

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Christian Haass

**UNTERSUCHUNG DER TRANSPORTREGULATION DES
 γ -SEKRETASE-KOMPLEXES ANHAND SEINER
UNTEREINHEIT PEN2**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johanna Scheuermann

aus

Starnberg

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Haass

Zweite Berichterstatterin: Priv. Doz. Dr. Katharina Bürger

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Nils Peters

Priv. Doz. Dr. Markus J. Schwarz

Mitbetreuung durch den promovierten

Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Christoph Kaether

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

Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2010

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Kaether C., J. Scheuermann, M. Fassler, S. Zilow, K. Shirotani, C. Valkova, B. Novak, S. Kacmar, H. Steiner, and C. Haass:

Endoplasmic reticulum retention of the γ -secretase complex component Pen2 by Rer1
EMBO rep. 8:743-748. 2007.

Diese Publikation ist der Arbeit im Anhang beigelegt.

Meinen Eltern

Hinter jeder Ecke lauern ein paar Richtungen.

Stanislaw Jerzy Lec

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I	EINLEITUNG 11
I.1	Epidemiologische Bedeutung der Demenz vom Alzheimer-Typ 11
I.2	Klinische Symptomatik der Alzheimer-Demenz 13
I.3	Makroskopische und histopathologische Befunde bei der Demenz vom Alzheimer-Typ 14
I.4	Molekulare und genetische Grundlagen der Alzheimer-Demenz 18
I.4.1	Das Amyloid-Vorläufer-Protein 22
I.4.2	Proteolytische Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins 23
I.4.3	Die α -Sekretase 26
I.4.4	Die β -Sekretase 27
I.4.5	Die γ -Sekretase 29
I.4.5.1	Beteiligung der γ -Sekretase an der Notch-Signaltransduktion 30
I.4.5.2	Die Preseniline 32
I.4.5.3	Der γ -Sekretase-Komplex 34
I.4.5.4	Funktionen von und Interaktionen zwischen den weiteren Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes 36
I.4.5.5	Assemblierung und Transport des γ -Sekretase-Komplexes 37
I.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit: Überprüfung eines hypothetischen Modells zur Regulation von Assemblierung, Transport und Aktivität der γ -Sekretase 39
II	MATERIAL UND METHODEN 42
II.1	Rekombinante DNA-Techniken 42
II.1.1	Geräte 42
II.1.2	Konstrukte und Klonierungen 42
II.1.2.1	Vektoren 42
II.1.2.2	Vorhandene DNA-Konstrukte 42
II.1.2.3	Hergestellte DNA-Konstrukte 43
II.1.3	PCR und Klonierungsstrategien 44
II.1.3.1	Reaktionsansatz der PCRs 44

II.1.3.2	Verwendete Oligonukleotide	44
II.1.3.3	Reaktionsprogramm für PCRs	48
II.1.3.4	Verarbeitung der PCR-Produkte	48
II.1.3.5	Einführung von Punktmutationen und Oligonukleotid- mutationen	49
II.1.3.6	Austausch der CD4-Transmembrandomäne gegen die erste Pen2-Transmembrandomäne zur Herstellung der CD4- TM1 _{Pen2} -Chimäre	50
II.1.3.7	Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pCR2.1- TOPO	51
II.1.4	Reinigung und Analyse von DNA	51
II.1.4.1	Agarosegelelektrophorese	51
II.1.4.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	52
II.1.4.3	Reinigung von DNA-Fragmenten	52
II.1.5	Enzymatische Modifikationen von DNA	52
II.1.5.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	52
II.1.5.2	Ligation von DNA	53
II.1.6	Transformation von <i>Escherichia coli</i> und Plasmidpräparation	53
II.1.6.1	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	53
II.1.6.2	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	54
II.1.6.3	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab („Miniprep“)	54
II.1.6.4	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab („Maxiprep“)	54
II.1.6.5	Screening positiver Klone und Sequenzierung von Konstrukten	55
II.2	Zellkultur und Zelllinien	55
II.2.1	Geräte und Materialien	55
II.2.2	Verwendete und hergestellte Zelllinien	56
II.2.3	Kultivierung der Zellen	57
II.2.3.1	Medien und Lösungen	57
II.2.3.2	Durchführung	57
II.2.4	Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)	58

II.2.5	Transiente und stabile Transfektion von Zellen mit rekombinanter DNA	58
II.2.6	Nachweis der exogenen Proteinexpression in transfizierten Zellen	58
II.3	Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie	59
II.3.1	Geräte und Materialien	59
II.3.2	Erstellung eines Immunfluoreszenzpräparates	59
II.3.2.1	Lösungen	59
II.3.2.2	Interne Fluoreszenzfärbung	59
II.3.2.3	Oberflächenimmunfluoreszenz	60
II.3.2.4	Lebendzellmikroskopie	60
II.4	Antikörper	60
II.4.1	Übersicht über die primären Antikörper	60
II.4.1.1	Monoklonale Antikörper	60
II.4.1.2	Polyklonale Antikörper	61
II.4.2	Übersicht über die sekundären Antikörper	62
II.5	Proteinbiochemie	62
II.5.1	Geräte und Materialien	62
II.5.2	Gewinnung von Proteinextrakten	64
II.5.2.1	Gesamtproteinextrakt	64
II.5.2.2	Membranproteinextrakt	64
II.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration und der Gesamtproteinmenge	65
II.5.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration durch Messung der UV-Absorption	65
II.5.3.2	Bestimmung der Gesamtproteinmenge mit der Methode nach Bradford	65
II.5.4	Immunpräzipitation von Proteinen	65
II.5.5	Nachweis und Analyse von Proteinen	67
II.5.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung	67
II.5.5.2	Blue-Native-Gelelektrophorese	69
II.5.5.3	Transfer und immunchemischer Nachweis von Proteinen	69
II.5.6	„Strippen“ von Western-Blot-Membranen	71

II.5.7	Proteineluierung aus Sepharosebeads	71
II.5.8	Analyse der Glykosylierung von Proteinen	71
II.5.9	Oberflächenbiotinylierung	72
III	ERGEBNISSE	73
III.1	Nicht assembliertes Pen2 wird im Endoplasmatischen Retikulum retiniert	73
III.2	Die erste Transmembrandomäne (TM1) von Pen2 enthält ein ER-Retentionsmotiv	75
III.3.	Der distale Teil der TM1 und drei benachbarte Aminosäuren vermitteln die Retention im ER	80
III.4	Ein konservierter Asparaginrest in der TM1 wird für die ER-Retention benötigt	86
III.5	Das identifizierte Retentionsmotiv scheint spezifisch für Pen2 zu sein	89
III.6	GFP-Pen2TM1 _{mut} und GFP-Pen2N33L werden weniger im ER zurückgehalten als GFP-Pen2	90
III.7	CD4-TM1 _{Pen2} interagiert nicht mit anderen γ -Sekretase-Komponenten	93
III.8	Die TM1 von Pen2 ist essentiell für die Maturierung und Aktivität des γ -Sekretase-Komplexes	95
III.8.1	Mutation der TM1 von Pen2 führt zu herabgesetzter Maturierung von Nct sowie Akkumulation von PS1-Holoprotein und den Substraten APP-CTF α und β	95
III.8.2	Pen2 mit Mutation der TM1 assembliert nicht in γ -Sekretase-Komplexe	98
IV	DISKUSSION	100
IV.1	ER-Retention von nicht in den γ -Sekretase-Komplex assemblierten Pen2-Molekülen	100
IV.2	Der Einsatz von CD4 und TNF α als Reporterproteine zur Untersuchung der Transporteigenschaften von Pen2	101
IV.3	Identifizierung eines Retentionssignals in Pen2	102

Inhalt		- 10 -
IV.4	Untersuchung der Rolle spezifischer Aminosäurenreste im Rahmen der Retention	103
IV.5	Das hier identifizierte Transportsignal ist in seiner Signalsequenz spezifisch für Pen2, könnte jedoch von einem allgemeineren Rezeptor erkannt werden	104
IV.6	Mögliche Mechanismen zum Einfluss der Pen2-TM1 auf Assemblierung und Aktivität der γ -Sekretase	106
IV.7	Mögliche Experimente zur Unterscheidung zwischen den vorangegangenen Hypothesen	108
IV.8	Verbessertes Modell zu Assemblierung, Transport und Aktivitätsregulierung der γ -Sekretase	109
IV.8.1	Bestätigung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Hypothese und Verfeinerung des bestehenden Modells zu Assemblierung, Transport und Aktivitätsregulierung der γ -Sekretase	109
IV.8.2	Mögliche therapeutische Verwendung der Ergebnisse dieser Arbeit	111
IV.8.3	Relevanz der hier präsentierten Ergebnisse für nachfolgende Arbeiten/ Publikation	112
V	ZUSAMMENFASSUNG	115
VI	LITERATUR	116
VII	ANHANG	135
VII.1	Abkürzungsverzeichnis	135
VII.2	Abbildungsverzeichnis	139
VII.3	Tabellenverzeichnis	141
VII.4	Curriculum Vitae	142
VII.5	Schriftenverzeichnis	143
VII.6	Dank	144
VII.7	Publikation	146

I EINLEITUNG

Diese Arbeit untersucht, wie die Assemblierung, der Transport und letztlich die Aktivität der γ -Sekretase, einem bei der molekularen Entstehung der Alzheimer-Demenz entscheidend involvierten Enzymkomplex, reguliert werden.

I. 1 EPIDEMIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER DEMENZ VOM ALZHEIMER-TYP

Als der Münchner Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer (Abb. I.1) zu Beginn des letzten Jahrhunderts die später nach ihm benannte Demenz vom Alzheimer-Typ (Synonym: Alzheimer-Demenz) beschrieb, handelte es sich dabei noch um eine sehr seltene Erkrankung. Heute macht die Demenz vom Alzheimer-Typ mit einem Anteil von etwa 72% den weltweit größten Anteil aller Demenzen aus und ist gleichzeitig die Hauptursache des starken Inzidenzanstiegs von Demenzen im höheren Lebensalter [Ott *et al.*, 1995; Selkoe, 2001].

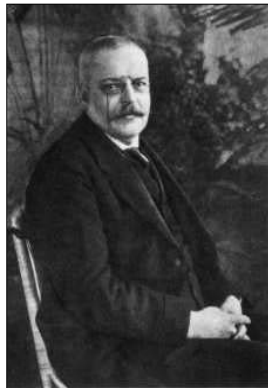


Abbildung I.1: Alois Alzheimer.
(Fotografie) [Abbildung aus Webpath 1]

Betrachtet man die gegenwärtigen Statistiken zur Gesamtheit aller Demenzen, so gibt es heute weltweit insgesamt etwa 24,3 Millionen dementer Patienten. Die jährliche Inzidenz liegt bei 4,6 Millionen, anschaulich formuliert erkrankt also weltweit alle sieben Sekunden ein Mensch an einer Demenz [Ferri *et al.*, 2005]. Abb. I.2 zeigt die Prävalenz und Inzidenz von Demenzerkrankungen in Deutschland in Abhängigkeit vom Lebensalter.

Die Inzidenz sowohl der Demenzen im allgemeinen wie auch der Demenz vom Alzheimer-Typ im besonderen wächst beinahe exponentiell mit steigendem Alter. Dies bedeutet, dass sich der prozentuale Anteil der an der Alzheimer-Demenz erkrankten Patienten in einer

gegebenen Altersgruppe ab dem 60. Lebensjahr etwa alle fünf Jahre verdoppelt. So sind etwa 1 % aller 60-Jährigen und 30 % aller 80-Jährigen erkrankt [Jorm *et al.*, 1991].

Das Inzidenzmaximum wird bei etwa 85 bis 90 Jahren erreicht, um sich dann bei den sehr alten Menschen wieder zu verringern [Miech *et al.*, 2002] (vgl. Abb. I.2). Man kann daher feststellen, dass das Lebensalter der bedeutendste Risikofaktor für die Erkrankung an der Alzheimer-Demenz ist [Bertram und Tanzi, 2005]. Dies gilt in erster Linie für die sporadischen Formen, welche mit etwa 90 bis 95% der Fälle unter den Alzheimer-Demenzen die weitaus größte Gruppe darstellen. 5 bis 10% der Erkrankungen lassen sich dagegen auf genetische Ursachen zurückführen, welche damit den zweitgrößten Risikofaktor für die Alzheimer-Demenz darstellen [Haass und Steiner, 2002; Bertram und Tanzi, 2005].

Da es bis heute keine Heilungsmöglichkeit für die Erkrankung gibt und auch die existierenden supportiven Therapieansätze nur geringfügig das Voranschreiten der Demenz verzögern können [Poeck und Hacke, 2001; Selkoe und Schenk, 2002], stellt sich sowohl aus medizinischen wie auch aus sozioökonomischen Gründen die dringende Aufgabe der Entwicklung wirksamerer therapeutischer Konzepte. Sollte dies nicht gelingen, würde sich angesichts der für Deutschland prognostizierten Bevölkerungsentwicklung die Zahl der Krankheitsfälle hierzulande pro Jahr um etwa 20.000 Patienten erhöhen, sich bis zum Jahr 2050 gegenüber der heutigen Prävalenz mehr als verdoppeln und dann die prekäre Anzahl von etwa 2 Millionen Patienten umfassen [Bickel, 2001]. Für die Entwicklung wirksamer präventiver und therapeutischer Maßnahmen ist es notwendig, die der Erkrankung zugrundeliegenden molekularen und zellulären Pathomechanismen exakt zu charakterisieren und zu verstehen.

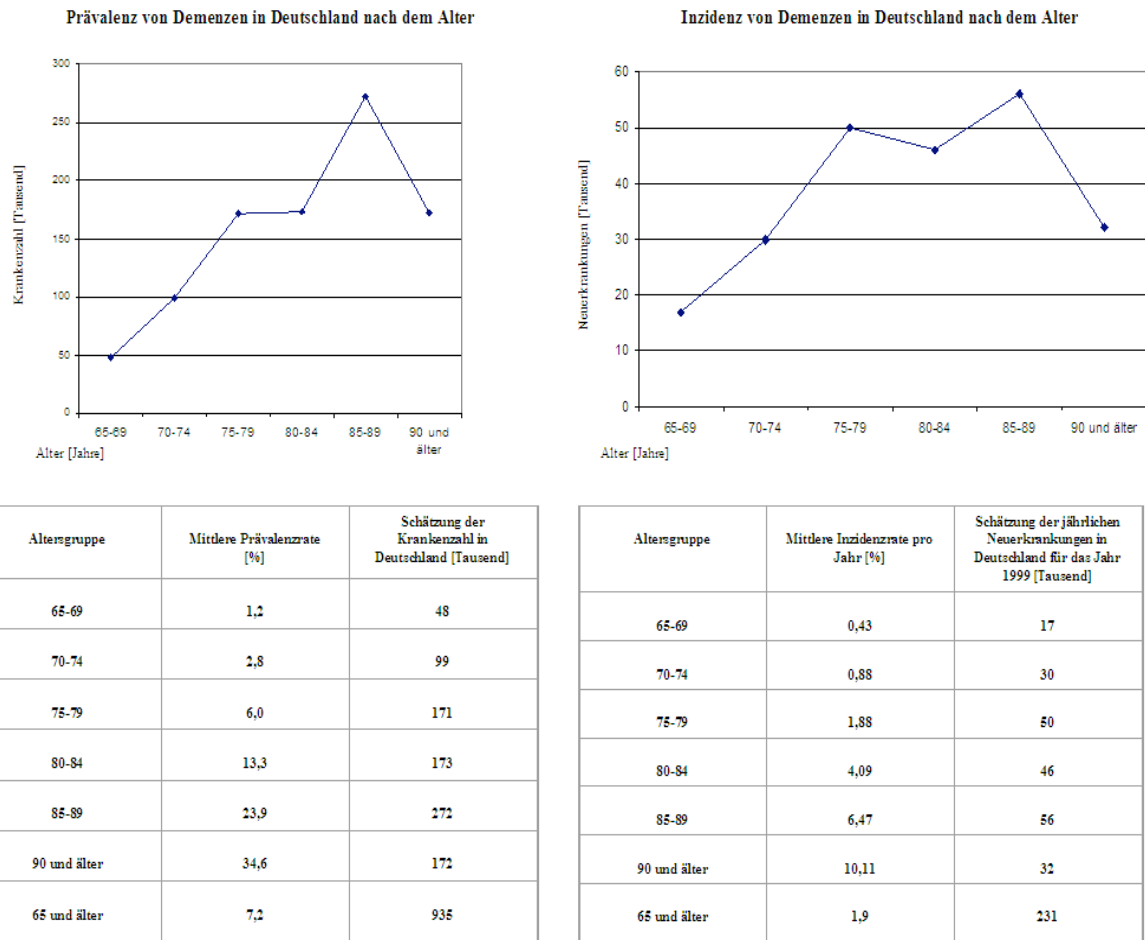


Abbildung I.2: Inzidenz und Prävalenz von Demenzen in Deutschland in Abhängigkeit vom Lebensalter. Nach [Bickel, 2000].

I. 2 KLINISCHE SYMPTOMATIK DER ALZHEIMER-DEMENZ

Die klinischen Symptome vermehren sich im Verlauf der Erkrankung in bezug auf Schwere und Anzahl. Zu den frühesten Veränderungen gehören Störungen der Merkfähigkeit und höherer kognitiver Funktionen. Im Verlauf der Erkrankung kommen Defizite der zeitlichen, örtlichen und in weit fortgeschrittenen Fällen der persönlichen Orientierung hinzu. Bei vielen Patienten findet man neuropsychologische Symptome wie Aphasie, Apraxie und visuospatielle Störungen. Die Stimmungslage ist sowohl in früheren wie auch in späteren Stadien häufig depressiv verändert, wodurch klinischerseits mitunter Probleme der diagnostischen Abgrenzung gegenüber einer isolierten Depression bestehen [Selkoe, 2001; Poeck und Hacke, 2001]. Die genannten Befunde zusammenfassend lässt sich feststellen, dass

die Alzheimer-Demenz im fortgeschrittenen Stadium nicht nur die Ausübung fast jeglicher alltäglichen Tätigkeit verhindert und somit zu dringender Pflegebedürftigkeit führt, sondern den Patienten auch durch Erschwerung des zwischenmenschlichen Kontaktes von seiner sozialen Umwelt nahezu völlig isolieren kann – eine Situation, die sowohl für den betroffenen Patienten wie auch für pflegende Angehörige eine gravierende Belastung darstellt. Abb. I.3 zeigt eine Fotografie von Auguste D., der ersten beschriebenen Alzheimer-Patientin.



Abbildung I.3: Auguste D., die erste beschriebene Alzheimer-Patientin (Fotografie) [Maurer und Maurer, 1998].

I. 3 MAKROSKOPISCHE UND HISTOPATHOLOGISCHE BEFUNDE BEI DER DEMENZ VOM ALZHEIMER-TYP

Betrachtet man das Gehirn eines Alzheimer-Patienten makroskopisch bei der postmortalen Autopsie, so ist schon äußerlich eine kortikale Atrophie mit Verschmälerung und Abflachung der Gyri und Verbreiterung der Sulci auffällig. Ebenfalls als Ausdruck der Atrophie findet man vergrößerte Ventrikelräume und eine allgemein verringerte Hirnmasse. Besonders ausgeprägt sind die Befunde oft im Frontal- und im Temporallappen, wobei in der Regel unter anderem die an Gedächtnisprozessen in essentieller Weise beteiligten Strukturen Hippocampus und limbisches System betroffen sind [Böcker *et al.*, 2004]. Abb. I.4 und I.5 zeigen die erwähnten Veränderungen anhand makroskopischer Hirnpräparate verstorbener gesunder Probanden und an der Alzheimer-Demenz erkrankter Patienten.

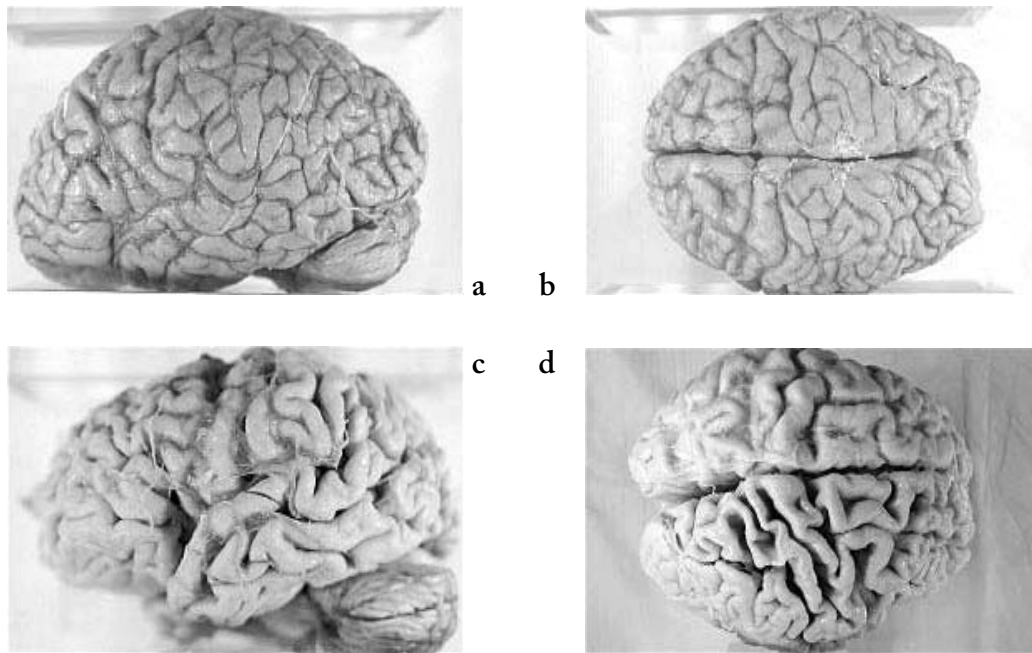


Abbildung I.4: Oberfläche des Gehirns eines Alzheimer-Patienten im Vergleich mit dem Gehirn einer gesunden älteren Kontrollperson.

Oben das Gehirn einer gesunden Kontrollperson (a: von temporal, b: von kranial), unten das eines Alzheimer-Patienten (c: von temporal, d: von kranial). Die Arachnoidea mater cerebri ist teilweise *in situ* belassen. Als Zeichen der kortikalen Atrophie infolge der Alzheimer-Demenz sind eine Verbreiterung der Sulci und eine Verschmälerung der Gyri erkennbar (Fotografie) [Abbildungen aus Webpath 2].

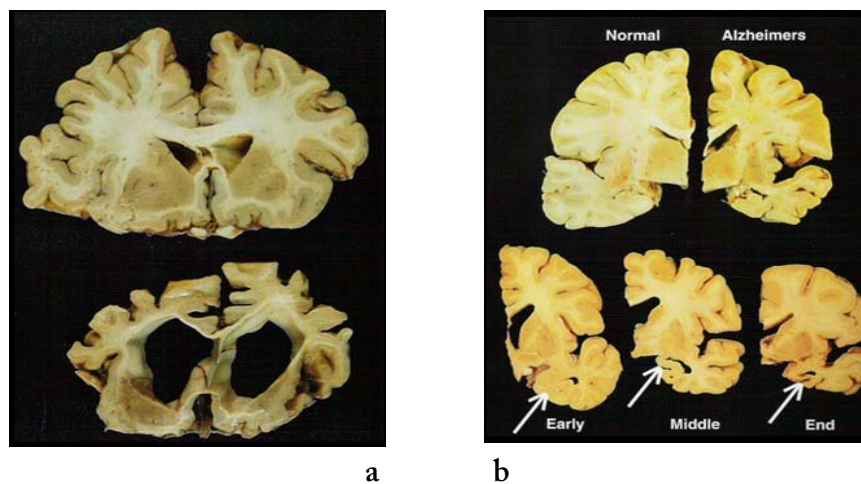


Abbildung I.5: Frontalschnitt des Gehirns von Alzheimer-Patienten im Vergleich mit gesunden Personen.

a: Vergleich des Gehirns einer nicht erkrankten Person (im Bild oben) mit dem Gehirn eines Alzheimer-Patienten (im Bild unten) im Frontalschnitt. Auffällig ist eine stark ausgeprägte Atrophie, die sich hier besonders in Form einer Erweiterung der Ventrikelräume zeigt. Als weiteres Atrophiezeichen besteht eine Verschmälerung der Gyri mit entsprechender Verbreiterung der Sulci.

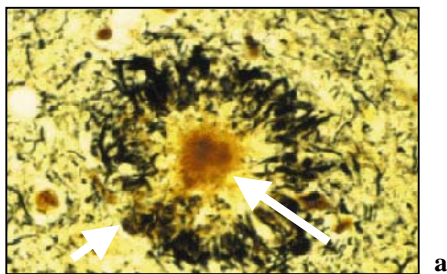
b: Oben im Bild wiederum der direkte Vergleich zwischen nicht-erkranktem (links) und erkranktem (rechts) Gehirn im Frontalschnitt. Gezeigt sind jeweils der Frontal- und Temporallappen. Unten im Bild der Vergleich der Gehirne dreier Alzheimer-Patienten in verschiedenen Stadien. „Early“ entspricht dem frühen, „Middle“ dem fortgeschrittenen und „End“ dem späten Stadium der Erkrankung. Die Pfeile weisen jeweils auf die an Gedächtnisprozessen beteiligte Hippocampusregion des Temporallappens, welche mit fortschreitender Erkrankung zunehmend atrophiert (Fotografie) [Abbildungen aus Webpath 3].

Die erste und bis heute gültige Beschreibung histomorphologischer Korrelate zur klinischen Symptomatik dieser Demenzform gelang Alois Alzheimer im Jahr 1907. Er beobachtete intrazelluläre neurofibrilläre Bündel im Gehirn seiner 51 Jahre alt gewordenen Patientin Auguste D. (s. Abb. I.6) [Alzheimer, 1907]. Diese intrazellulären Veränderungen sowie extrazelluläre Amyloidablagerungen (Abb. I.7) sind als histopathologische Kennzeichen bis heute die ausschlaggebenden Kriterien für die definitive Diagnose einer Demenz vom Alzheimer-Typ *post mortem* [Thorsett und Latimer, 2000], wobei die histologischen Veränderungen ähnlich den makroskopischen Atrophiezeichen vorwiegend in Neokortex und Hippocampus lokalisiert sind [Braak *et al.*, 1996].

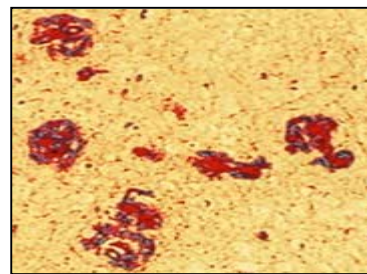


Abbildung I.6: Dokumentation neurofibrillärer Bündel nach Alois Alzheimer.

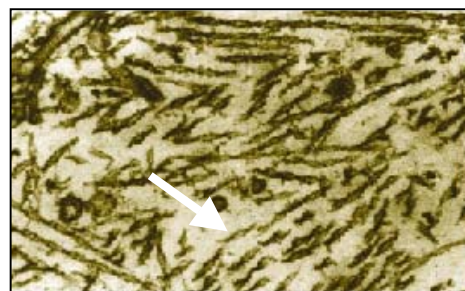
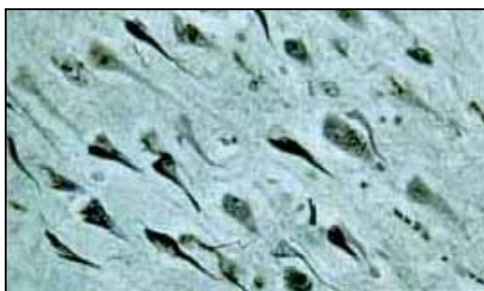
Intraneuronal lokalisierte neurofibrilläre Bündel, gezeichnet von Alois Alzheimer nach lichtmikroskopischen Befunden [Maurer und Maurer, 1998].



a



b



d

Abbildung I.7: Histopathologische Merkmale der Demenz vom Alzheimer-Typ.

- a: Mikroskopische Aufnahme eines extrazellulären neuritischen Amyloidplaques (langer Pfeil), umgeben von dystrophen Neuriten (kurzer Pfeil) in der Silberfärbung. [Sisodia und St George-Hyslop, 2002].
- b: Mikroskopische Aufnahme von Amyloidplaques in der Kongorotfärbung [Abbildung aus Webpath 4].
- c: Mikroskopische Aufnahme intrazellulärer neurofibrillärer Bündel in der Silberfärbung [Abbildung aus Webpath 5].
- d: Elektronenmikroskopischer Ausschnitt aus einem intrazellulären neurofibrillären Bündel, das sich aus gepaarten helikalen Filamenten (weißer Pfeil) zusammensetzt [Sisodia und St George-Hyslop, 2002].

Neurofibrilläre Bündel („tangles“, Abb. I.6, I.7 c und d) entstehen intrazellulär im somatodendritischen Kompartiment und in Axonen von Neuronen durch Aggregation von gepaarten helikalen Filamenten [Terry *et al.*, 1964]. Diese setzen sich hauptsächlich aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen zusammen [Grundke-Iqbal *et al.*, 1986]. Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, dessen physiologische Funktion vor allem in der Stabilisierung axonaler Mikrotubuli besteht; es gibt jedoch noch eine Reihe weiterer zellulärer Prozesse, an denen Tau beteiligt ist, beispielsweise an Signaltransduktionsmechanismen, an der Regulation des intrazellulären Vesikeltransports und des Neuritenwachstums sowie an der Verankerung verschiedener Enzyme innerhalb der Zelle [Friedhoff *et al.*, 2000]. Die bei der Alzheimer-Demenz auftretende überschießende und unphysiologische Hyperphosphorylierung von Tau ist Folge einer Imbalance zwischen verschiedenen zellulären Kinasen und Phosphatasen und führt erstens zur Dissoziation des Tau-Proteins von den Mikrotubuli und so zur Störung der Zellarchitektur und des axonalen Transports, zweitens zum Verlust der Löslichkeit von Tau und damit seiner Aggregation. Die Ursache der Kinasen/Phosphatasen-Imbalance ist bisher nicht ausreichend verstanden [Mandelkow und Mandelkow, 1998]. Axone und Dendriten, die Zeichen einer filamentösen Degeneration infolge der Aggregation von Tau aufweisen, werden als „dystrophe Neuriten“ bezeichnet [Crowther und Goedert, 2000]. Durch den Untergang betroffener Zellen im Rahmen der Degeneration kommt es auch zum extrazellulären Auftreten neurofibrillärer Bündel ("ghost tangles") [Bondareff *et al.*, 1994, Braak *et al.*, 1996]. Im Unterschied zu bestimmten Formen von amyloiden Plaques, den sogenannten neuritischen Plaques (Abb. I.7 a und b), sind neurofibrilläre Bündel jedoch nicht spezifisch für die Demenz vom Alzheimer-Typ, sondern sind auch bei anderen Erkrankungen aus dem neurodegenerativen Formenkreis, wie zum Beispiel der Frontallappendemenz ("Frontal Lobe Dementia"), anzutreffen [Morris *et al.*, 2001].

Amyloide Plaques (Abb. I.7 b) sind das zweite pathologische Hauptmerkmal der Alzheimer-Demenz. Sie finden sich extrazellulär in kortikalen Hirnarealen [Selkoe, 1999]. Häufig ist auch das mikrovaskuläre arterielle und venöse zerebrale Blutgefäßsystem in Form einer Amyloidose der Basalmembran der Gefäßwand betroffen [Selkoe, 1999]. Es gibt zwei mikroskopische Subklassen der amyloiden Plaques, sogenannte neuritische (Synonym: senile) und diffuse Plaques. Neuritische Plaques (Abb. I.7 a) sind von kompakter Struktur. Sie

besitzen einen dichten Amyloidkern („amyloid core“), umgeben von degenerierten Axonen und Dendriten [Braak *et al.*, 1996], sowie aktivierten Mikrogliazellen und Astrozyten [Pike *et al.*, 1994]. Diffusen Amyloidplaques fehlen der dichte Kern und die umgebenden dystrophen Neuriten, die begleitenden zellulären Veränderungen sind insgesamt deutlich schwächer ausgeprägt als bei neuritischen Plaques [Yamaguchi *et al.*, 1989]. Neuritische Amyloidplaques werden als für die Alzheimer-Demenz spezifisch angesehen, wohingegen diffuse Amyloidplaques auch in Gehirnen nicht erkrankter älterer Menschen nachweisbar sind [Hardy und Selkoe, 2002]. Die vorherrschende Hypothese zur Rolle der diffusen Plaques in der Entstehung der Alzheimer-Demenz besagt, dass sie als eine Vorstufe der neuritischen Plaques angesehen werden können und somit die Übergänge zwischen dem physiologischen Alterungsprozess des Gehirns und einer manifesten Erkrankung nicht nur klinisch, sondern auch histopathologisch fließend vonstatten gehen [Giaccone *et al.*, 1989; Tagliavini *et al.*, 1988; Dickson, 1997].

I. 4 MOLEKULARE UND GENETISCHE GRUNDLAGEN DER ALZHEIMER-DEMENZ

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Amyloidplaques entstehen in erster Linie durch Aggregation des amyloidogenen Peptids Amyloid- β (A β), das somit eines der Schlüsselproteine in der Pathogenese der Alzheimer-Demenz ist [Selkoe, 2004]. Erst die Identifikation und Sequenzierung von A β ermöglichte eine systematische Analyse der molekularen und letztlich auch genetischen Grundlagen dieser Erkrankung. Weitere entscheidende Erkenntnisse wurden aus der Untersuchung derjenigen Gene gewonnen, die mit der familiären Form der Alzheimer-Demenz (FAD) assoziiert sind. Die familiäre Form ist mit einem Anteil von etwa 5 % unter den Alzheimer-Demenzen zwar relativ selten, entsprechende Mutationen besitzen aber eine sehr hohe Penetranz, so dass der Schluss nahe liegt, aus der Analyse der Pathophysiologie dieser Mutationen wichtige Hinweise auf das Entstehen der Alzheimer-Demenz erhalten zu können. Auf diese Weise konnten neben dem APP (Amyloid Precursor Protein)-Gen auf Chromosom 21 die Gene für Presenilin (PS) 1 und 2 (Chromosom 14 und 1) identifiziert werden (vgl. spätere Abschnitte und [Cai *et al.*, 1993; Citron *et al.*, 1992; Cruts *et al.*, 1995; Levy-Lahad *et al.*, 1995; Rogaev *et al.*, 2001; Sherrington *et al.*, 1995], zusammengefasst in [Selkoe, 1996]).

Das in den Amyloidplaques aggregierende A β hat überwiegend eine Länge von 40 bis 42 Aminosäuren (AS), seine Sequenz beginnt, bezogen auf die in neuronalen Geweben vorherrschende Isoform APP₆₉₅ (vergleiche Abschnitt I.4.1), mit D597 und endet mit V636 (A β 1-40 = A β ₄₀) beziehungsweise mit A638 (A β 1-42 = A β ₄₂) [Kang *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1996; Haass und Steiner, 2002; Sisodia und St George-Hyslop, 2002]. Es existieren weitere Varianten des A β -Peptids, die an N- und C-Terminus unterschiedliche Verkürzungen und Verlängerungen aufweisen [Glennner *et al.*, 1984; Masters *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 1996]. Neben A β kommen in den Amyloidplaques auch andere Komponenten vor, wie die Apolipoproteine E und J, α 1-Antichymotrypsin und verschiedene Proteoglykane [Dickson, 1997].

A β ₄₀ und A β ₄₂ haben trotz ihrer nur um zwei Aminosäuren differierenden Länge stark unterschiedliche chemische Eigenschaften. A β ₄₂ ist durch die beiden zusätzlichen Aminosäuren Isoleucin und Alanin deutlich hydrophober als A β ₄₀ und ist damit *in vitro* wesentlich aggregationsbereiter [Selkoe, 1999]. Gleichzeitig ist A β ₄₂, das besonders in den neuritischen Plaques in hoher Konzentration auftritt, resistenter gegenüber abbauenden Enzymen als andere A β -Spezies [Glabe, 2001].

Die klinisch übliche Unterscheidung zwischen einer im frühen (etwa 20 bis 30 Jahre) oder mittleren (etwa 40 bis 50 Jahre) Lebensalter auftretenden Form der Alzheimer-Demenz (vormals "präsenile Demenz") und der klassischen, im hohen Lebensalter (etwa 75 bis 85 Jahre) beginnenden Form, lässt sich histopathologisch nicht nachvollziehen [Selkoe, 2001]. Genetisch jedoch findet man bei den früh auftretenden Formen häufig autosomal-dominante Vererbungsmuster, während die klassische Erkrankung im höheren Alter in aller Regel sporadisch auftritt [Selkoe, 1999; Haass und Steiner, 2002]. Bemerkenswert ist, dass die bekannten Mutationen bei der familiären Form der Alzheimer-Demenz (FAD) allesamt in den Genen des β -Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP), des Presenilin 1 (PS1) und des Presenilin 2 (PS2) liegen [Selkoe und Schenk, 2002]. Es wurde angenommen, dass diese Mutationen entweder eine verstärkte Bildung aller A β -Spezies bedingen, oder aber selektiv die Produktion von A β ₄₂ fördern und damit das Verhältnis A β _{40/42} verringern [Haass und Steiner, 2002], was ein möglicher Hinweis auf die zentrale Funktion von A β ₄₂ bei der Plaquetbildung ist. Nachfolgende Arbeiten haben ergeben, dass zahlreiche klinisch relevante PS-Mutationen tatsächlich eine verstärkte Bildung von A β ₄₂ zur Folge haben, und dass dies je nach Mutation sowohl über eine Verringerung der A β ₄₀-Produktion, eine Vermehrung der

A β ₄₂-Produktion, oder auch eine Kombination beider Mechanismen stattfinden kann [Bentahir *et al.*, 2006].

Die klinische Symptomatik der Alzheimer-Demenz beruht jedoch nicht auf der alleinigen Anwesenheit der Amyloidplaques, sondern auf dem Untergang von Neuronen, synaptischen Fehlfunktionen und Transmitterverschiebungen. Es stellt sich daher die Frage, ob diese Phänomene auf die Bildung der Amyloidplaques zurückgeführt werden können, und, falls dies zutrifft, auf welche Weise dieser Zusammenhang zustande kommt. Angenommen wird, dass weder monomere A β -Peptide, noch deren unlösliche fibrilläre Aggregate verantwortlich sind, sondern dass hauptsächlich lösliche A β -Oligomere eine Zytotoxizität ausüben, die ursächlich für die erwähnten Phänomene ist [Walsh *et al.*, 2002].

Obwohl Details über Art und Zustandekommen der toxischen Wirkung nicht ausreichend bekannt sind, gibt es eine Reihe experimenteller Befunde, die ein vorherrschendes Modell, die sogenannte Amyloidkaskadenhypothese (Abb. I.8), stützen. Dieser Hypothese zufolge stellt die Aggregation von A β den Beginn einer Vielzahl aufeinander folgender Ereignisse dar, die letztendlich zum Untergang von Neuronen führen und damit die dementiellen Symptome bedingen [Hardy und Selkoe, 2002]. Zu den von A β -Oligomeren ausgelösten Mechanismen gehören unter anderem entzündliche Reaktionen, Störungen des intrazellulären Milieus und des Gleichgewichts zwischen Phosphatasen und Kinasen und damit eine sowohl direkte wie auch indirekte Schädigung von Neuronen und Synapsen [Hardy und Selkoe, 2002; Selkoe, 2001; Sisodia und St George-Hyslop, 2002].

