

Biologie

Dissertationsthema

**Die Funktion der intrazellulären Domäne des Amyloid Precursor Proteins als  
transkriptionell aktive Domäne und Auslöser von ER-Stress:  
Implikationen für Morbus Alzheimer**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Thorsten Müller  
aus Hamm/Westf.  
2005

---

Dekan:	Prof. Dr. Alexander Steinbüchel
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Andreas W. Püschel
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Rupert Egensperger
Tag der mündlichen Prüfung:	01.07.2005
Tag der Promotion:	22.07.2005



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die neuropathologische Diagnose des Morbus Alzheimer	1
1.2	Genetik des Morbus Alzheimer	2
1.3	Die physiologische Funktion des Amyloid Precursor Proteins (APP)	4
1.4	Amyloidogene und nicht-amyloidogene APP Prozessierung	6
1.5	Lokalisation und Modulation der APP Prozessierung	8
1.6	Die intrazelluläre Domäne des APP	10
1.6.1	Domänen des AICD und ihre Bindungspartner	10
1.6.2	Lokalisation von AICD	12
1.6.3	Degradation von AICD	12
1.7	Hinweise auf AICD-vermittelte differentielle Genexpression	13
1.7.1	Homologie von AICD und NICD	13
1.7.2	FE65 als Adapterprotein für AICD	14
1.7.3	Modell der AICD abhängigen Genregulation	14
1.7.4	Potentiell AICD abhängig regulierte Gene	17
1.7.5	Modulation der AICD abhängigen differentiellen Genexpression	19
1.8	AICD vermittelte Apoptose bei Morbus Alzheimer	20
1.9	Zielsetzung der Arbeit	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.2	Materialien	24
2.2.1	Verwendete Geräte	24
2.2.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	24
2.2.3	Medien für Bakterienkulturen	25
2.2.4	Bakterienstämme	25
2.2.5	Zellkulturmaterial und Zellkulturzusätze	26

---

2.2.6	Zelllinien	26
2.2.7	Vektoren	27
2.2.8	Oligonukleotide	28
2.2.9	Lösungen/Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten	30
2.2.10	Lösungen für biochemische Arbeiten	31
2.2.11	Antikörper	33
2.2.11.1	Primär-Antikörper	33
2.2.11.2	Sekundär-Antikörper	33
2.2.12	Enzyme	34
2.2.13	Verwendete Kits	34
2.2.14	Verwendete Software	34
2.3	Methoden	34
2.3.1	Zellbiologische Arbeiten/Zellkultur	34
2.3.1.1	Humane Zelllinien	35
2.3.1.1.1	Trypsinierung und Subkultivierung von adhärent wachsenden Zellen	35
2.3.1.1.2	Bestimmung der Zellzahl	35
2.3.1.1.3	Langzeit-Aufbewahrung der Zellen	35
2.3.1.1.4	Auftauen von tiefgefrorenen Zellen	36
2.3.1.2	Hippocampale Primärzellkulturen der Maus	36
2.3.1.3	Transfektion von Zellen und primärer hippocampaler Kulturen	37
2.3.1.4	Etablierung stabiler Zelllinien	37
2.3.1.5	Induktion von ER Stress und Apoptose	38
2.3.1.6	Nachweis von Apoptose	38
2.3.1.6.1	Caspase-3 Aktivitätsmessung (Caspase-Assay)	38
2.3.1.6.2	Hoechst 33342 Färbung	39
2.3.2	DNA-Arbeitstechniken	39
2.3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse	39
2.3.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	39
2.3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und RT-PCR	39
2.3.2.4	Real-time PCR	40
2.3.2.5	DNA-Restriktionsverdau	43
2.3.2.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	43
2.3.2.7	Phenol-Chloroform Extraktion von DNA	43
2.3.2.8	Präzipitation und Aufreinigung von DNA aus wässrigen Lösungen	43

---

2.3.3	Analytische Methoden	44
2.3.3.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
2.3.3.2	DNA Gelelektrophorese	44
2.3.3.3	DNA- Sequenzierung	44
2.3.4	Klonierungstechniken	44
2.3.4.1	Dephosphorylierung von DNA	44
2.3.4.2	Ligation von DNA- Fragmenten	44
2.3.4.3	Kultivierung von Bakterien	45
2.3.4.4	Herstellung kompetenter Bakterien für die Hitzeschocktransformation	45
2.3.4.5	Hitzeschock- Transformation	45
2.3.4.6	Übersicht über die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen	46
2.3.5	RNA Arbeitstechniken	49
2.3.5.1	Isolierung von Gesamt-RNA und cDNA Synthese	49
2.3.5.2	RNA- Gelelektrophorese	49
2.3.6	Analyse von Proteinen	50
2.3.6.1	Gesamtzellextraktion	50
2.3.6.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	50
2.3.6.3	Immunpräzipitation	50
2.3.6.4	Western-Analytik	51
2.3.6.4.1	SDS-PAGE	51
2.3.6.4.2	Tris Tricine Gele	51
2.3.6.5	Westernblot	51
2.3.6.6	Immundetektion von Proteinen	52
2.3.6.7	Antikörperentfernung von Nitrocellulosemembranen (stripping)	52
2.3.7	Immunfluoreszenzanalysen	52
2.3.8	Immunhistologie	53
2.3.9	Reportergen Experiment	54
2.3.10	GeneChip Analyse (Affymetrix Technologie)	54
2.3.10.1	Herstellung von T7-Promotor enthaltender cDNA	56
2.3.10.2	Herstellung Biotin-markierter cRNA	56
2.3.10.3	Hybridisierung und Waschen der GeneChips	56
2.3.10.4	Scannen des GeneChips	57
2.3.11	Auswertung der Affymetrix GeneChips	57

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
3.1	Analyse potentiell AICD vermittelter Apoptose	61
3.2	Etablierung stabiler Zelllinien	64
3.2.1	Humane Neuroblastom-Zelllinien als Empfänger-Zelllinie	64
3.2.1.1	Endogene Expressionslevel der am AICD Transkriptionskomplex beteiligten Proteine FE65 und TIP60	64
3.2.1.2	Absterbekinetik der humanen Neuroblastom-Zelllinie SHEP-SF	65
3.2.2	Konstitutiv AICD exprimierende Zelllinien	67
3.2.2.1	AICD-EGFP und EGFP-AICD Fusionszelllinien – Zelluläre AICD Lokalisation	67
3.2.2.2	AICD-IRES-EGFP Zelllinien	68
3.2.2.2.1	AICD Expression in AICD-IRES-EGFP Zelllinien	69
3.2.2.2.2	Analyse AICD abhängig regulierter Gene	70
3.2.2.2.3	AICD erzeugt ER-Stress und Apoptose unabhängig von einer SERCA2B Expressionsänderung in konstitutiv AICD exprimierenden Zelllinien	71
3.2.3	Induzierbare Zelllinien	74
3.2.3.1	Zeitabhängiger Induktionsverlauf stabiler Linien	79
3.2.3.2	Analyse ektopisch exprimierter Gene	80
3.2.3.3	Analyse potentiell AICD abhängig regulierter Gene	82
3.2.3.4	AICD erzeugt ER-Stress und Apoptose unabhängig von einer SERCA2B Expressionsänderung in induzierbar AICD exprimierenden Zelllinien	83
3.2.3.5	AICD abhängig differentiell regulierte Gene in humanen Neuroblastom-Zelllinien	85
3.2.3.6	Real-time PCR Analyse ausgewählter Kandidatengene	94
3.2.3.7	Mechanismen am Clusterin (CLU) Promotor vermitteln dessen AICD abhängige differentielle Genexpression	97
3.3	Potentiell AICD abhängig regulierte Gene sind in humanem cerebralen Gewebe von Morbus Alzheimer Patienten gegenüber Kontrollen differentiell reguliert	98
3.4	Immunhistologische Färbung AICD abhängig regulierter Gene	101
3.5	Variabilität der FE65 Expression in humanem Autopsiegewebe	102
3.6	Potentiell AICD abhängig regulierte Gene als Dendogramm sortiert nach GeneOntology Kriterien	102

---

3.7	Signalweg-Analyse potentiell AICD abhängig regulierter Gene	105
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>107</b>
4.1	AICD ist ein nukleär lokalisiertes Protein	108
4.2	Funktionalität des Zellkulturmodells	108
4.3	AICD induziert ER Stress und Apoptose in humanen Neuroblastom-Zelllinien	112
4.4	AICD abhängig regulierte Kandidatengene	115
4.4.1	Apoptose relevante Gene	115
4.4.1.1	Insulin-growth-factor binding protein 3 (IGFBP3)	115
4.4.1.2	Clusterin (CLU)	116
4.4.1.3	Prostate apoptosis response protein 4 (PRKC)	117
4.4.1.4	Neuregulin 1 (NRG1)	118
4.4.2	Gene des Aktinzytoskeletts	120
4.4.2.1	Tropomyosin 1 (TPM1)	120
4.4.2.2	Transgelin (TAGLN)	120
4.4.2.3	Actin alpha 2 (ACTA2)	120
4.4.3	Transportergene	121
4.4.4	Sonstige Gene	121
4.4.5	AICD abhängig regulierte Gene sind in die Modulation von Calcium Konzentrationen und Apoptose involviert	123
4.5	Signalweganalyse	125
4.6	Hypothetisches Modell der AICD abhängigen Genregulation	128
4.7	Ausblick	130
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>133</b>
<b>6</b>	<b>Referenzen</b>	<b>135</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>149</b>
<b>Anhang</b>		<b>151</b>

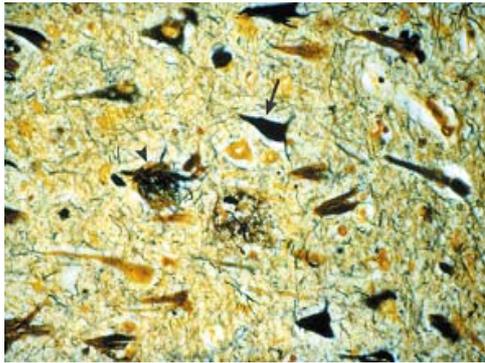
## **1 Einleitung**

„Wenn Sie etwas weniger Schwung in meinem Gang sehen, wenn mir Ihr Name nicht mehr über die Lippen kommt, dann wissen Sie warum. Und wenn ich Ihnen eine lustige Geschichte zum zweiten Mal erzähle, dann lachen Sie bitte trotzdem.“ Damit verabschiedete sich der an Alzheimer erkrankte Schauspieler Charlton Heston von der Öffentlichkeit. Der Zaubergeiger Helmut Zacharias hatte zum Schluss keine Ahnung mehr, wer er selbst war. In Deutschland machen derzeit rund eine Million Menschen eine Reise in diese Dunkelheit. Sie vergessen schleichend, verlieren nach und nach ihr Gedächtnis, Urteilsvermögen und zum Schluss auch ihre Persönlichkeit. Sie leiden unter bizarren Stimmungsschwankungen, von aggressiv bis deprimiert, sind verwirrt, ängstlich, unruhig. Welches Ausmaß die Erkrankung bereits erreicht hat, lässt sich an nüchternen Zahlen verdeutlichen. Im Jahre 2050 werden etwa 14 Millionen Menschen allein in den USA an Morbus Alzheimer leiden, wie dem „Progress Report on Alzheimer’s Disease“ der National Institutes of Health zu entnehmen ist.

Morbus Alzheimer ist eine altersabhängige, irreversible Erkrankung des Gehirns, die meist mit einer schwachen Vergesslichkeit beginnt und bis zum vollständigen Verlust wichtiger mentaler Funktionen führen kann. Änderungen im Verhalten und der Persönlichkeit gehen mit diesem Verlust einher.

### **1.1 Die neuropathologische Diagnose des Morbus Alzheimer**

Die Alzheimer Krankheit wurde erstmals 1907 von dem deutschen Arzt Alois Alzheimer im Zusammenhang mit dem klinischen Bild einer Demenz beschrieben (Alzheimer, 1907). Alzheimer fand die typischen histopathologischen Elemente, zahlreiche Plaques und ausgeprägte Neurofibrillen-Veränderungen in Hippocampus und Isokortex im Gehirn einer Patientin. Neben der makroskopisch sichtbaren Hirnatrophie gelten diese morphologischen Charakteristika auch heute noch als wegweisend für die neuropathologische Diagnose des Morbus Alzheimer (Khachaturian, 1985).



**Abbildung 1 – Charakteristische Ablagerungen in cerebralem Gewebe von Alzheimer Gehirnen.** Die histologische Analyse eines an Morbus Alzheimer verstorbenen Patienten zeigt zwei verschiedene Arten von Ablagerungen: Extrazelluläre  $\beta$ A4-Ablagerungen (gelb (Immunhistologische Färbung)) und „Neurofibrilläre Tangles“ (schwarz (Silberfärbung), Pfeil) (aus (Mattson, 2000)).

Wesentlicher Bestandteil der senilen Plaques ist das 4 kDa große Amyloid  $\beta$ -Protein ( $\beta$ A4), das nach Aggregation zu Fibrillen als Amyloid-Plaque imponiert (Abbildung 1). Diese Ablagerungen sind in der Regel extrazellulär. Die Ablagerung im Hirnparenchym erfolgt je nach Aggregationsform des  $\beta$ A4 als diffuse (amorphe) oder neuritische Plaques. Diffuse Plaques stellen die frühesten erkennbaren Veränderungen, neuritische Plaques hingegen fortgeschrittene Stadien dar (Dickson, 1997).

Das zweite histopathologische Merkmal in Gehirnen von Alzheimer-Patienten sind Ansammlungen von Neurofibrillenbündeln oder „Neurofibrillären Tangles“ (NFT).

Das Substrat der NFT sind „paired helical filaments“, die aufgrund einer abnormalen Phosphorylierung des Proteins TAU entstehen. Von Braak und Braak (Braak and Braak, 1991) zeigten, dass die Neurofibrillen-Pathologie im Gegensatz zur relativ unsystematischen Verteilung der Amyloid-Plaques einem stereotypen Muster mit einer konstanten hierarchischen Ausbreitung folgt. Nach dem Muster der befallenen Areale gibt eine Stadieneinteilung den Schweregrad der Neurofibrillen-Pathologie an, wobei die jeweiligen Stadien gut mit dem Ausmaß der Demenz korrelieren. Die ersten Nervenzellen mit NFT treten zunächst im transentorhinalen Kortex (Stadium I-II), später im gesamten entorhinalen Kortex, dem Ammonshorn und anderen limbischen Strukturen (Stadium III-IV) und zuletzt im gesamten isokortikalen Assoziationskortex (Stadium V-VI) auf, wobei die ersten NFT bereits 20 Jahre vor Beginn der klinischen Symptomatik auftreten sollen. Von Bedeutung ist dabei, dass die Stadien I-II meist klinisch asymptomatisch bleiben (präklinisches Stadium), bei den Stadien III-IV kann, muss aber nicht zwingend eine Demenz bestehen, während Patienten mit den Stadien V-VI immer dement sind (Baner et al., 1993).

## 1.2 Genetik des Morbus Alzheimer

Zieht man die Veröffentlichungen der letzten Jahre heran, so zeichnen sich zwei Hauptforschungszweige entsprechend den beiden in Absatz 1 beschriebenen Formen von „Ablagerungen“ ab. Ein Teil der Grundlagenforschung untersucht das Protein TAU, ein Mikrotubuli assoziiertes Protein (MAPT), das in Neuronen exprimiert wird und

normalerweise zur Stabilität der Mikrotubuli, die wiederum für Transportvorgänge der Zelle notwendig sind, beiträgt (Mandelkow et al., 1996). Dieses Protein wird bei der Alzheimer Krankheit hyperphosphoryliert und initiiert die Bildung von so genannten "paired helical filaments" (PHF) aus denen wiederum „Neurofibrilläre Tangles“ (NFT) entstehen können.

Der zweite große Forschungszweig befasst sich mit dem Amyloid Precursor Protein (APP), einem Typ-1 Transmembranprotein, das 1987 identifiziert wurde und auf Chromosom 21 lokalisiert ist. Die Vermutung, dass auf Chromosom 21 ein „Alzheimer-Gen“ liegt, hatte man schon länger, denn Patienten, die an Trisomie 21 leiden, entwickeln fast ausnahmslos ab dem vierzigsten Lebensjahr Alzheimersche Veränderungen im Gehirn. Durch genetische Kopplungsuntersuchungen entdeckte man schließlich das auf diesem Chromosom liegende APP (Heston et al., 1991). Daneben wurden als weitere autosomal dominant vererbte Gendefekte Mutationen in den Genen Presenilin 1 und Presenilin 2 identifiziert (Sherrington et al., 1995; Barinaga, 1995). Diese Formen des vererbaren Morbus Alzheimer betreffen nur ca. 2-3 % aller Patienten. Bei der überwiegenden Zahl aller Alzheimer-Patienten findet man dagegen kein eindeutiges Vererbungsmuster. Zwar tritt eine gewisse familiäre Häufung auf, die jedoch keinem klassischen Mendelschen Erbgang folgt. Für diese sporadischen Alzheimer-Fälle konnte 1993 mit dem Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 Allel erstmals ein genetischer Risikofaktor gefunden werden (Strittmatter et al., 1993; Saunders et al., 1993), der zwar das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken erhöht, aber entgegen den autosomal dominant vererbten Gendefekten nicht deterministisch wirkt.

Für die vorliegende Arbeit ist der APP Forschungszweig von zentraler Bedeutung, so dass auf die physiologische bzw. pathophysiologische Funktion des APP im Rahmen dieser Einleitung genauer eingegangen wird.

APP wird ubiquitär in verschiedenen Isoformen exprimiert, die durch alternatives Spleißen eines 19-Exon enthaltenden Gens (Exon 1-13, 13a, 14-18) zustande kommen. In neuronalen Zellen wird APP in der 695 Aminosäuren langen Isoform (Isoform c; NP\_958817; Exon 1-6, 9-18, nicht 13a) exprimiert, in allen anderen Geweben in der längeren 751 (Isoform b; NP\_958816; Exon 1-7, 9-18, nicht 13a) bzw. 770 (Isoform a; NP\_000475; Exon 1-18, nicht 13a) Aminosäuren langen Isoform (Yoshikai et al., 1990). Diese Unterschiede korrespondieren also mit dem Vorhandensein oder Fehlen der Exons 7 und/oder 8. In Isoformen mit Exon 7 ist eine Kunitz-Inhibitor-Domäne enthalten, während Exon 8 für eine MRC OX2 Antigen-Homologie codiert.

APP ist ein Mitglied einer evolutionär konservierten Proteinfamilie, zu der auch die Homologen Amyloid Precursor like Proteine 1 und 2 (APLP1 und APLP2) gehören. Alle drei

Proteine haben Aminosäuren- und Domänen-Homologie mit der Ausnahme, dass APLP1 und APLP2 keine A $\beta$ -Domäne besitzen. Die Entstehung von A $\beta$  infolge amyloidogener Prozessierung von APP galt lange Zeit als das zentrale pathophysiologische Kennzeichen von Morbus Alzheimer. Heute spekuliert man, dass auch andere APP Spaltprodukte zur Pathophysiologie beitragen können (s. dazu 1.4).

### **1.3 Die physiologische Funktion des Amyloid Precursor Proteins (APP)**

Bis heute gibt es keine hinreichenden Erkenntnisse über eine physiologische Funktion des Amyloid Precursor Proteins. Einige zum Teil sehr grundlegende potentiell APP abhängige Mechanismen wurden vorgeschlagen und sind Bestandteil aktueller Forschung.

#### **APP ist essentiell für die Entwicklung des Nervensystems.**

Der vielleicht interessanteste Hinweis auf die physiologische Funktion des APP stammt aus der Analyse von Mausmodellen. Studien an "knock-out" Mäusen zeigten, dass ein Ausschalten eines der Gene APP, APLP1 oder APLP2 zwar nur geringe neurologische Abnormalitäten gegenüber Wildtyp-Geschwistertieren verursacht, Doppel-, "knock-out" Tiere, bei denen dagegen APP und APLP2 oder APLP1 und APLP2 ausgeschaltet wurde, aber bereits früh nach der Geburt sterben, während APP und APLP1 „knock-out“ Tiere vital waren. Allerdings konnten keine histologischen Abnormalitäten in Organen (auch nicht im Gehirn) festgestellt werden. Trotzdem lässt dies auf eine essentielle Funktion von APP und seiner Homologen für die Entwicklung schließen (Heber et al., 2000; von Koch et al., 1997; Dawson et al., 1999). Mäuse, denen sämtliche APP Familienmitglieder fehlten, wurden kürzlich generiert und zeigten eine sehr frühe Letalität. Diese Mäuse offenbarten kortikale Fehlbildungen, darunter Lissenzephalie und neuronale Migrationsdefizite (Herms et al., 2004). Die Analyse dieser Gehirn-Abnormalitäten spezifizierte die Rolle von APP für die Entwicklung des Nervensystems hinsichtlich einer Funktion bei der Adhäsion und Signaltransduktion.

#### **APP besitzt physiologische Funktion bei Adhäsion, Signaltransduktion und Migration.**

Die Hypothese, dass APP bei der zellulären Adhäsion eine wichtige Funktion besitzt, wird dadurch gestützt, dass APP zum einen mit Adhäsionsproteinen wie Integrinen auf der Zelloberfläche von Axonen kolokalisiert, zum anderen dadurch, dass APP mit extrazellulären Matrixmolekülen wie Laminin interagieren kann (Storey et al., 1996; Fossgreen et al., 1998). Weiterführende funktionelle Zusammenhänge sind jedoch noch nicht bekannt.

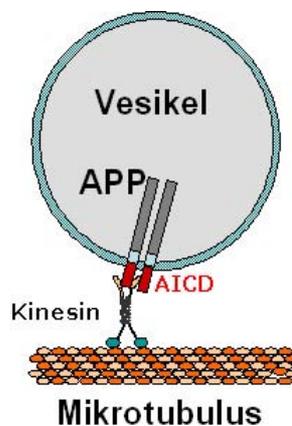
Dass die APP Familie für die Signaltransduktion, insbesondere im Zusammenhang mit neuronaler Migration, von großer Bedeutung ist, wird dadurch deutlich, dass es eine Fülle von neuronalen Proteinen gibt, die mit APP interagieren und mit Prozessen der Signalweiterleitung in Verbindung stehen, darunter Dab1, FE65 und X11/Mint1 (McLoughlin and Miller, 1996). So zeigen z.B. Dab1-defiziente Mäuse auffällige Störungen der neuronalen Migration ähnlich wie bei „reeler Mäusen“, einem klassischen Modell der unterbrochenen zellulären Organisation im Gehirn infolge des Fehlens von Reelin (Rice and Curran, 2001).

Darüber hinaus moduliert APP die Migration von Zellen. Sabo et al. (Sabo et al., 2001) zeigten dies nach Transfektion von APP in MDCK Zellen. Sie erklärten den Einfluss auf die Migration über die Bindung von APP an das Adapterprotein FE65, welches selbst wiederum an das Protein Mena bindet. Mena ist in den Umbau des Aktin Zytoskeletts involviert und kann so Einfluss auf die Migration der Zelle ausüben.

### **APP als essentielles Protein für den axonalen Transport.**

APP wird außerdem eine physiologische Funktion beim axonalen Transport in Neuronen zugeschrieben (Abbildung 2). Das Protein wird über den schnellen axonalen Transport anterograd zu den Nervenendigungen

transportiert, was sowohl in *in vitro* wie in *in vivo* Studien gezeigt wurde (Koo et al., 1990). APP fungiert dabei als Bindeglied zwischen dem Motorprotein Kinesin (KIF5) und Transportvesikeln (Kamal et al., 2001). Die Bindung an die leichte Kette des Kinesin erfolgt direkt



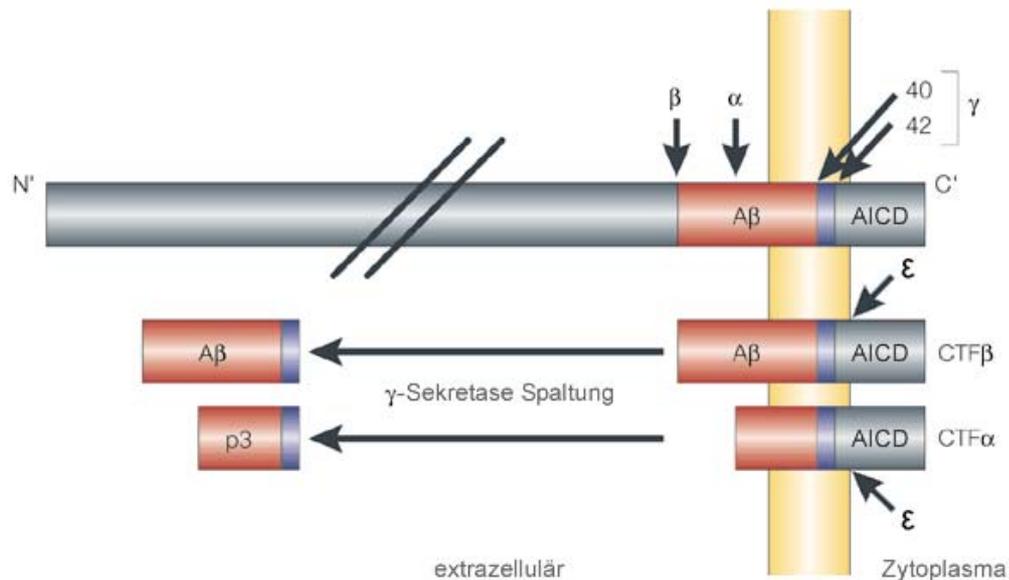
**Abbildung 2 - APP als Adapterprotein beim schnellen axonalen Transport.** Als Transmembranprotein ist APP in Vesikel integriert und fungiert so als Bindepotein zwischen dem zu transportierenden Vesikel und dem an Mikrotubuli gebundenen Kinesin, an dessen leichte Untereinheit es über seine intrazelluläre Domäne (AICD) bindet.

(Kamal et al., 2000) oder über Adaptoren wie z.B. Jip-1 (Inomata et al., 2003; Matsuda et al., 2001; Matsuda et al., 2003; Scheinfeld et al., 2002). Dieser APP abhängige Transport sowie der anschließende Transport von APP zu präsynaptischen Nervenendigungen konnte im optischen Nerv der Ratte demonstriert werden (Morin et al., 1993). In APPL (APPL ist das *Drosophila* Homolog von APP) überexprimierenden Fliegen konnte man eine Störung des axonalen Transports zeigen. APP könnte daher eine Funktion als Kinesin Frachtrezeptor besitzen und so für den Transport von Vesikeln und ihrer enthaltenen Proteine notwendig sein (Gunawardena and Goldstein, 2001). Auch im Rahmen des schnellen axonalen Transports

kann APP durch verschiedene Enzyme prozessiert werden. Die wichtigsten APP Prozessierungen sind im Folgenden beschrieben.

#### 1.4 Amyloidogene und nicht-amyloidogene APP Prozessierung

Die proteolytische Prozessierung von APP lässt sich in zwei Wege einteilen, deren Produkte sich in ihrer Funktion unterscheiden: Neuroprotektion oder Neurotoxizität (Abbildung 3).



**Abbildung 3 - Amyloidogene und nicht amyloidogene Prozessierung von APP.** Durch die Aktivität der  $\beta$ -Sekretase wird APP in der amyloidogenen Prozessierung extrazellulär gespalten. Der verbleibende C-terminale Rest CTF $\beta$  (oder C99) wird anschließend durch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex an der  $\gamma$ -Schnittstelle prozessiert. Letztere Spaltung ist an 2 verschiedenen Aminosäuren möglich (Position 40 oder 42 gerechnet von der  $\beta$ -Sekretase Schnittstelle), so dass entweder A $\beta$ 40 oder A $\beta$ 42 entsteht. Darüber hinaus kann der gleiche  $\gamma$ -Sekretase Komplex das verbleibende C-terminale Peptid (AICD59 oder AICD57) an der  $\epsilon$ -Schnittstelle prozessieren, die gerade noch in der Membrandomäne liegt. Nach dieser Spaltung könnte die intrazelluläre Domäne (AICD50) in das Zytoplasma freigesetzt werden. In der nicht-amyloidogenen Prozessierung wird APP durch die  $\alpha$ -Sekretase gespalten, so dass ein N-terminales Fragment und CTF $\alpha$  entstehen. Auch CTF $\alpha$  kann durch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex an der  $\gamma$ -Schnittstelle prozessiert werden. Es entstehen p3 und AICD59 oder AICD57. Ob AICD auch im Rahmen der nicht-amyloidogenen Prozessierung durch die  $\gamma$ -Sekretase an der  $\epsilon$ -Schnittstelle prozessiert werden kann, ist unklar (aus (Steiner and Haass, 2000); modifiziert).

Bei der sogenannten nicht amyloidogenen Prozessierung wird APP durch die  $\alpha$ -Sekretase nach Lys612 extrazellulär gespalten. Diese Sekretase-Aktivität wird durch drei Proteine (TACE (ADAM-17), ADAM-10 und ADAM-9) bewirkt, die alle eine „A-disintegrin und Metalloproteinase-Domäne“ (ADAM) enthalten und damit zu den Zelloberflächenproteinen gehören, die in Prozesse zellulärer Adhäsion und Proteolyse involviert sein können (Kojro and Fahrenholz, 2005). Dem bei dieser Prozessierung gebildeten 90 kDa großen löslichen in

der Regel extrazellulären Fragment (sAPP $\alpha$ ) wird eine neuroprotektive Funktion zugesprochen (Guo et al., 1998b; Turner et al., 2003).

Das verbleibende C-terminale Fragment dieser Spaltung (CTF $\alpha$ ) kann daraufhin durch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex gespalten werden, so dass p3 und AICD59 (APP Intracellular domain; auch CTF $\gamma$  oder AID bezeichnet) bzw. AICD57 entstehen (Selkoe, 2001). Ob die AICD Isoformen in der Folge durch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex auch an der  $\epsilon$ -Schnittstelle prozessiert werden, so dass AICD50 entsteht, ist unbekannt.

Gegenüber der nicht-amyloidogenen steht die pathophysiologische Prozessierung des APP, die für Morbus Alzheimer von zentraler Bedeutung ist, da sie unmittelbar zur Entstehung von Amyloidplaques beitragen kann. Diese Spaltung setzt sich aus zwei sukzessiven Schritten zusammen. APP unterliegt zunächst der Spaltung durch das Enzym  $\beta$ -Sekretase (BACE, „ $\beta$ APP cleaving enzyme“), einer Aspartyl-Protease, die APP in der extrazellulären Domäne nach Met596 spaltet (Marlow et al., 2003). Es entsteht das lösliche Fragment sAPP $\beta$  und ein C-terminales 99 Aminosäuren langes Fragment, welches von dem  $\gamma$ -Sekretase Komplex weiter prozessiert werden kann. Als Resultat entstehen  $\beta$ A4 und die APP Intrazelluläre Domäne AICD. Die  $\gamma$ -Sekretase schneidet APP innerhalb der Membran - eine Reaktion, die auch als „regulierte Intramembran-Proteolyse“ (RIP) bezeichnet wird und die das Zusammenspiel eines Multiproteinkomplexes aus Presenilin 1 und 2, Nicastrin, PEN-2 und APH-1 erfordert (De Strooper, 2003). Die Spaltung von APP durch die  $\gamma$ -Sekretase erfolgt an Val636 oder Ala638, so dass entweder A $\beta$ 40 oder A $\beta$ 42 und das zugehörige intrazelluläre Fragment (AICD59 oder AICD57) entstehen. Dergleiche  $\gamma$ -Sekretase Komplex spaltet nach ähnlichem Muster der regulierten intrazellulären Proteolyse analog auch Notch, APLP1 und 2, Erb-B4, E-Cadherin, LRP, Nectin1, Delta und Jagged (Walsh et al., 2003). Insbesondere die Homologie der APP Prozessierung zur Notch Spaltung wird an späterer Stelle noch diskutiert werden.

Das nach amyloidogener APP Prozessierung entstehende A $\beta$  diffundiert in die extrazelluläre Matrix und kann dort zunächst zu Protofibrillen mit einem Durchmesser von bis zu 5 nm und einer Länge von 200 nm aggregieren, um so den Kern eines Amyloidplaques zu bilden. Durch vermehrte A $\beta$  Ablagerung entstehen schließlich die Amyloidplaques - ein Hauptcharakteristikum im Gehirn von Alzheimer Patienten (Hardy and Selkoe, 2002).

Erst in den letzten Jahren wurde dem ebenfalls bei der  $\gamma$ -Sekretase Spaltung des APP neben A $\beta$  entstehenden C-terminalen Fragment (AICD) zunehmend Aufmerksamkeit geschenkt. Interessanterweise konnte man feststellen, dass durch die Aktivität dergleichen Sekretase an der  $\epsilon$ -Schnittstelle dieses Fragment zu AICD50 weiter prozessiert werden kann (Sastre et al.,

2001; Yu et al., 2001). Da die  $\epsilon$ -Schnittstelle am C-terminalen Ende der Transmembrandomäne des APP liegt, ist anzunehmen, dass AICD durch diese Prozessierung in das Zytosol freigesetzt werden könnte. Dies ist jedoch Bestandteil aktueller Forschung und wird durch die Tatsache erschwert, dass AICD zum einen sehr klein und damit schwer nachweisbar sowie auch schnell abgebaut werden kann (Nunan et al., 2003).

Die für die vorliegende Arbeit im Vordergrund stehende Intrazelluläre Domäne des Amyloid Precursor Proteins (AICD) wird in 1.6 genauer beschrieben, zunächst soll jedoch betrachtet werden, welche Faktoren die Prozessierung von APP beeinflussen können.

### **1.5 Lokalisation und Modulation der APP Prozessierung**

Das Amyloid Precursor Protein kann - wie beschrieben - verschiedenartig prozessiert werden. Das Resultat dieser Spaltungen kann protektiven oder toxischen Charakter aufweisen (Selkoe, 2001). Nach derzeitigem Wissen ist der „Lebensweg“ dieses Proteins wie folgt zu beschreiben.

Synthetisiert im ER durchläuft APP den Golgi Apparat und wird dort O- und N- glykosyliert (Selkoe, 1994). Vom Golgi Apparat abgeschnürte APP enthaltene Vesikel translozieren entweder direkt zur Zellmembran oder werden insbesondere in Neuronen über den schnellen axonalen Transport zu den präsynaptischen Nervenendigungen transportiert. Als Transmembranprotein kann APP über Clathrin vermittelte Endozytose reinternalisiert und innerhalb des Endosomen/Lysosomen Signalwegs degradiert werden (Golde et al., 1992).

Die APP Prozessierung ist an verschiedenen Stationen dieses „Lebensweges“ möglich. Selkoe (Selkoe, 2001) beschrieb, dass APP während des sekretorischen Signalwegs, vorwiegend im ER und Golgi-Apparat, prozessiert werden kann. Dies zeigten Versuche, bei denen man Preseniline insbesondere im ER finden konnte (Cook et al., 1996) sowie Versuche, bei denen man das Plasmamembran SNARE Protein Syntaxin 1A, welches die Golgi Exozytose aber nicht trans-Golgi Signalwege inhibiert, transfizierte und feststellte, dass APP trotzdem prozessiert wurde (Khvotchev and Sudhof, 2004). Die Freisetzung von AICD scheint hingegen erst stattzufinden, wenn APP bzw. seine  $\beta$ - oder  $\alpha$ -Spaltprodukte das ER verlassen haben (Bergman et al., 2003).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass APP nicht nur während des sekretorischen Signalwegs sondern auch während des axonalen Transports einer Prozessierung unterliegen kann (Kamal et al., 2000; Muller and Kins, 2002). Amaratunga et al. (Amaratunga and Fine, 1995) beschrieben, dass während dieses Transports eine signifikante APP Spaltung stattfindet, bei dem amyloidogene C-terminale Fragmente entstehen, bevor APP die Nervenendigungen erreicht. Auch Morin et al. (Morin et al., 1993) beschrieben, dass der axonale Transport der

zelluläre Mechanismus ist, bei dem A $\beta$  entsteht und in extrazelluläre Kompartimente freigesetzt werden kann.

### **1. APP bindende Proteine beeinflussen dessen Prozessierung**

APP besitzt zahlreiche Interaktionspartner, von denen das Adapterprotein FE65 zu den wichtigsten zählt, da es insgesamt drei Bindungsdomänen für verschiedene Proteine besitzt und daher für Signalweiterleitungs-Mechanismen prädestiniert ist. FE65 und seine Homologen binden an die zytoplasmatische Domäne des APP (AICD).

Ando et al. (Ando et al., 2001) beschrieben, dass FE65 Überexpression die amyloidogene Prozessierung von APP fördern kann. Dem widerspricht jedoch eine kürzlich veröffentlichte Studie, in der gezeigt werden konnte, dass APP/FE65 doppelt-transgene Mäuse (Thy-1 APP<sub>751</sub>SL/Thy-1 hFE65) weniger Amyloid-Plaques aufwiesen als APP transgene Mäuse (Santiard-Baron et al., 2005). Die Diskrepanz dieser Ergebnisse ist bislang nicht erklärt und bedarf daher weiterer Forschung. Chang et al. (Chang et al., 2003) zeigten, dass die Überexpression des FE65 Homologen FE65L1 (FE65 like 1) ebenfalls die Prozessierung von APP zu A $\beta$  und AICD fördert. Man vermutet generell, dass Mitglieder der FE65 Proteinfamilie die Prozessierung von APP beeinflussen, indem sie die Lokalisation dieses Proteins bzw. Mechanismen in dessen Sekretionsweg ändern.

Mittels des Adapterproteins FE65 kann APP mit anderen Proteinen interagieren, so z.B. mit LRP (Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein). Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch LRP die Prozessierung von APP beeinflussen kann (Pietrzik et al., 2002; Pietrzik et al., 2004). Es ist daher nicht auszuschließen, dass noch eine Reihe anderer bislang nicht bekannter Interaktionspartner die Prozessierung von APP beeinflussen können.

Araki et al. untersuchten ein anderes mit der zytoplasmatischen Domäne von APP interagierendes Protein, X11L (X11 like). Über X11L kann APP mit den Alcadein Proteinen interagieren. Es wurde beschrieben, dass ein Dreifachkomplex aus APP-X11L-Alcadein die Spaltung von APP inhibieren und so auch die A $\beta$  Bildung verringern kann. Auch Alcadeine können  $\gamma$ -Sekretase abhängig gespalten werden, so dass entsprechende intrazelluläre Domänen entstehen (Araki et al., 2004).

Darüber hinaus konnte auch ein potentieller extrazellulärer APP Ligand identifiziert werden. F-Spondin, ein sekretiertes Signalmolekül, das wie APP auch für die neuronale Entwicklung wichtig ist, bindet an die zentrale extrazelluläre Domäne von APP und inhibiert dessen Spaltung durch die  $\beta$ -Sekretase (Ho and Sudhof, 2004). Möglicherweise gibt es weitere Faktoren, die an die extrazelluläre Domäne von APP binden und dessen Prozessierung

beeinflussen. Diese Mechanismen sind hinsichtlich einer Therapie des Morbus Alzheimer von großem Interesse.

## **2. Intermolekulare Mechanismen**

Interessanterweise wurden einige intermolekulare Mechanismen beschrieben, die sich ebenfalls auf die APP Prozessierung auswirken. So zeigten Struhl et al. (Struhl and Adachi, 2000), dass die extrazelluläre APP Spaltung durch die  $\alpha$ - oder  $\beta$ - Sekretase selbst zu einer höheren Presenilin-1 Aktivität führt, was wiederum die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität stimulieren kann, so dass nach Art eines autoregulativen Mechanismus APP weiter prozessiert wird. In einer anderen Arbeit wird beschrieben, dass AICD selbst Einfluss auf die Regulation der APP Expression haben kann (von Rotz et al., 2004).

## **3. Andere Faktoren**

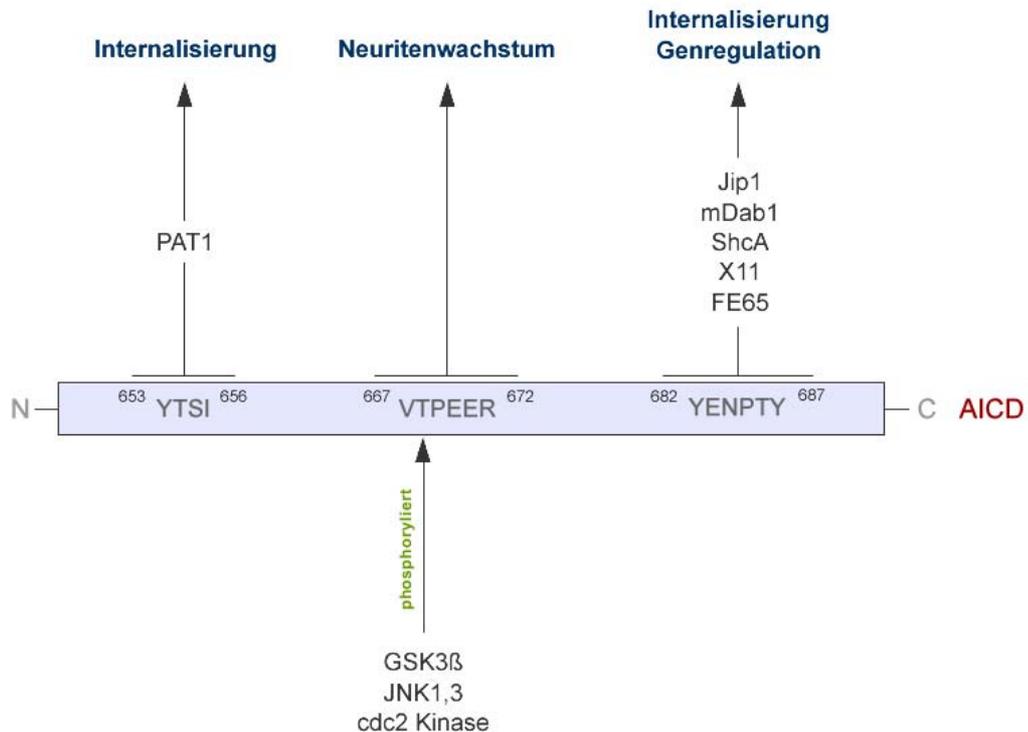
Darüber hinaus gibt es andere Faktoren, die die APP Prozessierung beeinflussen können. Erhöhte Cholesterin Konzentrationen sind ein viel diskutierter Risikofaktor für Morbus Alzheimer. So zeigte sich in APP transgenen Mäusen (Tg2576), die 6 Wochen lang einer Hypercholesterin-Diät unterzogen wurden, verglichen mit Kontroll-Tieren eine vermehrte Bildung von AICD und verringerte Entstehung von CTF $\alpha$  (George et al., 2004).

### **1.6 Die intrazelluläre Domäne des APP**

#### **1.6.1 Domänen des AICD und ihre Bindungspartner**

Die intrazelluläre Domäne des APP (AICD) besitzt drei wichtige Bindungsdomänen, die für die Sekretion, Endozytose und Transaktivierung eine Rolle spielen (Abbildung 4).

Die Aminosäuresequenz  $^{653}\text{YTSI}^{656}$  ist ein charakteristisches Internalisierungs- und/oder basolaterales Sortierungssignal (in MDCK Zellen gezeigt), an die das mit Mikrotubuli interagierende Protein PAT1 bindet (Zheng et al., 1998). Wird in diesem Motiv Tyrosin gegen Alanin mutiert, so werden sowohl Endozytose und die basolaterale Sortierung verhindert (Haass et al., 1995).



**Abbildung 4 - Wichtige Domänen der intrazellulären Domäne des Amyloid Precursor Proteins, deren Bindungspartner und diskutierte Funktion.** An die N-terminale Domäne YTSI bindet PAT1, wodurch APP internalisiert werden kann. Die Domäne VTPEER wurde funktionell mit dem Neuritenauswachsen in Verbindung gebracht. Der Threonin Rest dieser Domäne kann durch zahlreiche Kinasen phosphoryliert werden. Das Motiv YENPTY ist insbesondere für die Transaktivierung von AICD wichtig, da FE65 an dieses Motiv bindet. Aber auch andere Proteine binden an dieses Motiv und können ebenfalls zur Internalisierung ungeschnittenen APPs führen.

Das Motiv  $^{667}\text{VTPEER}^{672}$  enthält Thr-668, eine Aminosäure, die von der neuronalen Zyklin-abhängigen Kinase 5 (Iijima et al., 2000), cdc2 Kinase (Oishi et al., 1997), GSK3β, Streß-aktivierte Proteinkinase 1b (Aplin et al., 1996; Standen et al., 2001), JNK1 und JNK3 *in vitro* phosphoryliert werden kann. Diese Phosphorylierung von APP reguliert unter anderem das Neuritenauswachsen in PC12 Zellen (Ando et al., 1999). Möglicherweise ist die Phosphorylierung an Thr-668 aber auch eine Voraussetzung dafür, dass AICD in den Zellkern transloziert (Muresan and Muresan, 2004). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass GSK3β auch das Mikrotubuli assoziierte Protein TAU phosphorylieren kann, das Hauptbestandteil „neurofibrillärer tangles“ ist. Da GSK3β also APP und TAU phosphorylieren kann, wurde gefolgert, dass möglicherweise mechanistische Zusammenhänge zwischen den zwei charakteristischen Ablagerungen in Alzheimer Gehirnen bestehen (Aplin et al., 1996). Das Motiv  $^{667}\text{VTPEER}^{672}$  enthält außerdem Arg672, eine für den nicht-amyloidogenen Signalweg von APP notwendige Aminosäure (Tomita et al., 1998). Das dritte wichtige Motiv ist  $^{682}\text{YENPTY}^{687}$ , ein typisches Internalisierungssignal für Membran-assoziierte Rezeptorproteine (Koo and Squazzo, 1994). Allerdings ist Tyr687 im

APP nicht phosphoryliert, was normalerweise bei diesen Rezeptorproteinen der Fall ist. An dieses Motiv binden verschiedene zytoplasmatische Proteine wie FE65, FE65-like 1 (FE65L1), FE65L2, X11, X11-like, X11-like 2, ShcA, mDab1 (mammalian disabled-1) oder Jip1 jeweils über eine Phosphotyrosin-Bindedomäne (Borg et al., 1998; Duilio et al., 1998; Fiore et al., 1995; Guenette et al., 1996; Sastre et al., 1998; Tanahashi and Tabira, 1999; Tomita et al., 1999; Trommsdorff et al., 1998).

### **1.6.2 Lokalisation von AICD**

Aufgrund seiner geringen Größe und Instabilität ist AICD nur schwer nachweisbar, so dass es nur wenige Untersuchungen gibt, in denen versucht wurde, das Peptid in humanem Gewebe nachzuweisen (Daly et al., 1998).

In Zellkulturen, wie z.B. swAPP transfizierten HEK293 Zellen, konnte AICD dagegen sicher auf Proteinebene nukleär lokalisiert nachgewiesen werden (Sastre et al., 2001). Mittels Konfokalmikroskopie und FRET zeigten Kinoshita et al. (Kinoshita et al., 2002) in H4 Neurogliom Zellen, dass AICD58 in den Zellkern transloziert und dort zusammen mit TIP60 einen Komplex bildet. Muresan und Muresan (Muresan and Muresan, 2004) zeigten, dass an Thr-668 phosphoryliertes AICD in den Zellkern transloziert und dort mit subnukleären Partikeln kolokalisiert, von denen sie annahmen, dass sie zum „Splicing factor“ Kompartiment gehörten. Sie folgerten daraus, dass das mRNA „Splicen“ durch AICD beeinflusst werden könnte.

Kimberly et al. (Kimberly et al., 2001) untersuchten den Translokationsmechanismus und zeigten, dass AICD nur bei einer hohen zellulären FE65 Konzentration in den Zellkern transloziert werden kann. Umgekehrt wird FE65 nur dann nukleär transloziert, wenn freies AICD vorliegt und FE65 nicht durch APP an der Zellmembran verankert ist (Cao and Sudhof, 2001; Minopoli et al., 2001). In Analogie zu AICD konnte auch gezeigt werden, dass die intrazellulären Domänen von APLP1 und APLP2 in den Zellkern translozieren können (Walsh et al., 2003). Zusammengefasst ist festzuhalten, dass AICD zwar ein schwer detektierbares, aber durch die APP Prozessierung entstehendes Peptid ist, das abhängig von anderen zellulären Proteinen in den Zellkern transloziert wird.

### **1.6.3 Degradation von AICD**

Die wenigen Studien, in denen AICD in Gewebe oder Zellkultur nachgewiesen werden konnte, deuten darauf hin, dass dieses Fragment einer schnellen Degradation unterliegt. Es konnten zwei verschiedene Degradationsprozesse identifiziert werden.

1. AICD kann zum einen durch das Protein „Insulin-Degrading-Enzyme“ (IDE), welches für die Degradation von  $\beta$ A4 verantwortlich ist, abgebaut werden. Auch die zytoplasmatischen Domänen der APP Homologen APLP1 und APLP2 werden durch dieses Enzym degradiert (Edbauer et al., 2002; Cupers et al., 2001).
2. Die andere Möglichkeit der AICD Degradation ist wie bei anderen Proteinen auch der Proteasom vermittelte Abbau, der von Nunan et al. untersucht wurde (Nunan et al., 2003; Nunan et al., 2001).

Man nimmt an, dass AICD normalerweise einer sehr schnellen zellulären Degradation unterworfen ist. Jedoch konnte man zeigen, dass es durch die Bindung an das Adapterprotein FE65 stabilisiert wird und sich so einer schnellen Degradation entziehen kann (Kimberly et al., 2001).

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auch die nach  $\gamma$ -Sekretase Aktivität aus dem Notch Protein entstehende intrazelluläre Domäne NICD (Notch Intracellular domain) eine sehr geringe Lebensdauer in der Zelle hat, weswegen die Rolle von NICD lange kontrovers diskutiert wurde. Obwohl NICD jedoch nur eine sehr kurze Lebensdauer von wenigen Minuten besitzt, konnte gezeigt werden, dass diese Zeit für seine Funktion der Signalweiterleitung ausreicht (Schroeter et al., 1998). Möglicherweise besitzt das gegenüber NICD viel kleinere AICD ähnliches Potential wie im Folgenden diskutiert wird.

## **1.7 Hinweise auf AICD-vermittelte differentielle Genexpression**

### **1.7.1 Homologie von AICD und NICD**

Erste Hinweise für eine AICD abhängige Genregulation lieferte der Vergleich von APP und Notch. Beide Proteine unterliegen einer homologen Prozessierung, bei der durch Aktivität des  $\gamma$ -Sekretase Komplexes die intrazellulären Domänen AICD bzw. NICD freigesetzt werden. Studien über NICD zeigten, dass es an die CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1) Familie von Transkriptionsfaktoren bindet und auf diesem Wege unterschiedliche zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differentiation und Apoptose beeinflusst (Panin and Irvine, 1998; Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Kadesch, 2000). NICD bindet den Transkriptionsfaktor „Suppressor of Hairless“, transloziert in den Kern und reguliert dort die Transkription des „Enhancer of Split“ Komplexes (Greenwald, 1998). Daher spekulierte man, dass auch AICD transaktivierendes Potential haben könnte, was schließlich durch Studien mit „AICD-Gal4“ Fusionskonstrukten belegt werden konnte. Dieses Fusionskonstrukt führte zur Aktivierung eines unter dem Gal4-Promotor regulierten Reporters (Cao and Sudhof, 2001), wodurch

gezeigt werden konnte, dass AICD in den Zellkern transloziert wird und grundlegende Eigenschaften eines Transkriptionsfaktors besitzt.

Interessant ist die Beobachtung, dass AICD auch den zytosolischen Notch Inhibitor Numb binden kann. Roncarati et al. (Roncarati et al., 2002) schlossen daraus, dass die  $\gamma$ -Sekretase abhängige APP Prozessierung, die zur Entstehung zytosolischen AICDs führen kann, die NICD Transaktivierung inhibieren kann. Es besteht also nicht nur eine Homologie zwischen AICD und NICD bezüglich ihres transaktivierenden Potentials, sondern möglicherweise beeinflussen sich diese beiden Domänen in ihrer Funktion wechselseitig. Daher ist auch vorstellbar, dass zwischen AICD- und NICD-abhängiger differentieller Genexpression ein Zusammenhang besteht.

### **1.7.2 FE65 als Adapterprotein für AICD**

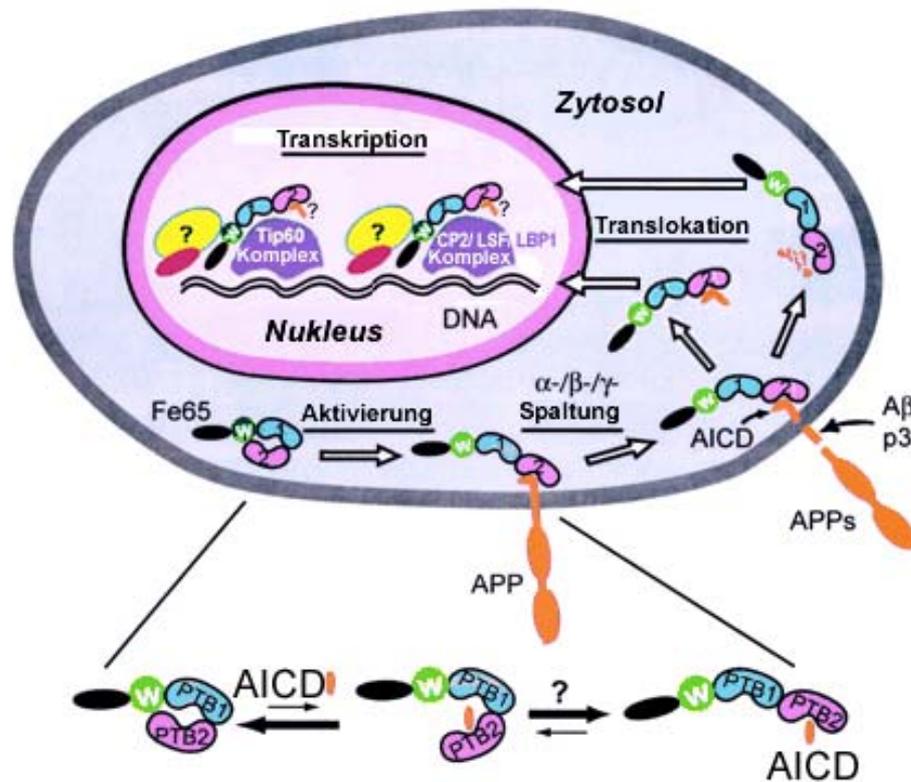
FE65 (auch „Amyloid beta precursor binding protein“) ist ein 97 kDa großes Protein, das am C-Terminus zwei Phosphotyrosin-Bindedomänen und am N-Terminus eine WW Domäne besitzt. Die PTB2 Domäne kann AICD binden, die PTB1 Domäne bindet LRP (LDL-receptor related protein; (Trommsdorff et al., 1998)), das NKSYSY Motiv in TIP60 oder den Transkriptionsfaktor CP2/LSF/LBP1. Im Hefe-2-Hybrid System konnte allerdings nur eine schwache Interaktion zwischen FE65 und CP2/LSF/LBP1 gezeigt werden, dagegen aber eine starke Bindung an TIP60. Die WW Domäne schließlich kann Prolin reiche Liganden wie Mena oder die nukleäre Tyrosin Kinase c-Abl binden (Ermekova et al., 1997; Zambrano et al., 2001) und ist für die Transaktivierung essentiell. Dies lässt vermuten, dass noch weitere, bislang nicht identifizierte Proteine an der Transkriptionsaktivierung beteiligt sind (Cao and Sudhof, 2001). Zahlreiche Studien führten schließlich zu einer Hypothese der AICD abhängigen differentiellen Genregulation.

### **1.7.3 Modell der AICD abhängigen Genregulation**

Das im Folgenden diskutierte Modell AICD abhängiger Genregulation ist im Wesentlichen auch in Abbildung 5 wiedergegeben.

Infolge der APP Prozessierung durch den  $\gamma$ -Sekretase Komplex entsteht im Zytoplasma AICD, an dessen NPTY Motiv das Adapterprotein FE65 über seine zweite Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB2) bereits gebunden war oder infolge der Spaltung bindet. Diese Bindung ist Phosphorylierungs-unabhängig (Borg et al., 1996). Der AICD/FE65 Komplex kann nun in den Zellkern translozieren (Kimberly et al., 2001), wo das „Tat interacting protein“ TIP60 mittels seines NKSYSY Motivs an die noch freie PTB1 Domäne von FE65 bindet, so dass ein trimerer Komplex aus AICD, FE65 und TIP60 entsteht. TIP60 besitzt Histon-

Acetyltransferase-Aktivität (Yamamoto and Horikoshi, 1997) und besteht aus mindestens 14 Untereinheiten, die zudem DNA-Binde-, ATPase- und DNA-Helicase-Eigenschaften enthalten (Cao and Sudhof, 2001; Ikura et al., 2000).



**Abbildung 5 - Modell der AICD abhängigen Genregulation.** AICD bindet an die PTB2 Domäne von FE65, wodurch es zu einer Konformationsänderung des Adapterproteins kommt. FE65 transloziert in der Folge in den Kern, wobei unklar ist, ob AICD kotransloziert oder im Zytosol degradiert wird. Im Zellkern kann der AICD/FE65 Komplex an verschiedene andere Proteine binden. Bislang ist eine Bindung an die Histon Acetyltransferase TIP60 und den Transkriptionsfaktor CP2/LSF/LBP1 beschrieben. Diese Komplexe modulieren das Genexpressionsprofil der Zelle (aus (Cao and Sudhof, 2004); modifiziert).

