf-Tube auf flüssigem Stickstoff gehalten
- Das tiefgefrorene Gewebe wird mit einem Mörser pulverisiert und für 5 Minuten mit 7500 g bei 4 C zentrifugiert
- Den Überstand wird verworfen und das RNA enthaltene Pellet bei Raumtemperatur getrocknet.
- Nach der Zugabe von 15 µl Storage-Lösung wird die RNA bei – 80 C aufbewahrt.

- 100mg Gewebe wird für 15 Minuten in 1000l Trizol inkubiert, mit dem Stempel vorsichtig zerkleinert und dann im Dissmembranator bei 2000 RIM für eine Minute zentrifugiert.
- 200 µl Chloroform wird hinzugegeben, 15 Sekunden geschüttelt und dann für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen
- Zentrifugation für 15 Minuten und 13000 g bei 4 C
- Abpipettieren der wässrigen oberen Phase; Zugabe von 500 µl Isopropanol.
- Inkubation über Nacht bei -20 C
- Zentrifugation für 10 Minuten mit 12000 g bei 4 C
- Gabe des Überstandes in ein neues Tube und waschen mit 1000 µl 75%igen Ethanol.

#### 2.2.2 *Photometrische Quantifizierung der extrahierten RNA*

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die Extinktion der 1:50 oder 1:100 verdünnten Probe in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm gemessen.

#### 2.2.3 *cDNA-Synthese gemäß ISCRIP<sup>T</sup>® Protokoll*

Isolierte Gesamt-RNA wurde mit dem iScript System (Biorad, München) in cDNA umgeschrieben, wobei 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt wurde.

#### 2.2.4 *Primer (Oligonukleotide)*

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei „MWG Biotech“, Ebersberg synthetisiert. Alle Sequenzen sind in 5'-3' Orientierung angegeben. Die Auswahl der Primerpaare für die PCR-Amplifikation erfolgte mit dem Programm PrimerExpress (Primer Express (Primer Design) Applied Biosystems, Darmstadt).

Abkürzung	Sequenz
MIGFBP3_S	GCAGGCAGCCTAAGCACCTA
MIGFBP3_AS	CATTGTGCTCCTCCTCGGA
MITPM1_S	ATCTGCCGAGAGCCAGCTAG
MITPM1-AS	GACTCGGGCTTGCCTTTCT
MIFN1_S	GACAGAACAGTTCTGGTAACGTGG
MIFN1_AS	CCCGCGGTCAGTCGG
Mfe65_S	GCTGTATCGGTGCTGTCAATGA
Mfe65_AS	CCTGTTGGGATGTGCCAGTA
HFE65_S	CATCTTGCACCAGAGACAGA
HFE65_AS	ATGAATGCAAACGTGTGGACAT
MIID3_S	CTCCGGAACCTTGATCTCCA
MIID3_AS	AGGACGACCGGGTCAGTG
MIPBX2_S	AAGGAGATGGAGCGCATGG
MIPBX2_AS	AAGGAGATGGAGCGCATGG
MISLC7a5_S	CACCACCAGCCGCCTAAC
MISLC7a5_AS	TGGACACCTGACGTTTGAGG
MKAI1_S	GCTGTATCGGTGCTGTCAATGA
MKAI1_AS	CACCTGTGCGATGAGGATGATCA
MITAGLN_S	GCCCAGACACCGAAGCTACTC
MITAGLN_AS	CTCCTCCAGCTCCTCGTCATA
MICLU_S	GAGAGTGACCGGCAGCAGA
MICLU_AS	AGCGTGTCTATGATGCCAGATG
MIPRKC_S	AAGGACAGCCGTCAGAGGAG
MIPRKC_SA	TCTTGAGCGACTCTAGTTGTCACAA
MIMICAL2_S	GCCAGCATCTGTAACCAATTAGC
MIMICAL2_AS	GCACCATGAAGAGATACTCAACCC

MINRG1_S	CTTCACCTGTCTCTAAGGCTCAGTCT
MINRG1_AS	GCCCTGTAACATGAGCCTCG
MIACTA2_S	GCTGTCTACCTTCCAGCAGATGT
MIACTA2_AS	GGAACTGGAGGCGCTGATC
MIRAB3B_S	GCTGTCCATAGCCAGGATCTGT
MIRAB3B_AS	CCCGAGTCCATTTTCAGTTTGA
MITIP60_S	ACGAATGACTGGCAGTCTGGT
MITIP60_AS	GTGACAATGTCGTCGTGGCT

**Tabelle 1:** Primer für die real-time PCR im transgenen Mausmodell.

Abkürzung	Sequenz
APP_S	GCGCCATGTCCCAAAGTTT
APP_AS	TCTCGGGGCAAGAGGTTCCCTT
AICD50_S	TCCATTCATCATGGTGTGGT
AICD50_AS	TGCATCTGCTCAAAGAACTTG
ARL6IP_S	AACCTGCTGGCTGCAGAGA
ARL6IP_AS	TGATGGCAGGTGGAAACCA
CSPG2_S	GCTAAAGGCTGCGAATGGG
CSPG2_AS	AAGAGTTCGACATTGGAGTCCTTAGT
DYRK2_S	TTCCTATCCTTTGCCTCCATATTT
DYRK2_AS	TCCCTGGCAGGCATTCTATATT
ELF2_S	GGATCGAAAGGGACCAAGC
ELF2_AS	CAGAATGTTAGTGTCCAAGTCTTAGTGT
FE65_S	CATCTTGCACCAGAGACAGA
FE65_AS	ATGAATGCAAACGTGTGGACAT
GAPDH_S	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC
GAPDH_AS	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA
GSK3 $\beta$ _S	CCGTGGACAGACCAATAATGC

GSK3 $\beta$ _AS	GAGTGACACTCAAGTAACTGGTGGTT
HAS2_S	GGTCCCGGTGAGACAGATGA
HAS2_AS	TTGCGTTACGTGTTGCGAG
IGFBP3_S	GGAGCCCATCCAGGACACT
IGFBP3_AS	AGCATGAGAATGACTCTAAGTTCAACA
KBTBD4_S	TCTGTCAGGAAATGTAACCTTTGGTTT
KBTBD4_AS	TCTGGCTTACCCCTTGAATAA
Nepriylisin_S	TCTCGACAATACCCGTT GGC
Nepriylisin_AS	TCGAACACTGCAGCATGGAG
PDE4B_S	ACAGACCGCATCATGGAGG
PDB4_AS	CTCCCGCTCTTTGCTCCC
PTHLH_S	AACACTGCAGAACAGCATCATGT
PTHLH_AS	AAGTGTGAATGGCTCAGAATCGT
SERPINE1_S	AGAGTGGTTTCCAATGTGTTCAATAG
SREPINE1_AS	TCACACACAGCAGCCGGA
SFRP1_S	TGAGGAGAGCACCCCTAGGCA
SFRP1_AS	AACAGGTCAGAACGGCCAGT
TPM1_S	GAAGAGGTGGCCCGTAAGC
TPM1_AS	TGCACGTTCCAGGTCGCT

---

**Tabelle 2:** Primer für die real-time PCR in humanem Autopsiegewebe.

### 2.2.5 Herstellung des Primermixes

Nach dem Zentrifugieren der gefriergetrockneten Sense- und Antisense- (S- und AS-) Primer mit maximaler Geschwindigkeit wurden die Primer nach mitgelieferten Angaben verdünnt (Einzelprimer mit der Konzentration von 100  $\mu$ molar) und ein Primermix mit einer Zielkonzentration von 4,5  $\mu$ molar hergestellt (910  $\mu$ l HPLC-Wasser + 45  $\mu$ l S- Primer + 45  $\mu$ l AS- Primer = Gesamtvolumen von 1000  $\mu$ l).

### 2.2.6 Expressionsbestimmung auf mRNA-Ebene mittels real-time PCR

Um die relative Menge der vorliegenden mRNA eines zu untersuchenden Gens zu bestimmen wurde die real-time PCR Methode angewendet. Aufgrund des limitierten Untersuchungsmaterials konnten nicht alle Gene in allen Systemen untersucht werden. Alle Analysen wurden mit SYBR-Green® (ABGene, Hamburg) als Fluorophor durchgeführt. Da diese Methode auch bei hohen Zykluszahlen sehr sensitiv ist, wurde die eingesetzte cDNA 1:3 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Verwendet wurde 5700 ABI SDS® (real-time PCR Auswertung) Applied Biosystems, Darmstadt Genesis (ELISA Reader Software) MTX Lab Systems, Vienna, USA.

Als Referenzgen wurde in sämtlichen real-time PCR Analysen GAPDH (Glycerinaldehyd-phospho-de-hydrogenase) verwendet. Die GAPDH ist ein ubiquitäres Enzym aus dem Kohlenhydratstoffwechsel der Zellen, das stabil exprimiert wird (*house-keeping* Gen) und durch APP nicht reguliert wird (Gutala et al. 2003).

Um stochastische Fehler zu minimieren, wurde jeder Ansatz der real-time PCR mit dem Primer-Paar für das zu untersuchende Gen als Duplikat, bzw. in den Proben des Autopsiegewebes von Alzheimer-Patienten als Triplikat durchgeführt. Unterschieden sich die dCt-Werte um mehr als 0,1, wurde der entsprechende PCR-Lauf mit dem gleichen Material wiederholt. Im Anschluss an die PCR Reaktion wurde eine Schmelzkurvenanalyse im Temperaturbereich zwischen 60 C und 95 C durchgeführt. Dabei kommt es durch schrittweisen Temperaturanstieg zu einer Auftrennung der PCR-Produkte entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte in ihre Einzelstränge. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Aufgrund der Schmelztemperaturen kann zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren unterschieden werden, da Primerdimere bei geringeren Temperaturen schmelzen als die spezifischen, größeren PCR-Produkte. Die Auswertung der real-time PCR Daten erfolgte nach der ddCt Methode (Livak und Schmittgen 2001). Zunächst wurde für jede Analyse eine Basislinie festgelegt, durch die das Grundrauschen der Analyse minimiert wird. Daraufhin wurde ein Schwellenwert der Fluoreszenzintensität festgelegt, bei dem die Analyse ausgewertet werden sollte. Der Schwellenwert wurde so definiert, dass alle Proben der Analyse in der exponentiellen Phase der Amplifikation ausgewertet werden konnten. Dann wurde für jede Probe die Anzahl Ct der Zyklen bestimmt, die zum Erreichen der Schwelle benötigt wurden. Diese wurden

mit dem analog ermittelten Ct-Wert der GAPDH verglichen ( $dCt = Ct[\text{Gen}] - Ct[\text{GAPDH}]$ ). Das selbe Verfahren wurde für die Kontrollen angewendet. Aus den so erhaltenen beiden dCt Werten wird erneut die Differenz gebildet (z.B.  $ddCt = dCt[\text{Wildtyp-cDNA}] - dCt[\text{transgene Maus-cDNA}]$ ). Mit der Größe  $R = 2^{ddCt}$  haben wir den Regulationsfaktor bestimmt.

### 2.2.7 *Ansatz der real-time PCR*

Für ein Gesamtvolumen von 12,5 µl wurden 6,25 µl SYBR Green Puffer (enthält dNTPs und Polymerase, AB Gene®), 1,25 µl Primer Mix (bestehend aus dem Sense- und Antisense-Primer in der durch den Hersteller beschriebenen Mengenrelation), 4 µl RNAase freies Wasser und 1 µl Template cDNA eingesetzt.

### 2.2.8 *Reaktionsbedingungen der real-time PCR*

Nach initialer Inkubation bei 50 C über 2 Minuten und Enzym-Inaktivierung bei 95 C für 15 Minuten wurden die folgenden beiden Schritte 40 mal wiederholt: Denaturierung bei 95 C für 15 Sekunden sowie Annealing und Elongation bei 60 C für 60 Sekunden.

## 2.3 **Proteinanalytik**

Um eine auf cDNA-Ebene ermittelte Überexpression von IGFBP3 auf Proteinebene zu validieren, wurde für die Analyse des Autopsiegewebes der Brainbank die ELISA-Methode verwendet.