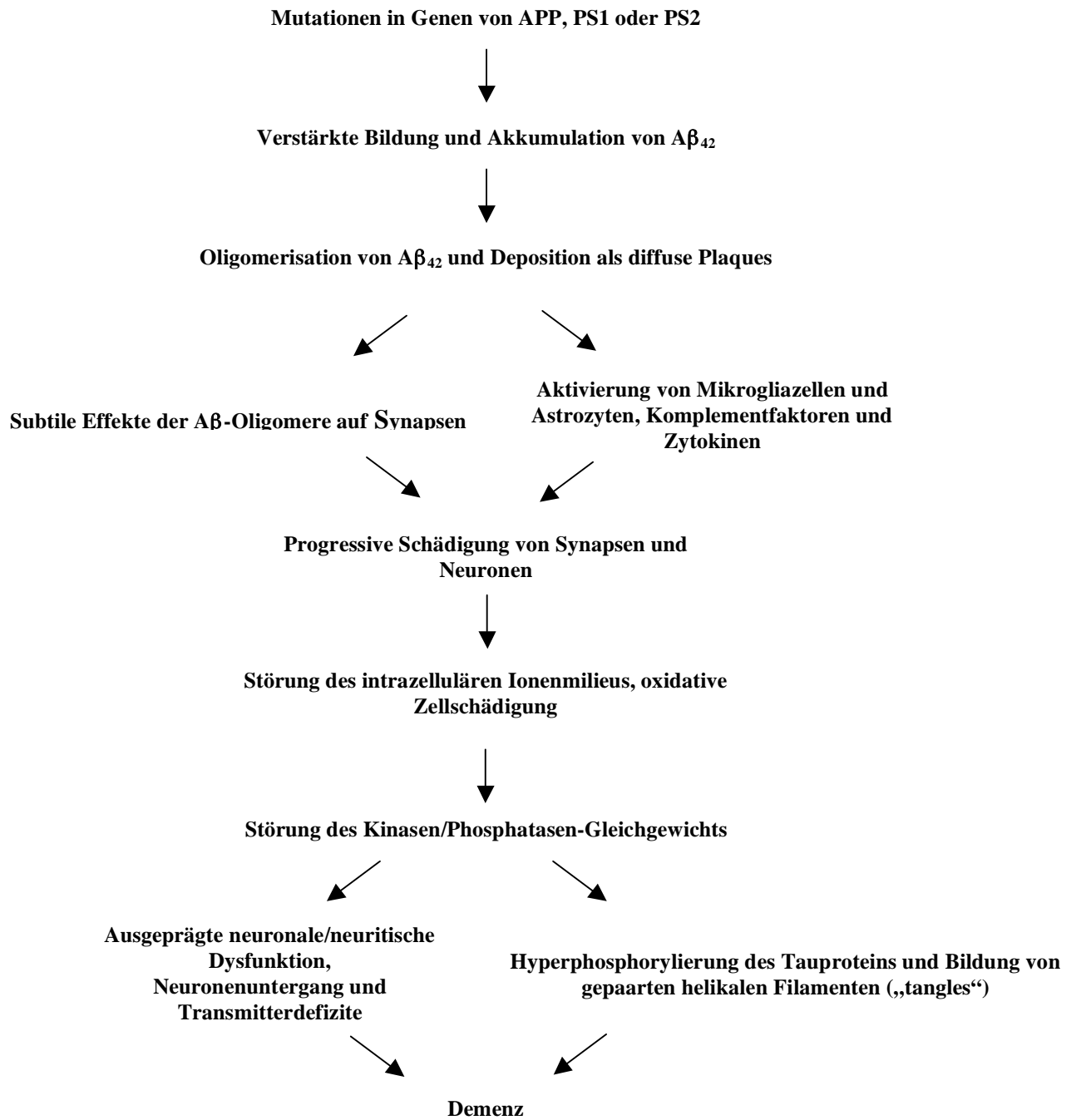


Abbildung I.8: Schematische Darstellung der hypothetischen Amyloidkaskade. Nach [Hardy und Selkoe, 2002].

I. 4.1 DAS AMYLOID-VORLÄUFER-PROTEIN

Wie oben bereits erwähnt, entsteht A β durch die proteolytische Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) [Haass, 2002].

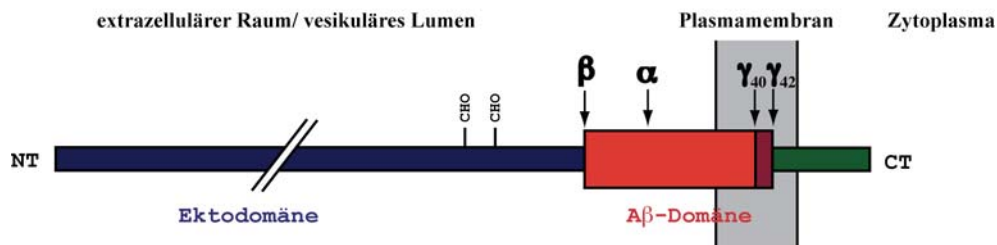


Abbildung I.9: Schematische Darstellung des Amyloid-Vorläufer-Proteins.

APP besitzt eine längere N-terminale Ektodomäne (blau), eine kurze C-terminale intrazelluläre Domäne (APP intracellular domain; AICD, grün) und die verbreitert dargestellte A β -Domäne (rot und dunkelrot), die teilweise in der Transmembranregion und teilweise im extrazellulären/luminalen Raum liegt. Die Schnittstellen von α -, β - und γ -Sekretase sowie die beiden Glykosylierungsstellen (CHO) sind in ihrer ungefähren Lage markiert. Schemazeichnung, Größenverhältnisse daher nicht völlig realitätsgetreu. Modifiziert nach [Haass und Selkoe, 1993].

APP ist ein Typ-I-Transmembranprotein, das strukturelle Ähnlichkeit mit einem Zelloberflächenrezeptor aufweist [Kang *et al.*, 1987] (Abb. I.9). Es besitzt eine längere N-terminale Ektodomäne mit zwei Glykosylierungsstellen, eine Transmembrandomäne und eine kürzere C-terminale zytoplasmatische Domäne. Der Bereich, aus dem nach der Prozessierung durch die verschiedenen Sekretasen Peptide der A β -Spezies entstehen, umspannt teilweise die Transmembranregion und teilweise die Ektodomäne und wird als A β -Domäne bezeichnet. Nach der Translokation in das Endoplasmatische Retikulum (ER) wird APP durch den sekretorischen Transportweg zur Zelloberfläche transportiert. Dabei finden posttranslationelle Modifikationen durch N'- und O'-Glykosylierung, Sulfatierung und Phosphorylierung statt [Selkoe, 1999; Weidemann *et al.*, 1989]. Nach der Reifung ist APP an der Zelloberfläche einem endosomalen Recycling unterworfen, wird also in endozytotische Vesikel aufgenommen, internalisiert und schließlich wieder an die Plasmamembran zurücktransportiert [Koo und Squazzo, 1994; Koo *et al.*, 1996].

APP wird ubiquitär in allen Geweben und Zelltypen exprimiert [Selkoe *et al.*, 1988]. Durch alternatives Spleißen der mRNA von APP entstehen in erster Linie drei verschiedene

Isoformen, die eine Länge von 695, 751 oder 770 Aminosäuren besitzen [Sandbrink *et al.*, 1994; Selkoe, 1994]. In neuronalen Geweben ist APP₆₉₅ die nahezu absolut vorherrschende Isoform, in nicht-neuronalem Gewebe findet man dagegen hauptsächlich APP₇₅₁ [Wertkin *et al.*, 1993]. Es gibt zwei zu APP homologe Proteine: APLP (Amyloid Precursor like Protein)-1 und APLP-2, die jedoch nicht die in APP vorhandene A β -Domäne besitzen [Sprecher *et al.*, 1993; Wasco *et al.*, 1992; Wasco *et al.*, 1993]. Die APP-Genfamilie ist evolutionär hoch konserviert [Wasco *et al.*, 1993], ihre genaue Funktion ist bisher jedoch unbekannt. In Betracht gezogen werden unter anderem eine Beteiligung an Signaltransduktion, Neuriten- und Zellwachstum, Zelladhäsion und Blutgerinnung [Milward *et al.*, 1992; Saitoh *et al.*, 1989; Nishimoto *et al.*, 1993]. Weiterhin könnte APP über eine Rezeptorfunktion für Kinesin-1, die eine Brücke zwischen dem Kinesin-Motor und einem axonalen Transportvesikel schafft, eine Rolle im vesikulären Transport spielen [Kamal *et al.*, 2001]. Dieses Modell muss jedoch teilweise modifiziert werden, da eine direkte Interaktion zwischen APP und Kinesin-1 entgegen initialer Befunde nicht bestätigt werden konnte [Kins *et al.*, 2006]. Weiterhin gibt es Anhaltspunkte für die Annahme, dass APP ähnlich wie der Notch-Rezeptor an der Transkriptionsregulation beteiligt ist, denn es konnte gezeigt werden, dass das zytoplasmatische C-terminale Fragment von APP einen Komplex mit dem nukleären Adapterprotein Fe65 und der Histonacetyltransferase Tip60 bildet [Cao und Südhof, 2001 und 2004]. Knockout-Experimente in der Maus ergaben, dass die Abwesenheit von Genen aus der APP-Familie zum perinatalen Absterben führt, dies wurde festgestellt für kombinierte homozygote Defizienzen für APP/APLP2 und APLP2/APLP1. Die Funktion der APP-Familie ist jedoch zwischen APLP2 und den beiden anderen Genen APP und APLP1 zumindest teilweise redundant, so dass Mäuse, die bezüglich APP und APLP1 homozygot defizient sind, phänotypisch unauffällig sind [Heber *et al.*, 2000; Herms *et al.*, 2004]. Die Dreifach-Defizienz für APP/APLP1/APLP2 führt zum postnatalen Absterben, die Foeten zeigen kortikale Dysplasien ähnlich der humanen Typ-II-Lissenzephalie [Herms *et al.*, 2004].

I. 4.2 PROTEOLYTISCHE PROZESSIERUNG DES AMYLOID-VORLÄUFER-PROTEINS

APP kann von verschiedenen Proteasen, den α -, β - und γ -Sekretasen, während des Transports durch den sekretorischen Weg und im Bereich der Zelloberfläche proteolytisch gespalten werden [Haass und Steiner, 2002].

Beschrieben sind in diesem Zusammenhang zwei mögliche Prozessierungskombinationen: APP kann entweder zuerst durch die α - und anschließend durch die γ -Sekretase gespalten werden, oder es kann zunächst durch die β - und danach wie bei der ersten Möglichkeit durch die γ -Sekretase prozessiert werden (Abb. I.10). Die γ -Sekretase ist also in diesen beiden Fällen als zweite Protease beteiligt.

Bei Prozessierung von APP durch die α -Sekretase wird die Ektodomäne als lösliches Molekül in den extrazellulären Raum sezerniert (β APPs α). Der in der Membran verbleibende C-terminale Rest (β APP CTF α) wird anschließend durch die γ -Sekretase gespalten, wobei eine intrazelluläre Domäne (β APP intracellular domain; AICD) [Sastre *et al.*, 2001] und das lösliche p3 freigesetzt werden [Haass *et al.*, 1993].

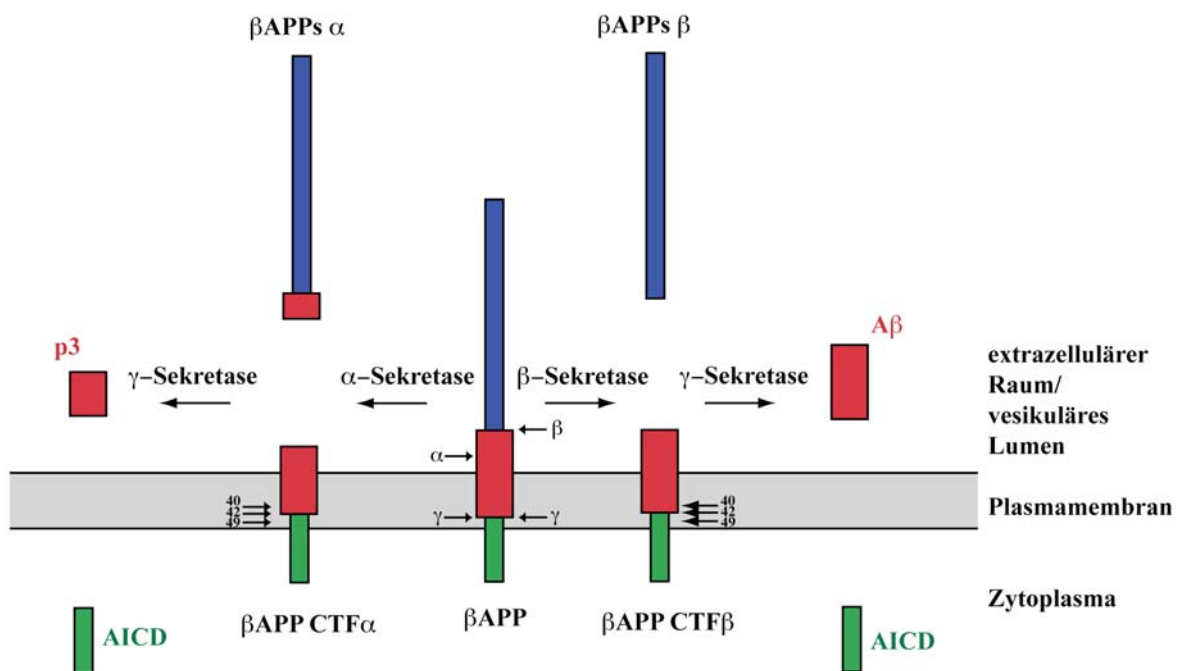


Abbildung I.10: Proteolytische Prozessierung von APP durch α -, β - und γ -Sekretase.

Dargestellt ist die APP-Ektodomäne (blau), die intrazelluläre Domäne (grün) und die A β -Domäne (verbreitert gezeichnet, rot), sowie die nach der Prozessierung durch die gekennzeichneten Sekretasen entstehenden Produkte. Im ersten Schritt findet entweder die Spaltung durch die α -Sekretase (Mitte links) oder durch die β -Sekretase (Mitte rechts) statt. Im zweiten Schritt kommt es jeweils zur Spaltung durch die γ -Sekretase (ganz links bzw. ganz rechts). Modifiziert nach [Haass und Selkoe, 1993].

Wenn APP zunächst von der β -Sekretase und daraufhin von der γ -Sekretase geschnitten wird, entstehen aus dem zunächst generierten C-terminalen Rest (APP CTF β) hauptsächlich A β_{40} und A β_{42} und ein geringerer Anteil A β_{49} [Haass und Steiner, 2002]. Auch wenn bisher noch keine eindeutige Funktion von APP und damit auch von A β selbst bekannt ist, so handelt es sich bei der Produktion von A β an sich höchstwahrscheinlich noch nicht um einen pathologischen Prozess. A β ist bei gesunden Menschen jeden Alters in der Liquorflüssigkeit und im Blutplasma nachweisbar. Daher wird die konstitutive Sekretion von A β heute als Teil des normalen APP-Metabolismus angesehen [Haass *et al.*, 1992; Seubert *et al.*, 1993; Shoji *et al.*, 1992].

Wie bereits erwähnt gibt es eine Reihe von FAD-Mutationen im APP-Gen. Bemerkenswert ist, dass die derzeit beschriebenen Mutationen nahe an den Schnittstellen der drei Sekretasen liegen (vgl. Abb. I.11).

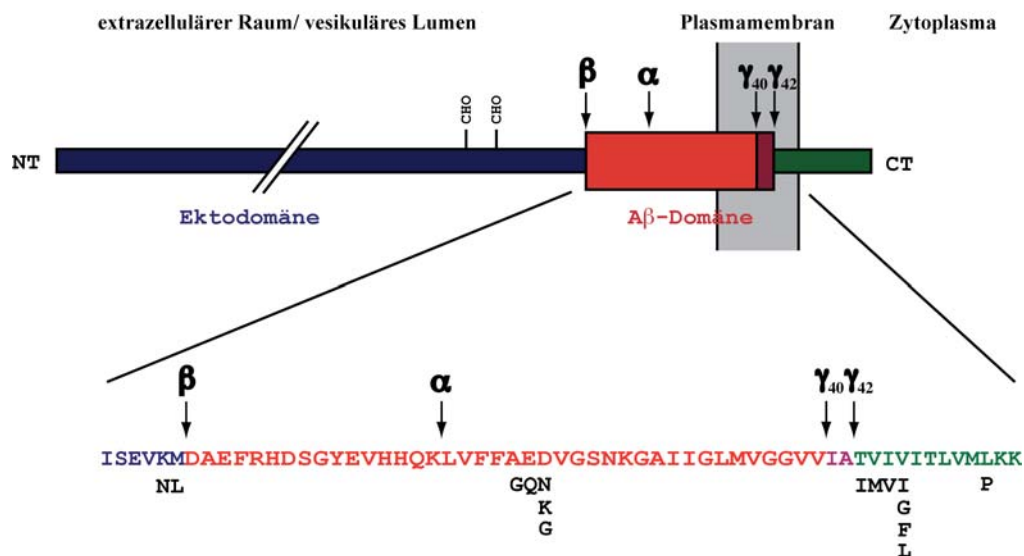


Abbildung I.11: Übersicht über die FAD-Mutationen im APP-Gen.

Schematische Darstellung von APP: Ektodomäne (blau), intrazelluläre Domäne (grün) und A β -Domäne verbreitert (rot). Die Aminosäuresequenz des relevanten Bereichs ist vergrößert im Einbuchstabencode angegeben, farblich sind die jeweils zu APP korrespondierenden Bereiche gekennzeichnet. Unterhalb der Sequenz sind die wichtigsten AS-Substitutionen angegeben, die bei FAD-Mutationen vorliegen (schwarz). Modifiziert nach [Haass und Selkoe, 1993] und [Webpath 6 und 7].

Die bekannten Mutationen führen teilweise zu einer erhöhten Gesamtmenge an A β , mehr jedoch zu einer spezifisch verstärkten Sekretion von A β_{42} [Selkoe, 1996]. Eine hierbei besonders wichtige Mutation ist die in einer schwedischen Familie mit FAD nachgewiesene sogenannte schwedische Doppelmutation K595N/M596L (β APP_{sw}), bezogen auf APP₆₉₅ [Mullan *et al.*, 1992]. Diese Mutation führt zu einer Affinitätserhöhung zwischen der β -Sekretase und ihrem Substrat β APP, so dass es zu einer vermehrten Produktion von A β kommt [Cai *et al.*, 1993; Citron *et al.*, 1992; Vassar *et al.*, 1999].

Interessant sind auch die Mutationen A617G [Hendriks *et al.*, 1992] und E618Q [Levy *et al.*, 1990] in der Nähe der Schnittstelle der α -Sekretase. Sie führen einerseits zu einer Affinitätsverminderung der α -Sekretase gegenüber β APP, das infolgedessen bevorzugt durch die β -Sekretase geschnitten wird, so dass wiederum letztlich vermehrt A β entsteht [Vassar, 2002] und andererseits zusätzlich zu erhöhter Aggregationsbereitschaft des entstehenden A β -Peptids.

Die C-terminalen Mutationen in der Nähe der γ -Sekretase-Schnittstelle scheinen zumeist spezifisch das Verhältnis A β_{42} /A β_{40} zu erhöhen, beispielsweise ist für die T639I-Mutation eine 11-fache Erhöhung dieses Verhältnisses *in vitro* gefunden worden und die Plaques im Gehirn der an dieser Mutation leidenden Patienten enthalten fast ausschließlich A β_{42} [Kumar-Singh *et al.*, 2006; Webpath 7].

I. 4.3 DIE α -SEKRETASE

Die α -Sekretase schneidet β APP innerhalb der A β -Domäne zwischen den AS-Resten Lys16 und Leu17, verhindert somit ein Prozessieren von β APP durch die β -Sekretase und vermindert daher letztlich die Produktion von A β [Esch *et al.*, 1990; Sisodia *et al.*, 1990; Buxbaum *et al.*, 1993; Hung *et al.*, 1993]. Die konstitutive Aktivität der α -Sekretase kann gesteigert werden durch die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Diese wiederum kann einerseits indirekt über Rezeptoren, die den PKC-Signalweg aktivieren [Esler und Wolfe, 2001], oder andererseits direkt durch Phorbol ester [Felsenstein *et al.*, 1994; Hung *et al.*, 1993; Jacobsen *et al.*, 1994] aktiviert werden.

Die α -Sekretase ist kein einzeln definiertes Protein, vielmehr beschreibt sie eine Aktivität, die von mehreren verschiedenen Enzymen ausgeführt werden kann. Die α -Sekretase-Proteasen sind Teil der ADAM (a disintegrin and metalloprotease)-Familie [Seals und Courtneidge,

2003], in der hauptsächlich zwei Vertreter bekannt sind, die APP spalten: ADAM 10 [Lammich *et al.*, 1999] und ADAM 17 (eine weitere Bezeichnung lautet TACE – tumor necrosis factor- α -converting enzyme) [Buxbaum *et al.*, 1998]. Es ist anzunehmen und bereits teilweise gezeigt worden, dass es weitere Vertreter der ADAM-Familie gibt, die eine gewisse α -Sekretase-Aktivität besitzen [Koike *et al.*, 1999; Weskamp *et al.*, 2002].

Bezüglich der Schnittstelle der α -Sekretase gibt es keine AS-Konsensussequenz, die Spaltung ist dagegen abhängig von der α -helikalen Konformation des Substrats und findet in einem Abstand von der Plasmamembran von etwa 12-13 AS-Resten statt [Sisodia, 1992]. Dies führt zu einer relativ geringen Substratspezifität, neben APP gehören auch andere Transmembranproteine wie TNF α , Notch, der p75-TNF α -Rezeptor und L-Selektin zu den Substraten der ADAM-Vertreter mit α -Sekretase-Aktivität [Seals und Courtneidge, 2003]. Die Aktivität von Proteasen, die auf solch relativ unspezifische Weise die extrazellulären Domänen von Transmembranproteinen abspalten, wird mit dem anschaulichen Begriff „ectodomain shedding“ bezeichnet, die Proteasen selber heißen entsprechend „sheddasen“ [Lichtenthaler und Steiner, 2007; Annaert und Saftig, 2009]. „Shedding“ ist oft einerseits involviert in der Freisetzung von Signalmolekülen (beispielsweise der extrazellulären Domäne von TNF α durch TACE/ADAM 17, vgl. oben), und andererseits häufig eine Voraussetzung für anschließende weitere intramembranäre Prozessierung des Substrats, wie dies beispielsweise durch die γ -Sekretase geschieht. Dieser Prozess wiederum wird entsprechend „regulated intramembrane proteolysis“ (RIP) genannt, und ist generell ebenfalls typisch für Signaltransduktionsmechanismen oder auch für die Degradation von Transmembranproteinen (zusammengefasst in [Lichtenthaler und Steiner, 2007; Annaert und Saftig, 2009]).

In Knockout-Experimenten in der Maus konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von ADAM 17/TACE essentiell für die Embryonalentwicklung ist [Peschon *et al.*, 1998] und dass das Fehlen von ADAM 10 zum embryonalen oder perinatalen Absterben infolge defekter Notch-Signaltransduktion führt [Hartmann *et al.*, 2002].

I. 4.4 DIE β -SEKRETASE

Die β -Sekretase wird nahezu ubiquitär in allen Zell- und Gewebetypen exprimiert, die höchste Aktivität ist jedoch in neuronalen Zellen und Geweben nachweisbar [Vassar *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999]. Eine Spaltung von APP findet im Zellkulturmodell

hauptsächlich statt, wenn das Substrat membrangebunden vorliegt [Citron *et al.*, 1995], es wurde jedoch unter Überexpressionsbedingungen auch eine zusätzliche β -Sekretase-Aktivität gefunden, die das bereits geschnittene lösliche A β -Peptid weiter verkürzen kann [Fluhrer *et al.*, 2003]. Das pH-Optimum der β -Sekretase liegt im sauren Bereich, maximale Aktivität findet man daher in den sauren Kompartimenten der Zelle, also im Golgi-Apparat und in Endosomen [Haass *et al.*, 1995; Koo und Squazzo, 1994]. Anders als die α -Sekretase und bis zu einem gewissen Grad auch als die γ -Sekretase besitzt die β -Sekretase eine deutliche Sequenzspezifität [Citron *et al.*, 1995].

Es gibt zwei homologe Aspartylproteasen der β -Sekretase-Gruppe, BACE 1 (β -site APP cleaving enzyme 1, andere Bezeichnungen lauten Asp-2 oder Memapsin-2) [Hussain *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999] und BACE 2 [Lin *et al.*, 2000; Saunders *et al.*, 1999; Solans *et al.*, 2000]. In Knockout-Experimenten in der Maus konnte gezeigt werden, dass in Neuronen bei Ausschalten von BACE 1 in Anwesenheit von humanem β APP keine Produktion von A β stattfindet [Cai *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2001; Roberds *et al.*, 2001]. Es ist daher anzunehmen, dass BACE 1 in neuronalen Geweben die einzige Protease mit relevanter β -Sekretase-Aktivität ist [Vassar, 2002]. Im Unterschied zu BACE 1 wird BACE 2 hauptsächlich in nicht-neuronalen Geweben exprimiert [Bennett *et al.*, 2000; Vassar *et al.*, 1999]. Die deutliche Homologie zwischen beiden Enzymen lässt jedoch vermuten, dass auch BACE 2 β -Sekretase-Aktivität besitzen könnte. Ein Argument für die Rolle von BACE 2 bei der Produktion von A β liefert die Beobachtung, dass bei Patienten, die unter einer Trisomie 21 (Down-Syndrom) leiden, neben der Genregion von β APP auch die von BACE 2 von der Vervielfältigung betroffen ist [Saunders *et al.*, 1999]. Down-Syndrom-Patienten weisen bereits in jungem Alter typische klinische und pathologische Symptome einer Alzheimer-Demenz auf. Zurückgeführt wird dies einerseits auf die verstärkte Expression von β APP, andererseits könnte auch die vermehrte BACE 2-Expression zur Krankheitsentstehung beitragen und somit BACE 2 eine nicht unwichtige Rolle bei der Produktion von A β spielen [Acquati *et al.*, 2000; Odetti *et al.*, 1998; Schupf *et al.*, 2001].

Neben APP und APLP1/2 gibt es eine Reihe weiterer Substrate der β -Sekretase, wie die Sialyltransferase ST6Gal I [Kitazume *et al.*, 2001], das Zelladhäsionsprotein P-Selektin Glycoprotein Ligand-1 [Lichtenthaler *et al.*, 2003], das Low-Density Lipoprotein Rezeptor-verwandte Protein [von Arnim *et al.*, 2005] und die β -Untereinheiten spannungsgesteuerter Natriumkanäle [Wong *et al.*, 2005]. Interessanterweise konnte kürzlich in weiteren BACE-1

Knockout-Experimenten in der Maus gezeigt werden, dass BACE-1 über die Prozessierung von TypIII Neuregulin 1 eine Rolle bei der Myelinisierung im peripheren und zentralen Nervensystem zu spielen scheint [Willem *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2006].

I. 4.5 DIE γ -SEKRETASE

Wie in Abschnitt I. 4.2 beschrieben, wird durch die γ -Sekretase die proteolytische Spaltung der durch die α - und β -Sekretase entstehenden APP CTFs ausgeführt. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass die Spaltung nicht, wie für die hydrolytische Spaltung einer Peptidbindung erforderlich, offensichtlich im wässrigen Milieu stattfindet, sondern innerhalb einer hydrophoben Transmembrandomäne [Wolfe *et al.*, 1999a]. Eine Lösung für diesen scheinbaren Widerspruch bietet die Hypothese, dass Presenilin, die eigentliche Protease des Enzymkomplexes, eine Pore bildet, durch die das zur Spaltung notwendige Wassermolekül bis zum aktiven Zentrum vordringen kann. Inzwischen konnte mit unterschiedlichen Strategien einige Evidenz hierfür gewonnen werden: Zum einen beobachtete man elektronenmikroskopisch im Inneren des γ -Sekretase-Komplexes eine relativ elektronendurchlässige Kammer, die als wassergefüllte Kavität interpretiert werden kann (Abb. I.12) [Lazarov *et al.*, 2006]. Zum anderen gelang es, durch Cystein-Substitution einzelner im aktiven Zentrum lokalisierter Aminosäuren und anschließende spezifische Modifikation mittels Sulfhydryl-Reagenzien nachzuweisen, dass diese Reste sich tatsächlich in wässrigem Milieu befinden [Tolia *et al.*, 2006].

Eine solche Form der hydrolytischen Peptidbindungsspaltung wird als „regulated intramembrane proteolysis“ (RIP) bezeichnet (vgl. Abschnitt I. 4.3). Die genaue Position des γ -Sekretaseschnittes ist weniger von der genauen AS-Sequenz des Substrats abhängig, als mehr von der Länge und Struktur der Transmembrandomäne [Esler und Wolfe, 2001; Lichtenthaler *et al.*, 2002]. Auch die γ -Sekretase ist wie die β -Sekretase eine Aspartylprotease [Wolfe *et al.*, 1999a], jedoch besitzt sie anders als die klassischen Aspartylproteasen im aktiven Zentrum der katalytischen Presenilin-Untereinheit ein neuartiges hochkonserviertes Motiv, das sich aus den Aminosäuren GxGD zusammensetzt (wobei x für eine variable Aminosäure steht) (vgl. Abschnitt I. 4.5.2) [Haass und Steiner, 2002]. Bei der Spaltung von β APP CTFs durch die γ -Sekretase entstehen A β - beziehungsweise p3-Spezies und ein lösliches zytosolisches Fragment des β APP, das als AICD bezeichnet wird (β APP

intracellular domain) [Sastre *et al.*, 2001] (vgl. Abschnitt I.4.2). Wie in Abschnitt I.4.1 genauer beschrieben, wird AICD analog zu NICD mit der Regulation noch nicht identifizierter Zielgene in Zusammenhang gebracht [Cao und Südhof, 2001 und 2004].

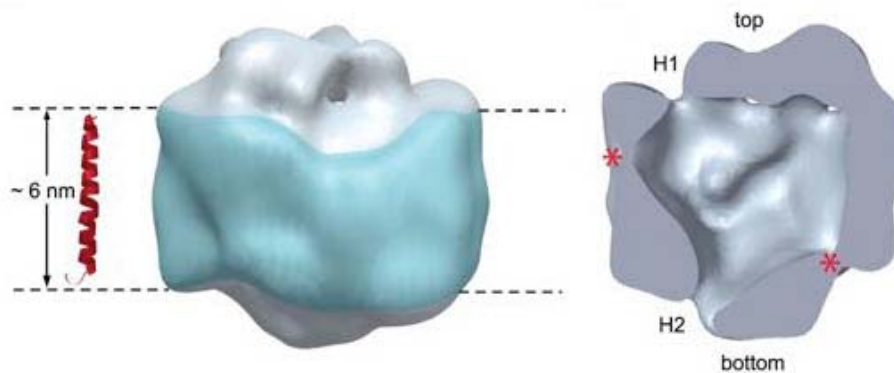


Abbildung I.12: Elektronenmikroskopische 3D-Struktur des γ -Sekretase-Komplexes.

Links: Das potentielle Transmembransegment ist in blaugrün gezeichnet und an der Außenseite durch gestrichelte Linien markiert, die 60 Å voneinander entfernt sind. Zum Größenvergleich ist in rot eine typische transmembranäre α -Helix (aus Rhodopsin, Protein Data Bank ID code 1GZM) gezeigt.

Rechts: Seitenansicht des aufgeschnittenen Komplexes, die eine große zentrale Kammer mit einer Öffnung oben (H1) und einer anderen Öffnung unten (H2) zeigt. Zwei laterale Regionen schwacher Dichte sind mit Stern markiert.

Leicht modifiziert nach [Lazarov *et al.*, 2006].

I. 4.5.1 BETEILIGUNG DER γ -SEKRETASE AN DER NOTCH-SIGNALTRANSDUKTION

β APP CTF ist bei weitem nicht das einzige Substrat, das von der γ -Sekretase prozessiert wird. Weitere Typ I Transmembranproteine, die innerhalb ihrer Transmembrandomäne von der γ -Sekretase gespalten werden, sind neben vielen anderen der Notch-1-Rezeptor [Mizutani *et al.*, 2001; Okochi *et al.*, 2002; Saxena *et al.*, 2001], APLP1 [Naruse *et al.*, 1998], ErbB-4 [Lee *et al.*, 2002a; Ni *et al.*, 2001], E-Cadherin [Marambaud *et al.*, 2002] und CD44 [Lammich *et al.*, 2002]. Abhängig scheint die Spaltung dabei in erster Linie von der Länge der extrazellulären Domäne des Substrats zu sein - daher die Wichtigkeit des in Abschnitt I.4.3 beschriebenen vorausgehenden „ectodomain shedding“ des Substrats. Es ist also davon auszugehen, dass es noch eine große Menge weiterer Typ-I-Transmembranproteine gibt, die von der γ -Sekretase prozessiert werden [Struhl und Adachi, 2000]. Eine besonders wichtige

Rolle spielt die γ -Sekretase bei der Proteolyse der Notch-Rezeptoren. Der Notch-Signalweg ist evolutionär konserviert und einerseits während der Embryonalentwicklung an Zelldifferenzierungsvorgängen [Mumm und Kopan, 2000; Selkoe, 2004], andererseits im adulten Organismus unter anderem an der Reifung von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark und der T-Zell-Differenzierung [Hadland *et al.*, 2001] beteiligt.

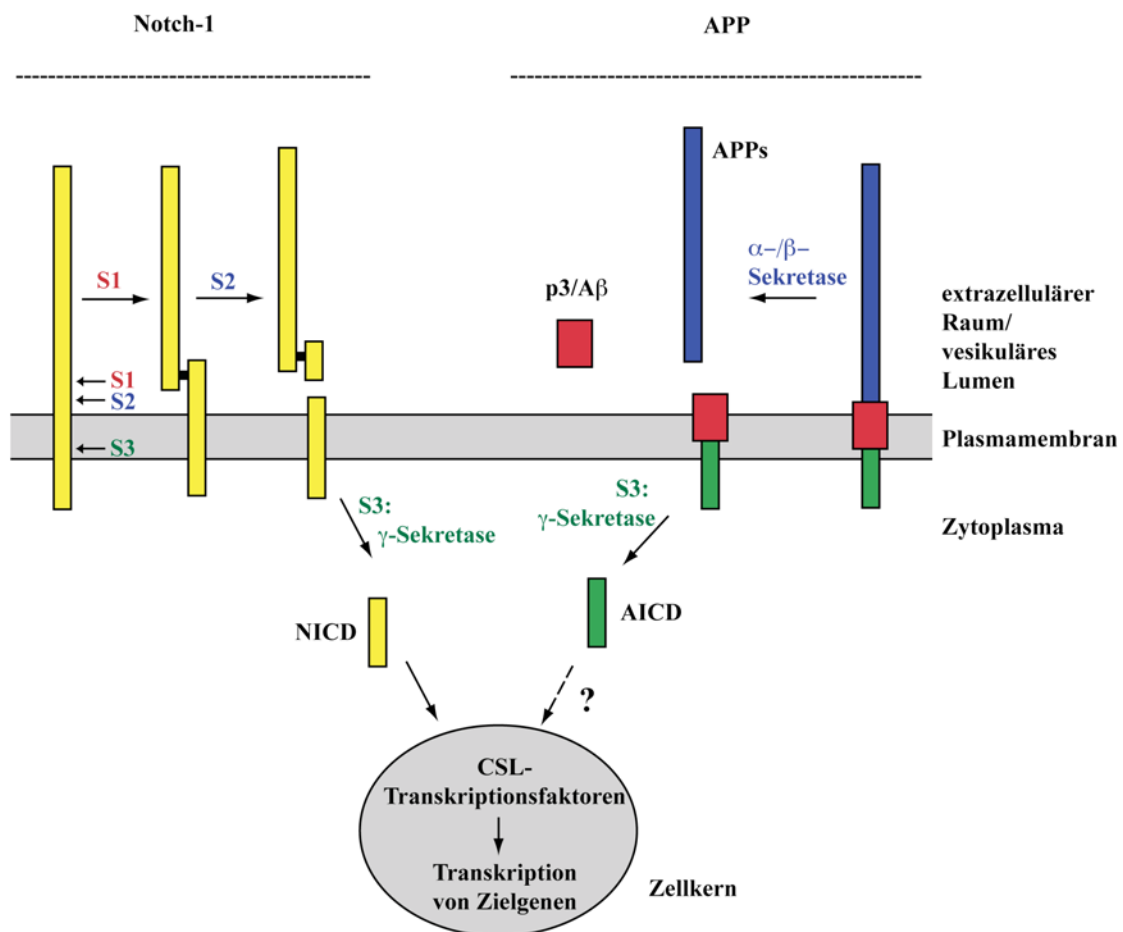


Abbildung I.13: Prozessierung des Notch-Rezeptors im Vergleich zu der des β APP.

Gezeigt ist die Prozessierung des Notch-Rezeptors (gelb) durch S1-, S2- und S3-Proteasen, verglichen mit der Prozessierung des β APP (Ektodomäne in blau, A β -Domäne in rot, intrazelluläre Domäne in grün). Notch wird nach Abspaltung der Ektodomäne innerhalb der Plasmamembran von der γ -Sekretase gespalten. Die dabei freigesetzte intrazelluläre Domäne (NICD) gelangt in den Zellkern und reguliert dort die Expression bestimmter Zielgene. Analog erfolgt die Freisetzung der intrazellulären Domäne von β APP (AICD), deren Funktion bisher nicht ausreichend verstanden ist. Modifiziert nach [Walter *et al.*, 2001].

Der Notch-Rezeptor ist wie alle bekannten Substrate der γ -Sekretase ein Typ-I-Transmembranprotein und wird nach der Translation vom ER über den sekretorischen Weg

zur Zelloberfläche transportiert. Im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) erfolgt die proteolytische Spaltung des Moleküls durch eine Furin-ähnliche Protease (sogenannter S1-Schnitt, vgl. Abb. I.13). Die beiden Spaltprodukte bleiben als Heterodimer assoziiert. Der Notch-Heterodimer fungiert an der Zelloberfläche als Rezeptor für Liganden, zu denen Delta und Serrate gehören [Mumm und Kopan, 2000]. Die Ektodomäne des Notch-Rezeptors wird nach Bindung durch einen Liganden von Proteasen der ADAM-Familie prozessiert (S2-Schnitt, Abb. I.13) und in den extrazellulären Raum sezerniert [Fortini, 2002]. Das membranständige Fragment wird anschließend von der γ -Sekretase gespalten (S3-Schnitt, Abb. I.13) und die intrazelluläre Domäne NICD (Notch intracellular domain) ins Zytoplasma freigesetzt. NICD wird daraufhin in den Zellkern transportiert und steuert dort über die Bindung an Transkriptionsfaktoren der CLS-Familie die Expression bestimmter Zielgene [Mumm und Kopan, 2000].

I. 4.5.2 DIE PRESENILINE

Es gibt mindestens drei wichtige Hinweise darauf, dass die Preseniline (PS) 1 und PS2 entscheidend an der Pathogenese der Alzheimer-Demenz und an der γ -Sekretase-Aktivität beteiligt sind: Zum einen existieren etliche FAD-Mutationen innerhalb der PS-Gene, die zu einer verstärkten Produktion von $A\beta_{42}$ führen (Abb. I.14) [Haass und Steiner, 2002], zum anderen konnte in PS1/PS2-Doppel-Knockout-Mäusen die Abwesenheit jeglicher $A\beta$ -Produktion gezeigt werden [DeStrooper *et al.*, 1998; Herreman *et al.*, 2000; Naruse *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000]. Außerdem binden die bisher bekannten γ -sekretase-spezifischen Inhibitoren unmittelbar an die PS-Heterodimere, welche die aktive Form des Presenilins darstellen (s.u.) [Esler *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Seiffert *et al.*, 2000].

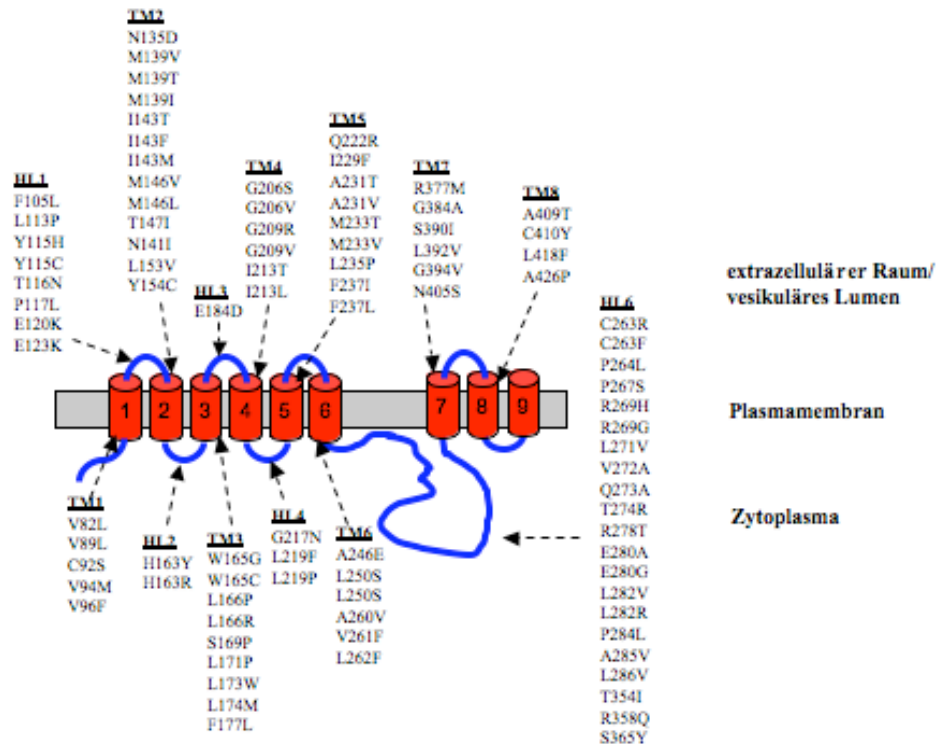


Abbildung I.14: Struktur des PS1-Proteins und Lokalisation einiger FAD-Mutationen innerhalb des PS1-Proteins.