Durch diese Bindung an TIP60 wird es dem AICD abhängigen Transkriptionskomplex ermöglicht, die Histone 3 und 4 zu acetylieren. Diese verstärkte Acetylierung konnte man z.B. auch nach alleiniger Überexpression von C99, AICD59 oder C31 in NGF-differenzierten PC12 Zellen beobachten, d.h. die gleichzeitige Überexpression von TIP60 war nicht notwendig. Die Histone verlieren infolge der Acetylierung ihre positiven Ladungen und Proteine haben so einen leichteren Zugang zur DNA (Kim et al., 2004). Über diesen Mechanismus könnte der Dreifachkomplex aus AICD/FE65/TIP60 (sowie eventuell weitere noch nicht identifizierte Proteine) in der Lage sein, an spezifische Promotoren zu binden und so das Genexpressionsmuster der Zelle zu verändern. Die Expressionsstärke von FE65 scheint

dabei für das Ausmaß der Expressionsänderung von Bedeutung zu sein, da man in AICD-Gal4-Reportergeren Untersuchungen feststellen konnte, dass dieses Adapterprotein das Maß der Transaktivierung um den Faktor 2000 steigern kann (Cao and Sudhof, 2001).

FE65 bindet neben TIP60 – wenn auch schwächer - den Transkriptionsfaktor CP2/LSF/LBP1 ebenfalls über seine PTB1 Domäne. CP2/LSF/LBP1 wurde initial als Faktor beschrieben, der an den  $\gamma$ -Fibrinogen Promotor und SV40 „late“ Promotor bindet (Chodosh et al., 1988). CP2/LSF/LBP1 reguliert eine Vielzahl von Genen, u.a. das humane  $\alpha$ -Globulin Gen (Lim et al., 1992), das Serum Amyloid A3 Gen (Bing et al., 1999), GSK3 $\beta$  und  $\alpha$ 2-Makroglobulin (Lau et al., 1999). Es ist daher möglich, dass es einen zweiten trimeren Komplex bestehend aus den Proteinen AICD/FE65/CP2/LSF/LBP1 gibt, der in die differentielle Genexpression involviert ist.

Die bislang beschriebenen Mechanismen gingen von einer Translokation des AICD aus dem Zytoplasma in den Zellkern aus. Cao et al. (Cao and Sudhof, 2004) schlugen einen alternativen Mechanismus vor. Lösliches AICD (frei von der Zellmembran) soll demnach keinen oder einen nur geringen Effekt auf die Transaktivierung haben. Dagegen soll Membran gebundenes AICD FE65 rekrutieren, dessen Konformation ändern und zusammen mit FE65 nach  $\gamma$ -Sekretase Aktivität von der Membran gelöst werden. Im Unterschied zu anderen Modellen soll AICD aber im Zytosol abgebaut werden und nicht in den Kern translozieren. AICD würde demnach einzig dazu dienen, die Konformation von FE65, das im Ausgangszustand nicht zugängliche aktive Zentren der beiden PTB Domänen besitzt, so zu ändern, dass es die PTB Domänen „aufklappt“ und FE65 in der Lage wäre, in den Kern zu translozieren. Diese Annahme beruht auf Experimenten, bei denen AICD an ein Membrananker-Peptid gekoppelt wurde und man mit derart verändertem AICD in Reporterstudien eine höhere Transaktivierung beobachten konnte als mit löslichem AICD. Cao et al. (Cao and Sudhof, 2004) verwendeten in dieser Arbeit auch ein Konstrukt, das nur aus der WW Domäne und der N-terminalen Sequenz von FE65 gebunden an Gal4 bestand und beobachteten eine starke Transaktivierung ganz ohne Vorhandensein von AICD. Fügten Sie zu der WW Domäne und der N-terminalen Sequenz noch die PTB1 oder PTB2 Domäne hinzu, so wurde die Transaktivierung 20-fach verringert. Aus „pull-down“ Experimenten der WW Domäne von FE65 wurde ersichtlich, dass die WW Domäne mit einem Sequenzabschnitt zwischen den beiden PTB Domänen von FE65 interagieren kann. Man folgerte daraus, dass AICD diese intrinsische Interaktion der WW Domäne mit einem Sequenzabschnitt zwischen den beiden PTB Domänen aufheben kann und dadurch die

Konformation von FE65 so ändert, dass es entfaltet wird, in den Zellkern transloziert und dort die Transaktivierung induziert.

Der Vollständigkeit halber sind an dieser Stelle zwei weitere Proteine aufgeführt, die für die AICD vermittelte Transaktivierung wichtige Bedeutung haben könnten. PAT1 ist ein lösliches zytoplasmatisches Protein, das an das YTSI Motiv von AICD bindet. Sequenzvergleiche zeigten, dass PAT1 eine DNA-Bindedomäne mit einem LXXLL Motiv enthält, das häufig in transkriptionellen Koregulatoren vorhanden ist und mehrere Kernlokalisations- und Kernexportsignale enthält. Möglicherweise ist PAT1 also in den nukleären Transport des AICD Komplexes integriert.

PAT1 besitzt aber auch Homologie zur leichten Kette des Kinesin und könnte daher auch in intrazelluläre Transportvorgänge involviert sein (Zheng et al., 1998; Gao and Pimplikar, 2001). Die Bedeutung dieses Proteins für AICD abhängige Mechanismen ist bislang wenig verstanden. Ähnliches gilt für den Nukleosomen-„assembly“ Faktor SET, der kürzlich als potentieller weiterer Bestandteil des AICD/FE65/TIP60 Komplexes diskutiert wurde (Telese et al., 2005).

Der Mechanismus der AICD abhängigen differentiellen Genregulation ist Bestandteil aktueller Forschung. Gleiches gilt für die Identifikation potentieller AICD Zielgene. Nur wenige Studien lieferten bisher Vorschläge für potentiell AICD abhängig regulierte Kandidatengene (Baek et al., 2002; Kim et al., 2003; Leissring et al., 2002).

#### **1.7.4 Potentiell AICD abhängig regulierte Gene**

In Studien mit Reporterkonstrukten wurde gezeigt, dass AICD transaktivierendes Potential besitzt. Die Domäne wurde in FAD-Zellkulturmodellen („familiar Alzheimer disease“) sowie in humanem Gewebe von Morbus Alzheimer Patienten nachgewiesen, aber nicht in den entsprechenden Kontrollen (Daly et al., 1998; Lahiri et al., 2002; Gao and Pimplikar, 2001). AICD abhängige Genregulation könnte daher für die Pathophysiologie von Morbus Alzheimer ein wichtiger Faktor sein. Umfassende Studien über Zielgene liegen nach aktuellem Stand der Forschung nicht vor. Die im Folgenden beschriebenen potentiellen Zielgene ergaben sich nicht aus einer gezielten Analyse, sondern sind Erkenntnisse aus Experimenten mit anderem Hintergrund.

- Baek et al. (Baek et al., 2002) stimulierten HEK293 Zellen mit IL-1 $\beta$ , um die Aktivierung NF-kB abhängiger Gene zu untersuchen. Sie zeigten, dass infolge der Stimulation ein Repressorkomplex bestehend aus N-CoR/TAB2/HDAC3 von dem Promotor des Tumorsuppressor Gens KAI1 aus dem Kern verdrängt wurde und ein

TIP60 enthaltender Komplex stattdessen rekrutiert wurde. Da bekannt war, dass TIP60 mit AICD und FE65 einen Komplex bildet, untersuchten sie mittels Chromatin Immunpräzipitation das Vorhandensein dieser drei Proteine am KAI1 Promotor und konnten diese dort nachweisen. Sie identifizierten damit KAI1 als ein potentielles *in vivo* Zielgen von AICD. Darüber hinaus konnten sie in Gehirnen von vier Wochen alten APP transgenen Mäusen (J9 Linie) gegenüber Kontrollen die erhöhte Expression von KAI1 im „Westernblot“ darstellen. Überraschenderweise war auch die FE65 und TIP60 Expression auf Proteinebene in den transgenen Tieren erhöht. KAI1 ist ein Zelloberflächenmolekül, das als Tumor Metastase Suppressor fungiert, eine Funktion bei der Zelladhäsion hat und mit zahlreichen Plasmamembran Rezeptoren interagieren kann. Bisher war ein Zusammenhang zwischen KAI1 und Morbus Alzheimer nicht bekannt.

- Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) ist ein bekanntermaßen vom Transkriptionsfaktor CP2/LSF/LBP1 abhängig reguliertes Gen. Kim et al. (Kim et al., 2003) zeigten, dass in AICD59 transfizierten PC12 Zellen das GSK3 $\beta$  Level auf mRNA- und Proteinebene erhöht war. In Reporterstudien untersuchten sie den GSK3 $\beta$  Promotor genauer und identifizierten eine notwendige CP2/LSF/LBP1 Bindestelle (Nukleotid +0 ~ +10), die für die AICD abhängige differentielle Regulation von GSK3 $\beta$  notwendig war. GSK3 $\beta$  ist eine Kinase, die das Mikrotubuli assoziierte Protein TAU phosphoryliert, das im hyperphosphorylierten Zustand die Vorstufe „neurofibrillärer tangles“ bildet. Kim et al. folgerten daraus einen mechanistischen Zusammenhang zwischen der APP und TAU Pathologie bei Morbus Alzheimer. Sie postulierten, dass APP amyloidogen prozessiert wird, so dass AICD freigesetzt wird, worauf GSK3 $\beta$  verstärkt exprimiert wird, was schließlich die Phosphorylierung von TAU fördert und so die Bildung von „tangles“ erleichtert. Inzwischen ist jedoch klar, dass TAU von verschiedenen Kinasen an verschiedenen Positionen phosphoryliert werden muss, um als hyperphosphoryliertes Protein aggregieren zu können. Interessanterweise phosphoryliert GSK3 $\beta$  aber auch AICD an Thr668 in seinem VTPEER Motiv. Dies würde auf einen selbst regulatorischen Mechanismus hinweisen, der bislang aber noch nicht untersucht ist.
- Das dritte potentiell AICD abhängig regulierte Gen ist der sarko- und endoplasmatische Calcium Transporter SERCA2B, durch den die hohe Calcium Konzentration des Endoplasmatischen Retikulums aufrechterhalten wird. Da bekannt war, dass das Ausschalten von PS oder APP in Mäusen zu einer Störung der Calcium

Homöostase in kultivierten Fibroblasten dieser Tiere führt und diese Störung durch die Transfektion von AICD aufgehoben werden konnte, vermutete man, dass ein Calcium Transporter differentiell von AICD reguliert wird. Akbari et al. (Akbari et al., 2003) schlugen schließlich den Transporter SERCA2B als AICD abhängiges Zielgen vor.

Einige andere Arbeitsgruppen, die die AICD abhängige differentielle Genexpression untersuchen, sind jedoch nicht in der Lage, eines dieser drei Kandidatengene zu bestätigen (unpublizierte Daten, persönliche Mitteilung der AG E. Kilger, Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Universität Tübingen).

### 1.7.5 Modulation der AICD abhängigen differentiellen Genexpression

Die AICD abhängige differentielle Genexpression kann durch verschiedene Faktoren moduliert werden. Prinzipiell können dies alle Mechanismen sein, die die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase beeinflussen und die bereits in 1.5 beschrieben wurden. Die an dieser Stelle beschriebenen Mechanismen beruhen dagegen auf Ergebnissen von "Reporter-gen-Assays" und zielen damit unmittelbar auf eine Modulation der AICD abhängigen Transaktivierung ab.

- In einer Arbeit von Zhao et al. (Zhao and Lee, 2003) wurde beschrieben, dass eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs (durch Überexpression der NF- $\kappa$ B induzierenden Kinase (NIK)) zu einer verringerten AICD abhängigen Transaktivierung führt. Da der NF- $\kappa$ B Signalweg durch Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  oder oxidativen Stress induzierbar ist, wäre daher auch eine Modulation des AICD Signalwegs durch externe Stimuli möglich. Ein zweiter durch oxidativen Stress induzierbarer Signalweg ist die JNK (c-Jun N-terminale Kinase) abhängige MAPK (Mitogen activated protein kinase) Kaskade. Liao et al. (Liao et al., 2004) beschrieben einen Zusammenhang zwischen diesem Signalweg und AICD abhängiger Transaktivierung. Sie zeigten, dass die Cytokine Interferon- $\gamma$ , Interleukin-1 $\beta$  und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  spezifisch die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität stimulierten und dass diese Aktivierung durch einen c-Jun N-terminale Kinase Inhibitor unterdrückt wird.
- Alle Mint Proteine binden an die zytoplasmatische Domäne von APP (YENPTY Motiv) sowie auch an Presenilin. Mint1 und 2 (neuronale Isoformen) inhibieren die AICD Transaktivierung. FE65 hingegen verstärkt die Transaktivierung (Biederer et al., 2002).

- Darüber hinaus konnte man zeigen, dass die intrazellulären Domänen der Alcadin Proteine (AlcICD) das Transaktivierungs-Potential von AICD verringern. AlcICD interagiert über X11L mit APP (Araki et al., 2004).
- Aktive c-Abl Tyrosin Kinase stimuliert die APP/FE65 abhängige Gentranskription und dieser Effekt wird über die Phosphorylierung von FE65 an Tyr547 innerhalb seiner zweiten PTB Domäne vermittelt (Perkinton et al., 2004).

All diese Regulationsmechanismen konnten bislang noch nicht in einen zusammenhängenden Signalweg integriert werden, daher bleibt obige Liste eine Aneinanderreihung von Daten.

### **1.8 AICD vermittelte Apoptose bei Morbus Alzheimer**

Zahlreiche Studien belegen, dass programmierter Zelltod bei Morbus Alzheimer ein Grund für den beobachteten Verlust neuronaler Zellen ist. Daly et al. (Daly et al., 1998) quantifizierten apoptotische Kerne in hippocampalem Gewebe und zeigten, dass Gehirne von Alzheimer Patienten in diesem Areal signifikant mehr Anzeichen für apoptotischen Zelltod zeigten als Kontrollen.

Auch Apoptose-spezifische Enzyme wie Caspase-9 wurde in Alzheimer Gehirnen, aber nicht in Kontroll-Gehirnen (Lu et al., 2000) nachgewiesen. In Zellkulturexperimenten wurde eine durch APP bzw. FAD Mutationen von APP initiierte Apoptose mehrfach beschrieben (Xu et al., 1999; McPhie et al., 2003).

Experimente mit der intrazellulären Domäne von APP zeigten schließlich, dass diese Domäne programmierten Zelltod initiieren und zum Absterben von Neuronen führen kann.

Kinoshita et al. (Kinoshita et al., 2002) transfizierten humane H4 Neurogliomzellen mit AICD und beobachteten mittels TUNEL Färbung innerhalb von 72 Stunden eine Induktion von Apoptose. Diese konnte inhibiert werden, wenn ein mit Zellmembrananker fusioniertes AICD transfiziert wurde. In dergleichen Arbeit wurde auch gezeigt, dass die Kotransfektion von wt-TIP60 den apoptotischen Effekt verstärkte, mutiertes TIP60 ohne Histon Acetyltransferase Aktivität (HAT) dagegen verminderte.

In differenzierten PC12 Zellen und primären kortikalen Neuronen der Ratte wurde beschrieben, dass die AICD abhängige Apoptose mit einem erhöhten GSK3 $\beta$  Level verbunden war. Daher diskutierte man als Modell, dass AICD die Expression von GSK3 $\beta$  erhöht, worauf infolge GSK3 $\beta$  abhängiger Verringerung der beta-Catenin Level die Zelle den programmierten Zelltod initiiert (Kinoshita et al., 2002). In diesem Fall wäre die Funktion von TIP60, das Chromatin zu relaxieren und so Transkriptionsfaktoren zugänglich zu machen (Ikura et al., 2000).

AICD kann auch Caspase abhängig zu einem AICD31 und N-terminalen Fragment prozessiert werden (Spaltung an Aminosäure 664). Lu et al. (Lu et al., 2000) transfizierten AICD31 in 293T und N2A Zellen und konnten zeigen, dass auch dieses verkürzte C-terminale Fragment apoptotisches Potential besitzt.

Weitere mechanistische Einblicke in AICD vermittelte Apoptose konnte man aus der Studie transgener Presenilin1 (PS1) Mäuse gewinnen. Als man Fibroblasten von Presenilin1 „knock-in“ Mäusen, die anstatt des Maus Presenilins das humane Presenilin1 mit der FAD Mutation M146V trugen, hinsichtlich ihrer intrazellulären Calcium Konzentrationen untersuchte, stellte man fest, dass diese Zellen erhöhte ER Calcium Level aufwiesen sowie eine Störung des kapazitiven Calcium Eintritts, also dem Einfließen von extrazellulärem Calcium ausgelöst durch die Entleerung intrazellulärer Calcium Speicher (Leissring et al., 2000). Dazu behandelte man die Zellen mit Bradykinin oder Thapsigargin, das zu einer Entleerung intrazellulärer Speicher führt. Die Untersuchung von Fibroblasten aus Ps1 „knock-out“ Mäusen (den Tieren fehlte entweder ein oder beide Ps Gene) zeigte im Gegensatz, dass diese gegenüber Zellen aus Kontroll-Tieren verringerte ER Calcium Konzentrationen aufwiesen. Das Ausmaß dieser Störung korrelierte dabei mit der Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase (gemessen an A $\beta$  Entstehung). Preseniline wurden so mit der Aufrechterhaltung bzw. Störung der intrazellulären Calcium Homöostase in Verbindung gebracht (Leissring et al., 2002). Aber auch in APP -/- Zellen konnte man nach Thapsigargin Behandlung signifikant verringerte Calcium Gehalte im ER feststellen. Diese Effekte konnten durch Transfektion von APP oder AICD wiederhergestellt werden. Mutiertes AICD, das kein FE65 binden kann, war dagegen nicht in der Lage, die gestörte Calcium Freisetzung wieder aufzuheben. Daher vermutete man eine physiologische Funktion von AICD bei der Störung der Calcium Homöostase.

Interessanterweise fand man in der Promotorsequenz des sarko- und endoplasmatischen Calcium Transporters SERCA2B ein Bindeelement des mit AICD abhängiger Genregulation in Verbindung stehenden Transkriptionsfaktors CP2/LSF/LBP1 und diskutierte daher diesen Transporter als potentiell durch AICD reguliertes *in vivo* Zielgen (Leissring et al., 2002).

Mehrere Hinweise lassen vermuten, dass unter bestimmten Bedingungen auch gestörte Calcium ER Level an der Apoptose-Regulation beteiligt sein können. So ist die Verteilung pro- und anti-apoptotischer Proteine nicht allein auf die Mitochondrien beschränkt. Auf Grund ihrer hydrophoben Transmembrandomäne finden sich anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> auch auf der Außenseite des ERs. Dies lässt vermuten, dass sie auch hier, ähnlich wie an den Mitochondrien, die Kontrolle über bestimmte apoptotische Vorgänge übernehmen. Daher könnte die AICD abhängige Modulation von ER Calcium

Konzentrationen auch mit einer Modulation der apoptotischen Schwelle der Zelle einhergehen.

## 1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die intrazelluläre Domäne des Amyloid Precursor Proteins kann nach Abspaltung gebunden an das Adapterprotein FE65 in den Zellkern translozieren und dort mit weiteren Proteinen interagieren. In Reporterstudien konnte gezeigt werden, dass AICD transaktivierendes Potential besitzt. Einige wenige Zielgene wurden als AICD abhängig reguliert diskutiert.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, potentielle Gene zu finden, die einer AICD abhängigen Regulation unterliegen. Dies sollte zunächst anhand eines selbst zu etablierenden Zellkulturmodells untersucht werden. Methodisch sollte dafür die Affymetrix GeneChip Technologie genutzt werden, die eine gleichzeitige Analyse von ca. 22000 Transkripten ermöglicht. Interessante Kandidaten sollten mit unabhängigen Methoden verifiziert werden. Zudem sollte eine potentielle Relevanz identifizierter regulierter Gene für die Alzheimer Erkrankung an humanem Autopsiegewebe von Morbus Alzheimer Patienten vs. Kontrollen analysiert werden.

In Zellkulturexperimenten wurde beschrieben, dass AICD darüber hinaus apoptotisches Potential besitzt. AICD abhängig induzierte Apoptose sollte daher in dem etablierten Zellkulturmodell untersucht werden. Der dem programmierten Zelltod zugrunde liegende Mechanismus, insbesondere die Funktion von AICD für die Störung der ER Calcium Homöostase (einem diskutierten Mechanismus), sollte charakterisiert werden.

Die beiden Teilaspekte dieser Arbeit (differentielle Genregulation und Apoptose) können miteinander in Zusammenhang stehen. Z.B. könnte Apoptose die Folge AICD abhängig differentieller Genexpression sein. Von besonderem Interesse ist daher die bioinformatische Aufarbeitung der GeneChip Experimente, um so Aussagen über potentiell regulierte Gengruppen, z.B. eine Gruppe Apoptose relevanter und regulierter Gene, zu erhalten.

## 2 Material und Methoden

### 2.2 Materialien

#### 2.2.1 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Bakterien- Schüttler	B.Braun Biotech International, Melsungen
Blotkammer	BioRad, München
Casy	Schärfe System
Elektrophoresekammer	BioRad, München
ELISA-Reader (HTS7000)	Perkin Elmer, Langen
Fluidics Station 400	Affymetrix, Santa Clara, USA
Fluoreszenz Mikroskop Olympus IX50	Zeiss, Oberkochen
Gel Dokumentationssystem	UVP Ultra Violet Products, Cambridge, UK
Human Genome U133A Chip	Affymetrix, Santa Clara, USA
Hybridisation Oven 640	Affymetrix, Santa Clara, USA
Microarray Scanner	Affymetrix, Santa Clara, USA
Mikro Dismembrator	B.Braun Biotech International, Melsungen
Real-time PCR Gerät	Applied Biosystems, Darmstadt
Spannungsgerät	BioRad, München
Thermocycler	MJ Research, München Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau
UV Spektrometer	Pharmacia Biotech
Zellkultur Mikroskop Olympus CK30	Zeiss, Oberkochen
Zellkultur Zentrifuge Stratos	Heraeus, Hanau

#### 2.2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in Analysenqualität („pro analysi“) von den Firmen „Diagonal“ (Münster), „Merck“ (Darmstadt), „Gibco-BRL-Invitrogen“ (Karlsruhe), „Roche Diagnostics GmbH“ (Mannheim) und „Sigma“ (Deisenhofen) bezogen. Wasser zur Herstellung von Lösungen wurde mit einer Reinstwasseranlage von „USF Purelab“ (Ransbach-Baumbach) gereinigt. Die Lieferanten spezieller Chemikalien, Biochemikalien und Materialien sind in der folgenden Tabelle zu finden.

Chemikalien/ Verbrauchsmaterial	Hersteller
Whatman Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
96 Loch-Platten für die real-time PCR	ABGene, Hamburg
Abdeckfolien für 96 Loch-Platten	ABGene, Hamburg
Human Genom U133A Chip	Affymetrix, Santa Clara, USA
Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Protein-G-Sepharose	Roche Diagnostics, Mannheim
Röntgenfilme	AGFA, Köln
SYBR-Green	ABGene, Hamburg
Thapsigargin	Alexis, Grünberg
Trizol Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid/Bis (Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (37,5:1))	Biorad, München
APS (Ammoniumpersulfat)	Biorad, München
TEMED	Biorad, München

### 2.2.3 Medien für Bakterienkulturen

Die Medien wurden 20min bei 120°C autoklaviert.

Medien/ Zusätze	Zusammensetzung
LB-Flüssigmedium	10 g/l Bacto- Trypton 5 g/l Bacto- Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7,5
LB- Agar	15 g/l Bacto-Agar (zusätzlich zu LB-Flüssigmedium)
Antibiotika	50 µg/ml Ampicillin
	50 µg/ml Kanamycin

### 2.2.4 Bakterienstämme

Für Transformationen wurde der *E.coli* Stamm *E.coli* DH5a verwendet.

### 2.2.5 Zellkulturmaterial und Zellkulturzusätze

Material	Hersteller	Anmerkungen
AraC	Sigma, Deisenhofen	
B27	Invitrogen, Karlsruhe	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen	
DMEM + 10 % FCS	Invitrogen, Karlsruhe	Dulbecco's Modified Eagles Medium 2 mM Glutamin 100 U/ml Penizillin 100 µg/ml Streptomycin
Doxycycline	Sigma, Deisenhofen	
Fötales Kälberserum (Tetrazyklin getestet)	PAA, Cölbe	Hitzeinaktiviert bei 56 °C für 10 min
G418	Sigma, Deisenhofen	
Hygromycin	Sigma, Deisenhofen	
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden	
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen	
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe	
Metafectene Transfektionsreagenz	Biontex, München	
Neurobasalmedium	Invitrogen, Karlsruhe	Neurobasalmedium 100 U/ml Penizillin 100 µg/ml Streptomycin 2 % B27
Phleomycin	Sigma, Deisenhofen	
Polyornithin	Sigma, Deisenhofen	
Puromycin	Sigma, Deisenhofen	
RPMI 1640	PAA, Cölbe	
Streptomycin und Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe	
Thapsigargin	Calbiochem	
Thymidin	Sigma, Deisenhofen	
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe	2,5% Trypsin/EDTA (w/v)

### 2.2.6 Zelllinien

Name	Beschreibung
IMR-5	humane Neuroblastom-Zelllinie
KCN	humane Neuroblastom-Zelllinie
SHEP-SF	humane Neuroblastom-Zelllinie
SH-SY5Y	humane Neuroblastom-Zelllinie
Tet21	Subklon der SHEP-SF Zelllinie

## 2.2.7 Vektoren

Bezeichnung	Resistenz (prok./ euk.)	Verwendung	Referenz
pBabe-Puro	Ampicillin/Puromycin	Selektion	(Morgenstern and Land, 1990)
pBI-EGFP (modifiziert)	Ampicillin/-	stabile Linien	Clontech, Heidelberg
pEGFP-C1	Kanamycin/Neomycin	stabile Linien	Clontech, Heidelberg
pEGFP-N3	Kanamycin/Neomycin	stabile Linien	Clontech, Heidelberg
pFE65myc-pCIneo	Ampicillin/Neomycin	FE65 Klonierung	(Fiore et al., 1995)
pIRES2-dsRED2	Kanamycin/Neomycin	FE65 Umklonierung	Clontech, Heidelberg
pIRES2-EGFP	Kanamycin/Neomycin	stabile Linien	Clontech, Heidelberg
pIRESbleo3	Ampicillin/Bleomycin	FE65 Umklonierung	Clontech, Heidelberg
pTK-Hyg	Ampicillin/Hygromycin	Selektion	Clontech, Heidelberg
pwtAPP-YFP	Ampicillin/Neomycin	AICD Klonierung	(von C.Kaether, LMU München)
pEGFP-AICD50	Kanamycin/Neomycin	stabile Linien	diese Arbeit
pEGFP-AICD59	Kanamycin/Neomycin	stabile Linien	diese Arbeit
pAICD50-EGFP	Kanamycin/Neomycin	stabile Linien	diese Arbeit
pAICD59-EGFP	Kanamycin/Neomycin	stabile Linien	diese Arbeit
pAICD50-IRES-EGFP	Kanamycin/Neomycin	stabile Linien	diese Arbeit
pAICD59-IRES-EGFP	Kanamycin/Neomycin	stabile Linien	diese Arbeit
piA50	Ampicillin/-	stabile Linien	diese Arbeit
piA59	Ampicillin/-	stabile Linien	diese Arbeit
piF	Ampicillin/-	stabile Linien	diese Arbeit
piFA50	Ampicillin/-	stabile Linien	diese Arbeit
piFA59	Ampicillin/-	stabile Linien	diese Arbeit
pGL-ApoJ/Clusterin	Ampicillin/-	Reportergen-Exp.	(Cervellera et al., 2000)
pCMVbeta	Ampicillin/-	Reportergen-Exp.	Clontech, Heidelberg

### 2.2.8 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.

Abkürzung (Labornamen, wenn anders)	Sequenz
Primer für Klonierungen	
AICD50/58 AS Nhe	GATATATAGCTAGCCTAGTTCTGCATCTGCTCAAAGAAGCTT
C50 C-term S	GATATATACTCGAGTGATGCTGAAGAAGAAACAGTACACA
C50 N-term S	GATATATACTCGAGGCCACCATGGTGATGCTGAAGAAGAAACAGTAC
C58 C-term S	GATATATACTCGAGCGACAGTGATCGTCATCACC
C58 C-term AS	GATAGAATTCCTAGTTCTGCATCTGCTCAAAGAAGCTT
C58 N-term S	GATATATACTCGAGGCCACCATGGCGACAGTGATCGTCATCACC
C58 N-term AS	GATGAATTCGCGTTCTGCATCTGCTCAAAGAAGCTT

Primer für kompetitive PCR	
AICD50/59 S h Ko	TCCATTCATCATGGTGTGGT
AICD59 S h Kontr	GACAGTGATCGTCATCACCTTG
AICD50/59 AS h K	TGCATCTGCTCAAAGAAGCTTGT
FE65 S	CATCTTGACCCAGAGACAGA
FE65 AS	ATGAATGCAAACGTGTGGACAT
GAPDH S h 3'	CCTGACCTGCCGTCTAGAAA
GAPDH AS h 3'	TTACTCCTTGGAGGCCATGT
GAPDH S h middle	GGAGCCAAAAGGGTCATCATC
GAPDH AS h middle	CACTGACACGTTGGCAGTGG

Primer für die real-time PCR humaner Proben	
ACTA2 S	ATTGCCGACCGAATGCAG
ACTA2 AS	CAGAGTATTTGCGCTCCGGA
AICD50 S	TCCATTCATCATGGTGTGGT
AICD50 AS	TGCATCTGCTCAAAGAAGCTTGT
APG3L S	TACAAGCTGTCATTCCAACAATAGAA
APG3L AS	CATTACATTGTGAAGTGTCTTGTGTAGTC
ARHGFE12 S	AAGAGTTCTTTTGCCTTATTCCTTAT
ARHGFE12 AS	CCTACCAATTTATTATCAAAACCCTCA
ATP2C1 S	AAGTTGATTCCCAGGAGTGCC
ATP2C1 AS	CAGTGGTCACATCCTGTGCAA

Primer für die real-time PCR humaner Proben	
B3GNT4 AS	TCAGGCACATACCCACAAAGAC
BLZF1 S	ATGCCCATTTGCTTGGCC
BLZF1 AS	CACAGGCACTTCTGCAACAAA
CALD1 S	TTCAATGCCTGATGACCTATAAGAAG
CALD1 AS	CTTGGTCGAGATGATAGCATTAAATAAA
CASP6 S	TCTCAGCGCCGAGTGGAC
CASP6 AS	CCTGCTTCTTTCCAATTGCAC
CLU S	CTGGCAAACCTCACGCAAG
CLU AS	CGTGGTGACCCGCAGATAGTA
EPOR S	GCATTGCTGATTTTGTCTGCC
EPOR AS	CAAGGTTGTGGTTTCTGAGC
FE65 S	CATCTTGACCCAGAGACAGA
FE65 AS	ATGAATGCAAACGTGTGGACAT

Primer für die real-time PCR humaner Proben	
FEZ2_S	GAATCACCGGACCCAGAAGA
FEZ2_AS	AGCATTGAAAGCCGATCTGAC
FN1_S	GTGCTTCATGCCTTTAGATGTACAG
FN1_AS	AGAAGAACTCTAAGCTGGGTCTGC
GAPDH_S	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC
GAPDH_AS	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA
GLUL_S	CTCATTACAGCGCCTGCTTGAT
GLUL_AS	TGATCTCCCATGCTGATTCCTT
GSK3B_S	CCGTGGACAGACCAATAATGC
GSK3B_AS	GAGTGACACTCAAGTAACTGGTGGTT
HSPA9B_S	AGATTTAGCTTCAAGAATATGCCATG
HSPA9B_AS	AACAGCCCTTCCAAATCTTGAAT
HSPH1_S	TGCAGTCTCACCATTTGCATC
HSPH1_AS	ACCTTGGCAGGAACAAATGCT
ID2_S	CTGAATTCCCTTCTGAGTTAATGTCA
ID2_AS	CCGCTTATTCAGCCACACAGT
ID3_S	CAGAGCGTGGAGGTGTGGA
ID3_AS	CGCCGCCTTGGCATAGT
IGFBP3_S	GGAGCCCATCCAGGACACT
IGFBP3_AS	AGCATGAGAATGACTCTAAGTTCAACA
IKBKB_S	CTGTGGTCAAGTAAGTTTAGGGAGCTAT
IKBKB_AS	TGAATCTCCACAAAGCAAGTGAAA
Kai1_S (hKai1_V4_S)	CCGACAAGAGCAGTTTCATCTCT
Kai1_AS (hKai1_V4_AS)	AAGACATAGGCCCCCATCCT
MICAL2_S	CTCATCACAAACGCATGTCTGTG
MICAL2_AS	TGCTGTGTGCAAATACAGGG
MRLC2_S	ACCTTGATGATGATGAATGA
MRLC2_AS	TGACATCTTCAGGATCTGTGCC
NRG1_S	GCCTGTGCGCATGAGAACATTAA
NRG1_AS	GCCAACTAGTCGCGAACAGAG
PBX2_S	ATGGGAAGGGAGTTATTGCCA
PBX2_AS	TCCCTCTCCCTACCCCTTGAT
PMAIP1_S	CGAAGATTACCGCTGGCCT
PMAIP1_AS	CAGCCGCCAGTCTAATCAC
PRKC_S	TCAGCTGACCAGGTAGAGGATTC
PRKC_AS	TGACCATTAACATTCAATCAGTAGTTAAA
RAB3B_S	AGTCTACCGTCACGAGAAGCG
RAB3B_AS	CGCTCCTGCCAGCTGT
RPS2_S	AGAAGCTGCTCATGATGGCTG
RPS2_AS	AGGTAGCTGTAGGTCTTAGAAATGGC
SLC7A5_S	TATTTATTTCCAGTGGTCATGCTCA
SLC7A5_AS	AGTGGATGGCCCTGCGT
SOAT1_S	GGAAGAAATCACTTAAATACCTCTGGC
SOAT1_AS	TTCCCAATTGCATGTTCAA
TAGLN_S	AGAATGATGGGCACTACCGTG
TPM1_S	GAAGAGGTGGCCCGTAAGC
TPM1_AS	TGCACGTTCCAGGTCGCT
UBE2b_S	TGCAATGCATATCTGTTTATTCTGG
UBE2b_AS	CACAAGAAGAAGCAACTCAGCAG
ZNF236_S	GTTGTGTGTTAACTTGTTTATTGCAGCT
ZNF236_AS	GACAAACCACAACCTAGAATGCAGTG

### 2.2.9 Lösungen/Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

Lösung	Zusammensetzung/Hersteller
<b>DNA Gelelektrophorese</b>	
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat (pH 7,5) 1 mM EDTA
Auftragspuffer	50 % Glycerin 1 mM EDTA (pH 8,0; in DEPC Wasser) 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol FF
DNA Ladder low/middle range	Fermentas, Leon-Rot
Smartladder	Eurogentec, Köln
<b>RNA Gelelektrophorese</b>	
Agarosegel (1 %)	1 g Agarose 74 ml H <sub>2</sub> O 10 ml 10 x MOPS-Puffer nach Aufkochen auf ca. 60 °C abkühlen lassen 16 ml 37 %-iges Formaldehyd
Laufpuffer	100 ml 10 x MOPS-Puffer 100 ml 37 %-iges Formaldehyd 800 ml H <sub>2</sub> O
10 x MOPS-Puffer	20 mM MOPS 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA eingestellt auf pH 7 mit NaOH
Auftragspuffer	50 % Formamid 6,5 % Formaldehyd 1 x MOPS-Puffer 0,005 % Ethidiumbromid
<b>Alkalische Lyse</b>	
Lösung A	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 10 µg/ml RNase
Lösung B	1% SDS 0,2 M NaOH
Lösung C	3 M Kaliumacetat 2 M Eisessig

## 2.2.10 Lösungen für biochemische Arbeiten

Lösung	Zusammensetzung		
<b>Lösungen für Caspase-Assay</b>			
Caspase-Lysepuffer	10 mM HEPES pH 7,4 0,5 % CHAPS 42 mM KCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 1 mM DTT 5 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin A 1 mM PMSF		
Caspase-Reaktionspuffer	25 mM HEPES pH 7,5 1 mM EDTA 10 % Sucrose 0,1 % CHAPS 3 mM DTT mit 10 µM N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcoumarin		
Lysepuffer für den AICD-Nachweis	1 % NP40 150 mM NaCl 2 mM EDTA 2 mM 1,10 PTH 250 µg/ml Insulin 1 Inhibitortablette ("Roche", Mannheim) ad 50 ml H <sub>2</sub> O		
<b>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>			
Trenngel	40 % Acrylamid/Bis	12 %	15 %
	1 M Tris-HCl (pH 8,8)	3 ml	3,75 ml
Sammelgel	10 % SDS	3,75 ml	3,75 ml
	dest. H <sub>2</sub> O	100 µl	100 µl
	APS	3,15 ml	2,4 ml
	TEMED	100 µl	100 µl
		5 µl	5 µl
			5 %
	40 % Acrylamid/Bis		625 µl
	1 M Tris-HCl (pH 6,8)		50 µl
	10 % SDS		3,625 ml
	dest. H <sub>2</sub> O		50 µl
	APS		2,5 µl
	TEMED		

5x Auftragspuffer	100 mM Tris-HCl (pH 6,8) 8 % SDS 20 % Glycerin 0,01 % Bromphenolblau 20 % $\beta$ -Mercaptoethanol
10 x SDS-Laufpuffer	30,2 g Tris 188 g Glycin 100 ml 10 % SDS add 1 l H <sub>2</sub> O
5 % Magermilchsuspension	5 % Magermilchpulver (w/V) 100 ml TST
10 x TST	100 ml 1 M Tris-HCl (pH7,6) 300 ml 5 M NaCl 5 g Tween 20 ad 1 l H <sub>2</sub> O
Proteinmarker	Kaleidoscope Prestained Standard (BioRad, München) Kaleidoscope Polypeptide Standard (BioRad, München)

Tris-Tricine-Gelelektrophorese (zusätzliche Lösungen)	
17,5 % Tricine-Trenngel	2,5 ml 30 % Acrylamid 1,44 ml 1 M Tris pH 8,7 42,5 $\mu$ l 10 % SDS 152,5 $\mu$ l H <sub>2</sub> O 1,5 $\mu$ l TEMED 15 $\mu$ l 10 % Ammoniumpersulfat (APS)
Tricine-Sammelgel	0,25 ml 30 % Acrylamid 144 $\mu$ l 1 M Tris pH 6,8 15 $\mu$ l 10 % SDS 1040 $\mu$ l H <sub>2</sub> O 1,5 $\mu$ l TEMED 7,5 $\mu$ l 10 % Ammoniumpersulfat (APS)
Kathodenpuffer	12,11 g Tris 17,92 g Tricine 1 g SDS add 1 l H <sub>2</sub> O, pH nicht einstellen bei 4°C lagern
5x Anodenpuffer	121,1 g Tris 500 ml H <sub>2</sub> O pH auf 8,9 einstellen mit konz. HCl add 1 l H <sub>2</sub> O bei 4°C lagern
2x Tricine-Probenpuffer	1 ml 1 M Tris pH6,8 2,4 ml (3 g) Glycerol 0,8 g SDS 2 mg Coomassie blue G-250 0,31 g DTT auf 10 ml mit Wasser auffüllen

Western Transfer (Westernblot) und Nachweis von Proteinen	
Blotpuffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 200 ml Methanol add 1 l H <sub>2</sub> O
Ponceau-Lösung	0,5 % Ponceau S 1 % Trichloressigsäure
Blocklösung	5 % Magermilch in 1 x TST
Strip-Puffer	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2 % SDS 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol

Konzentrationsbestimmung von Proteinen	
Reagenz A	Biorad, München
Reagenz S	Biorad, München
Reagenz B	Biorad, München
Lysepuffer RPG (Reporter-genexperiment)	
CAT Elisa	Boehringer Mannheim, Mannheim

## 2.2.11 Antikörper

### 2.2.11.1 Primär-Antikörper

Antikörper	Verdünnung/ Konzentration	Hersteller/ Bezug
$\alpha$ -hFE65 aus Maus, 05-758	1:1000	Upstate, Dundee, UK
$\alpha$ -hAICD, C8, aus Kaninchen	1:500	(Selkoe et al., 1988)
$\alpha$ -hIGFBP3, ab4248, aus Kaninchen	1:1000 WB 1:40 IH	Abcam, Hiddenhausen
$\alpha$ -hTPM1, ab7786, aus Maus	1:100 WB 1:50 IH	Abcam, Hiddenhausen

### 2.2.11.2 Sekundär-Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller/ Bezug
$\alpha$ -Kaninchen aus Maus; Peroxidase, A2074	1:10000 blot	Sigma, Deisenhofen
$\alpha$ -Maus aus Ziege; Peroxidase, A3682	1:10000 blot	Sigma, Deisenhofen
$\alpha$ -Maus aus Ziege; Cy5, T1657	1:200	Sigma, Deisenhofen

### 2.2.12 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNA Ligase (E.coli)	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	NEB, Schwalbach Fermentas, St. Leon Rot
Reverse Transkriptase (SuperScript II)	Invitrogen, Karlsruhe
Reverse Transkriptase (M-MLV)	Biorad, München
Taq-Polymerase	Eppendorf, Hamburg Fermentas, St. Leon Rot
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Pfu-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim

### 2.2.13 Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Eppendorf, Hamburg
Super Script Choice System	Invitrogen, Karlsruhe
RNA Transcript labeling Kit	ENZO Diagnostics, Farmingdale, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Nucleo Spin RNA II	Machery Nagel, Düren
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
ECL Kit	Amersham Bioscience, Freiburg

### 2.2.14 Verwendete Software

Software	Hersteller
Primer Express (Primer Design)	Applied Biosystems, Darmstadt
5700 ABI SDS (real-time PCR Auswertung)	Applied Biosystems, Darmstadt
Expressionist (GeneChip Daten Auswertung)	GeneData, Martinsried
Clone (Klonierungs Software)	Scientific & Educational Software, Cary, USA
Ingenuity Pathway Analysis (GeneChip Daten Auswertung)	Ingenuity, Mountain View, USA
Genesis (ELISA Reader Software)	MTX Lab Systems, Vienna, USA

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Zellbiologische Arbeiten/Zellkultur

Medien und Zusätze für die Zellkultur wurden von den Firmen „Invitrogen“ (Karlsruhe) und „PAA“ (Cölbe) gekauft. Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C unter einer 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Die verschiedenen

Kulturmedien (RPMI 1640, DMEM) wurden mit 10 % Kälberserum (für induzierbares Zellkulturmodell tetrazyklinfrei getestet), 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin versetzt. Das Serum wurde vor der Verwendung für 30 min bei 56 °C inaktiviert. Primäre hippocampale Zellkulturen wurden in Neurobasalmedium, supplementiert mit 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 2 % (v/v) B27, kultiviert.

### **2.3.1.1 Humane Zelllinien**

Die für die Etablierung der in dieser Arbeit beschriebenen stabilen Zelllinien verwendeten SHEP-SF und Tet21 Neuroblastom-Zelllinien wurden in RPMI Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden ca. jeden 3.-4. Tag 1:3 bzw. 1:5 subkultiviert. Für die ferner verwendeten Linien SH-SY5Y, IMR-5 und KCN wurde ebenso verfahren.

#### **2.3.1.1.1 Trypsinierung und Subkultivierung von adhärent wachsenden Zellen**

Für die Subkultivierung von adhärent wachsenden Zellen wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA für ca. 3 min inkubiert. Sobald sich die Zellen von der Kulturschale gelöst hatten, wurden sie mit frischem Medium gesammelt, in ein 15 ml „Falcon“ Röhrchen überführt und für 5 min bei 1700 UpM (Stratos Zentrifuge) pelletiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml frisches Medium resuspendiert. Ein Aliquot dieser Lösung oder eine definierte zuvor bestimmte Zellzahlmenge wurde subkultiviert.

#### **2.3.1.1.2 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde aus einer Zellsuspension ein Aliquot entnommen, auf die Zählkammer überführt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro ml errechnet sich aus der Anzahl der Zellen eines Großquadrats (16 Kleinquadrante, entspricht 1µl) multipliziert mit 10<sup>4</sup> und dem Verdünnungsfaktor. Für jede Zellzahlbestimmung wurden vier Großquadrante ausgezählt. Alternativ erfolgte die Auszählung mit einem Casy Zellzähler.

#### **2.3.1.1.3 Langzeit-Aufbewahrung der Zellen**

In Gegenwart von 10 % DMSO wurden die verwendeten Zelllinien eingefroren und über längere Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert. Zellsuspensionen wurden dazu pelletiert, in ihrem Wachstumsmedium plus 10 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox bei -80 °C eingefroren.

Das Isopropanol bewirkt ein langsames Herunterkühlen der Zellsuspension (ca. 1 °C pro Minute). Nach einem Tag bei -80 °C wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff (-196 °C) überführt.

#### **2.3.1.1.4 Auftauen von tiefgefrorenen Zellen**

Kryokonservierte Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in ein 15 ml Röhrchen, in das frisches Medium vorgelegt wurde, überführt. Die Suspension wurde 5 min bei 1700 UpM (Stratos Zentrifuge) pelletiert und anschließend das DMSO-haltige Medium abgesaugt. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und anschließend in einer Kulturflasche im Brutschrank inkubiert.

#### **2.3.1.2 Hippocampale Primärzellkulturen der Maus**

Für das Anlegen hippocampaler Primärzellkulturen wurden 24 h vor der Präparation 24 Loch-Platten mit Deckgläschen versehen und diese mit 15 µg/ml Polyornithin über Nacht beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Lösung entfernt und zweimal mit PBS gewaschen. Neurobasalmedium wurde frisch mit 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 2 % (v/v) B27 supplementiert.

Die trächtige Maus (E18,5) wurde zervikal disloziert, die Bauchdecke geöffnet und der komplette Uterus mit den pränatalen Mäusen entnommen und in eine mit PBS gefüllte Kulturschale auf Eis überführt. Die einzelnen Embryonen wurden freipräpariert und der Kopf abgetrennt. Nach der Entnahme des Gehirns wurden Hirnhäute entfernt und die beiden Großhirnhemisphären vorsichtig abgeschert. Der Hippocampus wurde lokalisiert, präpariert und in ein mit 1 ml Neurobasalmedium befülltes 15 ml Röhrchen überführt. Auf diese Weise wurden entsprechend der Anzahl der Embryonen die Hippocampi gesammelt. Anschließend wurden die Hippocampi mit einer 1000-er Pipette vorsichtig homogenisiert. Die Zellsuspension wurde durch ein 100 µm Sieb filtriert und die Zellzahl mit der Neubauerkammer bestimmt. Entsprechend der bestimmten Zellzahl wurde so viel Medium supplementiert, dass pro Vertiefung der 24 Loch Platte 45000 Zellen in 500 µl ausgesät werden konnten. Am folgenden Tag wurde das Medium komplett gewechselt. Zur Inhibition mitotisch aktiver Zellen wurde nach vier Tagen das Medium gegen 10 µM AraC supplementiertes Medium gewechselt. Im Folgenden wurde alle drei Tage 300 µl altes gegen neues Medium getauscht.

### **2.3.1.3 Transfektion von Zellen und primärer hippocampaler Kulturen**

Die Neuroblastom-Zelllinien SHEP-SF, IMR-5, SH-SY-5Y und Tet21 wurden mit Lipofectamine 2000 („Invitrogen“, Karlsruhe) transfiziert.

Mit dem Ziel stabile Zelllinien zu etablieren, wurden konfluent gewachsene SHEP-SF und Tet21 Zellen einer 10 cm Schale einen Tag vor der Transfektion durch Trypsinierung abgelöst und in 6 Vertiefungen einer „6-well Platte“ ausgesät. Für transiente Transfektionen wurden konfluent gewachsene Zelllinien (alle genannten Linien) einer 10 cm Schale trypsiniert und in die Vertiefungen einer „24-well Platte“ entsprechend 400 µl Medium je „well“ ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit „Lipofectamine 2000“ transfiziert. Im Folgenden ist die Transfektion für eine „24-well Platte“ beschrieben. Für „6-well Platten“ wurden die verwendeten Mengen und Volumina entsprechend des Oberflächenverhältnisses umgerechnet. Zur Transfektion eines „wells“ wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1 µg DNA in 50 µl „OptiMem“ verdünnt. Ebenso wurden 4 µl „Lipofectamine 2000“ in 50 µl „OptiMem“ vorgelegt. Die Lösungen wurden für 5 min bei RT inkubiert, bevor die DNA Lösung zur „Lipofectamine“ Lösung gegeben wurde. Die kombinierte Lösung wurde für 20 min bei RT inkubiert und anschließend in das „well“ pipettiert. Die Zellen wurden anschließend für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Primäre hippocampale Neurone von Wildtyp-Mäusen wurden zwischen dem 7. und 10. Tag nach der Präparation mit „Lipofectamine 2000“ entsprechend obigen Angaben, allerdings nur für 5 h, transfiziert. Nach 5 h wurde der Überstand entfernt und frisches supplementiertes Neurobasalmedium zugegeben. Die AICD Lokalisation wurde wie in den Neuroblastom-Zelllinien 24 h nach Beginn der Transfektion analysiert.

### **2.3.1.4 Etablierung stabiler Zelllinien**

In „6-well Platten“ transfizierte SHEP-SF oder Tet21 Zellen wurden am dritten Tag nach der Transfektion einmal mit PBS gewaschen, trypsiniert und die Zellen jedes „wells“ auf eine 10 cm Kulturschale umgesetzt, die mit Selektionsagenz versetztes Medium enthielt. Auf diesen Platten entwickelten sich nach ca. 10 – 15 Tagen Klone mit mehr als ca. 300 Zellen/Klon. Positive grün fluoreszierende Klone dieser Größe wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop identifiziert, markiert und anschließend mit einer 100 µl Pipette gepickt und in „24-well Platten“ umgesetzt. Im Folgenden wurden die Klone entsprechend ihrer Proliferation auf größere Kulturschalen umgesetzt. Dabei wurden nur solche Klone kultiviert, die zu 100 % aus positiven Zellen bestanden und deutliche Grünfluoreszenz

zeigten. Während der Etablierung wurde stets mit Medien gearbeitet, die das Selektionsmedium enthielten. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde die Zellen ohne Selektionsdruck kultiviert.

### **2.3.1.5 Induktion von ER Stress und Apoptose**

AICD wurde mit einer Modulation von ER Calcium Leveln in Verbindung gebracht (Leissring et al., 2002), daher wurde die ER Stress-bedingte Induktion der Apoptose durch Inkubation der Zellen (konstitutive und induzierbare Linien) mit Thapsigargin (1  $\mu\text{M}$  in DMSO) untersucht. Thapsigargin inhibiert die sarko-/ endoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), die für die Rückführung von Calcium aus dem Zytosol ins ER verantwortlich ist. Die Thapsigargin-Behandlung führt zur fortschreitenden Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum.

Konstitutiv AICD exprimierende Zellen wurden 24 h mit 1  $\mu\text{M}$  Thapsigargin behandelt (DMSO als Kontrolle), anschließend Lysate mit Caspase-Lysepuffer erstellt und die Caspase-3 Aktivität gemessen. Induzierbare Linien wurden entsprechend des etablierten Waschprotokolls (3.2.3.1) für 72 h in differentiell Doxyzyklin enthaltenem Medium behandelt, bevor die Zellen für weitere 24 h mit 1  $\mu\text{M}$  Thapsigargin haltigem Medium (DMSO als Kontrolle) kultiviert wurden. Daraufhin wurde wie mit den konstitutiven Zellen verfahren.

### **2.3.1.6 Nachweis von Apoptose**

#### **2.3.1.6.1 Caspase-3 Aktivitätsmessung (Caspase-Assay)**

Aus zuvor behandelten Zellen wurden durch Lyse zytosolische Extrakte gewonnen (150 – 200  $\mu\text{l}$  Caspase-Lysepuffer). Deren Caspase-Aktivität wurde anschließend durch Inkubation der Zelllysate (30-50  $\mu\text{l}$  Lysat) mit 10  $\mu\text{M}$  des fluorogenen Substrates „DEVD-AMC“ in 150  $\mu\text{l}$  Caspase-Reaktionspuffer bestimmt. Das Substrat („N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethyl-coumarin“, „Bachem“, Heidelberg) besteht aus einem Tetrapeptid (DEVD), das als Caspase-Spaltstelle dient und dem daran gekoppelten Fluorophor „Aminomethylcoumarin“ (AMC). Das durch Caspase-Spaltung freigesetzte Aminomethylcoumarin kann fluorometrisch nach Anregung mit 360 nm bei einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen werden. Die DEVD Sequenz wird auch von Caspase-3 ähnlichen Caspasen (wie -7 und -6) gespalten.

### **2.3.1.6.2 Hoechst 33342 Färbung**

Konstitutiv AICD und induzierbar AICD/FE65 exprimierende Zelllinien wurden hinsichtlich potentieller Apoptose-Induktion mikroskopisch durch Auszählung von Zellen mit kondensiertem und fragmentiertem Chromatin nach „Hoechst 33342 Färbung“ untersucht.

Dazu wurden die Zellen für 15 min mit 4 % Formaldehyde in PBS bei 37 °C fixiert, für 3 min mit 0,5 % TritonX100 permeabilisiert und anschließend 2x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 µg/ml „Hoechst 33342“ versetzt. Anschließend wurde in mehreren, zufällig ausgewählten Regionen der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen durch Auszählen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Es wurden jeweils 100-500 Zellen ausgezählt.

## **2.3.2 DNA-Arbeitstechniken**

### **2.3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse**

Mit der alkalischen Lyse kann Plasmid-DNA aus einer kleineren Bakterienkultur gewonnen werden. Dazu wurden 2 ml Übernachtskultur (LB + Antibiotikum) 1 min bei 13.000 UpM (Tischzentrifuge) zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lösung A resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung B wurden die Bakterien für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden 150 µl eisgekühlte Lösung C zugegeben, der Ansatz mehrfach invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13.000 UpM (Tischzentrifuge) wurde der Überstand abgenommen und durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol die Plasmid-DNA gefällt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13.000 UpM (Tischzentrifuge) wurde das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, nochmals 5 min bei 13.000 UpM (Tischzentrifuge) zentrifugiert, vakuumgetrocknet und anschließend in 10-50 µl Aqua bidest. gelöst.

### **2.3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab**

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA einer 100 ml Übernachtskultur (LB + Antibiotikum), wurde diese bei 4 °C und 5500 UpM (GSA-Rotor, Sorvall) zentrifugiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit einem Plasmid-Isolations-Kit der Firma „Qiagen“ nach Angaben des Herstellers.

### **2.3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und RT-PCR**

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde als kompetitive PCR (mit GAPDH als Referenz-Gen) zur quantitativen Analyse der Expression von AICD und FE65 genutzt. Als Matrize wurde 1 µl cDNA eingesetzt, als Negativkontrolle 0,1 µg nicht revers transkribierte RNA. Die

Zyklenzahl und Annealing-Temperaturen wurden an die verwendeten Primer angepasst und optimiert. Ein typischer PCR Ansatz enthielt:

1  $\mu$ l cDNA  
600 nMol „sense“ Primer  
600 nMol „antisense“ Primer  
10  $\mu$ l 2x Reaktionspuffer (enthält 10 mM dNTPs)  
1 U Taq Polymerase  
add 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Für die PCR-Reaktionen wurde i.d.R. folgendes Protokoll verwendet:

1. Initiale Inkubation bei 95 °C für 1 min
2. Denaturierung: 95 °C für 30 sec
3. Annealing: 56-58 °C für 60 sec
4. Elongation: 72 °C für 60 sec
5. Wiederholung ab Schritt 2 für 25-40 Zyklen

Je nach Expressionsverhältnis des untersuchten Gens zur Referenz GAPDH muss mit einer bestimmten Anzahl Vorlaufzyklen gearbeitet werden (für kompetitive PCR), bevor GAPDH Primer hinzugegeben werden und weiter amplifiziert wird. Für die kompetitive PCR von AICD und GAPDH waren keine Vorlaufzyklen notwendig. Die Analyse wurde mit 25 Zyklen durchgeführt. Die ersten fünf Zyklen der kompetitiven PCR für FE65 und GAPDH wurden nur mit FE65 Primern durchgeführt. Daraufhin wurden GAPDH Primer hinzugegeben und der Ansatz weitere 25 Zyklen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit 10 x Auftragspuffer versetzt und in einem 1-2 %-igen Agarosegel aufgetrennt.

Ferner wurde die PCR für die AICD Klonierung verwendet (siehe 2.3.4). Als Matrize dienten 500 ng DNA in einem 100  $\mu$ l Reaktionsvolumen bei an die Primerlänge (eingefügte Restriktionsschnittstellen, Start- Stoppcodon oder Kozaksequenz) angepassten „Annealing“ Temperaturen.