### 2.3.1 *Gesamtzellextraktion*

Gesamtzellextrakte wurden für die ELISA erstellt. Zellkulturen wurden zuvor mit 1 x PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert (1700 g (Stratos®Zentrifuge), 5 min).

### 2.3.2 *Konzentrationsbestimmung von Proteinen*

Proteinkonzentrationen wurden nach der Lowry Methode bestimmt. Dazu wurden jeweils 5 µl der Proben bzw. eine 1:10 und 1:20 Verdünnung in eine für den „ELISA Reader“ passende „96-well“ Platte pipettiert. Zu jeder Probe wurden 25 µl Reagenz A' (20 µl Reagenz S (Biorad®) ad 1 ml Reagenz A (Biorad®) und anschließend 200 µl Reagenz B (Biorad®) pipettiert. Die Platte wurde 15 min bei RT inkubiert und dann im „ELISA Reader“ vermessen. Die Standardreihe wurde aus dem „Biorad Assay Standard II®“ in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 0,8 mg/ml erstellt.

### 2.3.3 ELISA

Für die Quantitative Bestimmung der Konzentration des humanen Insulin Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP-3) in dem Zell-Lysat-Überstand des Autopsiegewebes wurde der humane IGFBP-3 Immunoassay Quantikine® verwendet.

Die Hirnproben wurden in Probepuffer lysiert (50 mM Tris, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1mM EDTA; 1mmM PMSF). Das mit Puffer versetzte Gewebegemisch wurde auf Eis zerkleinert und anschließend 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, um die nicht lysierten Gewebereste zu entfernen. Mittels Bradford-Methode wurde die Gesamtproteinkonzentration im Überstand gemessen, auf die geringste Konzentration verdünnt und auf die ELISA Platte aufgetragen. Für die Datenauswertung in SPSS wurden die Werte in ng/ml eingegeben.

## 2.4 Statistik

Als deskriptive Kenngröße der dCt- und Regulationswerte der einzelnen Gene wurde der Mittelwert, die Standardabweichung bzw. der Standardfehler in den zu vergleichenden Gruppen berechnet. Die grafische Darstellung erfolgte mit Hilfe von Fehlerbalkendiagrammen. Zusätzlich wurde mit Hilfe des unverbundenen Student'schen t-Tests geprüft, ob eine signifikante Regulation der Gene besteht. Anhand zweiseitiger Signifikanztests zum Niveau  $\alpha = 0.05$  ist man in der Lage sowohl die Hoch- als auch die Herunterregulation eines Gens nachzuweisen. Die Auswertung der Daten zur optischen Dichte und deren Vergleich zwischen Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen erfolgte ebenfalls mit Hilfe von Fehlerbalkendiagrammen sowie einem zweiseitigen unverbundenen t-Test. Die statistische Auswertung wurde mit der Software TIBCO Spotfire S+ (Version 8.1 for Windows, TIBCO Software Inc., Seattle, WA, USA) durchgeführt.

### 3 ERGEBNISSE

---

#### 3.1 Real-time PCR Analysen im Fe65- sowie AICD+Fe65-transgenen Mausmodell

Zunächst wurde die Expression von in AICD und Fe65- induzierbaren Neuroblastom-Zelllinien als reguliert identifizierten Genen (Müller 2006), analog in einem AICD und Fe65- transgenen Mausmodell untersucht. Es handelt sich um eine Auswahl derjenigen Gene, welche mittels real-time PCR im Zellkultur-Modell eine 1,5 bis 5,3-fache Regulation aufwiesen. Verglichen wurden Gewebeproben aus Hippocampus, Frontalhirn und Cerebellum der folgenden drei Gruppen mit jeweils n=5 Mäusen: doppelt AICD+Fe65- transgene Mäuse (Durchschnittsalter 6 Monate), Fe65-transgene Mäuse (Durchschnittsalter 10 Monate) und Wildtyp-Mäuse (Durchschnittsalter 7 Monate).

##### 3.1.1 *Expression von AICD und Fe65 in Fe65- sowie AICD+Fe65-transgenen Mäusen*

Das Transgen AICD war in den Hippocampus- und Frontalhirn-Proben der doppelt-transgenen Maustypen gegenüber den nicht-transgenen Tieren mit einer 6- bzw. 7-fachen Überexpression signifikant reguliert (siehe Abbildung 2). Im Cerebellum ist der Effekt mit einer 1,5-fachen Regulation geringer ausgeprägt.

Gleiches gilt für das Transgen Fe65, dessen Expression in allen untersuchten Hirnarealen in den Fe65- und AICD+Fe65- transgenen Modellen signifikant reguliert war (siehe Abbildung 3). Die höchste Überexpression von Fe65 zeigte sich hierbei in Hippocampus und Frontalhirn der doppelt transgenen Mäuse.

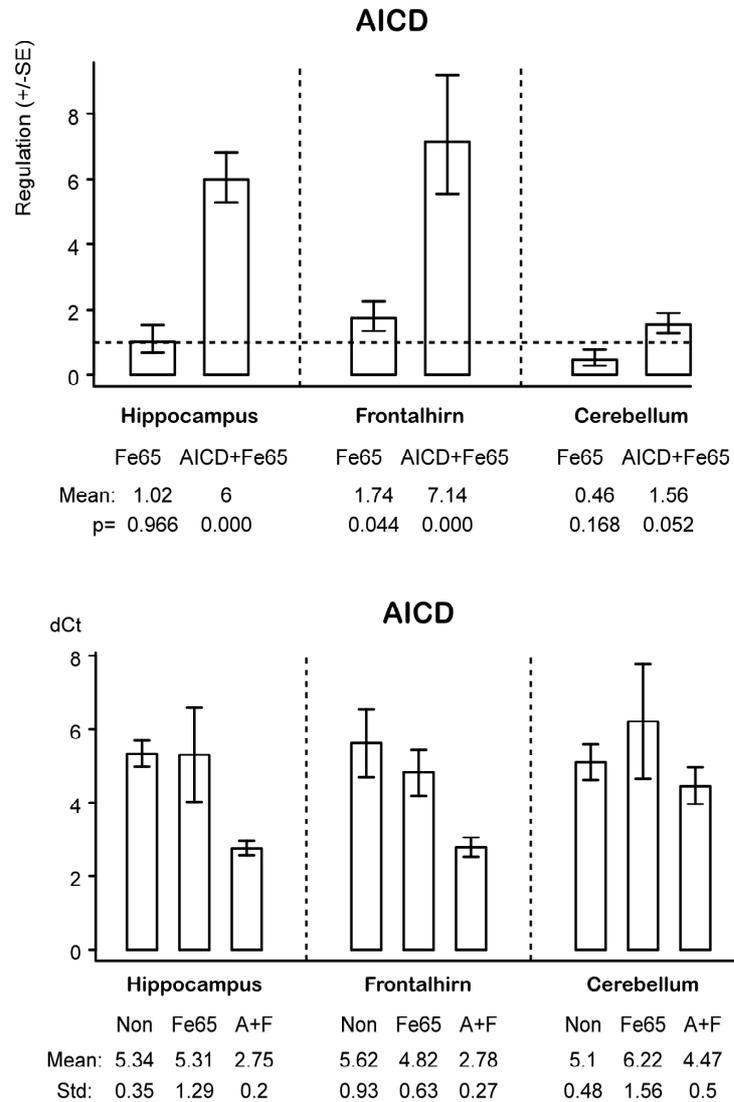
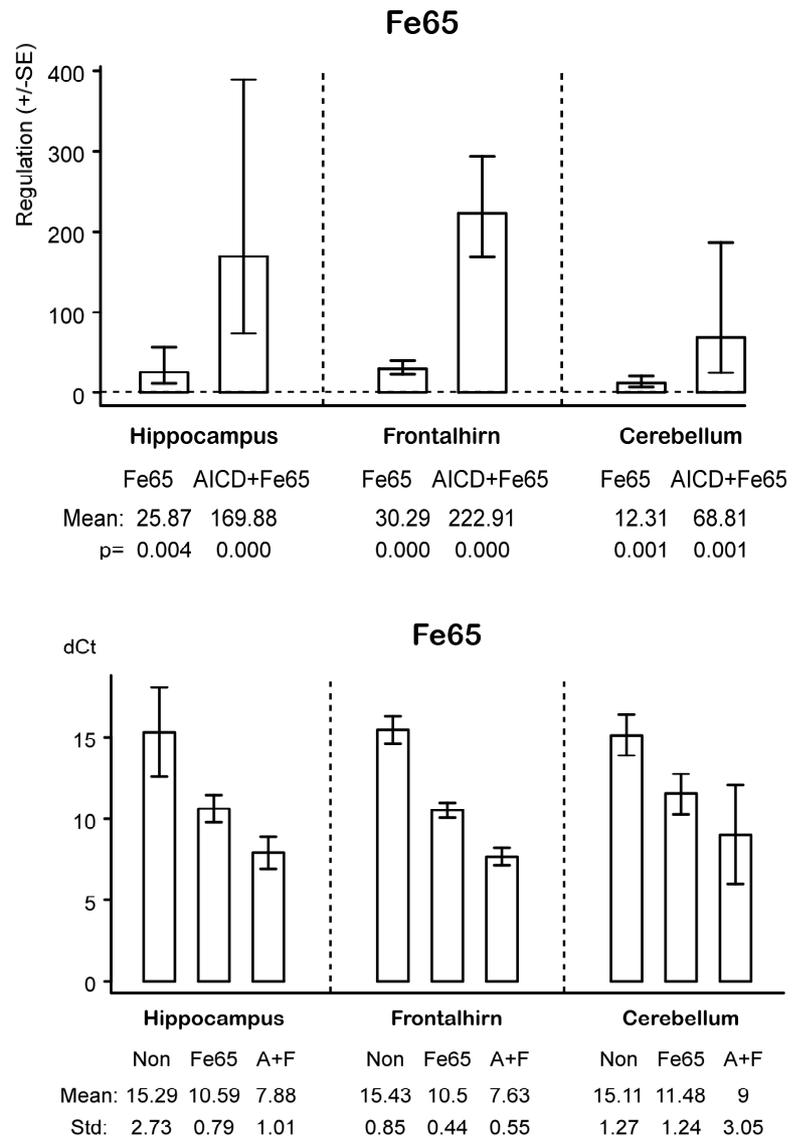


Abbildung 2

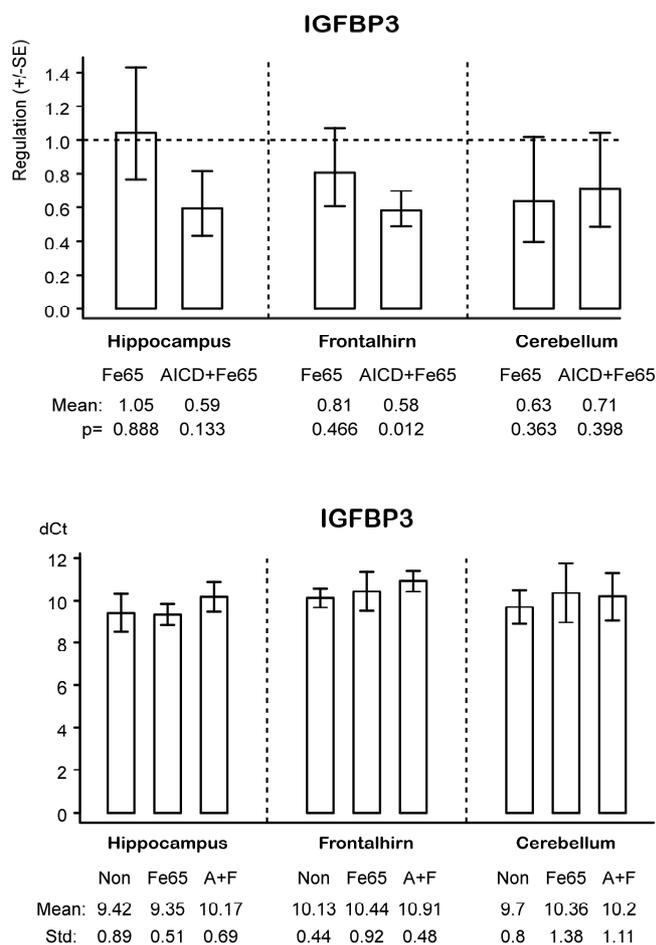
**Expression von AICD in Hippocampus, Frontalhirn und Cerebellum Fe65- sowie AICD+Fe65-transgener Mäuse.** RNA-Expression im Vergleich zu Wildtypkontrollen sowie dCt-Werte (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; Non=Wildtypkontrolle).