Die Abbildung veranschaulicht die Struktur der Preseniline. Gezeigt ist ein Topologiemodell mit neun Transmembrandomänen. Die Pfeile kennzeichnen die Bereiche der FAD-Mutationen. Einige der FAD assoziierten Mutationen sind angegeben. TM: Transmembrandomäne; HL: Hydrophiler Loop. [Webpath 6], [Kaether *et al.*, 2004] und modifiziert nach [Haass und Steiner, 2002]

PS1 und PS2 sind zueinander homologe, polytope Transmembranproteine [Levy-Lahad *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995]. Das Holoprotein wird nach der Translation innerhalb der zytoplasmatischen Domäne zwischen Transmembrandomäne (TM) 6 und TM7 endoproteolytisch gespalten. Die daraus resultierenden N- und C-terminalen Fragmente (NTF und CTF) [Thinakaran *et al.*, 1996] assoziieren zu einem Heterodimer und stellen die in der Zelle stabilisierte aktive Form der Preseniline dar (vgl. Abb. I.15) [Capell *et al.*, 1998; Ratovitski *et al.*, 1997; Thinakaran *et al.*, 1997].

Die Preseniline besitzen zwei einander gegenüberliegende konservierte Aspartylreste in TM6 und 7. Obwohl in den betreffenden Domänen keine starke Ähnlichkeit mit den bekannten klassischen Motiven der katalytischen Zentren von Enzymen aus der Aspartylprotease-Familie festzustellen ist, wurden schließlich dennoch Hinweise darauf gefunden, dass die Preseniline zu einer Untergruppe dieser Familie gehören, die durch ein neuartiges Motiv gekennzeichnet ist [Steiner *et al.*, 2000; Dunn, 2002; Wolfe und Selkoe, 2002].

Der Aspartylrest in TM7 liegt innerhalb eines evolutionär hoch konservierten Motivs (GxGD-Motiv) [Haass und Steiner, 2002], das zwar nicht dem kanonischen D(T/S)G(T/S)-Aspartylproteasenmotiv entspricht, jedoch auch in anderen polytopen Aspartylproteasen vorkommt, beispielsweise in den Typ 4 Prepilin-Peptidasen (TFPPs) in Prokaryonten [LaPointe und Taylor, 2000] oder den Signalpeptid-Peptidasen (SPPs) in höheren Lebewesen [Ponting *et al.*, 2002; Weihofen *et al.*, 2002]. Sowohl die endoproteolytische Spaltung wie auch die katalytische Aktivität von PS scheinen abhängig zu sein von den beiden konservierten Aspartylresten in TM6 und TM7, denn Mutation eines oder beider Reste führt zu reduzierter Bildung von A β mit Akkumulation des Substrats APP und fehlender Endoproteolyse von PS [Kimberly *et al.*, 2000; Steiner *et al.*, 1999; Wolfe *et al.*, 1999b]. Dieser Befund gibt auch Anlass zu der Annahme, dass es sich bei der aktivierenden Endoproteolyse von PS um einen autokatalytischen Prozess handeln könnte [Wolfe und Selkoe, 2002].

Trotz der oben erwähnten Argumente für eine proteolytische Funktion der Preseniline innerhalb der γ -Sekretase sorgte der Befund, dass eine Überexpression von Presenilin im Zellkulturmodell keine wesentliche Erhöhung der A β -Produktion zur Folge hat [Thinakaran *et al.*, 1997], für Skepsis. Auch führt die Überexpression von PS kaum zu einer Erhöhung des aktiven Heterodimers aus NTF und CTF, sondern in erster Linie zur Akkumulation des inaktiven Holoproteins und zu einer Verdrängung des endogenen PS - ein Phänomen, das als „Replacement“ bezeichnet wird [Capell *et al.*, 1997; Thinakaran *et al.*, 1997].

I. 4.5.3 DER γ -SEKRETASE-KOMPLEX

Eine mögliche Erklärung für das Replacement-Phänomen und die Akkumulation des PS-Holoproteins bei Überexpression von PS wurde gefunden, als sich herausstellte, dass die PS-Heterodimere in hochmolekulare Proteinkomplexe integriert sind [Capell *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998]. PS agiert also nicht als ein autonomes und isoliertes Enzym, sondern ist auf die Anwesenheit anderer Komponenten angewiesen, was die Unmöglichkeit erklärt, bei alleiniger Überexpression von PS eine Steigerung der enzymatischen Aktivität zu erreichen. Der Proteinkomplex (Abb. I.15) besteht aus insgesamt vier Untereinheiten:

- **Nicastrin (Nct)** wurde ursprünglich durch Affinitätsreinigung als Bindungspartner von PS identifiziert und ist wie APP ein glykosyliertes Typ-I-Transmembranprotein [Yu *et al.*, 2000].
- Zusätzlich zu PS und Nct wurden in einem genetischen Screen ausgerichtet auf die Suche nach Modulatoren der katalytischen γ -Sekretaseaktivität die Proteine **Pen2** und **Aph1** als essentielle Kofaktoren identifiziert [Francis *et al.*, 2002].

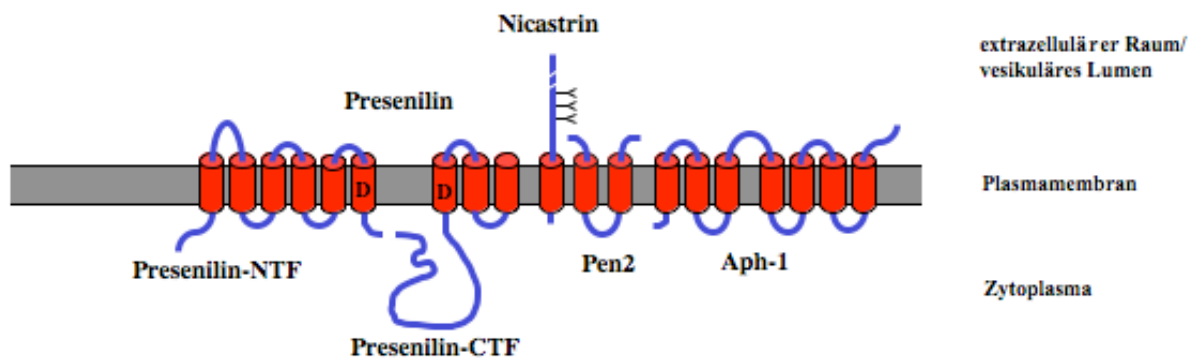


Abbildung I.15: Schematische Darstellung des γ -Sekretase-Komplexes.

Gezeigt sind die Modellzeichnungen der einzelnen Proteine des γ -Sekretase Komplexes und ihre Orientierung in der Plasmamembran. Modifiziert nach [Haass und Steiner, 2002].

Zwischen den einzelnen Komplexkomponenten besteht das Phänomen der koordinativen Regulation ihrer zellulären Expression. Das bedeutet, dass einerseits eine verringerte Menge an PS und/oder Nct zu einer Reduktion der Expression von Pen2 führt, andererseits eine Reduktion der Expression von Pen2 mit einer Verringerung der Menge an PS einhergeht [Steiner *et al.*, 2002]. Eine weitere Wechselwirkung besteht darin, dass PS und Pen2 die Maturierung von Nct beeinflussen, so führt eine reduzierte Expression dieser beiden Komponenten zu einer Akkumulation immaturren Nicastrins [Edbauer *et al.*, 2002; Leem *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2002].

Für die funktionelle Aktivität der γ -Sekretase sind alle vier Komponenten notwendig [Francis *et al.*, 2002]. Die Koexpression aller vier Proteine in Hefe, einem Organismus, der keinerlei endogene γ -Sekretase-Aktivität besitzt, zeigt, dass die vier beschriebenen Komponenten gleichzeitig hinreichend sind, um die γ -Sekretase-Aktivität wiederherzustellen [Edbauer *et al.*, 2003; Kimberly *et al.*, 2003]. Die Preseniline bilden also innerhalb des Komplexes das proteolytisch aktive Zentrum der γ -Sekretase, und es sind mit den vier beschriebenen

Komponenten mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit alle zur Aktivität nötigen Untereinheiten bekannt. Zusätzlich konnte kürzlich, entgegen mancher anders lautender Hypothesen, durch quantitative Immunpräzipitationsexperimente gezeigt werden, dass pro Komplex nur jeweils eine der vier Untereinheiten assembliert [Sato *et al.*, 2007]. Die Stöchiometrie des γ -Sekretasekomplexes beträgt also 1:1:1:1. Weitere postulierte Bindungspartner und zusätzliche Komplexuntereinheiten konnten biochemisch nicht bestätigt werden [Winkler *et al.*, 2009].

I. 4.5.4 FUNKTIONEN VON UND INTERAKTIONEN ZWISCHEN DEN WEITEREN KOMPONENTEN DES γ -SEKRETASE-KOMPLEXES

Nct ist notwendig für die Aktivität und Stabilität von PS und für die Produktion von A β [Edbauer *et al.*, 2002; Kopan und Goate, 2002; Lai, 2002; Yu *et al.*, 2000] und ist somit ein essentieller Kofaktor der γ -Sekretase (vgl. Abschnitt I.4.5.3). Darüberhinaus waren die Details seiner biochemischen Funktion innerhalb des Komplexes lange Zeit ungeklärt. Interessanterweise konnte schließlich gezeigt werden, dass die lange Ektodomäne von Nct als Substratrezeptor für die γ -Sekretase dient, der die durch andere Proteasen bereits verkürzte Ektodomäne („ectodomain shedding“) bestimmter Typ-I-Transmembranproteine als Substrat erkennt und anschließend gegenüber PS präsentiert [Shah *et al.*, 2005].

Pen2 (presenilin enhancer protein 2) [Francis *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2003; Steiner *et al.*, 2002] ist ein kleines polytopisches Protein von 10 kDa mit zwei Transmembrandomänen. N- und C-Terminus befinden sich im Lumen der Vesikel und Räume des sekretorischen Wegs [Bergman *et al.*, 2004; Crystal *et al.*, 2003]. Sowohl RNAi-basierte Knockdown-Experimente als auch Überexpressionsstudien legen nahe, dass die Assemblierung von Pen2 in den γ -Sekretase-Komplex die Endoproteolyse von PS1 initiiert, die einen wichtigen Schritt in der Maturierung und Aktivierung der γ -Sekretase darstellt [Hasegawa *et al.*, 2004; Hu und Fortini, 2003; Kim *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2003; Prokop *et al.*, 2004; Takasugi *et al.*, 2003]. Neuere Daten zeigen, dass für die Endoproteolyse von PS1 jedoch nicht die alleinige Assemblierung des vollständigen Komplexes im ER nötig ist, sondern auch sein Export mittels COPII-Vesikeln in nachgeschaltete Kompartimente des sekretorischen Weges [Kim *et al.*, 2007].

Pen2 ist weiterhin an der Stabilisierung der PS1-Fragmente (N-terminales Fragment, NTF und C-terminales Fragment, CTF) innerhalb des γ -Sekretase-Komplexes beteiligt [Prokop *et al.*, 2004]. Es konnte eine stabile Interaktion zwischen Pen2 und PS1 NTF gefunden werden

[Fraering *et al.*, 2004], insbesondere zwischen Pen2 und der vierten Transmembrandomäne (TM4) von PS1 [Kim und Sisodia, 2005; Watanabe *et al.*, 2005].

Aph1 (anterior pharynx defective 1) [Francis *et al.*, 2002; Goutte *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002b; Luo *et al.*, 2003] ist ein hydrophobes polytopisches Transmembranprotein, das direkt mit Nct über dessen Transmembrandomäne interagiert und durch Stabilisierung immaturren Nicastrins die Bildung eines frühen Subkomplexes ermöglicht, zu dem sich erst später Presenilin und Pen2 hinzufinden (siehe Abschnitt I.4.5.5) [Hu und Fortini, 2003; LaVoie *et al.*, 2003; Morais *et al.*, 2003; Shirotani *et al.*, 2004]. Die Interaktion zwischen Presenilin und Aph1 findet über den PS1 CTF statt [Steiner *et al.*, 2008], über die beschriebenen Interaktionen hinaus ist die nähere Funktion von Aph1 unbekannt.

Es wurden zwei Homologe dieses Proteins gefunden, Aph1a und -b [Francis *et al.*, 2002; Goutte *et al.*, 2002], außerdem gibt es von Aph1a zwei Spleißvarianten, die sich in der Länge des C-terminus unterscheiden: Aph1aL (long form) und Aph1aS (short form) [Shirotani *et al.*, 2004; Hebert *et al.*, 2004]. Diese drei unterschiedlichen Formen bilden jeweils separate Proteinkomplexe (vgl. Abschnitt I. 4.5.3 zur Stöchiometrie der γ -Sekretase), so dass unter zusätzlicher Berücksichtigung der beiden PS-Homologe PS1 und PS2 bis zu sechs unterschiedliche γ -Sekretase-Komplexe existieren könnten.

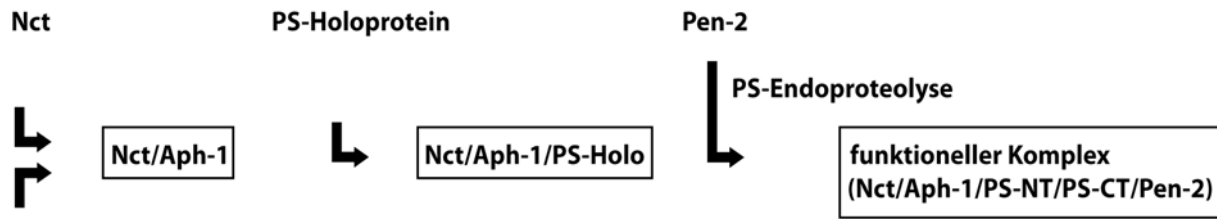
I. 4.5.5 ASSEMBLIERUNG UND TRANSPORT DES γ -SEKRETASE-KOMPLEXES

Die Komplexkomponenten der γ -Sekretase werden in das ER hinein translatiert, wo auch die Assemblierung des Komplexes stattfindet [Capell *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2007]. Nur der vollständige Komplex verlässt das ER und wird über den sekretorischen Weg zu Plasmamembran und (Endo-)Lysosomen transportiert, wo auch die katalytische Aktivität der γ -Sekretase lokalisiert werden konnte [Kaether *et al.*, 2002, Chyung *et al.*, 2005, Pasternak *et al.*, 2003]. Die Reifung zu katalytischer Aktivität, erkennbar an der Endoproteolyse von PS1, ist dabei einerseits von der Anwesenheit von Pen2 abhängig [Hasegawa *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2003; Hu und Fortini, 2003; Prokop *et al.*, 2004; Takasugi *et al.*, 2003], andererseits auch von dem Transport in spätere Kompartimente des sekretorischen Wegs [Kim *et al.*, 2007] (vgl. Abschnitt I. 4.5.4).

Es liegt nun die Vermutung nahe, dass die unmittelbare Regulation der γ -Sekretase-Aktivität weniger auf transkriptioneller und translationeller Ebene stattfindet, als vielmehr über die beiden eng verknüpften Prozesse der Assemblierung und des Transports durch den

sekretorischen Weg. Wichtig hierbei ist die Tatsache, dass nur vollständig assemblierte γ -Sekretase-Komplexe in der Lage sind, das ER zu verlassen. So kommt es beispielsweise bei einer (experimentellen) Reduktion der Menge an Presenilin zu einer Akkumulation immaturen - d.h. nicht vollständig glykosylierten - Nicastrins, was bedeutet, dass Nicastrin ohne Presenilin die dem ER nachgeschalteten späteren Kompartimente des sekretorischen Transportwegs nicht erreicht [Kaether *et al.*, 2002; Edbauer *et al.*, 2002; Leem *et al.*, 2002]. Auch Pen2 wird in Abwesenheit von Presenilin im ER zurückgehalten, akkumuliert und anschließend proteosomal degradiert [Bergman *et al.*, 2004; Crystal *et al.*, 2004]. Es scheint also eine Maschinerie zu geben, die sicherstellt, dass nur korrekt assemblierte Komplexe das ER verlassen und einzelne Komponenten bzw. Teilkomplexe zurückgehalten und gegebenenfalls degradiert werden.

Im vorangegangenen Abschnitt wurde bereits erwähnt, dass die Bildung eines Subkomplexes aus Nicastrin und Aph-1 die Assemblierung der γ -Sekretase einleitet, gefolgt von der Assemblierung und der Pen2-abhängigen Endoproteolyse von Presenilin. Aus Überexpressions- und Knockdownexperimenten gibt es Hinweise darauf, dass Pen2 die letzte sich assemblierende Komponente und der mengen- oder geschwindigkeitslimitierende Faktor sein könnte [Kimberly *et al.*, 2003, Takasugi *et al.*, 2003] (zusammengefasst in [Kaether *et al.*, 2006]) und damit diejenige Komponente, die letztlich den Austritt des komplettierten γ -Sekretase-Komplexes aus dem ER ermöglicht. Falls dies so wäre, käme Pen2 noch über die Initiierung der Endoproteolyse von Presenilin hinaus eine wichtige Rolle bei der Regulation der γ -Sekretase-Aktivität zu. Abb. I.16 fasst schematisch die Komplexassemblierungsreihenfolge zusammen.



Aph-1

Abb. I.16. Schematisches Modell zur Assemblierung der γ -Sekretase im ER.

Zunächst wird ein früher Subkomplex aus Nct und Aph-1 gebildet. Diesem folgt die Assemblierung des PS-Holoproteins und von Pen2, woraufhin der vollständig assemblierte Komplex das ER verlässt. Die Pen2-abhängige Endoproteolyse und damit katalytische Aktivierung der γ -Sekretase findet neueren Ergebnissen zufolge nicht bereits im ER statt, sondern erst in nachgeschalteten Kompartimenten des sekretorischen Wegs. Im Golgi-Apparat kommt es zur Maturierung von Nct. Modifiziert nach [Hu und Fortini, 2003, Kaether *et al.*, 2006].

I.5 ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT: ÜBERPRÜFUNG EINES HYPOTHETISCHEN MODELLS ZUR REGULATION VON ASSEMBLIERUNG, TRANSPORT UND AKTIVITÄT DER γ -SEKRETASE

In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie die Assemblierung, der Transport, und damit letztlich auch die Aktivität des γ -Sekretase-Komplexes kontrolliert werden. Im vorangegangenen Abschnitt wurde dargelegt, dass viele Beobachtungen zu Komplexassemblierung und -transport den Schluss nahe legen, dass diese Prozesse hoch reguliert ablaufen. Bezüglich der molekularen Maschinerie, die eine solche Regulierung zu leisten im Stande wäre, hat die Arbeitsgruppe bereits ein mögliches Modell vorgeschlagen [Kaether *et al.*, 2004]. Nach dieser Hypothese wird die Assemblierung der γ -Sekretase durch ähnliche Mechanismen reguliert wie die Assemblierung von Ionenkanälen und multimeren Zellmembranrezeptoren. Dort stellen Kontrollmechanismen sicher, dass nur vollständig assemblierte Komplexe das ER verlassen und zur Zelloberfläche transportiert werden. Die Retention nicht assemblierter monomerer Untereinheiten wird durch die Exposition von ER-Retentions-Signalen sichergestellt, die sowohl zytosolisch [Zerangue *et al.*, 1999], als auch in Transmembrandomänen [Bonifacino *et al.*, 1991; Sato *et al.*, 2004] lokalisiert sein können. Im Rahmen der vollständigen Assemblierung werden all diese Retentions-Signale maskiert und

ein ER-Export kann stattfinden. Genau nach einem solchen Prinzip könnte also auch die Assemblierung der γ -Sekretase reguliert werden (schematisch gezeigt in Abb. I.17).

Analog zu diesem Modell konnte bereits ein Retentions-Signal im C-Terminus von PS1 gefunden werden, das als unassemblierte Komponente – ebenso wie Nct und Pen2 - im ER zurückgehalten wird [Kaether *et al.*, 2004].

Um ein genaueres Verständnis für die Regulation des Transports der γ -Sekretase zu gewinnen, soll hier am Beispiel der γ -Sekretase-Komponente Pen2 untersucht werden, ob die vorgeschlagene Hypothese für weitere Komplexuntereinheiten zutrifft und, falls das der Fall sein sollte, wie relevant diese Regulation für die Funktion der γ -Sekretase *in vivo* tatsächlich ist.

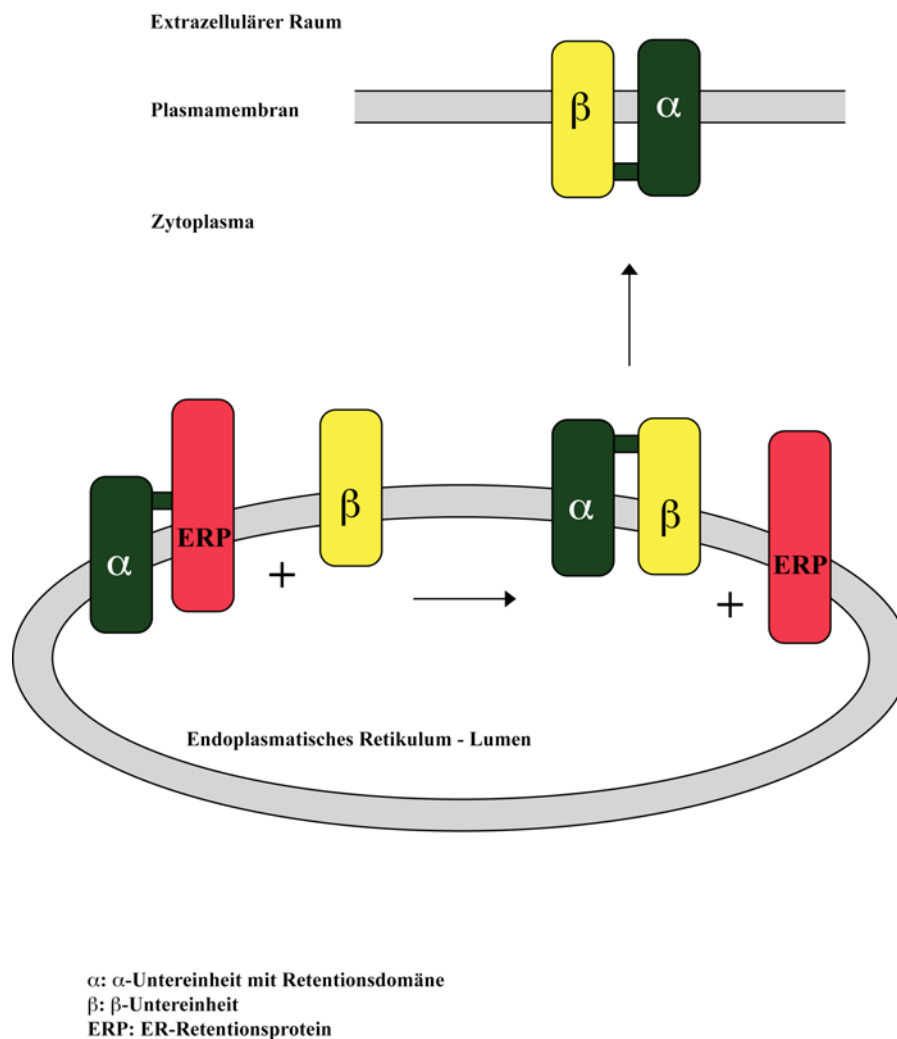


Abbildung I.17: Modell zur Retention multimerer Zelloberflächenproteine im ER.

Gezeigt sind die α - und β -Untereinheit eines multimeren Zelloberflächenproteins, beispielsweise eines Ionenkanals. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur zwei Untereinheiten gezeichnet. Die α -Untereinheit besitzt eine exponierte Domäne, die ein ER-Retentions-Signal präsentiert. Dieses Signal wird von einem hier nicht weiter identifizierten ER-Retentions-Protein erkannt und somit die α -Untereinheit retiniert. Nach Assemblierung des Proteinkomplexes durch Bindung der β -Untereinheit unter Einbeziehung des Bereichs der Retentionsdomäne wird das ER-Retentions-Protein aus der Bindung verdrängt, das Retentionssignal maskiert, und der Komplex wird zur Zelloberfläche transportiert.

II MATERIAL UND METHODEN

II. 1 REKOMBINANTE DNA-TECHNIKEN

II. 1.1 GERÄTE

Geräte für die Agarosegelelektrophorese und ihre Auswertung:

- Agarosegelelektrophoresekammern, *Owl Separation Systems Inc.*
- UV-Lampe (White/Ultraviolet Transilluminator), *UVP*
- Kamera (CCD Video Camera Module)
- Drucker (p91), *Mitsubishi*

Geräte für DNA-Techniken:

- 37°C Schrank (Function line), *Haereus*
- Schüttelinkubator (Certomat BS-1), *B. Braun Biotech International*
- PCR-Maschine (Mastercycler personal), *Eppendorf*

II. 1.2 KONSTRUKTE UND KLONIERUNGEN

II. 1.2.1 VEKTOREN

Bezeichnung	Hersteller	Zielorganismus für Proteinexpression
pcDNA 3.1. Zeo (+)	<i>Invitrogen</i>	Säugerzellen
pcDNA 3.1. Hygro (+)	<i>Invitrogen</i>	Säugerzellen
pEGFP-N1	<i>Clontech</i>	Säugerzellen
pCR 2.1- TOPO	<i>Invitrogen</i>	Ø (Klonierungsvektor)

Tabelle II.1: Übersicht der verwendeten Vektorsysteme.

II. 1.2.2. VORHANDENE DNA-KONSTRUKTE

Bezeichnung	Vektor	Restriktionsstellen (an 5'- bzw. 3'-Ende des Inserts)
GFP-Pen2	pEGFP-C1	NotI und XhoI

Pen2-RNAi Vektor * [Prokop <i>et al.</i> , 2004]	pcDNA3.1/Zeo (+) pSUPER	EcoRI (B _{gl} II) und HindIII
Pen2 wt [Prokop <i>et al.</i> , 2004] **	pcDNA3.1/Zeo (+)	EcoR1 und XhoI
CD4-wt	pcDNA 3.1/Hygro (+)	BamHI und XhoI

Tabelle II.2: Im Labor bereits vorhandene Konstrukte.

* Der Pen2-RNAi-Vektor exprimiert small hairpin RNAs für RNA-Interferenz (RNAi) gegen Pen2.

** Dieses Pen2 wt-Konstrukt ist durch einige die AS-Sequenz nicht verändernde Nukleotidmutationen im distalen Loop resistent gegen Pen2-RNAi.

II. 1.2.3 HERGESTELLTE DNA-KONSTRUKTE

Bezeichnung	Vektor	Restriktionsstellen (an 5'- bzw. 3'- Ende des Inserts)
CD4-TM1 _{Pen2} (1-24/18-41) *	pcDNA 3.1/Hygro (+)	BamHI und XhoI
CD4-TM1 _{Pen2} (1-12/18-29) *	pcDNA 3.1/Hygro (+)	BamHI und XhoI
CD4-TM1 _{Pen2} (7-18/24-35) *	pcDNA 3.1/Hygro (+)	BamHI und XhoI
CD4-TM1 _{Pen2} (7-12/24-29) *	pcDNA 3.1/Hygro (+)	BamHI und XhoI
CD4-TM1 _{Pen2} (7-15/24-32) *	pcDNA 3.1/Hygro (+)	BamHI und XhoI
CD4-TM1 _{Pen2} (10-18/27-35) *	pcDNA 3.1/Hygro (+)	BamHI und XhoI
CD4-TM1 _{Pen2} (10-15/27-32) *	pcDNA 3.1/Hygro (+)	BamHI und XhoI
CD4-TM1 _{Pen2} (13-24/30-41) *	pcDNA 3.1/Hygro (+)	BamHI und XhoI
CD4-TM1 _{Pen2} (16-24/33-41) *	pcDNA 3.1/Hygro (+)	BamHI und XhoI
CD4-TM1 _{Pen2} (16-21/33-38) *	pcDNA 3.1/Hygro (+)	BamHI und XhoI
CD4-TM1 _{Pen2} (13-21/30-38) *	pcDNA 3.1/Hygro (+)	BamHI und XhoI
CD4-TM1 _{Pen2} (1-24/18-41)N33L *	pcDNA 3.1/Hygro (+)	BamHI und XhoI
CD4-TM _{APP} (1-24/625-648) *	pcDNA 3.1/Hygro (+)	BamHI und XhoI

CD4-Loop _{Pen2} (enthält Pen2-AA 42-59)	pcDNA 3.1/Hygro (+)	NotI und XhoI
TNF α -TM2 _{Pen2} -HA (Pen2-AA 60-81)	pcDNA 3.1/Hygro (+)	NotI und XbaI
Pen2-TM _{CD4} (1-23/398-420)*	pcDNA 3.1/Zeo (+)	EcoRI und XhoI
Pen2-TM _{CD4} (12-23/409-420)*	pcDNA 3.1/Zeo (+)	EcoRI und XhoI
GFP-Pen2-TM _{CD4} (1-23/398-420)*	pEGFP-C1/Neo (+)	NotI und XhoI
GFP-Pen2-TM _{CD4} (12-23/409-420)*	pEGFP-C1/Neo (+)	NotI und XhoI

Tabelle II.3: Zusammenstellung der hergestellten DNA-Konstrukte.

* Die erste Nummerierung gibt die in dem jeweiligen Fusionsprotein enthaltenen Aminosäuren aus der Pen2-TM1 bzw. der APP-TM (bezogen auf APP695) bzw. der CD4-TM an, bezogen jeweils auf die erste intramembranäre Aminosäure. In der Pen2-TM1 ist dies Y18, d.h. Y18 entspricht Nr. 1. Die zweite Nummerierung nach dem Schrägstrich bezieht sich wie üblich auf die gesamte AA-Sequenz.

II. 1.3 PCR UND KLONIERUNGSSTRATEGIEN

II. 1.3.1 REAKTIONSANSATZ DER PCRS

- 1 μ l der entsprechenden Matrix-DNA (100 ng/ μ l)
- 1 μ l des entsprechenden forward-Oligonukleotids (fw, 100 μ M)
- 1 μ l des entsprechenden reverse-Oligonukleotids (rv, 100 μ M)
- 1 μ l dNTP-Mix (10 mM, *Roche*)
- 1 μ l Pwo DNA Polymerase (1 U/ μ l, *Peq Lab*)
- 5 μ l Reaktionspuffer komplett (10 x, *Peq Lab*)

mit H₂O bidest. ad 50 μ l Endvolumen.

II. 1.3.2 VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Oligonukleotide wurden von dem Hersteller *Invitrogen* synthetisiert. Zur Beschreibung des jeweiligen Konstrukts vgl. Tab II.3.

Konstrukt	Oligonukleotide	Matrix
CD4-TM1 _{Pen2} (1-24/18-41)	Reaktion 1a: CD4 fw (zur Verfügung gestellt von Dr. Ch. Kaether)	CD4-wt

	<p>rv: 5'-gac-caa-cca-gag-aaa-agg-cag-gaa-agc-aaa-ccc-ccc-cag-gta-gta-cat-tgg-ctg-cac-cgg-ggt-3'</p> <p>Reaktion 1b:</p> <p>fw: 5'-cct-ttt-ctc-tgg-ttg-gtc-aac-atc-ttc-tgg-ttc-ttc-cga-gag-gcc-agg-tgc-cgg-cac-gca-agg-3'</p> <p>CD4 rv (zur Verfügung gestellt von Dr. Christoph Kaether)</p>	CD4-wt
CD4-TM1 _{Pen2} (1-24/18-41) N33L	<p>fw: 5'-ctg-cct-ttt-ctc-tgg-ttg-gtc-ctg-atc-ttc-tgg-ttc-ttc-cg-3'</p> <p>rv: 5'-cg-gaa-gaa-cca-gaa-gat-cag-gac-caa-cca-gag-aaa-agg-cag-3'</p>	CD4-Pen2-TM1 (1-24/18-41)
CD4-TM1 _{Pen2} (1-12/18-29)	<p>Reaktion 1a:</p> <p>CD4 fw</p> <p>und rv: 5'-cag-gaa-agc-aaa-ccc-ccc-cag-gta-gta-cat-tgg-ctg-cac-cgg-ggt-3'</p>	CD4-wt
	<p>Reaktion 1b:</p> <p>fw: 5'-ggg-ggg-ttt-gct-ttc-ctg-cct-ttt-ctc-ctg-ctt-ttc-att-cgg-cta-3'</p> <p>und CD4 rv</p>	CD4-wt
CD4-TM1 _{Pen2} (7-18/24-35)	<p>Reaktion 1a:</p> <p>CD4 fw</p> <p>und rv: 5'-gac-caa-cca-gag-aaa-agg-cag-gaa-agc-ccc-cag-cac-aat-cag-ggc-3'</p>	CD4-wt
	<p>Reaktion 1b:</p> <p>fw: 5'-cct-ttt-ctc-tgg-ttg-gtc-aac-atc-ttc-ggc-atc-ttc-ttc-tgt-gtc-3'</p> <p>und CD4 rv</p>	CD4-wt

<p>CD4-TM1_{Pen2} (13-24/30-41)</p>	<p>Reaktion 1a: CD4 fw und rv: 5'-gaa-gaa-cca-gaa-gat-gtt-gac-caa-cca-gag-gcc-ggc-gac-gcc-ccc-3'</p> <p>Reaktion 1b: fw: 5'-aac-atc-ttc-tgg-ttc-ttc-cga-gag-gcc-agg-tgc-cgg-cac-cga-agg-3' und CD4 rv</p>	<p>CD4-wt</p> <p>CD4-wt</p>
<p>CD4-TM1_{Pen2} (16-24/33-41)</p>	<p>fw: 5'-aac-atc-ttc-tgg-ttc-ttc-cga-gag-gcc-agg-tgc-cgg-cac-cga-agg-3' rv: 5'-cct-tcg-gtg-ccg-gca-cct-ggc-ctc-tcg-gaa-gaa-cca-gaa-gat-gtt-3'</p>	<p>CD4-Pen2 TM1 (13-24/30-41)</p>
<p>CD4-TM1_{Pen2} (16-21/33-38)</p>	<p>Reaktion 1a: CD4 fw rv: 5'-gaa-gaa-cca-gaa-gat-gtt-tag-ccc-aat-gaa-aag-cag-gag-gcc-ggc-3'</p> <p>Reaktion 1b: fw: 5'-aac-atc-ttc-tgg-ttc-ttc-agg-tgc-cgg-cac-cga-agg-cgc-cao-gca-3' und CD4 rv</p>	<p>CD4-wt</p> <p>CD4-wt</p>
<p>CD4-TM1_{Pen2} (13-21/30-38)</p>	<p>Reaktion 1a: CD4 fw rv: 5'-gaa-cca-gaa-gat-gtt-gac-caa-cca-gaa-aag-cag-gag-gcc-ggc-gac-gcc-ccc-3'</p>	<p>CD4-wt</p>

	<p>Reaktion 1b:</p> <p>fw: 5'-gtc-aac-ata-ttc-tgg-ttc-ttc-agg-tgc-cgg-cac-cga-agg-cgc-caa-gca-3'</p> <p>CD4 rv</p>	CD4 wt
CD4-Loop _{Pen2} (42-59)	<p>fw: (NotI) 5'-gcg-gcc-gcg-ttc-ctt-gtc-cca-gcc-tac-aca-3'</p> <p>rv: (XhoI) 5'-ctc-gag-tca-gcg-cca-gac-ata-gcc-ttt-gat-3'</p>	Pen2 wt
Pen2-TM1 _{mut} = Pen2-TM _{Pen2} (412-423, wobei R423K))	<p>Reaktion 1a:</p> <p>Pen2 fw: (NotI) 5'-gcg-gcc-gcg-aac-ctg-gag-cga-gtg-tcc-3'</p> <p>rv: 5'-gac-aca-gaa-gaa-gat-gcc-tag-ccc-aat-gag-aaa-agg-cag-gaa-agc-3'</p> <p>Reaktion 1b:</p> <p>fw: 5'-ggc-ata-ttc-ttc-tgt-gtc-agg-tgc-aaa-ttc-ctt-gtc-cca-gcc-tac-3'</p> <p>Pen2 rv: (XhoI) 5'-ctc-gag-tca-ggg-ggt-gcc-cag-ggg-3'</p>	Pen2 wt
CD4-REA _{Pen2} - RCR _{CD4}	<p>fw: 5'-ggc-ata-ttc-ttc-tgt-gtc-cga-gag-gcc-agg-tgc-cgg-cac-cga-agg-3'</p> <p>rv: 5'-cct-tcg-gtg-ccg-gca-cct-ggc-ctc-tcg-gac-aca-gaa-gaa-gat-gcc-3'</p>	CD4
CD4-KDA- RCR _{CD4}	<p>fw: 5'-ggc-ata-ttc-ttc-tgt-gtc-aag-gac-gcc-agg-tgc-cgg-cac-cga-agg-3'</p> <p>rv: 5'-cct-tcg-gtg-ccg-gca-cct-ggc-gtc-ctt-gac-aca-gaa-gaa-gat-gcc-3'</p>	CD4
CD4-REA _{Pen2} - delta RCR _{CD4}	<p>fw: 5'-ggc-ata-ttc-ttc-tgt-gct-agg-gag-gcg-cac-cga-agg-cgc-caa-gca-3'</p> <p>rv: 5'-tgc-ttg-gcg-cct-tcg-gtg-cgc-ctc-cct-gac-aca-gaa-gaa-gat-gcc-3'</p>	CD4

<p>TNFα- TM2_{Pen2} (60- 81)-HA</p>	<p>Reaktion 1a: TNFα fw: (NotI) 5'-gcg-gcc-gcg-cca-cca-tga-gca-ctg-aaa-gca-tg-3' rv: 5'-gga-ggt-gag-cac-tat-cac-cca-gaa-gag-gaa-gcc-cac-agc-tga-ccg-cct-gga-gcc-ctg-ggg-3'</p> <p>Reaktion 1b: fw: 5'-gtg-ata-gtg-ctc-acc-tcc-tgg-atc-acc-atc-ttc-cag-atc-tac-gtg-atc-ggc-ccc-cag-agg-3' TNFα-HA rv (XbaI): zur Verfügung gestellt von Dr. C. Kaether</p>	<p>TNFα</p> <p>TNFα</p>
---	---	---

Tabelle II.4: Zusammenstellung der verwendeten PCR-Oligonukleotide und der entsprechenden cDNA-Matrizes. fw: Synthese des DNA-Stranges in 5'→ 3'-Richtung. rv: Synthese des DNA-Stranges in 3'→ 5'-Richtung.

II. 1.3.3 REAKTIONSPROGRAMM FÜR PCRS

In der PCR-Maschine wurden die Ansätze standardmäßig mit folgendem Reaktionsprogramm prozessiert:

94 °C, 5 min

25 Zyklen:

94 °C, 30 sec

48 °C, 30 sec

72 °C, 1 min (generell 1 min pro 1kb Matrix)

72 °C, 7 min

II. 1.3.4 VERARBEITUNG DER PCR-PRODUKTE

Die Auftrennung der jeweiligen PCR-Produkte erfolgte je nach Größe des erwarteten Zielprodukts in einprozentigen bzw. zweiprozentigen Agarosegelen (vgl. II. 1.4.1). Dieses wurde anschließend unter schwachem UV-Licht ausgeschnitten und aus den erhaltenen

Gelfragmenten isoliert (vgl. II. 1.4.2). Die aufgereinigte DNA wurde zur weiteren Klonierung verwendet (vgl. II. 1.4.3).

II. 1.3.5 EINFÜHRUNG VON PUNKTMUTATIONEN UND OLIGONUKLEOTIDMUTATIONEN

Das Design der Primer und die Wahl der PCR-Bedingungen, welche sich in einigen Punkten von den unter (II. 1.2.3) genannten Bedingungen unterschieden, erfolgten entsprechend den Anweisungen des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (*Stratagene*).