#### **2.3.2.4 Real-time PCR**

Die Real-time PCR wurde zur quantitativen Analyse von AICD, FE65 und allen in dieser Arbeit untersuchten potentiellen Zielgenen genutzt. Als Referenz diente das „house-keeping Gen“ GAPDH. 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. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µl cDNA

1,25 µl Primermix (4,5 µM sense und 4,5 µM antisense Primer)

6,25 µl 2x „SYBR-Green“ Mastermix (enthält dNTPs und Polymerase)

add 12,5 µl H<sub>2</sub>O

Die Reaktionsbedingungen waren:

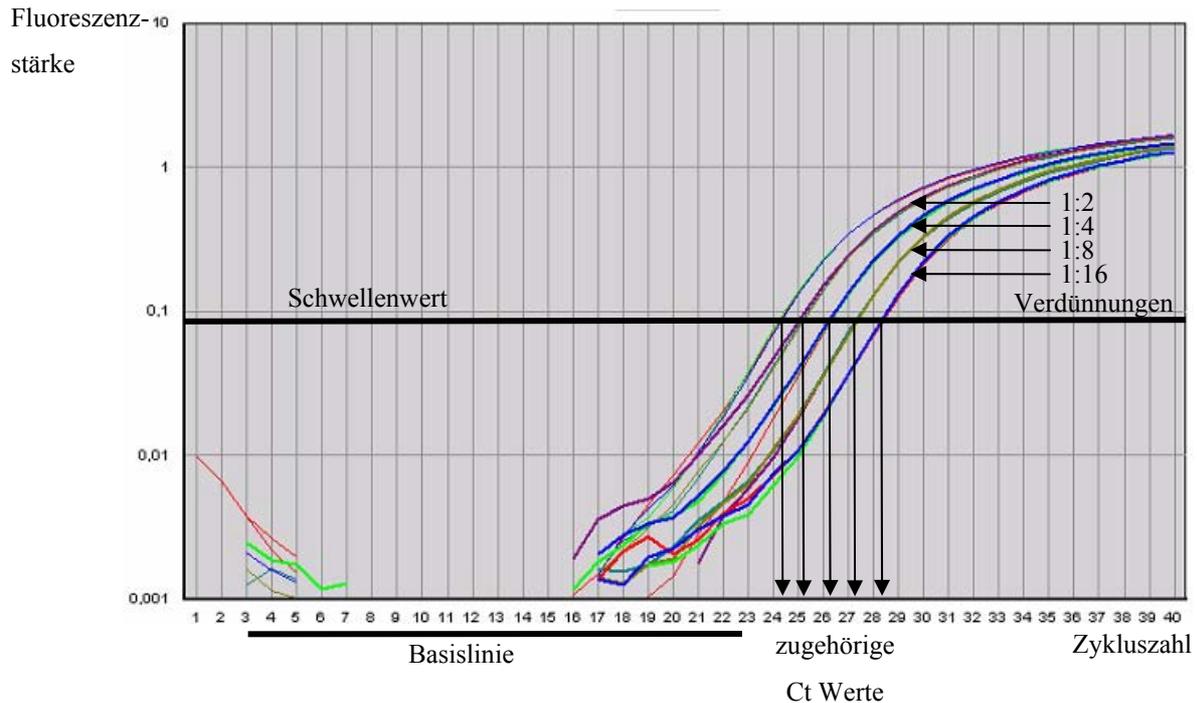
1. Initiale Inkubation bei 50 °C für 2 min
2. Enzymaktivierung bei 95 °C für 15 min
3. Denaturierung: 95 °C für 15 sec
4. Annealing und Elongation 60 °C für 60 sec
5. Wiederholung ab Schritt 3 für 40 Zyklen

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 man zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren unterscheiden, da Primerdimere bei geringeren Temperaturen schmelzen als die spezifischen, größeren PCR-Produkte.

Real-time PCR Analysen wurden stets als Dupli- oder Triplikate durchgeführt.

Die Auswertung der real-time PCR Daten erfolgte nach der ddCt Methode. 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 (Abbildung 6). In der exponentiellen Phase ist die PCR nicht durch Mangel an Matrize, Primer oder Enzym limitiert. Dann wurde für jede Probe der dem Schwellenwert zugehörige Ct Wert bestimmt und mit dem Ct Wert der GAPDH Analyse verrechnet ( $dCt = Ct_{Gen} - Ct_{GAPDH}$ ). Dies wurde in Analogie für die Kontrolle berechnet, also z.B. für real-time PCR Analysen von nicht-induzierten Zellklonen. Aus den so erhaltenen beiden dCt

Werten wird erneut die Differenz gebildet (z.B.  $ddCt = dCt(\text{nicht-induziert}) - dCt(\text{induziert})$ ). Der  $ddCt$  Wert in Potenz zur Basis 2 ergibt schließlich den Regulationsfaktor. Bei einer Hochregulation ist dieser bei der angegebenen Berechnung  $>1$ , bei einer Herunterregulation  $<1$ . Für die häufig quantifizierten Expressionslevel der Gene AICD und FE65 wurde darüber hinaus eine Verdünnungsreihe erstellt, die die Grundlage für eine exakte Berechnung des Regulationsfaktors ermöglicht (Abbildung 6).



**Abbildung 6 – Auswerteparameter der Real-time PCR Analyse.** Dargestellt ist eine cDNA-Verdünnungsreihe, in der die Expression von AICD quantifiziert wurde. Die Basislinie definiert das Grundrauschen der Analyse und wird in der Regel auf den Bereich zwischen dem 3. und einem Zykluswert, der einen Ct Wert vor dem Schnittpunkt der ersten Kurve mit dem Schwellenwert liegt, festgelegt. Der Schwellenwert schneidet alle Kurven in deren exponentiellen Phase und definiert so für jede Analyse einen zugehörigen Ct Wert, der Grundlage zur Errechnung von  $dCt$  Werten ist. Für diese  $dCt$  Werte wird i.d.R. eine Analyse eines „house keeping“ Gens wie GAPDH verwendet. Bei einer 1:2 Verdünnungsreihe ist der Ct Wert Abstand zwischen benachbarten Kurven im optimalen Fall gleich eins, so dass pro Zyklus exakt eine Verdopplung des PCR Produkts stattfindet.

Für eine Verdünnungsreihe wurde die cDNA in 1:2 Schritten verdünnt und fünf verschiedene Verdünnungsstufen mittels real-time PCR quantifiziert. Sofern der Abstand zwischen benachbarten Verdünnungsstufen jeweils einem Ct Wert entspricht (bei einer 1:2 Verdünnung) ist eine Duplikation mit jedem PCR Zyklus sichergestellt. In diesem Fall ist die Berechnung des Regulationsfaktors durch Potenzierung zur Basis 2 gerechtfertigt, was sowohl für die AICD wie auch für die FE65 Analyse der Fall war.

### **2.3.2.5 DNA-Restriktionsverdau**

Plasmide und PCR-Amplifikate wurden mit Restriktionsenzymen nach Angaben des Herstellers verdaut. Die DNA wurde in der Regel mit 1/10 Vol. Reaktionspuffer und 2 bis 10 Units Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA inkubiert. Das Volumen des eingesetzten Enzyms betrug maximal 1/10 des Endvolumens. Der Restriktionsverdau dauerte zwischen 1 und 12 Stunden bei der für das Enzym geeigneten Temperatur. Für einen Doppelverdau wurde der Reaktionspuffer verwendet, bei dem beide Enzyme die höchste Aktivität hatten.

### **2.3.2.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Für Klonierungsarbeiten mussten DNA-Fragmente (PCR-Produkte, Restriktionsenzym verdaute Plasmid-DNA) von Proteinen, RNA, Salzen und Nukleotiden aufgereinigt werden. Dazu wurde die das interessierende DNA-Fragment enthaltene Lösung elektrophoretisch aufgetrennt, die gewünschte Bande unter UV-Licht lokalisiert und ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit dem „Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Alternativ ( $\text{N}_2$ -Methode) wurde das Gelstück in ein zur Hälfte mit Cellulose gefülltes 0,5 ml Reaktionsgefäß mit durchbohrtem Boden überführt, das geschlossene Gefäß für 5 min in flüssigem  $\text{N}_2$  gefroren, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und durch Zentrifugation bei 3000 g für 10 min die zu isolierende DNA im unteren Gefäß gesammelt. Die Agarose hingegen wird durch die Cellulose zurückgehalten. Mit diesen Methoden aufgereinigte DNA konnte direkt für Ligationen eingesetzt werden.

### **2.3.2.7 Phenol-Chloroform Extraktion von DNA**

Enzymatisch behandelte DNA wurde mittels Phenol-Chloroform Extraktion aufgereinigt, indem 300  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung mit dergleichen Menge Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt wurde, kräftig gemischt und bei 13000 UpM (Tischzentrifuge) für 5 min zentrifugiert wurde. Anschließend wurde die obere wässrige Phase abgenommen, mit 300  $\mu\text{l}$  Chloroform versetzt, erneut gemischt und zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und präzipitiert.

### **2.3.2.8 Präzipitation und Aufreinigung von DNA aus wässrigen Lösungen**

Unter Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat Lösung (pH 5,2) und 2,5 Vol. 100 % Ethanol wurde DNA aus wässrigen Lösungen nach 30-minütiger Inkubation bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  und anschließender Zentrifugation (15 min, 13000 UpM, Tischzentrifuge) gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen, erneut zentrifugiert, an der Luft getrocknet und

schließlich in einem geeignetem Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen. Alternativ kann die Fällung mit 1 Vol. Isopropanol anstelle von 2,5 Vol. Ethanol durchgeführt werden.

### **2.3.3 Analytische Methoden**

#### **2.3.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

DNA- und RNA-Proben wurden spektrometrisch bei 260 und 280 nm vermessen. Eine optische Dichte  $OD_{260} = 1,0$  entspricht für doppelsträngige DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, für RNA 40 µg/ml. Das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$ , das Aufschluss über die Reinheit der gemessenen Nukleinsäure gibt, sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

#### **2.3.3.2 DNA Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente wurden nach ihren Molekulargewichten elektrophoretisch für analytische und präparative Zwecke aufgetrennt. Dazu wurde eine 1 – 2 %-ige Agarose-Lösung in TAE Puffer angesetzt, in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht, mit 10 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in abgedichtete Horizontalkammern mit eingesetztem Kamm gegossen. Aufzutragende Proben wurden mit 1/10 Vol. 10 x Auftragspuffer versetzt, in die Kammern gefüllt und schließlich bei 10 – 15 V/cm<sup>2</sup> für 30 – 120 min aufgetrennt.

#### **2.3.3.3 DNA- Sequenzierung**

Durch Klonierung erstellte Vektoren wurden bei „MWG-Biotech“ (Ebersberg) sequenziert.

### **2.3.4 Klonierungstechniken**

Grundlage der Klonierungstechniken ist der DNA- Restriktionsverdau, der unter 2.3.2.5 nachzulesen ist. Im Folgenden werden weitere benötigte Techniken beschrieben.

#### **2.3.4.1 Dephosphorylierung von DNA**

Um die intramolekulare Ligation von durch Restriktionsverdau linearisierten Plasmiden zu verhindern, wurden diese mit 1/10 Vol. 10x Phosphatasepuffer und 4 µl alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm versetzt und bei 56 °C für 1 h inkubiert, was eine Abspaltung der endständigen 5'- Phosphatgruppe bewirkt.

#### **2.3.4.2 Ligation von DNA- Fragmenten**

Die DNA-Ligase katalysiert unter ATP Verbrauch die kovalente Verknüpfung einer 3'-OH- mit einer 5'-Phosphat-Gruppe unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung. Für die

Ligation wurde folgender Ansatz gewählt:

- 7 µl zu inserierendes Fragment
- 1 µl linearisierter und ggf. dephosphorylierter Vektor (ca. 50 ng DNA)
- 1 µl Ligase- Puffer
- 1µl T4- DNA- Ligase (1U/µl)

Die Inkubation erfolgte bei 16°C über Nacht.

### **2.3.4.3 Kultivierung von Bakterien**

Der *E.coli* Stamm DH5 $\alpha$  wurde auf LB-Agar-Platten bei 37 °C kultiviert. Für plasmidtragende Stämme wurden die entsprechenden Selektionsmedien gewählt. Für Flüssigkulturen wurde LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und für 8 h (Vorkultur) oder über Nacht (Hauptkultur) bei 37 °C im Schüttler bei 220 UpM inkubiert. Zur dauerhaften Lagerung wurden Glycerinkulturen mit einer Glycerin-Endkonzentration von 50 % (v/v) angesetzt und diese bei -80 °C tiefgefroren. Für das Wieder-Auftauen dieser Kulturen wurde mit einer abgeflamten Impföse wenig Bakterienmaterial entnommen, auf eine LB-Agar-Platte überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **2.3.4.4 Herstellung kompetenter Bakterien für die Hitzeschocktransformation**

Eine 1000 ml Bakterienkultur in der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,6 - 0,7$ ) wurde auf Eis 30 min gekühlt, 10 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert, das Pellet in 20 ml eiskaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen, 5 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert, in 10 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert, 5 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert und in 2,5 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> mit 15 % Glycerin aufgenommen. Die Suspension wurde aliquotiert, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **2.3.4.5 Hitzeschock- Transformation**

Ein Aliquot kompetente Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, zu maximal 500 ng Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz gegeben und 30 min aus Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde für 90 s bei 42 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Suspension 2 min auf Eis abgekühlt, 1000 µl LB Medium hinzugefügt und 45 min bei 37 °C inkubiert. Für Plasmid-DNA Transformationen wurden 50 µl dieses Ansatzes auf eine Agarplatte mit Selektionsmedium ausplattiert, während für Ligationsansätze die Kultur zuvor noch bei 4000 g für 5 min zentrifugiert wurde und der Überstand bis auf einen kleinen Rest zum Resuspendieren abgenommen wurde. Die komplett resuspendierte Kultur wurde dann ausplattiert. Die Agarplatte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.3.4.6 Übersicht über die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen

Für alle im Rahmen der Klonierungen durchgeführten PCRs wurde Pfu Polymerase verwendet.

#### **AICD-EGFP-Fusions- und AICD-IRES-EGFP Konstrukte:**

AICD wurde mittels PCR aus einem wtAPP enthaltenen Vektor (erhalten von C. Kaether, LMU München) amplifiziert. Für pEGFP-AICD59 Vektoren wurden die Primer C58\_C\_term\_S und C58\_C\_term\_AS, für pEGFP-AICD50 Vektoren die Primer C50\_C\_term\_S und C58\_C\_term\_AS, für pAICD59-EGFP Vektoren die Primer C58\_N\_term\_S und C58\_N\_term\_AS und für pAICD50-EGFP Vektoren die Primer C50\_N\_term\_S und C58\_N\_term\_AS verwendet. Entsprechend der EGFP Lokalisation am N- oder C-Terminus von AICD enthielten die Primer Kozaksequenz und Start- bzw. Stoppcodon. Ebenso wurde mittels der Primer die entsprechende Restriktionsenzym-Schnittstelle (XhoI bzw. EcoRI) eingefügt.

Für pAICD-IRES-EGFP Vektoren wurden für AICD50 die Primer C50\_N\_term\_S und C58\_C\_term\_AS und für AICD59 die Primer C58\_N\_term\_S und C58\_C\_term\_AS verwendet. Durch die Primer wurden Kozak Sequenz, Start-, Stoppcodon und Restriktionsenzym-Schnittstellen (XhoI bzw. EcoRI) eingefügt.

Alle oben beschriebenen Amplifikate wurden Phenol-Chloroform aufgereinigt und anschließend mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI verdaut. Der Verdau wurde auf ein präparatives 2 %-iges EtBr Gel aufgetragen. AICD Banden wurden isoliert und mit dem „PCR Purification Kit“ von „Qiagen“ oder der N<sub>2</sub>-Methode aufgereinigt. Die Vektoren pEGFP-N1, pEGFP-C1 und pIRES2-EGFP (alle „Clontech“, Heidelberg) wurden ebenfalls mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI verdaut und auf einem 1 %-igen präparativen Gel aufgetrennt. Die Vektorbande wurde ausgeschnitten und mit dem „PCR Purification Kit“ von „Qiagen“ aufgereinigt. Das AICD „Insert“ wurde in den Vektor ligiert. Anschließend wurde der komplette Ligationsansatz in *E.coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Flüssigkulturen von gewachsenen Klonen wurden angeimpft und schließlich Plasmide isoliert. Die resultierenden Vektoren wurden mit pEGFP-AICD50, pEGFP-AICD59, pAICD50-EGFP, pAICD59-EGFP, pAICD50-IRES-EGFP und pAICD59-IRES-EGFP bezeichnet.

#### **Induzierbare AICD Konstrukte:**

AICD wurde mittels PCR aus einem wtAPP enthaltenen Vektor (erhalten von C. Kaether, LMU München) amplifiziert. Als Primer dienten für AICD50 C50\_C-term\_S und

AICD50/58\_AS\_Nhe, für AICD59 C58\_N-term\_S und AICD50/58\_AS\_Nhe. Kozaksequenz, Start- und Stoppcodon sowie Restriktionsenzym Schnittstellen für XhoI und NheI wurden über diese Primer eingefügt. Die Amplifikat Aufarbeitung, Ligation und Transformation erfolgte analog den oben beschriebenen Konstrukten. Der Vektor pBI-MCS-EGFP („Clontech“, Heidelberg, modifiziert) wurde entsprechend mit den Restriktionsenzymen XhoI und NheI verdaut. Die resultierenden Vektoren wurden mit pBI-A50 (bzw. kurz iA50 für induzierbarer AICD50 Klon) bzw. pBI-A59 (iA59) bezeichnet.

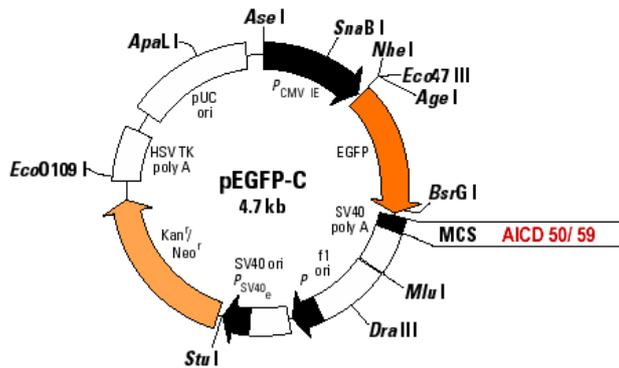
#### **Induzierbare FE65 Konstrukte:**

Die für FE65 codierende Sequenz entstammt ursprünglich dem Vektor pFE65myc-pCIneo (erhalten von T. Russo, CEINGE, Neapel, Italien). Im Rahmen weiterer Experimente wurde die FE65 cDNA mehrfach umklontiert. Aus dem Vektor FE65myc-pCIneo wurde FE65 über EcoRI und SmaI Verdau geschnitten und in den ebenso verdauten Vektor pIRES2-dsRED2 („Clontech“, Heidelberg) ligiert. Aus dem resultierenden Vektor wurde FE65 cDNA über EcoRI und BamHI geschnitten und in den Vektor pIRESbleo3 („Clontech“, Heidelberg) ligiert. Aus dem resultierenden Vektor wurde FE65 cDNA über EcoRV und EheI Verdau geschnitten und schließlich in den induzierbaren Vektor pBI-EGFP ligiert. Dieser war zuvor mit dem Enzym PvuII linearisiert und mit alkalischer Phosphatase behandelt worden. Der nach der Transformation resultierende Vektor wurde mit pBI-F (bzw. kurz iF) bezeichnet.

#### **Induzierbare AICD/FE65 Konstrukte:**

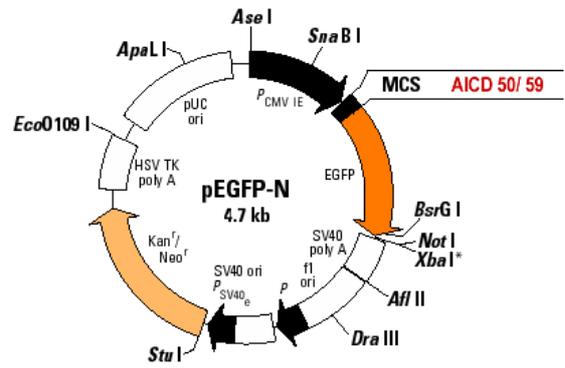
Der Vektor pBI-F wurde mit dem Restriktionsenzym EheI linearisiert und mit Alkalischer Phosphatase behandelt. Aus dem Vektor pAICD50-IRES-EGFP bzw. pAICD59-IRES-EGFP wurde AICD50 bzw. AICD59 mit den Restriktionsenzymen NheI und NaeI herausgeschnitten und in den linearisierten Vektor ligiert und transformiert. Die resultierenden Konstrukte wurden mit pBI-FA50 (im Folgenden mit iFA50 bezeichnet für „induzierbarer Klon/Vektor, der FE65 und AICD50 induziert“) bzw. pBI-FA59 (iFA59) bezeichnet. Die folgende Abbildung zeigt die wichtigsten der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren (Abbildung 7).

A



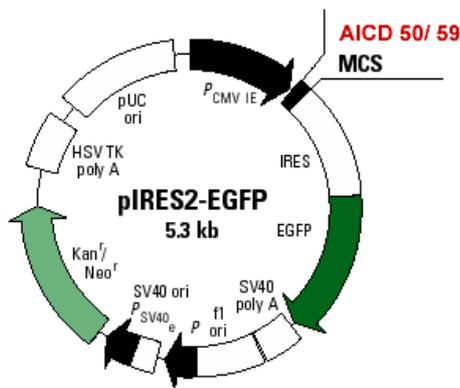
Bezeichnung:  
pEGFP-AICD50  
pEGFP-AICD59

B



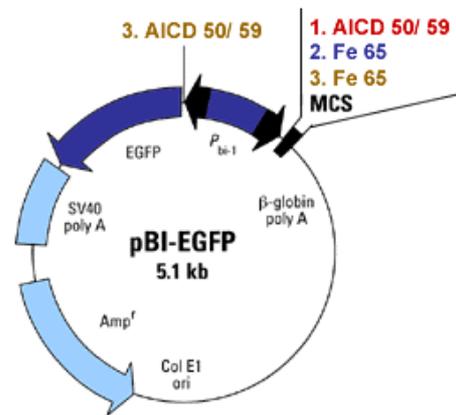
Bezeichnung:  
pAICD50-EGFP  
pAICD59-EGFP

C



Bezeichnung:  
pAICD50-IRES-EGFP  
pAICD59-IRES-EGFP

D



Bezeichnung:  
iA50 (induzierbar für AICD50)  
iA59 (induzierbar für AICD59)  
[iA bezeichnet im Folgenden Mittelwerte aus iA50 und iA59 Analysen]  
iF (induzierbar für FE65)  
iFA50 (induzierbar für AICD50 und FE65)  
iFA59 (induzierbar für AICD59 und FE65)  
[iFA bezeichnet im Folgenden Mittelwerte aus iFA50 und iFA59 Analysen]

**Abbildung 7 - Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und ihrer Bezeichnungen zur Expression von AICD und/oder FE65.** A), B) Vektoren zur Expression von AICD-EGFP Fusionsproteinen. C) Vektor zur Expression von AICD, mit dem stabile konstitutiv AICD exprimierende Zelllinien etabliert wurden. D) Vektorfamilie zur Expression von induzierbarem AICD, FE65 oder AICD und FE65. Mit diesen Vektoren wurden stabile induzierbare Zelllinien erstellt.

Bemerkungen:

1. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch induzierbare AICD Konstrukte mit dem lacZ Gen als Reporter kloniert. Da die daraus erstellten Zelllinien für die vorliegende Arbeit nicht verwendet wurden, sind die entsprechenden Klonierungen hier nicht aufgeführt.
2. Die „erste Generation“ doppelt (FE65 und AICD) induzierbarer Linien wurde auf Grundlage eines Vektors etabliert, bei dem AICD an den C-Terminus eines FE65-IRES Konstrukts kloniert wurde. Nach Etablierung stabiler Linien zeigte sich, dass die so erreichbare AICD Induktion nur mittels real-time PCR auf einen Faktor von ca. vierfacher Expressionserhöhung nachweisbar war. Im Westerblot war AICD dagegen auch nach Immunpräzipitation nicht nachweisbar. Das verwendete Plasmid schien daher nicht funktionsfähig zu sein bzw. die Expression von AICD war so gering, dass das entstehende sehr kleine Peptid sofort abgebaut wurde. Diese Zelllinien wurden nicht weiter verwendet.

### **2.3.5 RNA Arbeitstechniken**

#### **2.3.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA und cDNA Synthese**

Die Gesamt-RNA aus 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.

Isolierte Gesamt-RNA wurde mit dem iScript System (Biorad, München) in cDNA umgeschrieben, wobei 250 ng (Zelllinien) bzw. 1 µg (cerebrales Gewebe) Gesamt-RNA eingesetzt wurde.

#### **2.3.5.2 RNA- Gelelektrophorese**

Einzelsträngige RNA kann Sekundärstrukturen ausbilden, die zu unberechenbaren Änderungen des Laufverhaltens im elektrischen Feld führen können. Um dies zu verhindern, wurde die RNA unter denaturierenden Bedingungen im 1 %-igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Die RNA-Proben wurden mit 2,5 Vol. Ladepuffer 5 – 10 min bei 60 °C

denaturiert und anschließend mit 1/10 Vol DNA-Laufpuffer versetzt. Der Gellauf erfolgte bei 100 V für ca. 1 h.

### **2.3.6 Analyse von Proteinen**

#### **2.3.6.1 Gesamtzellextraktion**

Gesamtzellextrakte wurden für Westernblots, Caspase Assays und Immunpräzipitationen erstellt. Entsprechend wurden Zellkulturen oder Gewebe in CHAPS-Lysepuffer, Caspase-Lysepuffer oder Lysepuffer für den AICD-Nachweis aufgenommen. Zellkulturen wurden zuvor mit 1 x PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert (1700 g (Stratos Zentrifuge), 5 min).

#### **2.3.6.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Proteinkonzentrationen wurden nach der Lowry Methode bestimmt. Dazu wurden jeweils 5 µl der Proben bzw. einer 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.

#### **2.3.6.3 Immunpräzipitation**

AICD ist ein sehr kurzlebiges Proteinfragment, das schnell durch das Proteasom oder durch das „Insulin-Degrading-Enzyme“ (IDE) abgebaut wird (Nunan et al., 2001; Nunan et al., 2003). Ohne „tag“ war AICD nur nach vorangehender Immunpräzipitation nachweisbar. Dafür wurden je vier konfluente für 72 h induzierte und nicht-induzierte 10 cm Schalen (für konstitutiv exprimierende Zellen entsprechende Kontrolle) gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer für den AICD Nachweis resuspendiert, das Lysat 1 h bei 37 °C inkubiert, 10 min auf Eis gekühlt und bei 10000 UpM (Tischzentrifuge) für 1 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 3 µl C8 AICD Antikörper gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden für jede Präzipitation 30 µl Protein-G-Agarose mit 500 µl Lysepuffer gewaschen (Zentrifugation bei 2000 UpM (Tischzentrifuge) für 1 min) und die Lysat-Antikörper Lösung zu den „beads“ gegeben. Während der Inkubation über Nacht bei 4 °C binden die Antikörper über ihre Fc-Teil an die Agarose. Darauf wurden die „beads“ dreimal mit Lysepuffer gewaschen (letzte

Zentrifugation bei 5000 UpM (Tischzentrifuge) und gebundene Antigen-Antikörper Konjugate durch 5-minütige Inkubation mit 20 µl 1x Auftragspuffer eluiert.

#### **2.3.6.4 Western-Analytik**

##### **2.3.6.4.1 SDS-PAGE**

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe und Ladung erfolgte in Acrylamidgelen. Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich dabei unspezifisch an Proteine an und führt zur Dissoziation von Untereinheiten sowie zur negativen Gesamtladung der Proteine. Im elektrischen Feld können die Proteine anschließend aufgetrennt werden und wandern entsprechend ihrer Gesamtladung, die proportional zu ihrer Größe ist.

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden zwei Gele (Sammel- und Trenngel), die sich in der Acrylamid-Konzentration sowie im pH-Wert unterscheiden, übereinander geschichtet. An der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel entsteht eine scharfe Protein-Bande; nach dem Weiterlaufen in das Trenngel erfolgt eine reproduzierbare Auftrennung der Proteine. Die Polymerisierung der Gele erfolgte ausgehend von Acrylamid (Monomer) und Bisacrylamid (bifunktional) und wurde durch Zugabe von TEMED (Katalysator) und APS (Quervernetzung) gestartet. Die Gelbox wurde in die Gelkammer eingespannt und mit 1 x SDS-PAGE-Laufpuffer bedeckt. Die Proteinproben, in Auftragspuffer aufgenommen und kurz aufgeköcht (3-5 min, 90 °C), wurden in die Geltaschen gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke (Einlauf: 15 mA für ca. 30 min; Auftrennung: 20-25 mA für ca. 1-1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> h).

##### **2.3.6.4.2 Tris Tricine Gele**

Für den Nachweis immunpräzipitierten AICDs wurden 17,5 %-ige Tris-Tricine-Gele verwendet. Die Herstellung dieser Gele unterscheidet sich nicht von denen der SDS-Page, lediglich wurden andere Trenn- und Sammelgel- Lösungen verwendet. Für die elektrophoretische Auftrennung wird in der Innenkammer Kathodenpuffer, in der Außenkammer Anodenpuffer verwendet. Laufbedingungen entsprachen denen der SDS-PAGE.

##### **2.3.6.5 Westernblot**

Der Transfer von Proteinen auf (Nitrocellulose-) Membranen wird als Western Blot bezeichnet. Für den Transfer wurde ein elektrophoretisches Naß-Blotverfahren benutzt. Die verwendete Apparatur („Blotter“) besteht aus anodischem und kathodischem Pol.

Proteingel und Nitrocellulosemembran werden in einer Klemmvorrichtung wie folgt angeordnet. Auf ein mit Blotpuffer angefeuchtetes Schwämmchen werden 3 Lagen „Whatman“-Papier (ebenfalls angefeuchtet), das Proteingel, die Nitrocellulosemembran, 3 Lagen feuchtes „Whatman“-Papier und wiederum ein Schwämmchen (angefeuchtet) gelegt. Die Klemmvorrichtung wird geschlossen und so im „Blotter“ angeordnet, dass das Proteingel zum kathodischen Pol weist.

Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V und einer maximalen Stromstärke von 0,25 A für 60 min. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran für 5 min in Ponceau-Lösung geschwenkt. Die aufgetrennten Proteine erscheinen als gefärbte Banden.

#### **2.3.6.6 Immundetektion von Proteinen**

Die auf die Nitrocellulose-Membran geblotteten Proteine wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungen in 5 % Magermilchsuspension inkubiert (1 h bei RT). Dann wurde der Primär-Antikörper, in 5 % Magermilchsuspension verdünnt (je nach AK 1:500-1:1000), zur Membran gegeben und die Membran für 60-90 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C in der Lösung auf einem Schüttler inkubiert. Nach drei Waschschritten (5 min in TST) wurde der Sekundär-Antikörper in der vom Hersteller angegebener Verdünnung in 5 % Magermilchsuspension für 1 h mit der Membran inkubiert. Nach anschließendem mehrmaligen Waschen der Membran mit TST erfolgte die Detektion nach dem ECL-Protokoll.

#### **ECL-Kit (Enhanced Chemiluminescence)**

Das an den Zweitantikörper gekoppelte Enzym Rettich-Peroxidase (HRP, „horseradish peroxidase“) erzeugt durch Substrat-Umsatz (Luminol) Chemilumineszenz, die auf einem Röntgenfilm zu einer Schwärzung führt. Entsprechend den Herstellerangaben wurde der Blot mit der ECL-Lösung inkubiert, in einer Entwicklerkassette in Folie eingepackt und anschließend Röntgenfilme unterschiedlich lang belichtet.

#### **2.3.6.7 Antikörperentfernung von Nitrocellulosemembranen (stripping)**

Der Blot wurde mit Strip-Puffer für 30 min bei 60 °C im Wasserbad schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde 3-mal mit 1x TST gewaschen.

#### **2.3.7 Immunfluoreszenzanalysen**

Für die Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen auf Deckgläschen in „24-well“-Platten kultiviert. Die Zellen wurden mit 1 x PBS gewaschen, mit 4 % Paraformaldehyd für

15 min fixiert und mit 0,5 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert (5 min). Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation mit 1,5 % BSA abgesättigt (1h, RT). Die Zellen wurden 1 h mit Primär-Antikörper inkubiert. Ein polyklonaler anti-FE65 (Upstate, Dundee, UK; 1:1000 verdünnt), wurde zum Nachweis von FE65 verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 1 h mit einem Fluoreszenz-gekoppelten anti-Maus Sekundär-Antikörper (1:1000 verdünnt) inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Die Zellkerne wurden mit „Hoechst 33342“ (1 µg/µl in PBS) gefärbt und anschließend die Fluoreszenz an einem inversen Mikroskop (Olympus IX50) beobachtet. Aufnahmen mit gleicher Belichtungszeit wurden aufgenommen.

### 2.3.8 Immunhistologie

Zur immunhistologischen Analyse der Expression von AICD abhängig regulierten Genen in humanem cerebralen Gewebe wurde Paraffin-eingebettetes Sektionsgewebe (frontaler Kortex, Hippocampus und Cerebellum) immunhistologisch aufgearbeitet. Dazu wurden zunächst 2 µm dicke Schnitte am Schlittenmikrotom angefertigt und auf „super-frost“ (Poly-L-Lysin beschichtete) Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank fixiert und anschließend entparaffiniert, indem sie für 10 min in reinem Xylol, zweimal 5 min in absolutem Ethanol, 5 min in 96 %-igem und 5 min in 70 %-igen Ethanol inkubiert und anschließend in Aqua dest. gewaschen wurden. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Objektträger für 10 min in Citratpuffer (20 ml „target retrieve solution“ DAKO, S2031 in 180 ml Aqua dest.) in der Mikrowelle bei 600 W inkubiert. Nach Abkühlen in dem gleichen Puffer für 20 min wurden die Objektträger 3 min in PBS gewaschen, 10 min in 3 %-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend erneut in PBS für 2 min gewaschen. Im Anschluss wurden unspezifische Proteine mit „protein block serum free“ Lösung (Dako, X0909) für 10 min bei RT blockiert, indem die Lösung auf die Schnitte aufgetropft wurde und die Objektträger in einer feuchten Kammer inkubiert wurden. Der Erstantikörper (1:40 für IGFBP3) wurde in „antibody diluent“ Lösung (Dako, S3022) verdünnt, auf die Schnitte aufgetropft und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 2 h in PBS bei RT gewaschen und anschließend die Flüssigkeit vollständig vom Gewebe entfernt (abgetupft). Das Gewebe wurde mit dem biotinylierten Sekundär-Antikörper („LSAB2 System“ DAKO, K0675) für 10 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte für 10 min in PBS gewaschen, bevor mit dem Streptavidin-Komplex aus dem „LSAB2 System“ für 10 min bei RT inkubiert wurde. Erneut wurde 10 min in PBS gewaschen. Nach Herstellerangaben wurde die „DAB substrate-chromogen“ Lösung frisch angesetzt (Dako, K3465) und auf den Schnitt getropft. Die Färbe-

Reaktion der Schnitte (lichtmikroskopische Beurteilung) wurde durch Waschen in PBS unterbrochen. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte in Hämatoxylin Lösung (DAKO, S2020) für 2 min inkubiert. Durch 5-minütiges Waschen unter fließendem Leitungswasser entstand schließlich die blaue Zellkern-Gegenfärbung. Die Objektträger wurden im Anschluss mit wässrigem Eindeckmedium („Glycergel“, DAKO C0563) und einem Deckgläschen dauerhaft konserviert.

### **2.3.9 Reporteragen Experiment**

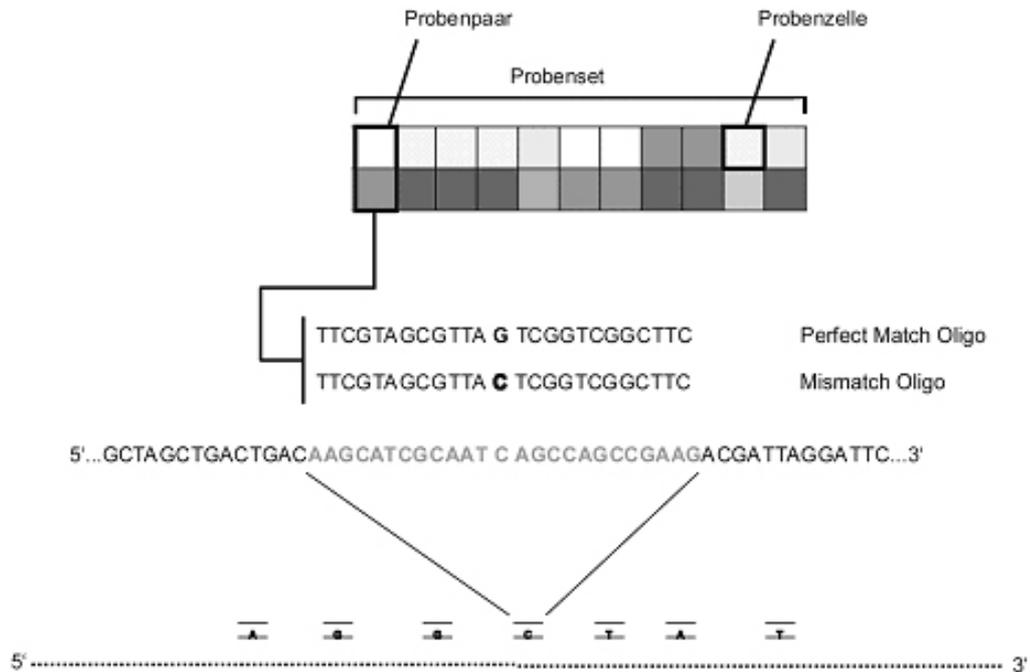
Zur Analyse der Promotoraktivität des Clusterin Gens wurde der Vektors pGL-ApoJ/Clusterin (10 µg pro 10 cm Kulturschale), der für den Promotor des Clusterin Gens fusioniert an Luziferase codiert, in für 72 h induzierte und nicht-induzierte iFA Zellen (Induktion von FE65 und AICD und EGFP) sowie iEGFP Zellen (Induktion von EGFP) transfiziert. Das β-Gal codierende Plasmid pCMVbeta (1 µg pro 10 cm Kulturschale) wurde kotransfiziert. Nach 24 h wurde von induzierten und nicht-induzierten Zellen ein Gesamtzellextrakt erstellt (Lysepuffer RGE). In diesen Proben wurde die Luziferase und β-Galaktosidase Aktivität mit dem Luminometer bestimmt. Für die Ermittlung der Hintergrundaktivität wurde ebenfalls eine nicht transfizierte Probe vermessen. Die Messungen der Luziferase Aktivität wurden auf β-Galaktosidase Messwerte normiert, um Schwankungen der Transfektionsrate auszugleichen.

### **2.3.10 GeneChip Analyse (Affymetrix Technologie)**

In den letzten Jahren hat sich die GeneChip Technik so weit entwickelt, dass ein routinemäßiger Einsatz etwa zur Klassifizierung von Tumoren derzeit Einzug in die Medizin erhält. In der wissenschaftlichen Forschung stellen sie heute ein zentrales Werkzeug dar, um komplexe Vorgänge der Zelle auf transkriptionaler Ebene abzubilden. Die in dieser Arbeit benutzten GeneChips U133A der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) detektieren und quantifizieren mRNA Konzentrationen der Probe und sind daher zur Untersuchung eines potentiellen Transkriptionsfaktors wie AICD geeignet.

Jedes Gen bzw. dessen Transkript wird auf dem Chip durch elf „probe cells“ repräsentiert. Ein „probe cell“ entspricht einer Fläche von 25 x 25 µm und enthält circa 10<sup>7</sup> 25-mer lange Oligonukleotide, die komplementär zu einer Sequenz am 3' Ende der zugehörigen mRNA des Gens ist. Elf Quadrate decken daher elf verschiedene 25-mer lange Sequenzbereiche am 3'Ende der mRNA ab (Abbildung 8). Zu jeder „probe cell“ gehört eine „probe cell“-Negativkontrolle, die bis auf einen zentralen „mismatch“ dieselbe Sequenz des jeweiligen Oligonukleotids enthält. So wird jedes Gen durch elf Probenpaare („perfect- und mis-match“)

repräsentiert, die auf dem Chip an unterschiedlichen Positionen angeordnet sind. Dadurch werden Seiteneffekte durch die Hybridisierung verhindert.



**Abbildung 8 - Schematische Darstellung der „probe cells“ des U133A GeneChips von Affymetrix (Santa Clara, USA).** Jedes Gen wird durch 11 Zellen repräsentiert, deren Oligonukleotide perfekt zu einem 25-mer langen Sequenzabschnitt am 3' Ende des entsprechenden Gens hybridisieren (perfect match, obere Reihe). Jede „probe cell“ hat ihre eigene Negativkontrolle, nämlich eine zugehörige „probe cell“, in der dieselben Oligonukleotide mit einem zentralen Mismatch angeordnet sind (untere Reihe). Die elf Probenpaare aus „perfect- und mis-match“ sind auf dem Chip an voneinander getrennten Koordinaten angeordnet, so dass Hybridisierungs-Seiteneffekte ausgeschlossen werden.

Diese sogenannten „High Density Microarrays“ werden mit bis zu 500.000 verschiedenen Oligonukleotiden in einem speziellen photolithographischen Verfahren *in situ* synthetisiert. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten GeneChips enthalten circa 22000 Transkripte. Für die Analyse wurde Gesamt-RNA aus den induzierbaren Zelllinien isoliert, in cDNA umgeschrieben und daraus durch *in vitro* Transkription biotinylierte cRNA synthetisiert. Spezifische Hybridisierungssignale dieser cRNA an komplementäre Oligonukleotide („perfect match probe cells“) auf dem Chip können nach Färbung mit Streptavidin-Phykoerythrin-Konjugaten bestimmt werden. Aus den ermittelten Signalstärken berechnet die Affymetrix-Software einen Wert für die Expressionsstärke des entsprechenden Gens, der mit den anderen Proben verglichen werden kann. Die Hybridisierung an „mismatch“ Oligos dient der Detektion unspezifischer Hybridisierung, Berechnung von Hintergrund und Kreuzhybridisierung und der späteren Auswertung der Chips.

### 2.3.10.1 Herstellung von T7-Promotor enthaltender cDNA

Als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese wurden 40 µg gesamtzelluläre RNA von induzierten (72 h) und nicht-induzierten AICD bzw. AICD/FE65 Zelllinien verwendet. Die Erststrangsynthese wurde unter Verwendung von Oligo-dT<sub>24</sub>-T7-Primern durchgeführt.

### 2.3.10.2 Herstellung Biotin-markierter cRNA

Die Synthese von Biotin-markierter cRNA wurde mit dem „BioArray RNA Transcript Labeling Kit“ von ENZO (Affymetrix, Santa Clara, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In der Reaktion wurde 2 µg cDNA aus der cDNA-Synthese eingesetzt. Die Reinigung der synthetisierten cRNA erfolgte mit dem „RNeasy Mini“ Kit (Qiagen, Hilden). 40 µg cRNA wurden in Fragmentierungspuffer in einem Volumen von 40 µl für 35 min bei 94 °C fragmentiert. Der Ansatz wurde bei -20 °C gelagert oder sofort in die Hybridisierung eingesetzt.

- Verwendete Lösungen:

**5 x Fragmentierungspuffer:** 200 mM Tris-Acetat (pH 8,1); 500 mM Kaliumacetat; 150 mM Magnesiumacetat

### 2.3.10.3 Hybridisierung und Waschen der GeneChips

15 µg fragmentierte cRNA (bzw. 5 µg für Testchips) wurden mit 162 µl Hybridisierungspuffer gemischt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 300 µl gebracht. Der Hybridisierungscocktail wurde im Hybridisierungssofen (Affymetrix Hybridization Oven 640) für 16 h bei 45 °C auf die GeneChips (U133A, Affymetrix, Santa Clara, USA) hybridisiert. Kontroll-cRNA (BioB, BioC, BioD und Cre) und Kontroll-Oligonukleotide wurden vom Institut für Arterioskleroseforschung (AG Funke, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Münster) zur Verfügung gestellt. Die Kontroll-Oligonukleotide hybridisieren am Rande und als Kreuz in der Mitte des Chips. Diese Markierungen dienen zur Positionierung eines Gitters und Orientierung bei der späteren Auswertung. Kontroll-cRNAs verschiedener Konzentration dienen als quantitative Kontrolle für die Hybridisierung.

**Hybridisierungscocktail:** 15 µg Proben-cRNA; Kontroll-cRNA (1,5; 5; 25 und 100 pM); 5 nM Kontroll-Oligonukleotide; 0,1 µg/µl sonifizierte Heringssperma-DNA; 0,5 µg/µl acetyliertes BSA; 75 mM MES Natrium-Salz und 27,5 mM MES freie Säure (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure).

Nach der Hybridisierung wurden die Chips in einer Waschstation (Affymetrix Fluidics Station 400) gemäß Herstellerangaben mit verschiedenen Puffern gewaschen. Zur Detektion und Verstärkung der Fluoreszenzsignale wurde der Chip mit Färbelösung 1-3 behandelt. Nach jeder Behandlung wurden die Chips mit nicht-stringentem Puffer gewaschen.

- Verwendete Lösungen:

**Nicht-stringenter Waschlösung:** 75 mM MES Natrium-Salz; 27,5 mM MES freie Säure; 26 mM NaCl; 0,01 % Tween 20

**Stringenter Waschlösung:** 0,9 M NaCl; 60 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6 mM EDTA; 0,005 % Triton; 0,02 % Tween 20; 0,1 g/l Antifoam-30

**Färbelösung 1:** 1 mg/ml Streptavidin in 600 µl Färbepuffer

**Färbelösung 2:** 10 mg/ml Ziegen-IgG; 0,5 mg/ml biotinylierter IgG in 600 µl Färbepuffer

**Färbelösung 3:** 1 mg/ml Streptavidin-Phykoerythrin (SAPE) in 600 µl Färbepuffer

**Färbepuffer:** 150 mM MES Natrium-Salz; 200 mM MES freie Säure; 1,85 M NaCl; 0,1 % Tween 20; 0,01 % Antifoam O-30

#### 2.3.10.4 Scannen des GeneChips

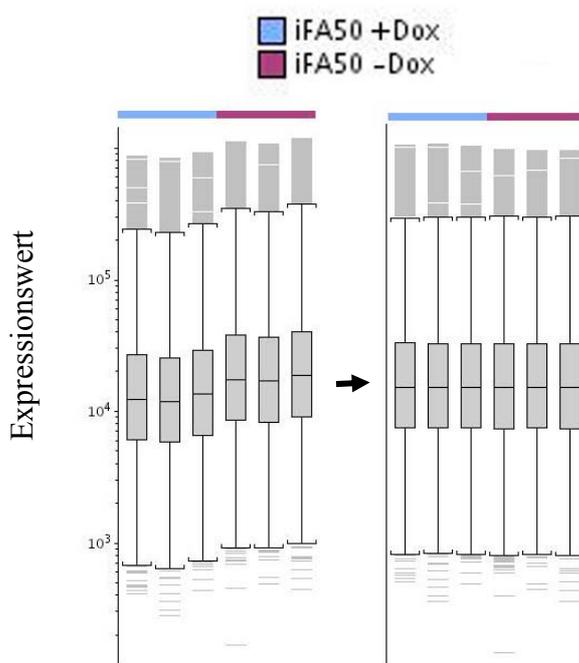
Das Scannen der Chips erfolgte mit einem HP GeneArray Scanner (Affymetrix, Santa Clara, USA). Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden zunächst in einer .dat-Datei gespeichert. Bei einer Größe der Probenzelle von ca. 24 x 24 µm und einer Auflösung von 3µm/Pixel wird jede Probenzelle durch 64 Pixel (8 x 8 Pixel) repräsentiert. Da die Intensitäten aufgrund von Randeffekten u.ä. auf der Fläche nicht gleichmäßig verteilt sind, wird aus den Rohdaten eine durchschnittliche Intensität pro Probenzelle berechnet (.cel Datei).

#### 2.3.11 Auswertung der Affymetrix GeneChips

Für die Datenauswertung wurde die Software Expressionist von GeneData verwendet. Um die Daten auswerten zu können, wurde die nach dem Scannen generierte .cel Datei in die Software eingelesen. Dabei findet eine Qualitätskontrolle statt, bei der eventuelle Kratzer, dunkle oder helle Flecken des Chips detektiert werden und davon betroffene Gene aus der anschließenden Analyse eliminiert werden.

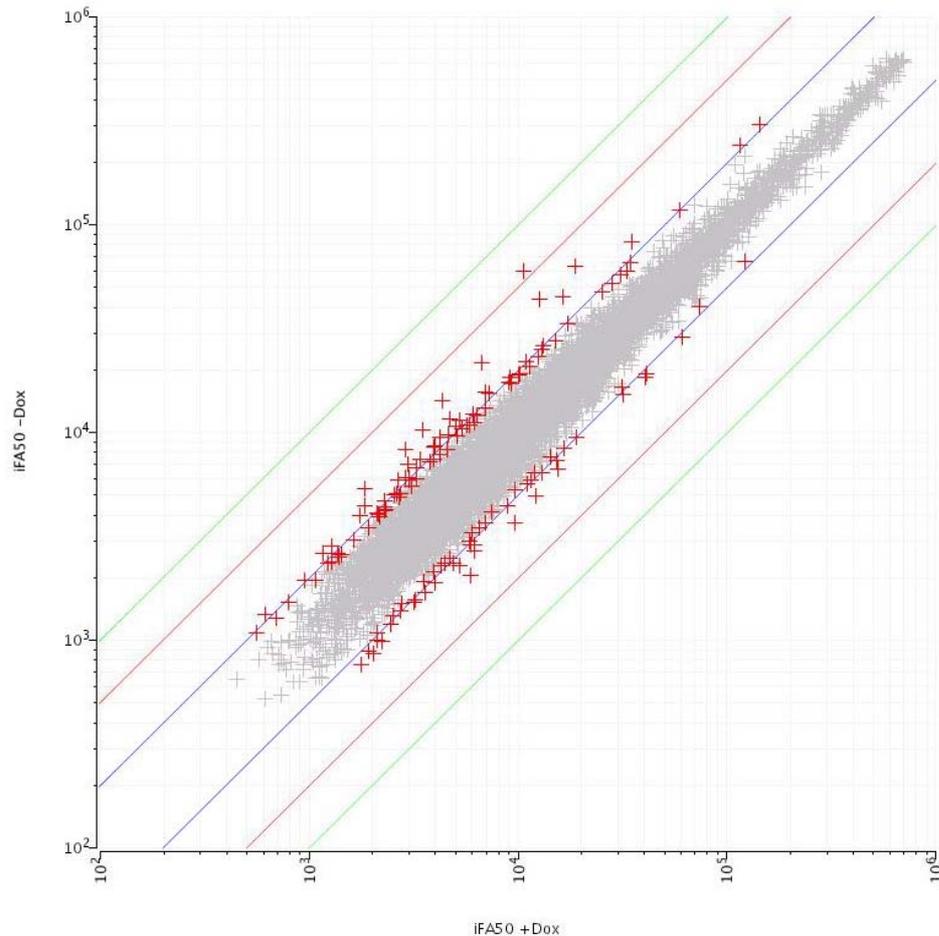
Die Expressionist Software ist ein sehr umfangreiches Werkzeug zur Analyse von GeneChip Daten, so dass es auch verschiedene Strategien gibt, Kandidatengenlisten zu erstellen. Im Folgenden ist die in dieser Arbeit genutzte Methode zur Datenauswertung beschrieben. Zunächst wurden die Daten einer Normalisierung unterworfen, um generelle Helligkeitsunterschiede zwischen den einzelnen Chips auszugleichen. Dadurch werden alle

Chips auf eine gemeinsame mittlere Intensität normalisiert. Im Rahmen der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde auf den Median normalisiert (Abbildung 9).



**Abbildung 9 – Normalisierung von GeneChip Daten.** Der linke Teil der Abbildung zeigt sechs nicht normalisierte GeneChip Verteilungen zweier verschiedener Gruppen (iFA50 + und - Dox). Dargestellt ist der Median der Intensität aller auf dem Chip enthaltenen Gene (Querstrich in grauer Box). Die Ober- und Untergrenze der Box kennzeichnet den jeweiligen Perzentil Wert (75-igster und 25-igster Perzentil). Der oberste und unterste fettgedruckte Strich kennzeichnet das Gen mit der höchsten bzw. niedrigsten Expression, das entsprechend dem Algorithmus nicht als Ausreißer berechnet wurde. Ausreißer sind hingegen außerhalb der fettgedruckten Striche dargestellt. Dies sind alle Gene, die mehr als das 1,5-fache der Länge der grauen Box vom jeweiligen Perzentil entfernt liegen. Nach der Normalisierung (rechter Teil der Abbildung) besitzen die Mediane der einzelnen Chips das gleiche Intensitäts-Niveau.

Mit den normalisierten Daten wurde darauf ein „N-fold regulation“ Test durchgeführt. Bei diesem Test wird für jedes Gen das Verhältnis des Expressionswerts des Chips mit RNA aus dem induzierten Klon zum Expressionswert des Chips mit RNA aus dem nicht-induzierten Klon errechnet. Das Ergebnis dieser Analyse lässt sich grafisch als „scatter plot“ darstellen (Abbildung 10).



**Abbildung 10 – Berechnung der Regulationshöhe für jedes auf den GeneChips vorhandene Gen.** Bei dieser Darstellung in Form eines sogenannten „scatter plot“ wird jedem Gen ein Regulationsfaktor zugeordnet und als Kreuz symbolisiert. Die meisten Gene sind erwartungsgemäß nicht reguliert. Diese bilden die graue Punktwolke entlang der Winkelhalbierenden der Grafik. Gene mit einem Regulationsfaktor von mehr als 1,8-fach sind rot markiert.

Bei dieser Darstellung wird jedes auf dem Chip vorhandene Gen durch ein Kreuz symbolisiert.

Erwartungsgemäß ist der Großteil der auf den Chips vorhandenen Gene nicht reguliert und bildet die in Abbildung 10 dargestellte graue Punktwolke entlang der Winkelhalbierenden der Grafik. Im Rahmen der Auswertung waren zunächst solche Gene interessant, die einen Regulationsfaktor von mehr als 1,8 hatten. Diese sind in Abbildung 10 rot markiert.

Diese „Rohliste“ von potentiell differentiell regulierten Genen wurde anschließend einem parametrischen t-Test unterworfen. Da jeder GeneChip dreifach gescannt wurde, können so Ausreißer eliminiert werden.

Weitere potentiell interessante Kandidatengene können aus einer sogenannten „absent-present“ Suche erhalten werden. Aus dem Verhältnis zwischen „Perfect match“- und „Mismatch“-Signal wurde für jedes individuelle Gen der so genannte „Absolute Call“

bestimmt. Der Wert des „Absolute Call“ gibt an, ob das korrespondierende Transkript für die Analyse „present“ oder „absent“ war. Sobald ein Gen auf einem der GeneChips (+ oder – Dox) als „absent“ definiert wird, wird es aus der oben beschriebenen Analyse eliminiert. In der Regel ist dies auch sehr sinnvoll, da so insbesondere Gene mit einer sehr starken Streuung innerhalb der elf „probe cells“ aus der Analyse herausgefiltert werden. Jedoch ist es auch möglich, dass Gene deshalb als „absent“ definiert werden, weil ihre Expressionswerte sehr niedrig sind. Möglicherweise sind auf dem korrespondierenden GeneChip (z.B. der +Dox Chip) jedoch hohe oder normale, zumindest aber „present“ definierte Expressionswerte diesem Gen zugeordnet. Solche Gene, die auf einem Chip (z.B. dem –Dox Chip) „absent“, aber auf dem korrespondierenden Chip (z.B. dem +Dox Chip) „present“ definiert sind, können durch die „absent-present“ Suche identifiziert werden. Aus den genannten Gründen sind diese Daten jedoch stark fehlerbehaftet.

Zusammenfassend betrachtet stellt die Affymetrix GeneChip Technik ein sehr wirkungsvolles Werkzeug dar, um Genexpressionsprofile zu untersuchen.

### 3 Ergebnisse

In wissenschaftlichen Veröffentlichungen der letzten Jahren wurde die Intrazelluläre Domäne des Amyloid Precursor Proteins (AICD) funktionell mit den Eigenschaften eines Transkriptionsfaktors in Verbindung gebracht (Cao and Sudhof, 2001). Darüber hinaus gab es Hinweise, dass AICD apoptotisches Potential besitzt, indem es in die Regulation der zellulären Calcium Homöostase involviert ist (Leissring et al., 2002). Ziel dieser Arbeit war es daher, diese beiden Aspekte – AICD vermittelte Genregulation und Apoptose – zu untersuchen.