**Abbildung 3: Expression von Fe65 in Hippocampus, Frontalhirn und Cerebellum Fe65- sowie AICD+Fe65-transgener Mäuse.** RNA-Expression im Vergleich zu Wildtypkontrollen sowie  $\Delta$ Ct-Werte (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; Non=Wildtypkontrolle)

### 3.1.2 Expression von Insulin-Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3) in Fe65- sowie AICD+Fe65-transgenen Mäusen

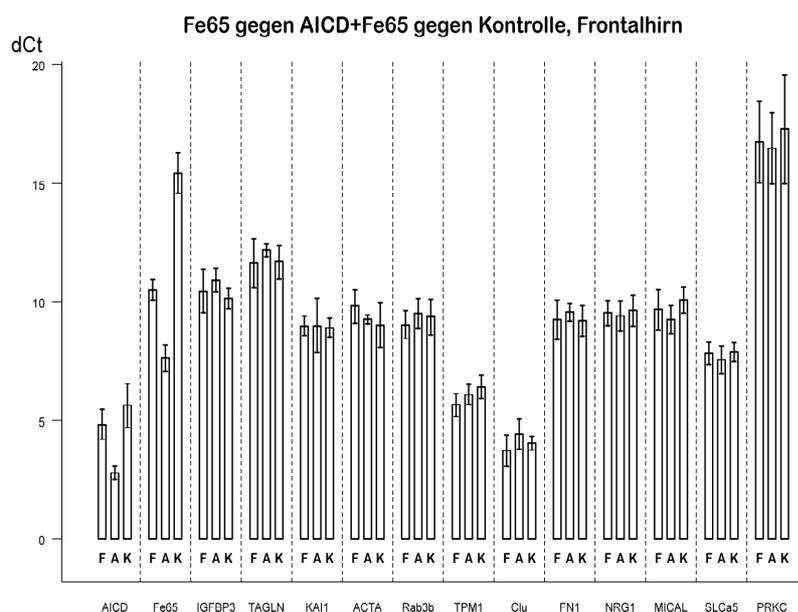
Von den untersuchten Kandidatengenen war das für das Insulin-Growth Factor Binding Protein 3 kodierende *IGFBP3* in den doppelt-transgenen Mäusen im Frontalhirn im Vergleich mit den Wildtyp Mäusen 0,58-fach herunter reguliert ( $P=0,012$ ), siehe Abbildung 4. Der Unterschied der Expressionslevels in den anderen Hirnarealen war nicht signifikant. In den Fe65-transgenen Mäusen war keine differentielle Regulation von IGFBP3 zu verzeichnen.



**Abbildung 4:** Expression von IGFBP3 in Hippocampus, Frontalhirn und Cerebellum Fe65- sowie AICD+Fe65-transgener Mäuse. RNA-Expression im Vergleich zu Wildtypkontrollen sowie dCt-Werte (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; Non=Wildtypkontrolle)

### 3.1.3 Übersicht aller in Fe65- sowie AICD+Fe65-transgenen Mäusen untersuchten Gene

Abgesehen von AICD, Fe56 und IGFBP3 ergab sich für keines der weiteren untersuchten Kandidatengene in den Fe65-transgenen sowie AICD+Fe65-transgenen Mäusen verglichen mit den Wildtypen eine signifikante differenzielle Expression (siehe Abbildung 5).

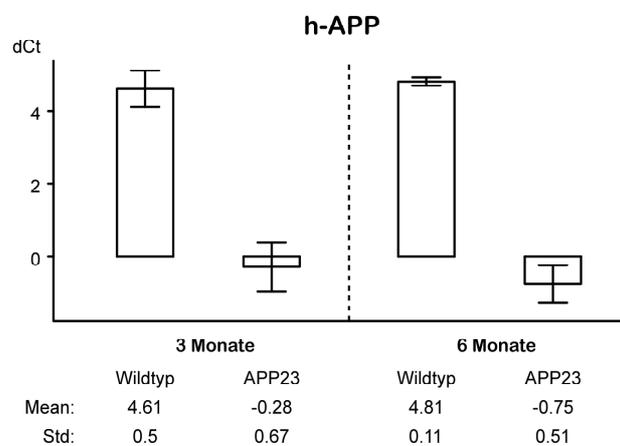


**Abbildung 5: Expression aller untersuchter Gene im Frontalhirn Fe65- sowie AICD+Fe65-transgener Mäuse.** Dargestellt sind die dCt-Werte (Ordinate) der untersuchten Gene im Frontalhirn. Verglichen werden für jedes Gen (Abszisse) die dCt-Werte der Fe65- Maustypen („F“), der AICD- und Fe65-transgenen Maustypen („A“) und der Wildtypen („K“ = Kontrolle). Abgesehen von den Transgenen AICD und Fe65 und der dCt-Werte von IGFBP3 ergaben sich bei den übrigen Genen keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Mausgruppen.

## 3.2 Real-time PCR Analysen des transgene Mausmodells APP23 mit der Mutation K670/M671L („swedish“-Mutation)

Das transgene Mausmodell APP23 mit der Mutation K670/M671L gehörte zu den ersten Versuchen, ein *in vivo* Modell zur Erforschung der Alzheimer Erkrankung zu etablieren. Es stellt ein bewährtes Tiermodell dar, welches in dieser Arbeit eingesetzt

wurde, um Einzelaspekte der Alzheimer-Erkrankung zu untersuchen. Im Gegensatz zu dem doppelt-transgenen Mausmodell mit nur der intrazytoplasmatischen Domäne von APP als Transgen wurde in diesem Modell der Einfluss des Holo-Proteins APP auf die Genregulation untersucht. Verglichen wurden Hippocampus-Proben folgender vier Gruppen mit n= 5 Tieren in jeder Gruppe: 3 Monate alte APP23-transgene Mäuse, 3 Monate alte Wildtyp-Mäuse, 6 Monate alte APP23-transgene Mäuse sowie 6 Monate alte Wildtyp-Mäuse.



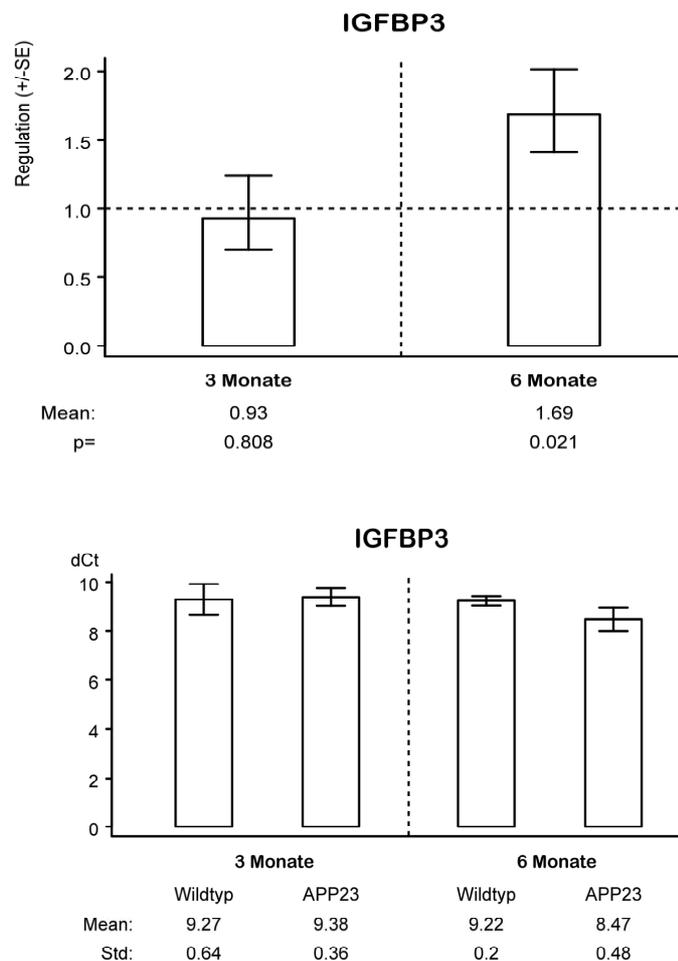
**Abbildung 6:** Expression von humanem APP im Hippocampus 3 Monate und 6 Monate alter transgener APP23-Mäuse. RNA-Expression im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypkontrollen sowie  $\Delta$ Ct-Werte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; Non=Wildtypkontrolle).

### 3.2.1 Expression von APP im transgenen Mausmodell APP23

Das Amyloid Precursor Protein war in den APP23- Mäusen der drei und sechs Monate alten Mäuse verglichen mit gleichaltrigen Wildtypen hochreguliert; der Unterschied war statistisch signifikant (siehe Abbildung 6). Die Hochregulation von APP war in den 3 Monate alten Mäuse mit einer ca. 30-fachen Regulation niedriger als in den doppelt so alten Mäusen mit einer 47-fachen Regulation. Auch dieser Unterschied war statistisch signifikant.

### 3.2.2 Expression von Insulin-Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3) in APP23-Mäusen

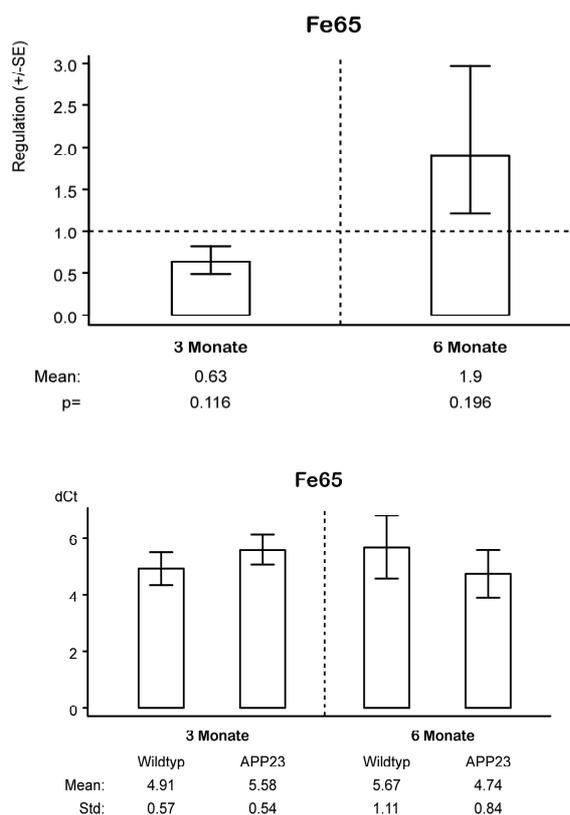
Unter den in diesem Modell untersuchten Genen war das Insulin-Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3) in 6 Monate alten Mäusen, der Gruppe mit der höchsten APP-Expression, 1,7-fach hochreguliert ( $P=0.021$ , siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Expression von IGFBP3 im Hippocampus 3 Monate und 6 Monate alter transgener APP23-Mäuse.** RNA-Expression im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypkontrollen sowie  $\Delta Ct$ -Werte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; Non=Wildtypkontrolle). Die sechs Monate alten transgenen Tiere weisen eine 1,7 fache IGFBP3 Expression im Vergleich zu den Kontrollen auf.