Zum Mechanismus der Mutagenesemethode: Fw- und Rv-Primer sind so zu wählen, dass sie jeweils die zu erzielende Mutation enthalten und in antiparalleler Weise genau denselben Sequenzbereich des zu mutierenden Gens umfassen. Daher lagern sie sich antiparallel zueinander an den Template-Vektor an, und es wird während jedes PCR-Zyklus der gesamte Vektor amplifiziert, wobei jedes neusynthetisierte Vektormolekül die gewünschte Mutation enthält. Anschließend wird der PCR-Ansatz eine Stunde bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. DpnI schneidet nur methylierte DNA an seiner häufig vorkommenden Restriktionsstelle. Die Methylierung unterscheidet indirekt mutierte von nichtmutierter DNA, da die Methylierung erst im Rahmen der Amplifikation innerhalb eines methylierungskompetenten *E. coli*-Stamms stattfindet. Somit entsprechen die methylierten Vektoren den nichtmutierten Template-Vektoren, die auf diese Weise effizient entfernt werden. Das durch den Verdau gereinigte, unmethylierte und mutierte PCR-Produkt wird daraufhin in *E. coli* transformiert, um die nach der PCR noch vorhandenen Einzelstrangbrüche im Vektor zu reparieren (vgl. Handbuch von *Stratagene*).

Die erfolgreiche Einführung der Mutationen wurde durch einen analytischen Restriktionsverdau - falls möglich - und anschließende Sequenzierung (vgl. II. 1.6.5) nachgewiesen.

Modifiziertes PCR-Reaktionsprogramm:

94 °C, 5 min

20 Zyklen:

94 °C, 30 sec

48 °C, 30 sec

68 °C, 1 min pro 1 kb Matrix (Pfu-DNA Polymerase, *Promega*)

72 °C, 7 min

II. 1.3.6 AUSTAUSCH DER CD4-TRANSMEMBRANDOMÄNE GEGEN DIE ERSTE PEN2-TRANSMEMBRANDOMÄNE ZUR HERSTELLUNG DER CD4-TM1_{PEN2}-CHIMÄRE

Da im Bereich der CD4-Transmembrandomäne keine geeigneten Restriktionsschnittstellen für einen direkten Austausch dieses Abschnitts vorhanden sind, wurden mehrere PCR-Schritte hintereinander kombiniert, um das gewünschte Konstrukt herstellen zu können. In der ersten PCR-Runde wurden zwei verschiedene PCR-Produkte hergestellt: Das 5'-Produkt reichte vom 5'-Ende der CD4-DNA bis zum mittleren Bereich der Pen2-Transmembrandomäne, wobei der Rv-Primer die Nukleotidsequenz der der Transmembrandomäne an ihrem 5'-Ende vorangehenden Basen der CD4-DNA sowie die Sequenz der ersten Hälfte der ersten Pen2-Transmembrandomäne beinhaltete. Das 3'-PCR-Produkt reichte von der Mitte der Transmembrandomäne bis zum 3'-Ende der CD4-DNA, wobei der Fw-Primer – überlappend mit dem Rv-Primer aus der 5'-Reaktion – die Sequenz der zweiten Hälfte der ersten Pen2-Transmembrandomäne sowie die Sequenz der der Transmembrandomäne in 3'-Richtung nachfolgenden Basen der CD4-cDNA beinhaltete. Die beiden erhaltenen PCR-Produkte umfassten also einerseits den CD4-N-Terminus und die erste Hälfte der Pen2-Transmembrandomäne, andererseits die zweite Hälfte der Pen2-Transmembrandomäne und den CD4-C-Terminus, wobei sie im Bereich der Pen2-Transmembrandomäne in der Mitte überlappten. In der zweiten PCR-Runde wurde nach Anlagerung der beiden Templates aus der ersten PCR-Runde (5'- und 3'-Produkt) eine PCR über den gesamten Bereich vom CD4-5'-Ende bis zum CD4-3'-Ende durchgeführt. Sollten nur Teile der Transmembrandomäne ausgetauscht werden, wurden die in der Transmembranregion befindlichen Oligonukleotide entsprechend verändert und ansonsten analog verfahren.

Abb. II.1 zeigt ein Schema der Klonierungsstrategie (schwarz: CD4-, rot: Pen2-Matrix):

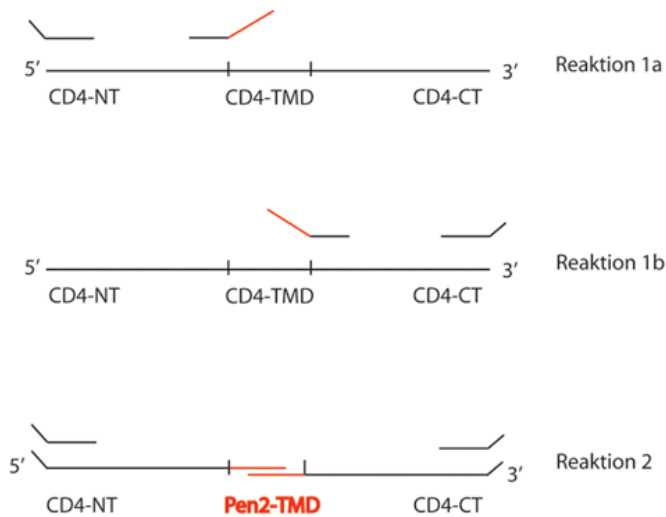


Abb. II.1: Schema der Klonierungsstrategie zur Herstellung des chimären CD4-TM1_{Pen2}-Fusionsproteins und verwandter Konstrukte.

II. 1.3.7 KLONIERUNG VON PCR-PRODUKTEN IN DEN VEKTOR pCR 2.1- TOPO

Die meisten PCR-Produkte wurden zunächst in den Vektor pCR 2.1- TOPO nach dem Protokoll des TOPO TA Cloning Kit (*Invitrogen*) kloniert.

Zum Mechanismus dieser Klonierungsmethode: PCR-Produkte, die mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase amplifiziert werden, tragen an beiden Enden einen einzelsträngigen Überhang in Form eines 3'-Desoxyadenosin. Über dieses sind sie direkt in den linearisiert vorliegenden Vektor pCR 2.1-TOPO ligierbar, der an seinen Enden 3'-Thymidinüberhänge sowie kovalent gebundene Topoisomerase I trägt (vgl. TOPO TA Cloning Kit Handbuch, *Invitrogen*). Da die PCRs wegen ihrer geringeren Fehlerrate in der vorliegenden Arbeit stets mit Pwo-Polymerase durchgeführt wurden (mit Ausnahme der Site-directed-Mutagenesis-PCRs, für die Pfu-Polymerase verwendet wurde), wurde für die Klonierung in pCR 2.1-TOPO an das normale PCR-Programm ein zusätzlicher Schritt angehängt, in dem dem PCR-Produkt 1 U/μl Taq-Polymerase (*Peq Lab*) zugesetzt und der Reaktionsansatz weitere 5 Minuten bei 72 °C inkubiert wurde.

Das Insert wurde im Rahmen der weiteren Klonierung wieder mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem Vektor herausgeschnitten (vgl. II. 1.5.1), aufgereinigt (vgl. II. 1.4.3) und in den eigentlichen Zielvektor ligiert (vgl. II. 1.5.3).

II. 1.4 REINIGUNG UND ANALYSE VON DNA

II. 1.4.1 AGAROSEGELELEKTROPHORESE

- TAE Puffer : 0.04 M Tris-Acetat, 0.001 M EDTA

- Agarose NA (*Amersham Biosciences*)
- 6x DNA-Ladepuffer: 30 % Glycerin, 0.25 % Bromphenolblau und 0.25 % Xylencyanol FF in dH₂O

Die größenabhängige elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel wurde verwendet zur Analyse linearer DNA-Moleküle, superhelikaler Plasmid-DNA und zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten. Die Agarose wurde in einer Konzentration von 1-2% in TAE Puffer mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid (*Sigma*) eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 1/6 Volumen 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard wurde eine 1 Kb DNA Leiter (*Gibco Invitrogen Corporation*) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 90 – 120 V mit TAE Puffer in Agarosegelkammern durchgeführt.

II. 1.4.2 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aus dem Gelfragment mit Hilfe des Nucleo Spin Extract Kits (*Macherey-Nagel*) nach der Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

II. 1.4.3 REINIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Nach enzymatischen DNA-Modifikationen wurde die entsprechende Reaktionslösung mit 600 µl Puffer N1 des Nucleo Spin Extract Kits (*Macherey-Nagel*) versetzt und die DNA weiter nach der Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

II. 1.5 ENZYMATISCHE MODIFIKATIONEN VON DNA

II. 1.5.1 SPALTUNG VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Verwendete Enzyme:

- BamHI (*NEB*): 10 U/µl
- Eco RI (*MBI Fermentas*): 10 U/µl
- Hind III (*MBI Fermentas*): 10 U/µl
- NotI (*Gibco*): 10 U/µl
- XbaI (*Fermentas*): 10 U/µl
- XhoI (*MBI Fermentas*): 10 U/µl

Zur analytischen Zielsetzung nach Plasmidpräparationen wurden 1-2 µg Plasmid-DNA mit 10 U der benötigten Restriktionsenzyme (vgl. II. 1.2.3) in dem jeweils vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 20 µl für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Restriktion mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. II. 1.4.1) analysiert.

Für präparative Ansätze im Rahmen der weiteren Klonierung wurden ca. 5 µg Plasmid-DNA und ca. 0.5 – 1.0 µg des entsprechenden PCR-Produktes in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer mit 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme (vgl. II. 1.2.3) in einem Endvolumen von 30 µl für 3 - 8 h bei 37 °C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter Verwendung des Nucleo Spin Extract Kits (*Macherey-Nagel*) gereinigt (vgl. II. 1.4.3).

II. 1.5.2 LIGATION VON DNA

Die Insertion des gewünschten DNA-Fragments ("Insert") in das linearisierte und ggf. dephosphorylierte Plasmid wurde unter Verwendung einer T4 Ligase (DNA-Ligase des Bakteriophagen T4, 5 U/µl, *Roche*) durchgeführt. Für die Ligation wurden Insert und linearisierter Zielvektor in einem Mengenverhältnis von ca. 5:1 eingesetzt. Es wurden ca. 200 ng Plasmid, ca. 1 µg des entsprechenden DNA-Fragments, 5 U T4 Ligase und Ligationspuffer des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 20 µl 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Transformation in kompetente *E. coli* wurden etwa 10 µl des Ligationsansatzes eingesetzt (vgl. II. 1.6.2).

II. 1.6 TRANSFORMATION VON *ESCHERICHIA COLI* UND PLASMIDPRÄPARATION

II. 1.6.1 HERSTELLUNG KOMPETENTER *ESCHERICHIA COLI*-ZELLEN

- LB-Medium (Low Salt *Luria-Bertani* Medium): 1 % Tryptone, 0,5 % Yeast Extract und 0,5 % NaCl in dH₂O.

Der pH wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde bei 120 °C und 1,2 bar 20 min autoklaviert. Die erforderlichen Selektionsantibiotika wurden dem Medium nach dem Abkühlen zugesetzt.

- CaCl₂-Puffer: 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 8,0 in dH₂O.

- *E. coli* - Stamm: DH5α

Es wurden Übernachtskulturen des DH5 α -Stammes angeimpft und nach etwa 12 - 16 h Inkubation bei 37 °C im Verhältnis 1:100 in 100 ml LB-Medium verdünnt. Anschließend wurde die Suspension bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 im Schüttelinkubator bei 200 upm und 37 °C inkubiert. In der Megafuge 1,0 R wurden die Bakterienzellen 5 min bei 1500 x g und 4 °C pelletiert und in 17,5 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer resuspendiert. Es folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Zellen wieder in der beschriebenen Weise pelletiert und erneut in 1 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden bei -80 °C aufbewahrt.

II. 1.6.2 TRANSFORMATION KOMPETENTER *ESCHERICHIA COLI*-ZELLEN

100 μ l des kompetenten *E. coli*-Stamms Dh5 α (vgl. II. 1.6.1) wurden mit 10 μ l Ligationsansatz (vgl. II. 1.5.3) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der DNA in die Zellen wurde der Ansatz für 1 min bei 42 °C und für weitere 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C und 500 upm auf einem Thermoschüttler (vgl. II. 5.1) inkubiert. Die Zellen wurden in der Tischzentrifuge (vgl. II. 5.1) 30 sec bei 11000 xg pelletiert, in 200 μ l LB-Medium resuspendiert und gemäß den bakteriellen Selektionsmarkern der verwendeten Vektoren auf LB-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin (*Sigma*) bzw. 50 μ g/ml Kanamycin (*Sigma*) ausplattiert. Resistente Einzelzellklone wurden nach 24 h Inkubation bei 37 °C gepickt und Übernachtskulturen in dem entsprechenden mit Antibiotikum versetzten LB-Flüssigmedium angeimpft.

II. 1.6.3 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA IM KLEINEN MAßSTAB ("MINIPREP")

Zur Identifizierung korrekter rekombinanter *E. coli*-Klone erfolgte die Präparation der Plasmide im kleinen Maßstab („Miniprep“) aus 5 ml *E. coli*-Übernachtskulturen gemäß dem Protokoll des NucleoSpin Plasmid Kit (*Macherey-Nagel*). Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde im analytischen Maßstab mit Restriktionsendonukleasen verdaut (vgl. II. 1.5.1).

II. 1.6.4 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA IM GROßEN MAßSTAB ("MAXIPREP")

Bei Bedarf wurden Klone, die im Rahmen des analytischen Restriktionsverdaus im Anschluss an eine "Miniprep" die gewünschten DNA-Banden aufwiesen, in 200 ml Übernachtskulturen angeimpft und nach 12-16 h Inkubation bei 37 °C abzentrifugiert (6500 xg / 15 min / 4 °C). Die Lyse des Bakterien-Pellets und die Gewinnung der Plasmid-

DNA erfolgte mit Hilfe des Nucleobond AX 500 Kits (*Macherey-Nagel*) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Anschließend wurde die so erhaltene Plasmid-DNA einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen (vgl. II. 1.5.1).

II. 1.6.5 SCREENING POSITIVER KLONE UND SEQUENZIERUNG VON KONSTRUKTEN

Einige der Klone, die sowohl die erforderlichen Selektionsmarker wie auch ein positives Ergebnis in der Restriktionsanalyse aufwiesen, wurden – falls bei dem jeweiligen Konstrukt möglich und sinnvoll – daraufhin in Cos-Zellen (vgl. II. 2.2) transfiziert und die Expression des erwarteten Proteins untersucht, beispielsweise durch *in-vivo*-Fluoreszenz bei GFP-Konstrukten oder Immunfluoreszenz bei CD4-Konstrukten.

„Maxipreps“ von korrekt erscheinenden Konstrukten wurden anschließend in relevanten Bereichen sequenziert (Überprüfung von Anfang und Ende des Inserts bei subklonierten Konstrukten, Sequenzierung des gesamten Inserts bei durch PCR hergestellten Konstrukten) (vgl. II. 1.4.4). Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte wurde von der Firma *GATC Biotech AG*, Konstanz, durchgeführt.

II. 2 ZELLKULTUR UND ZELLINIEN

II. 2.1 GERÄTE UND MATERIALIEN

- - 80 °C Gefrierschrank (HFU 80), *Heraeus*
- Autoklav (Tuttnauer 3850 EL), *Systec*
- Bunsenbrenner (Vulcan), *Heraeus*
- CO₂-Inkubator (Hera cell), *Heraeus*
- dH₂O Anlage (Milli-Q academic), *Millipore*
- Einfriergefäße (Qualifreeze), *Qualilab*
- Einwegpipetten steril (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml), *Sarstedt*
- Einweg-PP-Röhrchen steril (15 ml, 50 ml), *Sarstedt*
- Kryoröhrchen steril, *Nunc*
- Pasteurpipetten, *Volac*
- Sterilwerkbank (Hera Safe HS12), *Heraeus*
- Wasserbad (Typ 1002, Typ 1003), *GFL*
- Zellkulturschalen, *Nunc*
- Zentrifuge (Megafuge 1,0), *Heraeus*

II. 2.2 VERWENDETE UND HERGESTELLTE ZELLINIEN

Name	Mutter-zelllinie	exogen exprimierte Proteine	Resistenz	Referenz
HEK293	∅	∅	∅ (Grundmedium)	bezogen von ATTC, Rockville, USA
Cos7	∅	∅	∅ (Grundmedium)	
βAPP _{sw}	HEK293	+ βAPP _{695SW}	G418	[Citron <i>et al.</i> , 1992]
Sw-CD4 (vgl. II. 1.2.2)	βAPP _{sw}	+ βAPP _{695SW} + CD4	G418 Hygromycin	[Kaether <i>et al.</i> , 2004]
CD4-TM _{APP} (vgl. II. 1.2.3)	βAPP _{sw}	+ βAPP _{695SW} + CD4-TM _{APP}	G418 Hygromycin	Diese Arbeit
CD4-TM1 _{Pen2} (vgl. II. 1.2.3)	βAPP _{sw}	+ βAPP _{695SW} + CD4-TM1 _{Pen2}	G418 Hygromycin	Diese Arbeit
Pen2-RNAi (vgl. II. 1.2.2)	βAPP _{sw}	+ βAPP _{695SW} - Pen2	G418 Hygromycin	[Prokop <i>et al.</i> , 2004]
GFP-Pen2 (vgl. II. 1.2.3)	Pen2-RNAi	+ βAPP _{695SW} - Pen2 + GFP-Pen2	G418 Hygromycin Blasticidin	Diese Arbeit
GFP-Pen2- N33L	Pen2-RNAi	+ βAPP _{695SW} - Pen2 + GFP-Pen2- N33L	G418 Hygromycin Blasticidin	Diese Arbeit
Pen2- TM1 _{CD4(12-23)} (vgl. II. 1.2.3)	Pen2-RNAi	+ βAPP _{695SW} - Pen2 + Pen2- TM1 _{CD4(12-23)}	G418 Hygromycin Zeocin	Diese Arbeit

Tabelle II.5: Zelllinien. Aufgeführt sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten genetisch veränderten Zelllinien.

Erläuterung:

- β APP^{sw}: HEK (human embryonic kidney) 293-Zellen, die APP-Sw (K595N/M596L Doppelmutation im APP-Gen bei einer schwedischen Familie mit hereditärem Morbus Alzheimer) stabil exprimieren. Diese Mutation erhöht die A β -Produktion um ein Vielfaches und erleichtert so den biochemischen Nachweis von A β [Citron *et al.*, 1992].
- Sw-Pen2-RNAi-Zellen: Sw-Zellen, die small hairpin RNAs für RNAi gegen Pen2 (s. Konstrukte: Pen2-RNAi Vektor) stabil exprimieren (erhalten von S. Prokop, Haass Labor)
- Cos7-Zellen: aus Nierenparenchymzellen der Grünen Meerkatze gewonnene und durch *simian virus 40* immortalisierte Zelllinie.

II. 2.3 KULTIVIERUNG DER ZELLEN

II. 2.3.1 MEDIEN UND LÖSUNGEN

- PBS Puffer (steril, pH 7,4): 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,75 mM KH₂PO₄, pH mit HCl eingestellt
- Trypsin-EDTA-Lösung: 0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA*4Na in Hanks' B.S.S. (*Gibco Invitrogen Corporation*)
- Grundmedium: DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) High Glucose (*PAA*) supplementiert mit 2 mM L-Glutamin (*Invitrogen*), 10 % fetales Kälberserum (FCS; *PAA*), 50 U/ml Penicillin (*Invitrogen*) und 50 μ g/ml Streptomycin (*Invitrogen*).
- Selektionsmedien: Grundmedium supplementiert mit den entsprechenden Antibiotika (*Invitrogen Life Technologies*) in folgenden Endkonzentrationen:
 - Geneticin (G 418): 200 μ g/ml
 - Zeocin: 200 μ g/ml
 - Hygromycin: 200 μ g/ml
 - Blastocidin: 5 μ g/ml

II. 2.3.2 DURCHFÜHRUNG

Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach Standardprotokollen (Kruse und Patterson, 1973).

II. 2.4 ANLEGEN VON DAUERKULTUREN (KRYOKONSERVIERUNG)

- Einfriermedium: FCS (*PAA*) supplementiert mit 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO, *Roth*)
- PBS Puffer (steril): vgl. II. 2.3.1
- Trypsin–EDTA-Lösung: vgl. II. 2.3.1

Zur Kryokonservierung wurden konfluent gewachsene Zellen einer 10 cm Zellkulturschale mit sterilem PBS Puffer gewaschen, in 3 ml Trypsin–EDTA-Lösung abgelöst und mit 3 ml Grundmedium (vgl. II. 2.3.1) versetzt. Die Zellen wurden in der Zentrifuge bei RT für 5 min und bei 200 xg sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und anschließend in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kulturen wurden in Einfriergefäßen über Nacht bei –80 °C gefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

II. 2.5 TRANSIENTE UND STABILE TRANSFEKTION VON ZELLEN MIT REKOMBINANTER DNA

Die zu transfizierenden Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 50 % kultiviert und mittels FuGENE™ 6 Transfection Reagent (*Roche*) oder Lipofectamine (*Invitrogen*) gemäß den Anweisungen der Hersteller transfiziert. Hierbei entstehen positiv geladene liposomale Vesikel, die die negativ geladene zu transfizierende DNA enthalten. Die Vesikel verschmelzen mit der Plasmamembran der Zellen und geben die DNA in das Zytoplasma ab. Im Falle einer transienten Transfektion wurden die Zellen nach 16 bis 24 h analysiert – je nach Fragestellung mit proteinbiochemischen oder fluoreszenzmikroskopischen Methoden. Zur Selektion stabiler Einzelzellklone wurden die Zellen 24 bis 48 h nach Transfektion in verschiedenen Verdünnungen (z.B. 1:100, 1:200, 1:500 und 1:1000) in das entsprechende Selektionsmedium (vgl. II. 2.3.1) umgesetzt. Stabile Klone wurden mit Trypsin–Lösung (vgl. II. 2.3.1) unter Verwendung steriler Klonierungszyylinder (8 x 8 mm; *DUNN Labortechnik*) abgelöst und in 24 well Platten transferiert. Die Zellen wurden anschließend weiter vermehrt und auf die Expression des exogenen Proteins hin analysiert (vgl. II. 2.6).

II. 2.6 NACHWEIS DER EXOGENEN PROTEINEXPRESSION IN TRANSFIZIERTEN ZELLEN

Die nach Selektion erhaltenen Einzelzellklone wurden je nach Typ des gewünschten exogen exprimierten Proteins fluoreszenzmikroskopisch (vgl. II. 3), proteinbiochemisch (vgl. II. 5) oder mit einer Kombination beider Methoden untersucht.

II. 3 IMMUNZYTOCHEMIE UND FLUORESZENZMIKROSKOPIE

II. 3.1 GERÄTE UND MATERIALIEN

- 510Meta Konfokalmikroskopsystem mit einem 100x/1.2 Objektiv (*Zeiss*)
- Axioskop2 plus Mikroskop mit einem 63x/1.25 Objektiv und einem Standard FITC und TRITC Fluoreszenzfilterset (*Zeiss*), AxioCam HRm Camera, AxioVision Software
Die weitere Bearbeitung der Bilder wurde unter Verwendung des Programms Photoshop (*Adobe*) durchgeführt.

II. 3.2 ERSTELLUNG EINES IMMUNFLUORESZENZPRÄPARATES

II. 3.2.1 LÖSUNGEN

- PBS (pH 7,4): vgl. II. 2.3.1
- PBS (Ca, Mg): 1 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂ in PBS (pH 7,4)
- Fixierlösung: 4 % Paraformaldehyd (*J. T. Baker*) und 4 % Saccharose (*Merck*) in PBS Puffer.
- Ammoniumchloridlösung: 50 mM Ammoniumchlorid (*Sigma*) in PBS
- Triton-Lösung: 0,2 % Triton X 100 (*Sigma*) in PBS Puffer.
- Blockierungslösung: 1% FCS (*PAA*), 1% BSA (*Sigma*) und 0,1 % Fischgelatine (*Sigma*) in PBS Puffer.
- Dilutionslösung: 1 % BSA (*Sigma*) in PBS Puffer.
- Mowiol-Lösung: 15 % Mowiol (*Hoechst*) und 50 mg/ml DABCO (*Sigma*) in dH₂O.

II. 3.2.2 INTERNE FLUORESZENZFÄRBUNG

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf Deckgläsern bis zu einer Konfluenz von 50 – 80 % kultiviert, einmal mit PBS Puffer gewaschen und genau 20 min bei RT mit Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS Puffer gewaschen und das zurückgebliebene Paraformaldehyd durch mindestens 10 minütige Inkubation mit Ammoniumchloridlösung neutralisiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen mit PBS Puffer wurden die Zellen zur vollständigeren Membranpermeabilisierung anschließend 2 min mit 0,2% Triton-Lösung inkubiert. Das unspezifische Erkennen und Binden von Proteinantigenen durch den Primärantikörper wurde verhindert durch Absättigung des Präparates mit Blockierungslösung für mindestens 10 min. Die monoklonalen und/oder polyklonalen Primärantikörper wurden in Dilutionslösung entsprechend verdünnt (vgl. II 4) und mindestens 20 min bei RT mit den vorbehandelten Zellen inkubiert. Die Zellen wurden dreimal kurz mit PBS Puffer gewaschen

und mindestens 20 min bei RT mit den entsprechenden in Dilutionslösung verdünnten Sekundärantikörpern inkubiert. Erneut wurde dreimal kurz mit PBS Puffer gewaschen, einmal mit dH₂O gespült und die Deckgläser mit Mowiol-Lösung auf einem Objektträger fixiert. Die so erhaltenen Präparate wurden nach dem Aushärten unter Verwendung von Immersionsöl N518 (*Zeiss*) unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

II. 3.2.3 OBERFLÄCHENIMMUNFLUORESZENZ

Für eine Oberflächenimmunfluoreszenz wurden lebende Zellen zweimal in PBS (Ca, Mg) gewaschen, mindestens 20 Minuten lang auf Eis bei intakter Plasmamembran mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert und daraufhin erneut zweimal in PBS (Ca, Mg) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in der oben beschriebenen Weise fixiert, der Sekundärantikörper appliziert und das Präparat wie beschrieben weiterverarbeitet.

II. 3.2.4 LEBENDZELLMIKROSKOPIE

Für die Lebendzellmikroskopie wurden Deckgläser mit Zellen und etwa 25 µl ihres 37 °C-warmen Mediums in Aluminiumhalter montiert, die zu diesem Zweck von der Werkstatt des Adolf-Butenandt-Instituts spezialangefertigt worden waren (beschrieben von J. White, s. www.embl-heidelberg.de/~jwhite/microscopy/live_cell_microscopy.html).

II. 4 ANTIKÖRPER

Die verwendeten Antikörper wurden in Blocklösung (vgl. II.5.5.3) verdünnt.

II. 4.1 ÜBERSICHT ÜBER DIE PRIMÄREN ANTIKÖRPER

Bei den nachfolgend aufgeführten monoklonalen Antikörpern handelt es sich um Maus IgG-Antikörper, bei den polyklonalen Antikörpern um Kaninchen IgG-Antikörper.

II. 4.1.1 MONOKLONALE ANTIKÖRPER

Bezeichnung	Zielprotein	IP ¹	WB ²	IF ³	Bezugsquelle ⁴
BI. 3D7	PS1 (AS 263-407)	---	1:750	---	<i>Boehringer Ingelheim</i> [Steiner <i>et al.</i> , 1999]
CD4	CD4	1:300	---	1:300	EDU-2 Antikörper von

					<i>Diatec</i> , Oslo, Norwegen
GFP	GFP, YFP, CFP	1:300	1:1000	1:300	Living Colors Monoclonal Antibody JL-8, <i>Clontech</i>
Lamp-2	Lamp-2	---	---	1:300	<i>Abcam</i>
Nixon	PS1 N-Terminus	1:300	1:4000	---	R. Nixon, Harvard Medical School, Belmont

Tabelle II.6: Primäre monoklonale Antikörper

¹Angegeben ist die zur Immunpräzipitation von Proteinen (vgl. II. 5.4.1) verwendete Verdünnung.

²Angegeben ist die zum immunchemischen Nachweis von Proteinen nach Blotting (vgl. II. 5.5.3) verwendete Verdünnung.

³Angegeben ist die zum immunzytochemischen Nachweis von Proteinen (vgl. II. 2.3.2) verwendete Verdünnung.

⁴Angegeben ist die Vertreiberfirma oder Bezugsquelle des Antikörpers.

II. 4.1.2 POLYKLONALE ANTIKÖRPER

Bezeichnung	Zielprotein	IP ¹	WB ²	IF ³	Bezugsquelle ⁴
1638	Pen2 N-Terminus (AS 4-15)	1 :300	1 :1000	---	[Steiner <i>et al.</i> , 2002]
1736	β APP ₆₉₅ (AS 595-611)	1:500	---	---	Dr. D.J. Selkoe [Haass <i>et al.</i> , 1992b]
2953	PS1 N-Terminus (AS 2-81)	1:300	1:2000	---	[Walter <i>et al.</i> , 1997]
3027 (=5023)	PS1 loop (AS 263-407)	1:300	1:2000	---	[Walter <i>et al.</i> , 1996]
3711 (=BI.HF5c)	PS2 C-Terminus	---	1 :2000	---	[Steiner <i>et al.</i> 1999]
5313	β APP ₆₉₅ (AS 444-592)	1:300	1:1000	---	[Walter <i>et al.</i> , 2000]
6687	β APP ₆₉₅ C-Terminus (AS 676-695)	1:300	1:1000	---	[Walter <i>et al.</i> , 2000]
Sigma-Nct	Nct (AS 693-709)	1:1000	1:5000	---	<i>Sigma</i>

CD4	CD4	---	1:2000	---	H-370 Antikörper von <i>Santa Cruz Biotechnology</i>
-----	-----	-----	--------	-----	--

Tabelle II.7: Primäre polyklonale Antikörper

¹ Angegeben ist die zur Immunpräzipitation von Proteinen (vgl. II. 5.4.1) verwendete Verdünnung.

² Angegeben ist die zum immunchemischen Nachweis von Proteinen nach Blotting (vgl. II. 5.5.3) verwendete Verdünnung.

³ Angegeben ist die zum immunzytochemischen Nachweis von Proteinen (vgl. II 2.3.2) verwendete Verdünnung.

⁴ Angegeben ist die Vertreiberfirma oder Bezugsquelle des Antikörpers.

II. 4.2 ÜBERSICHT ÜBER DIE SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER

Bezeichnung	Zielprotein	Wirtsspezies ¹	Applikation	Verdünnung	Firma ²
anti-rabbit- HRP	Kaninchen IgG	Ziege	WB ³	1:20000	<i>Promega</i>
anti-mouse- HRP	Maus IgG	Ziege	WB ³	1:10000	<i>Promega</i>
Alexa Fluor 488 (grün)	Kaninchen IgG	Ziege	IF ⁴	1:1000	<i>Molecular Probes</i>
Alexa Fluor 594 (rot)	Kaninchen IgG	Ziege	IF ⁴	1:1000	<i>Molecular Probes</i>
Alexa Fluor 488 (grün)	Maus IgG	Ziege	IF ⁴	1:1000	<i>Molecular Probes</i>
Alexa Fluor 594 (rot)	Maus IgG	Ziege	IF ⁴	1:1000	<i>Molecular Probes</i>

Tabelle II.8: Sekundäre Antikörper

¹ Angegeben ist die Spezies in der der Antikörper generiert wurde.

² Angegeben ist die Vertreiberfirma des Antikörpers.

³ Immunchemischer Nachweis von Proteinen nach Blotting (vgl. II. 5.5.3).

⁴ Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen (vgl. 2.3.2).

II. 5 PROTEINBIOCHEMIE

II. 5.1 GERÄTE UND MATERIALIEN

- Elektrophoresekammern:

Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell, *BioRad*

XCell SureLock™ Mini Cell, *Invitrogen Life Technologies*

- Filmentwicklungsgerät (Curix 60), *Agfa*
- Fluorimeter (Fluoroscans Ascent FL), *Labsystems*
- Gelrockner (Slab Gel Dryer 2000), *Savant*
- Heizblöcke, *Liebisch*
- Kühlzentrifuge (Biofuge fresco), *Heraeus*
- Magnetrührer (RCT basic und KMO2 basic), *IKA Labortechnik*
- Megafuge 1,0 R, *Heraeus*
- pH-Elektrode (Blueline 23 pH), *Schott*
- pH-Meter (Inolab pH Level 1), *Wissenschaftlich Technische Werkstätten Weilheim*
- Photometer (SmartSpec™ 3000), *BioRad*

Einwegküvetten, *Sarstedt*

Quarzküvetten (Quartz Spectrophotometer Cell), *Bio Rad*

- Pipetten (20 ml, 200 ml, 1000 ml), *Gilson*
- Pipettierhilfe (Accu-Jet), *Brand*
- Pipettenspitzen, *Sarstedt*
- Reaktionsgefäße, *Sarstedt*
- Scanner:

Astra 1220S, *UMAX*

Perfection 1650, *Epson*

- Schüttler (KM2), *EB (Edmund Buhler)*
- Sonifier (Cell Disruptor B 15), *Branson*
- Spannungsquelle (PowerPac300), *BioRad*
- Thermoschüttler (Thermomixer compact), *Eppendorf*
- Tischzentrifuge (Biofuge – pico), *Heraeus*
- Transferkammer (Mini Trans-Blot Cell), *BioRad*
- Ultrazentrifuge (Optima Ultracentrifuge), *Beckman*

Rotoren: TLA-55, MLA-80, TLA-110

- Vakuumentrifuge (Speed Vac Concentrator), *Savant*
- Vortex (Vortex Genie 2), *NeoLab*

- Zentrifugen: (J2-MC Centrifuge und J2-21M Induction Drive Centrifuge), *Beckman*

Rotoren: Type JA – 10, Type JA – 20

II. 5.2 GEWINNUNG VON PROTEINEXTRAKTEN

II. 5.2.1 GESAMTPROTEINEXTRAKT

- PBS Puffer: vgl. II. 2.3.1
- STEN-Lysis Puffer: 50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % (v/v) IGEPAL CA-630 (*Sigma*), 1 % (v/v) Triton X-100 und 2 % BSA (*Sigma*) in dH₂O.
- STEN-Lysis Puffer ohne BSA: 50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % (v/v) IGEPAL CA-630 (*Sigma*) und 1 % (v/v) Triton X-100 in dH₂O.
- CHAPS-Lysis Puffer: 150 mM NaCitrat, pH 6.4, 2% CHAPS (*Fluka BioChemika*)
- CHAPSO Puffer: 150 mM NaCitrat, pH 6.4, 2% CHAPSO (*Sigma*)

Die entsprechenden Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 - 90 % kultiviert, auf Eis mit eiskaltem PBS Puffer gewaschen und dann in 1 ml PBS Puffer mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst. Anschließend wurden sie durch Zentrifugation (400 xg/ 5 min) pelletiert und je nach folgender Prozedur entweder mit STEN-Lysis Puffer oder STEN-Lysis Puffer ohne BSA oder CHAPS-Lysis Puffer oder CHAPSO-Puffer (jeweils 400 µl pro 10 cm Schale) sowie 1:500 verdünntem Protease Inhibitor Cocktail (*Sigma*) 30 min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Rückstände wurden durch Zentrifugation (16000 xg/ 10 min/ 4 °C) abgetrennt und der Überstand ("STEN-Lysat" bzw. "CHAPS-Lysat" bzw. CHAPSO-Lysat) entweder sofort weiter verwendet oder bei -20 °C konserviert.

II. 5.2.2 MEMBRANPROTEINEXTRAKT

- PBS Puffer: vgl. II. 2.3.1
- Hypotonpuffer: 10 mM Tris pH 7,6, 1 mM EDTA und 1 mM EGTA in dH₂O

80 - 90 % konfluente Zellen wurden auf Eis mit eiskaltem PBS Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml eiskaltem PBS Puffer abgeschabt und aufgenommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (2400 xg/ 5 min) pelletiert, in 750 µl kaltem Hypotonpuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch 15maliges Aufziehen mit einer 2 ml Spritze (*Terumo*) mit einer 0,6 mm Injektionskanüle (*Braun*) homogenisiert. Zellorganellen und Zytoskelett wurden durch Zentrifugation (3000 xg/ 5 min/ 4 °C) abgetrennt und die Membranen anschließend durch Ultrazentrifugation (100000 xg/

1h/ 4°C) aus dem Überstand isoliert. Das erhaltene Membranpellet wurde entweder in 60 µl Laemmli-Probenpuffer bei 95 °C gelöst und direkt mittels SDS-PAGE analysiert, oder in 100 µl STEN-Lysis Puffer ohne BSA (vgl. II. 5.4.1) oder in 100 µl CHAPSO-Puffer (vgl. II. 5.4.1) resuspendiert, erneut zentrifugiert (16000 xg/ 30 min/ 4 °C) und die Proteinkonzentration ermittelt (vgl. II. 5.3)

II. 5.3 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION UND DER GESAMTPROTEINMENGE

II. 5.3.1 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION DURCH MESSUNG DER UV-ABSORPTION

Im Photometer wurde die UV-Absorption der unverdünnten Proteinlösung in einer Quarzküvette bei 280 nm gemessen.

Die Proteinkonzentration ergibt sich nach folgender Formel: $c = OD_{280} \cdot 0,5$ [mg/ml].

II. 5.3.2 BESTIMMUNG DER GESAMTPROTEINMENGE MIT DER METHODE NACH BRADFORD

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge aus 1-2 µl Zellysat ohne Zusatz von BSA erfolgte photometrisch unter Verwendung des Bio-Rad Protein Assay Kit (*Bio-Rad*).

Für die Eichkurve wurden verschiedene Volumina eines BSA-Standards bekannter Konzentration eingesetzt. Die Proben wurden mit 200 µl Bio-Rad Protein Assay Reagenz versetzt und mit dH₂O auf 1 ml Endvolumen ergänzt. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch ermittelt.

II. 5.4 IMMUNPRÄZIPITATION VON PROTEINEN

Für die Immunpräzipitation von Proteinen wurden folgende Lösungen benutzt:

- Protein-A-Sepharosesuspension: 100 mg/ml Protein A gebunden an Sepharose CL-4B (*Sigma*) und 2 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin, *Sigma*) in STEN Puffer oder in CHAPS Puffer oder in CHAPSO Puffer

- Protein-G-Sepharosesuspension: 100 mg/ml Protein G gebunden an Sepharose CL-4B (*Sigma*) und 2 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin; *Sigma*) in STEN Puffer oder in CHAPS Puffer
- STEN Puffer: 50mM Tris pH 7,6, 2 mM EDTA, 0,2% (v/v) NP-40, 150 mM NaCl
- STEN-NaCl Puffer: 50 mM Tris pH 7,6, 2 mM EDTA, 0,2 % (v/v) NP-40 und 500 mM NaCl
- STEN-SDS Puffer: 50 mM Tris pH 7,6, 2 mM EDTA, 0,2 % (v/v) NP-40, 150 mM NaCl und 0,1 % (w/v) SDS
- CHAPS Puffer: 150 mM NaCitrat, pH 6.4, 2% CHAPS (*Fluka BioChemika*)
- CHAPSO Puffer: 150 mM NaCitrat, pH 6.4, 2% CHAPSO (*Sigma*)

Die Lysate wurden mit 25 µl Protein-G-Sepharosesuspension bei einer späteren Fällung mit einem monoklonalen Antikörper oder 25 µl Protein-A-Sepharosesuspension bei einer späteren Fällung mit einem polyklonalen Antikörper für 1 h auf dem Schüttler bei 4 °C vorinkubiert, um unspezifisch interagierende Proteine auszufällen. Je nach Art des Lysates (STEN-, CHAPS- oder CHAPSO-Lysat) waren die Sepharosebeads dabei entweder in STEN Puffer, in CHAPS Puffer oder in CHAPSO Puffer suspendiert. Die Sepharosebeads wurden anschließend durch 2 minütige Zentrifugation bei 10000 g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde weiterverwendet, mit der entsprechenden Antikörpermenge (vgl. II 4.) versetzt und 1-2 Stunden bei 4 °C geschüttelt. Daraufhin wurde im Falle eines monoklonalen Antikörpers 25 µl Protein-G-Sepharosesuspension, im Falle eines polyklonalen Antikörpers 25 µl Protein-A-Sepharosesuspension zugegeben, und 90 Minuten bei 4 °C weitergeschüttelt. Die Sepharosebeads mit dem Immunpräzipitat wurden durch 2 minütige Zentrifugation bei 10000 g und 4 °C pelletiert. Zum Waschen des Pellets wurden jeweils 750 µl des entsprechenden Waschpuffers zugegeben, kurz geschüttelt und das Pellet wieder abzentrifugiert.