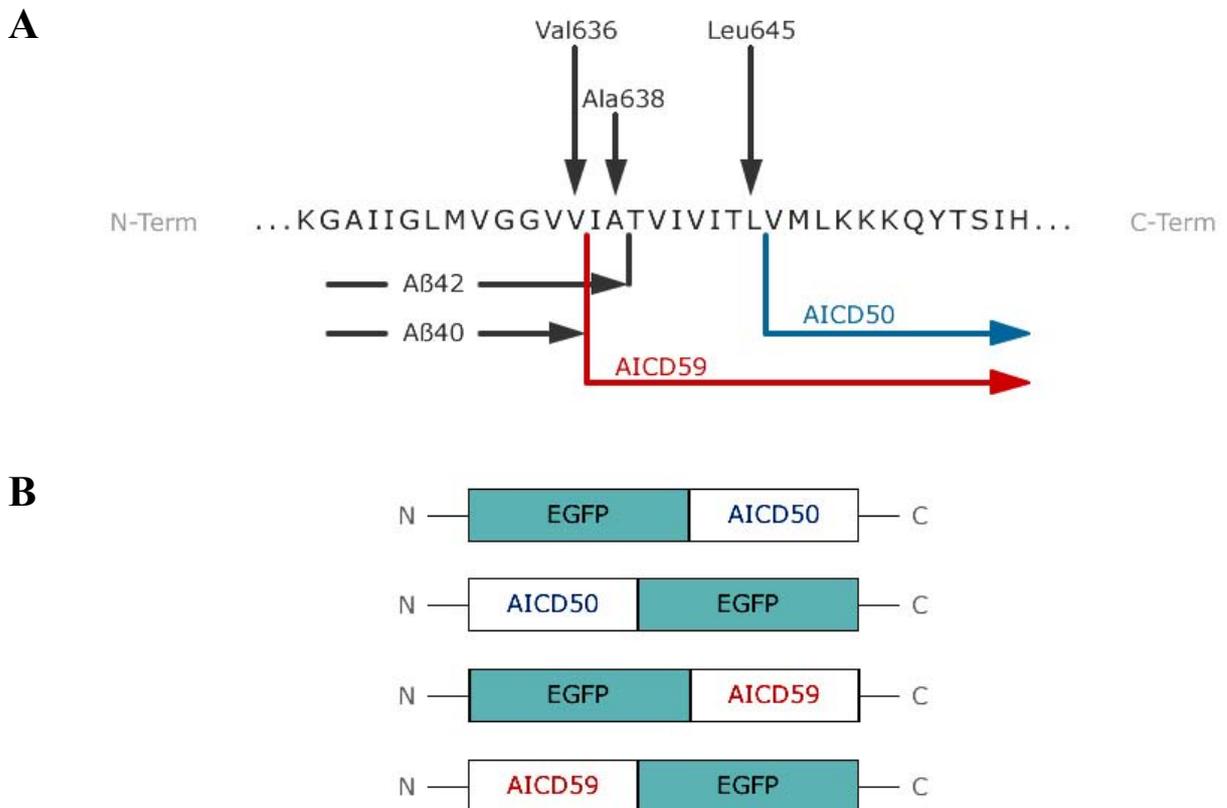
Zunächst wurde analysiert, welches apoptotische Potential AICD bei Überexpression in verschiedenen Zelllinien besitzt, um so auch die Möglichkeit der Erstellung stabiler Zelllinien zu untersuchen. Da diese Ergebnisse keine Hinweise auf eine in den verwendeten Zelllinien induzierte Apoptose gaben, wurden daraufhin sowohl konstitutive wie induzierbare AICD Zelllinien etabliert, erneut ihr apoptotischen Potentials untersucht sowie das Ausmaß der Apoptose nach vorangegangener Induktion von ER Stress bestimmt.

Im Zentrum der Arbeit stand jedoch die Identifikation von AICD abhängig regulierten Genen. Dazu wurden die etablierten induzierbaren AICD sowie ebenfalls erstellte stabile induzierbare AICD/FE65 Zelllinien mittels Affymetrix (Santa Clara, USA) GeneChips analysiert. Potentielle Zielgene wurden mittels real-time PCR verifiziert. Ausgewählte Gene wurden hinsichtlich ihrer Expression darüber hinaus in cerebralem Gewebe von Alzheimer Patienten gegenüber Kontrollen untersucht. Immunhistologische Färbungen und Reporter gen Studien wurden ebenfalls für einige Zielgene erstellt.

#### 3.1 Analyse potentiell AICD vermittelter Apoptose

In Publikationen der letzten Jahre wurde zunehmend über ein apoptotisches Potential des 6 kDa großen AICD Peptids berichtet (Lu et al., 2000; Kinoshita et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde AICD vermittelter programmierter Zelltod zunächst nach transienter Transfektion von AICD-EGFP Fusionskonstrukten untersucht. Die beiden AICD Isoformen AICD59 und AICD50, die der  $\gamma$ -Sekretase abhängigen APP Spaltung nach Val636 bzw. nach Leu645 (Angaben beziehen sich auf die neuronale APP695 Isoform; NP\_958817) entsprechen, wurden entweder C- oder N-terminal mit EGFP fusioniert. Die Kozaksequenz und das Start- bzw. Stoppcodon wurden entsprechend inseriert. Abbildung 11 zeigt eine Übersicht der erstellten Konstrukte. Die resultierenden Vektoren wurden mit pEGFP-AICD50, pAICD50-EGFP, pEGFP-AICD59 und pAICD59-EGFP bezeichnet. Sofern im Folgenden nur pAICD-EGFP bzw. pEGFP-AICD beschrieben ist, so bedeutet dies, dass für

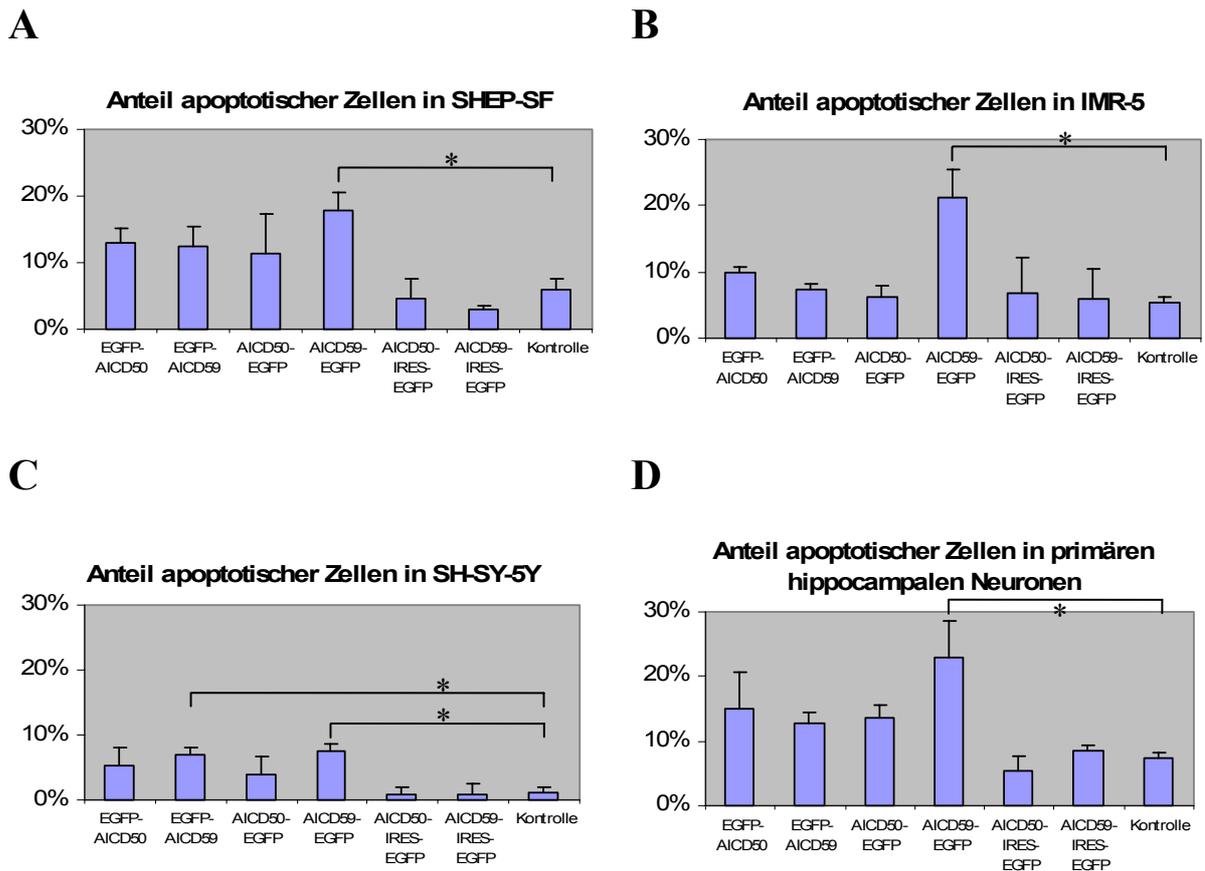
das entsprechende Experiment keine Unterschiede zwischen den beiden Isoformen feststellbar waren.



**Abbildung 11 -  $\gamma$ -Sekretase vermittelte APP Prozessierung und konstruierte AICD-EGFP Fusionskonstrukte.** A) Dargestellt sind relevante  $\gamma$ -Sekretase Schnittstellen im Amyloid Precursor Protein und die resultierenden Fragmente A $\beta$  und AICD. B) zeigt eine Übersicht über die klonierten EGFP Fusionsproteine. Die resultierenden Vektoren wurden mit pEGFP-AICD50, pAICD50-EGFP, pEGFP-AICD59 und pAICD59-EGFP bezeichnet.

Des Weiteren wurden die beiden Isoformen AICD50 und AICD59 in den pIRES2-EGFP Vektor kloniert (pAICD50-IRES-EGFP und pAICD59-IRES-EGFP), so dass auch das apoptotische Potential des „isolierten“ AICD Peptids (kein EGFP Fusionsprotein) untersucht werden konnte. Sofern im Folgenden nur pAICD-IRES-EGFP beschrieben ist, waren zwischen den beiden Isoformen hinsichtlich des Experiments keine Unterschiede.

Die Vektoren wurden in die Neuroblastom-Zelllinien SHEP-SF, IMR-5, SH-SY-5Y und primäre hippocampale Neurone der Maus transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und mittels „Hoechst 33342 Färbung“ markiert. „Hoechst 33342“ färbt Zellkerne bläulich-weiß. Der Anteil der Zellen mit apoptotischem Phänotyp (kondensierte und fragmentierte Kerne) wurde bestimmt (Abbildung 12).



**Abbildung 12 - Anteile apoptotischer Zellen in verschiedenen Neuroblastom-Zellen 24 h nach Transfektion von AICD-EGFP Fusionskonstrukten und AICD-IRES-EGFP Konstrukten.** A) SHEP-SF, B) IMR-5, C) SH-SY-5Y und D) hippocampale Neurone wurden mit pAICD-EGFP Fusionskonstrukten (pAICD50-EGFP, pEGFP-AICD50, pAICD59-EGFP, pEGFP-AICD59) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, die Zellkerne mit „Hoechst 33342“ gefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen ausgezählt (kondensierte und fragmentierte Kerne). Signifikante Ergebnisse wurden mit dem Tukey-Test bestimmt und mit Stern gekennzeichnet (\* $p < 0,025$ ). Mit pAICD59-EGFP Fusionskonstrukten transfizierte Zellen zeigten in allen Zellen signifikant höhere Anteile apoptotischer Zellen gegenüber Kontroll-Vektor (pEGFP-C) transfizierten Zellen, während sich pAICD-IRES-EGFP transfizierte Zellen bezüglich ihres Anteils apoptotischer Zellen nicht von Kontroll-Vektor transfizierten Zellen unterschieden. Die vermehrte Rate apoptotischer Zellen nach pAICD59-EGFP Transfektion kann daher nicht zwingend auf AICD zurückgeführt werden, sondern ist auch durch verstärkte Kernlokalisierung von EGFP vermittelt durch AICD erklärbar.

Mit pAICD59-EGFP transfizierte Zellen zeigten in SHEP-SF, IMR-5, SH-SY-5Y und primären hippocampalen Neuronen signifikant höhere Anteile apoptotischer Zellen als nur mit EGFP-Vektor (Kontrolle) transfizierte Zellen. Mit anderen Fusionskonstrukten transfizierte Zellen wiesen zwar höhere Anteile apoptotischer Zellen auf, jedoch waren diese nicht signifikant.

AICD-IRES-EGFP Konstrukte unterschieden sich dagegen in keiner der Zelllinien signifikant von der Kontrolle. Der mit den AICD59-EGFP Fusionsproteinen einhergehende Effekt kann daher nicht unmittelbar auf AICD zurückgeführt werden, sondern ist möglicherweise durch eine infolge AICD erhöhte nukleäre Translokation von EGFP zu erklären. Andererseits wäre

auch denkbar, dass infolge einer Stabilisierung des normalerweise schnell abgebauten AICD durch EGFP das toxische Potential von AICD besser induziert werden kann.

### **3.2 Etablierung stabiler Zelllinien**

Da die in Abbildung 12 gezeigten Ergebnisse bezüglich AICD-IRES-EGFP transfizierter Zellen keinen Hinweis auf AICD induzierte Apoptose lieferten, schien die Möglichkeit gegeben, stabile AICD exprimierende Zelllinien mit AICD-IRES-EGFP Konstrukten zu etablieren. Dagegen war es jedoch fraglich, ob auch mit den gezeigten pAICD-EGFP Konstrukten, mit denen AICD fusioniert an EGFP exprimiert wird, stabile Linien erstellt werden konnten, da diese Konstrukte nach transienter Transfektion apoptotisches Potential zeigten.

Stabile AICD exprimierende Zelllinien bieten die Möglichkeit, die intrazelluläre APP Domäne hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung für Zelltod und Genregulation sensitiver (alle Zellen eines Klon exprimieren das gewünschte Protein) und nach Stimulation mit spezifischen Apoptose relevanten Inhibitoren, die ER Stress auslösen, zu untersuchen.

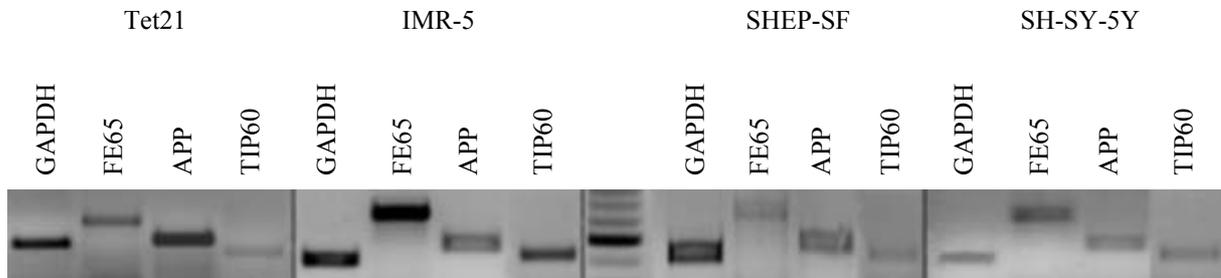
#### **3.2.1 Humane Neuroblastom-Zelllinien als Empfänger-Zelllinie**

Unter allen cerebralen Zelltypen ist die APP Expression in Neuronen am höchsten. Ebenso nimmt man an, dass Neurone die primäre Quelle für A $\beta$  sind und daher in diesen Zellen auch die überwiegende pathophysiologische APP Prozessierung stattfindet. Aus diesen Gründen sollten AICD exprimierende Zelllinien etabliert werden, die hinsichtlich ihres endogenen Expressionsmusters dem neuronaler Zellen möglichst ähnlich sein sollten. Daher sollten humane Neuroblastom-Zelllinien als Empfänger-Zelllinien dienen. Die am AICD Transkriptionskomplex beteiligten Proteine FE65 und TIP60 sollten überdies endogen exprimiert sein. Diverse Neuroblastom-Zelllinien wurden daher zunächst hinsichtlich dieses Aspektes untersucht.

##### **3.2.1.1 Endogene Expressionslevel der am AICD Transkriptionskomplex beteiligten Proteine FE65 und TIP60**

Nach derzeitigem Stand der Forschung bildet AICD zusammen mit dem Adapterprotein FE65 und der Histon-Acetyl-Transferase TIP60 einen aktiven Transkriptionskomplex, wobei noch weitere Proteine beteiligt sein können. Für die Etablierung stabiler AICD exprimierender Zelllinien (bzw. auch AICD und FE65 exprimierender Linien im induzierbaren Modell) sollten FE65 und TIP60 endogen exprimiert sein. Drei verschiedene Neuroblastom-Zelllinien und Tet21, ein mit dem Tetrazyklin-Transaktivator stabil transfizierter Subklon von

SHEP SF, der für die Etablierung induzierbarer Linien verwendet wurde (siehe 3.2.3), wurden auf endogene Expression von FE65, TIP60 und APP im Vergleich zu GAPDH mittels RT-PCR untersucht (Abbildung 13).



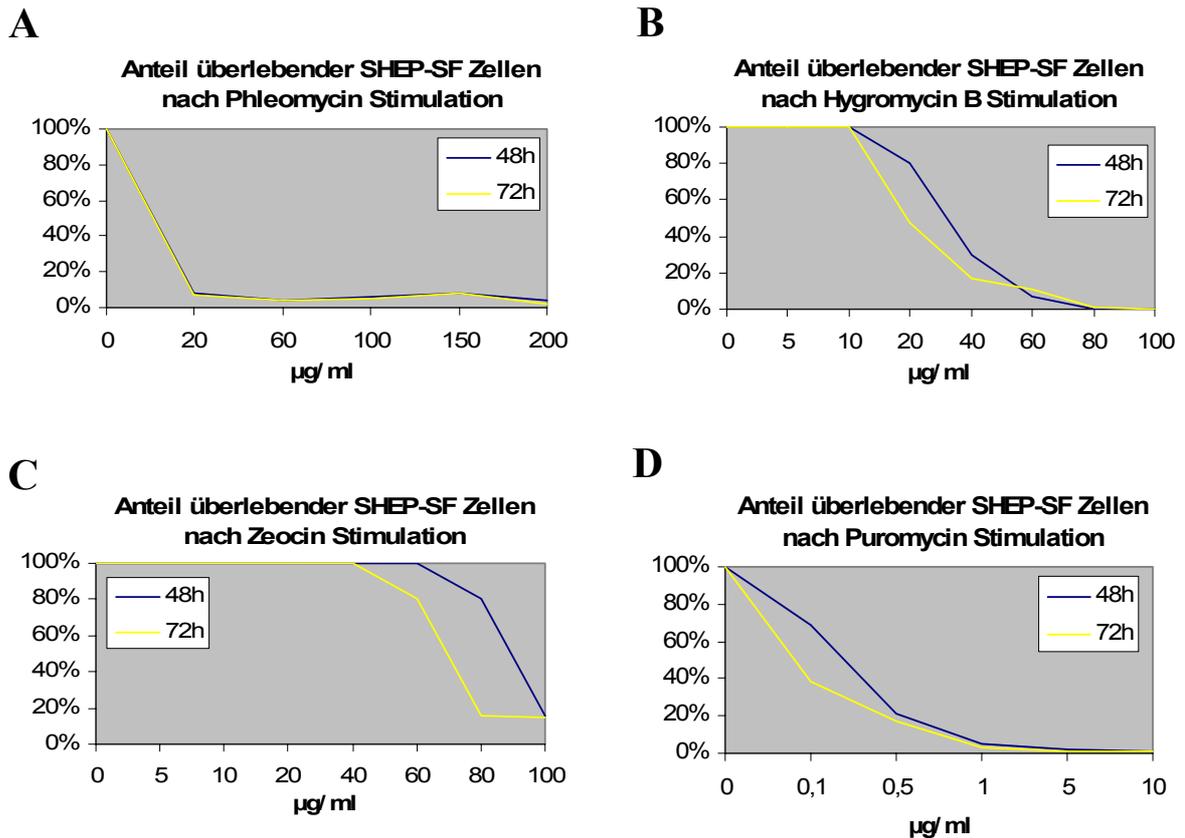
**Abbildung 13 – Endogene Expressionslevel von APP und der am Transkriptionskomplex beteiligten Proteine FE65 und TIP60 in Neuroblastom-Zelllinien.** Aus den Neuroblastom-Zelllinien Tet21, IMR-5, SHEP-SF und SH-SY-5Y wurde RNA isoliert und mittels RT-PCR die endogene Expression von FE65, TIP60 und APP im Vergleich zu GAPDH untersucht. Die am Transkriptionskomplex beteiligten Proteine FE65 und TIP60 sind auf mRNA Ebene endogen in allen Linien exprimiert. Ebenfalls wird APP endogen exprimiert.

Alle untersuchten Neuroblastom-Zelllinien exprimierten endogen auf mRNA Ebene FE65 und TIP60 und waren damit zur Etablierung einer AICD Linie geeignet. Endogenes AICD, das nach Möglichkeit nicht vorhanden sein sollte, kann nur dann entstehen, wenn APP endogen exprimiert wird. Die APP Expression war auf mRNA Ebene in allen Linien nachweisbar, woraus jedoch nicht auf die Entstehung von AICD geschlossen werden kann. Wie später gezeigt werden konnte, war AICD in den im Folgenden verwendeten Zelllinien SHEP-SF und Tet21 nach Immunpräzipitation und Westernblot endogen jedoch nicht nachweisbar.

Unter Berücksichtigung der Transfektionseffizienz, die für alle Linien quantifiziert wurde, fiel die Wahl auf die Neuroblastom-Zelllinie SHEP-SF, die sich unter den genannten Linien mit einer Rate von ca. 10 % am besten transfizieren ließ.

### 3.2.1.2 Absterbekinetik der humanen Neuroblastom-Zelllinie SHEP-SF

Die zur Etablierung stabiler Linien verwendeten SHEP-SF Zellen wurden mit den gängigen Selektionsagentien Hygromycin B, Phleomycin, Zeocin und Puromycin entsprechend dem vom Hersteller angegebenen Konzentrationsbereich stimuliert. Die Anzahl der Zellen pro standardisiertes Gesichtsfeld (Rasterokular) wurde zu Beginn des Experiments, nach 48 und 72 h ausgezählt (Abbildung 14).



**Abbildung 14 – Absterbekinetik der humanen Neuroblastom-Zelllinie SHEP-SF.** Die humane Neuroblastom-Zelllinie SHEP-SF wurde mit den Selektionsreagentien Phleomycin (A), Hygromycin B (B), Zeocin (C) und Puromycin (D) stimuliert. Zu Beginn des Experiments sowie nach 48 und 72 h nach der Stimulation wurden die Zellen fixiert, die Zellkerne mit „Hoechst 33342“ gefärbt und die Anzahl noch lebender Zellen in einem standardisierten Gesichtsfeld bestimmt.

Aus den ermittelten Verläufen wurde die Konzentration, bei der nach 72 h mehr als 90 % der Zellen abgestorben waren, als einzusetzende Selektionskonzentration festgelegt. Dies waren 20 µg/ml Phleomycin, 60 µg/ml Hygromycin B, 100 µg/ml Zeocin und 1 µg/ml Puromycin. Die Konzentration von Geneticin (G418) für SHEP-SF Linien (500 µg/ml) war aus anderen Versuchen bereits beschrieben.

Während SHEP-SF Neuroblastom-Zellen nach Stimulation mit Phleomycin bereits bei sehr geringen Konzentrationen (im vom Hersteller angegebenen Bereich) größtenteils abgestorben waren, reagierten die Zellen auf Behandlung mit Zeocin erst bei sehr hohen Konzentrationen mit Zelltod. Die Selektionsagentien Hygromycin B, Puromycin oder G418 erschienen daher für den Selektionsdruck am besten geeignet. Puromycin und G418 wurden im Folgenden zur Etablierung stabiler Zelllinien verwendet.

### 3.2.2 Konstitutiv AICD exprimierende Zelllinien

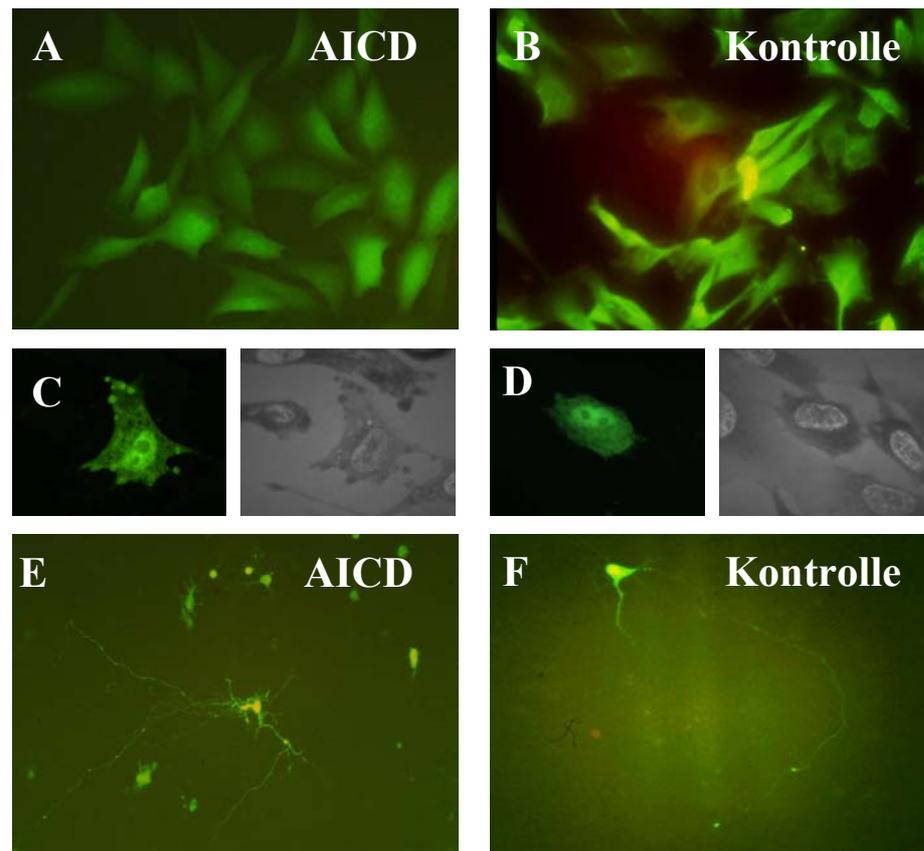
Unter Verwendung der in Abbildung 11 dargestellten Fusionskonstrukte (pAICD-EGFP bzw. pEGFP-AICD) sowie der pAICD-IRES-EGFP Konstrukte konnten stabil transfizierte Zelllinien mit SHEP-SF Hintergrund erstellt werden. Die verwendeten Vektoren enthielten das Neomycin-Resistenz Gen, so dass eine direkte Selektion (ohne Kotransfektion eines Resistenzvektors) mit G418 möglich war. Es wurden zwischen 5 und 10 unabhängige Klone jeden Typs etabliert. Für die folgenden Experimente wurden in der Regel drei unabhängige Klone untersucht.

#### 3.2.2.1 AICD-EGFP und EGFP-AICD Fusionszelllinien – Zelluläre AICD Lokalisation

Die EGFP Expression in den AICD-EGFP bzw. EGFP-AICD Zelllinien (Transfektion mit pAICD-EGFP bzw. pEGFP-AICD) war schwach bis moderat, in stabil mit Kontrollvektor transfizierten Linien jedoch sehr stark. Möglicherweise waren nur solche Zellen lebensfähig und entwickelten stabile Klone, deren Expression des transfizierten pAICD-EGFP bzw. pEGFP-AICD ein bestimmtes Maß nicht überschritten. Das würde mit dem erhöhten apoptotischen Potential von pAICD-EGFP bzw. pEGFP-AICD Fusionskonstrukten übereinstimmen. Die Zellen zeigten morphologisch (Größe von Zytoplasma und Zellkern) keine Unterschiede zu mit Leer-Vektor etablierten stabilen Linien. Auch Wachstums- und Zellteilungsrate erschienen im Vergleich zu Kontroll-Vektor Linien oder der parentalen SHEP-SF Linie nicht verändert, wurden aber nicht quantifiziert. Die Klone wurden zur Analyse der zellulären AICD Lokalisation verwendet.

AICD-EGFP bzw. EGFP-AICD Fusionsproteine zeigten in den stabilen Linien zytoplasmatische und zum Teil nukleäre Lokalisation, während Kontrollvektor transfizierte Zellen überwiegend nur zytoplasmatische EGFP Färbung aufwiesen (Abbildung 15).

Unterschiede zwischen den verschiedenen Konstrukten (AICD50, AICD59 jeweils N- und C-terminal an EGFP fusioniert) konnten nicht beobachtet werden. AICD-EGFP bzw. EGFP-AICD bildete im Kern zum Teil fragmentierte Strukturen – ein möglicherweise von der Expressionshöhe abhängiger Effekt (Abbildung 15 C und D). Die zelluläre AICD Lokalisation wurde auch in primären hippocampalen Kulturen von Wildtyp-Mäusen analysiert. Neurone wurden mit pAICD-EGFP bzw. pEGFP-AICD vs. pEGFP-C1 Kontrollvektor transfiziert. Wesentliche Unterschiede zwischen pAICD-EGFP bzw. pEGFP-AICD und Kontrollvektor transfizierten Zellen waren in Neuronen jedoch nicht ersichtlich (Abbildung 15 E und F).



**Abbildung 15 - Zelluläre AICD Lokalisation.** Stabil mit pAICD-EGFP bzw. pEGFP-AICD Fusionskonstrukten transfizierte SHEP-SF Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer EGFP Lokalisation mit Kontroll-Vektor (pEGFP-C1) stabil transfizierten Zelllinien verglichen. A) Alle stabilen AICD-EGFP bzw. EGFP-AICD Klone (gezeigt ist ein pAICD59-EGFP Klon) unabhängig von der AICD Isoform und N- oder C-terminaler EGFP Lokalisation zeigten vermehrt nukleäre Lokalisation im Vergleich zu B) Kontroll-Vektor stabil transfizierten Klonen. C), D) Insbesondere in Zellen mit höherer Expression (anhand von EGFP Expression identifiziert) zeigte AICD-EGFP bzw. EGFP-AICD fragmentierte Strukturen im Kern („Hoechst 33342 Kernfärbung“ in Schwarz-Weiß). Darüber hinaus wurden primäre hippocampale Kulturen von Wildtyp-Mäusen mit pAICD-EGFP bzw. pEGFP-AICD Fusionskonstrukten transfiziert. E) Die zelluläre AICD-EGFP bzw. EGFP-AICD Lokalisation zeigte keine Unterschiede zu F) Kontroll-Vektor transfizierten Zellen.

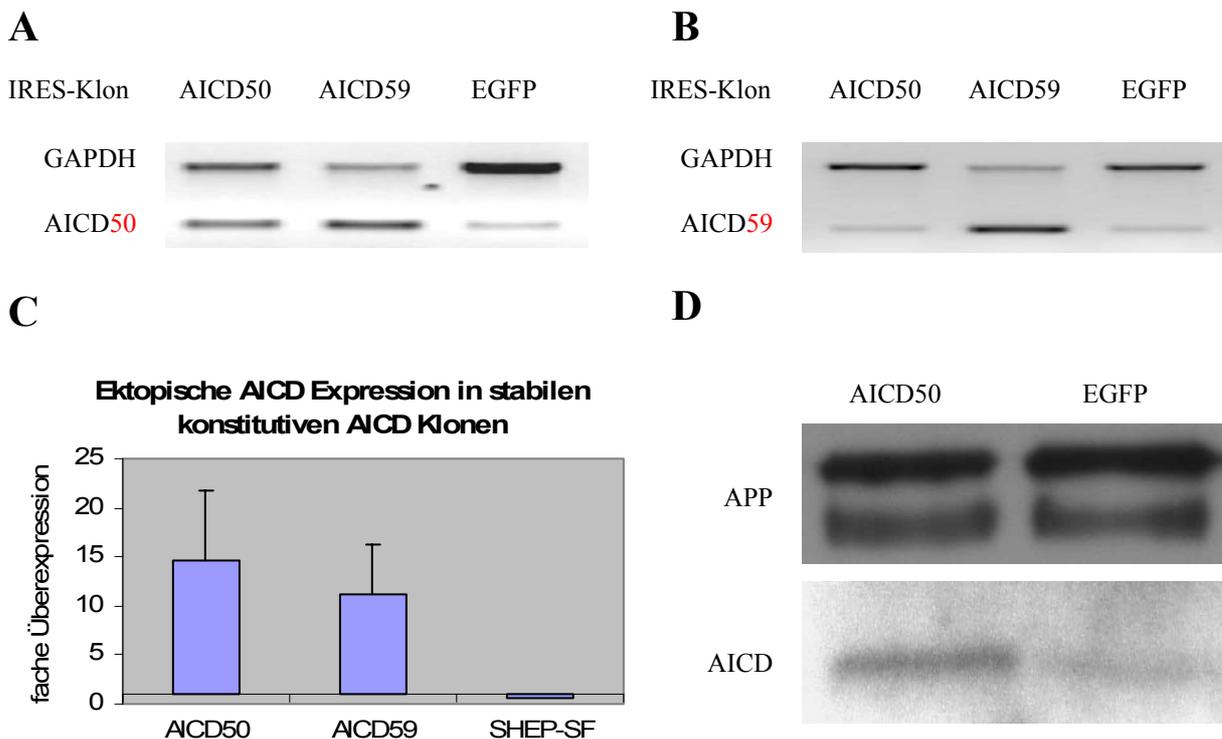
Aufgrund der vorangegangenen Arbeiten zur Analyse potentiell AICD vermittelter Apoptose (siehe 3.1), die zeigten, dass das apoptotische Potential von pAICD-EGFP bzw. pEGFP-AICD Fusionskonstrukten nicht zwingend auf AICD zurückgeführt werden kann, wurden keine weiteren Experimente mit stabilen AICD-EGFP bzw. EGFP-AICD Fusionszelllinien unternommen.

### 3.2.2.2 AICD-IRES-EGFP Zelllinien

SHEP-SF Neuroblastom-Linien wurden mit pAICD-IRES-EGFP bzw. dem Leervektor für Kontroll-Zelllinien transfiziert und mit G418 selektioniert. Es wurden insgesamt fünf Klone der AICD50 und fünf Klone der AICD59 Isoform etabliert. Diese wurden zunächst hinsichtlich der ektopischen AICD Expression charakterisiert.

### 3.2.2.2.1 AICD Expression in AICD-IRES-EGFP Zelllinien

Mittels quantitativer RT-PCR, real-time PCR und „Westernblot“ wurde die ektopische AICD Expression der AICD-IRES-EGFP Klone untersucht und quantifiziert (Abbildung 16). Aus stabilen Zelllinien wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert und mittels kompetitiver PCR und real-time PCR die Expression von AICD analysiert.



**Abbildung 16 - AICD Überexpression in stabil konstitutiv AICD-IRES-EGFP exprimierenden Klonen.** Es wurde RNA aus stabil transfizierten AICD-IRES-EGFP Klonen (beide Isoformen) isoliert, cDNA synthetisiert und mittels kompetitiver RT-PCR und real-time PCR die Expression von AICD analysiert. A), B) Mittels kompetitiver RT-PCR konnte die Überexpression von AICD für AICD50 und AICD59 im Vergleich zu EGFP Klonen bestätigt werden (jeweils ein Klon gezeigt). A) Während die kompetitive RT-PCR mit Primern für AICD50 sowohl für AICD50 und AICD59 Klone im Vergleich zur Kontrolle (EGFP Klon) ein stärkeres Signal der AICD Bande zeigte (verglichen mit GAPDH), erzeugte die RT-PCR mit Primern für AICD59 (B) nur für den AICD59 Klon eine stärkere AICD Bande (verglichen mit GAPDH). Auf diese Weise konnten AICD50 von AICD59 Klonen unterschieden werden. C) Dargestellt ist die real-time PCR- Analyse für AICD50- und AICD59-Klone. Die AICD Überexpression von jeweils 5 verschiedenen Klonen jeder AICD Isoform (gezeigt ist Mittelwert und Standardabweichung) wurde rechnerisch gegenüber dem dCt Wert-Mittel aus drei stabilen EGFP Klonen bestimmt (Referenzklone). Die Überexpression betrug für AICD50-IRES-EGFP Klone im Mittel 14,7 +/- 6,99-fach und 11,1 +/- 5,13-fach für entsprechende AICD59 Klone. Die Ausgangszelllinie SHEP-SF zeigte erwartungsgemäß keine AICD Regulation. Darüber hinaus wurden von AICD-IRES-EGFP und Kontroll-Klonen Gesamt-Proteinextrakte erstellt und mit einem  $\alpha$ -AICD (C8) Antikörper immunpräzipitiert. Präzipitate wurden in einem 17,5 %-igen Tris-Tricine Gel analysiert (D). Dargestellt ist ein AICD50 Klon gegenüber einem Kontrollklon. Kopräzipitiertes endogenes reifes und unreifes APP verdeutlicht gleiche Mengen aufgetragenen Proteinlysates. Die AICD Überexpression konnte somit auf mRNA und Proteinebene bestätigt werden.

Abbildung 16 A und B zeigen je einen AICD Klon im Vergleich zu einem EGFP Kontrollklon. Die kompetitive PCR mit Primern für AICD50 erzeugte bei beiden AICD

Isoformen im Vergleich zum Kontrollklon ein stärkeres AICD Signal, während die kompetitive PCR für AICD59 nur den AICD59 Klon gegenüber GAPDH stärker amplifiziert. Auf diese Weise konnten die beiden Isoformen voneinander unterschieden werden.

Die quantitative real-time PCR Analyse ergab für die ektopische AICD Expression in 5 verschiedenen AICD50-IRES-EGFP stabil exprimierenden Klonen im Mittel 14,7-fache (+- 6,99) Induktion und 11,1-fache (+- 5,13) mittlere Induktion in 5 AICD59-IRES-EGFP Klonen. Das Ausmaß der Überexpression wurde nach der  $\Delta\Delta C_t$  Methode berechnet, die in 2.3.2.4 genauer beschrieben ist. Als Referenzwert wurde der Mittelwert aus drei Kontrollvektor (pIRES2-EGFP) stabil transfizierten Klonen verwendet.

Gesamtprotein-Zelllysate von AICD und Kontrollklonen wurden mit einem C-terminalen APP Antikörper (C8) immunpräzipitiert und auf einem 17,5 % igen „Tris-Tricine“ Gel aufgetrennt. Nach dem „Blotten“ wurde mit demselben Antikörper detektiert. Auch auf Proteinebene konnte die AICD Überexpression bestätigt werden. In Kontrollklonen konnte AICD auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden. Da „full length“ APP jedoch kopräzipitiert wurde, kann angenommen werden, dass die  $\gamma$ -Sekretase vermittelte APP-Prozessierung in SHEP-SF Zellen nicht erfolgt (Abbildung 16 D). Ein AICD Proteinnachweis ohne Immunpräzipitation war nicht möglich. Somit konnte die Funktionalität des konstitutiv AICD exprimierenden Zellkultursystems bestätigt werden und für die Analyse der in der Literatur diskutierten potentiellen AICD Zielgene eingesetzt werden.

#### **3.2.2.2.2 Analyse AICD abhängig regulierter Gene**

Zu den in der Literatur kontrovers diskutierten AICD abhängig regulierten Zielgenen gehören das Tumor-Suppressor Gen KAI1, der sarko- und endoplasmatische Calcium Transporter SERCA2B und die Glykogen Synthase Kinase GSK3 $\beta$  (Baek et al., 2002; Kim et al., 2003; Leissring et al., 2002). Die Expression der Transkripte dieser Gene wurde in den etablierten Zellklonen des Typs AICD-IRES-EGFP analysiert. Es wurden jeweils drei Klone der AICD50 und AICD59 Isoform untersucht. Als Referenz dienten drei stabil mit dem Leervektor transfizierte Klone. Als Kontrolle wurde die parentale Zelllinie SHEP-SF ebenfalls untersucht. Aus den Zelllinien wurde RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Die Analyse erfolgte mittels real-time PCR (Abbildung 14) und zeigte, dass keines der drei diskutierten potentiell durch AICD regulierten Gene eine signifikante Regulation in diesen Zelllinien aufwies.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Regulationsfaktoren in AICD50 bzw. AICD59 Klonen:

Transkript	MW AICD50	STABW AICD50	MW AICD59	STABW AICD59
KAI1	2,2	1,3	0,7	0,8
SERCA2B	0,9	0,05	0,96	0,1
GSK3 $\beta$	0,85	0,44	0,88	0,5

Im Vergleich zu den Kontrollklonen konnte zwar im Mittel eine Induktion für KAI1 in AICD50 Klonen errechnet werden, doch waren die Ergebnisse aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant. Diese hohen Schwankungen der dCt-Werte waren ein generelles Problem bei der Analyse der potentiellen Zielgene KAI1, SERCA2B und GSK3 $\beta$  in stabilen konstitutiv AICD exprimierenden Klonen.

Die AICD abhängige Regulation des Calcium Transporters SERCA2B wurde von Leissring et al. ((Leissring et al., 2002) sowie Kongreßberichte des gleichen Autors) mit einer ebenfalls AICD abhängigen Störung der ER Calcium Homöostase in Verbindung gebracht. Sie stellten z.B. fest, dass in Fibroblasten von APP -/- Mäusen die beobachteten verringerten ER Calcium Konzentration durch eine Transfektion von AICD wieder auf ein normales Niveau angehoben werden konnte. Sie vermuteten, dass dieser Effekt infolge einer SERCA2B Aktivierung (Expressionssteigerung) durch AICD verursacht wurde.

In den in der vorliegenden Arbeit erstellten stabil konstitutiv exprimierenden AICD-IRES-EGFP Zelllinien war jedoch keine differentielle SERCA2B Regulation gegenüber Kontroll-Zelllinien nachweisbar. Umso interessanter erschien daher die Frage, ob AICD Expression in diesen Zelllinien trotzdem zu einer Modulation der ER Calcium Homöostase führt.

### **3.2.2.2.3 AICD erzeugt ER-Stress und Apoptose unabhängig von einer SERCA2B Expressionsänderung in konstitutiv AICD exprimierenden Zelllinien**

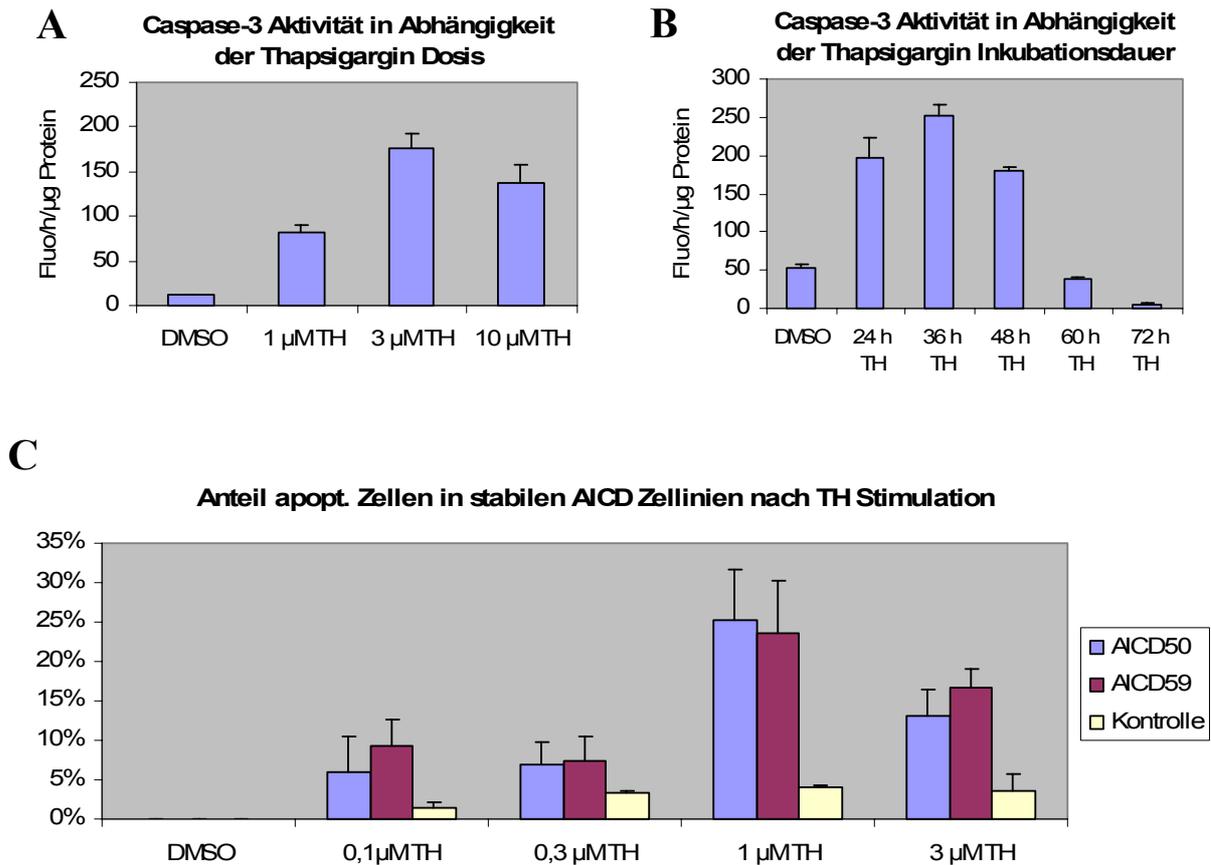
Um der Frage nachzugehen, ob AICD Expression die Calcium Konzentrationen des ER verändert, ist es möglich, AICD exprimierende Zellen sowie Kontroll-Zellen mit Thapsigargin zu behandeln. Infolge dieser Stimulation werden die sarko- und endoplasmatischen Calcium Transporter inhibiert, was zu einer Entleerung der Calcium Konzentration des ER führt. Entsprechend den im ER zuvor vorhandenen Calcium Konzentrationen werden nun unterschiedlich starke Calcium „Ströme“ in das Zytoplasma gelangen. Hohe zytoplasmatische Calcium Konzentrationen induzieren wiederum Caspase abhängigen Zelltod.

Misst man nun die Aktivität der Effektor-Caspase-3, so lässt sich darüber indirekt eine Aussage über die zuvor vorherrschenden ER Calcium Konzentrationen ableiten.

Für ein solches Experiment müssen zunächst basale Parameter der verwendeten Thapsigargin-Dosis und –Inkubationsdauer ermittelt werden, die für jede Zelllinie unterschiedlich sind. Diese beiden Parameter („dose and time response“) werden so gewählt, dass die verwendete Zelllinie „per se“ (d.h. ohne Expression ektopisch exprimierter Gene, in diesem Fall AICD) bereits erhöhte Caspase-3 Aktivität besitzt und somit die apoptotische Schwelle der Zelle erreicht wird. Zusätzliche potentiell auf die ER Calcium Homöostase einwirkende Stimuli (wie z.B. AICD Expression) könnten in den Zellen dann sehr leicht programmierten Zelltod induzieren, was wiederum über die Messung der Caspase-3 Aktivität quantifiziert werden kann. Diese basalen Parameter wurden für die Zelllinie SHEP-SF ermittelt, die als Empfänger-Zelllinie für die Etablierung stabiler Zelllinien gewählt wurde (Abbildung 17 A und B). Nach der Stimulation mit Thapsigargin wurde ein Gesamtprotein-Zellextrakt erstellt und die darin enthaltene Caspase-3 Aktivität gemessen.

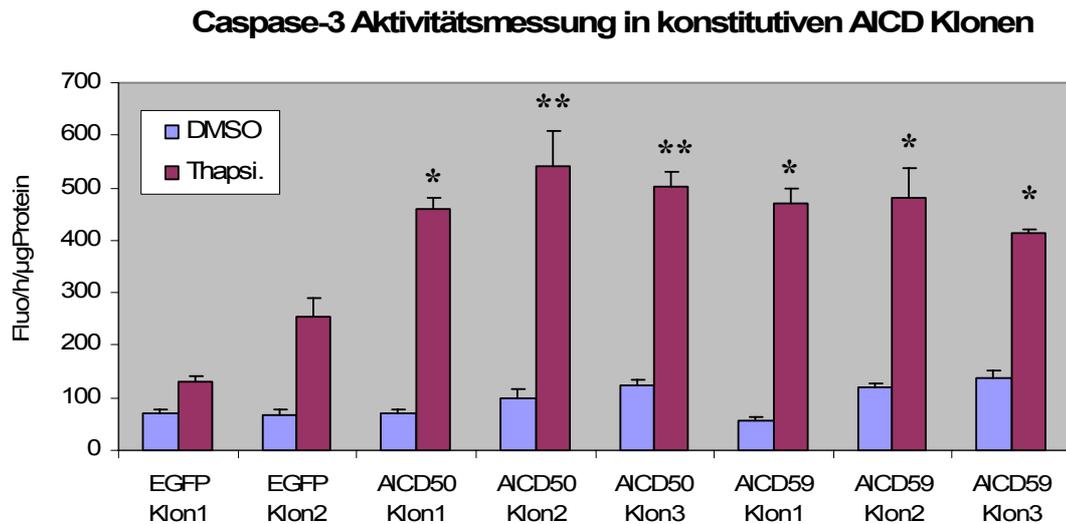
Die Stimulation von SHEP-SF Zellen mit Thapsigargin bei einer Konzentration von 1 und 3  $\mu\text{M}$  führte zu signifikant erhöhter Caspase-3 Aktivität. Bei Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  Thapsigargin waren zum Messzeitpunkt (24 h Inkubationsdauer) bereits die meisten Zellen abgestorben (nicht gezeigt), so dass die Quantifizierung für diese Dosis keinen realistischen Wert lieferte (Abbildung 17 A).

Zudem erschien eine Thapsigargin Inkubationsdauer von 24 h am besten geeignet zu sein (Abbildung 17 B), da längere Inkubationszeiten zu großen Anteilen bereits abgestorbener Zellen führten (nicht gezeigt). Für die folgenden Experimente sollten die konstitutiv AICD exprimierenden Zelllinien sowie Kontrollklone daher für 24 h mit 1  $\mu\text{M}$  Thapsigargin stimuliert werden. Diese Parameter wurden durch ein Experiment gestützt, bei dem AICD-IRES-EGFP Klone sowie Kontrollklone 24 h lang mit Thapsigargin Konzentrationen zwischen 0,1 und 3  $\mu\text{M}$  stimuliert wurden. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit „Hoechst 33342“ gefärbt. Der Anteil apoptotischer Zellen, bezogen auf die Anzahl der Zellen zu Anfang des Experiments, wurde im standardisierten Gesichtsfeld (Rasterokular) ausgezählt (Abbildung 17 C). AICD-IRES-EGFP Klone, die mit 1 oder 3  $\mu\text{M}$  Thapsigargin stimuliert worden waren, wiesen signifikant höhere Anteile apoptotischer Zellen auf als stabil mit Kontrollvektor transfizierte Klone.



**Abbildung 17 - Zeit- und Dosis- abhängige Caspase-3 Aktivierung in SHEP-SF Zellen.** Zellen der Zelllinie SHEP-SF, die als Grundlage zur Erstellung stabiler Zelllinien verwendet wurde, wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Thapsigargin (TH) für 24 h stimuliert, oder es wurde mit konstanter Thapsigargin Konzentration von 1 µM für unterschiedlich lange Zeiträume inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Caspase-3 im Zellysate gemessen. A) Bei einer Konzentration von 1 und 3 µM Thapsigargin für 24 h konnte erhöhte Caspase-3 Aktivität gemessen werden, während mit 10 µM Thapsigargin Konzentration die meisten Zellen zum Messzeitpunkt bereits abgestorben waren. B) 24 und 36 h Thapsigargin Stimulation erhöhten die Aktivierung der Caspase-3 deutlich. Längere Inkubationszeiten führten dazu, dass die Zellen größtenteils abgestorben waren. Für die folgenden Analysen der Caspase-3 Aktivität in stabilen AICD exprimierenden Klonen wurde deshalb eine Thapsigargin Konzentration von 1 µM und eine Inkubationsdauer von 24 h gewählt. Die richtige Wahl dieser Parameter wurde durch ein weiteres Experiment bestätigt (C). Dabei wurden AICD-IRES-EGFP Klone 24 h lang mit unterschiedlichen Thapsigargin Konzentrationen stimuliert, die Zellen anschließend fixiert und mit „Hoechst 33342“ gefärbt. AICD Klone zeigten bei einer Konzentration von 1 und 3 µM Thapsigargin gegenüber der Kontrolle (pEGFP-C1 stabil transfizierte Klone) signifikant erhöhte Anteile apoptotischer Zellen.

Nach Bestimmung der für den „Caspase-3 assay“ notwendigen basalen Parameter, wurden drei AICD50-IRES-EGFP, drei AICD59-IRES-EGFP und zwei Kontroll-Klone nach 24-stündiger 1 µM Thapsigargin Stimulation hinsichtlich ihrer Caspase-3 Aktivität untersucht (Abbildung 18). Alle analysierten Zellklone der AICD50 und AICD59 Isoform zeigten gegenüber Kontrollen (Leervektor stabil transfizierte Zellen; EGFP Klon) signifikant erhöhte Caspase-3 Aktivität. Mit DMSO, dem Lösungsmittel von Thapsigargin, behandelte Zellen, zeigten hingegen keine Unterschiede zu Kontrollen.



**Abbildung 18 - Caspase-3 Aktivitätsmessung in konstitutiv AICD exprimierenden stabilen Klonen.** AICD-IRES-EGFP und Kontroll-Klone wurden für 24 h mit 1  $\mu$ M Thapsigargin stimuliert. Anschließend wurde ein Gesamtzelllysate erstellt und die Aktivität der Effektor-Caspase-3 quantifiziert. Sowohl Klone der AICD50 wie der AICD59 Isoform zeigten signifikant erhöhte Caspase-3 Aktivität im Vergleich zu Leervektor stabil transfizierte Klone (EGFP Klone) (Signifikanz errechnet mit Tukey-Test, \* $p < 0,002$ , \*\* $p < 10^{-5}$ ).

Die Ergebnisse der Caspase-3 Aktivitätsmessung in konstitutiv AICD exprimierenden Klonen waren sehr konsistent und gegenüber Kontrollklonen hoch signifikant. Da, wie zuvor gezeigt, in den vorliegenden Zelllinien die Genexpression des Calcium Transporters SERCA2B nicht verändert ist, müssen andere Mechanismen vorliegen, die für die Störung der ER Calcium Homöostase verantwortlich sind. Da in Gal4-Reporterstudien das transaktivierende Potential von AICD nachgewiesen wurde, ist nahe liegend, dass andere Gene, die in die Regulation der ER Calcium Homöostase der Zelle involviert sind, differentiell reguliert werden. Eine Identifikation dieser potentiell AICD regulierten Zielgene war daher ein wesentliches Ziel dieser Arbeit.

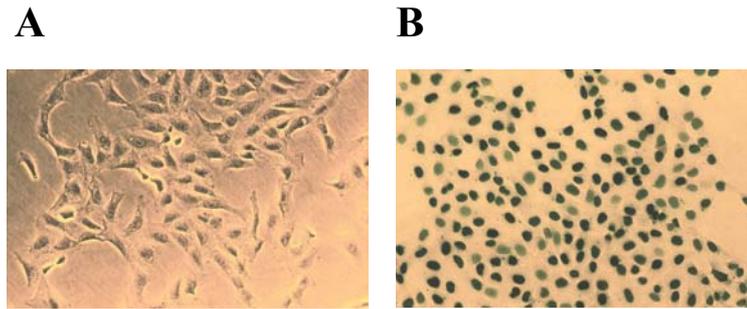
### 3.2.3 Induzierbare Zelllinien

Aufgrund klonaler Unterschiede der stabil konstitutiv AICD-IRES-EGFP transfizierten Zelllinien erschienen diese für eine gezielte Suche potentiell AICD abhängiger Zielgene wenig geeignet. Stattdessen wurde ein induzierbares Zellkultursystem erstellt, das diesen Nachteil nicht besitzt. Für die Etablierung induzierbarer Zellklone wurde die Zelllinie Tet21 als Empfänger-Zelllinie verwendet. Tet21 ist ein mit dem Tetrazyklin Transaktivator stabil transfizierter Subklon der SHEP-SF Neuroblastom Linie. Die Tet21 Zelllinie wurde vom DKFZ Heidelberg zur Verfügung gestellt und führt nach Entzug (Auswaschen) des Antibiotikums Doxyzyklin zu einer Induktion ektopisch inserierter Gene (Tet-Off System).

AICD bildet zusammen mit FE65 und TIP60 einen transkriptionell aktiven Komplex. Veröffentlichungen der letzten Jahre zeigten, dass FE65 für die Transkriptionsaktivierung entscheidende Bedeutung haben kann und den Effekt von AICD potenziert. Diese Experimente beruhen auf Gal4-Reportersystemen, bei denen AICD-Gal4-Fusionskonstrukte zusammen mit Reportervektoren in Zellen transfiziert wurden (Cao and Sudhof, 2001). Es zeigte sich, dass das Ausmaß der Transaktivierung durch eine gleichzeitige Überexpression von FE65 um bis zu 2000-fach erhöht werden konnte.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit neben einer AICD induzierbaren Neuroblastom-Zelllinie auch eine AICD *und* FE65 induzierbare Linie generiert. Als Kontrollen wurden ferner Linien erstellt, die nur für FE65 induzierbar waren sowie Linien, die nur für EGFP induzierbar waren, welches als Marker in allen genannten Linien unter Induktion koexprimiert wurde. Die Stabilität der Linien wurde durch Kotransfektion des Resistenzvektors pBABE-Puro bewirkt. Mit den zuvor getesteten Resistenz vermittelnden Vektoren pTK-Hyg (Hygromycin Resistenz) und pIRESbleo3 (Phleomycin Resistenz) konnten keine stabilen Linien erstellt werden.

Anmerkungen: An dieser Stelle sei angefügt, dass zunächst versucht wurde, ein lacZ induzierbares Reporterplasmid anstatt des EGFP Systems (pBI-G Vektor „Clontech“, Heidelberg) zu verwenden. Bei dem lacZ Reportersystem können positive Klone über eine  $\beta$ -Galaktosidase Färbung nachgewiesen werden. Es konnten zwar Zellklone mit diesem System etabliert werden (Abbildung 19), jedoch erwies sich dieses System, bei dem positive Zellen bzw. Klone nur nach Fixierung und Färbung nachweisbar waren, verbunden mit der in SHEP-SF Zellen geringen Transfektionsrate als nicht praktikabel. Alle im Rahmen dieses Etablierungsversuchs genutzten Verfahren wie Klonierungen und  $\beta$ -Gal Nachweisverfahren sind daher in dieser Arbeit nicht aufgeführt.