### 3.2.3 Expression von Fe65 in APP23-Mäusen

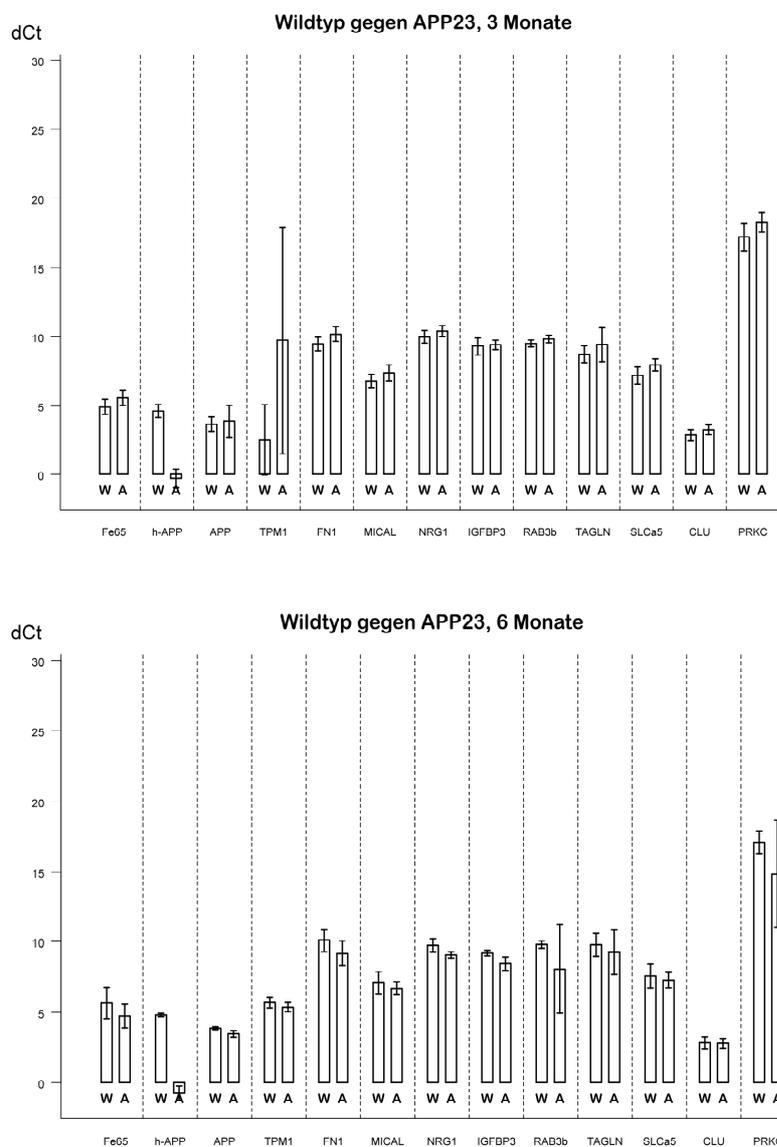
Für das Adaptorprotein Fe65, dem ein potentiell transaktivierendes Potential zugesprochen wird, ergab sich weder bei den drei noch bei den sechs Monaten alten Tieren eine signifikante differentielle Expression (siehe Abbildung 8)



**Abbildung 8:** Expression von Fe65 im Hippocampus 3 Monate und 6 Monate alter transgener APP23-Mäuse. RNA-Expression im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypkontrollen sowie  $\Delta$ Ct-Werte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; Non=Wildtypkontrolle).

### 3.2.4 Übersicht aller im APP23-Mausmodell untersuchten Gene

Wie in Abbildung 9 dargestellt ergab sich, abgesehen von den bereits erwähnten Genen, für keines der weiteren untersuchten Gene eine signifikante differentielle Expression in den Altersgruppen der drei- noch der sechs Monate alten transgenen Mäuse im Vergleich zu den altersentsprechenden Wildtypmäusen.



**Abbildung 9: Expression aller untersuchter Gene im Hippocampus drei Monate alter transgener APP23-Mäuse.** Dargestellt sind die dCt-Werte sämtlicher in dem APP23- transgenen Maussystem untersuchten Gene. Bei den drei Monate alten Tieren ergibt sich eine signifikant unterschiedliche Expression zwischen Wildtypen („W“) und APP-transgenen Mäusen („A“) ausschließlich für humanes APP, bei den 6 Monate alten Tieren war zusätzlich lediglich IGFBP3 differentiell exprimiert.

### 3.3 IGFBP3 mRNA-Expression in Autopsie-Gewebe von Alzheimer-Patienten

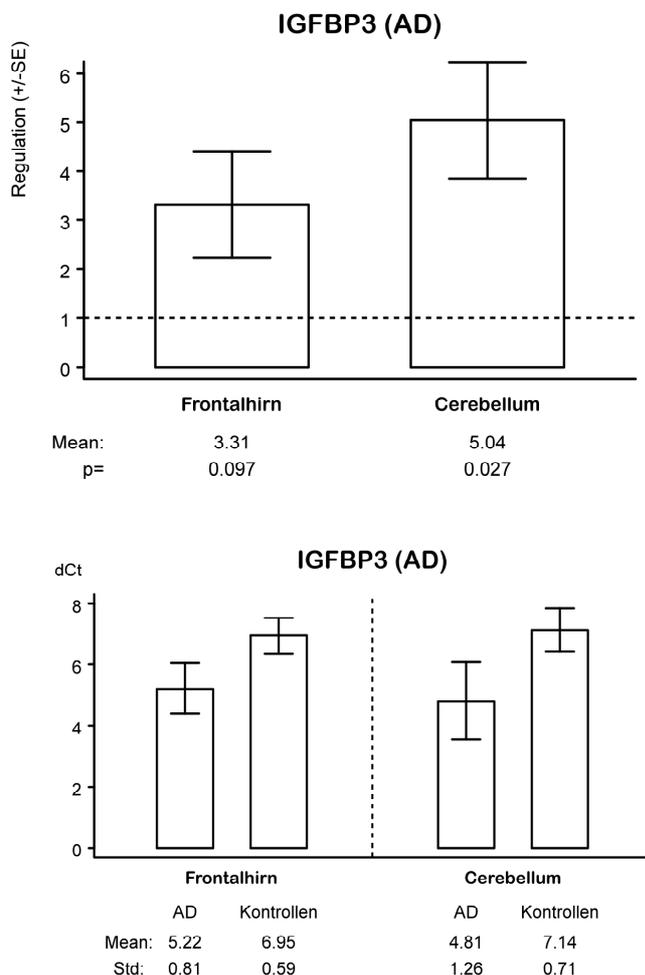
In dem transgenen APP23-Mausmodell wurden Effekte von APP ohne weitere Alzheimer-typische Veränderungen wie die neurofibrillären Tangles untersucht. Um eine Aussage über die Bedeutung des untersuchten Gens bei der Alzheimer-Erkrankung beim Menschen treffen zu können, wurde das in beiden Mausmodellen signifikant regulierte Gen IGFBP3 mittels der real-time PCR in Autopsie-Gewebe von Alzheimer-Erkrankten und gesunden Kontrollen analysiert. Das Autopsiegewebe entstammt aus der grauen Substanz der Frontalhirne und Cerebelli von sechs Alzheimerpatienten und fünf altersstandardisierten Kontrollen ohne neuropathologische Auffälligkeiten.

	Alter	Post-mortem-Zeit
<b>Alzheimer-Patienten</b>	75 Jahre (63-86 Jahre)	13,4 Stunden (5-24 Stunden)
<b>Kontrollpersonen</b>	76 Jahre (63-92 Jahre)	11,4 Stunden (5-23 Stunden)

---

**Tabelle 3: Charakteristika des Autopsiegewebes.** Alter und Post-mortem-Zeit bei Alzheimer-Patienten (n=6) und Kontrollpersonen [n=5, Mittelwert (Bereich)].

Mittels real-time PCR Analyse ergab sich eine signifikante Hochregulation des Insulin Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3) in den Frontalhirnen (3-fach), ausgeprägter in den Cerebelli (5-fach), im Autopsiegewebe von Alzheimer-Patienten gegenüber neuropathologisch unauffälligen Kontrollgehirnen (siehe Abbildung 10)



**Abbildung 10: Expression von IGFBP3 in Frontalhirn und Cerebellum von Alzheimer-Patienten.** RNA-Expression im Vergleich zu neuropathologisch unauffälligem Kontrollgewebe sowie  $\Delta$ Ct-Werte (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; Non=Wildtypkontrolle).

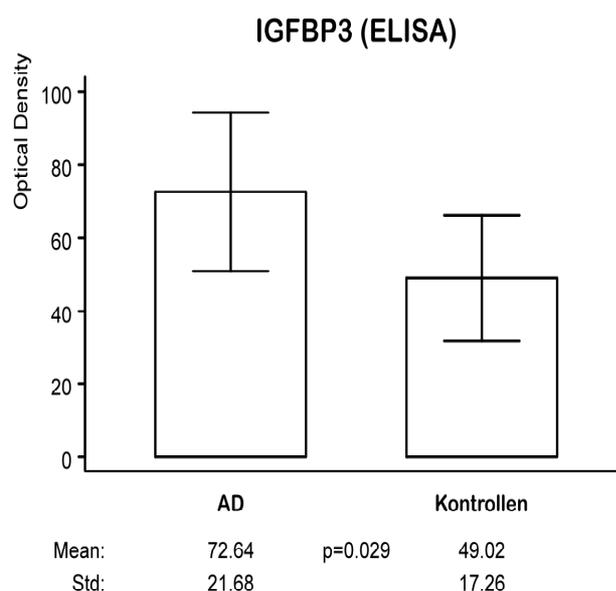
### 3.4 IGFBP3 Proteinexpression in Autopsie-Gewebe von Alzheimer-Patienten

Die mit Hilfe der real-time PCR gemessene Überexpression auf mRNA Ebene des in allen untersuchten Modellen signifikant regulierten Gens IGFBP3 erlaubt keinen direkten Rückschluss auf die funktionelle Bedeutung der Expression dieses Gens in der Alzheimer-Erkrankung. Daher wurde die Analyse auf Protein-Ebene mit ELISA in Autopsie-Gewebe von Alzheimer-Patienten gegenüber Kontrollen durchgeführt.

### 3.4.1 Enzyme-linked Immunsorbend Assay (ELISA)

Zur quantitativen Bestimmung der Protein-Konzentration von IGFBP3 wurden Proben des Autopsiematerials von Alzheimerhirnen (Frontalhirn) in Probepuffer lysiert. Der Überstand, das Proteinextrakt, wurde auf die geringste Konzentration verdünnt und auf die ELISA Platte aufgetragen (siehe Methodenteil; Seite 33).

Für den Assay wurden Autopsiegewebeproben von sieben an Alzheimer verstorbenen Patienten mit dem IGFBP3-Antikörper (Quantiquine®) untersucht und mit neun Autopsiegewebeproben von nicht an einer Demenz verstorbenen Patienten verglichen. Es handelte sich um Frontalhirngewebe. Die optische Dichte (OD, Optical Density) der Alzheimer-Proben, welche mit der Konzentration von IGFBP3 korreliert, unterschied sich signifikant von der optischen Dichte der untersuchten Kontrollen.



**Abbildung 11: Expression von IGFBP3 Protein im Frontalhirn von Alzheimer-Patienten und Kontrollen.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichung der optischen Dichte (Optical Density), welche im ELISA an Autopsiematerial von Alzheimer-Patienten („AD“) und neuropathologisch unauffälligen Kontrollgehirnen gemessen wurde.

## 4 DISKUSSION

---

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Verifizierung AICD-abhängiger Genregulation von Kandidatengenen in transgenen Mausmodellen der Alzheimererkrankung. Um die Relevanz der differentiellen Genregulation bezüglich der Alzheimer-Pathogenese beurteilen zu können, sollten die zuvor im Tiermodell bestätigten Gene auch an Autopsiegewebe von Alzheimer-Patienten untersucht werden.

Hierbei konnte bis auf Insulin-Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3) für keines der untersuchten Kandidatengene eine differentielle Expression in den untersuchten Mausmodellen nachgewiesen werden. Eine differentielle IGFBP3-Expression konnte jedoch sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene ebenso im Autopsiegewebe von Alzheimer-Patienten identifiziert werden. Somit ist dieses Gen möglicherweise an der Pathogenese der Alzheimererkrankung beteiligt. Zudem besitzt dieser Befund möglicherweise auch Implikationen für die Behandlung der Alzheimer-Erkrankung.