Im Fall von STEN-Lysaten wurde das Pellet erst zweimal mit STEN-NaCl Puffer, dann mit STEN-SDS Puffer und zuletzt mit STEN Puffer gewaschen.

Im Fall von CHAPS-Lysaten wurde das Pellet viermal mit CHAPS Puffer gewaschen, ebenso wurde für CHAPSO-Lysate viermal mit CHAPSO Puffer gewaschen.

Die Pellets wurden anschließend mit 12,5 µl 2x Laemmli Puffer (vgl. II. 5.5.1) versetzt, 5 min bei 95 °C gekocht (bzw. im Falle von PS1 10 Minuten bei 65 °C erhitzt) und mittels SDS-PAGE (vgl. II. 5.5.1) und Western Blot (vgl. II. 5.5.1) analysiert.

II. 5.5 NACHWEIS UND ANALYSE VON PROTEINEN

II. 5.5.1 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) UND COOMASSIE-FÄRBUNG

Die zu untersuchenden Proteine wurden in einem diskontinuierlichen Gelsystem unter denaturierenden Bedingungen und in eindimensionaler Weise aufgetrennt (Laemmli, 1970). Folgende Puffer wurden dabei verwendet:

- 2x Laemmli Probenpuffer: 50 mM Tris, pH 7,2, 20% Glycerol, 10% β -Mercaptoethanol, 4% SDS
- 2x Urea Probenpuffer: 50 mM Tris, pH 7,2, 4 M Urea, 20% Glycerol, 10% β -Mercaptoethanol, 4% SDS
- Acrylamid - Lösung (*Q-BioGene*): 40 % (w/v) Acrylamid – BIS-Acrylamid 37,5 :1 in dH₂O
- APS: 10 % (w/v) Ammonium Persulfat in dH₂O
- Entfärbelösung: 5 % (v/v) Isopropanol und 7 % (v/v) Eisessig
- Färbelösung: 50 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Eisessig und 0,5 % (w/v) Coomassie-Blue-R in dH₂O
- Sammelgelpuffer („Upper Tris) (4 x): 0,5 M Tris und 0,4 % (w/v) SDS in dH₂O; pH mit HCl auf 6,8 eingestellt.
- TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (*Merck*)
- Trenngelpuffer („Lower Tris) (4 x): 1,5 M Tris und 0,4 % (w/v) SDS in dH₂O; pH mit HCl auf 8,8 eingestellt.
- Tris-Glycin-SDS Puffer: 25 mM Tris, 0,2 M Glycin und 0,01 % (w/v) SDS in dH₂O
- Tris-Tricin Puffer: 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 3 mM SDS
- Urea-Lösung: 8 M Urea in dH₂O

Zusammensetzung pro Minigel (1,5 mm dick) in Abhängigkeit von der Prozentigkeit:

Substanz	Trenngel (8 %)	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)	Substanz	Sammelgel
dH ₂ O ¹	4,4 ml	4 ml	3,6 ml	dH ₂ O	3,3 ml
Acrylamid-Lösung	1,6 ml	2,0 ml	2,4 ml	Acrylamid-Lösung	0,5 ml
Trenngelpuffer	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml	Sammelgelpuffer	1,3 ml
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	TEMED	15 µl
APS	15 µl	15 µl	15 µl	APS	15 µl
Σ	~ 8 ml	~ 8 ml	~ 8 ml	Σ	~ 5,1 ml

Tabelle II.9: Zusammensetzung der jeweiligen SDS-Minigele.

¹ Bei Urea-Gelen wurde anstelle von dH₂O Urea-Lösung verwendet.

Für den Nachweis von Nicastrin wurden 8 % oder 10 % Polyacrylamidgele (Herstellung s.u.) und Tris-Glycin-SDS Puffer verwendet. Proben wurden vor dem Laden mit 2x Laemmli Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C gekocht.

Für den Nachweis von Presenilin wurden Ureagele (12% Polyacrylamid, 3 M Urea, Herstellung s.u.) und Tris Glycin-SDS Puffer verwendet. Proben wurden vor dem Laden mit 2x Urea Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei 65 °C erhitzt.

Für den Nachweis von Proteinen und Peptiden mit geringem Molekulargewicht wie Pen2 und APP CTFs wurden fertige 10-20% Tris-Tricin-Gele (*Novex*) und Tris-Tricin Puffer verwendet. Proben wurden vor dem Laden mit 2x Laemmli Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C gekocht.

Sowohl zur Herstellung der Gele wie auch zur eigentlichen Gelelektrophorese wurden Minigelsysteme (*Bio Rad*) verwendet.

Die Glasplatten des Minigelsystems wurden vor der Verwendung mit Isopropanol von Proteinrückständen befreit. Anschließend wurde das Gelsystem montiert, das Trenngel bis zu einer Höhe von etwa 2 cm unterhalb des Oberrandes gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels wurden alle Flüssigkeitsreste mit saugfähigem Filterpapier entfernt, das verbleibende Volumen über dem Trenngel mit Sammelgel gefüllt und ein Kamm eingesetzt. Nach dem Aushärten des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Trennkammer eingesetzt. Die

Kammer wurde sowohl auf der Seite der Anode als auch auf der Seite der Kathode mit Tris-Glycin-SDS Puffer gefüllt. Die Geltaschen wurden einige Male mit Tris-Glycin-SDS Puffer gespült. Die fertig aufbereiteten Proben wurden in 2x Probenpuffer resuspendiert und 5 min bei 95 °C gekocht (zum Nachweis von PS1 wurde 10 min auf 65 °C erhitzt). Nicht gelöstes Material wurde durch Zentrifugation (16000 xg/ 1 min) abgetrennt und die Proben mit Hilfe einer Spritze und einer feinen Kanüle in die Taschen des Gels eingebracht. Als Molekulargewichtsstandard wurden 10 µl See Blue Plus 2 (*Invitrogen*) geladen. Anode und Kathode wurden mit der Spannungsquelle verbunden. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 70 V, nach Eintritt der Proteine in das Trenngel bei 120 V.

Coomassie-Färbung:

Zum Proteinnachweis in der Coomassie-Färbung wurde das Gel unmittelbar nach Beendigung der Elektrophorese 10 - 15 min bei RT in der Färbelösung auf dem Schüttler inkubiert und anschließend etwa 3 - 8 h mit der Entfärbelösung bei RT entfärbt, bis der Hintergrund des Gels klar wurde. Die entfärbten Gele wurden 2 h bei 60 °C auf einem Gel-Trockner getrocknet.

II. 5.5.2 BLUE-NATIVE-GELELEKTROPHORESE

Die Darstellung des nativen γ -Sekretasekomplexes nach Präparation von Membranextrakten mittels Blue-Native-Gelelektrophorese erfolgte wie beschrieben [Schaegger und von Jagow, 1991].

II. 5.5.3 TRANSFER UND IMMUNCHEMISCHER NACHWEIS VON PROTEINEN

- PBS Puffer: vgl. II. 2.3.1
- Tris-Glycin Puffer: 25 mM Tris und 0,2 M Glycin in dH₂O.

Nach Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese wurden die Proteine in einer Transferkammer auf eine PVDF-Membran (Immobilon Transfer Membran, *Millipore*) übertragen. Die PVDF-Membran wurde vor der Verwendung 30 sec in 70 % Isopropanol inkubiert, danach gründlich etwa 2 min mit dH₂O gespült bis sie vollständig benetzbar war und anschließend in Tris-Glycin Puffer äquilibriert.

Aufbau:

- 1) Anodenplatte
- 2) poröser Schwamm in Tris-Glycin Puffer äquilibriert
- 3) Gel Blotting-Papier (*Schleicher & Schuell*) in Tris-Glycin Puffer äquilibriert
- 4) PVDF-Membran in Tris-Glycin Puffer äquilibriert
- 5) SDS-Polyacrylamid-Gel
- 6) Gel Blotting-Papier (*Schleicher & Schuell*) in Tris-Glycin Puffer äquilibriert
- 7) poröser Schwamm in Tris-Glycin Puffer äquilibriert
- 8) Kathodenplatte

Der Transfer erfolgte bei konstantem Stromfluss von 400 mA für 1 h bei 4 °C.

Immunchemischer Nachweis der Proteine:

- TBST Puffer: 0,3 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6 und 0,3 % (v/v) Triton X-100 in dH₂O
- Blockierungspuffer: 0.5 g/l I-Block (*Tropix*) und 0,1% Tween 20 (*Roth*) in PBS.

Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen mindestens 1 h in Blockierungspuffer geschüttelt, anschließend mindestens 1 h mit dem Primärantikörper (vgl. II 4.), verdünnt in Blockierungspuffer, auf dem Schüttler inkubiert und 5 mal je 5 min mit TBST Puffer gewaschen. Der entsprechende HRP-gekoppelte und in Blockierungspuffer verdünnte Sekundärantikörper (vgl. II 4.) wurde ebenfalls mindestens 1 h mit der PVDF-Membran inkubiert. Schließlich wurde erneut 5 mal je 5 min mit TBST Puffer gewaschen und kurz mit dH₂O nachgespült. Die Detektion der mit den Antikörpern gekoppelten Proteine erfolgte mit Hilfe der ECL (enhanced chemoluminescence, ECLTM Western Blotting Detection Reagent; *Amersham Biosciences*) nach Angaben des Herstellers und unter Verwendung von Röntgenfilmen (Super RX, *Fuji*). Zum Nachweis schwacher Signale wurde das ECL plus Western Blotting Detection System (*Amersham Biosciences*) verwendet. Die Filme wurden über ein Filmentwicklergerät (vgl. 2.5.1) entwickelt, eingescannt (vgl. 2.5.1) und die Bildqualität gegebenenfalls mit Hilfe des Programms Photoshop 5.5 (*Adobe*) (vgl. 2.5.1) verbessert.

II. 5.6 „STRIPPEN“ VON WESTERN-BLOT-MEMBRANEN

- „Stripping“ Puffer: 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7, 2 % (w/v) SDS und 0,7 % (v/v) β -Mercaptoethanol (*Merck*).

Um eine PVDF-Membran nacheinander mit verschiedenen Antikörpern analysieren zu können, wurden die nicht denaturierten Proteine, welche den gebundenen Primär- und Sekundärantikörpern entsprachen, nach dem ersten Proteinnachweis wieder entfernt. Hierfür wurde die Membran 40 min mit dem "Stripping" Puffer im Wasserbad bei 50 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde sie 5 mal je 5 min in TBST Puffer gewaschen und erneut zum immunchemischen Nachweis der Proteine (vgl. II. 5.5.3) verwendet.

II. 5.7 PROTEINELUIERUNG AUS SEPHAROSEBEADS

- Elutionspuffer: 1% SDS, 100mM TrisCl, 10mM DTT (Biomol).

Um Proteine im Anschluss an eine Immunpräzipitation aus dem Protein-A bzw. Protein-G-Sepharose-Pellet zu eluieren, wurde das gewaschene Sepharosepellet mit 30 μ l Elutionspuffer versetzt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 5 Minuten bei 95° C gekocht. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 10000 g wurde der Überstand (= Eluat) weiterverwendet.

II. 5.8 ANALYSE DER GLYKOSYLIERUNG VON PROTEINEN

Aus Sepharosepellets eluierte Proteine wurden mit Endoglykosidase H bzw. N-Glykosidase F (*Boehringer Mannheim*) entsprechend den Angaben des Herstellers verdaut.

Dabei wurden folgende 10x Puffer und Enzymmengen verwendet:

Endoglykosidase H

- Endo H Puffer: 200 mM Natriumcitrat pH 5,8, 0,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol (*Merck*), 0,1 % (w/v) SDS und 2,5 mM PMSF in dH₂O
- 1 μ l Endoglykosidase H (5U/ml)

N-Glykosidase F

- NGF Puffer: 100 mM Natrium-Phosphat, pH 8,0, 25 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol (*Merck*), 0,1 % (w/v) SDS und 2,5 mM PMSF in dH₂O
- 1 μ l N-Glykosidase F (1U/ μ l)

Es wurden jeweils 10 µl IP-Eluat in einem 100 µl Reaktionsansatz für 1 Stunde bei 37 °C verdaut. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 x Laemmli-Probenpuffer (vgl. II. 5.5.1) gestoppt. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. II. 5.5.1) und Transfer auf eine PVDF-Membran (vgl. II. 5.5.3).

II.5.9 OBERFLÄCHENBIOTINYLIERUNG

- PCM-Puffer: PBS supplementiert mit 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂
- NH₄Cl-PBS
- STEN-Lysis-Puffer: 50mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% NP-40

Sw-Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und 30 min auf Eis in PCM-Puffer mit 1mg/ml Sulfo-succinimidyl-6-([+]-biotinamido)-hexanoat (*Molecular Biosciences*) inkubiert. Die Biotinylierung wurde gestoppt mittels zweimaligen Waschens mit 50mM NH₄Cl-PBS (auf Eis), gefolgt von einer 10 minütigen Inkubation auf Eis in 50mM NH₄Cl-PBS. Nach zweimal zusätzlichem Waschen wurden die Zellen in STEN-Lysis-Puffer lysiert und die biotinylierten Proteine mit Streptavidin-Sepharose präzipitiert. Die biotinylierten Proteine und 1/60 des jeweiligen Totallysates wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper wurde mit einem ¹²⁵I-markierten-Sekundärantikörper inkubiert und das radioaktive Signal mit einem Phosphoimager-System detektiert und quantifiziert.

III ERGEBNISSE

III.1 NICHT ASSEMBLIERTES PEN2 WIRD IM ENDOPLASMATISCHEN RETIKULUM RETINIERT

Zunächst sollten vorliegende Ergebnisse bestätigt werden, nach denen Pen2-Moleküle, die nicht in den γ -Sekretase-Komplex assembliert sind, im ER retiniert werden [Bergman *et al.*, 2004; Crystal *et al.*, 2004]. Zu diesem Zweck wurde ein GFP-Pen2-Fusionsprotein verwendet, in dem das Markerprotein GFP (Green Fluorescent Protein) an den N-Terminus von Pen2 geknüpft ist. Die physiologische Funktionalität von GFP-Pen2 (Abb. III.1) war bereits anhand der Rettung von Pen2-Mutationsphänotypen in *C. elegans* gezeigt worden [Francis *et al.*, 2002]. GFP-Pen2 wurde sowohl transient als auch stabil in humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney 293 cells = HEK 293), die stabil APP_{sw} (vgl. Abschnitt I.4.2) exprimieren ("swedish cells" = Sw-Zellen), transfiziert und die lebenden Zellen wurden mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. In stabil transfizierten Zellen, die GFP-Pen2 der endogenen Situation in etwa entsprechend auf niedrigem Level exprimieren, wurde eine schwache Fluoreszenz beobachtet, die sich hauptsächlich in vesikulären Strukturen konzentrierte (Abb. III.2) und mit Lamp-2, einem Marker für saure lysosomale Kompartimente, kolokalisiert werden konnte (Abb. III.3). In transient transfizierten und GFP-Pen2 konfokalmikroskopisch deutlich über das physiologische Level hinaus exprimierenden Zellen hingegen zeigte sich das Signal ausschließlich im ER und der Kernhülle (Abb. III.2). Diese bildgebenden Experimente legten in Übereinstimmung mit den Vorarbeiten nahe, dass überexprimiertes Pen2, das wegen seines Überschusses nicht in den γ -Sekretase-Komplex assembliert wird, im ER retiniert wird.

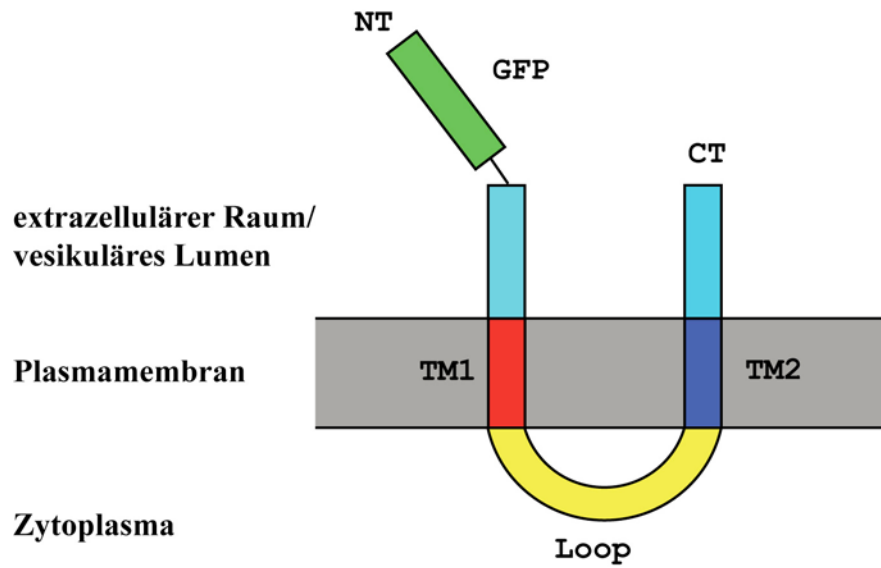


Abb. III.1. Schematische Darstellung des GFP-Pen2-Fusionsproteins.

NT = N-Terminus, bestehend aus GFP (grün) und Pen2-NT (hellblau),

CT = C-Terminus (hellblau), TM1 = erste Transmembrandomäne (rot), Loop = zytoplasmatischer Loop (gelb),
TM2 = zweite Transmembrandomäne (dunkelblau).

Schemazeichnung, Größenrelationen nicht vollständig realitätsgetreu.

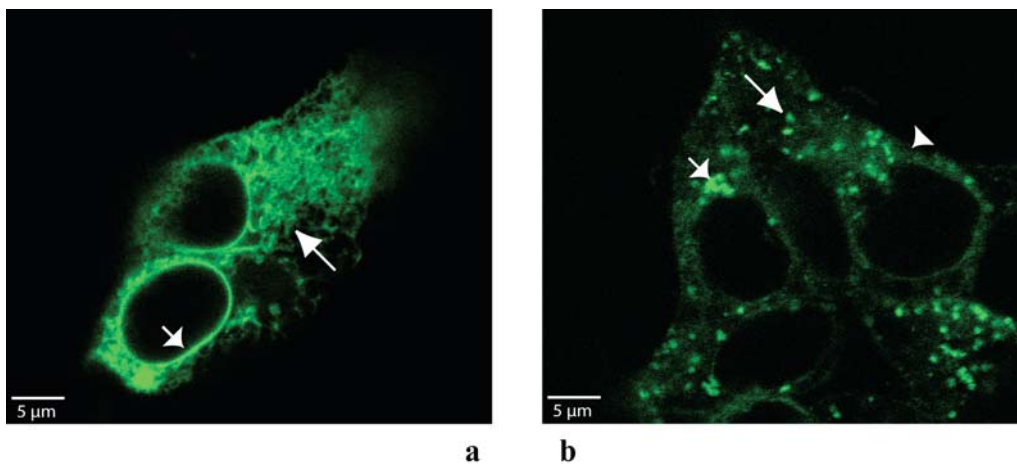


Abb. III.2. GFP-Pen2-Protein lokalisiert unterschiedlich je nach Expressionslevel.

Sw-Zellen, die GFP-Pen2 entweder transient (a) oder stabil (b) exprimieren, wurden fixiert und mit konfokaler Mikroskopie analysiert. Das transient transfizierten Fusionsprotein zeigt sich in ER (langer Pfeil) und Kernhülle (kurzer Pfeil), während sich in der stabilen Expression das Signal mehr hin zu peripheren Vesikeln (langer Pfeil), Golgi-Apparat (kurzer Pfeil) und Plasmamembran (Pfeilkopf) verschiebt.

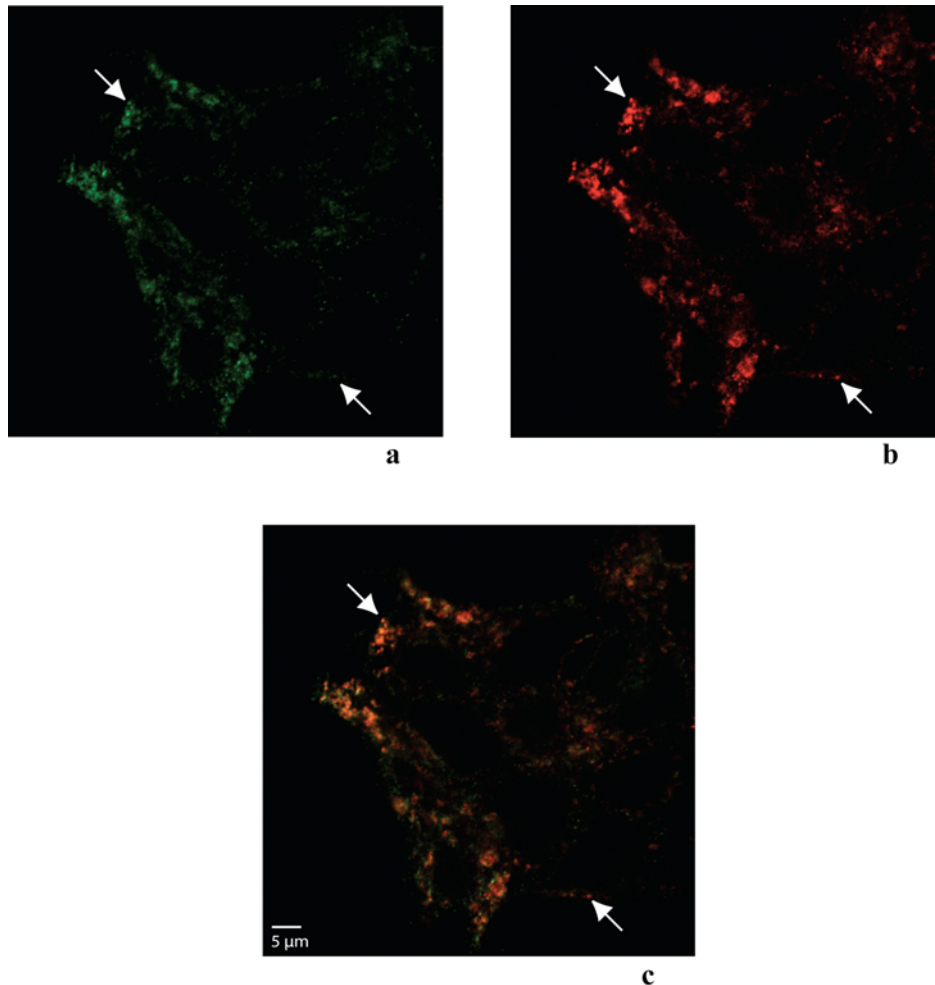


Abb. III.3. Kolokalisation von GFP-Pen2 mit Lamp-2.

Stabil GFP-Pen2 exprimierende Sw-Zellen wurden fixiert und mit konfokaler Mikroskopie untersucht. Der konfokale Schnitt liegt in dieser Abbildung nahe am Deckglas.

a: Stabile Expression von GFP-Pen2 (etwas stärkerer Kontrast im Vergleich zu Abb. III.2). Erkennbar ist eine periphere Fluoreszenz in vesikulärer Anordnung (Pfeile).

b: Färbung lysosomaler Vesikel in denselben Zellen mit Lamp-2 (rot, Pfeile).

c: Überlagerung von **a** und **b**. Es zeigt sich eine partielle Kolokalisation von GFP-Pen2 mit dem lysosomalen Marker (exemplarische Pfeile).

III.2 DIE ERSTE TRANSMEMBRANDOMÄNE VON PEN2 ENTHÄLT EIN ER-RETENTIONS-MOTIV

Um nun spezifische Domänen innerhalb von Pen2 zu identifizieren, die für die Retention von Pen2 verantwortlich sein könnten, wurden Reporterproteine mit bekanntem Transportverhalten eingesetzt. Einzelne Domänen der Reporterproteine wurden durch korrespondierende Domänen von Pen2 ersetzt. Da Transportsignale allgemein in

zytoplasmatischen Domänen oder in Transmembrandomänen lokalisiert sind, kommen hierfür im Falle von Pen2 die beiden Transmembrandomänen 1 und 2 sowie der zytoplasmatische Loop in Frage. Die nach Ersetzen der zu untersuchenden Domänen erhaltenen Fusionsproteine wurden transient in COS-Zellen transfiziert und ihr Transportverhalten mittels Immunfluoreszenz analysiert (Abb. III.5).

Zur Analyse der ersten Transmembrandomäne (TM1) und des Loops wurde als Reporterprotein CD4 eingesetzt, ein Typ-I-Transmembranprotein, das auf T-Zellen und anderen Immunzellen exprimiert wird und als Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors fungiert. CD4 wurde bereits in anderen Arbeiten zur Identifizierung von ER-Retentions-Signalen verwendet [Kaether *et al.*, 2004, Zerangue *et al.*, 1999] (Schema siehe Abb. III.4).

Die zweite Transmembrandomäne von Pen2 (TM2) wurde entsprechend in TNF α , einem Typ-II-Transmembranprotein, das nach der Proteolyse seiner extrazellären Domäne als Zytokin aktiv ist, analysiert (Schema siehe Abb. III.4).

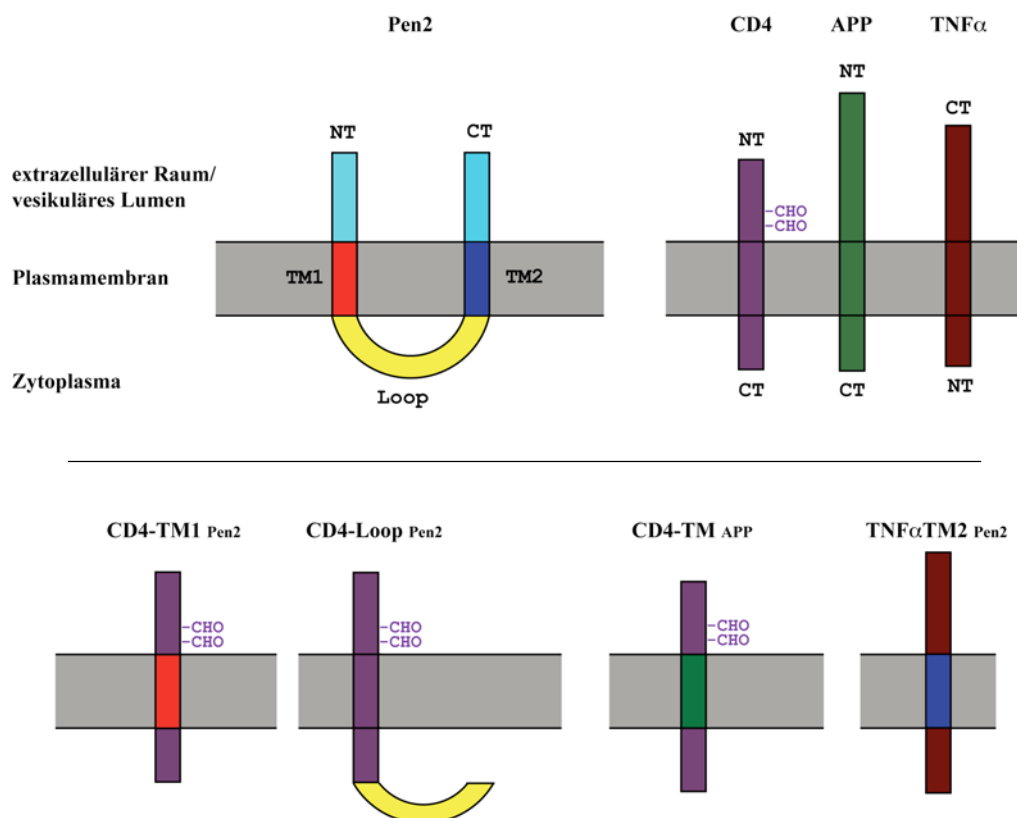


Abb. III.4. Schema der Ausgangs-/Reporterproteine und resultierender Fusionskonstrukte.

Grafische Darstellung der zur Herstellung der Fusionsproteine verwendeten Reporter- bzw. Ausgangsproteine (oben) und der resultierenden Konstrukte (unten). CHO = Glykosylierungsstelle.

Schemazeichnung, Größenrelationen nicht realitätsgetreu.

Analog zu vorherigen Resultaten [Kaether *et al.*, 2004; Zerangue *et al.*, 1999] führte die Expression von CD4 zur Akkumulation des Proteins an der Zelloberfläche. Wie erwartet fand sich ebenso TNF α an der Plasmamembran. Das Anfügen des intrazellulären Loops von Pen2 an den C-Terminus von CD4 sowie das Ersetzen der TNF α -TM durch die TM2 von Pen2 hatten keinen Effekt auf die Lokalisierung des jeweiligen Konstrukts; beide Fusionsproteine wurden in COS-Zellen effizient an die Zelloberfläche transportiert (Abb. III.5, Konstrukte CD4, CD4-Loop_{Pen2}, TNF α und TNF α -TM2_{Pen2}). Wurde hingegen die CD4-Transmembrandomäne durch die erste Transmembrandomäne von Pen2 (TM1) ersetzt (Abb. III.5, Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}), zeigte das resultierende Konstrukt nach der Expression in COS-Zellen eine prominente und nahezu vollständige ER-Färbung. Dies legt nahe, dass die TM1 für die Retention des Konstrukts im ER verantwortlich ist (Abb. III.5). Um auszuschließen, dass es sich hierbei um einen artifiziellen Effekt durch Missfaltung, Destruktion eines ER-Export-Motivs oder eines anderen Motivs, das die Lokalisation von CD4 an der Zelloberfläche vermittelt oder beeinflusst, handeln könnte, wurde in einem Kontrollexperiment die Transmembrandomäne von APP in CD4 inseriert. Hierdurch konnte keine ER-Retention von CD4 ausgelöst werden. Dies zeigt, dass der beobachtete Effekt spezifisch für und abhängig von der AS-Sequenz der Pen2-Transmembrandomäne ist (Abb. III.5, Konstrukt CD4-TM_{APP}).

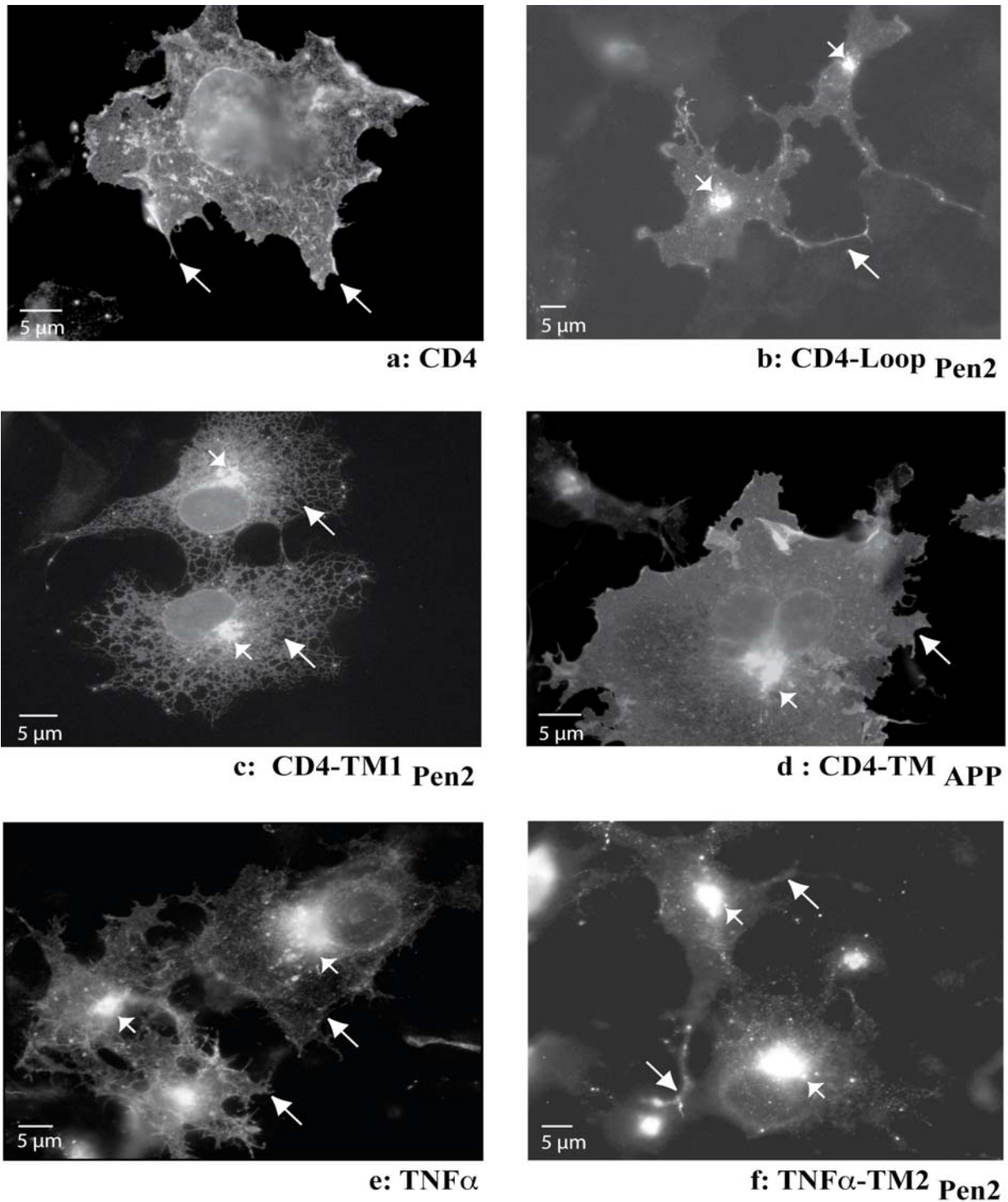


Abb. III.5. Zelluläre Lokalisation der in Abb. III.4 dargestellten Fusionskonstrukte.

COS-Zellen wurden transient transfiziert and fixiert. Die Fusionsproteine wurden immunfluoreszent markiert und ihre Lokalisation mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

a: CD4 – Plasmamembran (lange Pfeile).

b: CD4-Loop_{Pen2} – Plasmamembran (langer Pfeil) und Golgi (kurze Pfeile)

c: CD4-TM1_{Pen2} – ER (lange Pfeile) und Golgi (kurze Pfeile)

d: CD4-TM_{APP} – Plasmamembran (langer Pfeil) und Golgi (kurzer Pfeil)

e: TNF α – Plasmamembran (lange Pfeile) und Golgi (kurze Pfeile)

f: TNF α -TM2_{Pen2} – Plasmamembran (lange Pfeile) und Golgi (kurze Pfeile)

Um weitere, methodisch unabhängige Evidenz für eine ER-Retention von CD4-TM1_{Pen2} zu gewinnen, wurden stabil exprimierende Zelllinien für die Fusionsproteine CD4, CD4-TM_{APP} und CD4-TM1_{Pen2} angelegt und für Deglykosylierungsexperimente verwendet (Abb. III.6). CD4 hat zwei Glykosylierungsstellen (siehe Schema in Abb. III.4). Eine der beiden Glykosylierungsstellen wird im Rahmen des Maturierungsprozesses und des Transports durch den sekretorischen Weg komplex glykosyliert und somit endoglykosidase-H(EndoH)-resistent [Shin *et al.*, 1991]. Aus diesem Grund läuft endoH-verdautes CD4 im SDS-Gel etwas schneller als die unverdaute Probe, jedoch langsamer als das völlig deglykosylierte, N-Glykosidase F-behandelte CD4 (Abb. III.6). Wie CD4 war auch CD4-TM_{APP} endoH-resistent, wohingegen CD4-TM1_{Pen2} endoH-sensitiv blieb, was bestätigt, dass es nicht in die späten Golgi-Kompartimente vordringt (Abb. III.6). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die TM1 von Pen2 spezifisch die Retention eines Reporterproteins vermittelt.

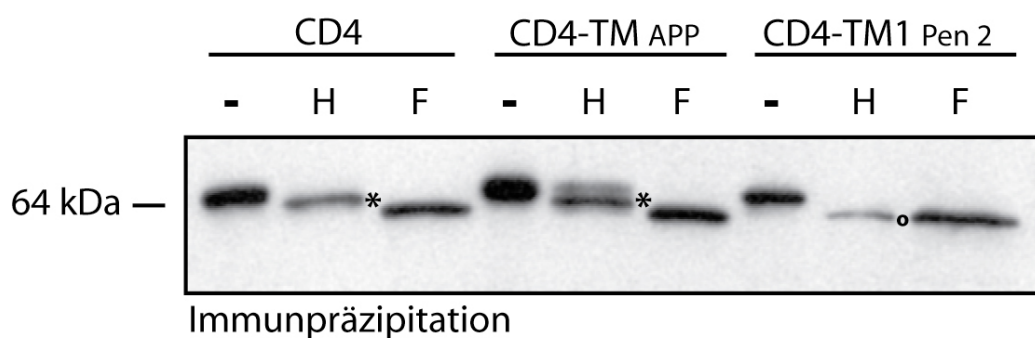


Abb. III.6: Deglykosylierungsverhalten von CD4, CD4-TM_{APP} und CD4-TM1_{Pen2}.

CD4 und CD4-TM_{APP} sind Endoglykosidase H-resistent, erkennbar an der etwas langsameren Laufgeschwindigkeit der Endoglykosidase H-behandelten Probe (markiert mit *) im Vergleich zur komplett deglykosylierten, N-Glykosidase-F-behandelten Probe. Diese Resistenz zeigt eine komplexe Glykosylierung im späten sekretorischen Weg an. Die zweite schwächere und etwas langsamer auf der Höhe von unbehandeltem Protein laufende Bande bei CD4-TM_{APP} in der Endoglykosidase H-behandelten Probe zeigt einen nicht ganz vollständigen Verdau aufgrund etwas höherer Proteinmengen an. Dagegen bleibt CD4-TM1_{Pen2} sensitiv gegenüber Endoglykosidase H (Probe markiert mit o), erkennbar an der gleichen Laufgeschwindigkeit zur N-Glykosidase-F-behandelten Probe. Dieses Konstrukt erreicht daher den späten sekretorischen Weg nicht. Alle Proben wurden mit einem α -CD4-Antikörper immunpräzipitiert, die Detektion wurde ebenfalls mit einem α -CD4-Antikörper durchgeführt.

- = unbehandelt, H = behandelt mit Endoglykosidase H, F = behandelt mit N-Glykosidase F.

III.3 DER DISTALE TEIL DER TM1 UND DREI BENACHBARTE AMINOSÄUREN VERMITTELN DIE RETENTION IM ER

Um die für die Retention verantwortliche Domäne weiter zu spezifizieren, wurden in drei überlappenden Intervallen Teile der CD4-TM durch korrespondierende Teile der Pen2-TM1 ersetzt (Schema siehe Abb. III.7). Die so erhaltenen CD4-Varianten wurden in COS-Zellen transient transfiziert und die subzelluläre Distribution der Fusionsproteine wurde mittels Immunfluoreszenz analysiert (Abb. III.8). Während der N-terminale und der mittlere Teil der TM nicht zur Retention des CD4-Konstrukts führten (Konstrukte CD4-TM_{Pen2} 1-12 und CD4-TM_{Pen2} 7-18), retinierte der C-terminale Teil der TM1 das korrespondierende CD4-Konstrukt (Konstrukt CD4-TM_{Pen2} 13-24) im ER (Abb. III.8). Eine weitere Verkürzung dieser 12 Aminosäuren umfassenden Sequenz um jeweils drei N- bzw. C-terminale Aminosäuren hob die ER-Retention wieder auf (Konstrukte CD4-TM_{Pen2} 13-21 und CD4-TM_{Pen2} 16-24).