**Abbildung 19 - Stabiler AICD und  $\beta$ -Galaktosidase (als Marker) induzierbarer Klon.** A) Unter Zugabe von Tetracyclin (bzw. Doxycyclin) wird die Expression reprimiert, wäscht man das Antibiotikum aus, aktiviert der Tetracyclin Transaktivator den bidirektionalen Tet-Promotor (B). Bei dem hier gezeigten Klon fungiert lacZ als Reporter gen. Positive Zellklone können nach Fixierung und  $\beta$ -Galaktosidase Färbung detektiert werden. Dieses System erwies sich für die folgenden Experimente aufgrund der aufwendigen Reporter gen detektion als nicht praktikabel und wurde zugunsten eines EGFP Reportersystem verworfen.

Ebenfalls erfolglos blieb der Versuch eine Zelllinie zu etablieren, die AICD induzierbar, aber FE65 konstitutiv exprimieren sollte. Dazu wurde versucht, einen pIRESbleo3-FE65 Vektor in bereits stabile AICD induzierbare Zelllinien zu transfizieren und über Phleomycin-Stimulation zu selektionieren. Es war jedoch nicht möglich, solche Zellklone dauerhaft zu kultivieren.

Ein unmittelbares und einfaches Verfolgen der „angeschalteten“ Expression im induzierbaren System ist mit EGFP als Reporter gen auf einfache Weise möglich. Der grüne Fluoreszenzfarbstoff wird gleichzeitig zur Induktion ektopisch inserierter Gene koexprimiert. So kann nicht nur das Ausmaß der Induktion verfolgt werden, sondern auch analysiert werden, ob es sich bei den etablierten Klonen um „reine“ Klone handelt (100% EGFP exprimierende Zellen) oder ob eine Mischpopulation vorliegt. Aufgrund der Tatsache, dass die Resistenz über eine Kotransfektion mit einem zweiten Vektor inseriert wurde und sich so stabile Klone ohne inseriertes AICD/FE65 Konstrukt etablieren können, ist dieses einfache Monitoring ein großer Vorteil und erheblich praktikabler als ein lacZ Reportersystem.

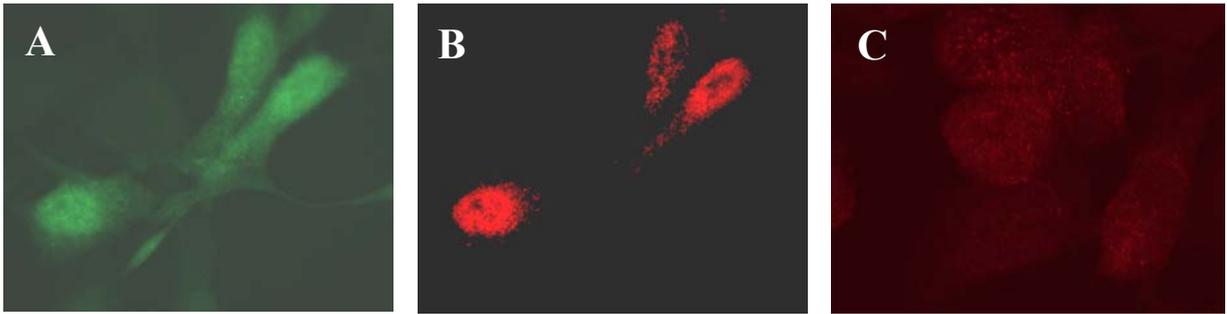
Zur Vereinfachung der im Folgenden immer wieder genannten Zellklone/ Vektoren werden folgende Abkürzungen eingeführt (Tabelle 1).

Kürzel Klon/ Vektor	Beschreibung
iA50	induzierbar für AICD50 und EGFP
iA59	induzierbar für AICD59 und EGFP
iA	bezeichnet im Folgenden, sofern nicht anders benannt, den Mittelwert der jeweiligen Analyse aus 2 iA50 und 2 iA59 Klonen
iFA50	induzierbar für FE65 und AICD50 und EGFP
iFA59	induzierbar für FE65 und AICD59 und EGFP
iF	induzierbar für FE65
iEGFP	induzierbar für EGFP
iFA	bezeichnet im Folgenden, sofern nicht anders benannt, den Mittelwert der jeweiligen Analyse aus 2 iFA50 und 2 iFA59 Klonen

**Tabelle 1 - Übersicht und Beschreibung der erstellten Vektoren bzw. stabilen induzierbaren Klone.**

Nach abgeschlossener Klonierung und Sequenzierung wurden alle Konstrukte in der Tet21 Zelllinie zunächst nach *transienter* Transfektion auf ihre Doxyzyklin (Dox) abhängige Induktion von EGFP getestet. Dazu wurden die Vektoren einerseits in nicht stimulierte Tet21 Zellen transfiziert, andererseits in Zellen, die drei Tage zuvor mit Doxyzyklin stimuliert wurden. Alle Konstrukte zeigten unter Dox Entzug die Induktion von EGFP. Für die Konstrukte iFA sowie iF wurde die FE65 Expression mittels Immunfluoreszenz analysiert, was für AICD aufgrund seiner Instabilität und des endogenen APP Hintergrunds nicht möglich war (Abbildung 20).

Während FE65 in iFA und iF Klonen deutliche Kernlokalisierung zeigte, konnte in iA Zellen nur eine schwache Hintergrundfärbung nachgewiesen werden, die sich über das Zytoplasma und den Zellkern diffus erstreckte. Diese Experimente bestätigten die Funktionalität der klonierten Vektoren.

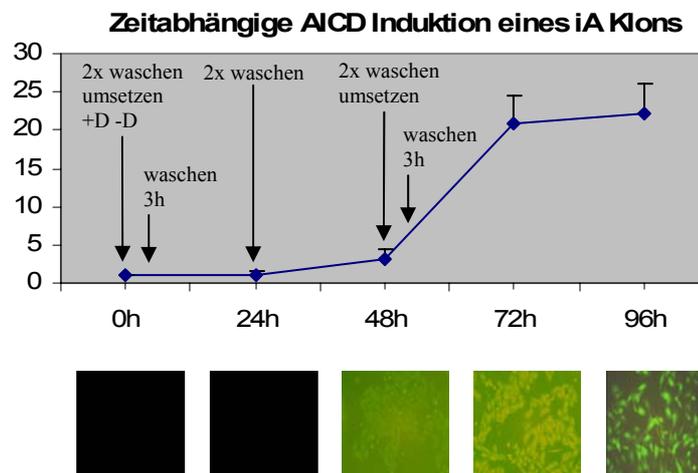


**Abbildung 20 - EGFP und FE65 Induktion in Tet21 Zellen nach transients Transfektion.** Die Vektoren iFA, iF und iA wurden transient in Dox stimulierte und Dox nicht-stimulierte Tet21 Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und die FE65 Expression mittels Immunfluoreszenz untersucht. A) Wird Doxyzyklin aus den Zellen heraus gewaschen, werden durch den Tetrazyklin Promotor regulierte Gene aktiviert. EGFP diente in allen erstellten Zelllinien als Reportergen und wird koexprimiert. B) In iF und iFA Zellen wird FE65 induziert (gezeigt ist ein iFA Klon). Die Immunfluoreszenzfärbung zeigt die deutliche Kernlokalisierung des Adapterproteins FE65. C) In iA Zelllinien war nur eine schwache FE65 Hintergrundfärbung erkennbar, die sich diffus über das Zytoplasma und den Kern erstreckte.

Mittels der in Tabelle 1 beschriebenen Vektoren konnten nach Puromycin Selektion jeweils mehrere stabil transfizierte Klone etabliert werden. Zellen von iA, iF und iEGFP Klonen zeigten morphologisch (Größe und Struktur der Zellen) keine Unterschiede zu den parentalen Tet21 Zellen. iFA Zellen hingegen besaßen ein ausgedehnteres Zytoskelett. Unterschiede in der Zellteilungsrate konnten nicht beobachtet werden. Alle Klone wurden unter Doxyzyklin-Gabe kultiviert (keine Expression ektopisch inserierter Gene). Für die folgenden Experimente wurde Doxyzyklin stets ausgewaschen.

### 3.2.3.1 Zeitabhängiger Induktionsverlauf stabiler Linien

Nach dem Waschen nicht-induzierter Zellen von induzierbaren Zelllinien und Kultivierung in Doxyzyklin freiem Medium beginnen die Zellen mit der Expression ektopisch inserierter Gene. Allerdings ist die Induktionshöhe und –dauer bis zur initialen Expression sehr davon abhängig, wann die Zellen gewaschen und umgesetzt werden, da Doxyzyklin unspezifisch an Zellen und an die extrazelluläre Matrix bindet. Für die in dieser Arbeit erstellten induzierbaren Zelllinien wurde ein Protokoll der Fa. BD Biosciences (s. dazu „Technical Note Tet-Off System“ der Firma BD Biosciences) zur Expressionsinduktion zugrunde gelegt. Experimente mit einem iA Klon führten schließlich zu einer Modifikation dieses Protokolls, so dass eine zeitlich frühe und zugleich hohe Induktion erzielt werden konnte (Abbildung 21).



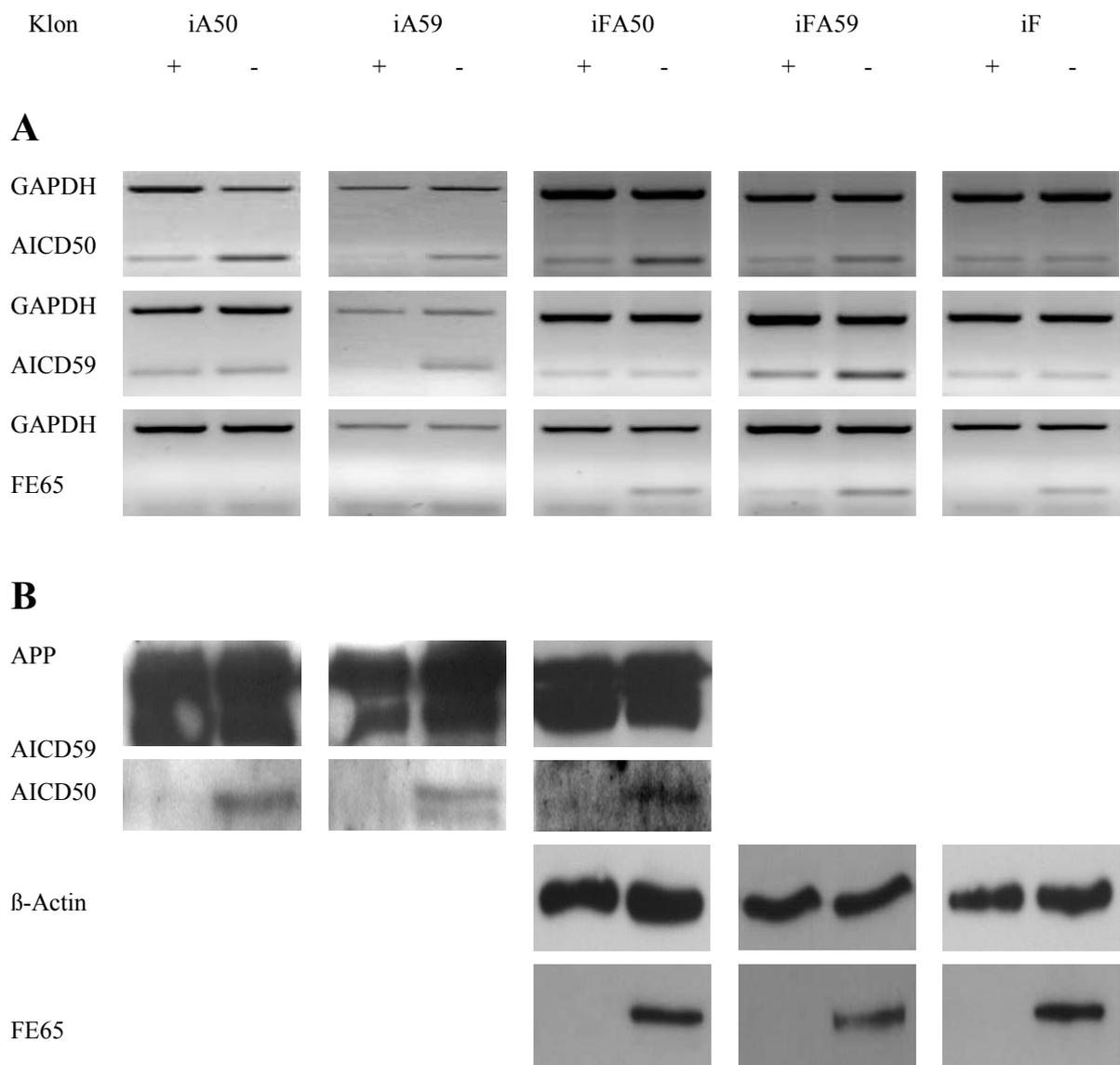
**Abbildung 21 – Zeitabhängige Expression ektopisch inserierter Gene.** Ein induzierbarer, sich im reprimierten Zustand befindlicher Klon (+Dox) wurde 2 x gewaschen, trypsiniert und auf zwei Kulturschalen (eine mit und eine ohne Dox) ausgesät und im Folgenden entsprechend dem in der Abbildung angegebenen Protokoll erneut umgesetzt bzw. gewaschen. Nach 24, 48, 72 und 96 h wurde RNA isoliert, cDNA erstellt und mittels real-time PCR die AICD Induktionshöhe quantifiziert. Nach 72 h konnte eine hohe AICD Induktion erreicht werden, die im Folgenden nicht stärker anstieg. Zu früheren Zeitpunkten war keine ausreichende AICD Induktion vorhanden.

Der sich im reprimierten Zustand befindende Zellklon wurde 2x mit PBS gewaschen, trypsiniert und auf zwei Kulturschalen mit und ohne Doxyzyklin enthaltenes Medium umgesetzt. Nach 3 h wurde erneut mit PBS gewaschen. 24 h nach dem Umsetzen wurde 2 x mit PBS gewaschen, bevor nach 48 h die Zellen erneut 2 x gewaschen, trypsiniert und umgesetzt wurden. Auch nach diesem zweite Umsetzen wurde nach 3 h erneut mit PBS gewaschen. Mit diesem Protokoll konnten zum 72 h Zeitpunkt, der für die folgenden Analysen gewählt wurde, AICD Induktionswerte von bis zu 23-facher Überexpression erzielt werden. Zu späteren Zeitpunkten (96h und später (nicht gezeigt)) konnte keine wesentlich

höhere Expression erreicht werden. Zu früheren Zeitpunkten war keine ausreichende Induktion vorhanden.

### 3.2.3.2 Analyse ektopisch exprimierter Gene

Alle induzierbaren Klone wurden zunächst hinsichtlich ihrer AICD und/oder FE65 Expression mittels kompetitiver RT-PCR und „Westernblotting“ nach 72-stündiger Induktion im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen analysiert (Abbildung 22).



**Abbildung 22 - Charakterisierung induzierbarer Zelllinien.** Aus induzierbaren Zelllinien des Typs iA, iFA und iF wurde RNA des induzierten (72 h) und des nicht-induzierten Zustands isoliert, cDNA erstellt und mittels kompetitiver RT-PCR auf AICD bzw. FE65 Induktion analysiert. Die in A) gezeigte kompetitive RT-PCR bezieht sich auf GAPDH als Referenz-Gen und wurde sowohl mit Primern für die kurze AICD50-Isoform wie für die längere AICD59-Isoform durchgeführt. Entsprechend zeigten sowohl AICD50- und AICD59-Klone oder nur der AICD59 Klon eine Induktion. Darüber hinaus wurden Gesamtzell-Proteinlysate erstellt und mittels „Westernblot“ die Induktion von AICD bzw. FE65 analysiert. Für den AICD Nachweis wurde das Peptid zunächst immunpräzipitiert. In allen untersuchten induzierbaren Zelllinien konnte die Induktion von AICD bzw. FE65 sowohl auf RNA- wie auf Proteinebene verifiziert werden.

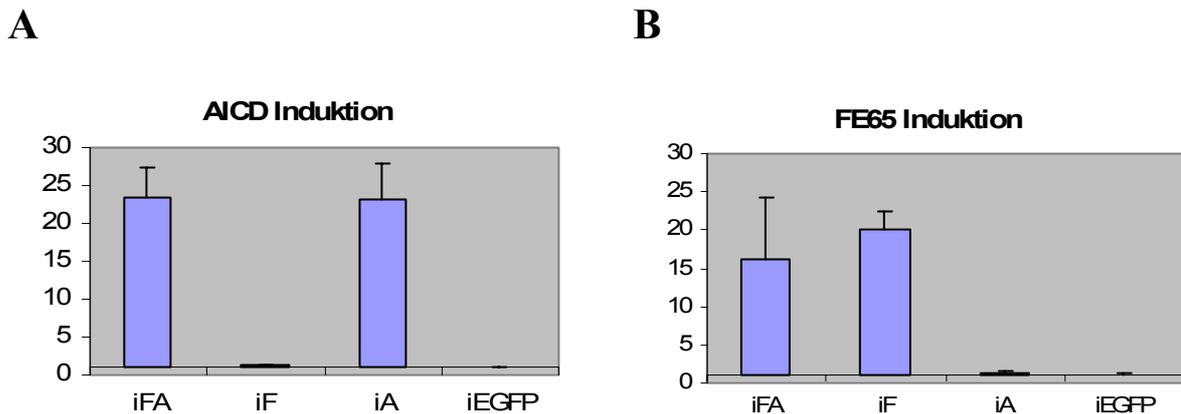
Für die PCR Versuche wurden Gesamt-RNA Lysate erstellt und anschließend cDNA synthetisiert. Für den Nachweis auf Proteinebene wurden Gesamtprotein-Zelllysate erstellt. Die induzierbaren Zellklone mit dem Hintergrund der SHEP-SF Neuroblastom-Linie (Tet21) zeigten 72 h nach Doxyzyklin Entzug (entsprechend dem unter Abbildung 21 etablierten Protokoll) Expression der jeweils stabil transfizierten Konstrukte auf RNA- und auf Proteinebene:

AICD wurde auf RNA Ebene in iA und iFA Klonen exprimiert (Abbildung 22 A Spalte 1-3). Da sowohl für die kurze AICD50 wie für die lange AICD59 Isoform Klone etabliert werden konnten, wurde mittels kompetitiver real-time PCR die Induktion einerseits mit Primern für AICD50 (beide Isoformen zeigten Induktion), andererseits mit Primern für AICD59 (nur lange Isoform zeigte Induktion) durchgeführt. Die Expression der richtigen Isoform konnte so geprüft werden.

Auf Proteinebene konnte AICD aufgrund der geringen Peptidgröße und des schnellen durch „Insulin-Degrading Enzyme“ oder Proteasom vermittelten Abbaus nur nach vorhergehender Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Die Induktion von AICD auf Proteinebene war ebenfalls in iA und iFA Klonen detektierbar (Abbildung 22 B) Spalte 1-3). Im Westernblot des induzierbaren AICD59 Klon konnten zwei Banden nachgewiesen werden. Neben der erwarteten AICD59 Bande entstand eine kleinere Bande, die auf Höhe der AICD50 Bande im 17,5 %-igen Tris Tricine Gel lief und offenbar dieser Isoform entsprach. AICD59 wurde offensichtlich in den Klonen zur kürzeren Isoform prozessiert.

FE65 schließlich wurde in iFA und iF Klonen auf RNA- und Proteinebene exprimiert (Abbildung 22 A, B Spalte 3-5).

Die Induktionshöhen wurden zudem mittels real-time PCR quantifiziert (Abbildung 23). Dazu wurden iFA (zwei iFA50 und zwei iFA59 Klone), zwei iF Klone, iA (zwei iA50 und zwei iA59 Klone) und zwei iEGFP Klone analysiert. Aus diesen Klonen wurde sowohl vom induzierten (72 h Induktion) wie vom nicht-induzierten Zustand RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Induktionshöhen von AICD und FE65 mittels real-time PCR analysiert.



**Abbildung 23 - Quantifizierung der Induktionshöhe mittels real-time PCR 72 h nach differentieller Doxyzyklin Stimulation.** Aus induzierbaren Zelllinien (iFA (zwei iFA50 und zwei iFA59 Klone), zwei iF Klone, iA (zwei iA50 und zwei iA59 Klone) und zwei iEGFP Klone) wurde jeweils vom induzierten Zustand (72 h Induktion) und dem nicht-induzierten Zustand RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Induktionshöhe von AICD bzw. FE65 mittels real-time PCR quantifiziert. A) Die durchschnittliche Induktionshöhe von AICD in iFA Klonen betrug 23,47  $\pm$  3,95 und iA Klonen 23,04  $\pm$  4,78. B) Die durchschnittliche Induktionshöhe von FE65 in iFA Klonen war 16,3  $\pm$  8,1, in iF Klonen 20,11  $\pm$  2,36.

Die mittleren Expressionshöhen für AICD waren in iFA und iA Klonen sehr ähnlich (in iFA Klonen 23,47  $\pm$  3,95; in iA Klonen 23,04  $\pm$  4,78). Die FE65 Expressionshöhe lag in iFA Klonen bei 16,3  $\pm$  8,1 und in iF Klonen bei 20,11  $\pm$  2,36.

### 3.2.3.3 Analyse potentiell AICD abhängig regulierter Gene

Analog den Untersuchungen in konstitutiv AICD exprimierenden Zellen wurden die potentiellen Zielgene KAI1, SERCA2B und GSK3 $\beta$  auch in induzierbaren Zelllinien untersucht (Tabelle 2).

Gensymbol		iFA	iF	iA	iEGFP
KAI1	MW	0,94	0,80	0,57	0,74
	STABW	0,02	0,09	0,15	0,03
GSK3 $\beta$	MW	0,91	1,06	1,14	1,19
	STABW	0,14	0,26	0,06	0,23
SERCA2B	MW	1,08	1,00	0,94	0,92
	STABW	0,16	0,16	0,10	0,32

**Tabelle 2 – Regulation potentiell AICD abhängig regulierter Gene in induzierbaren Zelllinien.** Aus induzierbaren Zelllinien des Typs iFA, iF, iA und iEGFP wurde RNA des induzierten (72 h Induktion) wie des nicht-induzierten Zustands isoliert, cDNA synthetisiert und mittels real-time PCR die Induktion der in der Literatur diskutierten Zielgene KAI1, GSK3 $\beta$  und SERCA2B analysiert. Weder in iFA noch in iA Klonen konnte eine differentielle Expression detektiert werden. Analysiert wurden drei iFA (zwei iFA50, ein iFA59), zwei iF, drei iA (zwei iA50, ein iA59) und zwei iEGFP Klone.

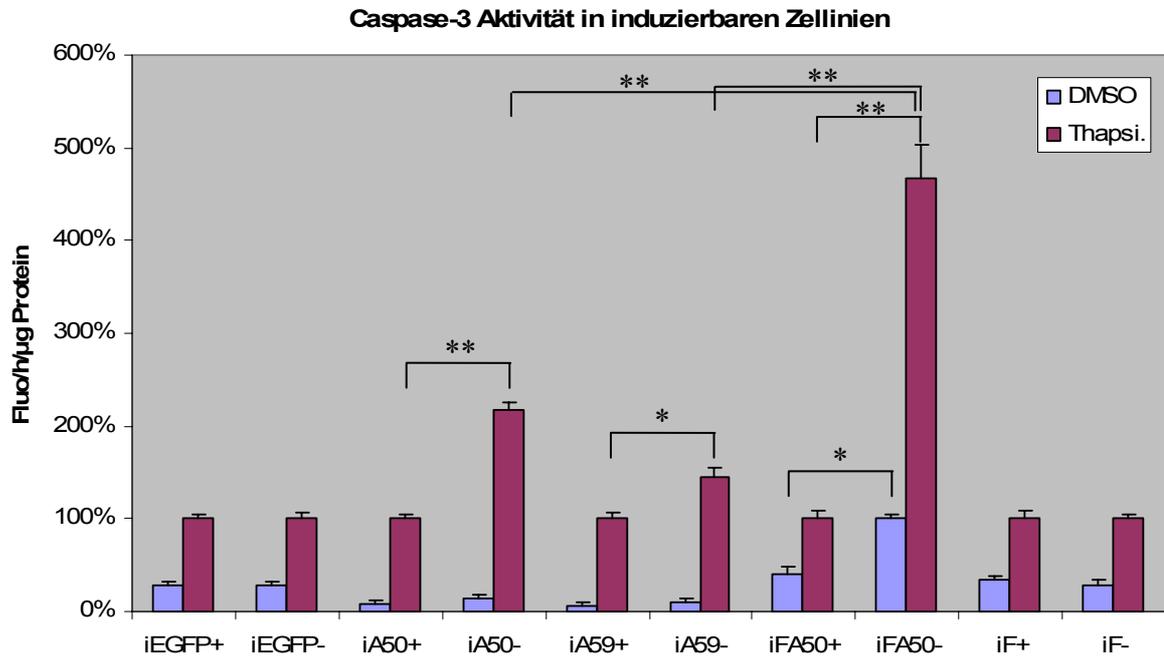
Eine differentielle Regulation konnte auch in den induzierbaren Zelllinien nicht detektiert werden. Auch für diese Zelllinien stellte sich die Frage, ob AICD- bzw. AICD- und FE65-Induktion die Calcium Konzentrationen des ER beeinflusst, obwohl der Calcium Transporter SERCA2B nicht differentiell reguliert war.

#### **3.2.3.4 AICD erzeugt ER-Stress und Apoptose unabhängig von einer SERCA2B Expressionsänderung in induzierbar AICD exprimierenden Zelllinien**

Eine AICD abhängige Modulation der intrazellulären ER Calcium Konzentration wurde von (Leissring et al., 2002) beschrieben. Diskutiert wurde in diesem Rahmen auch ein potentieller Einfluss von AICD auf das Expressionslevel der sarko- und endoplasmatischen Calcium Transporter SERCA, insbesondere SERCA2B.

In konstitutiv AICD exprimierenden Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit eine Modulation der ER Calcium Homöostase gezeigt werden, jedoch konnte keine differentielle Expression von SERCA2B detektiert werden. Auch in induzierbaren Zelllinien war keine differentielle Genexpression von SERCA2B (induziert vs. nicht-induziert) analysierbar. Analog dem konstitutiven Modell wurde auch in den induzierbaren Linien Caspase-3 Aktivität nach Thapsigargin Stimulation untersucht. Da die parentale Tet21 Zelllinie ein mit dem Tetrazyklin-Transaktivator stabil transfizierter Subklon der SHEP-SF Zelllinie ist, wurden die basalen Parameter („time and dose response“) der in Abbildung 17 untersuchten SHEP-SF Zelllinie für die Messung der Caspase-3 Aktivität nach Thapsigargin Stimulation übernommen. Verglichen wurde jeweils der induzierte mit dem nicht-induzierten Zustand. Nach vollständiger Induktion (72 h) wurden die Zellen 24 h mit 1  $\mu$ M Thapsigargin stimuliert (DMSO als Kontrolle).

Die Analyse der Caspase-3 Aktivität ergab folgendes Bild (Abbildung 24).



**Abbildung 24 - Caspase-3 Aktivitätsmessung in induzierbaren Zelllinien nach Thapsigargin- oder DMSO-Stimulation.** AICD induzierte Zellen (iA) zeigten nach Thapsigargin Stimulation erhöhte Caspase-Aktivierung, während DMSO keinen Einfluss hatte (+ (reprimiert) gegenüber – Dox (induziert)). In iFA Klonen potenzierte sich die Caspase-3 Aktivität nach Thapsigargin-Stimulation signifikant gegenüber iA Klonen. Auch DMSO behandelte iFA Klone zeigten nach Induktion signifikant erhöhte Aktivität. Dagegen hatte die Induktion von FE65 (iF) sowie von EGFP (iEGFP, Kontrollklon) keinen Effekt auf die Caspase-3 Aktivität (Tukey-Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 10^{-5}$ ). Die Induktion von AICD führt daher zu erhöhtem ER-Stress, der sich nach Thapsigargin Stimulation durch aktive Caspase-3 messen lässt. Die Koexpression von AICD und FE65 verstärkte diesen Effekt.

In induzierten iA Zelllinien (iA50 und iA59) wurde Caspase-3 nach Thapsigargin Stimulation signifikant aktiviert, während DMSO-behandelte Zellen keine signifikanten Unterschiede zeigten. Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Induktion von FE65 in iFA50 Linien potenziert. Aber auch DMSO-behandelte induzierte iFA Zellen zeigten gegenüber ihren reprimierten Kontrollen bereits eine höhere Caspase-3 Aktivität auf. iF und iEGFP induzierte Zellen zeigten keinen Unterschied in der Caspase-3 Aktivität gegenüber ihren Kontrollen.

Durch die Induktion von AICD werden offensichtlich die ER Calcium Konzentrationen erhöht, so dass nach Thapsigargin Stimulation und folglich Entleerung der ER Speicher vermehrt Calcium in das Zytosol gelangt, wo es apoptotisch wirkt und die Effektorcaspase-3 aktiviert. Dies kann durch die Koexpression von FE65 in iFA Klonen weiter verstärkt werden.

### 3.2.3.5 AICD abhängig differentiell regulierte Gene in humanen Neuroblastom-Zelllinien

Die bisherigen Experimente zeigten, dass Thapsigargin Stimulation in AICD exprimierenden Zelllinien (sowohl konstitutiv als auch induzierbar) zu erhöhter Caspase-3 Aktivität führt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Caspase-3 Aktivierung ursächlich für den programmierten Zelltod ist. Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche ektopische Expression von FE65 verstärkt. Die für diesen induzierten programmierten Zelltod zugrunde liegende Ursache könnte eine transkriptionelle Aktivierung Zelltod-relevanter Gene durch den AICD Transkriptionskomplex sein. Insbesondere differentiell regulierte Gene, die in Zusammenhang mit einer gestörten Calcium Homöostase stehen, sind von Interesse. Der diskutierte Calcium Transporter SERCA2B war jedoch weder in konstitutiven noch in induzierbaren Zelllinien differentiell reguliert. Um andere potentiell AICD abhängig regulierte Gene zu identifizieren, wurden induzierbare AICD (iA) und induzierbare FE65/AICD Zelllinien (iFA) bezüglich ihres Genexpressionsmusters untersucht. Aus 72 h induzierten Zellen und den zugehörigen nicht-induzierten Zellen wurde RNA isoliert, biotinylierte cRNA erstellt und diese auf Affymetrix (Santa Clara, USA) GeneChips hybridisiert. Aufgrund der in 3.2.3.1 gezeigten Ergebnisse (Ermittlung der optimalen Waschprozedur) war davon auszugehen, dass mit diesem 72 h Zeitpunkt in erster Linie primär regulierte Gene gefunden werden konnten, da die Expression der ektopischen Gene (AICD und/oder FE65) zu früheren Zeitpunkten sehr gering war. Tabelle 3 stellt die untersuchten Klone und die aus der GeneChip Analyse gewonnenen Ergebnisse in Form der Anzahl hoch- und herunterregulierter Gene dar.

Die Affymetrix (Santa Clara, USA) Technologie beruht auf Oligonukleotid-Microarrays und ermöglicht eine parallele Analyse der Genexpression von mehreren tausend Genen. In der vorliegenden Studie wurden die Affymetrix GeneChips U133A verwendet, die insgesamt ca. 22.000 verschiedene Transkripte repräsentieren. Die Auswertung der gemessenen Intensitätswerte wurde mit Hilfe der GeneData Expressionist Software durchgeführt. Diese Software unterzieht jeden gescannten „Array“ einer Qualitätskontrolle, bei der eventuelle „Flecken“ oder Gradienten detektiert und davon betroffene Gene maskiert werden. Diese können dann für die Analyse nicht herangezogen werden. Da jedes Gen auf dem Chip durch elf so genannte „probe cells“ (das sind 24 µm x 24 µm große Flächen, auf die jeweils unterschiedliche 25 Basen lange Oligonukleotide des entsprechenden Gens (mRNA) hybridisiert sind) repräsentiert wird, werden durch die Qualitätskontrolle auch solche Gene von der Analyse ausgeschlossen, deren Intensitätsschwankungen innerhalb der elf „probe cells“ zu groß sind (p-Wert < 0,04).

Im Rahmen der Datenanalyse wurde jeder induzierte Zustand zunächst gegen seine Referenz ausgewertet (also z.B. iA50 Klon1 -D gegen iA50 Klon1 +D). Für die Bewertung als reguliertes Gen mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

1. Der Regulationsfaktor musste größer gleich 1,8 sein (sog. „N-fold“ Wert).
2. Jeder Chip wurde dreifach gescannt. Die Schwankungen jedes einzelnen Gens innerhalb dieser Scans mussten einer t-Test Analyse mit p-Wert  $\leq 0,05$  genügen.

Weitere interessante Gene können auf *einem* Array einen „regulären“ Wert zugeordnet bekommen haben (sog. „present call“), auf dem *ReferenzChip* jedoch nicht (sog. „absent call“), da die Signalintensität zu gering war. Solche Gene können im Rahmen einer „absent-present“ Suche mittels der Expressionist Software detektiert werden. Auf diese Weise analysierte Gene müssen jedoch unter großem Vorbehalt betrachtet werden, da der „absent call“ auch auf eine zu große Streuung innerhalb der „probe cells“ zurückgeführt werden kann. Die Anzahl der mit Hilfe dieser zwei Analysestrategien gefundenen differentiell regulierten Gene ist in Tabelle 3 dargestellt.

Nummer	Klon	Induktionsstatus (Doxyzyklin)	Anzahl regulierter Gene			
			Nfold $\geq 1,8$		„abs pre“ Suche	
			↑	↓	↑	↓
1	iA50 Klon1	-D (72h)	11	29	5	11
2	iA50 Klon1	+D (72h)				
3	iA50 Klon2	-D (72h)	34	54	14	27
4	iA50 Klon2	+D (72h)				
5	iFA50 Klon1	-D (72h)	93	47	26	11
6	iFA50 Klon1	+D (72h)				
7	iFA50 Klon2	-D (72h)	fehlerhafte Hybridisierung, keine Auswertung möglich			
8	iFA50 Klon2	+D (72h)				

**Tabelle 3 – Gesamtzahlen differentiell regulierter Gene nach der GeneChip Analyse.** Übersicht der auf Affymetrix (Santa Clara, USA) GeneChips analysierten Zellklone und Anzahl hoch- und herunterregulierter Gene mit einem Regulationsfaktor von mehr als 1,8. Darüber hinaus ist die Anzahl regulierter Gene angegeben, die im Rahmen einer sogenannten „absent-present“ Suche gefunden wurden. Dies sind Gene, die z.B. nur auf dem Chip der induzierten Probe, aber nicht auf dem Chip der zugehörigen Kontrolle messbar waren.

Die Hochregulation ( $\uparrow$ ) bezieht sich dabei auf den induzierten Zustand. Hochregulierte Gene sind demnach unter Expression ektopisch inserierter Gene (Doxyzyklin Entzug bzw. AICD oder AICD/FE65 Induktion) stärker exprimiert.

Die differentiell regulierten Gene der GeneChip Analyse sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 4) dargestellt. Diese Liste vereinigt alle Kandidatengene, die im Rahmen der in dieser Arbeit beschriebenen GeneChip Experimente als differentiell reguliert gefunden wurden. Es sind also Gene enthalten, die nur auf den Ergebnissen der Analyse eines Klons (iA50 Klon1, iA50 Klon2 oder iFA50 Klon) beruhen, auch wenn sie in den jeweils anderen Klonen nicht reguliert waren. Die Liste enthält auch Ergebnisse der „absent-present“ Suche. Die Regulationsrichtung wird durch Pfeile dargestellt. Ein nach oben gerichteter Pfeil kennzeichnet Gene, die unter Expression ektopisch inserierter Gene aktiviert wurden. Die Bedeutung der farblichen Markierungen ist im Folgenden dargestellt:

gelb hinterlegt

diese Expressionswerte entstammen einer „absent-present“ Suche und sind daher stark fehlerbehaftet

blaue Gene

diese Kandidatengene wurden mittels quantitativer real-time PCR untersucht

grün umrandete Werte

diese GeneChip Expressionswerte wurden mittels real-time PCR bestätigt (s. 3.2.3.6)

rot umrandete Werte

diese GeneChip Expressionswerte wurden mittels real-time PCR NICHT bestätigt

Beschreibung	Gensymbol	Affymetrix Nr.	Reg.faktor iA50 Klon1		Reg.faktor iA50 Klon2		Reg.faktor iFA50	
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (lysophosphatidic acid acyltransferase, beta)	AGPAT2	210678_s_at	1,46	↓	1,77	↓	1,09	↓
8-oxoguanine DNA glycosylase	OGG1	205301_s_at	1,93	↓	1,08	↓	1,53	↓
actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	ACTA2	200974_at	1,08	↓	1,18	↑	2,69	↑
actinin, alpha 1	ACTN1	208636_at	1,37	↓	1,20	↓	1,70	↑
acyl-Coenzyme A binding domain containing 3	ACBD3	202323_s_at	1,13	↑	1,14	↑	2,07	↑
aminoadipate-semialdehyde synthase	AASS	214829_at	1,28	↑	1,63	↑	2,36	↓
ATP citrate lyase	ACLY	201127_s_at	1,30	↓	1,13	↑	1,86	↑
ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 4		210711_at	1,00	↓	1,41	↑	2,33	↓
ATPase, Ca++ transporting, type 2C, member 1	ATP2C1	209934_s_at	1,439	↑	1,07	↑	1,03	↑
ATPase, Class VI, type 11A	ATP11A	213582_at	1,37	↓	2,42	↑	3,13	↓
autophagy Apg3p/Aut1p-like	APG3	220237_at	1,29	↓	2,29	↑	2,59	↓
basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	BHLHB2	201170_s_at	1,09	↑	1,33	↓	2,41	↑
basic leucine zipper nuclear factor 1 (JEM-1)	BLZF1	203840_at	2,31	↓	1,81	↓	1,15	↑
beaded filament structural protein 1, filensin	BFSP1	206746_at	1,85	↓	1,12	↑	1,96	↓
butyrophilin, subfamily 2, member A2	BTN2A2	205299_s_at	2,32	↑	1,83	↓	2,83	↓
calcium channel, voltage-dependent, alpha 1I subunit	CACNA1I	208299_at	1,51	↑	1,47	↓	2,20	↓
caldesmon 1	CALD1	214880_x_at	1,02	↓	2,75	↓	2,57	↓
caspace 6, apoptosis-related cysteine protease	CASP6	209790_s_at	1,05	↓	1,09	↑	2,15	↓
catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	CTNNB1	201533_at	1,08	↓	1,21	↓	1,79	↑
CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)	CDC42BPA	215296_at	1,49	↓	4,87	↓	1,78	↓
Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9	ARHGEF9	203264_s_at	1,16	↑	1,03	↑	2,03	↓
CDNA FLJ11682 fis, clone HEMBA1004880		215128_at	3,26	↓	1,65	↑	1,48	↑
CDNA FLJ12295 fis, clone MAMMA1001818		215376_at	1,28	↓	1,41	↓	2,50	↑
CDNA FLJ14122 fis, clone MAMMA1002033		222180_at	1,10	↑	1,83	↓	1,45	↑
CDNA FLJ43745 fis, clone TESTI2019648		215302_at	1,21	↑	1,17	↑	1,91	↓
CGI-109 protein		214658_at	1,01	↓	1,78	↓	2,09	↑
chloride channel 3	CLCN3	201733_at	1,04	↓	1,27	↑	3,77	↑
choline kinase alpha	CHKA	204233_s_at	1,40	↓	1,79	↓	2,28	↑
chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	204620_s_at 211571_s_at	1,38	↑	1,11	↓	2,43	↑
chorionic gonadotropin, beta polypeptide	CGB	205387_s_at	1,58	↑	4,54	↓	2,39	↑
chromosome 16 open reading frame 5	C16orf5	218183_at	1,23	↓	3,20	↑	1,17	↓
chromosome 16 open reading frame 7	C16orf7	205781_at	1,05	↓	1,53	↑	2,09	↓
chromosome 18 open reading frame 22	C18orf22	219419_at	1,04	↓	1,24	↑	1,72	↑
chromosome 20 open reading frame 104	C20orf104	209423_s_at	1,20	↑	1,62	↓	2,60	↑
chromosome 20 open reading frame 45	C20orf45	217851_s_at	1,02	↑	1,23	↓	2,30	↑
chromosome 6 open reading frame 111	C6orf111	212177_at	1,02	↓	1,26	↓	2,08	↑
chromosome 9 open reading frame 87	C9orf87	218772_x_at	1,03	↓	1,29	↓	1,78	↑

Beschreibung	Gensymbol	Affymetrix Nr.	Reg.faktor iA50 Klon1		Reg.faktor iA50 Klon2		Reg.faktor iFA50	
clusterin (apolipoprotein J)	CLU	208792_s_at 208791_at	1,18	↓	1,07	↑	2,01	↓
c-myc promoter-binding protein	IRLB	214787_at	1,27	↓	1,20	↑	1,76	↓
collagen, type I, alpha 1	COL1A1	202311_s_at	1,07	↑	1,22	↓	2,14	↑
collagen, type IV, alpha 1	COL4A1	211980_at 211981_at	1,16	↓	1,08	↓	1,87	↑
collectin sub-family member 12	COLEC12	221019_s_at	1,06	↓	1,13	↓	2,20	↓
colony stimulating factor 1 (macrophage)	CSF1	209716_at	2,55	↓	1,01	↑	1,68	↑
COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	COX11	203551_s_at	1,13	↑	1,04	↑	1,94	↓
cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1	200621_at	1,07	↓	1,06	↓	1,83	↑
cytochrome b reductase 1	CYBRD1	217889_s_at	1,79	↓	1,20	↓	2,19	↑
cytochrome b-5	CYB5	209366_x_at	1,07	↓	1,03	↑	1,75	↓
cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	CYP24A1	206504_at	1,38	↓	11,03	↓	1,77	↑
dedicator of cytokinesis 4	DOCK4	205003_at	1,06	↓	1,05	↑	1,99	↓
dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1	DHTKD1	209916_at	1,37	↓	4,37	↑	2,81	↓
dentin sialophosphoprotein	DSPP	221681_s_at	2,88	↓	1,54	↓	2,32	↑
diaphanous homolog 1 (Drosophila)	DIAPH1	213514_s_at	1,91	↓	1,17	↓	1,24	↑
dihydrolipoamide branched chain transacylase	DBT	205369_x_at	1,06	↓	1,07	↓	2,47	↓
DKFZP564C152 protein	DKFZP564C1 52	216028_at	1,08	↑	1,67	↑	1,90	↑
DKFZP586A0522 protein	DKFZP586A0 522	207761_s_at	1,01	↓	1,04	↑	2,18	↓
DNA cross-link repair 1C (PSO2 homolog, S. cerevisiae)	DCLRE1C	219678_x_at	3,08	↓	1,22	↓	1,15	↓
DNA directed RNA polymerase II polypeptide J-related gene		212706_at	2,10	↓	1,07	↓	1,20	↓
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2	DNAJB2	202500_at	1,26	↑	1,50	↓	1,83	↑
dual-specificity tyrosine-(Y)- phosphorylation regulated kinase 2	DYRK2	202970_at	1,14	↑	1,55	↓	1,88	↑
dystrophin (muscular dystrophy, Duchenne and Becker types)	DMD	203881_s_at	1,08	↑	1,36	↑	2,20	↑
E74-like factor 2 (ets domain transcription factor)	ELF2	210361_s_at	1,99	↓	1,38	↓	2,55	↓
ectodermal-neural cortex (with BTB- like domain)	ENC1	201340_s_at	1,11	↑	1,11	↓	2,26	↑
epithelial V-like antigen 1	EVA1	203780_at	1,25	↓	1,18	↑	2,53	↑
erythrocyte membrane protein band 4.1-like 1	EPB41L1	212336_at	1,03	↓	1,53	↓	2,85	↑
erythropoietin receptor	EPOR	215054_at	2,02	↓	1,29	↓	1,77	↑
fasciculation and elongation protein zeta 2 (zygin II)	FEZ2	202305_s_at	1,15	↓	1,46	↑	3,19	↓
fibronectin 1	FN1	210495_x_at 216442_x_at	1,09	↑	1,17	↓	1,81	↑
fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	FLRT2	204358_s_at	1,10	↓	2,78	↓	1,74	↑
flavoprotein oxidoreductase MICAL2	MICAL2	212472_at 212473_s_at	1,01	↑	1,05	↓	2,03	↑
fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)	FUS	215744_at	1,05	↓	1,74	↓	1,41	↑
G protein-coupled receptor 1	GPR1	214605_x_at	2,09	↓	1,02	↑	1,03	↑
G1 to S phase transition 1	GSPT1	217595_at	1,17	↑	2,14	↓	4,22	↑
gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, rho 1	GABRR1	206525_at	2,08	↑	1,12	↓	1,28	↓
GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	GLIPR1	204221_x_at	1,60	↑	1,17	↑	1,85	↑
GLI-Kruppel family member GLI2	GLI2	207034_s_at	2,35	↓	1,25	↓	1,69	↑

Beschreibung	Gensymbol	Affymetrix Nr.	Reg.faktor iA50 Klon1		Reg.faktor iA50 Klon2		Reg.faktor iFA50	
glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	GLUL	217202_s_at	1,92	↑	3,26	↑	1,30	↓
glutathione transferase zeta 1 (maleylacetoacetate isomerase)	GSTZ1	209531_at	1,02	↓	1,25	↑	2,50	↓
glycogen synthase kinase 3 beta	GSK3B	209945_s_at	1,15	↑	1,31	↓	1,17	↑
guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide, olfactory type H2A histone family, member X	GNAL	206355_at	1,91	↓	1,56	↑	1,97	↓
H2A histone family, member X	H2AFX	212525_s_at	1,70	↓	1,21	↑	1,05	↓
hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)	HES1	203394_s_at	1,13	↑	1,13	↑	2,06	↑
heat shock 105kDa/110kDa protein 1	HSPH1	206976_s_at	1,00	↑	1,02	↑	1,72	↑
heat shock 70kDa protein 9B (mortalin-2)	HSPA9B	200690_at	1,16	↓	1,04	↑	2,27	↑
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	HNRPR	208765_s_at	1,29	↑	1,36	↓	2,38	↑
high mobility group AT-hook 1-like 4	HMGA1L4	65133_i_at	1,82	↓	1,39	↓	1,06	↑
histone 1, H1c	HIST1H1C	209398_at	1,09	↓	1,12	↑	1,82	↓
histone 2, H2aa	HIST2H2AA	214290_s_at	1,05	↑	1,06	↑	1,81	↓
histone 3, H2a	HIST3H2A	221582_at	1,17	↓	1,80	↓	2,37	↓
HIV-1 Rev binding protein	HRB	213926_s_at	1,29	↑	1,14	↓	1,92	↑
Homo sapiens cDNA FLJ14080 fis, clone HEMBB1002152.		216110_x_at	1,90	↑	1,73	↑	1,45	↓
Homo sapiens cDNA: FLJ21527 fis, clone COL05961		216769_x_at	1,10	↑	1,63	↓	2,05	↓
Homo sapiens transcribed sequences		222320_at	11,63	↓	1,76	↓	1,33	↓
Human lipocortin (LIP) 2 pseudogene mRNA, complete cds-like region.		210876_at	2,13	↓	1,17	↓	1,04	↑
huntingtin interacting protein B	HYPB	212493_s_at	1,13	↑	1,25	↑	1,98	↑
hypothetical protein DKFZp434P162	DKFZp434P162	222149_x_at	1,27	↑	1,67	↑	4,92	↓
hypothetical protein FLJ10613		217632_at	1,72	↓	1,20	↓	1,72	↑
hypothetical protein FLJ11142	FLJ11142	221103_s_at	1,80	↓	1,25	↓	1,03	↓
hypothetical protein FLJ13236	FLJ13236	216595_at	2,17	↓	1,21	↓	2,02	↓
hypothetical protein FLJ13352	FLJ13352	218800_at	1,17	↑	1,66	↓	1,99	↑
hypothetical protein FLJ14054	FLJ14054	219054_at	1,26	↑	1,44	↓	4,83	↑
hypothetical protein FLJ20035	FLJ20035	218986_s_at	1,58	↓	1,42	↑	1,72	↓
hypothetical protein FLJ20280	FLJ20280	219717_at	1,07	↓	1,16	↓	1,97	↑
hypothetical protein FLJ20507	FLJ20507	219460_s_at	1,08	↑	3,23	↓	1,12	↓
hypothetical protein FLJ22490	FLJ22490	220072_at	1,14	↑	2,03	↓	1,03	↑
hypothetical protein LOC120526	LOC120526	213853_at	1,57	↓	2,13	↑	1,02	↓
hypothetical protein LOC92482	LOC92482	213224_s_at	1,43	↓	1,85	↑	2,10	↓
hypothetical protein MGC10772	MGC10772	219742_at	2,27	↓	1,02	↓	1,41	↑
inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	ID2	201566_x_at	1,35	↑	1,14	↑	4,01	↑
inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	ID3	207826_s_at	1,10	↓	1,16	↓	1,68	↑
inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	IKBKB	209341_s_at	1,12	↓	1,18	↑	3,12	↓
insulin-like growth factor binding protein 3	IGFBP3	212143_s_at 210095_s_at	1,11	↑	4,49	↓	3,19	↑
integrin, beta 4	ITGB4	211905_s_at	1,90	↓	1,13	↓	1,37	↓
interleukin 1 receptor accessory protein	IL1RAP	205227_at	1,88	↑	1,04	↑	1,53	↑
interleukin 13 receptor, alpha 2	IL13RA2	206172_at	1,34	↓	1,01	↑	3,36	↓
interleukin 27 receptor, alpha	IL27RA	222062_at	1,06	↑	1,24	↑	2,35	↑
jerky homolog (mouse)	JRK	216309_x_at	1,30	↑	2,12	↓	1,02	↑

Beschreibung	Gensymbol	Affymetrix Nr.	Reg.faktor iA50 Klon1		Reg.faktor iA50 Klon2		Reg.faktor iFA50	
<i>kangai 1</i>	KAI1	203904_x_at	1,64	↓	1,17	↑	2,32	↓
kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 4	KBTBD4	218570_at	1,37	↓	1,86	↓	3,12	↑
kelch-like 2, Mayven (Drosophila)	KLHL2	219157_at	1,90	↓	1,25	↓	1,30	↑
KIAA0146 protein	KIAA0146	212523_s_at	1,03	↓	3,89	↓	1,47	↓
KIAA0146 protein	KIAA0146	203973_s_at	1,25	↓	1,08	↓	1,70	↓
KIAA0478 gene product	KIAA0478	203959_s_at	1,12	↑	1,16	↓	1,82	↑
KIAA0542 gene product	KIAA0542	36545_s_at	3,07	↓	1,21	↓	1,03	↓
KIAA0913	KIAA0913	212359_s_at	1,13	↓	1,13	↓	2,09	↓
KIAA1052 protein	KIAA1052	204251_s_at	1,27	↑	1,01	↑	1,70	↑
KIAA1354 protein	KIAA1354	213117_at	2,52	↓	1,03	↑	1,53	↓
KIAA1701 protein	KIAA1701	213709_at	2,76	↑	1,63	↑	1,09	↑
killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1	KLRC1	206785_s_at	1,07	↑	1,05	↓	2,16	↓
Kruppel-like factor 2 (lung)	KLF2	219371_s_at	1,26	↓	1,13	↑	2,06	↑
Kruppel-like factor 5 (intestinal)	KLF5	209211_at	1,29	↓	1,19	↑	2,02	↓
<i>laminin receptor 1 (ribosomal protein SA, 67kDa)</i>	LAMR1	216806_at	1,14	↓	1,24	↑	1,71	↑
laminin, alpha 4	LAMA4	202202_s_at	1,10	↓	1,34	↓	2,44	↓
lin-7 homolog C (C. elegans)	LIN7C	221568_s_at	1,00	↓	1,18	↓	2,06	↑
lysyl oxidase		215446_s_at	1,19	↑	1,18	↓	1,98	↑
lysyl oxidase	LOX	204298_s_at	1,02	↓	1,19	↓	1,87	↑
maba1	KIAA1324	221874_at	1,09	↓	1,14	↓	2,09	↓
meiosis-specific nuclear structural protein 1	MNS1	219703_at	1,69	↓	1,38	↓	1,97	↑
metallothionein 1X	MT1X	204326_x_at	1,21	↓	1,21	↓	2,01	↑
Mid-1-related chloride channel 1	MCLC	207855_s_at	1,10	↑	1,15	↓	2,26	↑
MRNA; cDNA DKFZp564D193		216527_at	1,40	↓	1,16	↓	2,72	↑
MRNA; cDNA DKFZp566O053		216121_at	2,24	↑	1,19	↓	2,88	↑
<i>myosin regulatory light chain MRLC2</i>	MRLC2	221474_at	1,63	↑	1,05	↑	1,64	↑
natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)	NPR3	219789_at	1,16	↑	1,59	↓	3,38	↑
<i>neuregulin 1</i>	NRG1	206343_s_at	1,24	↑	2,21	↓	2,07	↑
neurobeachin	NBEA	221207_s_at	1,59	↓	1,05	↓	2,33	↓
neuroepithelial cell transforming gene 1	NET1	201830_s_at	1,18	↑	1,34	↑	1,99	↑
neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3	NTRK3	217033_x_at	1,71	↓	1,30	↑	1,53	↑
NFKB inhibitor interacting Ras-like 2	NKIRAS2	218240_at	1,35	↓	1,33	↑	1,12	↓
Notch homolog 4 (Drosophila)	NOTCH4	205247_at	1,91	↓	2,11	↓	1,77	↑
nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	NFAT5	208003_s_at	1,24	↑	1,55	↓	2,82	↑
nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus	NPAT	209798_at	1,84	↓	1,22	↑	1,08	↓
nuclear respiratory factor 1	NRF1	204652_s_at 211279_at	1,22	↓	1,20	↓	2,26	↓
parathyroid hormone-like hormone	PTH1H	206300_s_at		↑	5,32	↑	17,00	↑
pentaxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	PTX3	206157_at	1,08	↓	1,22	↓	2,10	↓
peroxisomal biogenesis factor 11A	PEX11A	205160_at	1,29	↓	1,18	↑	2,10	↓
PHD finger protein 16	PHF16	204866_at	2,04	↓	1,28	↓	1,09	↑
PHD finger protein 3	PHF3	217951_s_at	3,32	↓	1,14	↑	1,74	↓
<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>	PMAIP1	204285_s_at	1,10	↓	1,14	↓	1,68	↑
phosphatidic acid phosphatase type 2B	PPAP2B	212230_at	2,40	↓	1,13	↓	1,17	↑
phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific	PLD1	215723_s_at	1,04	↓	1,20	↓	1,76	↓
phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase	PPAT	209434_s_at	1,17	↑	1,13	↓	2,10	↑

Beschreibung	Gensymbol	Affymetrix Nr.	Reg.faktor iA50 Klon1		Reg.faktor iA50 Klon2		Reg.faktor iFA50	
pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)	PTN	209465_x_at	1,91	↓	1,27	↑	1,11	↑
poliovirus receptor	PVR	214444_s_at	2,08	↓	3,33	↓	1,53	↑
poly (ADP-ribose) glycohydrolase	PARG	205060_at	2,12	↑	1,05	↓	2,01	↑
polymerase (RNA) mitochondrial (DNA directed)	POLRMT	203783_x_at	2,63	↓	1,70	↓	1,63	↑
pre-B-cell leukemia transcription factor 2	PBX2	202876_s_at 211097_s_at	2,57	↓	1,18	↓	1,80	↑
PRKC, apoptosis, WT1, regulator	PRKC	204005_s_at	1,16	↓	1,72	↓	2,10	↑
proline rich 4 (lacrimal)	PRR4	204919_at	2,50	↓	1,30	↓	1,08	↑
prospero-related homeobox 1	PROX1	207401_at	2,47	↓	1,10	↓	1,59	↑
protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), beta isoform	PPP2R1B	202884_s_at	1,97	↓	1,02	↑	1,52	↑
protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform	PPP2R2B	213849_s_at	1,02	↓	1,02	↓	1,99	↓
protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	PTPRZ1	204469_at	16,50	↓	1,45	↓	21,57	↑
proteolipid protein 1 (Pelizaeus-Merzbacher disease, spastic paraplegia 2, uncomplicated)	PLP1	210198_s_at	1,00	↑	1,53	↓	5,54	↑
prothymosin, alpha (gene sequence 28)	PTMA	216384_x_at	1,09	↓	1,29	↓	1,70	↑
RAB3B, member RAS oncogene family	RAB3B	205925_s_at 205924_at	1,13	↓	1,73	↓	2,88	↑
RAB9A, member RAS oncogene family	RAB9A	208245_at	6,76	↓	2,20	↑	3,36	↓
Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2	RALGPS2	220338_at	1,13	↑	4,06	↓	1,98	↑
regulator of G-protein signalling 3	RGS3	203823_at	1,01	↓	1,36	↓	2,38	↓
reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	RECK	205407_at	1,11	↑	1,07	↑	1,79	↑
ribosomal protein L21	RPL21	217340_at	2,38	↓	1,31	↓	1,20	↑
ribosomal protein S2	RPS2	217466_x_at	1,66	↓	1,72	↓	1,43	↓
RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	RBMS1	215127_s_at	1,07	↓	1,13	↑	1,90	↑
RuvB-like 1 (E. coli)	RUVBL1	201613_s_at	2,03	↓	1,52	↑	2,36	↓
sal-like 1 (Drosophila)	SALL1	206893_at	5,16	↓	1,05	↑	2,04	↓
SAM pointed domain containing ets transcription factor	SPDEF	214403_x_at	1,89	↓	1,64	↓	1,37	↑
secreted frizzled-related protein 1	SFRP1	202037_s_at	1,09	↓	1,04	↓	2,10	↓
secretory carrier membrane protein 1	SCAMP1	212417_at	1,42	↓	1,38	↑	1,76	↑
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	SERPINE1	202627_s_at 202628_s_at	1,00	↓	1,18	↓	1,81	↑
SMAD, mothers against DPP homolog 6 (Drosophila)	SMAD6	207069_s_at	1,14	↑	1,09	↓	1,97	↑
SMAD, mothers against DPP homolog 7 (Drosophila)	SMAD7	204790_at	1,96	↓	1,21	↑	1,67	↑
SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (yeast)	SUMO1	216556_x_at	2,50	↓	1,22	↑	3,47	↓
solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2	SLC12A2	204404_at	1,01	↓	1,03	↓	2,36	↑
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	SLC7A1	212292_at 212290_at	1,22	↓	1,28	↑	1,91	↑
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	SLC7A5	201195_s_at	1,09	↓	1,16	↓	2,05	↑
SP140 nuclear body protein	SP140	207777_s_at	2,07	↑	1,38	↓	1,03	↑

Beschreibung	Gensymbol	Affymetrix Nr.	Reg.faktor iA50 Klon1		Reg.faktor iA50 Klon2		Reg.faktor iFA50	
stearoyl-CoA desaturase 4	SCD4	220232_at	1,02	↓	1,06	↓	1,91	↑
sterol O-acyltransferase (acyl-Coenzyme A: cholesterol acyltransferase) 1	SOAT1	221561_at	1,20	↑	1,09	↓	3,14	↑
SUMO1/sentrin specific protease 6	SENPE6	214790_at	1,57	↓	1,71	↓	1,15	↑
suppression of tumorigenicity	ST7	220253_s_at	1,25	↓	1,92	↑	2,74	↑
survival of motor neuron protein interacting protein 1	SIP1	205063_at	2,04	↓	1,30	↓	1,18	↑
synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	SYNCRIP	217834_s_at	1,07	↑	1,05	↑	1,92	↑
syntrophin, gamma 1	SNTG1	220405_at	1,70	↓	1,65	↓	1,54	↑
tachykinin receptor 1	TACR1	208048_at	1,11	↑	1,01	↓	2,02	↑
TAF6 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 80kDa	TAF6	203572_s_at	1,30	↓	1,10	↓	1,83	↑
thioesterase domain containing 1	THEDC1	219975_x_at	1,34	↑	1,23	↓	2,92	↑
thioredoxin	TXN	216609_at	1,07	↓	1,65	↓	1,21	↑
thrombospondin repeat containing 1	TSRC1	220578_at	1,35	↓	1,01	↑	7,84	↓
thyroid hormone receptor associated protein 2	THRAP2	216109_at	5,27	↓	1,59	↑	2,03	↑
tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	209277_at	1,16	↓	1,60	↑	2,34	↑
tolloid-like 1	TLL1	206415_at	2,31	↑	1,40	↑	1,77	↑
Transcribed sequence with moderate similarity to protein sp:P39191 (H.sapiens) ALU4_HUMAN		220033_at	1,86	↓	1,30	↓	1,29	↑
Transcribed sequence with moderate similarity to protein sp:P39194 (H.sapiens) ALU7_HUMAN		217695_x_at	1,48	↓	1,39	↓	1,70	↓
Transcribed sequence with strong similarity to protein sp:P00722 (E. coli) BGAL_ECOLI Beta-galactosidase		217629_at	1,03	↑	1,87	↓	1,02	↓
Transcribed sequences		222306_at	1,23	↑	1,16	↓	2,08	↑
transcription termination factor, RNA polymerase II	TTF2	204407_at	1,57	↓	1,25	↓	1,79	↑
transducin (beta)-like 1X-linked	TBL1X	201867_s_at	1,10	↑	1,25	↓	1,83	↑
transforming growth factor, beta receptor III (betaglycan, 300kDa)	TGFBR3	204731_at	3,06	↓	1,32	↓	1,12	↓
transgelin	TAGLN	205547_s_at	1,01	↑	1,02	↑	3,46	↑
transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	TGM2	201042_at	1,11	↓	1,46	↑	1,86	↑
transmembrane 4 superfamily member tetraspan NET-7	NET-7	218693_at	1,21	↓	1,78	↓	1,11	↓
Treacher Collins-Franceschetti syndrome 1	TCOF1	202385_s_at	1,41	↓	1,01	↓	1,79	↑
triosephosphate isomerase 1	TPI1	210050_at	2,26	↑	1,52	↑	2,35	↓
tropomyosin 1 (alpha)	TPM1	210987_x_at 206116_s_at	1,07	↓	1,00	↓	2,10	↑
tumor protein, translationally-controlled 1	TPT1	207783_x_at	5,48	↑	1,09	↓	1,03	↑
ubiquilin 3	UBQLN3	220422_at	2,22	↑	1,99	↓	1,31	↑
ubiquitin specific protease 7 (herpes virus-associated)	USP7	201499_s_at	1,05	↓	1,08	↓	1,92	↑
ubiquitin-conjugating enzyme E2B (RAD6 homolog)	UBE2B	202335_s_at	7,43	↓	1,96	↑	1,00	↓
UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4	B3GNT4	221240_s_at	2,28	↓	1,28	↓	1,18	↑
voltage-dependent anion channel 1	VDAC1	217139_at	1,57	↑	1,31	↑	1,74	↑
zinc finger and BTB domain containing 1	ZBTB1	205092_x_at	3,60	↓	1,01	↑	1,11	↓

Beschreibung	Gensymbol	Affymetrix Nr.	Reg.faktor iA50 Klon1		Reg.faktor iA50 Klon2		Reg.faktor iFA50	
zinc finger protein 236	ZNF236	222227_at	1,80	↓	1,24	↓	5,86	↑
zinc finger protein 42 (myeloid-specific retinoic acid-responsive)	ZNF42	210336_x_at	4,26	↓	1,24	↑	1,01	↓
zinc finger protein 482	ZNF482	206098_at	1,07	↓	1,62	↑	2,10	↑

**Tabelle 4 – Einzelaufstellung regulierter Gene nach Affymetrix GeneChip Analyse.** Untersucht und ausgewertet wurden zwei AICD induzierbare Klone (iA50) und ein AICD/FE65 induzierbarer Klon (iFA50; die GeneChip Analyse eines weiteren iFA Klons lieferte qualitativ unzureichende Ergebnisse). In der Tabelle sind die Ergebnisse der verschiedenen Chipuntersuchungen zusammenfassend dargestellt. Die Bedeutung der Farben ist vor der Tabelle dargestellt.