Die Auswahl der 25 untersuchten Gene basiert auf den Ergebnissen einer Mikroarray-Analyse von für AICD mit dem Koaktivator Fe65 induzierbaren Neuroblastomzellen (Müller et al. 2006). Die Expression auf mRNA-Ebene wurde mittels real-time PCR untersucht; auf Protein-Ebene konnten die Ergebnisse von IGFBP3 zusätzlich in einem ELISA bestätigt werden. Im Zentrum stand die real-time PCR Analyse eines in der Arbeitsgruppe von Ryan et al. etablierten transgenen Mausmodells, welches AICD und Fe65 exprimiert (Y. Gao, S. Pimplikar et al. 2005). Darüber hinaus wurde das transgene Mausmodell APP23 eingesetzt, in dem die nicht-neuronale APP751 Isoform mit der „swedish familial AD“ Mutation unter der Kontrolle des Neuron-spezifischen Thy-1 Promotors steht.

Neben einer Darstellung des gegenwärtigen Forschungsstandes rund um die differentielle Genregulation durch AICD wird die Funktionsfähigkeit der eingesetzten Modelle diskutiert, sowie die Problematik kohärenter Ergebnisse von AICD-abhängig regulierten Kandidatengenen, die Validität der Befunde dieser Arbeit und schließlich die Analyse des Insulin-Growth Factor Binding Protein 3. Ausgehend von den Schlussfolgerungen soll der Stellenwert der Ergebnisse erläutert und mögliche

Konsequenzen für fortführende Untersuchungen sowie den Umgang mit der Alzheimer Erkrankung beleuchtet werden.

Die durch beta- und gamma-Sekretase vermittelte Prozessierung von APP, einem Typ I-Transmembranprotein, führt zur Ausbildung von neurotoxischen Amyloidplaques. Dieser Prozess ist von zentraler Bedeutung für die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung. Es wird angenommen, dass APP auf noch unklare Weise Einfluss auf Signalkaskaden in der Zelle nimmt und hierdurch die Regulation von Genen modifiziert, welche möglicherweise zu Zellzyklusveränderungen, neuronalem Zelltod, Amyloidbildung und schließlich Demenz führen (Cupers et al., 2002). Diese Hypothese wird unterstützt durch die Interaktion von APP mit diversen Proteinen, die in unterschiedliche Signalwege involviert sind (Leissering et al. 2001).

In diesem Zusammenhang wurde erst lange Zeit nach der Entdeckung des Abeta-Peptids der kleinen intrazellulären Domäne von APP zunehmend Beachtung geschenkt. Sudhof et al. zeigten 2001 an heterogenen Reportersystemen, dass AICD, das Adaptorprotein Fe65 und die Histon-Acetyltransferase Tip60 einen transkriptionell aktiven Komplex bildet. Fe65 soll für die differentielle Genregulation durch AICD eine besondere Rolle spielen (Kimberly et al. 2001). AICD ist ein hoch labiles Peptidfragment, das nur schwer nachweisbar ist (Müller et al. 2006). Wie Kimberly et al. (2001) in einer Studie nahe legen, wird AICD durch Fe65 stabilisiert, der AICD-Fe65-Komplex kann in den Zellkern eintreten und dort Einfluss auf die Genregulation nehmen. Nakaya et al. (2006) vermuten, dass die Phosphorylierung von APP zu einer Konformationsänderung und Freisetzung des membrangebundenen Fe65 führt, welches daraufhin im Komplex mit AICD spezifische Gene im Zellkern aktiviert. Santiard-Baron et al. (2005) etablierten Mausmodelle, in denen entweder APP allein oder in Kombination mit Fe65 exprimiert wurde. In den doppelt-transgenen Mäusen konnte, verglichen mit den einfach-transgenen Mäusen, eine signifikant niedrigere Abeta-Akkumulation nachgewiesen werden. Die Autoren vermuten eine Beeinflussung der APP-Prozessierung von Fe65 (Santiard-Baron, 2005). Alternativ wurde von Yang et al. (2006) vorgeschlagen, dass Fe65 selbst eine dominierende Rolle als Aktivator der Transkription spielt und APP nur eine modulierende Nebenrolle ausübt.

Trotz intensiver Forschung ist bis dato wenig über die Funktion von APP und seiner zytoplasmatischen Domäne AICD bekannt. Auf der Basis der gegenwärtigen

Forschungsergebnisse wird der Einsatz von Sekretase-Inhibitoren in der Therapie der Alzheimer-Erkrankung diskutiert. Diese reduzieren zwar die Bildung der Amyloidplaques, aber sie schwächen gleichzeitig auch die dem AICD innewohnenden Signaleigenschaften ab und könnten unvorhersehbare Nebenwirkungen nach sich ziehen. Ein besseres Verständnis des APP-Holoproteins und seines Peptidfragments AICD, sowie die Identifikation der durch AICD differentiell regulierten Gene sind eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung gezielter Interventionen bei der Alzheimer-Demenz.

#### **4.1 Funktionalität der untersuchten Modelle**

Die signifikante Überexpression von AICD und Fe65 bestätigen die Funktionalität der untersuchten Modelle.

Mittels der real-time PCR Technik konnte im Frontalhirn und im Hippocampus der doppelt transgenen Tiere eine 6- bzw. 7-fache Regulation von AICD nachgewiesen werden. Auch im Cerebellum wurde eine geringe, 1,5-fache Überexpression von AICD gemessen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Aktivität des hier eingesetzten CaMKII $\alpha$  Promotors im Frontalhirn und Hippocampus (Abel et al. 1997). Die beobachtete Anreicherung von AICD im Cerebellum könnte auf schwache CaMKII $\alpha$ -Promotoraktivität in diesem Abschnitt zurückzuführen sein, oder einen sekundären Effekt von exprimiertem AICD und Fe65 im Frontalhirn und Hippocampus darstellen.

Auch Fe65 wird in den drei genannten Hirnarealen überexprimiert; in den AICD und Fe65 doppelt-transgenen Mäusen ist die Fe65-RNA wesentlich stärker angereichert (Regulationswerte im Frontalhirn 223-fach, im Hippocampus 223-fach und im Cerebellum 69-fach) als in den Fe65- einfach transgenen Tieren (Regulationswerte im Frontalhirn 12-fach, Hippocampus 25-fach, Cerebellum 12-fach). Dieser bemerkenswerte Befund könnte auf eine bislang unbekannt positive Rückkoppelung von AICD und Fe65 hindeuten, wonach AICD die Expression von Fe65 verstärkt. In diesem Zusammenhang sind die Befunde von Sant-Baron et al. zu erwähnen, die eine Wechselwirkung von Fe65 und der Prozessierung des APPs konstatieren. Eine derartige Interaktion sollte in zukünftigen Untersuchungen näher überprüft werden.

Die Funktionalität des APP23-Modells konnte durch die deutliche Expression des APP-Transgens verifiziert werden. In den drei Monate alten Tieren zeigte sich eine weniger ausgeprägte RNA-Expression des Transgens (30-fach) im Verhältnis zu den sechs Monate alten Tieren (47-fach), was einen relevanten Alterseffekt darstellt.

Das Altersspektrum sowie die post-mortem Intervalle der Vergleichsgruppen der Autopsiegewebe weichen nicht wesentlich voneinander ab und bieten keinen Anlass für einen entsprechenden Confounder: Das mittlere Alter der Alzheimer-Patienten betrug 75,2 Jahre (Bereich 63-86 Jahre), die durchschnittliche post-mortem Zeit betrug 13,4 Stunden (Bereich 5-24 Stunden). Das mittlere Alter der Kontrollpersonen betrug 75,5 Jahre (Bereich 63-92 Jahre), die durchschnittliche post-mortem Zeit betrug 11,4 Stunden (Bereich 5-23 Stunden).

#### **4.2 Heterogene Ergebnisse der APP-abhängigen Genregulation von Kandidatengenen**

Bis auf die Transgene im Mausmodell und das Insulin-Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3) konnte kein Gen in den untersuchten Modellen als differentiell reguliert bestätigt werden. Grundsätzlich bestehen allein durch das *in vivo* Studiendesign dieser Arbeit trotz der nachweisbaren Funktionalität mögliche Schwächen. Zu nennen ist die durch das limitierte Probenmaterial bedingte niedrige Fallzahl mit entsprechend hoher interindividueller Streubreite, welche sich insbesondere bei Genen mit geringer Konzentration bemerkbar macht (siehe beispielsweise PRKC im Ergebnisteil Abbildung 7). Zu bedenken ist weiterhin, dass – anders als in den Zellkulturmodellen – nicht ausschließlich neuronale Zellen verwendet wurden, sondern das Gesamtzell-extrakt mit Zellen nicht-neuronaler Herkunft, wie die Gliazellen. Ein nur geringer Konzentrationsunterschied der vorliegenden mRNA in den neuronalen Zellen bleibt unentdeckt. Mögliche durch die Untersuchungsmethode der real-time PCR bedingte Fehler wurden durch entsprechende Doppelmessungen und die Analyse der Schmelzkurve minimiert. Das Housekeeping-Gen GAPDH, ein im Glukose-Stoffwechsel in allen stoffwechselaktiven Zellen in konstanter Konzentration vorliegendes Enzym, wurde in sämtlichen Proben in konstant niedriger Konzentration gemessen, so dass von einer gleichen Menge eingesetzter Zellen in den zu vergleichenden Proben

ausgegangen werden kann. Konzentrationsunterschiede der Gene können folglich nicht auf eine unterschiedliche Menge eingesetzter Zellen zurückzuführen sein.

Zusammenfassend kann unter Berücksichtigung der Funktionalität der Modelle sowie der oben genannten Überlegungen von einem validen Ergebnis dieser Arbeit ausgegangen werden.

Heterogene Ergebnisse bezüglich der APP-abhängig regulierten Zielgene stellen ein wohlbekanntes Phänomen dar: Als ein Beispiel sei das Tumor-Suppressor Gen KAI 1 erwähnt, welches in bisherigen Untersuchungen durch APP reguliert wurde (Baek et al. 2002 und Ryan et al. 2005 und Müller et al. 2006), aber von Heber et al. (2006) und in der vorliegenden Arbeit nicht als APP-Zielgen in Erscheinung trat. GSK3beta (Glykogen synthase kinase-3 beta) wurde durch Kim et al. (2003) und von Rotz et al. (2004) als reguliert identifiziert, was ebenfalls durch Heber et al. 2006 und in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Das mit Apoptose und dem Lipidtransport assoziierte Protein Clusterin (Apolipoprotein J) wurde von Calero et al. (2000) als hochreguliert beschrieben, während hier wie auch bei Müller et al. (2006) keine differentielle Genregulation beobachtet werden konnte.

Worin könnte die offenbare Diskrepanz in den Untersuchungsergebnissen begründet liegen? Bei den *in vitro* Untersuchungen wurden unterschiedliche Zelllinien verwendet, z.B. HEK293 (Rotz et al. 2004), SHEP-SF Neuroblastomzellen (Müller et al. 2006) oder Fibroblastenlinien (da Costa et al. 2006). Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Ausstattung von Proteinen, welche für die Transaktivierung wichtig sein könnten, wie etwa der Gehalt von Fe65 und Tip60.

Bei den *in vivo* Untersuchungen kamen unterschiedliche transgene Mausmodelle zum Einsatz und es wurden unterschiedliche Promotoren eingesetzt, die in verschiedenen Stadien der Entwicklung und unterschiedlichen Geweben aktiv sind (Sturchler-Pierrat et al. 1997, Kelly et al. 2001, Janus et al. 1999, Ryan et al. 2006).

Ein wichtiger Faktor ist der Zeitpunkt der Analyse. Es wurden bei den mit AICD transfizierten Zellen unterschiedliche Induktionszeiträume benutzt, so dass indirekte Effekte durch Neusynthese von Proteinen nach längeren Expositionszeiten nicht auszuschließen sind (72 Stunden bei Müller et al. 2006, 48 Stunden bei von Rotz 2004). Grundsätzlich liegen keine Referenzen vor, wie stark AICD bzw. APP

exprimiert sein muss, so dass es transaktivierende Wirkung entfalten kann (Frage nach der Dosis-Wirkungs-Komponente); auch was die Regulationsraten angeht, liegen keine Richtwerte für funktionell signifikante direkte Regulation vor (Vgl. Herbert et al. 2006).