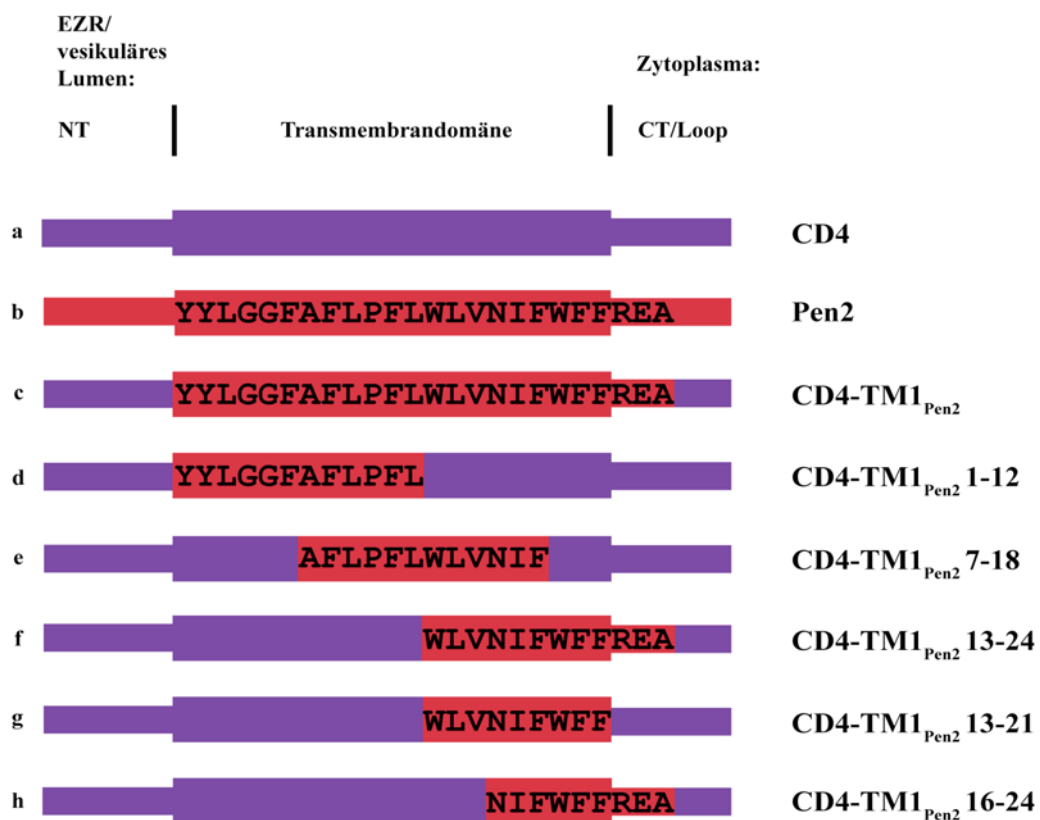


Abb. III.7. Schematische Darstellung der verwendeten CD4-TM1_{Pen2}-Konstrukte (s. vorherige Seite).

a: CD4 (violett) – Ausgangsprotein

b: Pen2 (rot, inklusive der Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne und Umgebung) - Ausgangsprotein

c: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2} (vgl. Abschnitt III.2)

d: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}1-12 (die Zahlen nummerieren die in der Transmembrandomäne enthaltenen Aminosäuren)

e: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}7-18

f: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}13-24

g: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}13-21

h: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}16-24

Schemazeichnung, die N- und C-Termini bzw. der zytoplasmatische Loop sind stark verkürzt dargestellt.

Abb. III.8. Zelluläre Lokalisation der CD4-TM1_{Pen2}-Konstrukte (s. nächste Seite).

COS-Zellen wurden transient transfiziert und fixiert. Die Fusionsproteine wurden immunfluoreszent markiert und ihre Lokalisation wurde im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

a: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}1-12: Plasmamembran (langer Pfeil) und Golgi-Apparat (kurzer Pfeil)

b: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}7-18: Hauptsächlich Plasmamembran (langer Pfeil)

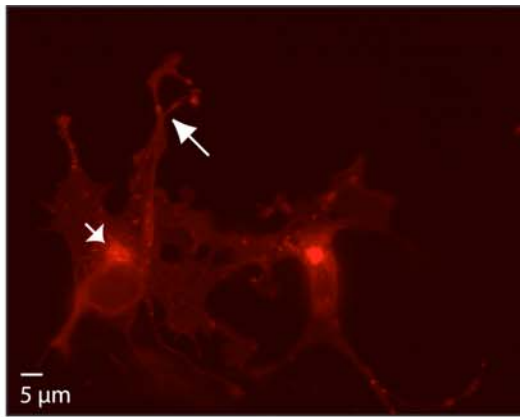
c: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}13-24: ER (langer Pfeil) und Golgi-Apparat (kurzer Pfeil)

d: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}13-21: Plasmamembran (langer Pfeil) und Golgi (kurzer Pfeil)

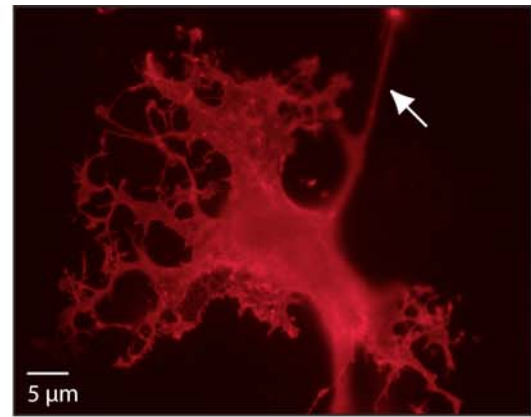
e: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}16-24: Hauptsächlich Plasmamembran (langer Pfeil)

f: CD4: Plasmamembran (langer Pfeil) und Golgi (kurzer Pfeil)

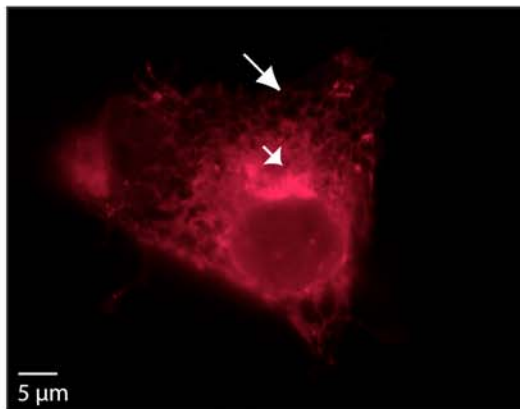
g: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}1-24: ER (langer Pfeil) und Golgi-Apparat (kurzer Pfeil)



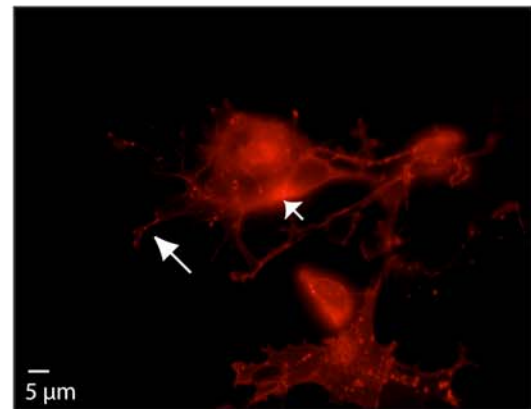
a: CD4-TM1_{Pen2} 1-12



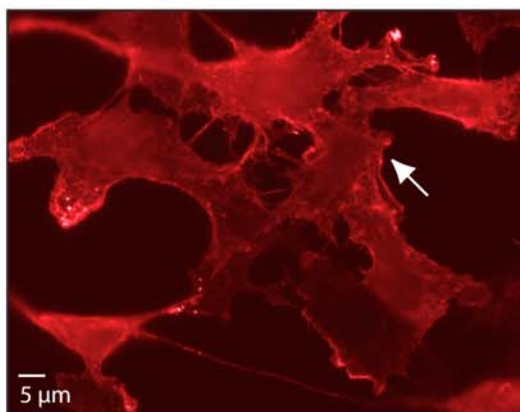
b: CD4-TM1_{Pen2} 7-18



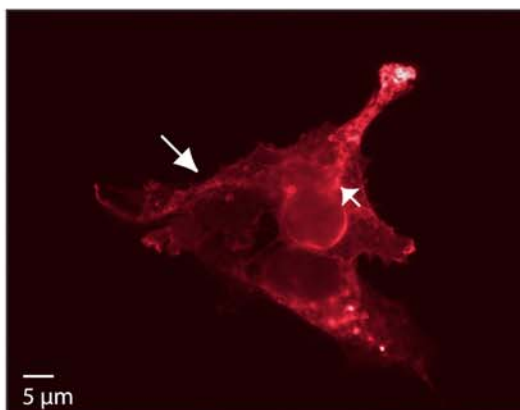
c: CD4-TM1_{Pen2} 13-24



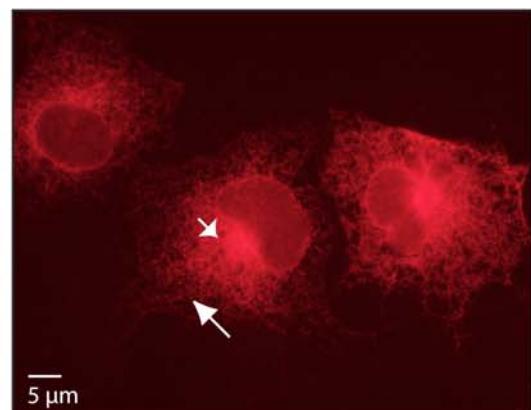
d: CD4-TM1_{Pen2} 13-21



e: CD4-TM1_{Pen2} 16-24



f: CD4



g: CD4-TM1_{Pen2} 1-24

Die formal definierte TM des Konstrukts CD4-TM1 und der Konstrukte CD4-TM1_{Pen2}13-24 und CD4-TM1_{Pen2}16-24 (C-terminaler Teil der Pen2-TM1) endet mit der Aminosäuresequenz REA. Diese geladenen Aminosäuren befinden sich höchstwahrscheinlich außerhalb der Lipiddoppelschicht. Da sie damit die in CD4 an die Transmembrandomäne angrenzende Aminosäuresequenz RCR mehr in den zytosolischen Raum verschieben und RCR (wie generell RxR, wobei x für eine variable Aminosäure steht) eine potentielle ER-Retentions-Sequenz darstellt, ergab sich die Möglichkeit, dass durch das Einsetzen der Aminosäuren REA artifiziell ein vorher inaktives und in der physiologischen Situation bedeutungsloses Retentionssignal durch günstigere Exposition im zytoplasmatischen Raum aktiviert worden sein könnte. Um diese Möglichkeit auszuschließen und um ergänzend zu den bereits analysierten Konstrukten zu untersuchen, wie wichtig der Beitrag der REA-Sequenz zur Retention im ER ist, wurden folgende drei CD4-Varianten konstruiert: Erstens wurde REA an entsprechender Stelle in CD4 ohne die restliche Pen2-TM1-Sequenz eingesetzt, wobei die angrenzende RCR-Sequenz von CD4 beibehalten wurde, um einen möglichen Retentionseffekt von REA zusammen mit RCR nachzuweisen. Zweitens wurde anstelle von REA die ebenfalls geladene willkürliche Sequenz KDA zusätzlich zu RCR in CD4 eingesetzt um den alleinigen Effekt des Verschiebens von RCR in Richtung Zytosol unabhängig von einer bestimmten Aminosäuresequenz zu imitieren. Drittens wurde REA allein ohne das RCR-Motiv eingesetzt um eine eventuelle Retentionswirkung dieser drei Aminosäuren isoliert zu untersuchen (Schema siehe Abb. III.9).

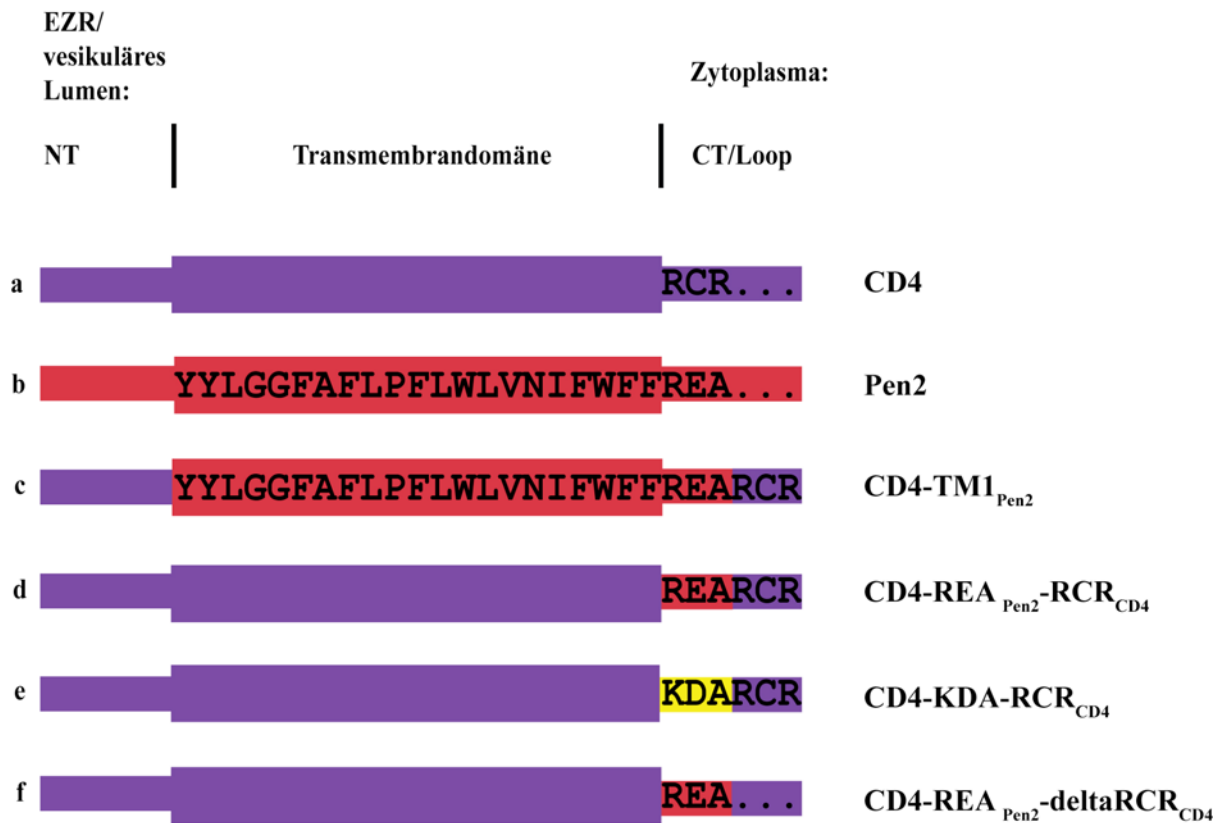


Abb. III.9. Schematische Darstellung der verwendeten C-terminal variierten CD4-TM1_{Pen2}-Konstrukte.

- a: CD4 (violett, inklusive der in CD4 enthaltenen Aminosäuresequenz RCR) – Ausgangsprotein
 b: Pen2 (rot, inklusive der Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne und Umgebung) - Ausgangsprotein
 c: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2} (vgl. Abschnitt III.2)
 d: Konstrukt CD4-REA_{Pen2}-RCR_{CD4}
 e: Konstrukt CD4-KDA-RCR_{CD4}
 f: Konstrukt CD4-REA_{Pen2} - delta RCR_{CD4}

Schemazeichnung, die N- und C-Termini bzw. der zytoplasmatische Loop sind stark verkürzt dargestellt.

Wie in Abb. III.10 ersichtlich, werden alle drei Konstrukte nicht im ER retiniert, wodurch einerseits ein möglicher artifizierlicher Effekt durch die Verschiebung von RCR ausgeschlossen werden konnte, und andererseits gezeigt wurde, dass REA allein nicht in der Lage ist, eine ER-Retention auszulösen. Für die Retention werden also sowohl eine hydrophobe Domäne wie auch ein geladenes Cluster in Kombination benötigt, isoliert ist keiner der beiden Anteile dazu in der Lage, auch nur eine schwache Retention zu bewirken.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass eine Sequenz von sieben bis neun hydrophoben Aminosäuren in der TM1 von Pen2 zusammen mit ein bis drei benachbarten zytosolischen Aminosäuren hinreichend und notwendig ist, um ein Reporterprotein im ER zu retinieren.

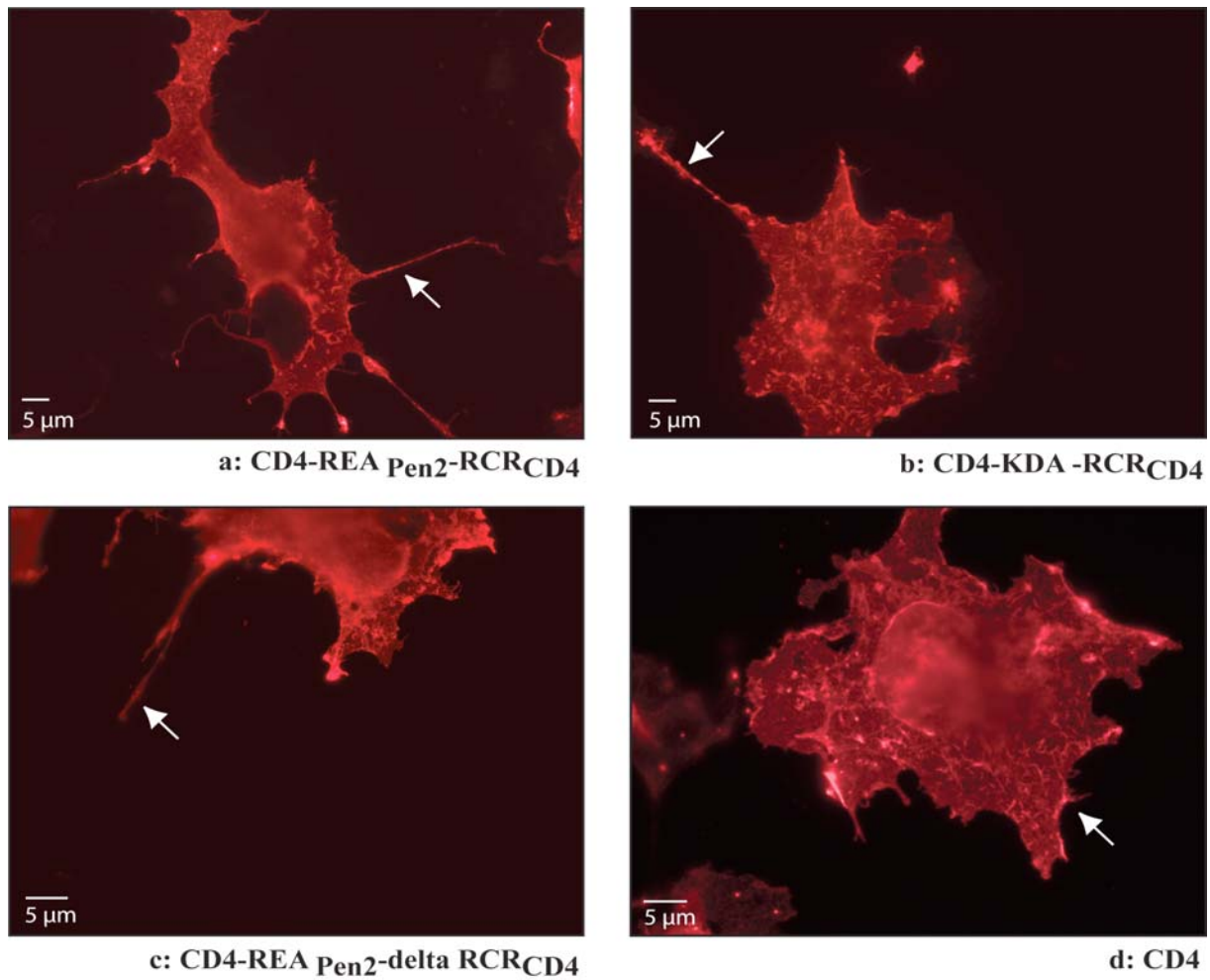


Abb. III.10. Zelluläre Lokalisation der verwendeten C-terminal variierten CD4-TM1_{Pen2}-Konstrukte

COS-Zellen wurden transient transfiziert und fixiert. Die Fusionsproteine wurden immunfluoreszent markiert und ihre Lokalisation wurde im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

- a: Konstrukt CD4-REA_{Pen2}-RCR_{CD4}: Lokalisation an der Plasmamembran (langer Pfeil)
- b: Konstrukt CD4-KDA-RCR_{CD4}: Lokalisation an der Plasmamembran (langer Pfeil)
- c: Konstrukt CD4-REA_{Pen2}-delta RCR_{CD4}: Lokalisation an der Plasmamembran (langer Pfeil)
- d: CD4: Lokalisation an der Plasmamembran (langer Pfeil)

III.4 EIN KONSERVIERTER ASPARAGINREST IN DER TM1 WIRD FÜR DIE ER-RETENTION BENÖTIGT

In Arbeiten anderer Gruppen wurde gezeigt, dass polare oder geladene Aminosäurenreste innerhalb eines Retentions-Motivs entscheidend an der Ausübung des Retentionseffektes beteiligt sind [Bonifacino *et al.*, 1991; Sato *et al.*, 2003]. Die TM1 von Pen2 enthält in der Domäne, die für die ER-Retention verantwortlich ist, ein evolutionär konserviertes Asparagin (N) an Position 33 (bzw. Position 16 wenn nummeriert ab der ersten Aminosäure innerhalb der Transmembrandomäne, vgl. Abb. III.11, III.7 und III.9).

Hs	MNLER-----VSNEEKLNLCKRKY	19
Mm	MNLER-----VSNEEKLNLCKRKY	19
Dr	MNLER-----IPNEEKLSLCRRYY	19
Dm	MNISK-----APNPRKLELCRKYF	19
Ce	MDISK-----LTDVKKVDLCKKYF	19
At	MEATRSDDPSLNPIRNRNPNPNPNPLSTI ISSAQVWPTIDGPLGLTEEASVDYARRFY	60
-----*		
Hs	LGGFAFLPFLWLVNIFWFFREAFLLVPAYTEQSQIKGYVWRSVAVGFLFWVIVLTSWITIFQ	79
Mm	LGGFAFLPFLWLVNIFWFFREAFLLAPAYTEQSQIKGYVWRSVAVGFLFWVILATWITIFQ	79
Dr	LGGFAFLPFLWLVNIFWFFREAFLLKPAYTEQPQIKSYVKKSALEGLLWVAVLTTWITVFQ	79
Dm	FAGFAFLPFWVAINVCWFFTEAFHKPPFSEQSQIKRYVIYSVAVGTLFWLIVLTAWIIFQ	79
Ce	LIGACFLPLVWIVNTFWFFSDFACKPINAHRRQIRKYVIASLVGSIFWIIVLSAWIIFQ	79
At	KFGFALLPWLWVNCFYFWPVLHRSRAFP---QIRNYVVRSAIGFSVFTALLSAWALTF	117
-----*		
Hs	IYR-PRWGALGDYLSFTIPLGTP-----	101
Mm	IYR-PRWGALGDYLSFTIPLGTP-----	101
Dr	HFR-AQWGEVGDYLSFTIPLGTA-----	101
Dm	TNR-TAWGATADYMSFIIPLGSA-----	101
Ce	HYR-AQGLVWTDFLTFVFPTRV-----	101
At	IGGEQLFGPLYDKLVMYNVADRLGLSGLA	146

Abb. III.11: CLUSTAL W (1.83) Alignment von Pen2-Homologen verschiedener Spezies

Abkürzungen und Symbole:

Hs: *Homo sapiens*

Mm: *Mus musculus*

Dr: *Danio rerio*

Dm: *Drosophila melanogaster*

At: *Arabidopsis thaliana*

Ce: *Caenorhabditis elegans*

-----*: Motiv des Retentionssignals, das in humanem Pen2 identifiziert wurde [diese Arbeit].

N: Konservierter Asparaginrest

Aminosäuren-Farbkodierung anhand ihrer chemischen Eigenschaften:

AVFPMILW: kleine und hydrophobe Aminosäuren

DE: saure Aminosäuren

RK: basische Aminosäuren

STYHCNGQ: Aminosäuren mit Hydroxyl-, Sulfhydryl- oder zusätzlichen Aminogruppen und Glycin

Genbankzugangsnummern:

Hs: NP_758844, Mm: [AK007621](#), Dr: NP_991139,

Dm: AAM88323, At: CAC05457, Ce: NP_499459.

Um die mögliche Beteiligung dieses polaren Aminosäurerestes an der ER-Retention zu untersuchen, wurde er in CD4-TM1_{Pen2} zu Leucin (L) mutiert (Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}-N33L) und anschließend die subzelluläre Lokalisation des mutanten Konstrukts einerseits mittels Immunfluoreszenz nach transienter Expression und andererseits mittels Deglykosylierungsexperimenten bei stabiler Expression untersucht (Abb. III.12 und III.13). Bei CD4-TM1_{Pen2}-N33L zeigte sich in der Immunfluoreszenz eine weitgehende Aufhebung der ER-Retention mit teilweiser Verschiebung des Fluoreszenzsignals hin zu peripheren Zellkompartimenten (Abb. III.12). Dieser Befund wurde bestätigt durch Deglykosylierungsexperimente, die etwa gleiche Anteile endoH-resistenten und sensitiven CD4-TM1_{Pen2}-N33L zeigten, im Gegensatz zu dem vollständig retinierten CD4-TM1_{Pen2} (Abb. III.13). Zusammen mit den Ergebnissen aus Abb. III.8 und III.10 zeigt dies, dass dem konservierten Asparaginrest eine wichtige Funktion bei der Vermittlung der ER-Retention zukommt, ohne dass er jedoch hierfür hinreichend wäre. Der Retentionseffekt wird durch benachbarte Aminosäuren komplementiert, die somit eine zusätzliche Rolle spielen.

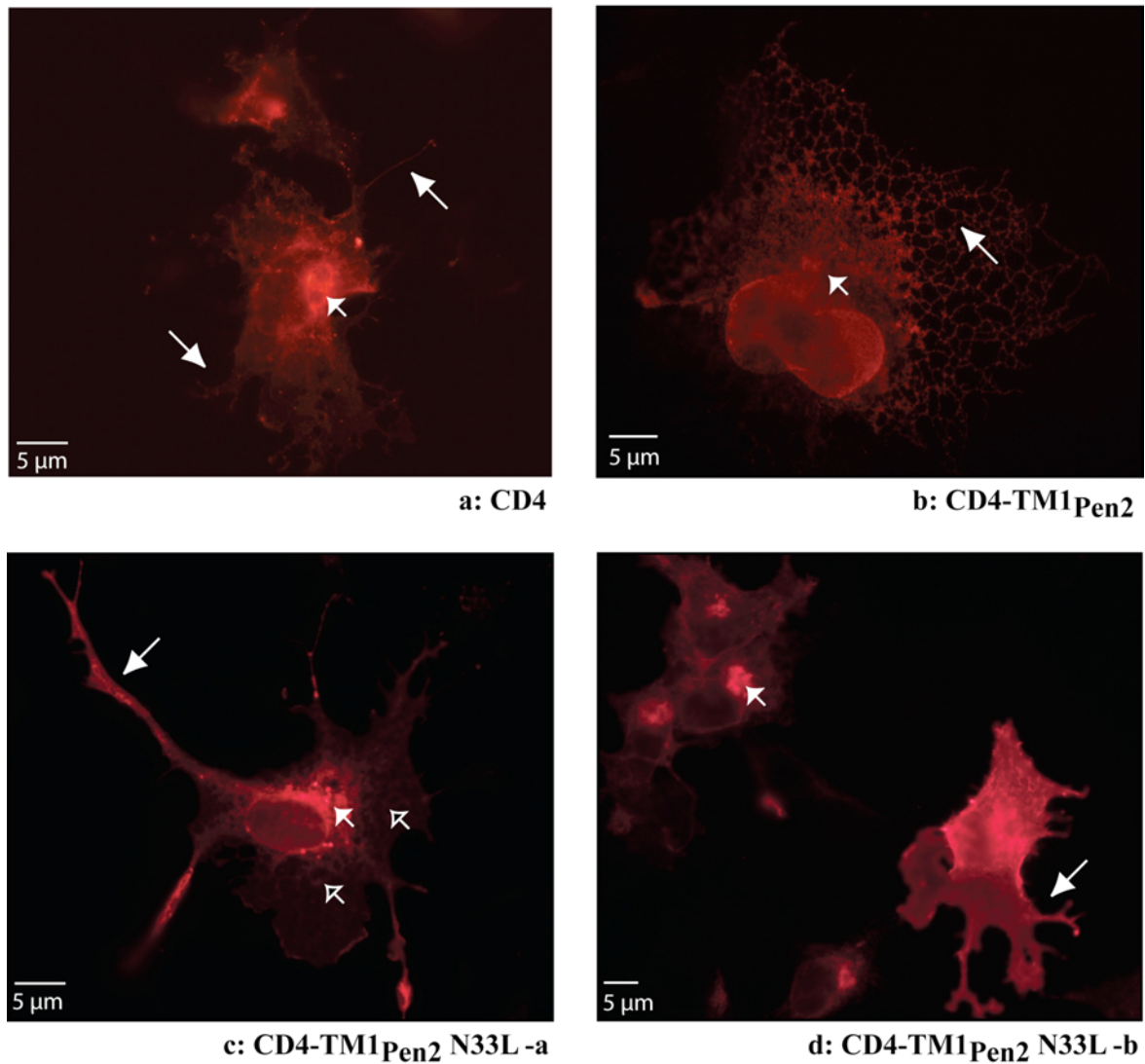


Abb. III.12. Zelluläre Lokalisation der CD4-TM1_{Pen2}-N33L-Konstrukte

COS-Zellen wurden transient transfiziert und fixiert. Die Fusionsproteine wurden immunfluoreszent markiert und ihre Lokalisation wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

a: CD4: Plasmamembran (lange Pfeile) und Golgi-Apparat (kurzer Pfeil)

b: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}: ER (langer Pfeil) und Golgi (kurzer Pfeil)

c und d: Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}N33L: Plasmamembran (lange weiße Pfeile), Golgi-Apparat (kurze weiße Pfeile) und ER (kurze schwarz-weiße Pfeile). Im Vergleich mit CD4 und CD4-TM1_{Pen2} fällt auf, dass die ER-Retention weitgehend aufgehoben ist. Das Ausmaß dieses Effektes ist jedoch von Zelle zu Zelle individuell unterschiedlich stark ausgeprägt (vgl. c und d, sowie verschiedene Zellen innerhalb von d).

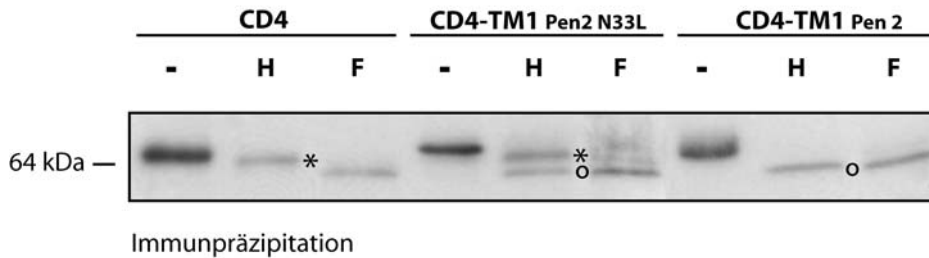


Abb. III.13. Deglykosylierungsverhalten von CD4, CD4-TM1_{Pen2 N33L}, und CD4-TM1_{Pen2}

CD4 (links) ist aufgrund seiner komplexen Glykosylierung im späten sekretorischen Weg Endoglykosidase H-resistent (*) (vgl. Abb.III.6). CD4-TM1_{Pen2} (rechts), das den späten sekretorischen Weg aufgrund der ER-Retention nicht erreicht, bleibt sensitiv gegenüber Endoglykosidase H, erkennbar an der der N-Glykosidase-F-behandelten Probe entsprechenden Laufgeschwindigkeit (o) (vgl. Abb.III.6). CD4-TM1_{Pen2 N33L} (Mitte) zeigt ein Mischverhalten – während etwa die Hälfte der Probe Endoglykosidase H-resistent ist (*), bleibt die andere Hälfte sensitiv (o). Die Proben wurden mit einem α -CD4-Antikörper immunpräzipitiert, die Detektion wurde ebenfalls mit einem α -CD4-Antikörper durchgeführt.

- = unbehandelt, H = behandelt mit Endoglykosidase H, F = behandelt mit N-Glykosidase F.

III.5 DAS IDENTIFIZIERTE RETENTIONS-MOTIV SCHEINT SPEZIFISCH FÜR PEN2 ZU SEIN

Nachdem also ein Signalmotiv, bestehend aus den zwölf Aminosäuren WLVNIFWFFREA identifiziert worden war, das in der Lage ist, ein Reporterprotein im ER zurückzuhalten, sollte nun festgestellt werden, ob dieses Motiv auch in anderen Proteinen als Retentionssignal vorkommen könnte – mit anderen Worten, ob es sich hier um ein Pen2-spezifisches oder allgemeineres Phänomen handelt. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe des FASTA-Programms [Pearson und Lipmann, 1988] innerhalb der gesamten Uniprot-Datenbank nach Proteinen gesucht, die dasselbe oder ein ähnliches Sequenzmotiv enthielten. Es wurden außer Pen2 und Pen2-Homologen (bzw. putativen Homologen wenig charakterisierter Spezies) jedoch keine Kandidaten gefunden, die besondere Sequenzähnlichkeit gezeigt hätten. Auch die Suche nach ausschließlich menschlichen Proteinen/Peptiden, die nur eine entfernte Homologie mit der vorgegebenen 12-AA-Sequenz aufweisen mussten, erbrachte keine charakterisierten Treffer (s. Abb. III.14).

FASTA version 34.26

searching /ebi/services/idata/v2082/fastadb/uniprot library

Sequence 12 aa vs UniProt library

Colored by: identity + property

```

                                1 [           ] 12
Query                          1:12      WLVNIFWFFREA
1 UNIPROT: PEN2_BOVIN         1:12 1:101  WLVNIFWFFREA
2 UNIPROT: PEN2_HUMAN         1:12 1:101  WLVNIFWFFREA
3 UNIPROT: PEN2_MOUSE        1:12 1:101  WLVNIFWFFREA
4 UNIPROT: Q6QI68_RAT         1:12 1:101  WLVNIFWFFKEA
5 UNIPROT: Q4RHS1_TETNG       1:12 1:101  WLVNVVWFFREA
6 UNIPROT: PEN2_DANRE         1:12 1:101  WLVNIIWFFKEA
7 UNIPROT: A7RR32_NEMVE       1:12 1:101  WLVNAIWFFREA
8 UNIPROT: Q640D2_XENLA       1:12 1:101  WLVNVVWFFKEA
9 UNIPROT: Q5PQA0_XENLA       1:12 1:101  WLVNVVWFFKEA
10 UNIPROT: Q28GF7_XENTR      1:12 1:101  WLVNVVWFFKEA
11 UNIPROT: PEN2_CAEEL        1:12 1:101  WIVNTFWFFSDA
12 UNIPROT: Q2F5X1_BOMMO      1:12 1:101  WAVNVCWFFRDA
consensus/100%                  WhvNhhWFFp-A
consensus/90%                   WLVNhhWFF+-A
consensus/80%                   WLVNlhWFF+EA
consensus/70%                   WLVNlhWFF+EA

```

Abb. III.14. Ergebnisse der FASTA-Suche nach dem Pen2-Retentionssignal (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>). Gesucht wurde nach der in Pen2 identifizierten Retentionssequenz WLVNIFWFFREA. Bei den Treffern handelt es sich um Pen2, Pen2-Homologe und uncharakterisierte Proteine, die höchstwahrscheinlich Pen2-Homologen entsprechen.

III.6 GFP-PEN2^{TM1_{MUT}} UND GFP-PEN2N33L WERDEN WENIGER IM ER ZURÜCKGEHALTEN ALS GFP-PEN2

Es war nun nahe liegend, die zellbiologische Bedeutung des identifizierten Retentionssignals im Kontext des Pen2-Proteins selber zu untersuchen. Dies sollte zuerst mittels konfokaler Lebendzellmikroskopie geschehen. Zu diesem Zweck wurden zunächst die 12 als relevant bestimmten Aminosäuren in GFP-Pen2 durch orthotope Aminosäuren von CD4 ersetzt (Konstrukt GFP-Pen2-TM1_{mut}) (Schema siehe Abb. III.15).

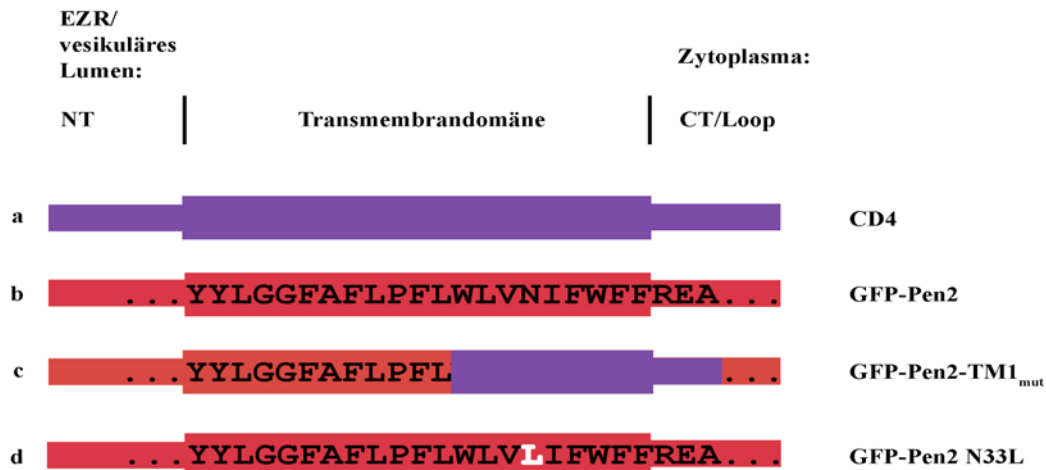


Abb. III.15. Schematische Darstellung der GFP-Pen2-TM1-Konstrukte.

a: CD4 (violett)

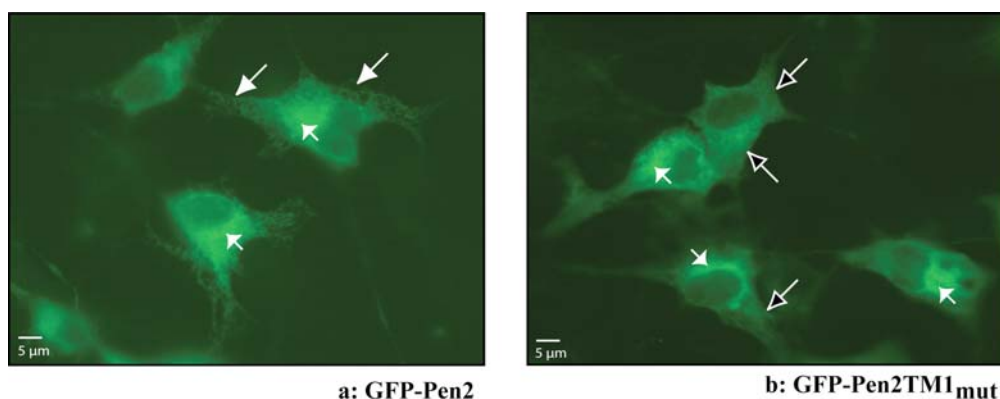
b: Pen2 (rot, inklusive der Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne und Umgebung) - Ausgangsprotein

c: Konstrukt GFP-Pen2-TM1_{mut}.

d: Konstrukt GFP-Pen2 N33L.

Schematische Zeichnung, die N- und C-Termini, bzw. der zytoplasmatische Loop, sind stark verkürzt dargestellt. Die N-terminal lokalisierte Fusion an GFP ist nicht gezeigt.

Wie aus Abb. III.16 ersichtlich zeigte sich bei transienter Expression von GFP-Pen2-TM1_{mut}, die mit einer über das physiologische Level hinausgehenden Überexpression einhergeht, nur eine partielle Verschiebung des Fluoreszenzsignals zu peripheren Kompartimenten und zur Plasmamembran. Ein Großteil des Proteins war – wahrscheinlich aufgrund seiner hohen Abundanz – noch im ER und im Golgi-Apparat zu sehen.



a: GFP-Pen2

b: GFP-Pen2TM1_{mut}

Abb. III.16. Transiente Expression von GFP-Pen2 und GFP-Pen2-TM1_{mut}.

COS-Zellen wurden transient transfiziert, fixiert, und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Wie in Abb. III.2 gezeigt befindet sich transient exprimiertes GFP-Pen2 (a) hauptsächlich im ER (lange weiße Pfeile) und Golgi-Apparat (kurze weiße Pfeile). Das Konstrukt GFP-Pen2TM1_{mut} (b) ist aufgrund seiner Überexpression ebenfalls zu einem Großteil in ER und Golgi (kurze weiße Pfeile) lokalisiert, jedoch kommt es zusätzlich zu einer vergleichsweise vermehrten Lokalisation in peripheren Vesikeln und an der Plasmamembran (lange schwarz-weiße Pfeile).