Alle blau markierten Gene (34 Gene) in Tabelle 4 wurden mittels real-time PCR untersucht.

### 3.2.3.6 Real-time PCR Analyse ausgewählter Kandidatengene

Die Affymetrix (Santa Clara, USA) GeneChip-Technologie ist eine sensitive und spezifische Analysemethode. Die Aussagekraft gewonnener Ergebnisse muss dennoch mit weiteren quantitativen Methoden verifiziert werden. Alle Gene, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit als differentiell AICD abhängig beschrieben werden, wurden daher mittels real-time PCR quantifiziert.

Es wurden zunächst Gene aus Tabelle 4 ausgewählt, die einen hohen Regulationswert hatten. Einige Gene sind auf den U133A GeneChips von Affymetrix (Santa Clara, USA) mehrfach repräsentiert, aber durch verschiedene Nummern gekennzeichnet. Regulierte Gene, die mehrfach auf dem GeneChip repräsentiert waren und infolge der Datenauswertung auch mehrfach in den Ergebnislisten vertreten waren, wurden weiterhin bevorzugt für die Verifikation ausgewählt. Dies betraf insgesamt 12 Gene.

War die differentielle Regulation eines Gens nach Auswertung der real-time PCR Daten hinsichtlich der Orientierung (hoch oder herunter) zu den mittels GeneChip Analyse erhaltenen Ergebnisse konsistent, so wurden alle induzierbaren Zelllinien hinsichtlich dieses Gens untersucht (iFA, iA, iF und iEGFP Klone). Mit diesem Verfahren konnten die in der folgenden Tabelle angegebenen Gene als differentiell AICD abhängige Gene verifiziert werden (Tabelle 5).

Untersucht wurden drei voneinander unabhängige iFA Klone (zwei iFA50 Klone und ein iFA59 Klon), zwei unabhängige iF Klone, drei unabhängige iA Klone (zwei iA50, ein iA59) und zwei unabhängige Kontrollklone iEGFP. In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Gruppe angegeben.

Gensymbol	Beschreibung	Affym. Nr.		iFA	iF	iA	iEGFP	Regulationstyp s. Abbildung 25
ACTA2	Actin, alpha 2	200974_at	MW	3,10	0,99	1,83	0,78	II
			STABW	0,71	0,09	0,51	0,41	
CLU	Clusterin	208792_s_at	MW	0,56	0,99	0,77	0,92	II
			STABW	0,03	0,42	0,01	0,02	
FN1	Fibronectin 1	210495_x_at	MW	2,72	0,91	1,35	0,76	II
			STABW	0,67	0,49	0,28	0,06	
ID3	Inhibitor of DNA binding 3	207826_s_at	MW	1,53	0,93	1,39	1,13	I
			STABW	0,14	0,01	0,29	0,06	
IGFBP3	Insulin growth factor binding protein 3	212143_s_at	MW	5,36	1,86	5,17	0,99	I
			STABW	0,76	0,03	0,49	0,14	
MICAL2	Flavoprotein oxidoreductase MICAL2	212472_at	MW	1,88	1,08	0,78	1,07	III
			STABW	0,50	0,00	0,13	0,14	
NRG1	Neuregulin 1	206343_s_at	MW	1,57	1,02	1,03	1,06	III
			STABW	0,06	0,12	0,05	0,01	
PRKC	Prostate apoptosis response protein 4	204005_s_at	MW	1,47	1,08	1,38	1,01	I
			STABW	0,01	0,11	0,18	0,13	
RAB3B	Ras-associated protein	205925_s_at	MW	2,60	1,46	1,25	1,09	III
			STABW	0,75	0,04	0,40	0,10	
SLC7A5	Solute carrier family 7, member 5	201195_s_at	MW	2,01	1,28	1,68	1,00	I
			STABW	0,48	0,07	0,40	0,06	
TAGLN	Transgelin	205547_s_at	MW	4,02	1,93	3,26	0,88	I
			STABW	1,01	0,02	1,65	0,01	
TPM1	Tropomyosin 1	210987_x_at	MW	2,54	1,04	1,49	1,09	II
			STABW	0,65	0,30	0,24	0,01	

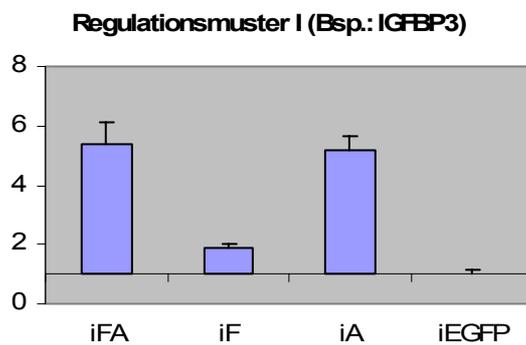
**Tabelle 5 – Bestätigte differentiell AICD abhängig regulierte Gene.** Die in der Tabelle gelisteten Gene wurden durch eine GeneChip Analyse als potentiell AICD abhängig regulierte Gene identifiziert. Aus den entsprechenden Klonen (drei iFA (zwei iFA50 und ein iFA59), zwei iF, drei iA (zwei iA50 und ein iA59) und zwei iEGFP Klone) im induzierten (72 h) und nicht-induzierten Zustand wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Induktion potentieller Zielgene mittels real-time PCR analysiert. Die in dieser Tabelle gelisteten Gene konnten als AICD Zielgene verifiziert werden. Bis auf Clusterin (blau markiert) waren alle Gene AICD abhängig hochreguliert. Entsprechend ihrer Regulationsfaktoren in den unterschiedlichen Zelllinien konnten den Genen verschiedene Regulationsmuster zugeordnet werden, die in der letzten Spalte durch römische Ziffern gekennzeichnet sind.

Bei dem Vergleich der Induktionswerte eines Gens in iFA, iA, iF und iEGFP Klonen mit denen eines anderen Gens, fielen unterschiedliche Regulationsmuster auf. Insgesamt konnten drei verschiedene Muster identifiziert werden, die in Tabelle 5 durch römische Ziffern

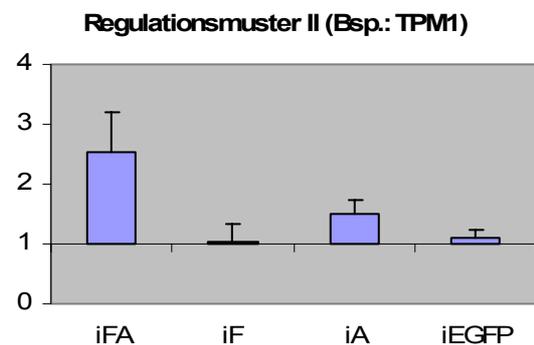
gekennzeichnet wurden und die im Folgenden beschrieben werden. Diese Muster können wie folgt beschrieben werden und sind in Abbildung 25 grafisch dargestellt.

- I. Fünf Gene (ID3, IGFBP3, PRKC, SLC7A5, TAGLN) waren in iFA und in iA Klonen gleichermaßen gegenüber iF und iEGFP Klonen signifikant höher reguliert. Zwischen der Induktionshöhe in iFA und iA Klonen war kein Unterschied.
- II. Vier Gene (ACTA2, CLU, FN1, TPM1) waren in iFA und iA Klonen signifikant differentiell gegenüber iF und iEGFP Klonen reguliert. In iFA Klonen war jedoch der Induktionsfaktor höher als in iA Klonen. Die zusätzliche Expression von FE65 verstärkte also die durch AICD ausgelöste differentielle Regulation.
- III. Drei Gene (MICAL2, NRG1, RAB3B) waren nur in iFA Klonen differentiell reguliert und unterschieden sich signifikant von iF, iA und iEGFP Klonen.

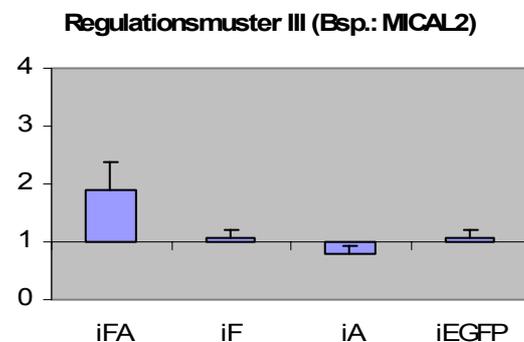
A



B



C



**Abbildung 25 - Differentiell durch AICD regulierte Gene zeigten unterschiedliche Regulationsmuster.**

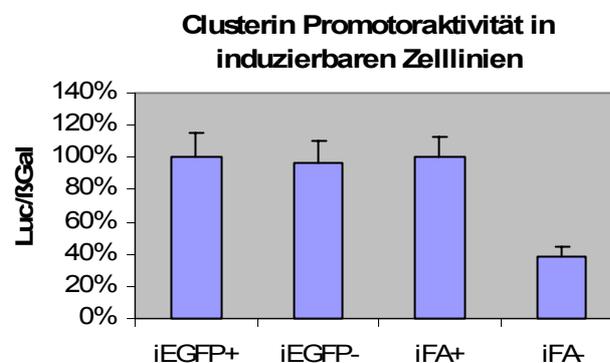
A) Gene des Regulationsmusters I (ID3, IGFBP3, PRKC, SLC7A5, TAGLN) waren sowohl in iA wie iFA Zellen gleichermaßen signifikant induziert. In iF und iEGFP Klonen waren diese Gene nicht induziert. B) Gene des Musters II (ACTA2, CLU, FN1, TPM1) waren in iA Zellen gegenüber iF und iEGFP Klonen signifikant induziert. In iFA Klonen wurde die Induktion durch die zusätzliche Expression von FE65 verstärkt. C) Gene des Musters III (MICAL2, NRG1, RAB3B) waren nur in iFA Klonen differentiell reguliert und unterschieden sich signifikant von allen anderen Zellklonen.

Insgesamt konnten 12 von 34 Genen (Ergebnisse der GeneChip Analyse) als differentiell reguliert bestätigt werden (35 %). 65 % der GeneChip Daten konnten somit nicht verifiziert werden. Diese geringe Trefferrate ist sicherlich ein Resultat der aus ökonomischen Gründen begrenzten Anzahl von verwendeten GeneChips.

### 3.2.3.7 Mechanismen am Clusterin (CLU) Promotor vermitteln dessen AICD abhängige differentielle Genexpression

In 3.2.3.6 konnte Clusterin (CLU) als potentiell AICD abhängiges Zielgen in humanen Neuroblastom-Zelllinien identifiziert werden. Durch Koexpression von AICD und FE65 wurde die Clusterin-Expressionsänderung weiter verstärkt. Im Folgenden wurde die differentielle Regulation von Clusterin mittels einer Reporter-gen Studie untersucht.

Ein Vektor, der einen an Luziferase fusionierten CLU-Promotor enthält, wurde in induzierte (72 h) und nicht-induzierte iFA Zellen sowie iEGFP Kontrollzellen für 24 h transfiziert. Anschließend wurden Gesamtprotein-Zellysate erstellt, die Luziferase-Aktivität bestimmt und auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität normiert. Für diese Normierung zur Berücksichtigung der Transfektionseffizienz wurde ein  $\beta$ -Gal codierendes Plasmid kotransfiziert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 26 dargestellt.



**Abbildung 26 – Clusterin Reporter-genexperiment.** In einen iFA50 und einen iEGFP Klon (72 h Induktionszeit) wurde ein Clusterin-Promotor-Luziferase Vektor für 24 h transfiziert, Gesamtprotein-Zellextrakt erstellt und das Luziferase Signal induzierter mit dem nicht-induzierter Zellen verglichen. Um Transfektionsunterschiede zu berücksichtigen, wurde ein lacZ Vektor kotransfiziert. Das Luziferase Signal wurde auf das  $\beta$ -Galaktosidase Signal bezogen. Es konnte gezeigt werden, dass die Clusterin-Promotoraktivität in induzierten AICD/FE65 Zellen im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen um 60 % verringert ist. In induzierbaren Kontroll-Zelllinien war die Promotoraktivität dagegen unverändert.

Analog den GeneChip und real-time Daten zeigte auch das hier durchgeführte Promotorexperiment, dass Clusterin unter AICD/FE65 Expression geringer exprimiert wird. In induzierten Zellen war die Promotoraktivität auf 40 % der nicht-induzierten Zellen reduziert und war damit mit den Ergebnissen der Expressionsstudie, die eine 1,8-fache

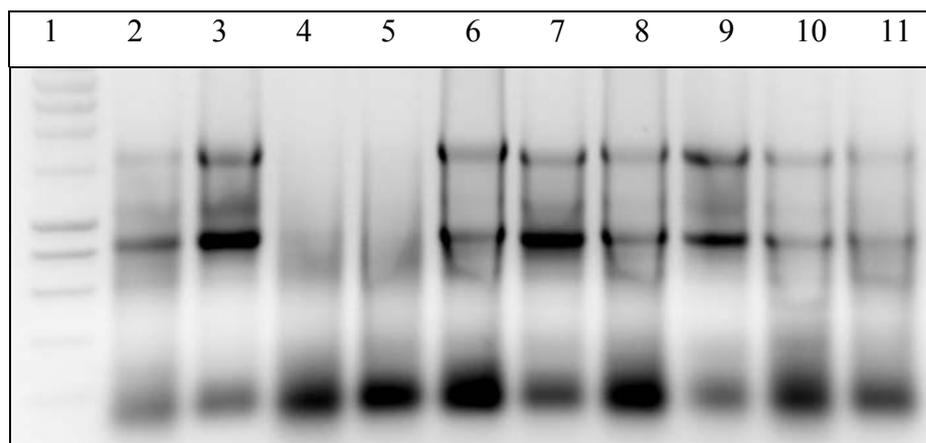
Herunterregulation ergab, vergleichbar. Offensichtlich sind also Mechanismen am Clusterin Promotor für dieses Ergebnis verantwortlich. In Kontrollzellen, die nur EGFP unter Doxyzyklin Entzug induzierten, war hingegen keine veränderte Promotoraktivität nachweisbar.

### 3.3 Potentiell AICD abhängig regulierte Gene sind in humanem cerebralen Gewebe von Morbus Alzheimer Patienten gegenüber Kontrollen differentiell reguliert

Microarray Experimente liefern in der Regel große Mengen Ergebnisse, deren Relevanz im Bezug zur Fragestellung mit weiteren aufwendigen Untersuchungen verbunden sind.

Ob die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen AICD abhängig differentiell regulierten Gene auch in Hirn-Gewebe von Alzheimer-Patienten gegenüber Kontrollen reguliert sind, wurde an Autopsie-Gewebe analysiert. Da sowohl sporadischen wie familiären Alzheimer Erkrankungen die vermehrte A $\beta$  Bildung gemeinsam ist, ist auch davon auszugehen, dass AICD in entsprechend höherem Maß entstehen kann. AICD abhängige Genregulation könnte daher für die Pathogenese des Morbus Alzheimer ein wichtiger Signalweg sein.

Von Alzheimer- sowie Kontrollfällen wurde RNA aus frontalem Kortex- und Cerebellum-Gewebe isoliert. Das Ausmaß der RNA Degradation infolge unterschiedlicher „post-mortem“ Zeiten wurde mittels Formaldehyd-Gelelektrophorese beurteilt.



**Abbildung 27 - Gelelektrophoretische Analyse von RNA Proben aus humanem Cerebellum-Gewebe.** Gesamt-RNA wurde aus humanem Gewebe isoliert und im 1-%igen Formaldehyd Agarosegel aufgetrennt. Entsprechend der „post-mortem“ Zeiten der Gehirne waren die Proben unterschiedlich stark degradiert.

Fünf RNA-Proben jeder Gruppe (Alzheimer vs. Kontrolle), die keine bis wenig Degradation aufwiesen (entsprechend Spuren 6-9 in Abbildung 27) wurden in cDNA umgeschrieben und

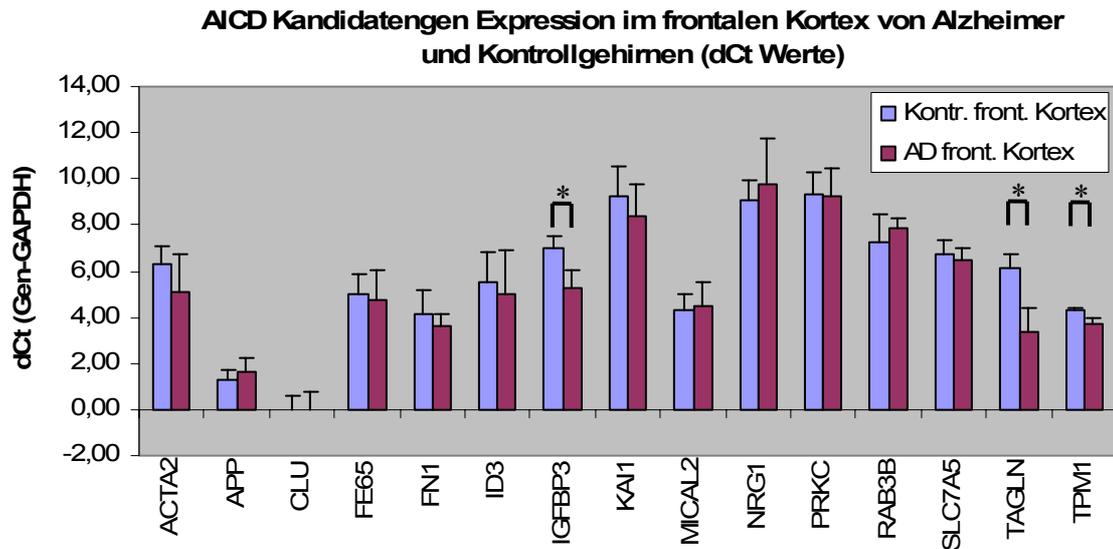
mittels real-time PCR für die in Tabelle 5 verifizierten Gene analysiert. Die Mittelwerte jeder Gruppe wurden miteinander verglichen. Die Analyse von 12 im induzierbaren AICD Zellkulturmodell differentiell regulierten Genen zuzüglich der Analyse von APP, FE65 und KAI1 in humanem Autopsie-Gewebe von an Morbus Alzheimer erkrankten Patienten (vs. Kontrollen) ergab, dass Insulin-growth-factor-binding-protein 3 (IGFBP3) sowohl im Cerebellum wie im frontalen Kortex signifikant differentiell reguliert war. Clusterin (CLU) hingegen war nur im Cerebellum, aber nicht im frontalen Kortex signifikant unterschiedlich exprimiert. Transgelin (TAGLN) und Tropomyosin1 (TPM1) waren nur im frontalen Kortex signifikant differentiell reguliert (Abbildung 28).

Mit Ausnahme von CLU waren alle differentiell regulierten Gene in den Geweben von Alzheimer Patienten gegenüber Kontroll-Patienten höher exprimiert – also in dem Gewebe, in dem entsprechend obiger Annahme vermehrt AICD entsteht. Auch in dem untersuchten Zellkultursystem waren diese Gene unter AICD bzw. AICD/FE65 Induktion stärker exprimiert. Auch in den Zelllinien bildete CLU mit einer geringeren Expression bei Induktion von AICD bzw. AICD/FE65 die Ausnahme.

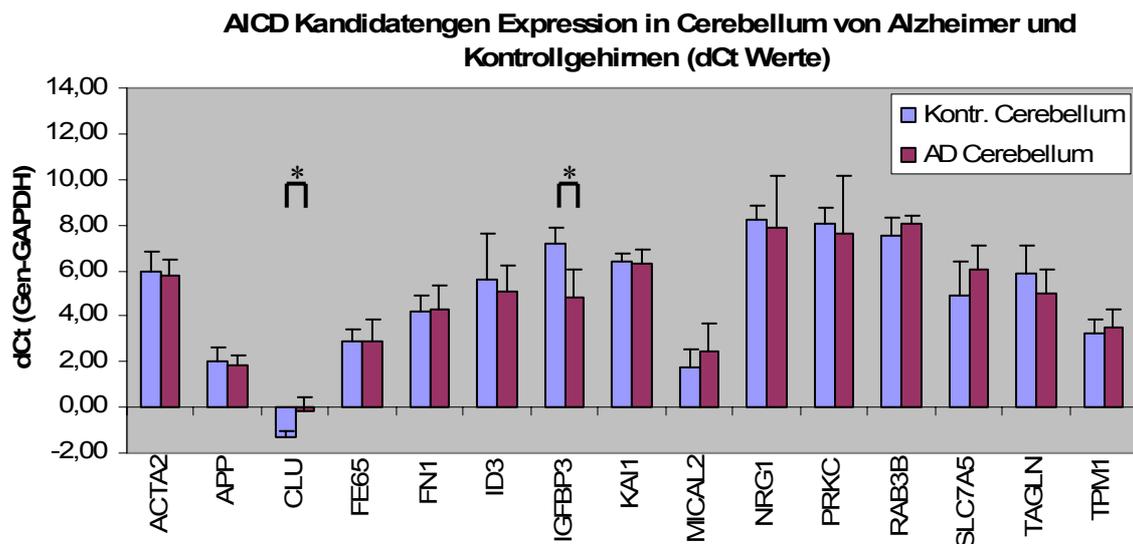
Die hohen Standardabweichungen in der Analyse von cerebralem Gewebe sind durch unterschiedliche post-mortem Intervalle und die damit verbundene variable RNA-Qualität zu erklären. Ferner kommt hinzu, dass die Akquirierung von cerebralem Gewebe von Alzheimer Patienten schwierig ist. In der vorliegenden Studie konnten deshalb nur fünf AD und fünf Kontrollfälle untersucht werden

Im Einzelnen ergaben sich Regulationsfaktoren von 0,44  $\pm$  0,4 für CLU im Cerebellum, 5,03  $\pm$  1,97 für IGFBP3 im Cerebellum, 3,31  $\pm$  0,51 für IGFBP3 im frontalen Kortex, 1,81  $\pm$  0,26 für TAGLN im frontalen Kortex und 1,47  $\pm$  0,16 für TPM1 (jeweils Alzheimer- gegenüber Kontrollgruppe). Diese Ergebnisse waren signifikant.

A



B

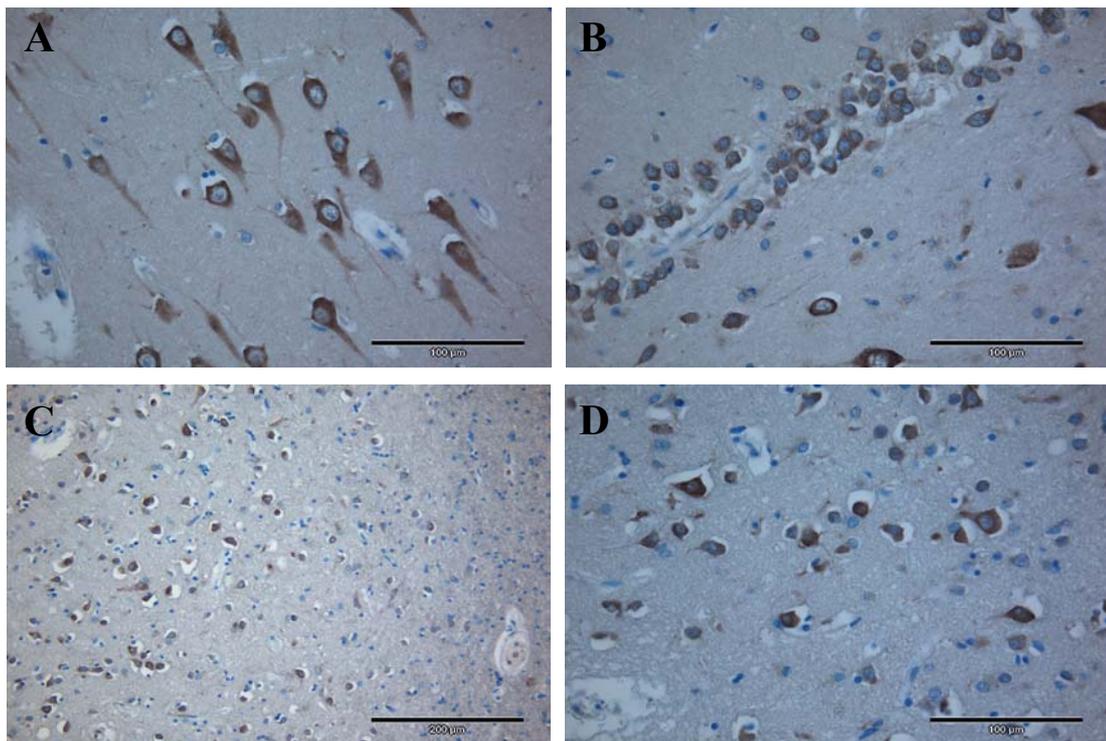


**Abbildung 28 - Real-time PCR-Analyse potentiell AICD abhängig regulierter Gene in humanem Autopsie-Gewebe von Morbus Alzheimer Patienten und Kontrollen.** Jede Gruppe umfasst fünf Proben unterschiedlicher Patienten. Aus dem Gewebe wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression mittels real-time PCR untersucht. Da im Gegensatz zu induzierbaren Zelllinien kein direkter Bezug auf eine Kontrolle möglich ist, sind die dCt Werte dargestellt (Differenz aus untersuchtem Zielgen und der Kontrolle GAPDH). Hierbei ist zu beachten, dass kleine Balken gegenüber großen Balken eine größere Expression darstellen. Die Analyse wurde für den frontalen Kortex (A) und das Cerebellum (B) durchgeführt. Analysiert wurden Actin alpha 2 (ACTA2), Amyloid Precursor Protein (APP), Clusterin (CLU), FE65, Fibronectin 1 (FN1), Inhibitor of DNA binding 3 (ID3), Insulin-growth-factor-binding-protein 3 (IGFBP3), Kangai 1 (KAI1), Flavoprotein Oxidoreduktase MICAL2 (MICAL2), Neuregulin 1 (NRG1), PRKC, RAB3B, Solute carrier family 7 (SLC7A5), Transgelin (TAGLN) und Tropomyosin (TPM1). Signifikante Unterschiede zeigten im frontalen Kortex IGFBP3, TAGLN, TPM1 und im Cerebellum CLU und IGFBP3. CLU war das einzige herunterregulierte Gen und entsprach damit wie auch die hochregulierten Gene den Ergebnissen aus der Analyse induzierbarer Zelllinien. Es zeigte sich, dass einige der in Zellkultur differentiell AICD abhängig regulierten Gene auch in humanen Proben von Alzheimer Patienten gegenüber Kontrollen reguliert waren (Tukey-Test, \* $p < 0,05$ ).

Im Rahmen dieser Experimente zeigte sich, dass die FE65 Expression zwar nicht zwischen Alzheimer und Kontrollgruppe, aber zwischen Cerebellum und frontalem Kortex signifikant unterschiedlich war (s. dazu 3.5).

### 3.4 Immunhistologische Färbung AICD abhängig regulierter Gene

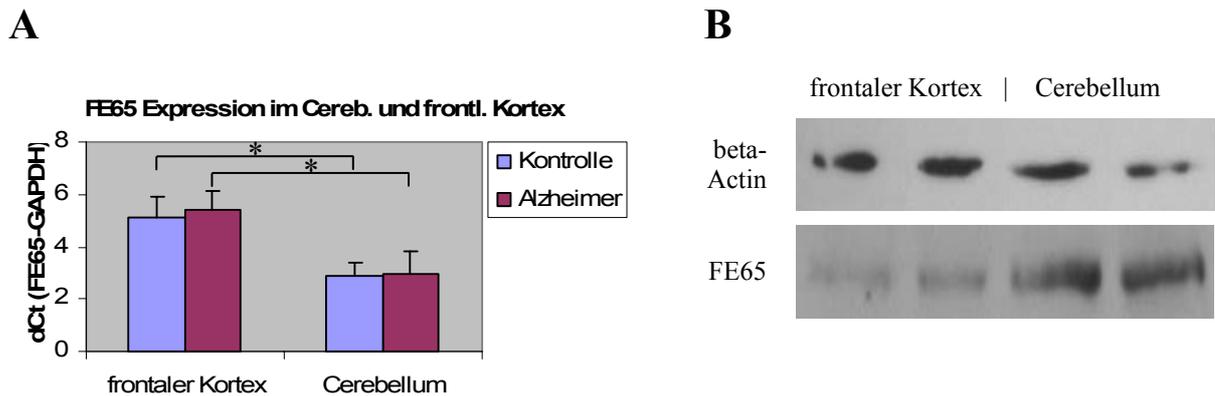
Die Expression des „Insulin-growth-factor-binding-protein 3“ (IGFBP3) wurde immunhistologisch an Paraffin eingebettetem cerebralem Gewebe des Hippocampus und des frontalen Kortex untersucht. Im Hippocampus waren die pyramidalen Neuronen sowie Neurone der „fascia dentata“ zytoplasmatisch gefärbt. Im frontalen Kortex waren Neurone ebenfalls zytoplasmatisch gefärbt. Gliazellen waren hingegen in keinem der Gewebeschnitte gefärbt (Abbildung 29). Immunhistologische Färbungen für „Tropomyosin 1“ blieben erfolglos.



**Abbildung 29 – Immunhistologische „Insulin-growth-factor-binding-protein 3“ (IGFBP3) Färbungen an humanem cerebralem Gewebe.** Humane cerebrale Paraffin Schnitte des Hippocampus und des frontalen Kortex wurden immunhistologisch gefärbt. A) IGFBP3 ist in hippocampalen Schnitten zytoplasmatisch in pyramidalen Neuronen sowie B) Neuronen der „fascia dentata“ lokalisiert. Gliazellen wurden hingegen nicht angefärbt. C), D) Auch im frontalen Kortex waren neuronale Zellen zytoplasmatisch gefärbt, während Gliazellen unmarkiert waren.

### 3.5 Variabilität der FE65 Expression in humanem Autopsiegewebe

Im Rahmen der real-time PCR Experimente zur Analyse potentiell AICD abhängig regulierter Gene in Gewebe von Morbus Alzheimer Patienten gegenüber Kontrollen fiel auf, dass die FE65 Expression auf transkriptionaler Ebene zwischen frontalem Kortex und Cerebellum signifikant unterschiedlich war (Abbildung 30). Dies konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden.



**Abbildung 30 - Die FE65 Expression in humanem cerebralen Gewebe ist im Cerebellum signifikant höher als im frontalen Kortex.** A) Die real-time PCR Analyse von RNA aus humanem cerebralen „post-mortem“ Gewebe lieferte für das Cerebellum signifikant geringere dCt Werte als für den frontalen Kortex und entspricht somit einer „Hochregulation“ von FE65 im Cerebellum. B) Auch auf Proteinebene wurde dies bestätigt. Der „Westernblot“ zeigt vier Kontrollfälle.

Diese Beobachtung kann im Zusammenhang mit AICD abhängiger Genexpression, die durch FE65 potenziert wird, von Bedeutung sein, da zahlreiche Untersuchungen den potenziierenden Einfluss des Adapterproteins FE65 zeigen konnten.

### 3.6 Potentiell AICD abhängig regulierte Gene als Dendogramm sortiert nach GeneOntology Kriterien

Ein interessantes Werkzeug, um GeneChip Daten auszuwerten, stellt die Klassifizierung der Daten nach „GeneOntology (GO)“ Kriterien dar. Entsprechend dem Stand der Forschung ist jedes auf dem Chip enthaltene Gen mit einer oder mehrerer Gruppen aus den Bereichen molekulare Funktion, zelluläres Kompartiment und biologischer Prozess verbunden. Mittels einer solchen Klassifizierung ist die Identifikation funktionell zusammengehöriger Gruppen möglich. Die im Folgenden dargestellte Übersicht wurde mit dem „GeneOntology Browser“ der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) nach dem Kriterium „biological process“ erstellt (affymetrix.com). Die GeneOntology Analyse gliedert sich in verschiedene Ebenen, wobei die Ebene x+1 eine Tochterebene von x ist und diese weiter aufgliedert. Entsprechend ist eine

untergeordnete Ebene (x+1) spezifischer benannt als die übergeordnete Ebene x (z.B. x= regulation of transcription, x+1= regulation of transcription from polII promotor).

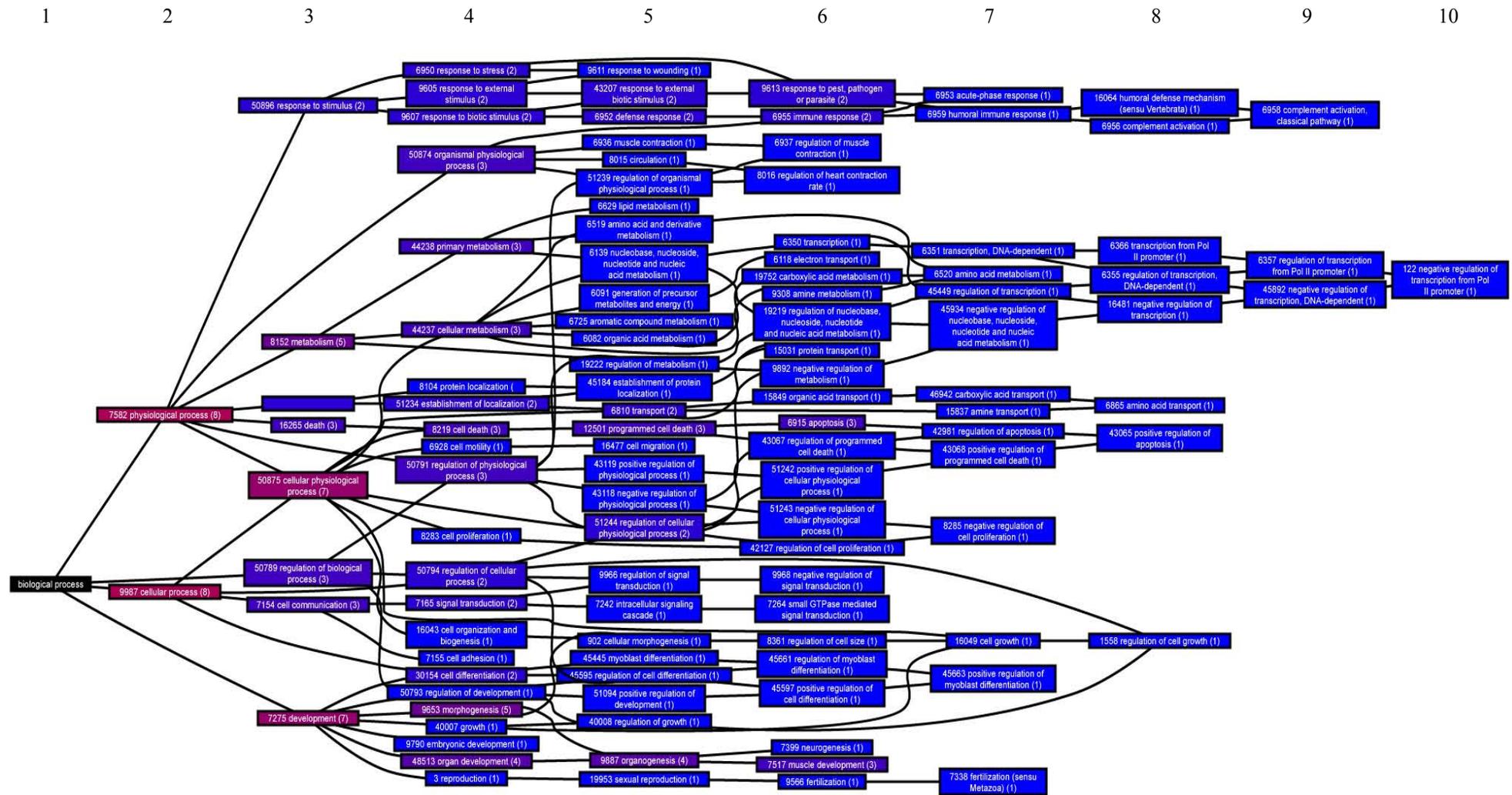
GO Gruppen mit mehreren regulierten Genen können Aufschlüsse über zugrunde liegende biologische Prozesse liefern, die infolge AICD/FE65 Überexpression moduliert werden.

Es wurden die 12 in dieser Arbeit als potentiell AICD abhängig regulierten Gene analysiert.

Das daraus resultierende Dendogramm für die Kategorie „biochemical pathways“ ist in Abbildung 31 dargestellt.

Folgende GO Gruppen waren überrepräsentiert:

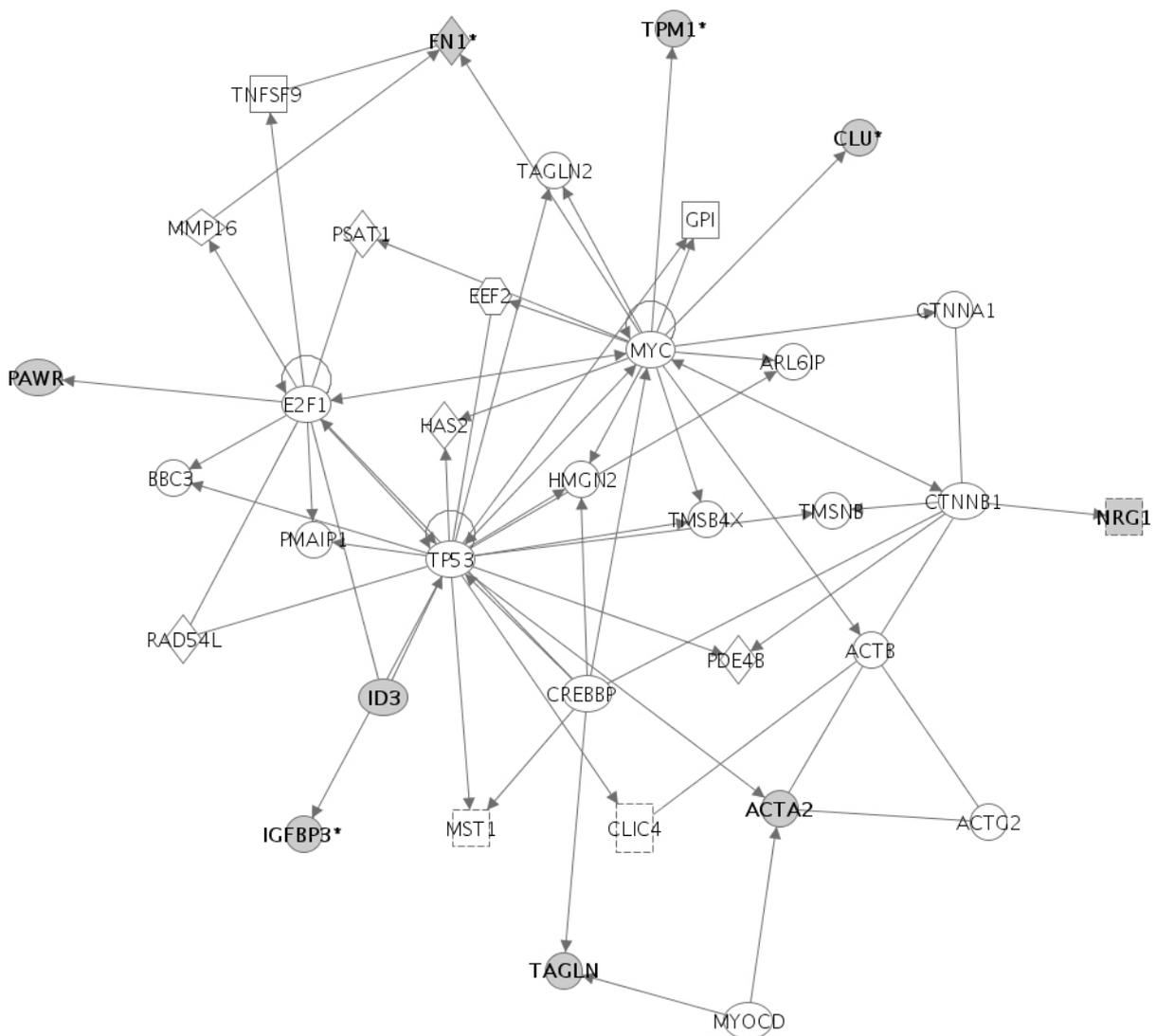
- GO 6915 “apoptosis”, 6. Ebene mit den Genen PRKC, CLU, IGFBP3
- GO 7517 „muscle development“, 6. Ebene mit den Genen ACTA2, TAGLN, TPM1



**Abbildung 31 - Klassifizierung der GeneChip Daten nach „biological process GeneOntology“ Kriterien.** Diese Sortierung ermöglicht die Identifikation funktionell zusammengehöriger Gruppen. Als „Input“ wurden die 12 in dieser Arbeit differentiell AICD abhängig regulierten Gene verwendet. Jeder Kasten repräsentiert eine „GeneOntology“ Gruppe mit zugehöriger Nummer und Anzahl der in dieser Gruppe vorhandenen eingelesenen Gene (in Klammern). Eine Farbverschiebung von blau nach rot visualisiert überrepräsentierte Gruppen, die mehrere Gene enthalten.

### 3.7 Signalweg-Analyse potentiell AICD abhängig regulierter Gene

Eine weitere Möglichkeit, große Datenmengen aus GeneChip Experimenten funktionell in einen Gesamtzusammenhang zu bringen, bietet die Möglichkeit der Signalweg Analyse mit Programmen wie „Ingenuity pathways“ ([www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)). Diese Software ermöglicht es, eine Liste potentiell regulierter Gene einzulesen und aus dieser entsprechend dem aktuellen Stand der Forschung einen putativen Signalweg zu erstellen. Das Einlesen der in dieser Arbeit 12 verschiedenen differentiell regulierten Gene lieferte folgendes Bild (Abbildung 32).



**Abbildung 32 - Signalweganalyse von 12 differentiell AICD abhängig regulierten Genen mit „ingenuity pathways“.** Die Software versucht entsprechend des aktuellen Stands der Forschung physikalische (Bindung) und funktionelle (Modifikation, Regulation) Interaktionen zwischen den Genen zu identifizieren. Pfeile können eine einseitige oder beidseitige Interaktion anzeigen. Von den 12 eingelesenen Genen waren die 9 mit grauen Symbolen dargestellten Gene in einem zusammengehörigen Signalweg darstellbar. Die anderen vor weißem Hintergrund dargestellten Gene sind für den dargestellten Signalweg relevant und beruhen auf Interaktionen, die in der „Ingenuity pathway knowledge base“ gespeichert sind. Die Bedeutung der unterschiedlichen Kästchenformen ist im Haupttext beschrieben.

9 der 12 eingelesenen Gene (grau unterlegte Gene) konnten in einem zusammenhängenden Signalweg-Diagramm dargestellt werden, d.h. es konnte eine direkte oder indirekte (mittels anderer Proteine) Interaktion zwischen ihnen identifiziert werden. Die Pfeile zwischen zwei verschiedenen Genen deuten auf eine physikalische (Bindung) oder funktionelle Interaktion (z.B. Transkriptionsänderung) hin. Weiß unterlegte Gene waren für den Signalweg relevant und beruhen auf Interaktionen, die in der „Ingenuity pathway knowledge base“ gespeichert sind. Es fällt auf, dass das c-Myc Protein eine zentrale Rolle in diesem Signalweg zu spielen scheint. Im Einzelnen bedeuten die Symbole:

	Transkriptionsfaktoren
	Cytokine
	Translationsfaktoren
	Enzyme
	Peptidasen
	Wachstumsfaktoren
	Ionenkanäle
	sonstige

Eine solche Signalweganalyse kann wichtige Hinweise auf funktionelle Zusammenhänge gefundener differentiell regulierter Gene liefern. Z.B. ist es möglich einzuschätzen, ob Gene primär oder abhängig von anderen Genen sekundär reguliert werden.

## 4 Diskussion

Das Amyloid Precursor Protein ist entsprechend der „Amyloid-Hypothese“ für sporadische wie familiäre Morbus Alzheimer Formen von zentraler Bedeutung, da infolge amyloidogener Spaltung  $\beta$ A4 entsteht, welches die notwendige Voraussetzung zur Entstehung von Amyloid-Ablagerungen ist (Selkoe, 2001). Zahlreiche Studien der letzten Jahre belegen die Toxizität von A $\beta$  bereits auf intrazellulärem Niveau (Hartley et al., 1999). Der bei der amyloidogenen APP Prozessierung ebenfalls entstehenden Intrazellulären Domäne wurde hingegen erst in jüngster Zeit zunehmend Aufmerksamkeit geschenkt (Cao and Sudhof, 2001). Bis heute ist nicht endgültig geklärt, ob diese Domäne im Zuge der amyloidogenen APP Spaltung verstärkt gebildet und freigesetzt wird oder ob dies auch nach nicht-amyloidogener Spaltung möglich ist und der eingeschlagene Weg der APP Prozessierung somit möglicherweise keinen Einfluss auf die intrazellulären AICD Konzentrationen besitzt (Bergman et al., 2003). In einigen wenigen Ansätzen versuchte man das vermehrte Vorhandensein von AICD in Gewebe von an Morbus Alzheimer verstorbenen Patienten nachzuweisen (Daly et al., 1998; Lahiri et al., 2002), jedoch ist dies bis heute nicht eindeutig gezeigt. Die Analyse dieses sehr wichtigen Sachverhalts wird durch die geringe Größe und die vermutete schnelle Degradation von AICD über das Proteasom oder „Insulin degrading enzyme“ erschwert (Edbauer et al., 2002; Nunan et al., 2003; Kume et al., 2004). In Zellkulturexperimenten fand man hingegen eindeutige Belege dafür, dass nach  $\gamma$ -Sekretase abhängiger APP Prozessierung AICD entsteht und dieses auch in den Zellkern translozieren kann (Lahiri et al., 2002; von Rotz et al., 2004; Kimberly et al., 2001).

Geht man nun davon aus, dass AICD bei Morbus Alzheimer vermehrt entsteht, so könnte der Mechanismus, der mit AICD in Verbindung gebracht wird, von entscheidender pathophysiologischer Bedeutung für die Erkrankung sein und die Toxizität von A $\beta$  insbesondere in frühen Stadien der Erkrankung möglicherweise noch verstärken. Mit diesem Mechanismus ist das seit einigen Jahren diskutierte transaktivatorische Potential von AICD gemeint, wodurch das Genexpressionsmuster der Zelle gravierend verändert werden könnte.

Dass AICD tatsächlich zu differentieller Genregulation führt und überdies apoptotisches Potential besitzt, wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Im Rahmen der Diskussion wird insbesondere auf diese beiden Aspekte – Genregulation und Apoptose – eingegangen. Zunächst wird dargestellt, dass AICD ein nukleär lokalisiertes Protein ist, bevor nach Darstellung der Funktionalität des hauptsächlich benutzten Zellkulturmodells der Aspekt der AICD induzierten Apoptose diskutiert wird. Im Anschluss werden AICD abhängige Zielgene

diskutiert und entsprechend dem aktuellen Stand der Forschung insbesondere hinsichtlich ihres apoptotischen Potentials beurteilt und miteinander in einen Gesamtzusammenhang gebracht.

#### **4.1 AICD ist ein nukleär lokalisiertes Protein**

Für die Aktivität von AICD als transkriptionell aktives Protein erscheint eine Translokation der primär an der Zellmembran gebildeten Domäne in den Zellkern notwendig, wobei jedoch auch andere Mechanismen diskutiert wurden (s. 1.7; (Cao and Sudhof, 2001; Cao and Sudhof, 2004)). Unabhängig davon welchen Mechanismus man nun favorisiert, konnte in diversen Zellkulturmodellen gezeigt werden, dass die ektopische Expression von AICD nach Transfektion tatsächlich in erster Linie nukleär zu beobachten ist (Gao and Pimplikar, 2001; von Rotz et al., 2004; Kimberly et al., 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte dies für pAICD-EGFP bzw. pEGFP-AICD Fusionskonstrukte in den hier verwendeten humanen Neuroblastom-Zelllinien gezeigt werden (3.2.2.1).

FE65 und TIP60 sind Proteine, die mit AICD einen Komplex bilden können und sind möglicherweise von zentraler Bedeutung für die transaktivatorische Eigenschaft von AICD. Interessanterweise konnte in Zellkulturen gezeigt werden, dass die Koexpression dieser Proteine und von AICD im Zellkern zu einem „punktförmigen“ Muster führt und in diesen „dots“ die Proteine AICD, FE65 und TIP60 lokalisiert sind. Man vermutete, dass diese „dots“ transkriptionell aktive Regionen im Chromatin sein könnten (von Rotz et al., 2004). Hier stellt sich die Frage, ob es nun Gene gibt und welche es sind, die abhängig von AICD in der Zelle reguliert werden. Diese Frage wurde in den relevanten Veröffentlichungen der letzten Jahre vermehrt aufgeworfen, präsentiert wurden jedoch nur drei mögliche Kandidaten, deren Identifizierung eher das Produkt anderer Fragestellungen anstatt einer gezielten Suche nach diesen Genen war (von Rotz et al., 2004; Kim et al., 2003; Leissring et al., 2002). Um diese Frage gezielt zu untersuchen, wurde ein induzierbares Zellkultursystem etabliert.

#### **4.2 Funktionalität des Zellkulturmodells**

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, systematisch nach potentiell AICD abhängig regulierten Genen zu suchen. Dafür wurde ein induzierbares Zellkulturmodell auf Basis einer humanen Neuroblastom-Zelllinie verwendet, mit dem die Expression von AICD (iA) bzw. von AICD und FE65 (iFA) durch Zugabe von Doxyzyklin gesteuert werden konnte (Tet-Off System). Als Kontrollen wurden für FE65 (iF) und für EGFP (iEGFP) ebenfalls induzierbare Zelllinien etabliert. EGFP wurde in allen anderen induzierbaren Zelllinien als Markerprotein koexprimiert. Die Wahl einer Neuroblastom-Zelllinie begründete sich in ihrer Herkunft aus

einem neuroektodermalen Tumor mit neuronaler Differenzierung, so dass das endogene Expressionsmuster dem neuronaler Zellen ähnlich ist. Die endogene Expression der am AICD Transkriptionskomplex beteiligten Proteine FE65 und TIP60 wurde in diesen Zelllinien zudem auf RNA Ebene nachgewiesen (Abbildung 13). Obwohl FE65 endogen exprimiert war, sollte dieses Adapterprotein mit AICD koexprimiert werden, da aus Transaktivator-Studien der potenzierende Effekt einer FE65 Koexpression bekannt ist (Cao and Sudhof, 2001).

Die Charakterisierung des induzierbaren Zelliniensystems (iFA, iA, iF und iEGFP Klone) bestätigte dessen Funktionalität:

Die Induktionshöhen waren abhängig vom gewählten Waschprotokoll. Für eine hohe Expression zu einem frühen Zeitpunkt wurde das in Abbildung 21 dargestellte Protokoll verwendet, mit dem 72 h nach Auftrennung der Zellen in +/- Doxyzyklin enthaltendes Medium eine hohe Expression ektopisch exprimierter Gene messbar war. Frühere Zeitpunkte lieferten keine ausreichenden Induktionswerte. Dies ist durch die bekannte Resistenz von Doxyzyklin in Zellen zu erklären (s. dazu auch TechNote der Fa. BD). Spätere Zeitpunkte erhöhten die zum 72 h Zeitpunkt gemessene Induktionshöhe nicht mehr.