Eine weitere Variable in den vorliegenden Studien über das transaktivierende Potential von AICD und seiner Kandidatengene sind die unterschiedlichen Altersklassen, die in den Tiermodellen eingesetzt werden. Wie Janus (2002) in seinem Übersichtsartikel über transgene Mäuse und Alzheimermodelle berichtet, zeigen unterschiedlich alte Mäuse unterschiedliche Muster der Amyloid-Peptid-Akkumulation und junge transgene Mäuse zeigen keine überzeugenden Alzheimer-ähnlichen Pathologien (siehe hierzu auch Sturchler-Pierrat et al. 1997). Sturchler-Pierrat et al. zeigten, dass in den in dieser Studie ebenfalls verwendeten Mausmodellen mit der swedish-Mutation (APP23) die typischen Alzheimer-Pathologien im Alter von sechs Monaten eintreten, so dass Alzheimer-typische Veränderungen in Abhängigkeit vom Alter untersucht werden müssen.

Ein kritischer Punkt für die Untersuchung der relativen Expressionsunterschiede ist die interne Referenz. Gutala et al. (2003) zeigten, dass - basierend auf der real-time PCR Methode beta-Aktin und 18srRNA in Autopsiegewebe von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen differentiell reguliert werden; als RNA-Ladekontrolle wurde in dieser Studie Glyceralaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Dieses Gen wird im Gehirn von Alzheimerpatienten und Kontrollen gleichermaßen exprimiert (Gutala et al. 2003) und stellt somit eine optimale Referenz dar. Auch in Neuroblastomzellen wurde GAPDH als stabil exprimiert beschrieben (Horendli et al. 2004). In der vorliegenden Studie wurden Proben der für AICD und Fe65 doppelt-transgene Mäuse von Ryan und Pimplikar (2005) verwendet. In diesem transgenen Mausmodell werden AICD und Fe65 verstärkt in frontalen und hippocampalen Regionen des postnatalen Gehirns exprimiert. Trotz des gleichen Modells konnten die Ergebnisse von Ryan und Pimplikar (2005), die u. a. KAI1 als reguliert identifizierten, in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Eine mögliche Ursache könnte der Einsatz der internen Referenz sein. Während Ryan und Pimplikar (2005) beta-Aktin als Referenz-Gen verwendeten, wurde in hier GAPDH verwendet.

Welche Rolle die Isoformen von AICD spielen, wurde noch unzureichend untersucht. Die doppelt-transgenen Mäuse exprimieren AICD 59. Ob für die nukleäre Translokation von AICD und die nachfolgende Transaktivierungsaktivität eine Phosphorylierung von AICD erforderlich ist oder nicht (Chang et al. 2006, Nakaya et al. 2006), ist bislang nicht definitiv geklärt und könnte ebenso Einfluss auf die differentielle Genregulation haben.

Zu bedenken sind weiter die von Müller et al. 2006 postulierten unterschiedlichen Regulationsmechanismen einzelner durch APP regulierter Zielgene und möglicherweise verschiedener Adaptorproteine, die für die transaktivierende Wirkung von AICD notwendig sind. Von Rotz et al. (2004) führten eine Studie zur Untersuchung der Funktion der Adaptorproteine Fe65, Jip1b, X11 alpha (MINT1) und dem Chromatin-assoziierten Protein Tip60 durch. Um die molekulare Ausstattung für die nukleäre Lokalisation von AICD zu charakterisieren, nutzen die Autoren induzierbare Expression von Fluoreszenz-markiertem AICD und Ko-Transfektion von Adaptorproteinen, gefolgt von konfokaler Mikroskopie und Ko-Immunopräzipitation. Aufgrund der unterschiedlichen Morphologie des AICD-Fe65-Tip60 (AFT)-Komplexes (spährische nukleäre Spots) und der des AICD-Jip1b-Tip60 (AJT)- Komplexes (fleckig-gesprenkelte Morphologie) mutmaßte die Arbeitsgruppe, dass AJT und AFT ein unterschiedliches Set an Genen reguliert.

Die aufgeführten methodologischen Unterschiede der verschiedenen Studien erschweren die Vergleichbarkeit der Ergebnisse und fordern bei ihrer Interpretation die Berücksichtigung der genannten Variablen. Für praktische Zwecke im Bereich der Alzheimer-Therapie sind Bestätigungsstudien an humanem Autopsiegewebe von Alzheimererkrankungen erforderlich.

#### **4.3 Das signifikant regulierte Gen Insulin-Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3)**

In der vorliegenden Studie wurde IGFBP3 als ein differentiell exprimiertes Gen in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen der Alzheimer-Erkrankung nachgewiesen. Es wurde konsistent eine Überexpression von IGFBP3-mRNA der Hippocampus-Proben der sechs Monate alten APP23-Mäuse und im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten ermittelt. Auch auf Proteinebene konnte eine Hochregulierung von IGFBP3

in Alzheimer-Hirnen mittels ELISA bestätigt werden. Demgegenüber wurde eine Reduktion (0,58-fach) von IGFBP3 mRNA in den Frontalhirnen von sechs Monate alten doppelt-transgenen (AICD und Fe65) Mausproben beobachtet. Über diesen Befund lässt sich aufgrund der Komplexität der *in vivo* Systeme mit ihren multiplen Beeinflussungsgrößen nur mutmaßen. So könnte das Alter der zu vergleichenden Mausgruppen einen Störfaktor darstellen. Das Alter der Kontrollgruppe beträgt 10 Monate gegenüber 6 Monaten bei den doppelt-transgenen Mäusen. In diesem Studienmodell handelt es sich um relative Regulationswerte; es ist evident, dass die dCt-Werte der Kontrollgruppe direkt die Regulationswerte beeinflussen. Wie oben beschrieben, ist das Alter der Mäuse von Bedeutung (Janus 2002). Da es sich bei den doppelt-transgenen AICD und Fe65-Mäusen um ein erst vor kurzem etabliertes Modell handelt (Ryan 2005), stehen noch keine Daten bezüglich altersabhängiger Veränderungen zur Verfügung. In den doppelt-transgenen Mäusen liegt AICD nicht in membrangebundener Form vor; dieser Umstand könnte seine transaktivierende Funktion beeinflussen (Vgl. Cao et al. 2004). Eine interessante Interpretation wäre, dass es sich hier um einen Effekt des besonders in den doppelt-transgenen Mäusen außergewöhnlich stark hochregulierten Proteins Fe65 handeln könnte, welches womöglich in diesem Fall eine zu AICD diametrale Wirkung hervorruft. Das Adaptorprotein Fe65 zeigte sich dagegen in dem APP23-Modell verglichen mit den Wildtypen als nicht signifikant reguliert. Im Frontalhirn des doppelt-transgenen Mausmodells hingegen konnte die höchste Expression von Fe65 beobachtet werden - ausgerechnet dort, wo die IGFBP3 mRNA reduziert ist.

Hinsichtlich der Fragestellung bezüglich der Relevanz der Überexpression von IGFBP3 für die Alzheimer-Pathogenese sind die Autopsie-Ergebnisse von herausragender Bedeutung. Nicht nur auf mRNA-, sondern auch auf Protein-Ebene konnte im Frontalhirn eine verstärkte Expression von IGFBP3 in Alzheimer-Hirnen festgestellt werden. Die Ergebnisse der real time PCR Analyse sollten jedoch kritisch bewertet werden, weil ein größerer Anstieg in der IGFBP3 mRNA in den Cerebelli (5-fach) gegenüber den Frontalhirnen ermittelt wurde. Es könnte sich hierbei um einen unspezifischen Effekt im Rahmen der neurodegenerativen Erkrankung handeln. In diesem Zusammenhang sind die Befunde von Irizarry und Pratico (2001) anzuführen, welche in den Kleinhirnen von Alzheimer-Patienten keine signifikanten Amyloid-

Ablagerungen nachweisen konnten, so dass in diesem Hirnareal Alzheimer-spezifische Veränderungen zumindest morphologisch nicht typisch sind.

Eine spezifische Rolle von IGFBP3 bei der Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung bleibt trotz aktueller Forschung ungewiss: Die IGF-Bindeproteine stellen eine komplexe Familie von sieben eng verwandten cysteinreichen Proteinen dar, die mit hoher Affinität an Insulin-verwandte Wachstumsfaktoren (engl. Insulin-like Growth Factors, IGFs) binden und entweder positiv oder negativ die Signalaktivität dieser Faktoren beeinflussen. IGF-1 wurde mehrfach als Anti-Zelltod-Faktor beschrieben (D'Mello et al. 1993, Harrington et al., 1994, Sell et al., 1995). Es ist ein im Plasma zirkulierendes Polypeptid, welches hauptsächlich in der Leber, jedoch auch parakrin in anderen Geweben produziert wird. Der entsprechende wirkungsvermittelnde Rezeptor IGF-1R wird in diversen Geweben einschließlich des Gehirns produziert. Mustafa et al. (1999) zeigten, dass verminderte Konzentrationen von IGF-1 bei der Familiären Alzheimer-Erkrankung mit der Mutante K595/N/M596L vorliegen. Der Befund, dass IGF-1 primäre hippocampale Rattenneurone vor toxischen Effekten des Abeta-Peptids schützt (Dore, 1997), wies auf eine mögliche neuroprotektive Aktivität dieses Faktors hin. Dore et al. (2000) schlugen IGF-1 als potentielles Therapeutikum gegen die Alzheimer-Erkrankung vor. Clemmons et al. beschrieben IGFBP3 als das IGFBP von mindestens sechs Untergruppen mit der stärksten Bindungsaktivität an IGF-1 im Serum und gehen von mannigfachen Interaktionsmodalitäten aus. IGFBP3 stabilisiert IGF1 im Blut und erhöht dessen Halbwertszeit von 10 Minuten im ungebundenen Zustand auf 30 Minuten im Komplex mit IGFBP3. In diesem Zusammenhang scheinen genauere Kenntnisse über IGFBP3 und IGF-1 (IGF-2) vonnöten zu sein.

Verstärkte Expression von IGFBP3 wurde wiederholt mit der Inhibition von Zellwachstum und Apoptoseinduktion in Zusammenhang gebracht; es reguliert die Bioaktivität von IGF (Chun et al. 1994). IGFBP3 blockiert die durch IGF-1 verhinderte spontane Apoptose in kultivierten präovulatorischen Follikeln. Buckbinder et al. (1995) berichten, dass IGFBP3 die Mitose durch IGF-1 verhindert und von diesem Mechanismus unabhängig auf Zellwachstum und Überleben einwirkt. Für einige Vertreter der IGFBP-Familie wurden IGF-unabhängige Wirkungen aufgezeigt, wie z.B. die Inhibition von Wnt-Signalen durch IGFBP4 bei der Herzbildung (Zhu et al. 2004). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch IGFBP3 unabhängig von IGF-Signalen wirken

könnte. Neben der vorliegenden Arbeit existieren weitere Hinweise auf eine vermutlich direkte Beteiligung von IGFBP3 an der Alzheimer-Pathogenese. Diverse Studien legen nahe, dass IGFBP3 zur neuronalen Degeneration von AD beitragen könnte. Ikonen et al. (2003) identifizierten eine hoch-affine Interaktion zwischen dem Alzheimer Survival Peptid Humanin und IGFBP3, die sich als pleiotropher Natur mit z.T. synergistischer und z.T. antagonistischer Natur erwies. Humanin ist ein Peptid, welches spezifisch den durch die FAD-Mutante und Abeta induzierten neuronalen Zelltod inhibiert.

Renskin et al. (2002) zeigten an humanen Hirnperizyten (HBP) mit der Dutch-Mutation (DAbeta1-14) bei der Untersuchung der differentiellen Genexpression eine erhöhte mRNA-Expression von Insulin-Growth Factor Binding Protein 3 in den behandelten HBPs. Auch wurden in einer Untergruppe von senilen Plaques und cerebraler Amyloid-Angiopathie in AD-Hirnen erhöhte IGFBP3 Proteinlevel festgestellt. IGFBP3 konnte in neurofibrillären Tangles als hochreguliert identifiziert werden (Renskin et al. 2002 Acta Neuropathologie).