Um das aufgrund der Überexpression nur schwach ausgeprägte Fehlen des Retentionseffektes besser darstellen und außerdem quantitativ messbar machen zu können, wurde in einem zweiten Experiment eine Zelllinie hergestellt, die stabil GFP-Pen2 N33L exprimiert. Dies ist eine Mutante, in der lediglich der konservierte Asparaginrest, der schon in Vorexperimenten als wichtig für die ER-Retention bestimmt worden war, zu Leucin mutiert ist (Konstrukt GFP-Pen2N33L, vgl. Abschnitt III.4, Schema siehe Abb. III.15). In diesen Zellen wurde einerseits konfokalmikroskopisch die Lokalisation von GFP-Pen2 N33L mit Wildtyp-GFP-Pen2 verglichen, andererseits wurde zusätzlich mittels eines Oberflächenbiotinylierungsexperiments der relative Anteil an oberflächenständigem GFP-Pen2 N33L im Vergleich zu Wildtyp-GFP-Pen2 bestimmt. Mikroskopisch fällt in der Tat auf, dass sich im Fall der Mutante mehr Fluoreszenzsignal in peripheren Vesikeln befindet und auch die Plasmamembran insgesamt stärker markiert ist als bei GFP-Pen2 (Abb. III.17A). Da jedoch auch letzteres vollständig an der Plasmamembran und in peripheren Vesikeln lokalisiert ist, ist ein (subjektiver) Unterschied kaum zu quantifizieren. Zudem wäre es möglich, dass die periphere Signalvermehrung nicht nur durch verminderte Retention, sondern auch durch unterschiedliche Levels transgener Expression bedingt sein könnte. Für eine genauere Quantifizierung der Menge membranständigen GFP-Pen2- und GFP-Pen2N33L-Proteins wurden die Oberflächenproteine der jeweiligen stabilen Linien bei intakter Zellstruktur biotinyliert, anschließend aus den Zellysaten mittels Streptavidin affinitätsgereinigt und nach SDS-PAGE quantitativ immunodetektiert (Abb. III.17B. Die Biotinylierung und Quantifizierung wurde von B. Novak und C. Kaether durchgeführt.). Es zeigt sich, dass tatsächlich der Anteil an membranständigem GFP-Pen2N33L etwa 1,6mal höher ist als bei GFP-Pen2, obwohl die Expressionslevels beider Konstrukte vergleichbar und sogar in den GFP-Pen2-Linien etwas höher sind (Abb. III.17C). Insgesamt zeigen diese Daten, dass das per Reporterprotein identifizierte Retentionssignal - und dabei insbesondere der darin enthaltene konservierte Asparaginrest - auch „*in vivo*“, also im Kontext des Pen2-Proteins selbst, den Transport des Pen2-Proteins reguliert.

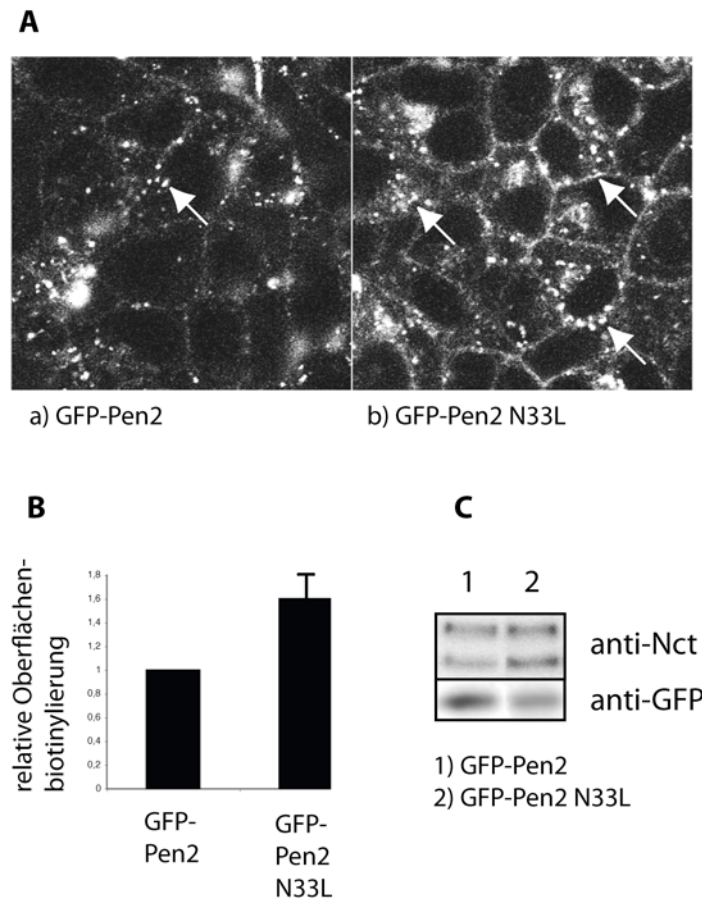


Abb. III.17: Mutation des konservierten Asparaginrestes innerhalb des Retentionssignals führt zu vermehrtem Export von GFP-Pen2.

A: Vermehrte Lokalisation von GFP-Pen2N33L an der Plasmamembran und in peripheren Vesikeln (Pfeile). Sw-Zellen wurden stabil transfiziert und im Konfokalmikroskop analysiert.

B: Biotinylierung aller Zelloberflächenproteine und anschließende relative Quantifizierung von biotinyliertem GFP-Pen2 versus GFP-Pen2N33L in stabilen Zelllinien. Die GFP-Pen2 N33L-Menge an der Oberfläche ist demnach um den Faktor 1.6 höher. Der Fehlerbalken repräsentiert die mittlere Standardabweichung aus sechs unabhängigen Experimenten (durchgeführt v. B. Novak).

C: Die Gesamtmenge von GFP-Pen2 und GFP-Pen2 N33L ist in den verwendeten Zelllinien ähnlich – GFP-Pen2 N33L wird sogar weniger exprimiert als GFP-Pen2.

III.7 CD4-TM1_{PEN2} INTERAGIERT NICHT MIT ANDEREN γ -SEKRETASE-KOMPONENTEN

Pen2 interagiert mit den anderen Komplexkomponenten, insbesondere konnte eine enge Interaktion mit PS nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt I. 4.5.4). Um spezifisch und isoliert die Interaktionsrolle der retentionsvermittelnden Pen2-TM1 untersuchen zu können, wurden Co-Immünpräzipitationen im Kontext des CD4-Fusionsproteins durchgeführt. In einer früheren Arbeit der Gruppe konnte mithilfe eines solchen Ansatzes gezeigt werden, dass ein Fusionskonstrukt aus CD4 und dem PS C-Terminus an immatures Nct bindet (Kaether *et al.*, 2004).

Analog wurden nun die Konstrukte CD4, CD4-TM_{APP} und CD4-TM_{Pen2} stabil in Sw-Zellen exprimiert. Die CD4-Fusionsproteine wurden aus Zelllysaten mit einem Anti-CD4-Antikörper immunpräzipitiert und mittels Westernblot auf Interaktion mit Nct, PS N- und C-Terminus und Pen2 untersucht. Wie aus Abb. III.18 ersichtlich konnte keines dieser Konstrukte eine der anderen Komponenten co-immunpräzipitieren.

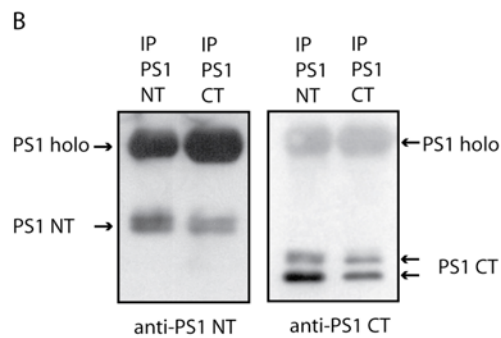
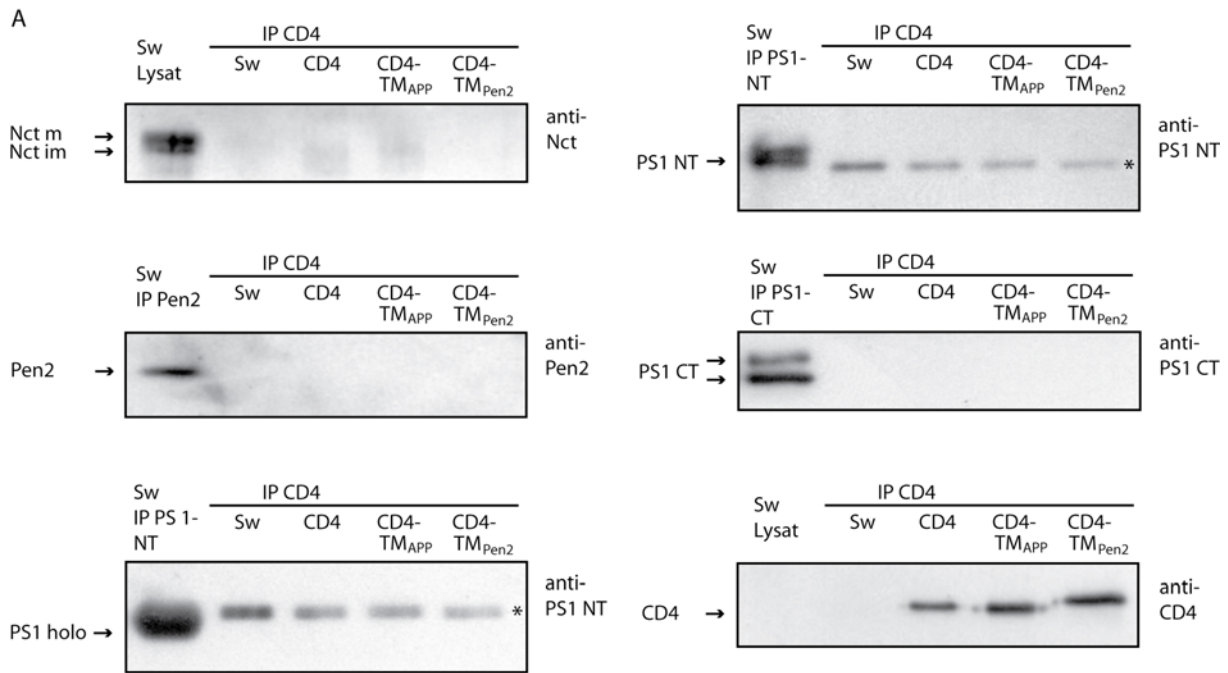


Abb. III.18: Nct, Presenilin N- oder C-Terminus und Pen2 interagieren nicht mit CD4-TM_{Pen2}.

Sw = Sw-Zellen, CD4 = Sw-Zellen, die stabil CD4 exprimieren, CD4-TM_{APP} = Sw-Zellen, die stabil CD4 exprimieren, dessen Transmembrandomäne durch die APP-Transmembrandomäne ersetzt wurde, CD4-TM_{Pen2} = Sw-Zellen, die stabil CD4 exprimieren, dessen Transmembrandomäne durch die erste Transmembrandomäne von Pen2 ersetzt wurde.

A, links oben: Nachweis von maturem und immaturem Nct im Lysat von Sw-Zellen, keine Co-Immunpräzipitation (CoIP) von Nct mit CD4-TM_{Pen2} oder den Kontrollkonstrukten CD4 und CD4-TM_{APP}.

A, links Mitte: Nachweis von Pen2 durch Immunpräzipitation (IP) in Sw-Zellen, keine CoIP von Pen2 mit CD4-TM_{Pen2} oder den Kontrollkonstrukten CD4 und CD4-TM_{APP}.

A, links unten: Nachweis von Presenilin-Holoprotein durch IP mit einem Antikörper gegen den Presenilin-N-Terminus in Sw-Zellen. Keine CoIP von Presenilin mit CD4-TM_{Pen2} oder den Kontrollkonstrukten CD4 und CD4-TM_{APP}. * = kreuzreagierende Bande.

A, rechts oben: Nachweis des Presenilin-N-Terminus durch IP in Sw-Zellen. Keine CoIP des Presenilin-N-Terminus mit CD4-TM_{Pen2} oder den Kontrollkonstrukten CD4 und CD4-TM_{APP}. * = kreuzreagierende Bande

A, rechts Mitte: Nachweis des Presenilin-C-Terminus durch IP in Sw-Zellen. Die Doppelbande ist durch unterschiedliche Phosphorylierungszustände bedingt. Keine CoIP des Presenilin-C-Terminus mit CD4-TM_{Pen2} oder den Kontrollkonstrukten CD4 und CD4-TM_{APP}.

A, rechts unten: Nachweis des jeweiligen CD4-Konstrukts durch IP.

B, rechts: CoIP des Presenilin-C-Terminus mit dem Presenilin-N-Terminus (Positivkontrolle 1).

B, links: CoIP des Presenilin-N-Terminus mit dem Presenilin-C-Terminus (Positivkontrolle 2).

III.8 DIE TM1 VON PEN2 IST ESSENTIELL FÜR DIE MATURIERUNG UND AKTIVITÄT DES γ -SEKRETASE-KOMPLEXES

III.8.1 Mutation der TM1 von Pen2 führt zu herabgesetzter Maturierung von Nct sowie Akkumulation von PS1 Holoprotein und den Substraten APP-CTF α und β

Nach der Identifikation und Lokalisationsabgrenzung des Retentions-Motivs innerhalb der TM1 sollte nun die Funktion der TM1 im Zusammenhang mit der Assemblierung und der Aktivität der γ -Sekretase untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde Gebrauch gemacht von Sw-Zellen, die stabil eine RNAi gegen Pen2 exprimieren [Prokop *et al.*, 2004]. Die Herabregulierung der Pen2-Menge führt in diesen Zellen zu vielfältigen biochemischen Phänotypen: Die Menge an maturem Nct ist infolge unvollständiger Komplexassemblierung und fehlenden Komplextransportes aus dem ER reduziert und immatures Nct akkumuliert. PS1 und PS2 CTFs sind destabilisiert und werden degradiert, PS1 Holoprotein und das Substrat APP-CTF (C-terminales Fragment) α und β der γ -Sekretase akkumulieren. Die Expression von exogenem Pen2 stellt bei allen diesen Phänotypen den ursprünglichen Zustand wieder her [Prokop *et al.*, 2004]. Nun sollte festgestellt werden, ob dies auch bei exogener Expression von einem Pen2-Konstrukt mit mutierter TM1 (Pen2-TM1_{mut}) der Fall sein würde. In dem Konstrukt Pen2-TM1_{mut} sind die Aminosäuren, die für die ER-Retention verantwortlich sind, durch die entsprechenden CD4-Aminosäuren ersetzt (Schema siehe Abb. III.14, jedoch ohne die dort im Zusammenhang mit mikroskopischen Experimenten verwendete GFP-Fusion). Die Analyse von Sw-Zellen im Vergleich mit Sw-Zellen, die stabil eine Pen2-RNAi exprimieren, und mit Sw-Zellen, die stabil sowohl eine Pen2-RNAi als auch das Konstrukt Pen2-TM1_{mut} exprimieren, zeigt, dass Pen2-TM1_{mut} den Pen2-RNAi-Phänotyp nicht aufheben oder abschwächen kann (Abb. III.19). Die Maturierung von Nct ist verringert, PS1 akkumuliert als Holoprotein und sowohl die Menge an PS1 CTF als auch an PS2 CTF ist reduziert, gleichzeitig zeigt sich ein Zuwachs in der Menge von APP-CTF α und β . Durch Expression von GFP-Pen2 können alle diese Phänotypen völlig oder weitgehend rückgängig gemacht werden.

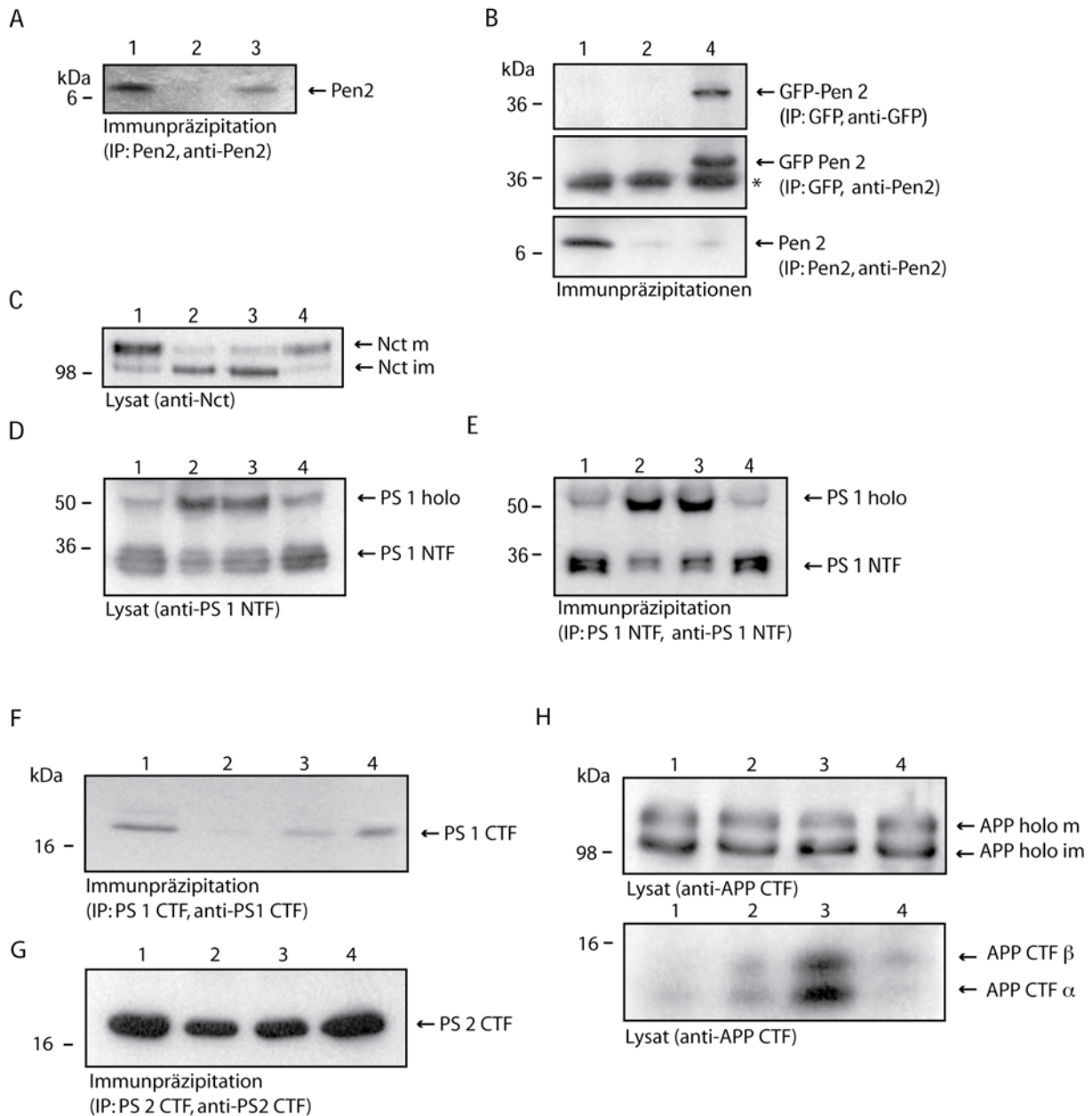


Abb. III.19. Vielfältige biochemische Phänotypen in Sw-Zellen nach Mutation der TM1 von Pen2.

1: Sw-Zellen. 2: Sw Pen2-RNAi-Zellen. 3: Sw Pen2-RNAi-Zellen, stabil transfiziert mit Pen2-TM1_{mut}. 4: Sw Pen2-RNAi-Zellen, stabil transfiziert mit GFP-Pen2.

A: Expression von Pen2 und Pen2-TM1_{mut}.

Expression von endogenem Pen2 in Sw-Zellen (1). Keine detektierbare Expression von Pen2 in Sw Pen2-RNAi-Zellen (2) und stabile Expression von transgenem Pen2-TM1_{mut} in Sw Pen2-RNAi-Zellen (3). Alle Proben wurden mit einem α-Pen2-Antikörper immunpräzipitiert; anschließend wurde mit einem α-Pen2-Antikörper detektiert.

B: Expression von GFP-Pen2.

Expression von endogenem Pen2 in Sw-Zellen (1). Kaum detektierbares Signal für endogenes Pen2 (unten) und kein detektierbares Signal für GFP-Pen2 (oben und Mitte) in Sw Pen2-RNAi-Zellen (2, *: kreuzreagierende Bande). Stabile Expression von transgenem GFP-Pen2 in Sw Pen2-RNAi-Zellen (4, oben und Mitte). Die Proben wurden immunpräzipitiert (α -GFP-Antikörper: oben und Mitte, α -Pen2-Antikörper: unten) und es wurde anschließend mit einem α -GFP-Antikörper (oben) oder einem α -Pen2-Antikörper (Mitte und unten) detektiert.

C: Herabgesetzte Maturierung von Nct in Pen2-TM1_{mut}-Zellen.

In Sw Zellen liegt Nct überwiegend in der maturierten Form vor (1), während Pen2-RNAi-Zellen eine stark reduzierte Nct-Maturierung aufweisen (2). Dieser Phänotyp kann nicht durch Expression von Pen2-TM1_{mut} gerettet oder gemildert werden (3), wohl aber durch Expression von GFP-Pen2 (4). Alle Proben sind Lysate, zur Detektion wurde ein α -Nct-Antikörper eingesetzt.

D und E: Verminderte Endoproteolyse von PS1 mit Akkumulation von PS1-Holoprotein und herabgesetzter Bildung und Stabilisierung von PS1-NTF in Pen2-TM1_{mut}-Zellen.

D: In Sw Zellen wird PS1 im Verlauf der Komplexmaturierung endoproteolytisch gespalten, was zu einer Verminderung der Menge an Holoprotein und einer vermehrten Detektion des N-terminalen Fragments (NTF) von PS1 führt (1). In Abwesenheit von Pen2 findet deutlich weniger Endoproteolyse statt und PS1 NTF wird nicht mehr stabilisiert, was einerseits zur Akkumulation des PS1-Holoproteins und andererseits zu einer Verminderung der NTF-Menge führt (2). Dieser Phänotyp findet sich auch in Pen2-TM1_{mut}-Zellen (3), nicht aber bei Expression von GFP-Pen2 (4). Alle Proben sind Lysate, die Detektion geschah mit einem Antikörper gegen PS1-NTF.

E: Selber biochemischer Phänotyp wie in D. Die Proben wurden diesmal vor der Detektion mit einem Antikörper gegen PS1-NTF immunpräzipitiert, was den beobachteten Phänotyp noch deutlicher sichtbar werden lässt.

F: Verminderte Endoproteolyse von PS1 mit herabgesetzter Bildung und Stabilisierung von PS1-CTF in Pen2-TM1_{mut}-Zellen.

In Sw-Zellen ist im Rahmen der PS1-Endoproteolyse das C-terminale Fragment (CTF) von PS1 detektierbar (1). In Sw Pen2-RNAi-Zellen ist aufgrund der herabgesetzten PS1-Spaltung und verminderten Stabilisierung von PS1 CTF die Menge an CTF reduziert (2), ebenso wie nach Expression von Pen2-TM1_{mut} (3). Nach Expression von Pen2-GFP dagegen findet Endoproteolyse von PS1 und Stabilisierung von PS1 CTF im normalen Umfang statt, erkennbar an der wildtyp-ähnlichen Menge an PS1 CTF (4). Alle Proben wurden mit einem Antikörper gegen PS1 CTF immunpräzipitiert und anschließend mit einem α -PS1 CTF-Antikörper untersucht.

G: Verminderte Endoproteolyse von PS2 mit herabgesetzter Bildung von PS2-CTF in Pen2-TM1_{mut}-Zellen.

Analog zu PS1 wird auch PS2 im Rahmen der Komplexmaturierung endoproteolytisch gespalten. Wie in F ist dies an der Bildung von PS2 CTF in Sw-Zellen erkennbar (1). Eine herabgesetzte Menge in Sw Pen2-RNAi-Zellen (2) und in Pen2-TM1_{mut}-Zellen (3) lässt auf eine herabgesetzte PS2-Endoproteolyse und Stabilisierung von PS2 CTF schließen. Dieser Phänotyp kann durch Expression von GFP-Pen2 (4) gerettet werden. Alle Proben wurden mit einem Antikörper gegen PS2 CTF immunpräzipitiert und anschließend mit einem α -PS2 CTF-Antikörper untersucht.

H: Akkumulation der γ -Sekretase-Substrate APP CTF α und APP CTF β in Pen2-TM1_{mut}-Zellen.

Infolge der herabgesetzten γ -Sekretase-Aktivität in Sw Pen2-RNAi-Zellen kommt es zu einer Akkumulation der γ -Sekretase-Substrate APP CTF β und APP CTF α (2, unten) im Vergleich zur normalen Situation in Sw Zellen (1, unten). Eine noch stärkere Akkumulation findet man in Pen2-TM1_{mut}-Zellen (3, unten), wobei sich die Mutation in der TM1 von Pen2 hier phänotypisch dominant-negativ verhält. Durch Expression von GFP-Pen2 kommt es zu einer vermutlich nicht vollständigen aber dennoch weitgehenden Herstellung der normalen γ -Sekretase-Aktivität (4, unten). Die Mengen an maturem und immaturem APP-Holoprotein waren in allen Proben gleich (oben, 1 bis 4). Alle Proben sind Lysate, die Detektion wurde mit einem Antikörper gegen APP CTF durchgeführt.

III.8.2 Pen2 mit Mutation der TM1 assembliert nicht in γ -Sekretase-Komplexe

Unter anderem wurde im vorangegangenen Abschnitt anhand der herabgesetzten Maturierung einzelner Komponenten eine mangelnde Assemblierung des Komplexes nach Mutation der Pen2-TM1 gezeigt. Um nun die Assemblierung des γ -Sekretase-Komplexes in seiner Gesamtheit in Abhängigkeit von der Pen2-TM1 zu untersuchen, wurde der native hochmolekulare Komplex mittels Blue-Native-Gelelektrophorese [Schaegger und von Jagow, 1991] dargestellt (Abb. III.20). Pen2-RNAi führt in Sw-Zellen zur Herabregulierung der Menge voll assemblierten γ -Sekretase-Komplexes. Diese Menge nimmt unter zusätzlicher Expression von Pen2-TM1_{mut} nicht zu. Die in der Abb. III.20 beobachteten Unterschiede in der Laufgeschwindigkeit der verschiedenen Banden sind in diesem Fall nicht primäre Meßgröße des Experiments, sondern vielmehr die Intensität des Signals im zu erwartenden Größenbereich [E. Winkler, persönliche Mitteilung]. Leider fehlt in diesem Experiment die Wiederherstellung der vollständigen Assemblierung durch transgene Expression von Wildtyp-Pen2, weswegen ein möglicher Artefakt durch die transgene Quelle mutanten Pen2-Proteins formal nicht ausgeschlossen werden kann. Zieht man jedoch die nahezu vollständige

Rettung der γ -Sekretase-Maturierung und –Aktivität durch transgenes GFP-Pen2 in allen vorangegangenen Experimenten in Betracht, erscheint dies zumindest unwahrscheinlich. Dieses Experiment legt also nahe, dass die Transmembrandomäne von Pen2 wichtig für eine korrekte Assemblierung der γ -Sekretase ist und weist darauf hin, dass Pen2-TM1_{mut} nicht oder nur wenig in den hochmolekularen Komplex integriert wird.

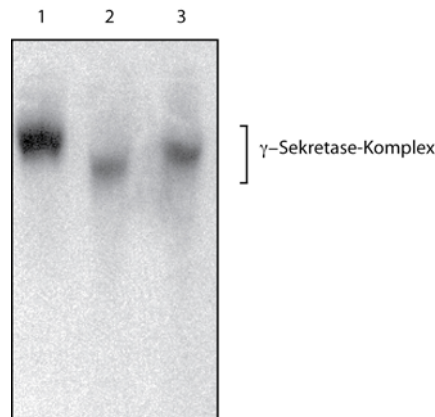


Abb. III.20. Herabgesetzte Maturierung des γ -Sekretase-Komplexes in Sw-Zellen nach Mutation der TM1 von Pen2 (Blue-Native-Gelelektrophorese).

1: Sw-Zellen. 2: Sw Pen2-RNAi-Zellen. 3: Sw Pen2-RNAi-Zellen, stabil transfiziert mit Pen2-TM1_{mut}. Die Proteinkonzentration und das Ladevolumen aller Proben wurden gleich eingestellt. Detektiert wurde mit einem Antikörper gegen PS1-NTF. Die Gesamtmenge an assemblierten Komplexen ist bei Pen2-RNAi-Zellen sowie bei den Pen2-TM1_{mut}-Zellen gleichermaßen herabgesetzt im Vergleich zu Sw-Zellen.

IV DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der γ -Sekretase-Komplexkomponente Pen2 untersucht, wie Assemblierung und Transport – und damit letztlich auch die Aktivität – des γ -Sekretase-Komplexes reguliert werden. Eingangshypothese war, dass es zu diesem Zweck spezifische Transportsignale innerhalb der jeweiligen Komplexuntereinheit geben könnte, die diese Prozesse kontrollieren.

In der Tat konnte in Pen2 eine Signalsequenz aus 12 Aminosäuren identifiziert werden, die das Pen2-Protein im ER zurückhält („Retentionssignal“). Interessanterweise ähnelt diese Sequenz keinem der zuvor beschriebenen Transportsignale, stellt also ein neuartiges Retentionssignal dar. Ebenfalls bemerkenswert ist, dass die hier identifizierte Sequenz hauptsächlich innerhalb einer Transmembrandomäne lokalisiert ist, was für klassische Transportsignale eher ungewöhnlich ist. Es stellte sich in weiteren Experimenten heraus, dass die erste Transmembrandomäne (TM1) von Pen2, die das Retentionssignal enthält, essentiell für eine korrekte Komplexassemblierung und –funktion ist: Mutation der TM1 von Pen2 hat drastische Folgen und zeigt etwa denselben biochemischen Phänotyp wie RNAi-basierter Knockdown von Pen2 mit stark herabgesetzter Maturierung anderer Komplexuntereinheiten, mangelhafter Assemblierung des Komplexes und Akkumulation des zu prozessierenden Substrats.

Im Folgenden werden die Ergebnisse miteinander in Zusammenhang gebracht und im Hinblick auf ihre Bedeutung für das Verständnis der Aktivierung der γ -Sekretase - und letztlich für die Pathogenese der Alzheimer-Demenz - diskutiert.

IV.1 ER-RETENTION VON NICHT IN DEN γ -SEKRETASE-KOMPLEX ASSEMBLIERTEN PEN2-MOLEKÜLEN

Zunächst wurde die Lokalisation von transient überexprimiertem GFP-Pen2-Protein mit derjenigen von stabil auf deutlich niedrigerem und mehr dem physiologischen Niveau entsprechend exprimiertem GFP-Pen2 verglichen. Wenn es auf niedrigem Level exprimiert wurde, befand sich das Fusionsprotein in peripheren Kompartimenten (Plasmamembran, Endolysosomen, auch im Golgi-Apparat), also hauptsächlich an denjenigen Orten, an denen

der vollassemblierte γ -Sekretase-Komplex normalerweise aktiv ist. Überexpression führte zu Akkumulation und Retention im ER (vgl. Abschnitt III.1, Abb. III.2. und 3).

Aus diesen Befunden entstand die Vermutung, dass überexprimiertes Pen2 im ER aktiv zurückgehalten wird. Nachdem bereits bekannt ist, dass die Assemblierung der freien Komponenten über mehrere Zwischenschritte im ER stattfindet [Capell *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007], während die katalytische Aktivität des vollassemblierten Enzymkomplexes an der Plasmamembran und in Endolysosomen lokalisiert ist [Kaether *et al.*, 2002; Chyung *et al.*; 2005, Pasternak *et al.*; 2003], lag der Schluss nahe, dass die im ER zurückgehaltene Fraktion von Pen2 dem nicht-assemblierten Proteinanteil entspricht und somit die Retention abhängig vom Mengenverhältnis zwischen Pen2 und den anderen Komplexkomponenten sein könnte. Um einen möglichen aktiven Retentionsmechanismus zu identifizieren und genauer zu untersuchen, wurden nun systematisch einzelne Domänen von Pen2 auf ihre Fähigkeit hin überprüft, bestimmte Reporterproteine im ER zu retinieren.

IV.2 DER EINSATZ VON CD4 UND TNF α ALS REPORTERPROTEINE ZUR UNTERSUCHUNG DER TRANSPORTEIGENSCHAFTEN VON PEN2

Vielen zellbiologischen Experimenten liegt das Prinzip zugrunde, die Eigenschaften eines Zielproteins durch den Vergleich mit den Eigenschaften eines charakterisierten Reporterproteins zu analysieren. Typischerweise werden hierfür komplette oder partielle Fusionskonstrukte aus Ziel- und Reporterprotein hergestellt und diese mit dem ursprünglichen Reporter verglichen. Eine solche Strategie wurde auch für das Ausgangsexperiment der vorliegenden Arbeit verwendet: Das Typ-I-Transmembranprotein CD4 hat charakterisierte Transporteigenschaften und ist nahezu vollständig an der Plasmamembran lokalisiert [Shin *et al.*, 1991]. Es kann problemlos in Zellkultursystemen exprimiert werden und es sind Anti-CD4-Antikörper verfügbar, die sich sehr gut für den Einsatz in der Fluoreszenzmikroskopie eignen. Damit ist CD4 ein idealer Reporter zur Untersuchung von Transportsignalen in Proteinen mit zu CD4 korrespondierender Topologie, also von Typ-I-Transmembranproteinen oder derjenigen Domänen von polytopen Proteinen, deren N-Termini in Richtung des vesikulären Lumens zeigen. Im Falle von Pen2 sind aus topologischen Gründen die mit CD4 untersuchbaren Domänen der N-Terminus (welcher jedoch als Lokalisation eines Transportsignals aufgrund seiner lumenalen Lage nicht in Frage kommt), die erste Transmembrandomäne und – mit Einschränkungen – der

zytoplasmatische Loop. Für Beispielarbeiten, die CD4 als Reporter nutzen, vergleiche [Shin *et al.*, 1991; Zerangue *et al.*, 1999; Kaether *et al.*, 2004].

Das originäre CD4-Molekül wird effizient an die Plasmamembran transportiert. Somit können Fusionsproteine aus CD4 und dem Zielprotein auf Transportsignale untersucht werden, die den Transport entlang des sekretorischen Wegs auf einer der Plasmamembran vorgeschalteten Ebene verhindern, d.h. also Retention- und/oder Retrieval-Signale. Umgekehrt könnte für die Identifizierung von Exportsignalen beispielsweise ein CD4-Derivat verwendet werden, das ein potentes Retentionssignal enthält und somit im ER zurückgehalten wird. Da Pen2 selbst jedoch retiniert wird, ist dieser Ansatz für die vorliegende Arbeit nicht relevant.

Ähnliche Reportereigenschaften wie CD4 hat das ebenfalls an der Plasmamembran lokalisierte Typ-II-Transmembranprotein TNF α , das entsprechend als Reporter für die zweite Transmembrandomäne von Pen2 eingesetzt wurde. Nachdem sich sowohl N- als auch C-Terminus von Pen2 im Lumen des sekretorischen Wegs befinden, kommen diese als Träger von Transportsignalen nach bisherigem Verständnis nicht in Betracht und wurden bei der Analyse der Transporteigenschaften von Pen2 in dieser Arbeit nicht untersucht.

IV.3. IDENTIFIZIERUNG EINES RETENTIONSSIGNALS IN PEN2

Der Austausch der CD4-Transmembrandomäne gegen die erste Transmembrandomäne von Pen2 (Konstrukt CD4-TM1_{Pen2}) führt zu nahezu vollständiger Retention des Fusionsproteins im ER. Dieses Ergebnis wurde in methodisch unabhängigen Experimenten einerseits mikroskopisch mittels Immunfluoreszenz bei transienter Expression wie auch andererseits proteinbiochemisch mittels Deglykosylierung des Fusionsproteins nach stabiler Expression übereinstimmend erhoben. Die Sequenzspezifität der Retention wurde sichergestellt durch analoges Untersuchen der Transmembrandomäne von APP, welche das Transportverhalten des CD4-TM_{APP}-Fusionsproteins nicht beeinflusste. Auf diese Weise wurde außerdem weitgehend ausgeschlossen, dass es sich bei der beobachteten Retention des CD4-TM1_{Pen2}-Konstrukts um einen artifiziellen Effekt infolge gestörter Proteinstruktur durch Missfaltung oder Aggregation handeln könnte (vgl. Abschnitt III.2, Abb. III.5 und 6).

Durch schrittweise Verkürzung der die Retention verursachenden Aminosäuresequenz und anschließender Analyse mittels Immunfluoreszenz konnte ein Signal identifiziert werden, das von einer Sequenz aus neun hydrophoben Aminosäuren in der putativen TM1 von Pen2

vermittelt wird. Zusätzlich werden die distal der TM1 liegenden benachbarten drei Aminosäuren Arginin, Glutamat und Alanin für eine effiziente Retention des Reporterproteins benötigt (vgl. Abschnitt III.3, Abb. III.8 und III.10). Es sollte jedoch erwähnt werden, dass das Signal mit einer gewissen Unschärfe bestimmt wurde – zu seiner Abgrenzung wurden Konstruktgruppen untersucht, die sich voneinander um den Austausch von jeweils drei Aminosäuren unterschieden, und es ist daher wahrscheinlich, dass ein oder zwei Aminosäuren an jedem Ende der Signalsequenz für die Retention verzichtbar wären (z.B. wäre dies gut für das C-terminal gelegene Alanin oder auch für das N-terminal lokalisierte Tryptophan vorstellbar).

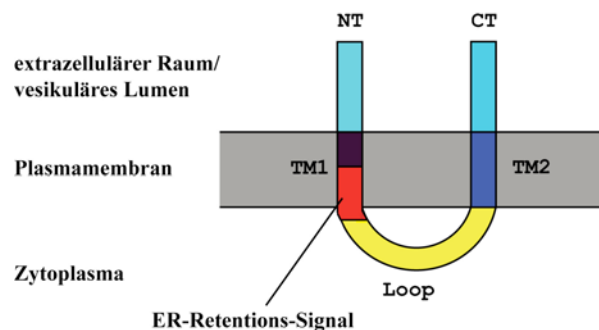


Abb. IV.1. Schematische Darstellung des ER-Retentions-Signals im Gesamtkontext des Pen2-Proteins.

NT = Pen2-N-Terminus (hellblau), CT = C-Terminus (hellblau), TM1 = erste Transmembrandomäne (violett), Loop = zyttoplasmatischer Loop (gelb), TM2 = zweite Transmembrandomäne (dunkelblau). Das ER-Retentionssignal ist in rot gezeigt. Schemazeichnung, Größenrelationen nicht vollständig realitätsgetreu

IV.4. UNTERSUCHUNG DER ROLLE SPEZIFISCHER AMINOSÄURENRESTE IM RAHMEN DER RETENTION

Es konnte bereits gezeigt werden, dass polare oder geladene Aminosäurenreste in Transmembrandomänen in manchen Fällen entscheidend an einer ER-Retention beteiligt sind [Bonifacino *et al.*, 1991; Sato *et al.*, 2003].

Auch die für die Retention verantwortliche Sequenz innerhalb der TM1 von Pen2 enthält an Position 33 ein evolutionär konserviertes Asparagin (N), welches in die Gruppe der Aminosäuren mit polarer ungeladener Seitenkette gehört (vgl. Abschnitt III.4, Abb. III.11). Mutation dieses Restes innerhalb des CD4-TM1_{Pen2}-Fusionsproteins zu Leucin (L), einer Aminosäure mit unpolare aliphatische Seitenkette, verminderte die Effizienz der ER-

Retention sowohl in der Immunfluoreszenz wie auch in den Deglykosylierungsexperimenten deutlich (vgl. Abschnitt III.4, Abb. III.12 und III.13). Dieser Befund stimmt also mit der oben beschriebenen Hypothese bezüglich einer besonders wichtigen Retentionsfunktion von innerhalb einer hydrophoben Umgebung liegenden polaren Resten sehr gut überein.

Auch im Kontext des Pen2-Proteins war die Retention nach Mutation des Asparaginrestes (stabil exprimiertes Konstrukt GFP-Pen2 N33L) deutlich abgeschwächt, wie mikroskopisch vermutet werden konnte und durch Oberflächenbiotinylierung und relative Quantifizierung im Vergleich mit GFP-Pen2 bewiesen wurde. Diese Experimente zeigen also einerseits, dass der geladene Rest für die Retention eine wichtige Rolle spielt, und andererseits, dass das hier identifizierte Retentionssignal nicht nur im Rahmen eines CD4-Reporterproteins, sondern auch im Zusammenhang des biologisch voll funktionstüchtigen GFP-Pen2 Proteins, also sozusagen völlig „*in vivo*“ tatsächlich als solches eingesetzt wird und die Oberflächenlokalisierung von Pen2 reguliert.