Die Induktion der ektopisch inserierten Gene konnte für den 72 h Zeitpunkt sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene (Abbildung 22) nachgewiesen werden. Nach Immunpräzipitation von Gesamtprotein-Zellextrakten der Klone mit langen AICD59 Isoformen konnten mittels eines C-terminalen APP Antikörpers und „Westernblot“ Analyse überraschenderweise zwei Banden auf Laufhöhe des AICD detektiert werden. Während eine Bande der Laufhöhe des AICD59 Peptids entsprach, repräsentierte die Laufhöhe der darunter liegenden Bande AICD50, denn diese Bande war mit der AICD Bande aus Klonen der AICD50 Isoform bezüglich ihrer Laufweite identisch (Abbildung 22). Offensichtlich wurde die lange AICD59 Isoform in den Zelllinien weiter in die kurze Isoform prozessiert, so dass AICD50 die für die beobachteten Mechanismen relevante Isoform zu sein scheint.

Für eine solche Prozessierung musste in den Zelllinien ein bestimmtes Maß an endogener  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität vorhanden sein, die dann zu einer Prozessierung des AICD an der  $\epsilon$ -Schnittstelle führt. In nicht-induzierten Zellklonen war kein endogen entstehendes AICD nach Immunpräzipitation nachweisbar (Abbildung 22 B, 1. Zeile), obwohl die Zelllinien APP auf RNA- und Proteinebene endogen exprimierten (Abbildung 22 B, 1. Zeile und Abbildung 13). Dies würde im Gegensatz zu obiger Annahme darauf hinweisen, dass doch keine endogene  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität vorhanden ist. Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass bereits an der  $\beta$ - Schnittstelle prozessiertes APP ein besseres Substrat für die  $\gamma$ -Sekretase

darstellt als „full length“ APP (Li et al., 2004; Mohajeri et al., 2004; Willem et al., 2004). Dies legt den Schluss nahe, dass auch AICD59 ein besseres Substrat für den  $\gamma$ -Sekretase Komplex darstellt als „full length“ APP und dass daher AICD50 aus AICD59 entstehen kann. Ein gutes Beispiel für den Sachverhalt, dass  $\beta$ -Sekretase prozessiertes APP ein besseres Substrat für den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex darstellt, sind auch die zahlreichen transgenen Maus Modelle mit einer „swedish“ APP Mutation, die primär nur zu einer erhöhten  $\beta$ -Sekretase Aktivität, letztlich aber zu verstärkter  $\gamma$ -Sekretase Aktivität und Bildung von Amyloid-Plaques führen (Sturchler-Pierrat and Staufenbiel, 2000). Zu beachten ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass AICD in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellkulturen ohne eine Membranverankerung zytoplasmatisch und nicht als Transmembranprotein exprimiert wurde. Dementsprechend zeigten Versuche mit AICD-EGFP bzw. EGFP-AICD Fusionskonstrukten keine verstärkte Membran-ständige Lokalisation des AICD (Abbildung 15). Die Spaltung der langen AICD59 Isoform wäre daher am ehesten ebenfalls zytoplasmatisch zu erwarten. Jedoch besteht der  $\gamma$ -Sekretase Komplex aus mindestens vier Transmembranproteinen (Edbauer et al., 2003), so dass anzunehmen ist, dass dieser Komplex auch nur Transmembranproteine prozessieren kann, wie es für APP und Notch beschrieben ist. Es erscheint aber denkbar, dass der  $\gamma$ -Sekretase Komplex das AICD59 Peptid „Membran-nah“ prozessieren könnte, jedoch bedarf dieser Aspekt weiterer Forschung. Interessanterweise wurde ein AICD59 oder AICD57 Peptid bislang auch in anderen Arbeiten nie identifiziert (George et al., 2004), was ebenfalls die Annahme unterstützt, dass AICD50 *das* entstehende C-terminale Fragment der  $\gamma$ -Sekretase Prozessierung ist. Dem ist zuzufügen, dass in der vorliegenden Arbeit in keinem der durchgeführten Experimente ein signifikanter Unterschied zwischen AICD59 und AICD50 Klonen feststellbar war.

Neben der Darstellung der Induktion auf RNA- und Proteinebene, wurden die Induktionshöhen von AICD und FE65 in den verschiedenen Klonen für den 72 h Zeitpunkt mittels real-time PCR quantifiziert und zeigten, dass diese aufgrund sehr ähnlicher Werte (im Mittel 23-fache AICD Induktion in iA und iFA Klonen; 18-fache FE65 Induktion in iF und iFA Klonen) sehr gut vergleichbar waren (Abbildung 23). Die Induktion von EGFP konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie identifiziert werden und wurde als Kontrollmaß für die erfolgreiche Induktion nach Doxyzyklin Entzug verwendet. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellklone bestanden zu 100 % aus „grün fluoreszierenden Zellen“.

Die Analyse der potentiellen AICD Zielgene in dem hier etablierten Zellkulturmodell zeigte, dass keines der drei bislang diskutierten Gene (KAI1, GSK3 $\beta$ , SERCA2B) weder in iA noch in iFA Zelllinien zum 72 h Zeitpunkt differentiell exprimiert waren. Folglich könnte man an dieser Stelle über die Funktionalität des etablierten Systems, etwa eine nicht ausreichende Induktionshöhe des sehr instabilen AICDs diskutieren, doch lieferten die mit den Zelllinien durchgeführten Genexpressionsstudien sehr konsistente und spezifische Daten über potentiell regulierte AICD abhängige Zielgene. Zudem konnten andere Arbeitsgruppen die differentielle Regulation dieser potentiellen Zielgene ebenfalls nicht bestätigen (unpublizierte Daten, persönliche Mitteilung der AG E. Kilger, Hertie Institut für klinische Hirnforschung, Universität Tübingen).

Es erscheint ebenfalls denkbar, dass die Gene KAI1, GSK3 $\beta$  und SERCA2B zu späteren Zeitpunkten induziert werden könnten und damit möglicherweise als sekundär AICD abhängig regulierte Gene zu bezeichnen sind. Analysen über den 72 h Induktionszeitpunkt hinaus wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht erstellt. Allerdings war auch in den konstitutiven Zellkulturen keines dieser potentiellen Zielgene differentiell reguliert (3.2.2.2.2).

Die GeneChip Experimente mit induzierbaren Zelllinien führten zunächst zu einer Gesamtliste von 239 Kandidatengenen, von denen 34 Gene mittels real-time PCR untersucht wurden, wovon schließlich 12 Gene als differentiell AICD abhängig reguliert bestätigt werden konnten. Die relativ geringe Trefferquote von 41 % tatsächlich regulierter Gene zu Ergebnissen der GeneChip Analyse ist sicherlich ein Resultat der aufgrund ökonomischer Rahmenbedingungen nur sehr geringen Anzahl verwendeter Chip-Replikate. So wurden je Gruppe iA und iFA Zelllinien jeweils zwei unabhängige Klone untersucht. Die Funktionalität des etablierten Systems wurde zudem durch eine Promotorstudie für eines der 12 Kandidatengene (Clusterin) bestätigt.

Die Funktionalität des etablierten induzierbaren Zellkultursystems wird somit durch folgende Punkte bestätigt:

- Verwendung von humanen Neuroblastom-Zelllinien als Empfänger-Zelllinie, in denen die am Transkriptionskomplex beteiligten Gene TIP60 und FE65 endogen exprimiert werden.
- Eine auf RNA- und Proteinebene nachweislich hohe Induktion ektopisch inserierter Gene, insbesondere des instabilen AICD in iA und iFA Klonen.
- Die Identifikation von eindeutig AICD abhängig differentiell regulierten Genen

- Reporter-gen Studie für das Clusterin Gen, die den Ergebnissen der Clusterin real-time PCR Studie entspricht.

Bevor auf die in dieser Arbeit gefundenen differentiell regulierten Gene bzw. Gengruppen eingegangen wird, soll zunächst das apoptotische Potential von AICD betrachtet werden, da dieses mit der differentiellen Regulation einzelner Gene in Zusammenhang stehen kann.

### **4.3 AICD induziert ER Stress und Apoptose in humanen Neuroblastom-Zelllinien**

Hinweise auf AICD vermittelte Apoptose wurden bereits in 1.8 beschrieben (Leissring et al., 2002; Leissring et al., 2000; Kim et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass AICD-EGFP bzw. EGFP-AICD Fusionsproteine nach transienter Transfektion in verschiedene humane Neuroblastom-Zelllinien (SHEP-SF, IMR-5, SH-SY5Y) die Anzahl apoptotischer Zellen erhöht (anhand morphologischer Beurteilung nach „Hoechst 33342 Färbung“). Signifikant erhöhte Anteile apoptotischer Zellen konnten in allen Zelllinien nach Transfektion des Fusionskonstrukts pAICD59-EGFP festgestellt werden (Abbildung 12). Interessanterweise wiesen AICD-IRES-EGFP transfizierte Zelllinien (beide Isoformen) dagegen nicht signifikant mehr apoptotische Zellen auf als Zellen, in denen nur der EGFP Vektor transfiziert wurde. Dieser durch Fusionskonstrukte bedingte „apoptotische“ Effekt kann daher nicht zwingend auf AICD zurückgeführt werden. So ist es möglich, dass das apoptotische Potential durch eine verstärkte Kernlokalisierung von EGFP infolge der AICD Fusion erklärbar ist. Dennoch erscheint die Annahme, dass AICD durch die Fusion mit EGFP stabilisiert wird und dadurch Zelltod auslösen kann, denkbar. In diesen Zusammenhang passt auch die Beobachtung, dass stabile AICD-EGFP bzw. EGFP-AICD Klone geringere EGFP Expression zeigten als stabile Kontroll-Klone. Offensichtlich führte eine hohe AICD-EGFP bzw. EGFP-AICD Expression zur Apoptose, so dass sich nur aus schwach AICD-EGFP bzw. EGFP-AICD exprimierenden Zellen Klone etablieren ließen. AICD-IRES-EGFP Zelllinien wiesen hingegen vergleichbare EGFP Expressionsstärken auf wie Kontroll-Vektor transfizierte Zellen.

In konstitutiv wie induzierbar exprimierenden AICD Zelllinien konnte per se kein erhöhtes apoptotisches Potential festgestellt werden, was durch die Messung der Caspase-3 Aktivität gezeigt wurde (Abbildung 18 und Abbildung 24). Wurde hingegen zusätzlich FE65 induziert (iFA) so war bereits ohne Zugabe anderer Stimuli (wie Thapsigargin) eine erhöhte Aktivität von Caspase-3 messbar. Auch hier könnte dieser Effekt wie bei den AICD-EGFP Konstrukten auf eine Stabilisierung von AICD in diesem Fall durch FE65 zurückgeführt werden. Diese

Beobachtung steht auch in Einklang mit der Beobachtung, dass iFA Klone im induzierten Zustand bei höheren Passagezahlen zunehmend ihre ektopisch inserierten Gene verlieren, was anhand nicht mehr vorhandener Grünfluoreszenz zu erkennen war. Ebenfalls in Einklang mit dieser Hypothese steht der gescheiterte Versuch, stabile Linien zu etablieren, die AICD induzierbar, FE65 aber konstitutiv exprimieren sollten (3.2.3). Zur Identifikation positiver Klone ist eine kurzzeitige Reporter-gen Induktion notwendig, wodurch auch AICD induziert wird. Es war nicht möglich, einmal so induzierte Klone weiter zu kultivieren. Diese Versuche deuten darauf hin, dass stabilisiertes AICD, sei es durch die Fusion mit EGFP oder durch Koexpression des Adapterproteins FE65, für die Zelle toxisch ist.

Die alleinige Expression von FE65 (iF) oder EGFP (iEGFP) im induzierbaren System hatte keinen Einfluss auf die gemessene Caspase-3 Aktivität. Nachdem so gezeigt werden konnte, dass AICD in den verwendeten Neuroblastom-Zelllinien „per se“ (d.h. ohne Stabilisierung) nicht apoptotisch wirkt, jedoch die Koexpression von AICD und FE65 zu erhöhter Caspase-3 Aktivität und damit Apoptose führt, sollte der zugrunde liegende Mechanismus untersucht werden. Aus Experimenten mit Fibroblasten von Ps1 „knock-in“ und „knock-out“ Mäusen ist bekannt, dass diese Zellen veränderte intrazelluläre Calcium Konzentrationen aufweisen (Leissring et al., 2000). Analog zeigen auch Fibroblasten aus APP knock-out Mäusen veränderte Calcium Konzentrationen insbesondere im ER, wobei diese Effekte durch Transfektion von AICD wiederhergestellt werden konnten. Aus diesen Beobachtungen vermutete man einen Zusammenhang zwischen AICD und einer Modulation intrazellulärer Calcium Konzentrationen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die stabilen Zelllinien des konstitutiven sowie des induzierbaren Zellkulturmodells daher mit Thapsigargin behandelt und anschließend die Aktivität der Caspase-3 gemessen. Thapsigargin inhibiert die sarko- und endoplasmatischen Calcium Transporter, so dass Calcium nicht mehr aus dem Zytoplasma in das ER gepumpt werden kann und es „de facto“ zu einem Calcium Ausstrom aus dem ER kommt. Dadurch erhöhte intrazelluläre Calcium Konzentrationen können apoptotisch wirken, wobei der zugrunde liegende Mechanismus bis heute nicht exakt geklärt ist. Hinweise auf eine Beteiligung des ER an der Regulation der Apoptose ergaben sich aus der Beobachtung, dass die Verteilung pro- und anti-apoptotischer Proteine nicht allein auf Mitochondrien verteilt ist. Aufgrund ihrer hydrophoben Transmembrandomäne finden sich anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> auch auf der Außenseite des ERs (Krajewski et al., 1993; Givol et al., 1994).

Das Ausmaß dieses programmierten Zelltods ist durch Messung aktiver Caspase-3 quantifizierbar. Über diesen Ansatz sollte der Frage nachgegangen werden, ob AICD die Calcium Konzentration des ER moduliert. Aufgrund seines transaktivatorischen Potentials könnte diese Modulation insbesondere durch eine AICD abhängige Genexpressionsänderung ausgelöst werden. Wie bereits in der Einleitung (1.7.4) beschrieben, wurde der sarko- und endoplasmatische Calcium Transporter SERCA2B als potentiell AICD abhängiges Zielgen diskutiert (Leissring et al., 2002). In den hier verwendeten Zelllinien (konstitutive und induzierbare) konnte SERCA2B jedoch nicht als differentiell reguliert beschrieben werden, so dass im Falle einer Thapsigargin abhängigen Modulation der Caspase-3 Aktivität andere Mechanismen zugrunde liegen müssten. Tatsächlich führte die Thapsigargin Stimulation sowohl in konstitutiven wie in induzierbaren AICD Zelllinien zu einer erhöhten Caspase-3 Aktivierung. Interessanterweise wurde dieser Effekt in Zelllinien, die AICD und FE65 induzieren, noch potenziert (3.2.2.2.3 und 3.2.3.4). Daraus kann geschlossen werden, dass AICD ER Stress induziert, indem es die Calcium Konzentrationen dieses Zellkompartiments erhöht. Dies steht in Einklang mit anderen Arbeiten, in denen ebenfalls gezeigt werden konnte, dass AICD mit einer Modulation der ER Calcium Konzentrationen in Verbindung steht (Leissring et al., 2000). FE65 verstärkt diesen Effekt und erhöht das apoptotische Potential der Zelle. Auch hier kann wieder angenommen werden, dass der stabilisierende Effekt des FE65 auf AICD das erhöhte apoptotische Potential auslöst oder aber, dass erst durch die FE65 Koexpression eine verstärkte nukleäre Translokation von AICD in den Zellkern zustande kommt (Kimberly et al., 2001). Dass auch die alleinige Expression von AICD nach Thapsigargin Stimulation zu einer verstärkten Caspase-3 Aktivierung führt, ist zunächst erstaunlich, da endogenes FE65 in den verwendeten Zelllinien nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 22). AICD wurde in den etablierten Zelllinien jedoch zytoplasmatisch und nicht Membran-verankert exprimiert, so dass anzunehmen ist, dass ein Anteil von AICD auch FE65 unabhängig in den Zellkern translozieren kann. Wie später diskutiert werden wird, ist in den verwendeten Zelllinien AICD auch ohne FE65 Koexpression in der Lage, bestimmte Zielgene in ihrer Expressionsstärke zu beeinflussen. Auch dies erklärt, weshalb alleinige AICD Expression nach Thapsigargin Stimulation zu einem verstärkten Caspase-3 Signal führen kann.

Obwohl die Standardabweichungen der Analyse potentiell AICD abhängig regulierter Gene in konstitutiven Zelllinien (3.2.2.2.2) relativ groß waren, lieferten die Caspase-3 Experimente in diesen Zelllinien sehr konsistente und signifikante Ergebnisse. Dies spricht dafür, dass andere

Mechanismen bzw. im Gegensatz zu den untersuchten Kandidaten KAI1, SERCA2B und GSK3 $\beta$  andere differentiell regulierte Gene existieren müssen.

Potentiell AICD abhängig regulierte Gene, die Einfluss auf den Calcium Haushalt der Zelle nehmen können, könnten weitere Hinweise auf den für das beobachtete apoptotische Potential von AICD verantwortlichen Mechanismus liefern.

#### 4.4 AICD abhängig regulierte Kandidatengene

GeneChip Experimente mit Affymetrix U133A Chips und real-time PCR Versuche lieferten 12 AICD abhängig regulierte Gene, die in den folgenden Abschnitten in funktionelle nach „GeneOntology – biological process“ Kriterien sortierte Gruppen eingeordnet hinsichtlich einer für Morbus Alzheimer relevanten Funktion diskutiert werden.

AICD abhängig regulierte Gene sind:

- IGFBP3 (Insulin-growth-factor binding protein 3)
- CLU (Clusterin oder Apolipoprotein J)
- PRKC (Prostate apoptosis response protein 4)
- NRG1 (Neuregulin 1)
- TPM1 (Tropomyosin 1)
- TAGLN (Transgelin)
- ACTA2 (Actin alpha 2)
- SLC7A5 (Solute carrier family 7, member 5)
- RAB3B (Ras-associated protein)
- FN1 (Fibronectin 1)
- MICAL2 (Flavoprotein oxidoreductase MICAL2)
- ID3 (Inhibitor of DNA binding 3)

Bis auf Clusterin (CLU) waren alle Gene in den induzierbaren Zelllinien durch AICD bzw. AICD/FE65 Expression hochreguliert.

##### 4.4.1 Apoptose relevante Gene

Die funktionelle Gruppierung nach GeneOntology Kriterien für die Kategorie „biological process“ (Abbildung 31) ordnete der Gruppe Apoptose die drei Gene IGFBP3, CLU und PRKC zu, die im Folgenden diskutiert werden.

##### 4.4.1.1 Insulin-growth-factor binding protein 3 (IGFBP3)

IGFBP3 gehört zur Gruppe der „Insulin-like-growth-factor“ (IGF) Bindeproteine und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und Apoptose. IGFBP3 kann in humanen Glioblastomzellen Apoptose induzieren und dies geht möglicherweise mit einer Modulation der Aktivität von IGF-I einher (Ikonen et al., 2003). Die IGF unabhängige Apoptose-Induktion hingegen wird über eine Bindung zum Retinoid X Rezeptor-alpha (RXRalpha) vermittelt. Als Antwort auf diese Bindung transloziert der RXRalpha Bindepartner Nur77 (ein Kernrezeptor) aus dem Zellkern in die Mitochondrien und kann dort

die Apoptose-Kaskade initiieren (Lee et al., 2005). Interessant ist auch, dass die Bindung von IGFBP3 an einen Zelloberflächenrezeptor die intrazellulären Calcium Konzentrationen erhöhen kann (Ricort et al., 2002). Daraus könnte man schließen, dass AICD vermittelte IGFBP3 Expressionssteigerung auch zu einer Erhöhung intrazellulärer Calcium Konzentrationen führen kann und dadurch eine Verbindung zwischen den beiden Aspekten der vorliegenden Arbeit (Genregulation und Apoptose) herstellt. Allerdings ist bislang nicht beschrieben, dass differentielle IGFBP3 Expression speziell die Calcium Konzentrationen des ER modulieren kann. Die AICD abhängige Induktion von IGFBP3 scheint jedoch auch nicht ursächlich für die beobachteten erhöhten ER Calcium Konzentrationen zu sein, da sowohl iA und iFA Klone vergleichbare IGFBP3 Induktionshöhen aufweisen, aber in iFA Klonen eine weitaus höhere ER Calcium Entleerung nach Thapsigargin Stimulation zu beobachten war als in iA Klonen.

IGFBP3 wurde in der vorliegenden Arbeit auch in Proben des frontalen Kortex sowie Cerebellums von Alzheimer Patienten gegenüber Kontrollen signifikant hochreguliert gefunden (Abbildung 28), was auch durch eine Arbeit einer anderen Gruppe bestätigt wird (Rensink et al., 2002). Sie beschrieben auch, dass IGFBP3 Expression an Schnitten insbesondere in „neurofibrillären Tangles“ (NFT) detektierbar war. Eigene immunhistologische Färbungen zeigten, dass IGFBP3 neuronal exprimiert wird (Abbildung 29).

An dieser Stelle ist anzufügen, dass dieser Befund keinen Beweis für eine AICD abhängige Genregulation bei Morbus Alzheimer bedeuten muss. Zumindest ist aber der Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Zellkulturexperimente und der humanen Proben auffällig und dies nicht nur für IGFBP3 sondern auch für weitere der insgesamt 12 differentiell in Zelllinien regulierten Gene wie im Folgenden beschrieben ist.

#### **4.4.1.2 Clusterin (CLU)**

Clusterin (CLU) bzw. Apolipoprotein J ist ein hoch konserviertes sekretiertes Glykoprotein, das unter anderem in physiologische Prozesse wie Lipid-Transport und Inhibition oder Promotion der Apoptose involviert ist. Im cerebralen Kortex wird es von Neuronen und Astrozyten exprimiert und wurde in zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen, darunter auch Morbus Alzheimer, als hochreguliert auf mRNA und Protein Level im frontalen Kortex beschrieben (Calero et al., 2000; Duguid et al., 1989). In der vorliegenden Arbeit konnte diese Hochregulation nicht bestätigt werden, überraschenderweise war CLU im Kleinhirn schwach, aber signifikant geringer exprimiert und entsprach damit der Regulationsorientierung in den untersuchten Zelllinien (0,56-fach in iFA Klonen). CLU wurde ferner assoziiert mit

Amyloidplaques und der löslichen Form von A $\beta$  gefunden (Choi-Miura et al., 1992; Matsubara et al., 1995). Außerdem ist bekannt, dass im Nervensystem eine enge Beziehung zwischen Neurodegeneration und erhöhter CLU Genexpression besteht (Michel et al., 1992). Michel et al. (Michel et al., 1997) zeigten, dass der Beginn neuronaler Apoptose mit CLU Genexpression einhergeht. Studien über die Mechanismen der CLU abhängigen Induktion des programmierten Zelltods liegen bislang nicht vor. Interessanterweise wurde der erhöhten CLU Genexpression in Gehirnen von Morbus Alzheimer Patienten auch eine protektive Funktion zugeschrieben, da es die Aggregation von  $\beta$ A4 verhindern soll (Calero et al., 2000). Zusammenfassend ergibt sich nach aktuellem Stand der Forschung kein eindeutiger Hinweis auf die Funktion von CLU bei Morbus Alzheimer. Die AICD abhängige Regulation von CLU konnte auch durch Reporter-gen Experimente in induzierbaren AICD/FE65 Klonen (iFA) und Kontroll-Klonen (iEGFP) bestätigt werden. Die Promotoraktivität war in induzierten iFA Zellen um ca. 60 % gegenüber nicht-induzierten iFA Zellen verringert. Dies verdeutlicht, dass der CLU Promotor direkt in die AICD abhängige differentielle Genregulation involviert ist (siehe 3.2.3.7) und offensichtlich keine anderen Transkriptions-Regulationsmechanismen wie „Enhancer“ oder „Introns“ in die AICD abhängige Regulation dieses Gens involviert sind. Diese Reporter-gen-Studie ist sehr viel versprechend und bietet in weiteren Experimenten die Möglichkeit, eine Promotor-Zielsequenz zu ermitteln, die für diese Regulation notwendig ist.

#### **4.4.1.3 Prostate apoptosis response protein 4 (PRKC)**

PRKC (PAR4, prostate apoptosis response protein 4) ist ein proapoptotisches Gen, das ursprünglich in Prostata-Karzinomzellen, die dem programmierten Zelltod unterliegen, identifiziert wurde. Es ist in Gehirnarealen, die einer Neurodegeneration bei Morbus Alzheimer unterliegen, auf mRNA und Proteinebene erhöht exprimiert (Guo et al., 1998a; El Guendy and Rangnekar, 2003). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit auf RNA Ebene für das Areal frontaler Kortex (Vergleich von RNA Proben aus Gewebe von Alzheimer-gegenüber Kontroll-Patienten) jedoch nicht bestätigt werden. Im Hippocampus wurde von El-Guendy und Rangnekar (El Guendy and Rangnekar, 2003) ein 8 bis 20-facher Anstieg von PRKC Protein in Alzheimer Patienten gegenüber Kontrollen gemessen. PRKC ist in der Lage, die apoptotische Schwelle der Zelle zu senken. So unterliegen primäre hippocampale Neurone bei Stimulation mit A $\beta$  dem programmierten Zelltod, jedoch nicht, wenn Antisense Oligonukleotide für PRKC transfiziert wurden (El Guendy and Rangnekar, 2003). Diese PRKC abhängige Sensibilisierung von Neuronen für Apoptose wurde als ein früher Mechanismus in der Apoptose-Kaskade beschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene AICD abhängige Hochregulation von PRKC war mit durchschnittlich 1,4-facher

Regulation (real-time PCR Daten, Tabelle 5) zwar nur relativ gering, aber sowohl in iA wie in iFA Zellen konsistent. Die AICD abhängige PRKC Expressionsinduktion ist daher ein weiterer Mechanismus, der das beobachtete apoptotische Potential der induzierbaren Zelllinien erklären könnte. Allerdings zeigte die real-time PCR Analyse, dass zwischen iA und iFA Klonen in der Expressionshöhe von PRKC kein Unterschied war. Da aber nur iFA Klone „per se“ – also ohne Thapsigargin Stimulation - erhöhte Caspase-3 Aktivität zeigten, scheidet PRKC als Schlüsselkandidat für den induzierten programmierten Zelltod aus, da andernfalls auch iA Klone ein gleiches Maß an aktiver Caspase-3 aufweisen müssten. In Analogie zu IGFBP3 kann PRKC daher auch nicht für die erhöhten ER Calcium Konzentrationen verantwortlich sein. Trotzdem ist die Beobachtung interessant, dass die erhöhte Expression von PRKC in PC12 Zellen zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium Konzentrationen führte (Guo et al., 2001).

Sowohl IGFBP3 als auch PRKC wurden mit einer Modulation der Calcium Homöostase in Verbindung gebracht. Das Regulationsmuster (gleichermaßen starke Induktion in iA und iFA Klonen) ist jedoch nicht mit den in den Zelllinien beobachteten veränderten ER Calcium Konzentrationen in Verbindung zu bringen, da diese zwischen iA und iFA Klonen eine deutliche Potenzierung zeigten.

Auch das Zielgen Neuregulin 1 besitzt apoptotisches Potential und ist daher im Folgenden beschrieben.

#### **4.4.1.4 Neuregulin 1 (NRG1)**

Neuregulin 1 (NRG1, Heregulin) gehört zu einer Gruppe von Polypeptid Faktoren, die die natürlichen Liganden der humanen EGF („epidermal growth factor“) Rezeptor Familie (Mitglieder 3 und 4) sind. Für NRG1 ist bislang beschrieben, dass es Apoptose über den mitochondrialen Signalweg induzieren kann. Bei diesem Signalweg wird Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt, was zur Aktivierung von Caspase-9 führt (Le et al., 2002). Caspase-9 wiederum aktiviert im Zytosol die Effektor-Caspase-3, deren Aktivität im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessen wurde. Sowohl der ER vermittelte als auch der mitochondriale Apoptose-Signalweg münden somit in der Aktivierung der Caspase-3. AICD vermittelte NRG1 Expressionsinduktion könnte daher die in iFA Klonen beobachtete erhöhte Caspase-3 Aktivität erklären (Abbildung 24), da auch nur in iFA Klonen (und nicht in iA Klonen) eine Induktion dieses Gens detektierbar war (Tabelle 5).

Fraglich ist dagegen, ob NRG1 Induktion auch die nach Thapsigargin Stimulation festgestellte erhöhte Caspase-3 Aktivität auslösen kann. In diesem Fall müsste dieses Gen auch in den ER Calcium Haushalt der Zelle eingreifen können, was jedoch bislang nicht beschrieben ist. NRG1 ist aber unter den in dieser Arbeit identifizierten AICD abhängigen Zielgenen der einzige Kandidat, der zugleich apoptotisches Potential besitzt und in iFA Klonen stärker induziert war als in iA Klonen.

Interessanterweise wurde auch NRG1 in neuritischen Plaques von Alzheimer Gehirnen gegenüber Kontroll-Gehirnen hochreguliert gefunden (Chaudhury et al., 2003). Sie fanden zudem eine NRG1 Immunreaktivität in neuritischen Plaques von APP transgenen Mäusen (K670N; M671L)/PS1(M146L). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch auf RNA Ebene kein regulativer Unterschied für NRG1 in Alzheimer Gehirnen gegenüber Kontrollen detektiert werden (Abbildung 28).

Die vier in dieser Gruppe beschriebenen Gene IGFBP3, CLU, PRKC und NRG1 wurden in diversen Arbeiten mit einem Apoptose induzierenden Potential in Verbindung gebracht. Ebenfalls konnten sie in AD Gehirnen entweder in dieser oder der Arbeit anderer Gruppen als signifikant unterschiedlich gegenüber Kontrollen reguliert beschrieben werden. Für CLU und PRKC liegen zudem Hinweise vor, dass diese Gene in einem relativ frühen Stadium der Alzheimer Pathophysiologie differentiell reguliert sind (El Guendy and Rangnekar, 2003; Calero et al., 2000). Durch AICD abhängige Genregulation induzierte Apoptose könnte daher ein bereits früher Mechanismus der AD Pathophysiologie sein und noch vor der Entstehung von Amyloid-Plaques zur Neurodegeneration führen. Fraglich ist jedoch der zugrunde liegende Mechanismus des initiierten programmierten Zelltods. Die Zellkulturexperimente nach Thapsigargin Stimulation zeigten, dass AICD bzw. AICD/FE65 Induktion die Calcium Konzentration des ER moduliert. Aufgrund der Regulationsmuster der hier beschriebenen Gene (Induktion in iA und iFA Klonen bzw. Potenzierung von iA zu iFA Klonen) sind diejenigen Gene, für die eine Modulation der Calcium Konzentration beschrieben wurde (IGFBP3 und PRKC), nicht mit den Ergebnissen der Caspase-Aktivierung in Einklang zu bringen. Denn während die Induktion von IGFBP3 und PRKC in iFA und iA Zellklonen gleichermaßen stark war, konnte in iFA Zellen eine signifikant höhere Caspase-3 gemessen werden als in iA Klonen. Das AICD abhängig regulierte Gen NRG1 hingegen besitzt bei Überexpression apoptotisches Potential und ist nur in iFA, aber nicht in iA Zellen induziert. Nach der Diskussion anderer AICD abhängig regulierter Gene wird auf den Zusammenhang von Genregulation und Apoptose vertiefend eingegangen (4.4.5).

#### **4.4.2 Gene des Aktinzytoskeletts**

Drei der insgesamt 12 differentiell regulierten Gene wurden nach „GeneOntology“ Kriterien des „biological process“ der Gruppe „muscle development“ bzw. Aktinzytoskelett zugeordnet (Abbildung 31). Dazu zählen Tropomyosin 1 (TPM1), Transgelin (TAGLN) und Actin alpha 2 (ACTA2).

##### **4.4.2.1 Tropomyosin 1 (TPM1)**

Tropomyosine sind ubiquitäre Proteine, die ursprünglich als mit Aktinfilamenten von Myofibrillen assoziierte Moleküle beschrieben wurden. Interessanterweise sind Tropomyosine auch Bestandteile von Hirano Körperchen, die man in Gehirnen von Alzheimer Patienten findet. Dies konnte man mittels immunhistochemischer Färbungen mit einem Antikörper gegen Tropomyosin zeigen (Maciver and Harrington, 1995; Galloway et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit konnten die aus Zelllinien gewonnenen Daten einer Hochregulation von TPM1 im frontalen Kortex von Gehirnen von Alzheimer Patienten gegenüber Kontrollen durch real-time PCR bestätigt werden. Dagegen war im Kleinhirn, also einem Areal, das im Vergleich zum frontalen Kortex keine auffällige Alzheimer Pathologie hat, keine signifikant unterschiedliche Regulation detektierbar.

##### **4.4.2.2 Transgelin (TAGLN)**

Transgelin (TAGLN, SM22) ist ein Protein, das die Stabilität und Organisation des Aktinzytoskeletts regulieren kann. Dies wurde von Goodman et al. in Hefezellen gezeigt (Goodman et al., 2003). Gourlay et al. (Gourlay et al., 2004) zeigten zudem, dass das Aktinzytoskelett für den Zelltod und das Altern in Hefezellen von funktioneller Bedeutung ist. So führte die Deletion des Hefegens Scp1, welches homolog zum Säugetier-Transgelin Gen ist, zu einer reduzierten Produktion von reaktiven Sauerstoff Spezies und einer signifikant höheren Überlebensrate der Hefezellen. Im Umkehrschluss könnte eine erhöhte Transgelin Expression, wie sie in der vorliegenden Arbeit sowohl für das Zellkulturmodell (Tabelle 5) als auch für den frontalen Kortex von Alzheimer Patienten (Abbildung 28) gezeigt wurde, zu einem höheren Level reaktiven Sauerstoffs in der Zelle führen.

##### **4.4.2.3 Actin alpha 2 (ACTA2)**

ACTA2 ist eine Aktin Isoform der glatten Muskulatur. Hinsichtlich eines funktionellen Zusammenhangs zu Morbus Alzheimer liegen keine Daten vor.

TPM1, TAGLN und ACTA2 waren sowohl in iA wie in iFA Klonen hochreguliert. TPM1 und ACTA2 Hochregulation war in iFA Klonen gegenüber iA Klonen noch verstärkt. Diese Modifikationen des Zytoskeletts korrelieren mit der beobachteten ausgedehnteren Morphologie von induzierten iFA Zellen. Der Gesamtzusammenhang der AICD abhängigen differentiellen Regulation von Genen des Aktinzytoskeletts für Morbus Alzheimer ist wenig untersucht und bedarf weiterer Forschung. Festzuhalten bleibt, dass wie schon in der Gruppe der Apoptose relevanten Gene bereits Studien vorliegen, die auch für TPM1 einen Zusammenhang zur Alzheimer Pathologie beschreiben. TAGLN wurde in der vorliegenden Arbeit als differentiell im frontalen Kortex von Alzheimer Patienten gegenüber Kontroll-Fällen reguliert identifiziert.

#### **4.4.3 Transportergene**

Über den Transporter SLC7A5 (LAT1; L-type amino acid transporter 1) importiert die Zelle große neutrale Aminosäuren mit verzweigten oder aromatischen Seitenketten in das Zytoplasma (Kanai et al., 1998). SLC7A5 erkennt und transportiert jedoch auch toxische Moleküle wie Neurotoxine, die in ihrer Struktur Aminosäuren ähneln. SLC7A5 Expression konnte nur im Gehirn, der Plazenta und im Testis (Experimente mit Gewebe aus Ratten) identifiziert werden (Kanai and Endou, 2003). AICD abhängige Hochregulation von SLC7A5 könnte also ebenfalls toxisches Potential besitzen, indem mehr potentiell in der extrazellulären Matrix vorhandene Neurotoxine in die Zelle transportiert werden.

Die Rab Familie enthält mehr als 60 Familienmitglieder in Säugetier-Zellen und koordiniert viele Schritte des vesikulären Transports. Intrazelluläre Kompartimente des exo- und endozytotischen Signalwegs enthalten spezifische Rab Familienmitglieder. Rab Proteine wechseln zwischen einer GTP gebundenen aktiven und einer GDP gebundenen inaktiven Form. Die Rab3 Familie ist im Gegensatz zu der ubiquitären Expression anderer Rab Proteine in Neuronen und endokrinen Zellen angereichert, RAB3B ist ebenso in polarisierten Epithelzellen exprimiert (Darchen and Goud, 2000). Eine AICD abhängige Hochregulation von RAB3B könnte daher die intrazellulären Transportvorgänge modulieren.

Bislang ist keine Verbindung dieser Proteine zu Morbus Alzheimer beschrieben.

#### **4.4.4 Sonstige Gene**

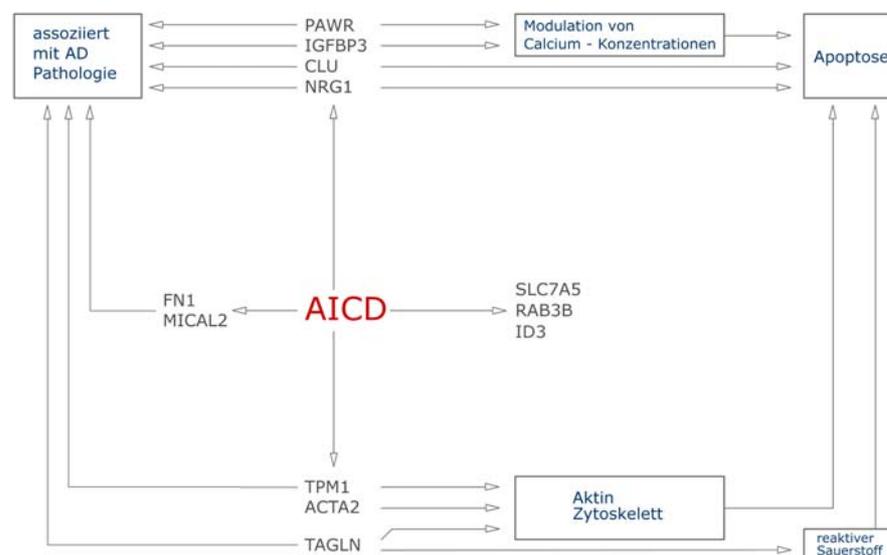
Fibronectin1 (FN1) ist ein Glykoprotein, das eine Rolle bei der Zelladhäsion und für die Morphologie der Zelle besitzt. Viele Zellen nutzen Fibronectin, um an das Collagen der

extrazellulären Matrix zu binden. Fibronectin wird auch von reaktiven Astrozyten sekretiert (Norenberg, 1994) und konnte in neuritischen Plaques in immunhistologischen Schnitten von Morbus Alzheimer Patienten nachgewiesen werden (Van Gool et al., 1994).

MICAL2 gehört zur Familie der Flavoprotein Monooxygenasen, die mit Aktin, Intermediärfilamenten und Zytoskelett assoziierten Adapterproteinen interagieren können (Terman et al., 2002).

ID3 (inhibitor of DNA binding 3) gehört zur Familie der „helix-loop-helix“ Proteine, denen eine basische DNA Bindedomäne fehlt und die daher die Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch Bildung nichtfunktionaler Dimere, die unfähig sind, an die DNA zu binden, inhibieren (Lyden et al., 1999).

Es konnten in induzierbaren Zelllinien 12 differentiell AICD abhängig regulierte Gene identifiziert werden, von denen in dieser oder anderen Arbeiten 7 (CLU, FN1, TPM1, IGFBP3, PRKC, TAGLN, NRG1) auch in Gewebe von Morbus Alzheimer Patienten gegenüber Kontrollen als differentiell exprimiert beschrieben wurden (Abbildung 33).



**Abbildung 33 – Funktionelle Übersicht AICD abhängig differenziell regulierter Gene und ihre Assoziation zur Morbus Alzheimer Pathologie.** Die 12 in der vorliegenden Arbeit identifizierten AICD abhängig regulierten Gene wurden hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung kategorisiert. 7 dieser Gene waren mit der Morbus Alzheimer Pathologie assoziiert, d.h. diese Gene wurden entweder in dieser oder anderen Arbeiten als signifikant unterschiedlich reguliert in Gewebe von Alzheimer-Patienten gegenüber Kontrollen beschrieben.

Bei der Analyse der differentiellen Genexpression des Adapterproteins FE65 in Gewebe von Morbus Alzheimer Patienten gegenüber Kontrollen war zwar zwischen der Alzheimer und der Kontrollgruppe kein Unterschied zu erkennen, jedoch zeigte der Vergleich der beiden Areale miteinander einen signifikanten Unterschied im Ausmaß der FE65 Expression. In allen untersuchten Proben (Alzheimer und Kontrollfälle) war die FE65 Expression im Cerebellum höher als im frontalen Kortex. Dies konnte auch auf Proteinebene verifiziert werden (Abbildung 30). Unter der Annahme, dass die in humanen cerebralen Gehirnen gefundenen differentiell regulierten Gene ein Resultat AICD abhängiger Transkriptionsänderung sind (was sicherlich nur eine Hypothese ist), wäre daher eher im Cerebellum eine verstärkte Induktion zu erwarten gewesen, da hier besonders hohe FE65 Konzentrationen vorliegen. Denn das Zellkultur-Modell verdeutlichtete, dass die Koexpression von AICD und FE65 für viele Gene eine notwendige Bedingung für eine hohe Induktion war.

Clusterin war tatsächlich nur im Cerebellum reguliert, Insulin-growth-factor-binding-protein 3 sowohl im Cerebellum und frontalen Kortex, Transgelin und Tropomyosin 1 dagegen nur im frontalen Kortex.

Die FE65 Expressionsstärken im Cerebellum und frontalen Kortex scheinen daher nicht mit der beobachteten Induktion von AICD Zielgenen in Verbindung zu stehen. Es kann daher vermutet werden, dass die FE65 Expressions-Level im frontalen Kortex ausreichend hoch sind, um AICD abhängige differentielle Genregulation zu induzieren. Der in diesem Zusammenhang maßgebliche Faktor scheint daher AICD zu sein. Da die Alzheimer Pathologie im frontalen Kortex stärker als im Cerebellum ausgeprägt ist, ist der frontale Kortex auch das Areal, in dem die Entstehung von AICD wahrscheinlicher ist.

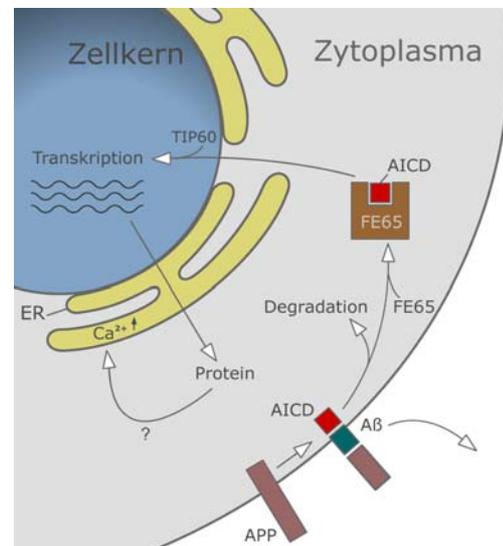
#### **4.4.5 AICD abhängig regulierte Gene sind in die Modulation von Calcium Konzentrationen und Apoptose involviert**

Die Klassifizierung nach „GeneOntology biochemical process“ Kriterien zeigte, dass der Gruppe der Apoptose relevanten Gene drei Mitglieder der in der vorliegenden Arbeit identifizierten AICD abhängig regulierten Gene zugeordnet werden konnten. Dies sind die Gene IGFBP3, CLU und PRKC. Nach aktuellem Stand der Forschung ist darüber hinaus auch NRG1 ein Gen, das häufig mit Mechanismen des programmierten Zelltods in Verbindung gebracht werden kann. Die Regulationsrichtung aller Apoptose relevanten Gene entsprach mit Ausnahme von CLU einer Verstärkung des apoptotischen Potentials bzw. einer Verringerung der apoptotischen Schwelle der Zelle. Sowohl für IGFBP3 als auch PRKC ist das

apoptotische Potential mit einer Störung des Calcium Haushalts der Zelle beschrieben (Ricort et al., 2002; Guo et al., 2001).

Dementsprechend ergibt sich folgende Hypothese: Die AICD abhängige differentielle Regulation Apoptose relevanter Gene wie IGFBP3 und PRKC geht mit einer verringerten apoptotischen Schwelle induzierter Zelllinien des Typs iA und iFA einher. Da die Gene IGFBP3 und PRKC mit der Modulation von intrazellulären Calcium Konzentrationen in Verbindung gebracht wurden, ist auch eine Änderung speziell der ER Calcium Konzentration durch diese Gene denkbar, bislang aber nicht beschrieben. Da eine gestörte ER Calcium Homöostase ER-Stress und Apoptose induzieren kann, kann so auch die nach Thapsigargin Stimulation erhöhte Caspase-3 Aktivität erklärt werden.

In iFA Klonen werden zusätzlich zu anderen Genen noch NRG1, MICAL2 und RAB3B induziert. Die Expression von TPM1, FN1, CLU und ACTA2, die in iA Klonen nicht oder nur wenig induziert waren, wird zudem verstärkt. Unter diesen AICD Zielgenen besitzt auch NRG1 apoptotisches Potential, wodurch die apoptotische Schwelle von iFA Zellen weiter gesenkt bzw. überschritten werden könnte. Infolge dessen konnten erhöhte Caspase-3 Konzentrationen auch ohne Zugabe von Thapsigargin in iFA Zellklonen gemessen werden. Die Stimulation von iFA Zellen mit Thapsigargin potenzierte das Ausmaß aktiver Caspase-3, so dass anzunehmen ist, dass es zu einer Steigerung der Störung der ER Calcium Homöostase gekommen war. AICD abhängige differentielle Genregulation resultiert somit in einer Störung der ER Calcium Homöostase (Abbildung 34).



**Abbildung 34 – Modell der AICD abhängigen Modulation der ER Calcium Konzentration.** Nach  $\gamma$ -Sekretase abhängiger APP Prozessierung wird AICD in das Zytoplasma freigesetzt. Dort wird es schnell degradiert, es sei denn, es kann infolge einer Interaktion mit FE65 stabilisiert werden. In diesem Fall gelangt es gebunden an das Adapterprotein in den Zellkern, wo es mit weiteren Proteinen wie z.B. TIP60 einen transkriptionell aktiven Komplex bilden kann. AICD abhängig regulierte Gene haben das Potential, intrazelluläre Calcium Konzentrationen zu modulieren, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Möglicherweise können diese AICD Zielgene auch die Calcium Konzentrationen des ER modulieren.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes hypothetisches Bild AICD abhängiger Genregulation:

- AICD zeigt Eigenschaften eines Transkriptionsfaktors. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals 12 AICD abhängig regulierte Gene beschrieben.
- Differentiell durch AICD regulierte Gene sind unter anderem in Mechanismen der Apoptose involviert (IGFBP3, CLU, PRKC, NRG1)
- AICD Überexpression steigert die ER Calcium Konzentration und erzeugt auf diese Weise ER Stress, was nach ER Calcium Entleerung zur Aktivierung von Caspase-3 und Apoptose führt.
- Die Koexpression von AICD und FE65 erhöht im Vergleich zur alleinigen AICD Expression die ER Calcium Konzentration. Die apoptotische Schwelle der Zellen sinkt und Zellen sind dem programmierten Zelltod ausgesetzt. Die ER Calcium Entleerung führt zu einer sehr starken Caspase-3 Aktivierung und hohem Maß an Apoptose.
- Die Koexpression von AICD und FE65 verstärkt die differentielle Regulation einiger AICD abhängig regulierter Gene. In der vorliegenden Arbeit waren die Gene ACTA2, CLU, FN1 und TAGLN auf diese Weise reguliert.
- 7 der 12 AICD abhängig differentiell in Zellkultur regulierten Gene sind auch mit der Pathophysiologie des Morbus Alzheimer verbunden. AICD abhängige differentielle Genexpression könnte daher ein für die Alzheimer Pathophysiologie relevanter neurodegenerativer Mechanismus sein.

#### 4.5 Signalweganalyse

Neben der Diskussion der 12 AICD abhängig differentiell regulierten Gene hinsichtlich ihrer potentiellen Funktion ist es von großem Interesse, die zugrunde liegenden AICD abhängigen Regulationsmechanismen zu verstehen. Bereits im Rahmen der Verifikation der GeneChip Daten fiel auf, dass die Genregulationen der 12 AICD abhängigen Gene unterschiedlichen Mustern folgten. So wurden drei Gene nur in iFA Klonen differentiell reguliert, fünf sowohl in iA und in iFA Klonen, vier wiederum erfuhren in ihrer Expressionshöhe eine Verstärkung von iA zu iFA Klonen.

Um weitergehende Untersuchungen durchzuführen, gibt es inzwischen eine Reihe kommerziell erwerblicher Software Pakete, von denen „Ingenuity Pathway Analysis“ ([www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) eines ist. Dieses Programm versucht auf Grundlage des aktuellen Standes der Forschung eine Liste von Genen miteinander in Verbindung zu bringen. Auf diese Weise können folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Welche Faktoren (Proteine) regulieren die identifizierten Gene? Sind diese Faktoren möglicherweise am Transkriptionskomplex beteiligt?
- Ist bereits bekannt, dass mehrere der Gene von einem bestimmten Faktor (Protein) differentiell reguliert werden? Im idealsten Fall könnte man so auf Promotorsequenzen schließen, die für die Regulation wichtig sind.
- Sind die Gene primär oder sekundär reguliert bzw. lassen sich Regulationskaskaden erkennen? Auf diese Weise könnte man Gene identifizieren, die infolge der Regulation eines anderen AICD abhängigen Gens in ihrer Expression beeinflusst wurden und daher als sekundäre Zielgene zu bezeichnen sind.

Die Signalweganalyse der 12 in dieser Arbeit identifizierten Gene ist in Abbildung 32 dargestellt. Die Software „Ingenuity Pathway Analysis“ konnte 9 der 12 Gene in einem „Network Explorer“ miteinander in Verbindung bringen. Diese Zusammenhänge sind im Folgenden beschrieben, wobei die in der vorliegenden Arbeit identifizierten AICD abhängigen differentiell regulierten Gene der Übersicht wegen unterstrichen dargestellt sind.

Im Rahmen der Signalweganalyse fiel zunächst die zentrale Rolle des c-Myc Proto-Onkogens auf, welches direkt oder indirekt Einfluss auf jedes der 9 Gene auszuüben scheint. Fibronectin 1 (Watson et al., 2002; Louro et al., 2002; Grandori et al., 2000), Tropomyosin 1 (Guo et al., 2000) und Clusterin (Thomas-Tikhonenko et al., 2004) werden direkt durch c-Myc herunterreguliert. In der vorliegenden Arbeit waren Fibronectin 1 und Tropomyosin 1 dagegen hochreguliert.

Zwischen c-Myc und dem Transkriptionsfaktor E2F1 besteht sowohl eine physikalische wie auch eine funktionelle Interaktion. So wurde die Bindung dieser beiden Proteine in verschiedenen Zelllinien gezeigt (Wells et al., 2003), aber auch, dass das c-Myc Protein die Expression von E2F1 erhöht (Conner et al., 2000).

E2F1 Expression erhöht wiederum die Expression von PRKC (Stanelle et al., 2002), was in der vorliegenden Arbeit ebenfalls hochreguliert gefunden wurde. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass E2F1 an den Promotor von ID3 bindet (Ren et al., 2002), welches ebenfalls AICD abhängig hochreguliert wird. In GeneChip Experimenten mit iFA Klonen war in der vorliegenden Arbeit die E2F1 Expressionsänderung um das 1,5-fache hochreguliert. Allerdings wurde dieses Gen mittels real-time PCR nicht untersucht.

c-Myc bindet darüber hinaus auch p53 (McCormack et al., 1998) und interagiert funktionell mit diesem Transkriptionsfaktor (Soengas et al., 1999; Ameyar et al., 1999). p53 wiederum

beeinflusst die Promotoraktivität von IGFBP3 (Frade et al., 2000; Shen et al., 1999), wobei bezüglich der Regulationsorientierung widersprüchliche Daten vorliegen. Daneben ist gezeigt, dass p53 die Expression von ACTA2 erhöht (Comer et al., 1998).

Auch zwischen c-Myc und beta-Catenin (CTNNB1) ist eine wechselseitige Beziehung hinsichtlich gegenseitiger Expressionsregulation beschrieben. Shiiio et al. (Shiiio et al., 2002) zeigten, dass das humane c-Myc Protein die Expression des beta-Catenin Proteins verringert. Interessanterweise war auch beta-Catenin eines der auf den iFA Chip differentiell regulierten Gene, das jedoch nicht weiter in dieser Arbeit untersucht wurde. Kim et al. (Kim et al., 2002) zeigten, dass beta-Catenin in humanen Kolon-Karzinom-Zelllinien für die Expression von NRG1 notwendig ist. So betrachtet, könnte die NRG1 Regulation ein sekundär durch beta-Catenin reguliertes AICD abhängiges Zielgen sein. Mittels „pull-down“ und Immunpräzipitation wurde gezeigt, dass beta-Catenin an CBP (CREBBP) bindet (Miyagishi et al., 2000; Takemaru and Moon, 2000). CBP schließlich steigert die Transkription des endogenen Promotors von Transgelin (Qiu and Li, 2002).

Diese Zusammenstellung verdeutlicht, dass 9 der 12 in der vorliegenden Arbeit differentiell AICD abhängig identifizierte Gene in einem Signalweg dargestellt werden können. Ein zentrales Protein in diesem Signalweg ist das Protoonkogen c-Myc, das ebenfalls transkriptionell aktiv ist. Da die Promotor-Binde-Matrix des c-Myc Proteins gut untersucht ist (die Sequenz ist NNACCACGTGGTNN) könnte man daraus folgern, dass diese Sequenz auch für die AICD abhängige Genregulation von Bedeutung ist. Bislang liegen dazu jedoch noch keine ausreichenden Untersuchungen vor. Kim et al. (Kim et al., 2003) schlugen in ihrer Arbeit, in der sie GSK3 $\beta$  als potentiell AICD abhängig reguliertes Zielgen darstellten, eine Bindesequenz im GSK3 $\beta$  Promotor als notwendig vor, an die der Transkriptionsfaktor CP2/LSF/LBP1 binden sollte. Diese Sequenz (+0 ~ +10 GCCCGGGCCAA) unterscheidet sich jedoch weitgehend von der c-Myc Zielsequenz. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass AICD abhängige Genregulation eine Subfamilie von c-Myc abhängig regulierter Gene in ihrer Expression moduliert. Interessanterweise rekrutiert der Transkriptionsfaktor c-Myc analog zu AICD auch TIP60 an das Chromatin, das im Rahmen der Transkriptionsaktivierung zur Acetylierung von Histonen führt (Frank et al., 2003). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass TIP60 auch c-Myc selbst acetyliert und so möglicherweise dessen Aktivität über die Veränderung seiner Abbaurate moduliert (Patel et al., 2004). Es ergeben sich also einige Parallelen zwischen c-Myc und AICD abhängiger differentieller Genregulation.

Wie beschrieben, bestehen zwischen c-Myc einerseits und E2F1, TP53 und CTNNB1 andererseits wechselseitige Beziehungen physikalischer oder funktioneller Art. Diese *weiteren* Faktoren wiederum beeinflussen direkt oder indirekt die Expression von in der vorliegenden Arbeit identifizierten AICD Zielgenen. Basierend auf der Annahme, dass c-Myc und AICD abhängige Genregulation ähnlichen Mechanismen unterliegen, kann vermutet werden, dass die Regulation von Genen durch die *weiteren* Faktoren sekundärer Art sind, also dadurch ausgelöst werden, dass AICD die Expression oder Aktivität der *weiteren* Faktoren beeinflusst und diese dann wiederum andere Gene differentiell regulieren. Dagegen spricht jedoch, dass die Gene E2F1 und TP53 entsprechend den Ergebnissen der GeneChip Experimente keine differentielle Regulation aufwiesen.

In Analogie der diskutierten Parallele zwischen c-Myc und AICD abhängiger Genregulation zeigten die drei direkt regulierten Gene den gleichen Induktionsverlauf. Sowohl CLU, FN1 und TPM1 waren in iA Klonen signifikant induziert. Diese Expression wurde durch die Koexpression von AICD und FE65 verstärkt (iFA Klone). Daneben zeigte nur noch ACTA2 denselben Induktionsverlauf.