Das Insulin-Growth Factor Binding Protein 3 wird in diversen Studien als ein Akteur bei neurodegenerativen Prozessen beschrieben. Ob IGFBP3 indirekt oder direkten Einfluss auf neurodegenerative Prozesse ausübt, ist noch nicht geklärt. Die vorliegende Studie, insbesondere die Ergebnisse des APP23-Mausmodells mit der Überexpression des mutierten APPs und folgender verstärkter Amyloid-Bildung legen nahe, dass eine Alzheimer-spezifische Wirkung von IGFBP3 durchaus wahrscheinlich ist.

#### **4.4 Ausblick**

Die erste Hypothese, bei der APP analog zum Notch-Protein an differentieller Genregulation beteiligt ist, scheint durch mehrere Studien gesichert zu sein. Bezüglich der AICD abhängig regulierten Kandidatengene liegen noch immer diskrepante Ergebnisse aus zum Teil sehr unterschiedlichen Studiendesigns vor und es besteht auch wegen der potentiellen klinischen Bedeutung der Bedarf an fortführenden standardisierten Studien.

Phiel et al. (2003) schlagen beispielsweise den Einsatz therapeutischer Konzentrationen von Lithium vor, einem GSK-3 Inhibitor, der die Produktion von Abeta durch Interaktion mit der APP prozessierenden Gamma-Sekretase blockiert. Auch wenn durch diese spezifische Inhibition die Notch-Prozessierung nicht beeinträchtigt ist (und man denke zusätzlich an die Beeinflussung vieler essentieller Signalwege durch GSK-3, wie dem Wnt oder Hedgehog-Weg), wäre, wie auch bei dem Einsatz von Sekretase-Inhibitoren, die AICD-Produktion verringert und somit ebenso die AICD-abhängige Regulation seiner Kandidatengene.

In dieser Studie konnte IGFBP3 als signifikant differentiell reguliertes Gen aus einer Vielzahl von untersuchten Kandidatengenen identifiziert werden. Trotz der noch unverstandenen Inkohärenz der Ergebnisse dieser Arbeit mit einer reduzierten Konzentration von IGFBP3 mRNA in den Frontalhirnen der doppelt-transgenen Mäuse und der Hochregulation in dem APP23-Mausmodell und dem Autopsiegewebe von Alzheimer-Patienten, die mit Fe65 in Zusammenhang stehen mag, ist eine Beeinflussung von Alzheimer-assoziierten Prozessen und APP sehr wahrscheinlich.

Zusammenfassend scheint IGFBP3 ein für die Entstehung von Morbus Alzheimer und vielleicht gar für die Behandlung der häufigsten Demenz-Erkrankung vielversprechendes Zielprotein zu sein. Selbst wenn es nicht als zentrales pathogenetisches Agens wirksam sein sollte, könnte es als Inhibitor von protektiven Faktoren von größerer Bedeutung sein. Vielleicht liegt hier auch eine Antwort auf die noch unzureichend geklärte Frage, warum die Alzheimer-Erkrankung bei vorliegender Mutation im APP-Gen erst im späteren Lebensalter manifest wird. Eine möglicherweise unspezifische Wirkung im Rahmen neurodegenerativer Prozesse (hier denke man an die signifikante Hochregulation von IGFBP3 in den Cerebelli der Alzheimerhirne) scheint ebenfalls zu bestehen und ist unabhängig zu betrachten.

Wenn auch zur Zeit noch Zukunftsmusik, so könnten IGFBP3-Inhibitoren eine therapeutische Option in der adjuvanten Behandlung der Alzheimer-Erkrankung oder anderer neurodegenerativer Erkrankungen bieten.

## 5 LITERATUR

---

- Abel, T., P. V., Ngyueyen, M., Barad, T., A., Duel, E., R., Kandel and Bourtchouladze, R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*. 88615-26
- Ando K, Oishi M, Takeda S, Lijima K, Isohara T, Nairn AC, Kirino Y, Greengard P, Suzuki T (1999). Role of phosphorylation of Alzheimer's amyloid precursor protein during neuronal differentiation. *J Neurosci*, 19:4421-4427
- Ando K, Lijima KI, Elliott JI, Kirino Y, Suzuki T: Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of beta-amyloid. *J Biol Chem* 2001, 276:40353-40361
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, MD., and Lake, RJ. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal interaction in development. *Science* 284, 770-776
- Baek SH (2002) Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression b NF-kappaB and beta-amyloid recursor protein. *Cell* 110 (1):55-67
- Baumeister R (1997) Human presnilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate Caenorhabditis elegans notch signaling independly of proteolytic processing. *Genes Function* I: 149-159
- Bayer TA, Cappai R, Masters CL, Beyreuther K, Multhaup G. *Mol Psychiatry* (1999 Nov) It all sticks together--the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. 4(6):524-8
- Bibel M (2004) Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defiend neuronal lineage. *Nat Neurosci* 7:1003-1009
- Blacker D (1998) Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimers disease. *Nature Genet* 19: 357-360
- Borg, Jean-Paul, Ooi, J., Levy, E., Margolis, B. (1996). The phosphotyrosine interaction domains of X11 and Fe65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Molecular and Cellular Biology*, p. 6229-6241

- Braak,H. and Braak,E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl)* 82, 239-259
- Brown MSYeJ, Rwason RB, Goldstein JL. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*; 100: 391-398
- Breen KC, Bruce M., Anderton, B.H., (1991) Beta-Amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J. Neuosci. Res.* 28, 90-100
- Buckbinder, L., Talbott, R., Velasco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, R. b., Kley, N., (1995). Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53.; *377(6550):646-9*
- Calero,M., Rostagno,A., Matsubara,E., Zlokovic,B., Frangione,B., and Ghiso,J. (2000). Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microsc. Res. Tech.* 50, 305-315
- Cao X, Sudhof TC (2004) Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem* 279 :2461-11
- Cao X, Sudhof TC (2001) A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone Acetyltransferase Tip 60. *Science* 293:115-120
- Chang,Y., Tesco,G., Jeong,W.J., Lindsley,L., Eckman,E.A., Eckman,C.B., Tanzi,R.E., and Guenette,S.Y. (2003). Generation of the beta-amyloid peptide and the amyloid precursor protein C-terminal fragment gamma are potentiated by FE65L1. *J. Biol. Chem.* 278, 5110051107
- Checler F, Sunyach C, Pardossi-Piquard R, Sévalle J, Vincent B, Kawarai T, Girardot N, St George-Hyslop P, da Costa CA. (2007). The gamma/epsilon-secretase-derived APP intracellular domain fragments regulate p53.*Curr Alzheimer Res.*; 4(4):423-6
- Cupers,P., Orlans,I., Craessaerts,K., Annaert,W., and 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.* 78, 1168-1178

- Delatour, B., Mercken, L., El Hachimi, K. H., Colle, M.A., Pradier, L., Duychaerts C. (2001). Fe65 in Alzheimer's Disease. Neuronal Distribution and Association with Neurofibrillary Tangles. *American J. of Pathology*, Vol. 158, No5
- De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolf MS, Ray WJ, Goat A, Kopan R. (1999). A presenilin-1-dependent Gamma-Secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*; 398:518-522
- Doré S, Kar S, Rowe W, Quirion R. (1997). Distribution and levels of [125I]IGF-I, [125I]IGF-II and [125I]insulin receptor binding sites in the hippocampus of aged memory-unimpaired and -impaired rats. *Neuroscience.*;80(4):1033-40
- Doré S, Kar S, Zheng WH, Quirion R. (2000). Rediscovering good old friend IGF-I in the new millenium: possible usefulness in Alzheimer's disease and stroke. *Pharm Acta Helv.*;74(2-3):273-80
- Erdbauer, D., Willem, M., Lammich, S., and Steiner, H.,: Insulin-degrading Enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain. (2002) *Neurobiol. Aging* 23,S559
- Ermekova KS, Zambrano N, Linn H, Minopoli G, Gertler F, Russo T, Sudol, M. (1997). The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* enabled. *J. Biol. Chem.* ;272(52):32869-77
- Galvan, V, Gorostiza, OF., Banwait, S., Ataie, M., Logvinova, AV., Sitaraman, S., Carlson, E., Sagi, SA., Chevallier, ., Jin, k., Greenberg, DA., Bredesen D. (2006). Reversal of Alzheimer's like pathology and behavior in human APP transgenic mice by mutation of Asp664. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103:7130-5. Epub
- Gao Y., Pimplikar SW: The gamma-secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:14979-14984
- Goldgaber D, Schwarzman AI, Bhasin R, Gregori L, Schmechel D, Saunders AM, Roses AD, Strittmatter WJ1993. Sequestration of amyloid beta-peptide. *Ann N Y Acad Sci.*;695:139-43

- Gunawardena S, Goldstein LS. (2001). Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron* 8;32(3):389-401
- Gutala RV, Reddy PH. (2004). The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains. *J Neurosci Methods*. 15;132(1):101-7
- Hardy. J (1992) An anatomical cascade hypothesis for Alzheimers disease. *Trends neurosci.* 15, 200-201
- Hardy J. (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 20:154.159
- Haass,C., Lemere,C.A., Capell,A., Citron,M., Seubert,P., Schenk,D., Lannfelt,L., and Selkoe,D.J. (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by betasecretase cleavage within the secretory pathway. *Nat. Med.* 1, 1291-1296
- Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C, Sisodia, S., Tremmel, P., Lipp, H.P., Wolfer, D.P., and Muller, U. (2006). Mice with comined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J.neurosci.* 20, 7951-7963
- Hebert, S. S., Serneels, L., Tolia, A., Craessaerts, K., Derks, C., Filippov, MA., Müller, U., De Strooper, B. (2006). Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *Embo reports* 7, 739-745
- Hoerendli, F., J., Toigo, M., Schild, A., Götz, J., Day, J. P. (2004). References genes identified in SH-SY5Y cells using custom-made gene arrays with validation by quantitative polymerase chain reaction. *Analytic Biochem.* 335 30-41
- Hung AY (1992) Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accomanied by secretory cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9439-9443

- Irizarry MC, Hyman BT. (2001) Alzheimer disease therapeutics. *J Neuropathol Exp Neurol*;60(10):923-8
- Ikezu, T., Trapp, B.D., Song, K.S., Schlegel, A. Lisante, M.P., Okamoto, T., 1998. Caveolae, plasma membrane microdomains for alpha-secretase mediated processing of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 273, 10485-19495
- Ikonen M, Liu B, Hashimoto Y, Ma L, Lee KW, Niikura T, Nishimoto I, Cohen P. (2003) Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28;100(22):13042-7
- Iwatsubo T (1994) Visualization of A beta 42 (43) and A beta 40 in senile Plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42 (43). *Neuron* 13; 45-53
- Jarrett JT, Berger EP, and Lansbury PT Jr. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implication for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32; 4693-4697
- Janus, C., Chishti, M. A., Westaway, D., (1999) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1502 (2000) 63-75
- Joachim, C.L., Morris, J.H., Selkoe, D.J., (1998) Diffuse senile plaques occur commonly in the cerebellum in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 135, 309-319
- Kang J, Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L. Grzeschik, K.H., Multhaupt, G, Beyreuther, K., Mullerhill, B. (1987) The precursor of Alzheimer-disease amyloid-A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736
- King, Gwendalyn D., Turner, Scott R. (2004) Adaptor protein interactions: modulators of amyloid precursor protein metabolism and Alzheimer's disease risk? *Experimental Neurology* 185, 208-219
- Kimberly WT, Zheng JB, Town T, Flavell RA, Selkoe DJ (2005). Physiological regulation of the beta-amyloid precursor protein signaling domain by c-Jun N-terminal kinase JNK3 during neuronal differentiation. *J Neurosci*, 25:5533-5543

- Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ (2001) The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. ,J. Biol Chem 276:40288-40292
- Kim,H.S., Kim,E.M., Lee,J.P., Park,C.H., Kim,S., Seo,J.H., Chang,K.A., Yu,E., Jeong,S.J., Chong,Y.H., and Suh,Y.H. (2003). C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3beta expression. FASEB J. 17, 1951-1953
- Koo, Edward H.,(2002) The beta-Amyloid Precursor Protein (APP) and Alzheimer's Disease: Does the tail Wag the Dog? Traffic 2002; 3:763-770 Blackwell Munksgard
- Koo, Edward H., Squazzo, S. L. (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. 1;269(26):17386-9
- Kopan R. Goate A. (2000) A common enzyme connects Notch signaling and Alzheimer's disease. Genes Dev 14:2799-2806
- Lai A.,Gibson, A., Hopkins, CR., Trowbridge, I.S. (1998). Signal-dependent trafficking of beta-amyloid precursor protein-transferrin receptor chimeras in Madin-Darby canine kidney cells. J. Biol. Chem. 273, 3732-3739
- Lamb BT, Sisodia SS, Lawler AM, Slunt HH, Kitt CA, Kearns WG, Pearson PL, Price DL, Gearhart JD (1993) Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice (corrected) (published erratum appears in Nat Genet 1993 nov; 5 (3) ; 312) Nat genet 1993, 5: 232-30
- Lee MS, Kao SC, Lemere CA, Xia W, Tseng HC, Zhou Y, Neve R, Ahljiyanian MK, Tsai LH (2003). APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. J Cell Biol, 163:83-95
- Leissring,M.A., Murphy,M.P., Mead,T.R., Akbari,Y., Sugarman,M.C., Jannatipour,M., Anliker,B., Muller,U., Saftig,P., De Strooper,B., Wolfe,M.S., Golde,T.E., and LaFerla,F.M. (2002). A physiologic signaling role for the gamma -secretase-derived intracellular fragment of APP. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99, 4697-4702

- Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Martinez A, Madrigal L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ, Arango JC. (1996) The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med.* (10):1146-50
- Levy E (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage. *Durch type. Science*; 248:1124-1126
- Lijima K., Ando K., Takeda S, Satoh Y, Seki T, Itohara S, Greengard P., Kirion Y, Nairn AC, Suzuki T (2000). Neuron-specific phosphorylation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein by cyclin-dependent kinase 5. *J. Neurochem.* 75:1085-1091
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. *Methods* 25, 402-408, (2001)
- Mandelkow, E.M., Schweers, O., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1996). Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 777, 96-106
- Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.*; 4(11):2757-63
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 13;95(21):12683-8
- Mirra, SS The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41, 479-486

- Minopoli, G., Zambrano, N., Russo, T. (2006). The cytosolic domain of APP and its possible role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *The Italian Journal of Biochemistry* Vol. 55 (3-4)
- Müller T, Concannon CG, Ward MW, Walsh CM, Tirniceriu AL, Tribl F, Kögel D, Prehn JH, Egensperger R. (2007). Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *Mol Biol Cell.*;18(1):201-10
- Müller, Thorsten. Dissertation in der Neuropathologie Münster (2005): "Die Funktion der intrazellulären Domäne des Amyloid Precursor Protein als transkriptionell aktive Domäne und Auslöser von ER-Stress: Implikationen für Morbus Alzheimer"
- Muresan z, Muresan V (2005). c-Jun NH2-terminal kinase interacting protein-3 facilitates phosphorylation and controls localization of amyloid-beta precursor protein. *J Neurosci*, 25:3741-3751
- Mustafa, W., Mustafa, A., Elbakri, N., Link, H., Adem, A. (2001) Reduced levels of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) suppress cellular signaling in experimental autoimmune sialadenitis (EAS). *J Recept Signal Transduct Res.*;21(1):47-54.
- Nakaya T, Suzuki T. (2006). Role of APP phosphorylation in FE65-dependent gene transactivation mediated by AICD *Genes Cells*; 11(6):633-45
- Nunan J, Williamson NA, Hill AF, Sernee MF, Masters CL, Small DH (2003). Proteasome-mediated degradation of the C-terminus of the Alzheimer's disease beta-amyloid protein precursor: effect of C-terminal truncation on production of beta-amyloid protein. *J Neurosci Res*. 1;74(3):378-85
- Nunan, J., Williamson, NA (2001) The C-terminal fragment of the Alzheimer's disease amyloid-precursor protein is degraded by proteasome-dependent mechanism distinct from gamma-secretase *Eur. J. Biochem.*, 268, 5329-5336
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. (2003) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.*;24(8):1063-70

- Oltersdorf T, Ward PJ, Henriksson T, Beattie EC, Neve R, Lieberburg I, and Fritz LC (1990) Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J Biol Chem* 265: 4492-4497
- Oster-Granite ML, McPhie DL, Greenan J, Neve RL (1996). Age-dependent neuronal and synaptic degeneration in mice transgenic for the C terminus of the amyloid precursor protein. *J Neurosci*, 16:6732-6741
- Pardossi-Piquard R, Dunys J, Yu G, St George-Hyslop P, Alves da Costa C, Checler F. (2006) Nephilysin activity and expression are controlled by nicastrin. *J Neurochem*. 97(4):1052-6. Epub 2006 Apr 5
- Piel, C. J., Wilson C., A., Lee, V., M., Klein, P., S. (2003) GSK-3 $\alpha$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 22;423(6938):435-9
- Ramelot TA, Nicholson LK (2001) Phosphorylation-induced structural changes in the amyloid precursor protein cytoplasmic tail detected by NMR. *J Mol Biol* 307: 871.884
- Rensink AA, Gellekink H, Otte-Höller I, ten Donkelaar HJ, de Waal RM, Verbeek MM, Kremer B. (2002). Expression of the cytokine leukemia inhibitory factor and proapoptotic insulin-like growth factor binding protein-3 in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*; 104(5):525-33. Epub 2002 Jul 20
- Russo, c., Salis, S., Dolcini V., Song, X.H., Teller, J.K., Schettini, G. (2001). Identification of amino-terminal fragments of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease and Down's Syndrome brain. *Neurobiol. Dis.* 8, 173-180
- Rosen DR A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2478-2482
- Rosen DR, Martin-Morris L, Luo LQ, White K(1998). A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2478-2482
- Ryan KA, Pimplikar SW (2005) Activation of GSK-3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. *J Cell Biol.*;171(2):327-335

- Sabo SI, Lkin AF, Buxbaum JD, Greengard P. (2001). The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and Fe65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol*, 153:1403-1414
- Salifero, O., Moreno-Flores, M.T. Wandosell, F, (2000). Increasing neurite outgrowth capacity of beta-amyloid precursor pretein proteoglycan in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res* . 60, 87-97
- Santiard-Baron D, Langui D, Delehedde M, Delatour B, Schombert B, Touchet N, Tremp G, Paul MF, Blanchard V, Sergeant N, Delacourte A, Duyckaerts C, Pradier L, Mercken L. (2005). Expression of human FE65 in amyloid precursor protein transgenic mice is associated with a reduction in beta-amyloid load. *J Neurochem.* ;93(2):330-8
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condrón, MM., Teplow, DB., and Haas, C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *Embo Rep.* 2, 835-841
- Saunders, A.M., Schmeider, K., Breitner, J.C., Benson, M.D., Brown, W.T., Goldfarb, L., Goldgaber, D., Manwaring, M.G., Szymanski, M.H., McCown, N. (1993). Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet* 342, 710-711
- Schellenberg GD (1992) Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258: 668-671
- Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A., and Kopan, R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393, 382-386
- Schubert, D., Jin, L.W., Saitoh, T., Cole, G., 1989. The regulation of amyloid-beta-protein-precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* 3, 689-694
- Sell C, Baserga R, Rubin R. (1995) Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res.* 15;55(2):303-6
- Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741-766

- Selkoe DJ (1988) Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110-135 kilodalton membrane-associated proteins in neuronal and nonneuronal tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7341-7345
- Selkoe D, Kopan R (2003) Notch and Presenilin: Regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26:565-597
- Slunt HH, Thinakaran G, Von Koch C, Lo ACY, Tanzi RE, and Sisodia SS., (1994) Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J. Biol Chem* 269: 2637-2644
- Smith RP (1990) Higuchi DA, and Broze GJ Jr. Platelet coagulation factor Xa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* 248; 1126-1128
- Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M. (2000). Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. *Ann N Y Acad Sci.* ;920:134-9
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 94(24):13287-92
- Tomita S (1998) A basic amino acid in the cytoplasmic domain of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein (APP) is essential for cleavage of APP at the alpha-site. *J. Biol. Chem.* 273, 19304-19310
- Tomita,S., Kirino,Y., and Suzuki,T (1998). A basic amino acid in the cytoplasmic domain of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein (APP) is essential for cleavage of APP at the alpha-site. *J. Biol. Chem.* 273, 19304-19310
- Tomita,S., Ozaki,T., Taru,H., Oguchi,S., Takeda,S., Yagi,Y., Sakiyama,S., Kirino,Y., and Suzuki,T (1999). Interaction of a neuron-specific protein containing PDZ domains with Alzheimer's amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 274, 2243-2254

- Thinakaran, G., Slunt, H.H., Sisodia, S.S. (1995) Novel regulation of chondroitin sulphate glycosaminoglycan modification of amyloid precursor protein and its homolog, APLP2. *J. Biol. Chem.* 270, 16522-16525
- Thinakaran, G., Teplow, D. B., Siman, R., Greenberg, B., Sisodia, S. S. (1996). Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the "beta-secretase" site occurs in the golgi apparatus. *J Biol Chem.*;271(16):9390-7
- Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J(1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 11;273(50):33556-60
- Von Rotz, R.C., Kohli, B.M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R.M., and Konietzko, U. (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J. Cell Sci.* 117, 4435-4448
- Wasco W, Paradis MD, Romano DM, Sisodia SS: Expression ubiquitous, cross-reactive homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta precursor protein (APP). *J. Biol Chem* 1994, 269: 2637-2644
- Wasco W (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
- Yoshikai, S., Sasaki H, doh-ura K, Furuya H., Sakaki Y (1990) Genomic organization of the human Amyloid Beta-Protein Precursor Gene. *Gene* 87, 257-263
- Yamazaki (1997) Cell surface amyloid beta protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neuronal cells. *J Neurosci.* 17 1004-1010
- Yamamoto, T. and Horikoshi, M. (1997). Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60. *J. Biol. Chem.* 272, 30595-30598
- Yang Z, Cool BH, Martin GM, Hu Q (2006). A dominant role for Fe65 (APBBI) in nuclear signaling. *J Biol Chem*, 281:4207-14

- Yanker BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL (1998). Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science*, 245: 417-420
- Yu, C., Kim, SH., Ikeuchi. T., Xu, H., Gasparini, L., L., Wang, R., and Sisodia, SS.: Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor pretein carboxyl-terminal fragment gamma. Evidence for distinct mechanisms involved in gamma-secretase processing of the APP and Notch1 transmembrane domains. *J Biol Chem*. 273, 20128-20133
- Zambrano N, Minopoli G, de Candida P, Russo T (1998) The Fe65 adaptor protein interacts through its PID1 domain with the transcription factor CP2/LSF/LBP1. *J Biol Chem* 273 (32): 20128-33
- Zheng Yang, Bethany H. Cool, George M. Martin, Qubai Hu A dominant role of Fe65 (ARBB1) in Nuclear Signaling. *J. Biol. Chem.* Vol 281, No.7, pp 4207-4214
- Zheng, H., Koo, E. H. (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular Neurodegeneration*, 1:5 doi: 10.1186/1750-1326-1-5

## DANKSAGUNG

---

Ich danke herzlich Prof. Dr. Walter Paulus und PD Dr. Rupert Egensperger, die es mir ermöglichten, diese Arbeit durchzuführen. Eine besondere Rolle spielte Dr. Anca-Laura Tirniceriu, die mich in die Welt der praktischen Wissenschaft im Labor einführte, Dr. Thorsten Müller – denn seine Arbeit hat erst die vorliegende ermöglicht, und Susanne Peetz-Dienhart. Auch die Mitarbeiter des Instituts für Neuropathologie in Münster haben ein angenehmes Arbeitsklima geschaffen und es hat Spaß gemacht, zusammen zu arbeiten. Für die Diskussionen und Unterstützung im Rahmen der statistischen Bearbeitung möchte ich Dr. Joachim Gerß danken. Dr. Martin Hasselblatt hat mich mit seinen fachkundlichen und aufbauenden Gesprächen bereichert und unterstützt. Für die kritische Durchsicht bedanke ich mich bei Dr. Edgar Pera.

Meiner Familie gilt ein besonderer Dank für ihre stete Unterstützung.