Dagegen waren ID3, IGFBP3, PRKC, SLC7A5 und TAGLN sowohl in iA als auch iFA Klonen gleichermaßen stark induziert. MICAL2, NRG1 und RAB3B Induktion war nur in iFA Klonen detektierbar. Diese unterschiedlichen Verläufe deuten darauf hin, dass voneinander unterschiedliche Regulationsmuster vorliegen oder für die jeweilige Regulationsgruppe unterschiedliche Kofaktoren, die bislang noch nicht bekannt sind, notwendig sind. Bereits in 1.7 wurden verschiedene Modelle der AICD abhängigen Genregulation vorgeschlagen, unter anderem wurden verschiedene Transkriptionskomplexe bestehend aus AICD/FE65/TIP60 oder AICD/FE65/CP2/LSF/LBP1 diskutiert (Cao and Sudhof, 2004). Darüber hinaus erscheint die Beteiligung weiterer Proteine am AICD Transkriptionskomplex möglich, da in diesem Zusammenhang z.B. noch keine Interaktionspartner der WW Domäne des Adapterproteins FE65 bekannt sind. Auf Grundlage des derzeitigen Stands der Forschung ist daher das im Folgenden dargestellte Modell der AICD abhängigen Genregulation vorstellbar.

#### **4.6 Hypothetisches Modell der AICD abhängigen Genregulation**

In der vorliegenden Arbeit konnten drei verschiedene Regulationsmuster herausgearbeitet werden (s. 3.2.3.6). ID3, IGFBP3, PRKC, SLC7A5 und TAGLN (Regulationsmuster I) waren in iA und iFA Klonen gleichermaßen stark induziert. ACTA2, CLU, FN1 und TPM1 (Regulationsmuster II) zeigten in iFA gegenüber iA Klonen eine erhöhte Induktion. MICAL2, NRG1 und RAB3B (Regulationsmuster III) waren nur in iFA Klonen induziert. Keines der 12

Kandidatengene war in iEGFP Klonen induziert, so dass unspezifische Mechanismen, wie etwa eine Expressionsinduktion durch das verwendete Doxzyklin oder durch koexprimiertes EGFP, ausgeschlossen werden konnten.

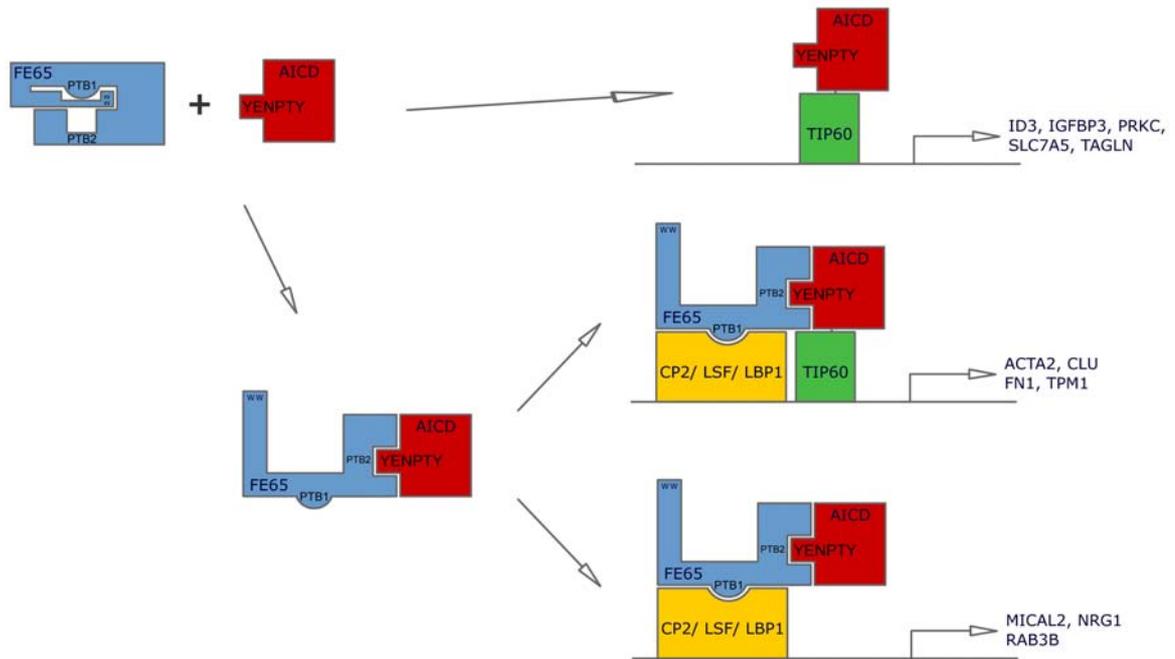
Auf Grundlage aktueller Forschung, in der zwei verschiedene AICD transkriptionell aktive Komplexe beschrieben werden, kann folgendes Modell der AICD abhängigen differentiellen Genexpression erstellt werden (Abbildung 35).

AICD interagiert im Zytoplasma mit dem Adapterprotein FE65. Infolge dieser Interaktion erfährt FE65 eine Konformationsänderung, so dass die WW Domäne, die vormals mit einem Motiv zwischen den beiden PTB Domänen intrinsisch assoziiert war (Cao and Sudhof, 2004), herausklappt und so beide PTB Domänen zugänglich werden. AICD bindet nun über sein YENPTY Motiv an die PTB2 Domäne von FE65. Der Komplex transloziert in den Zellkern und kann dort mit verschiedenen Promotoren interagieren. Diese im Folgenden beschriebenen drei verschiedenen Promotoren sind rein hypothetischer Natur, denn die Klassifizierung von Promotoren, die entweder nur TIP60 oder CP2/LSF/LBP1 bzw. beide Proteine gleichzeitig binden, ist bislang nicht untersucht.

An Promotoren der Klasse I ist nur TIP60 gebunden (Abbildung 35 oben). So regulierte Gene können durch AICD induziert werden. Die Koexpression von FE65 hat keinen Einfluss auf die Induktionshöhe. So regulierte Gene gehören zum Regulationsmuster I. Dass AICD eine direkte Interaktion mit TIP60 ausbilden kann, wurde bereits von Kinoshita et al. (Kinoshita et al., 2002) angenommen.

An Klasse II Promotoren ist sowohl der Transkriptionsfaktor CP2/LSF/LBP1 wie auch TIP60 gebunden. AICD ist ohne FE65 Koexpression in der Lage, Gene mit diesem Promotor zu induzieren, jedoch bewirkt die Koexpression von FE65 eine Induktionserhöhung (Abbildung 35 Mitte). Ohne AICD kann FE65 diese Gene nicht induzieren, da es in seiner geschlossenen Konformation verbleibt. So regulierte Gene entsprechen dem Regulationsmuster II.

An die Klasse III von Promotoren ist nur der Transkriptionsfaktor CP2/LSF/LBP1 gebunden (Abbildung 35 unten). An solche Promotoren kann nur der Komplex aus FE65/AICD bzw. in seiner Konformation „geöffnetes“ FE65 binden, wozu jedoch AICD notwendig ist. Durch diese Promotoren regulierte Gene werden nur bei Koexpression von FE65 und AICD induziert. So regulierte Gene entsprechen dem Regulationsmuster III.



**Abbildung 35 – Hypothetisches Modell der AICD abhängigen Genregulation.** Nach  $\gamma$ -Sekretase abhängiger APP Prozessierung wird AICD freigesetzt und kann an FE65 binden. Infolge dieser Bindung erfährt FE65 eine Konformationsänderung, so dass beide PTB Domänen „zugänglich“ werden. Der AICD/FE65 Komplex transloziert in den Zellkern und kann hier mit anderen Proteinen interagieren. Eines dieser Proteine ist TIP60, das mit bestimmten Promotoren assoziiert ist. Von diesen Promotoren regulierte Gene können AICD abhängig in ihrer Genexpression moduliert werden. Die Koexpression von FE65 hat keinen Einfluss auf die Expressionshöhe (oberer Teil der Abb.). Gene, die von solchen Promotoren reguliert werden, entsprechen dem Regulationsmuster I. Promotoren, die sowohl TIP60 und CP2/LSF/LBP1 binden, können ebenfalls AICD abhängig aktiviert werden. Die Koexpression von FE65 verstärkt jedoch die Expression der entsprechenden Gene (Regulationsmuster II, mittlerer Teil der Abb.). Eine dritte Gruppe von Promotoren kann hingegen nur den Transkriptionsfaktor CP2/LSF/LBP1 binden. Diese Promotoren werden nur dann aktiviert, wenn AICD und FE65 koexprimiert werden. Die alleinige Expression eines der Proteine hat dagegen keinen Effekt, denn AICD kann ohne FE65 nicht an CP2/LSF/LBP1 binden und FE65 wird ohne AICD nicht in seiner Ausgangskonformation geändert. So regulierte Gene gehören zu dem Regulationsmuster III.

#### 4.7 Ausblick

AICD abhängig differenzielle Genregulation könnte ein für Morbus Alzheimer relevanter Mechanismus sein, der möglicherweise neurodegenerativ wirkende Gene aktiviert und die apoptotische Schwelle neuronaler Zellen verringern kann.

Einige potentielle AICD Zielgene wurden in der vorliegenden Arbeit identifiziert. Obwohl die Bedingungen der Zellkulturexperimente so gewählt wurden, dass zum analysierten Zeitpunkt (72 h) gerade eine hohe Induktion ektopisch inserierter Gene vorhanden war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Gene sekundär reguliert sind. Daher erscheint es sinnvoll, die Expression der identifizierten Zielgene zeitabhängig über einen größeren Zeitraum zu analysieren (z.B. von 24 h bis 144 h). Möglicherweise sind auch die bislang vorgeschlagenen Zielgene KAI1, SERCA2B und GSK3 $\beta$  in dem hier benutzten Modell reguliert, aber erst zu späteren (oder früheren) Zeitpunkten. Interessanterweise sind einige der differentiell reguliert

gefunden Gene auch im frontalen Kortex von Alzheimer Patienten gegenüber Kontrollen unterschiedlich reguliert, woraus man schließen könnte, dass AICD diese Gene über einen „langen“ Zeitraum kontinuierlich induziert.

Im Rahmen der Experimente fielen unterschiedliche Regulationsmuster auf. So waren einige Gene nur in iFA Klonen, andere sowohl in iA und iFA Klonen induziert. Diese grundlegend verschiedenartigen Induktionen geben einen Hinweis auf weitere Proteine, die am Regulationskomplex beteiligt sein können und deren Identifikation von großem Interesse ist.

Das potentielle AICD Zielgen Neuregulin1 ist das einzige Kandidatengen, dass sowohl apoptotisches Potential besitzt und in iFA Klonen stärker induziert war als in iA Klonen. Daher ist es DAS Kandidatengen, um die nach Thapsigargin Stimulation gefundenen erhöhten Caspase-3 Aktivitäten zu erklären. Allerdings ist bislang keine Interaktion zwischen Neuregulin1 und einer Störung der ER Calcium Homöostase beschrieben. Die Analyse dieses potentiellen Zusammenhangs ist ein weiterer interessanter Aspekt für künftige Experimente AICD abhängiger Genexpression.

Reporter-gen-Untersuchungen zeigten, dass der Clusterin Promotor in die AICD abhängige differentielle CLU Regulation eingebunden ist. Mit diesem Experiment als Ausgangspunkt wäre eine Identifizierung des notwendigen Motivs innerhalb des Promotors von großem Interesse, um so auf vereinfachtem Wege andere Zielgene mit ähnlichen Motiv aufzufinden.

Darüber hinaus lieferte die Signalweganalyse Vorschläge für weitere eventuell differentiiell regulierte Gene. Dazu gehören in erste Linie Catenin-beta (Ctnnb1) und Transgelin 2 (TAGLN2). Ctnnb1 ist interessant, da Neuregulin 1, ein – wie bereits publiziert - durch Ctnnb1 differentiiell reguliertes Gen ist und in der vorliegenden Arbeit bereits als Zielgen identifiziert wurde. TAGLN2 ist von Interesse, da bereits TAGLN1 als AICD Zielgen identifiziert werden konnte.

Die Analyse der *in vitro* gefundenen Zielgene im Mausmodell könnte diese auch *in vivo* bestätigen. Auch für solche Experimente erscheint eine altersabhängige Untersuchung sinnvoll. Generell erscheint die Frage nach dem Zeitpunkt AICD abhängiger differentiieller Genexpression als hoch interessant. Während  $\beta$ A4 erst akkumulieren muss, um toxisches Potential zu erhalten, könnte AICD bereits in frühen Stadien von Morbus Alzheimer weit reichende zelluläre Modifikationen bewirken. Noch grundlegender ist die Frage, ob AICD überhaupt infolge amyloidogener Prozessierung vermehrt entsteht oder ob auch die nicht-amyloidogene Prozessierung AICD freisetzen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde stets mit zwei verschiedenen AICD Isoformen gearbeitet, wobei jedoch in keinem der Experimente ein signifikanter Unterschied zwischen AICD59 und

AICD50 erkennbar war. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass AICD59 in den verwendeten Neuroblastom-Zellen zu AICD50 prozessiert wird, wie es entsprechend den gezeigten Untersuchungen auf Proteinebene anzunehmen ist. Daher wäre es von großem Interesse, AICD59 Klone mit  $\gamma$ -Sekretase Inhibitoren zu behandeln und infolge dieser Stimulation AICD abhängige differentielle Genexpression zu untersuchen. Damit könnte geklärt werden, ob tatsächlich die  $\gamma$ -Sekretase für diese Prozessierung verantwortlich ist und möglicherweise gezeigt werden, dass diese auch im Zytoplasma Aktivität besitzt, denn in den hier untersuchten Zelllinien wird AICD zytoplasmatisch exprimiert.

## 5 Zusammenfassung

Das Amyloid Precursor Protein (APP) spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Morbus Alzheimer. Nach amyloidogener Prozessierung des APP durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase entstehen ein sekretiertes N-terminales Fragment,  $\beta$ -Amyloid (der Hauptbestandteil der Alzheimerschen Plaques) und die APP intrazelluläre Domäne (AICD). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass AICD transaktivierendes Potential besitzt, jedoch sind die durch AICD regulierten Gene bisher weitgehend unbekannt. Überexpression von AICD in Zellkulturen führt zum programmierten Zelltod, wobei unklar ist, ob dies mit einer Modulation des Transkriptoms in Verbindung steht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, AICD-abhängig regulierte Gene zu identifizieren sowie das apoptotische Potential dieses 6 kDa großen Peptids zu charakterisieren.

Stabil konstitutiv und induzierbar AICD exprimierende Zelllinien wurden auf Grundlage einer humanen Neuroblastom-Zelllinie (SHEP-SF) etabliert. Nachdem bekannt ist, dass FE65 ein an AICD bindendes Adapterprotein ist und potenzierende Wirkung auf die AICD induzierte Transaktivierung besitzt, wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine stabile Zelllinie etabliert, die sowohl für AICD wie für FE65 induzierbar war. Mit Hilfe dieses Zellkultursystem wurde zunächst gezielt nach AICD abhängig regulierten Genen gesucht, indem das Transkriptom induzierter vs. nicht-induzierter Klone auf Affymetrix GeneChips analysiert wurde.

Dies führte zu einer Liste von 239 potentiellen Kandidatengenen, von denen 34 nach stringenten statistischen Kriterien ausgewählt und letztlich 12 differentiell AICD abhängig regulierte Gene mittels real-time PCR verifiziert werden konnten. Ordnet man diese Gene nach ihrer Funktion, so können vier Apoptose relevante Gene (Clusterin, Insulin-growth-factor-binding-protein 3 (IGFBP3), Prostate apoptosis response protein 4 (PRKC), Neuregulin 1 (NRG1)), drei Gene des Aktinzytoskeletts (Actin alpha 2, Transgelinein, Tropomyosin 1), zwei mit Transportprozessen assoziierte Gene (Ras-associated protein RAB3B, Solute carrier family 7, member 5) und drei sonstige Gene (Fibronectin 1, Inhibitor of DNA binding 3, Flavoprotein oxidoreductase MICAL2) identifiziert werden. Die differentielle Genexpression von Clusterin wurde durch ein Reporterexperiment bestätigt, bei dem gezeigt werden konnte, dass die Promotor Aktivität von Clusterin AICD abhängig moduliert wird. Vergleicht man die Induktionswerte dieser AICD Zielgene in Klonen, die ausschließlich AICD induzieren mit denjenigen in Klonen, die sowohl AICD und FE65 induzieren, so zeichnen sich drei unterschiedliche Regulationsmuster ab. Fünf Gene sind unter AICD/FE65 sowie

unter AICD Induktion gleichermaßen stark, vier Gene unter AICD/FE65 stärker als unter AICD Induktion und drei Gene nur unter AICD/FE65 Induktion differentiell reguliert. Diese Regulationsmuster stützen die Hypothese, dass AICD/FE65 mit zwei verschiedenen Transkriptionskomplexen (TIP60 und CP2/LSF/LBP1) interagieren kann und implizieren, dass diese alternativen Interaktionen verschiedene Zielgene regulieren.

Interessanterweise waren drei der 12 AICD-Zielgene auch im frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten gegenüber Kontrollen differentiell reguliert. Dies deutet darauf hin, dass AICD abhängige Genregulation ein relevanter Mechanismus für die Pathophysiologie des Morbus Alzheimer sein könnte.

Die stabilen Zelllinien wurden zudem hinsichtlich ihres apoptotischen Potentials untersucht. Thapsigargin vermittelte Induktion von Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und damit induzierte Störung der ER Calcium Homöostase führte zu einer signifikanten Erhöhung des AICD abhängigen programmierten Zelltods. Nachdem bekannt ist, dass die ektopische Expression von IGFBP3, NRG1 oder PRKC in Zellkulturen zum programmierten Zelltod führt, konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals eine Expressions-Induktion dieser Gene mit AICD abhängiger Genregulation in Verbindung gebracht werden. AICD abhängige Modulation des Transkriptoms, insbesondere von mit Apoptose assoziierten Genen, könnte daher direkt zur Neurodegeneration bei Morbus Alzheimer beitragen.

## 6 Referenzen

Akbari, Y., Dagher, N., Murphy, M. P., Tseng, B. P., Smith, I. F., Golde, T. E., Oddo, S., Leissring, M. A., and LaFerla, F. M. APP intracellular domain governs expression of an ER calcium pump: a mechanism linking nuclear signaling, calcium, and  $\beta$ -amyloid. Society for Neuroscience, 2003 876.9. 12-11-2003.

Ref Type: Abstract

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Zeitschr. Psychiatr.* 64, 146-148.

Amaratunga, A. and Fine, R.E. (1995). Generation of Amyloidogenic C-Terminal Fragments During Rapid Axonal-Transport In-Vivo of Beta-Amyloid Precursor Protein in the Optic-Nerve. *Journal of Biological Chemistry* 270, 17268-17272.

Ameyar, M., Shatrov, V., Bouquet, C., Capoulade, C., Cai, Z., Stancou, R., Badie, C., Haddada, H., and Chouaib, S. (1999). Adenovirus-mediated transfer of wild-type p53 gene sensitizes TNF resistant MCF7 derivatives to the cytotoxic effect of this cytokine: relationship with c-myc and Rb. *Oncogene* 18, 5464-5472.

Ando, K., Iijima, K.I., Elliott, J.I., Kirino, Y., and Suzuki, T. (2001). Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of beta-amyloid. *J. Biol. Chem.* 276, 40353-40361.

Ando, K., Oishi, M., Takeda, S., Iijima, K., Isohara, T., Nairn, A.C., Kirino, Y., Greengard, P., and Suzuki, T. (1999). Role of phosphorylation of Alzheimer's amyloid precursor protein during neuronal differentiation. *J. Neurosci.* 19, 4421-4427.

Aplin, A.E., Gibb, G.M., Jacobsen, J.S., Gallo, J.M., and Anderton, B.H. (1996). In vitro phosphorylation of the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein by glycogen synthase kinase-3beta. *J. Neurochem.* 67, 699-707.

Araki, Y., Miyagi, N., Kato, N., Yoshida, T., Wada, S., Nishimura, M., Komano, H., Yamamoto, T., De Strooper, B., Yamamoto, K., and Suzuki, T. (2004). Coordinated metabolism of Alcadin and amyloid beta-protein precursor regulates FE65-dependent gene transactivation. *J. Biol. Chem.* 279, 24343-24354.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776.

Baek, S.H., Ohgi, K.A., Rose, D.W., Koo, E.H., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2002). Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappa B and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 110, 55-67.

Bancher, C., Braak, H., Fischer, P., and Jellinger, K.A. (1993). Neuropathological staging of Alzheimer lesions and intellectual status in Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Neurosci. Lett.* 162, 179-182.

- Barinaga,M. (1995). Missing Alzheimer's gene found. *Science* 269, 917-918.
- Bergman,A., Religa,D., Karlstrom,H., Laudon,H., Winblad,B., Lannfelt,L., Lundkvist,J., and Naslund,J. (2003). APP intracellular domain formation and unaltered signaling in the presence of familial Alzheimer's disease mutations. *Exp. Cell Res.* 287, 1-9.
- Biederer,T., Cao,X., Sudhof,T.C., and Liu,X. (2002). Regulation of APP-dependent transcription complexes by Mint/X11s: differential functions of Mint isoforms. *J. Neurosci.* 22, 7340-7351.
- Bing,Z., Reddy,S.A., Ren,Y., Qin,J., and Liao,W.S. (1999). Purification and characterization of the serum amyloid A3 enhancer factor. *J. Biol. Chem.* 274, 24649-24656.
- Borg,J.P., Ooi,J., Levy,E., and Margolis,B. (1996). The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol. Cell Biol.* 16, 6229-6241.
- Borg,J.P., Yang,Y., Taddeo-Borg,M., Margolis,B., and Turner,R.S. (1998). The X11alpha protein slows cellular amyloid precursor protein processing and reduces Abeta40 and Abeta42 secretion. *J. Biol. Chem.* 273, 14761-14766.
- Braak,H. and Braak,E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl)* 82, 239-259.
- 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. and Sudhof,T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-120.
- Cao,X. and Sudhof,T.C. (2004). Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J. Biol. Chem.* 279, 24601-24611.
- Cervellera,M., Raschella,G., Santilli,G., Tanno,B., Ventura,A., Mancini,C., Seignani,C., Calabretta,B., and Sala,A. (2000). Direct transactivation of the anti-apoptotic gene apolipoprotein J (clusterin) by B-MYB. *J. Biol. Chem.* 275, 21055-21060.
- 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, 51100-51107.
- Chaudhury,A.R., Gerecke,K.M., Wyss,J.M., Morgan,D.G., Gordon,M.N., and Carroll,S.L. (2003). Neuregulin-1 and erbB4 immunoreactivity is associated with neuritic plaques in Alzheimer disease brain and in a transgenic model of Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 42-54.
- Chodosh,L.A., Baldwin,A.S., Carthew,R.W., and Sharp,P.A. (1988). Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits. *Cell* 53, 11-24.
- Choi-Miura,N.H., Ihara,Y., Fukuchi,K., Takeda,M., Nakano,Y., Tobe,T., and Tomita,M. (1992). SP-40,40 is a constituent of Alzheimer's amyloid. *Acta Neuropathol. (Berl)* 83, 260-264.

- Comer, K.A., Dennis, P.A., Armstrong, L., Catino, J.J., Kastan, M.B., and Kumar, C.C. (1998). Human smooth muscle alpha-actin gene is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *Oncogene* 16, 1299-1308.
- Conner, E.A., Lemmer, E.R., Omori, M., Wirth, P.J., Factor, V.M., and Thorgeirsson, S.S. (2000). Dual functions of E2F-1 in a transgenic mouse model of liver carcinogenesis. *Oncogene* 19, 5054-5062.
- Cook, D.G., Sung, J.C., Golde, T.E., Felsenstein, K.M., Wojczyk, B.S., Tanzi, R.E., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., and Doms, R.W. (1996). Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: localization in cell bodies and dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 9223-9228.
- 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.
- Daly, J., Lahiri, D.K., Justus, D.E., and Kotwal, G.J. (1998). Detection of the membrane-retained carboxy-terminal tail containing polypeptides of the amyloid precursor protein in tissue from Alzheimer's disease brain. *Life Sci.* 63, 2121-2131.
- Darchen, F. and Goud, B. (2000). Multiple aspects of Rab protein action in the secretory pathway: focus on Rab3 and Rab6. *Biochimie* 82, 375-384.
- Dawson, G.R., Seabrook, G.R., Zheng, H., Smith, D.W., Graham, S., O'Dowd, G., Bowery, B.J., Boyce, S., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., van der Ploeg, L.H., and Sirinathsinghji, D.J. (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* 90, 1-13.
- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38, 9-12.
- Dickson, D.W. (1997). The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 321-339.
- Duguid, J.R., Bohmont, C.W., Liu, N.G., and Tourtellotte, W.W. (1989). Changes in brain gene expression shared by scrapie and Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 7260-7264.
- Duilio, A., Faraonio, R., Minopoli, G., Zambrano, N., and Russo, T. (1998). Fe65L2: a new member of the Fe65 protein family interacting with the intracellular domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *Biochem. J.* 330 (Pt 1), 513-519.
- Edbauer, D., Willem, M., Lammich, S., and Steiner, H. (2002). Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain. *Neurobiology of Aging* 23, S559.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat. Cell Biol.* 5, 486-488.
- El Guendy, N. and Rangnekar, V.M. (2003). Apoptosis by Par-4 in cancer and neurodegenerative diseases. *Exp. Cell Res.* 283, 51-66.

- Ermekova, K.S., Zambrano, N., Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T., and 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*, 32869-32877.
- Fiore, F., Zambrano, N., Minopoli, G., Donini, V., Duilio, A., and Russo, T. (1995). The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* *270*, 30853-30856.
- Fossgreen, A., Bruckner, B., Czech, C., Masters, C.L., Beyreuther, K., and Paro, R. (1998). Transgenic *Drosophila* expressing human amyloid precursor protein show gamma-secretase activity and a blistered-wing phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 13703-13708.
- Frade, R., Balbo, M., and Barel, M. (2000). RB18A, whose gene is localized on chromosome 17q12-q21.1, regulates in vivo p53 transactivating activity. *Cancer Res.* *60*, 6585-6589.
- Frank, S.R., Parisi, T., Taubert, S., Fernandez, P., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M., and Amati, B. (2003). MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep.* *4*, 575-580.
- Galloway, P.G., Mulvihill, P., Siedlak, S., Mijares, M., Kawai, M., Padget, H., Kim, R., and Perry, G. (1990). Immunohistochemical demonstration of tropomyosin in the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* *137*, 291-300.
- Gao, Y. and Pimplikar, S.W. (2001). The gamma-secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 14979-14984.
- George, A.J., Holsinger, R.M., McLean, C.A., Laughton, K.M., Beyreuther, K., Evin, G., Masters, C.L., and Li, Q.X. (2004). APP intracellular domain is increased and soluble A $\beta$  is reduced with diet-induced hypercholesterolemia in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* *16*, 124-132.
- Givol, I., Tsarfaty, I., Resau, J., Rulong, S., da Silva, P.P., Nasioulas, G., DuHadaway, J., Hughes, S.H., and Ewert, D.L. (1994). Bcl-2 expressed using a retroviral vector is localized primarily in the nuclear membrane and the endoplasmic reticulum of chicken embryo fibroblasts. *Cell Growth Differ.* *5*, 419-429.
- Golde, T.E., Estus, S., Younkin, L.H., Selkoe, D.J., and Younkin, S.G. (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* *255*, 728-730.
- Goodman, A., Goode, B.L., Matsudaira, P., and Fink, G.R. (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* calponin/transgelin homolog Scp1 functions with fimbrin to regulate stability and organization of the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* *14*, 2617-2629.
- Gourlay, C.W., Carpp, L.N., Timpson, P., Winder, S.J., and Ayscough, K.R. (2004). A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast. *J. Cell Biol.* *164*, 803-809.
- Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P., and Eisenman, R.N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *16*, 653-699.

- Greenwald,I. (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.* *12*, 1751-1762.
- Guenette,S.Y., Chen,J., Jondro,P.D., and Tanzi,R.E. (1996). Association of a novel human FE65-like protein with the cytoplasmic domain of the beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 10832-10837.
- Gunawardena,S. and Goldstein,L.S. (2001). Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron* *32*, 389-401.
- Guo,Q., Fu,W., Xie,J., Luo,H., Sells,S.F., Geddes,J.W., Bondada,V., Rangnekar,V.M., and Mattson,M.P. (1998a). Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nat. Med.* *4*, 957-962.
- Guo,Q., Robinson,N., and Mattson,M.P. (1998b). Secreted beta-amyloid precursor protein counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by activation of NF-kappaB and stabilization of calcium homeostasis. *J. Biol. Chem.* *273*, 12341-12351.
- Guo,Q., Xie,J., Chang,X., Zhang,X., and Du,H. (2001). Par-4 is a synaptic protein that regulates neurite outgrowth by altering calcium homeostasis and transcription factor AP-1 activation. *Brain Res.* *903*, 13-25.
- Guo,Q.M., Malek,R.L., Kim,S., Chiao,C., He,M., Ruffly,M., Sanka,K., Lee,N.H., Dang,C.V., and Liu,E.T. (2000). Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer Res.* *60*, 5922-5928.
- 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 beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat. Med.* *1*, 1291-1296.
- Hardy,J. and Selkoe,D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* *297*, 353-356.
- Hartley,D.M., Walsh,D.M., Ye,C.P., Diehl,T., Vasquez,S., Vassilev,P.M., Teplow,D.B., and Selkoe,D.J. (1999). Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J. Neurosci.* *19*, 8876-8884.
- Heber,S., Herms,J., Gajic,V., Hainfellner,J., Aguzzi,A., Rulicke,T., von Kretschmar,H., von Koch,C., Sisodia,S., Tremml,P., Lipp,H.P., Wolfner,D.P., and Muller,U. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J. Neurosci.* *20*, 7951-7963.
- Herms,J., Anliker,B., Heber,S., Ring,S., Fuhrmann,M., Kretschmar,H., Sisodia,S., and Muller,U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J.* *23*, 4106-4115.
- Heston,L.L., Orr,H.T., Rich,S.S., and White,J.A. (1991). Linkage of an Alzheimer disease susceptibility locus to markers on human chromosome 21. *Am. J. Med. Genet.* *40*, 449-453.
- Ho,A. and Sudhof,T.C. (2004). Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: A candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor

protein cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 2548-2553.

Iijima,K., Ando,K., Takeda,S., Satoh,Y., Seki,T., Itohara,S., Greengard,P., Kirino,Y., Nairn,A.C., and Suzuki,T. (2000). Neuron-specific phosphorylation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein by cyclin-dependent kinase 5. *J. Neurochem.* *75*, 1085-1091.

Ikonen,M., Liu,B., Hashimoto,Y., Ma,L., Lee,K.W., Niikura,T., Nishimoto,I., and 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* *100*, 13042-13047.

Ikura,T., Ogryzko,V.V., Grigoriev,M., Groisman,R., Wang,J., Horikoshi,M., Scully,R., Qin,J., and Nakatani,Y. (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* *102*, 463-473.

Inomata,H., Nakamura,Y., Hayakawa,A., Takata,H., Suzuki,T., Miyazawa,K., and Kitamura,N. (2003). A scaffold protein JIP-1b enhances amyloid precursor protein phosphorylation by JNK and its association with kinesin light chain 1. *J. Biol. Chem.* *278*, 22946-22955.

Kadesch,T. (2000). Notch signaling: a dance of proteins changing partners. *Exp. Cell Res.* *260*, 1-8.

Kamal,A., Almenar-Queralt,A., LeBlanc,J.F., Roberts,E.A., and Goldstein,L.S. (2001). Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* *414*, 643-648.

Kamal,A., Stokin,G.B., Yang,Z., Xia,C.H., and Goldstein,L.S. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* *28*, 449-459.

Kanai,Y. and Endou,H. (2003). Functional properties of multispecific amino acid transporters and their implications to transporter-mediated toxicity. *J. Toxicol. Sci.* *28*, 1-17.

Kanai,Y., Segawa,H., Miyamoto,K., Uchino,H., Takeda,E., and Endou,H. (1998). Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* *273*, 23629-23632.

Khachaturian,Z.S. (1985). Progress of research on Alzheimer's disease. Research opportunities for behavioral scientists. *Am. Psychol.* *40*, 1251-1255.

Khvotchev,M. and Sudhof,T.C. (2004). Proteolytic processing of amyloid-beta precursor protein by secretases does not require cell surface transport. *J. Biol. Chem.* *279*, 47101-47108.

Kim,H.S., Kim,E.M., Kim,N.J., Chang,K.A., Choi,Y., Ahn,K.W., Lee,J.H., Kim,S., Park,C.H., and Suh,Y.H. (2004). Inhibition of histone deacetylation enhances the neurotoxicity induced by the C-terminal fragments of amyloid precursor protein. *J. Neurosci. Res.* *75*, 117-124.

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.

Kim,J.S., Crooks,H., Dracheva,T., Nishanian,T.G., Singh,B., Jen,J., and Waldman,T. (2002). Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res.* 62, 2744-2748.

Kimberly,W.T., Zheng,J.B., Guenette,S.Y., and Selkoe,D.J. (2001). The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like. *J. Biol. Chem.* 276, 40288-40292.

Kinoshita,A., Whelan,C.M., Berezovska,O., and Hyman,B.T. (2002). The gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 28530-28536.

Kojro,E. and Fahrenholz,F. (2005). The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell. Biochem.* 38, 105-127.

Koo,E.H., Sisodia,S.S., Archer,D.R., Martin,L.J., Weidemann,A., Beyreuther,K., Fischer,P., Masters,C.L., and Price,D.L. (1990). Precursor of Amyloid Protein in Alzheimer-Disease Undergoes Fast Anterograde Axonal-Transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 1561-1565.

Koo,E.H. and Squazzo,S.L. (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 269, 17386-17389.

Krajewski,S., Tanaka,S., Takayama,S., Schibler,M.J., Fenton,W., and Reed,J.C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53, 4701-4714.

Kume,H., Maruyama,K., and Kametani,F. (2004). Intracellular domain generation of amyloid precursor protein by epsilon-cleavage depends on C-terminal fragment by alpha-secretase cleavage. *Int. J. Mol. Med.* 13, 121-125.

Lahiri,D.K., Kotwal,G.J., Farlow,M.R., Sima,A., Kupsky,W., Sarkar,F.H., and Sambamurti,K. (2002). The role of the carboxyl-terminal fragments of amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973, 334-339.

Lau,K.F., Miller,C.C., Anderton,B.H., and Shaw,P.C. (1999). Molecular cloning and characterization of the human glycogen synthase kinase-3beta promoter. *Genomics* 60, 121-128.

Le,X.F., Varela,C.R., and Bast,R.C., Jr. (2002). Heregulin-induced apoptosis. *Apoptosis.* 7, 483-491.

Lee,K.W., Ma,L., Yan,X., Liu,B., Zhang,X.K., and Cohen,P. (2005). Rapid Apoptosis Induction by IGFBP-3 Involves an Insulin-like Growth Factor-independent Nucleomitochondrial Translocation of RXR{alpha}/Nur77. *J. Biol. Chem.* 280, 16942-16948.

Leissring,M.A., Akbari,Y., Fanger,C.M., Cahalan,M.D., Mattson,M.P., and LaFerla,F.M. (2000). Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J. Cell Biol.* 149, 793-798.

- 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 physiological signaling role for the gamma-secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 4697-4702.
- Li, R., Lindholm, K., Yang, L.B., Yue, X., Citron, M., Yan, R., Beach, T., Sue, L., Sabbagh, M., Cai, H., Wong, P., Price, D., and Shen, Y. (2004). Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 3632-3637.
- Liao, Y.F., Wang, B.J., Cheng, H.T., Kuo, L.H., and Wolfe, M.S. (2004). Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interferon-gamma stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 49523-49532.
- Lim, L.C., Swendeman, S.L., and Sheffery, M. (1992). Molecular cloning of the alpha-globin transcription factor CP2. *Mol. Cell Biol.* *12*, 828-835.
- Louro, I.D., Bailey, E.C., Li, X., South, L.S., McKie-Bell, P.R., Yoder, B.K., Huang, C.C., Johnson, M.R., Hill, A.E., Johnson, R.L., and Ruppert, J.M. (2002). Comparative gene expression profile analysis of GLI and c-MYC in an epithelial model of malignant transformation. *Cancer Res.* *62*, 5867-5873.
- Lu, D.C., Rabizadeh, S., Chandra, S., Shayya, R.F., Ellerby, L.M., Ye, X., Salvesen, G.S., Koo, E.H., and Bredesen, D.E. (2000). A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nat. Med.* *6*, 397-404.
- Lyden, D., Young, A.Z., Zagzag, D., Yan, W., Gerald, W., O'Reilly, R., Bader, B.L., Hynes, R.O., Zhuang, Y., Manova, K., and Benezra, R. (1999). Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* *401*, 670-677.
- Maciver, S.K. and Harrington, C.R. (1995). Two actin binding proteins, actin depolymerizing factor and cofilin, are associated with Hirano bodies. *Neuroreport* *6*, 1985-1988.
- 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.
- Marlow, L., Cain, M., Pappolla, M.A., and Sambamurti, K. (2003). Beta-secretase processing of the Alzheimer's amyloid protein precursor (APP). *J. Mol. Neurosci.* *20*, 233-239.
- Matsubara, E., Frangione, B., and Ghiso, J. (1995). Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction. *J. Biol. Chem.* *270*, 7563-7567.
- Matsuda, S., Matsuda, Y., and D'Adamio, L. (2003). Amyloid beta protein precursor (AbetaPP), but not AbetaPP-like protein 2, is bridged to the kinesin light chain by the scaffold protein JNK-interacting protein 1. *J. Biol. Chem.* *278*, 38601-38606.
- Matsuda, S., Yasukawa, T., Homma, Y., Ito, Y., Niikura, T., Hiraki, T., Hirai, S., Ohno, S., Kita, Y., Kawasumi, M., Kouyama, K., Yamamoto, T., Kyriakis, J.M., and Nishimoto, I. (2001). c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein-1b/islet-brain-1 scaffolds Alzheimer's amyloid precursor protein with JNK. *J. Neurosci.* *21*, 6597-6607.

- Mattson, M.P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 120-129.
- McCormack, S.J., Weaver, Z., Deming, S., Natarajan, G., Torri, J., Johnson, M.D., Liyanage, M., Ried, T., and Dickson, R.B. (1998). Myc/p53 interactions in transgenic mouse mammary development, tumorigenesis and chromosomal instability. *Oncogene* *16*, 2755-2766.
- McLoughlin, D.M. and Miller, C.C. (1996). The intracellular cytoplasmic domain of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein interacts with phosphotyrosine-binding domain proteins in the yeast two-hybrid system. *FEBS Lett.* *397*, 197-200.
- McPhie, D.L., Coopersmith, R., Hines-Peralta, A., Chen, Y., Ivins, K.J., Manly, S.P., Kozlowski, M.R., Neve, K.A., and Neve, R.L. (2003). DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *J. Neurosci.* *23*, 6914-6927.
- Michel, D., Chabot, J.G., Moysse, E., Danik, M., and Quirion, R. (1992). Possible functions of a new genetic marker in central nervous system: the sulfated glycoprotein-2 (SGP-2). *Synapse* *11*, 105-111.
- Michel, D., Moysse, E., Trembleau, A., Jourdan, F., and Brun, G. (1997). Clusterin/ApoJ expression is associated with neuronal apoptosis in the olfactory mucosa of the adult mouse. *J. Cell Sci.* *110 (Pt 14)*, 1635-1645.
- Minopoli, G., de Candia, P., Bonetti, A., Faraonio, R., Zambrano, N., and Russo, T. (2001). The beta-amyloid precursor protein functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* *276*, 6545-6550.
- Miyagishi, M., Fujii, R., Hatta, M., Yoshida, E., Araya, N., Nagafuchi, A., Ishihara, S., Nakajima, T., and Fukamizu, A. (2000). Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating beta-catenin with CBP/p300. *J. Biol. Chem.* *275*, 35170-35175.
- Mohajeri, M.H., Saini, K.D., and Nitsch, R.M. (2004). Transgenic BACE expression in mouse neurons accelerates amyloid plaque pathology. *J. Neural Transm.* *111*, 413-425.
- Morgenstern, J.P. and Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* *18*, 3587-3596.
- Morin, P.J., Abraham, C.R., Amaratunga, A., Johnson, R.J., Huber, G., Sandell, J.H., and Fine, R.E. (1993). Amyloid precursor protein is synthesized by retinal ganglion cells, rapidly transported to the optic nerve plasma membrane and nerve terminals, and metabolized. *J. Neurochem.* *61*, 464-473.
- Muller, U. and Kins, S. (2002). APP on the move. *Trends Mol. Med.* *8*, 152-155.
- Muresan, Z. and Muresan, V. (2004). A phosphorylated, carboxy-terminal fragment of beta-amyloid precursor protein localizes to the splicing factor compartment. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 475-488.
- Norenberg, M.D. (1994). Astrocyte responses to CNS injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *53*, 213-220.

- Nunan, J., Shearman, M.S., Checler, F., Cappai, R., Evin, G., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Small, D.H. (2001). The C-terminal fragment of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor is degraded by a proteasome-dependent mechanism distinct from gamma-secretase. *Eur. J. Biochem.* *268*, 5329-5336.
- Nunan, J., Williamson, N.A., Hill, A.F., Sernee, M.F., Masters, C.L., and Small, D.H. (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.* *74*, 378-385.
- Oishi, M., Nairn, A.C., Czernik, A.J., Lim, G.S., Isohara, T., Gandy, S.E., Greengard, P., and Suzuki, T. (1997). The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid precursor protein is phosphorylated at Thr654, Ser655, and Thr668 in adult rat brain and cultured cells. *Mol. Med.* *3*, 111-123.
- Panin, V.M. and Irvine, K.D. (1998). Modulators of Notch signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* *9*, 609-617.
- Patel, J.H., Du, Y., Ard, P.G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C.J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P.M., Lane, W.S., Blobel, G.A., and McMahon, S.B. (2004). The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol. Cell Biol.* *24*, 10826-10834.
- Perkinton, M.S., Standen, C.L., Lau, K.F., Kesavapany, S., Byers, H.L., Ward, M., McLoughlin, D.M., and Miller, C.C. (2004). The c-Abl tyrosine kinase phosphorylates the Fe65 adaptor protein to stimulate Fe65/amyloid precursor protein nuclear signaling. *J. Biol. Chem.* *279*, 22084-22091.
- Pietrzik, C.U., Busse, T., Merriam, D.E., Weggen, S., and Koo, E.H. (2002). The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *EMBO J.* *21*, 5691-5700.
- Pietrzik, C.U., Yoon, I.S., Jaeger, S., Busse, T., Weggen, S., and Koo, E.H. (2004). FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* *24*, 4259-4265.
- Qiu, P. and Li, L. (2002). Histone acetylation and recruitment of serum responsive factor and CREB-binding protein onto SM22 promoter during SM22 gene expression. *Circ. Res.* *90*, 858-865.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A., and Dynlacht, B.D. (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev.* *16*, 245-256.
- Rensink, A.A., Gellekink, H., Otte-Holler, I., ten Donkelaar, H.J., de Waal, R.M., Verbeek, M.M., and Kremer, B. (2002). Expression of the cytokine leukemia inhibitory factor and pro-apoptotic insulin-like growth factor binding protein-3 in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl)* *104*, 525-533.
- Rice, D.S. and Curran, T. (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci.* *24*, 1005-1039.

- Ricort,J.M., Lombet,A., Lassarre,C., and Binoux,M. (2002). Insulin-like growth factor binding protein-3 increases intracellular calcium concentrations in MCF-7 breast carcinoma cells. *FEBS Lett.* 527, 293-297.
- Roncarati,R., Sestan,N., Scheinfeld,M.H., Berechid,B.E., Lopez,P.A., Meucci,O., McGlade,J.C., Rakic,P., and D'Adamio,L. (2002). The gamma-secretase-generated intracellular domain of beta-amyloid precursor protein binds Numb and inhibits Notch signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7102-7107.
- Sabo,S.L., Ikin,A.F., Buxbaum,J.D., and Greengard,P. (2001). The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J. Cell Biol.* 153, 1403-1414.
- Santiard-Baron,D., Langui,D., Delehedde,M., Delatour,B., Schombert,B., Touchet,N., Tremp,G., Paul,M.F., Blanchard,V., Sergeant,N., Delacourte,A., Duyckaerts,C., Pradier,L., and 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, 330-338.
- Sastre,M., Steiner,H., Fuchs,K., Capell,A., Multhaup,G., Condron,M.M., Teplow,D.B., and Haass,C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep.* 2, 835-841.
- Sastre,M., Turner,R.S., and Levy,E. (1998). X11 interaction with beta-amyloid precursor protein modulates its cellular stabilization and reduces amyloid beta-protein secretion. *J. Biol. Chem.* 273, 22351-22357.
- 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., and . (1993). Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet* 342, 710-711.
- Scheinfeld,M.H., Roncarati,R., Vito,P., Lopez,P.A., Abdallah,M., and D'Adamio,L. (2002). Jun NH2-terminal kinase (JNK) interacting protein 1 (JIP1) binds the cytoplasmic domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein (APP). *J. Biol. Chem.* 277, 3767-3775.
- 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.
- Selkoe,D.J. (1994). Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 489-517.
- Selkoe,D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 81, 741-766.
- Selkoe,D.J., Podlisny,M.B., Joachim,C.L., Vickers,E.A., Lee,G., Fritz,L.C., and Oltersdorf,T. (1988). Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 7341-7345.
- Shen,L., Dean,N.M., and Glazer,R.I. (1999). Induction of p53-dependent, insulin-like growth factor-binding protein-3-mediated apoptosis in glioblastoma multiforme cells by a protein kinase Calpha antisense oligonucleotide. *Mol. Pharmacol.* 55, 396-402.

- Sherrington,R., Rogaev,E.I., Liang,Y., Rogaeva,E.A., Levesque,G., Ikeda,M., Chi,H., Lin,C., Li,G., Holman,K., and . (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* *375*, 754-760.
- Shiio,Y., Donohoe,S., Yi,E.C., Goodlett,D.R., Aebersold,R., and Eisenman,R.N. (2002). Quantitative proteomic analysis of Myc oncoprotein function. *EMBO J.* *21*, 5088-5096.
- Soengas,M.S., Alarcon,R.M., Yoshida,H., Giaccia,A.J., Hakem,R., Mak,T.W., and Lowe,S.W. (1999). Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* *284*, 156-159.
- Standen,C.L., Brownlees,J., Grierson,A.J., Kesavapany,S., Lau,K.F., McLoughlin,D.M., and Miller,C.C. (2001). Phosphorylation of thr(668) in the cytoplasmic domain of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein by stress-activated protein kinase 1b (Jun N-terminal kinase-3). *J. Neurochem.* *76*, 316-320.
- Stanelle,J., Stiewe,T., Theseling,C.C., Peter,M., and Putzer,B.M. (2002). Gene expression changes in response to E2F1 activation. *Nucleic Acids Res.* *30*, 1859-1867.
- Steiner,H. and Haass,C. (2000). Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 217-224.
- Storey,E., Beyreuther,K., and Masters,C.L. (1996). Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components. *Brain Res.* *735*, 217-231.
- Strittmatter,W.J., Saunders,A.M., Schmechel,D., Pericak-Vance,M., Enghild,J., Salvesen,G.S., and Roses,A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 1977-1981.
- Struhl,G. and Adachi,A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol. Cell* *6*, 625-636.
- Sturchler-Pierrat,C. and Staufienbiel,M. (2000). Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *920*, 134-139.
- Takemaru,K.I. and Moon,R.T. (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J. Cell Biol.* *149*, 249-254.
- Tanahashi,H. and Tabira,T. (1999). X11L2, a new member of the X11 protein family, interacts with Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *255*, 663-667.
- Telese,F., Bruni,P., Donizetti,A., Gianni,D., D'Ambrosio,C., Scaloni,A., Zambrano,N., Rosenfeld,M.G., and Russo,T. (2005). Transcription regulation by the adaptor protein Fe65 and the nucleosome assembly factor SET. *EMBO Rep.* *6*, 77-82.
- Terman,J.R., Mao,T., Pasterkamp,R.J., Yu,H.H., and Kolodkin,A.L. (2002). MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell* *109*, 887-900.

- Thomas-Tikhonenko,A., Viard-Leveugle,I., Dews,M., Wehrli,P., Seignani,C., Yu,D., Ricci,S., el Deiry,W., Aronow,B., Kaya,G., Saurat,J.H., and French,L.E. (2004). Myc-transformed epithelial cells down-regulate clusterin, which inhibits their growth in vitro and carcinogenesis in vivo. *Cancer Res.* *64*, 3126-3136.
- 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.
- Trommsdorff,M., Borg,J.P., Margolis,B., and Herz,J. (1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* *273*, 33556-33560.
- Turner,P.R., O'Connor,K., Tate,W.P., and Abraham,W.C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* *70*, 1-32.
- Van Gool,D., Carmeliet,G., Triau,E., Cassiman,J.J., and Dom,R. (1994). Appearance of localized immunoreactivity for the alpha 4 integrin subunit and for fibronectin in brains from Alzheimer's, Lewy body dementia patients and aged controls. *Neurosci. Lett.* *170*, 71-73.
- von Koch,C.S., Zheng,H., Chen,H., Trumbauer,M., Thinakaran,G., van der Ploeg,L.H., Price,D.L., and Sisodia,S.S. (1997). Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging* *18*, 661-669.
- 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.
- Walsh,D.M., Fadeeva,J.V., Lavoie,M.J., Paliga,K., Eggert,S., Kimberly,W.T., Wasco,W., and Selkoe,D.J. (2003). gamma-Secretase cleavage and binding to FE65 regulate the nuclear translocation of the intracellular C-terminal domain (ICD) of the APP family of proteins. *Biochemistry* *42*, 6664-6673.
- Watson,J.D., Oster,S.K., Shago,M., Khosravi,F., and Penn,L.Z. (2002). Identifying genes regulated in a Myc-dependent manner. *J. Biol. Chem.* *277*, 36921-36930.
- Wells,J., Yan,P.S., Cechvala,M., Huang,T., and Farnham,P.J. (2003). Identification of novel pRb binding sites using CpG microarrays suggests that E2F recruits pRb to specific genomic sites during S phase. *Oncogene* *22*, 1445-1460.
- Willem,M., Dewachter,I., Smyth,N., Van Dooren,T., Borghgraef,P., Haass,C., and Van Leuven,F. (2004). beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 increases amyloid deposition in brain parenchyma but reduces cerebrovascular amyloid angiopathy in aging BACE x APP[V717I] double-transgenic mice. *Am. J. Pathol.* *165*, 1621-1631.
- Xu,X., Yang,D., Wyss-Coray,T., Yan,J., Gan,L., Sun,Y., and Mucke,L. (1999). Wild-type but not Alzheimer-mutant amyloid precursor protein confers resistance against p53-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 7547-7552.

- 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.
- Yoshikai,S., Sasaki,H., Dohura,K., Furuya,H., and Sakaki,Y. (1990). Genomic Organization of the Human Amyloid Beta-Protein Precursor Gene. *Gene* 87, 257-263.
- Yu,C., Kim,S.H., Ikeuchi,T., Xu,H., Gasparini,L., Wang,R., and Sisodia,S.S. (2001). Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment gamma. Evidence for distinct mechanisms involved in gamma -secretase processing of the APP and Notch1 transmembrane domains. *J. Biol. Chem.* 276, 43756-43760.
- Zambrano,N., Bruni,P., Minopoli,G., Mosca,R., Molino,D., Russo,C., Schettini,G., Sudol,M., and Russo,T. (2001). The beta-amyloid precursor protein APP is tyrosine-phosphorylated in cells expressing a constitutively active form of the Abl protooncogene. *J. Biol. Chem.* 276, 19787-19792.
- Zhao,Q. and Lee,F.S. (2003). The transcriptional activity of the APP intracellular domain-Fe65 complex is inhibited by activation of the NF-kappa B pathway. *Biochemistry* 42, 3627-3634.
- Zheng,P., Eastman,J., Vande,P.S., and Pimplikar,S.W. (1998). PAT1, a microtubule-interacting protein, recognizes the basolateral sorting signal of amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 14745-14750.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ACTA2	Actin, alpha 2
AICD	Amyloid precursor protein intracellular domain
AK	Antikörper
APP	Amyloid precursor protein
APS	Amoniumperoxodisulfat
Aβ	Amyloid β
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2, Bcl-x <sub>L</sub>	B-cell lymphoma 2
BSA	bovines Serumalbumin
β-Gal	β-Galaktosidase
ca.	circa
Caspase	Cysteinyl Aspartate-spezifische Proteasen
Csl	CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1
CBP	CREBBP
CLU	Clusterin, Apolipoprotein J
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxyd
Dox	Doxyzyklin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FAD	familiar Alzheimer disease
FCS	fötales Kälberserum
FE65	Amyloid beta A4 precursor protein-binding, family B, member 1
FN1	Fibronectin 1
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
g	Gramm
GADPH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
GSK3β	Glycogen synthetase Kinase 3β
h	Stunde(n)
HAT	Histone acetyl transferase
HDAC3	Histon deacetylase 3
HRP	Peroxidase aus Rettich
ID3	Inhibitor of DNA binding 3
IDE	Insulin degrading enzyme
IGF-I	Insulin growth factor I
IGFBP3	Insulin-growth-factor-binding-protein 3
Ipaf	ICE Protease-activating factor
JIP1	Mitogen-activated protein Kinase 8-interacting protein 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KAI1	Tumor suppressor gene Kai 1
l	Liter
Lsg.	Lösung
m	milli
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Mena	Mammalian enabled
MICAL2	Flavoprotein oxidoreductase MICAL2

mDab1	Mammalian disabled 1
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
N-CoR	Nuclear receptor-corepressor
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NGF	Nerve growth factor
nm	Nanometer
NRG1	Neuregulin 1
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAT1	Protein interacting with APP
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	pH-Wert, Wasserstoffionenkonzentration
PRKC	Prostate apoptosis response protein 4, Par-4
PS1	Presenilin-1
RAB3B	Ras-associated protein
RPMI	Roslind Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat, Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SERCA2B	Sarco- and endoplasmatic calcium transporter 2B
ShcA	Shc transforming protein
SLC7A5	Solute carrier family 7, member 5
TAB2	Mitogen-aktivated protein kinase kinase kinase 7-interacting protein 2
TAGLN	Transgelin
TAU (MAPT)	Mikrotubule associated protein TAU
Tip60	Tat interacting protein 60 kDa
TPM1	Tropomyosin 1
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Tdt-mediated dUTP Nick-End labeling
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand
V	Volt
Vol	Volumen
X11/Mint1	Amyloid beta A4 precursor protein-binding, family A, member 1
z.B.	zum Beispiel

**Anhang****Lebenslauf**

## Persönliche Daten

---

Name:	Thorsten Müller
Geburtsdatum/-ort:	11.03.1975 in Hamm/Westfalen
Familienstand:	ledig
Mutter:	Monika Müller, geb. Löffler
Vater:	Walter Müller

## Promotionsstudiengang

---

SS 2004 - WS 2004/05	Promotionsstudiengang an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
----------------------	---

## Hochschulausbildung

---

seit 08/2001	Promotion am Institut für Neuropathologie, Westfälische–Wilhelms Universität Münster unter der Anleitung von Prof. Dr. A. Püschel und Prof. Dr. R. Egensperger
10/1995 – 08/2000	Studium der Umweltschutztechnik, Universität Stuttgart Diplomarbeit „Grundlagen der Entwicklung einer Gensonde zum Nachweis Methylethylketon abbauender Bakterien in industriellen Biofiltern“ Abschluß: Dipl.-Ing. Umweltschutztechnik, 4.08.2000

## Tätigkeiten

---

01/2001 – 07/2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Neurobiochemie, Universität Witten
-------------------	---

## Schulausbildung

---

1981 – 1985	Grundschule in Hamm/Westf.
1985 – 1995	Gymnasium in Hamm/Westf. Abitur am 12.06.1995 in Hamm/Westf.

.....  
(Unterschrift)

## Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Rupert Egensperger, dass ich diese Arbeit unter seiner Leitung durchführen konnte sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens. Vielen Dank für viele kritische, fachliche Diskussionen und das stetige Engagement, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat. Ich danke ebenfalls für die freundschaftlichen Gespräche sowie für einige viel zu schnelle Aasee-Runden.

Prof. Dr. Andreas Püschel danke ich für die Betreuung meiner Arbeit und die Übernahme des Erstgutachtens.

Prof. Dr. Angelika Barnekow danke ich für die Übernahme des Drittgutachtens.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Jochen Prehn dafür, dass ich einen Teil meiner Arbeit in seinen Laboren durchführen konnte, für seine kritische Diskussion und Anregungen.

Dr. Donat Kögel danke ich für die fachliche Unterstützung und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei der Ag Eg für die stets freundliche Atmosphäre im Labor und im viel zu engen Büro mit völlig überladenen Wandregalen. Susanne Peetz-Dienhart danke ich für die hervorragende technische Unterstützung, ihre Versorgung mit Doppel-Kekschen, Schokolade und anderer Leckereien sowie ihre Geschichten aus dem Leben einer Großfamilie. Anca-Laura Tirniceriu danke ich für die fachlichen und freundschaftlichen Gespräche, nächtliches Ausschalten des real-time PCR Geräts und die Einführung in die rumänische Lebensart.

Birgit Heuer danke ich für viele nette Stunden und offenherzige Gespräche im Labor und zwischen Tür und Angel.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie gilt mein Dank für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft meiner Arbeit.

Ebenfalls bedanke ich mich bei meinen Eltern, Monika und Walter Müller, für die Unterstützung und Motivation bei meiner Arbeit und hoffe, dass ich Ihnen eine Antwort auf die Frage „Was macht die Forschung“ nicht schuldig geblieben bin.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Freundin Claudia Hömme für ihre Liebe, Motivation und fachliche Diskussion, mit der sie mich während meiner Arbeit begleitet hat, sowie für viele andere Dinge des Lebens.

Danke!