Bei Betrachtung der für die Retention ebenfalls notwendigen außerhalb der Pen2-Transmembrandomäne liegenden, geladenen Aminosäuren Arginin (R) und Glutamat (E) fällt auf, dass sie in anderen Spezies nur teilweise abhängig von der Identität, jedoch (nahezu) immer abhängig von der Ladung konserviert sind (vgl. Abb. III.13) – so kommt in anderen Spezies anstelle von Arginin häufig Lysin (K) vor, und Glutamat wird mitunter durch Aspartat (D) ersetzt. Es wurde festgestellt, dass diese geladenen Reste allein nicht in der Lage sind, eine Retention zu vermitteln (vgl. Abb. III.8 und 10), jedoch wäre es darüber hinaus interessant zu untersuchen, inwieweit hier die Ladungsverteilung spezifisch bei der Retention eine Rolle spielt oder inwieweit sie lediglich für generelle Mechanismen wie Proteinfaltung oder korrekte Membraninsertion wichtig ist.

IV.5 DAS HIER IDENTIFIZIERTE TRANSPORTSIGNAL IST IN SEINER SIGNALSEQUENZ SPEZIFISCH FÜR PEN2, KÖNNTE JEDOCH VON EINEM ALLGEMEINEREN REZEPTOR ERKANNT WERDEN

Es wurden bereits etliche weitläufig in diversen Proteinfamilien verwendete Transport- und Lokalisationssignale beschrieben, wie zum Beispiel die Kernlokalisationssequenz -KKKRK-, die Retentionssignale -RKXX, -KKXX, -KXXXX, und -RXKXX oder das Retrievalsignal („Rückholtsignal“) -KDEL [Kalderon *et al.*, 1984, Nilsson *et al.*, 1989, Pelham, 1989, Shin *et al.*, 1991]. Das hier identifizierte Signal weist keinerlei Ähnlichkeit mit diesen Signalen auf,

und ist zudem ungewöhnlicherweise nicht luminal oder zytoplasmatisch, sondern größtenteils innerhalb der Transmembrandomäne lokalisiert. Um jedoch Hinweise darauf zu erhalten, ob das in dieser Arbeit identifizierte Motiv dennoch als quasi allgemeingültiges Signal zur Retention unabhängiger Proteine dienen könnte, wurde genomweit und speziesübergreifend nach ähnlichen konservierten Sequenzen in anderen Proteinen gesucht. Es konnten jedoch keine Sequenzen gefunden werden, die eine solche Allgemeingültigkeit aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu dem hier identifizierten Motiv vermuten lassen würden (vgl. Abschnitt III.5, Abb. III.13). Es sollte jedoch erwähnt werden, dass diese Suche sich nur spezifisch auf das hier identifizierte Signal bezog. Wahrscheinlich würde eine allgemeinere bioinformatische Herangehensweise, die zum Beispiel generell nach dem Vorkommen von Asparagin oder anderen geladenen Resten innerhalb einer Sequenz unpolarer Reste sucht, eine Reihe möglicher weiterer Kandidatensignale in anderen Proteinen hervorbringen.

Nachdem also der geladene Asparaginrest innerhalb ungeladenen Transmembrandomäne für die Retention von Pen2 sehr wichtig ist (vgl. Abschnitt III.4) und dies ein häufiges Phänomen bei den wenigen bisher in Transmembrandomänen lokalisierten Retentionssignalen zu sein scheint [Sato *et al.*, 2003, Bonifacino *et al.* 1991], ist anzunehmen, dass der das Signal erkennende Rezeptor keine genau definierte Aminosäuresequenz bindet, sondern ein bestimmtes Ladungsmuster in und in der Nähe der Transmembrandomäne. Im vorangegangenen Abschnitt wurde bereits diskutiert, dass auch die außerhalb der TM liegenden geladenen Reste Arginin und Glutamat der Retentionssequenz in Pen2-Proteinen anderer Spezies deutlich ladungsabhängig konserviert sind.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen wäre, dass die hier identifizierte Retentionssequenz zwar so nicht in anderen Proteinen vorkommt (damit also spezifisch für Pen2 ist), jedoch prinzipiell durchaus von einem allgemeineren Retentionsrezeptor erkannt werden könnte. Dieser das Pen2-Retentionssignal bindende Rezeptor könnte also noch weitere Liganden haben, die über eine ähnliche Ladungsverteilung verfügen. Um diese Hypothese systematisch zu testen, könnte man die zwölf im Retentionssignal enthaltenen Aminosäuren schrittweise und in Kombination durch andere Aminosäuren mit jeweils möglichst ähnlichen bzw. deutlich verschiedenen chemischen Eigenschaften ersetzen. Dies sollte es ermöglichen zu untersuchen, wie wichtig bestimmte Ladungseigenschaften an bestimmten Positionen innerhalb des Signals sind und ob eine unterschiedliche Sequenz mit ähnlicher Ladungsverteilung ebenfalls in der Lage ist, Pen2 oder ein Reporterprotein zu retinieren.

IV.6 MÖGLICHE MECHANISMEN ZUM EINFLUSS DER PEN2-TM1 AUF ASSEMBLIERUNG UND AKTIVITÄT DER γ -SEKRETASE

Werden die kritischen Aminosäuren in der Pen2-TM1 durch orthotope Aminosäuren aus CD4 ersetzt, kann Pen2 nicht mehr in den Komplex eingebaut werden und es kommt zu einer Herabsetzung der enzymatischen Aktivität (vgl. Abschnitt III.8, Abb. III.18, Abschnitt III.9, Abb. III.19). Anzeichen für die gestörte Assemblierung sind einerseits eine verminderte Maturierung von Nct und herabgesetzte Endoproteolyse von PS1 und PS2 mit Akkumulation des jeweiligen Holoproteins und fehlender Stabilisierung der N- und C-terminalen Fragmente, andererseits eine reduzierte Menge an vollassembliertem Komplex. Anzeichen für die herabgesetzte Aktivität der γ -Sekretase sind eine Akkumulation ihrer Substrate APP-CTF α und $-\beta$. All diese Befunde entsprechen in Qualität und Quantität soweit mit dieser Methodik beurteilbar genau denen, die bei Herabregulierung der Expression des gesamten Pen2-Proteins durch RNAi erzielt wird [Prokop *et al.*, 2004]. Die TM1 ist also insgesamt essentiell für die Komplexassemblierung.

Diese Befunde können durch mindestens zwei unterschiedliche Mechanismen erklärt werden, die jeweils allein oder in Kombination auftreten könnten:

- Herabgesetzte Assemblierung und Aktivität aufgrund veränderten Transportverhaltens von Pen2:

Es wäre möglich, dass Pen2 durch Destruktion des Retentionsmotivs in der TM1 unkontrolliert aus dem ER in Richtung des weiteren sekretorischen Wegs transportiert wird, wodurch eine korrekte Assemblierung durch schiere Abwesenheit von Pen2 im ER verhindert wird. Dass der Wegfall der Transportregulation tatsächlich *in vivo* eine Rolle spielt, konnte anhand der mehr zu peripheren Kompartimenten hin verschobenen Lokalisation von GFP-Pen2 N33L (das eine Mutation des für die Retention besonders wichtigen Asparaginrestes trägt), die sowohl mikroskopisch wie auch durch Oberflächenbiotinylierung nachgewiesen wurde, gezeigt werden. Pen2 ist unter diesen Bedingungen also höchstwahrscheinlich nicht mehr in ausreichender Menge im ER vorhanden, um die Endoproteolyse von Presenilin einzuleiten (daher die nach Mutation der TM1 beobachtete Akkumulation des Holoproteins) und der Komplex ist anscheinend aufgrund des Fehlens einer Komponente nicht in der Lage, das ER zu verlassen (daher z.B. die fehlende Maturierung von Nicastrin). Beides, sowohl die

fehlende katalytische Aktivierung der aktiven Untereinheit, als auch die aus unvollständiger Assemblierung resultierende Unfähigkeit des Komplexes, das ER zu verlassen, resultieren in fehlender Prozessierung der γ -Sekretase-Substrate.

- Herabgesetzte Assemblierung und Aktivität aufgrund der Zerstörung einer Interaktionsdomäne:

Es kann weiterhin vermutet werden, dass durch Mutation der TM1 in Pen2 eine Bindungsstelle für eine oder mehrere Komplexuntereinheiten zerstört wurde. Auch dies würde eine korrekte Assemblierung des Komplexes verhindern, was ebenfalls die oben geschilderten Befunde einer herabgesetzten Maturierung von Nicastrin, fehlender Endoproteolyse von Presenilin etc. erklären könnte. Durch Co-Immunpräzipitationsexperimente konnte keine direkte Interaktion einer Komplexkomponente mit der Pen2-TM1 nachgewiesen werden. Diese Experimente wurden jedoch mit dem CD4-TM1_{Pen2} Konstrukt durchgeführt, und es bleibt offen, ob eine potentielle Interaktion zu schwach sein könnte oder zum Beispiel aufgrund sterischer Bedingungen mit diesem Reporter nicht nachweisbar gewesen sein könnte.

Tatsächlich haben zwei Gruppen unabhängig voneinander eine Bindung von Pen2 an die vierte Transmembrandomäne von Presenilin festgestellt [Kim und Sisodia, 2005a und b; Watanabe *et al.*, 2005]. Insbesondere haben Kim und Sisodia indirekt eine Interaktion zwischen den proximalen zwei Dritteln der ersten Transmembrandomäne von Pen2 und der vierten Transmembrandomäne von Presenilin beobachtet und außerdem festgestellt, dass die erste Transmembrandomäne von Pen2 notwendig für die Endoproteolyse von Presenilin ist. Die Interaktion zwischen diesen beiden Domänen macht sterisch durchaus Sinn, da sie unter Berücksichtigung ihrer Typ-I-Orientierung innerhalb der Membran in der Lage sein könnten, miteinander eine hydrophobe Helix-Helix-Interaktion zu formen. Der Grund, warum das in dieser Arbeit verwendete Konstrukt CD4-TM1_{Pen2} diese Interaktion nicht gezeigt hat, liegt höchstwahrscheinlich daran, dass hier die erste Pen2-Transmembrandomäne isoliert im Kontext von CD4 untersucht wurde, Kim und Sisodia dagegen haben für ihre Co-Immunpräzipitationsexperimente eine Pen2-Chimäre verwendet, in der lediglich Abschnitte der Pen2-Transmembrandomäne gegen entsprechende Abschnitte des unabhängigen Proteins SREBP-1 ausgetauscht worden waren. Mit diesem Ansatz beobachteten sie fehlende Co-Immunpräzipitation nach Austausch der gesamten TM1 und Wiederherstellung derselben nach Restitution der proximalen zwei Drittel der Pen2-TM1. Hierdurch lässt sich natürlich

nicht ausschließen, dass benachbarte Aminosäuren in Pen2, die während der gesamten Experimentserie unverändert geblieben sind, eine zusätzliche Rolle bei der Interaktion spielen könnten, worauf die hier präsentierten Daten hindeuten.

Die Arbeit von Watanabe *et al.* (2005) lässt bezüglich dieser Frage keine weiteren Schlüsse zu, da die dortigen Co-Immunpräzipitationen zwischen Pen2 und Presenilin in entgegengesetzter Richtung durchgeführt wurden: Es wurden verschiedene CD4-Presenilin-Fusionskonstrukte und jeweils das gesamte Pen2-Protein eingesetzt, um letztlich zu beweisen, dass Pen2 an die vierte Transmembrandomäne von Presenilin bindet.

Um mit der in der vorliegenden Arbeit gewählten Strategie ebenfalls und noch eindeutiger als Kim und Sisodia eine Interaktion der TM1 und benachbarter Abschnitte von Pen2 mit Presenilin oder anderen Komplexkomponenten nachzuweisen, wären weitere (Immuno-) Affinitätsexperimente mit verschiedenen Chimären und Fusionskonstrukten als „Köder“ (beispielsweise Pen2_{NT+TM1}-CD4_{CT} versus CD4_{NT}-Pen2_{TM1+zytoplasmatischer Loop}) notwendig. Unter Berücksichtigung dreidimensionaler Verhältnisse in der Tertiärstruktur von Pen2 wäre es auch denkbar, dass in der Primärstruktur weiter entfernte Domänen miteinander eine Interaktionsdomäne bilden, jedoch ist es ohne Strukturdaten des Komplexes schwierig, entsprechende Experimente zu entwerfen, um dies zu zeigen.

IV.7 MÖGLICHE EXPERIMENTE ZUR UNTERSCHIEDUNG ZWISCHEN DEN VORANGEGANGENEN HYPOTHESEN

Um zwischen den beiden oben genannten Erklärungsmodellen zu unterscheiden und damit herauszufinden, ob die herabgesetzte Assemblierung und Aktivität der γ -Sekretase ausschließlich auf der mangelnden ER-Retention von Pen2 beruht und/oder auf der Zerstörung einer Interaktionsdomäne, wäre ein mögliches Experiment das Retentionsmotiv an seiner ursprünglichen Stelle in der TM1 durch Mutation funktionsunfähig zu machen und gleichzeitig an unterschiedlicher Stelle – aus topologischen Gründen würde sich hierfür zum Beispiel die TM2 anbieten – ein anderes Retentionsmotiv einzubauen. Dies sollte theoretisch eine Unterscheidung zwischen der Retentionsfunktion und einer eventuellen Komplexassemblierungsfunktion der TM1 möglich machen. Zu bedenkende Probleme hierbei sind, dass andere, unabhängige Interaktionen zerstört werden könnten, dass die Faltung des Proteins aufgrund unspezifischer Effekte nicht mehr korrekt ablaufen könnte oder auch, dass ein anderes und von einem unterschiedlichen Rezeptor erkanntes Retentionsmotiv im Falle

von Pen2 seine Funktion nicht mit derselben Sensitivität und Dynamik ausüben würde. Um letzteres Problem zu umgehen, könnte man auch das Pen2-Retentionsmotiv an seiner ursprünglichen Stelle in der TM1 mutieren, und dieselbe Sequenz außerhalb der TM1, also geeigneterweise in der TM2, wieder einsetzen. Dies sollte eine Erkennung durch den retentionsvermittelnden Rezeptor im ER ermöglichen, gleichzeitig aber eine korrekte Komplexassemblierung, wenn sie wie erwartet von Teilen der TM1-Sequenz abhängen würde, verhindern. Bei diesem Experiment ergibt sich jedoch die Möglichkeit, dass dieses Einfügen ortsfremder Aminosäuren die Struktur und/oder Topologie des Proteins verändern könnte.

IV.8 VERBESSERTES MODELL ZU ASSEMBLIERUNG, TRANSPORT UND AKTIVITÄTSREGULIERUNG DER γ -SEKRETASE UND MÖGLICHE RELEVANZ DIESER ARBEIT FÜR THERAPEUTISCHE ZIELE

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Pen2-TM1 für eine ER-Retention verantwortlich ist. Außerdem wird ihre essentielle Bedeutung für Assemblierung und Aktivität des Komplexes nachgewiesen.

IV.8.1 BESTÄTIGUNG DER DIESER ARBEIT ZUGRUNDE LIEGENDEN HYPOTHESE UND VERFEINERUNG DES BESTEHENDEN MODELLS ZU ASSEMBLIERUNG, TRANSPORT UND AKTIVITÄTSREGULIERUNG DER γ -SEKRETASE

Der Befund, dass die Pen2-TM1 sowohl für eine ER-Retention von Pen2 als auch – wenn man sich auf die Befunde von Kim und Sisodia stützt - über die Vermittlung einer Bindung zu anderen Komplexkomponenten für die Assemblierung notwendig ist, würde gut in das generelle Modell zur Assemblierung des γ -Sekretase-Komplexes passen, das die Arbeitsgruppe vorgeschlagen hat [Kaether *et al.*, 2004]. Die Hypothese dieses Modells besagt, dass Assemblierung und Transport des γ -Sekretase-Komplexes ähnlich kontrolliert werden wie dies bei vielen Ionenkanälen und Oberflächenrezeptoren der Fall ist. In solchen multimeren Komplexen stellen Retentions-Signale an den einzelnen Untereinheiten sicher, dass nicht assemblierte Untereinheiten effizient im ER retiniert/in das ER zurücktransportiert werden (engl.: Retention/Retrieval). In voll assemblierten Komplexen werden die Retentions-/Retrieval-Signale maskiert und die Komplexe werden zur Zelloberfläche transportiert.

Analogerweise sind im Falle von CD8, von Fet3p (einem Eisentransporter in Hefe) und von B- und T-Zell-Rezeptoren die Retentions-/Retrieval-Signale in Transmembrandomänen lokalisiert [Hennecke *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 2004; Reth *et al.*, 1991; Bonifacino *et al.*, 1990]. Nach der Assemblierung des Komplexes werden diese intramembranären Signale von TMs anderer Untereinheiten maskiert [Bonifacino *et al.*, 1990].

Dieser Mechanismus könnte gut auf den hier untersuchten Fall zutreffen: Die TM1 von Pen2 enthält ein ER-Retentions-Signal und eine Bindestelle für Presenilin [Kim und Sisodia, 2005 a und b; Watanabe *et al.*, 2005]. Im unassemblierten Zustand wird das Pen2-Retentions-Signal einer an Transmembrandomänen bindenden Retentions-/Retrieval-Maschinerie präsentiert, ein entsprechendes Beispiel für eine solche Maschinerie wurde bereits in Hefe identifiziert [Sato *et al.*, 1996]. Sobald Pen2 als letzte sich assemblierende Komponente in den trimeren Komplex aus Aph1, Nct, und PS eintritt, wird das Retentions-Signal maskiert von einem Bindungspartner innerhalb des Komplexes. Der nun vollständig assemblierte Komplex kann das ER verlassen und die katalytische Aktivierung durch Endoproteolyse von PS findet statt. Da sich die von Kim und Sisodia identifizierte Pen2-TM1-Bindungsstelle zur TM4 von PS teilweise mit dem hier beschriebenen Retentionssignal überschneidet, ist anzunehmen, dass PS diese das Retentionssignal maskierende Komponente ist.

Ein ähnlicher Retentions/Maskierungs-Mechanismus wurde bereits für PS1 selbst beschrieben, in dem ebenfalls ein Retentions-Signal in einer hydrophoben und höchstwahrscheinlich transmembranären Domäne für die Retention von nicht assemblierten PS1 verantwortlich ist [Kaether *et al.*, 2004]. Benachbart zu dieser Sequenz ist eine Bindestelle für die TM von Nct, und es ist nahe liegend anzunehmen, dass die Bindung von Nct das Retentions-Signal von PS1 verdeckt. Nct selbst wird bei eigener Überexpression oder bei Herabregulierung anderer Komplexkomponenten im ER retiniert. Eine für die Retention verantwortliche Domäne ist noch nicht identifiziert worden, es ist jedoch gezeigt worden, dass Nct eine Konformationsänderung infolge der Formation des Komplexes erfährt [Shirovani *et al.*, 2003]. Es ist also möglich, dass Nct im ER als ein ungefaltetes Protein durch das Calnexin/Calretikulin-Chaperon-System oder ein ähnliches System retiniert wird. Sobald die anderen Komponenten - zunächst Aph1, später das PS-Holoprotein und wahrscheinlich als letzte Komponente Pen2 (zusammengefasst in [Kaether *et al.*, 2006]) - in den entstehenden Komplex eintreten, werden ihre Retentions-Signale maskiert, Nct wird in die aktive Konformation gefaltet und der Komplex mittels COPII-Vesikeln [Kim *et al.*, 2007] aus dem ER exportiert. Anschließend findet in späteren Kompartimenten die Pen2-abhängige

Aktivierung des γ -Sekretasekomplexes, die Endoproteolyse von PS1, statt [Kim *et al.*, 2007]. Abb. IV.2 fasst unter Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse die schrittweise Assemblierung und den Transport der γ -Sekretase zusammen (zur Einführung des dort erwähnten und im Anschluss an diese Arbeit identifizierten Pen2-Retentionsfaktors Rer1 siehe Abschnitt IV.8.3).

IV.8.2 MÖGLICHE THERAPEUTISCHE VERWENDUNG DER ERGEBNISSE DIESER ARBEIT

Es gibt bereits einige Ansätze zu einer kausalen Therapie der Alzheimer-Demenz zusätzlich zu den existierenden rein symptomatischen und supportiven Therapiemethoden, jedoch ist bisher keine der kausalen Therapien zu klinischer Reife gelangt. Die vielversprechendsten Strategien sind vermutlich Inhibitoren der β - oder γ -Sekretase oder auch die Immunisierung gegen das A β -Peptid [Selkoe, 2001; Selkoe und Schenk, 2003]. Abgesehen davon gibt es auch Vorhaben, durch synthetische Moleküle gezielt die Aggregation von A β zu verhindern [Selkoe, 2001].

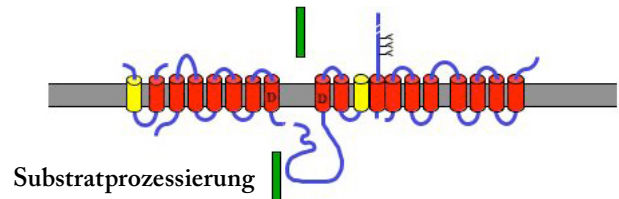
Die vorliegende Arbeit könnte möglicherweise als Grundlage für die Entwicklung eines γ -Sekretase-Inhibitors genutzt werden, der die Aktivität dieses Enzyms nicht durch Blockierung des aktiven Zentrums herabsetzt, sondern durch Interferenz mit der korrekten Assemblierung des γ -Sekretase-Komplexes: Nachdem nun eine nur 12 Aminosäuren umfassende Sequenz identifiziert wurde, die allen bisherigen Experimenten zufolge essentiell für die Funktion der γ -Sekretase ist, könnten beispielsweise synthetische Moleküle entworfen werden, die spezifisch an diese Domäne binden, somit die Retention von Pen2 und eine korrekte Komplexassemblierung verhindern und letztlich die Aktivität der γ -Sekretase dosisabhängig drosseln würden. Ein großer Vorteil dieses Ansatzes wäre, dass die zu inhibierende Interaktionsdomäne in dieser Form genomweit in keinem anderen Protein vorkommt. Ein wichtiger Nachteil von γ -Sekretase-Inhibitoren generell ist natürlich, dass die γ -Sekretase neben den APP-CTFs noch viele weitere physiologische Substrate besitzt, allen voran den Notch-1-Rezeptor. Inwieweit dennoch eine gewisse Herabsetzung der γ -Sekretase-Aktivität – v.a. in erwachsenen oder sogar älteren Patienten – tolerierbar wäre, wird sicherlich in Zukunft geklärt werden können.

IV.8.3 RELEVANZ DER HIER PRÄSENTIERTEN ERGEBNISSE FÜR NACHFOLGENDE ARBEITEN/PUBLIKATION

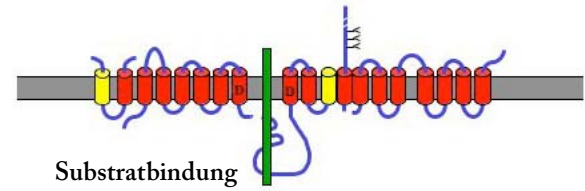
Im Anschluss an die hier präsentierte Arbeit konnte von der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Rer1 derjenige ER-Rezeptor ist, der das Retentionssignal in der TM1 von Pen2 erkennt und bindet (Abb. IV.2) [Kaether, Scheuermann *et al.*, 2007]. In Hefe ist das Rer1-Homolog Rer1p bekannt als ein ER-Rezeptor, der in Transmembrandomänen lokalisierte Retentionssignale verschiedener nicht-assemblierter Untereinheiten multimerer Komplexe und ER-residenter Proteine erkennt. Dabei spielen polare Reste innerhalb dieser Signale eine besonders wichtige Rolle [Sato *et al.*, 1996, 2003 und 2004].

Ähnliche Signale sind auch in Säugerzellen beschrieben worden, jedoch war die Identität ihres Rezeptors bislang nicht bekannt. Es war jedoch gezeigt worden, dass humanes Rer1, dessen Funktion ansonsten nicht untersucht worden war, in der Lage ist, die Funktion von Rer1p in entsprechend defizienten Hefestämmen zu retten [Füllekrug *et al.*, 1997]. Humanes Rer1 stellte daher einen vielversprechenden Kandidaten zur Retention von Pen2 dar. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Rer1 an die TM1 von Pen2 bindet, und dass RNAi-basierte Herabregulierung von Rer1 zu vermehrtem Export von Pen2 führt. Konsistent mit diesem Ergebnis konnte weiterhin gezeigt werden, dass es bei Überexpression von Rer1 zu vermehrter Retention von Pen2 im ER kommt [Kaether, Scheuermann *et al.*, 2007].

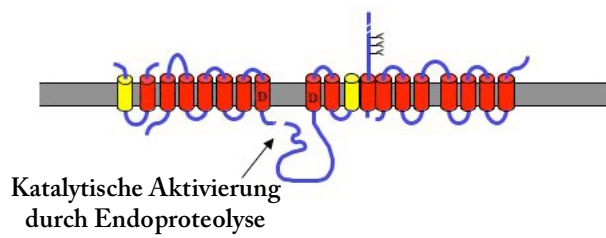
g) Plasmamembran/
Endolysosomen



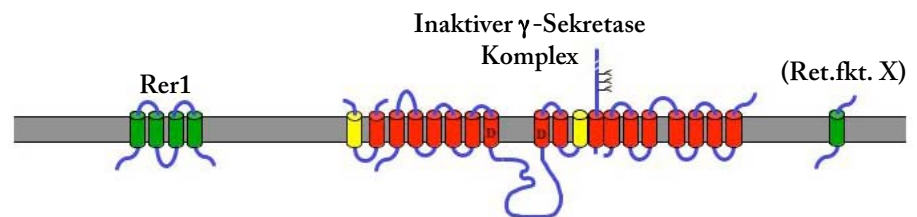
f) Plasmamembran/
Endolysosomen



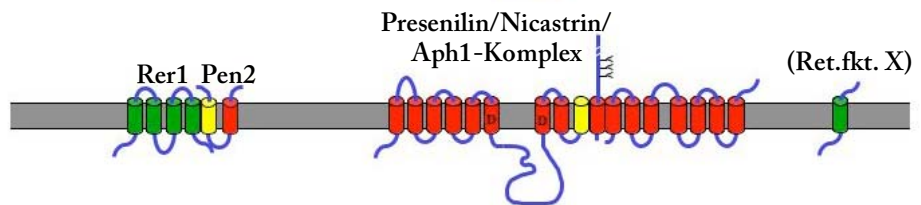
e) sekretorischer Weg



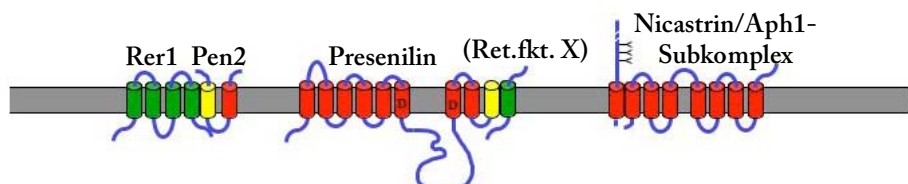
d) ER



c) ER



b) ER



a) ER

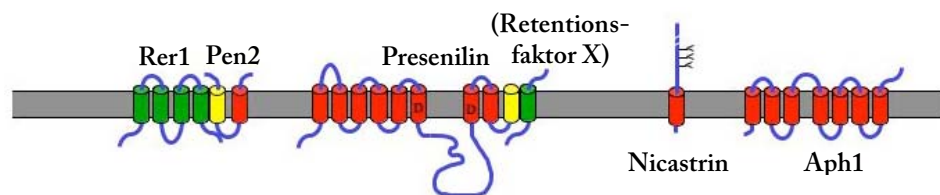


Abb. IV.2: Schematisches Modell des Assemblierungsprozesses der γ -Sekretase unter Berücksichtigung der hier präsentierten Ergebnisse.

- a) Nach der Translation im ER werden Pen2 über ein Retentionssignal in seiner ersten Transmembrandomäne (gelb, [diese Arbeit]) und Presenilin über ein Retentionssignal in seiner putativen neunten Transmembrandomäne (gelb, [Kaether *et al.*, 2004]) zurückgehalten. Im Falle von Pen2 wird diese Retention über Rer1 vermittelt (grün, [Kaether, Scheuermann *et al.*, 2007]), für Presenilin steht die Identifikation des verantwortlichen ER-Rezeptors ("Retentionsfaktor X", grün) noch aus.
- b) Im ersten Schritt der Assemblierung bilden Nicastrin und Aph1 einen frühen Subkomplex [Hu und Fortini, 2003; LaVoie *et al.*, 2003; Morais *et al.*, 2003; Shirovani *et al.*, 2004].
- c) Der Nicastrin-Aph1-Komplex dient als Assemblierungsplattform für das Presenilin-Holoprotein. Presenilin dissoziiert von seinem Retentionsfaktor und bindet mit seiner C-terminalen Domäne an die Transmembrandomäne von Nicastrin [Kaether *et al.*, 2004], wodurch wahrscheinlich das in der Nähe befindliche Retentionssignal maskiert wird. Wie der Presenilin/Nicastrin/Aph1-Komplex im ER zurückgehalten wird ist bisher nicht bekannt, möglicherweise geschieht dies über Retentionssignale in Aph1 oder Nicastrin (vgl. Abschnitt IV.8.1).
- d) Schließlich dissoziiert Pen2 von Rer1 und assembliert in den trimeren Komplex. Durch die Bindung der ersten Transmembrandomäne von Pen2 an die vierte Transmembrandomäne von Presenilin [Kim und Sisodia, 2005 a und b; Watanabe *et al.*, 2005] (im Schema nicht dargestellt) würde wahrscheinlich das Retentionssignal maskiert. Der nun vollständig assemblierte Komplex wird nun über COPII-Vesikel aus dem ER exportiert.
- e) Die katalytische Aktivierung der γ -Sekretase mittels Pen2-abhängiger Endoproteolyse von Presenilin (Pfeil) findet nach dem Austritt aus dem ER während des Transports durch den sekretorischen Weg statt [Kim *et al.*, 2007]. In welchem dem ER nachgeschalteten Kompartiment es zu dieser Reaktion kommt ist bislang jedoch nicht bekannt. Die Maturierung von Nicastrin findet während des Transports durch den Golgi-Apparat statt.
- f) und g) Die Substratprozessierung durch die γ -Sekretase findet an der Plasmamembran und in endolysosomalen Vesikeln statt. Als Illustrationsbeispiel wurde hier das C99-Fragment (grün) gewählt, das in die Produkte A β und AICD gespalten wird.

Stark modifiziert nach [Kaether *et al.*, 2006].

V ZUSAMMENFASSUNG

Die γ -Sekretase ist eine in essentieller Weise an der Produktion des Amyloid- β -Peptids beteiligte Aspartylprotease, welches durch proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (Amyloid Precursor Protein, APP) entsteht. Amyloid- β stellt die Hauptkomponente der amyloiden Plaques im Gehirn von Alzheimer-Patienten dar und spielt bei der Entstehung der Alzheimer-Demenz eine entscheidende Rolle.

Die γ -Sekretase ist ein Proteinkomplex, für dessen Funktionalität die vier Komponenten Presenilin (PS), Nicastrin (Nct), Aph1 und Pen2 hinreichend und notwendig sind. Im endoplasmatischen Retikulum (ER) werden die einzelnen Untereinheiten vollständig assembliert, nach dem Austritt aus dem ER kommt es zur katalytischen Aktivierung des γ -Sekretase-Komplexes. Die Substratprozessierung durch den nun aktiven Komplex findet in endolysosomalen Kompartimenten und an der Plasmamembran statt. Nicht vollständig assemblierte Teilkomplexe und einzelne Komponenten werden im ER zurückgehalten und erreichen nicht die nachgeschalteten Kompartimente. Diese Beobachtungen legen nahe, dass eine mögliche Regulation der Aktivität des Enzyms eng mit der Regulation von Assemblierung und Transport des Komplexes verknüpft ist. Um mechanistisch zu erklären, weshalb ausschließlich der vollständig assemblierte Komplex in der Lage ist, das ER zu verlassen, wurde von der Arbeitsgruppe ein Modell vorgeschlagen, demzufolge die einzelnen nicht assemblierten Untereinheiten mittels Retentionssignalen im ER zurückgehalten werden, bis diese im Rahmen der Assemblierung durch die Bindung an andere Untereinheiten maskiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird unter Verwendung von Reporterkonstrukten bzw. chimären Fusionsproteinen mittels konfokaler Mikroskopie und Proteinbiochemie gezeigt, dass nicht assembliertes Pen2 im ER zurückgehalten wird und dass diese Retention durch ein neuartiges Retentionssignal in der ersten Transmembrandomäne (TM1) vermittelt wird. Insbesondere ist ein konservierter Asparaginrest innerhalb dieser Sequenz für die Retention erforderlich. Auch wird mittels *knock down*- und *rescue*-Experimenten gezeigt, dass die Pen2-TM1 essentiell für die korrekte Assemblierung und enzymatische Aktivität der γ -Sekretase ist.

Diese Arbeit bestätigt damit das vorgeschlagene Modell für die Transportregulation des γ -Sekretase-Komplexes bezüglich seiner Untereinheit Pen2 und gibt starke Anhaltspunkte dafür, dass dieser Mechanismus für eine korrekte Funktionalität des Komplexes erforderlich ist.

VI LITERATUR

- Acquati, F., M. Accarino, C. Nucci, P. Fumagalli, L. Jovine, S. Ottolenghi, and R. Taramelli. 2000. The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region. *FEBS Lett.* 468:59-64.
- Annaert, W. and B. De Strooper. 1999. Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction. *Trends Neurosci.* 22:439-443.
- Annaert, W.G. and P. Saftig. 2009. Regulated intramembrane proteolysis — A story about sheddases and I-CliPs. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20:125.
- Alzheimer, A. 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtl. Med.* 64:146-148.
- Bennett, B.D., S. Babu-Khan, R. Loeloff, J.C. Louis, E. Curran, M. Citron, and R. Vassar. 2000. Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J. Biol. Chem.* 275:20647-51.
- Bentahir, M., O. Nyabi, J. Verhamme, A. Tolia, K. Horre, J. Wiltfang, H. Esselmann, and B. DeStrooper. 2006. Presenilin clinical mutations can affect γ -secretase activity by different mechanisms. *J. Neurochem.* 96:732-742.
- Bergman, A., H. Laudon, B. Winblad, J. Lundkvist, and J. Näslund. 2004. The Extreme C Terminus of Presenilin 1 is Essential for γ -Secretase Complex Assembly and Activity. *J. Biol. Chem.* 279:45564-45572.
- Bertram, L. and R.E. Tanzi. 2005. The genetic epidemiology of neurodegenerative diseases. *J. Clin. Invest.* 115:1449-1457.
- Bickel, H. 2000. Demenzsyndrom und Alzheimer-Krankheit: Eine Schätzung des Krankenbestandes und der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland. *Gesundheitswesen* 62: 211-218.
- Bickel, H. 2001. Demenzen im höheren Lebensalter: Schätzungen des Vorkommens und der Versorgungskosten. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie* 34:108-115.
- Böcker, W., H. Denk und P.U. Heitz. 2004. Pathologie. Urban&Fischer, München-Jena.
- Bondareff, W., C. Harrington, C.M. Wischik, D.L. Hauser, and M. Roth. 1994. Immunohistochemical staging of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53:158-64.
- Bonifacino, J.S., P. Cosson, N. Shah, and R.D. Klausner. 1991. Role of potentially charged transmembrane residues in targeting proteins for retention and degradation within the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 10:2783-2793.

- Bonifacino, J.S., P. Cosson, and R.D. Klausner. 1990. Colocalized Transmembrane Determinants for ER Degradation and Subunit Assembly Explain the Intracellular Fate of TCR Chains. *Cell* 63:503-513.
- Braak, H., E. Braak, J. Bohl, and R. Reintjes. 1996. Age, neurofibrillary changes, A beta-amyloid and the onset of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 210:87-90.
- Buxbaum, J.D., E.H. Koo, and P. Greengard. 1993. Protein phosphorylation inhibits production of Alzheimer amyloid beta/A4 peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:9195-8.
- Buxbaum, J.D., K.N. Liu, Y. Luo, J.L. Slack, K.L. Stocking, J.J. Peschon, R.S. Johnson, B.J. Castner, D.P. Cerretti, and R.A. Black. 1998. Evidence that tumor necrosis factor a converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* 273:27765-7.
- Cai, H., Y. Wang, D. McCarthy, H. Wen, D.R. Borchelt, D.L. Price, and P.C. Wong. 2001. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat. Neurosci.* 4:233-4.
- Cai, X.D., T.E. Golde, and S.G. Younkin. 1993. Release of excess amyloid β protein from a mutant amyloid β protein precursor. *Science.* 259:514-6.
- Cao, X., and T.C. Südhof. 2001. A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science.* 293:115-20.
- Cao, X., and T.C. Südhof. 2004. Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J. Biol. Chem.* 279: 24601-24611 .
- Capell, A., D. Beher, S. Prokop, H. Steiner, C. Kaether, M.S. Shearman, and C. Haass. 2005. γ -Secretase Complex Assembly within the Early Secretory Pathway. *J. Biol. Chem.* 280:6471-6478.
- Capell, A., J. Grunberg, B. Pesold, A. Diehlmann, M. Citron, R. Nixon, K. Beyreuther, D.J. Selkoe, and C. Haass. 1998. The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. *J. Biol. Chem.* 273:3205-11.
- Capell, A., R. Saffrich, J.C. Olivo, L. Meyn, J. Walter, J. Grunberg, P. Mathews, R. Nixon, C. Dotti, and C. Haass. 1997. Cellular expression and proteolytic processing of presenilin proteins is developmentally regulated during neuronal differentiation. *J. Neurochem.* 69:2432-40.
- Chyung J.H., D.M. Raper, and D.J. Selkoe. 2005. Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J. Biol. Chem.* 280: 4383-4392.
- Citron, M., D. Teplow, and D. Selkoe. 1995. Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron.* 14:661-670.

- Citron, M., T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A.Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg, and D.J. Selkoe. 1992. Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature*. 360:672-4.
- Crowther, R.A., and M. Goedert. 2000. Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases. *J. Struct. Biol.* 130:271-9.
- Cruts, M., H. Backhovens, S.Y. Wang, G.V. Gassen, J. Theuns, C.D. De Jonghe, A. Wehnert, J. De Voecht, G. De Winter, P. Cras *et al.* 1995. Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum. Mol. Genet.* 4:2363-71.
- Crystal, A.S., V.A. Morais, R.R. Fortna, D. Carlin, T.C. Pierson, C.A. Wilson, V.M.-Y. Lee, and R.W. Doms. 2004. Presenilin Modulates Pen-2 Levels Posttranslationally by Protecting It from Proteasomal Degradation. *Biochemistry* 43:3555-3563.
- Crystal, A.S., V.A. Morais, T.C. Pierson, D.S. Pijjak, D. Carlin, V.M.-Y. Lee, and R.W. Doms. 2003. Membrane Topology of γ -Secretase Component PEN-2. *J. Biol. Chem.* 278:20117-20123.
- De Strooper, B., P. Saftig, K. Craessaerts, H. Vanderstichele, G. Guhde, W. Annaert, K. Von Figura, and F. Van Leuven. 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*. 391:387-90.
- Dickson, D.W. 1997. The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56:321-39.
- Dunn, B.M. 2002. Structure and Mechanism of the Pepsin-like Family of Aspartic Peptidases. *Chem. Rev.* 102:4431-4458.
- Edbauer, D., E. Winkler, C. Haass, and H. Steiner. 2002. Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid β -peptide production via complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:8666-71.
- Edbauer, D., E. Winkler, J.T. Regula, B. Pesold, H. Steiner, and C. Haass. 2003. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat. Cell Biol.* 5:486-8.
- Esch, F.S., P.S. Keim, E.C. Beattie, R.W. Blacher, A.R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure, and P.J. Ward. 1990. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*. 248:1122-4.
- Esler, W.P., and M.S. Wolfe. 2001. A portrait of Alzheimer secretases-new features and familiar faces. *Science*. 293:1449-54.
- Esler, W.P., W.T. Kimberly, B.L. Ostaszewski, T.S. Diehl, C.L. Moore, J.-Y. Tsai, T. Rahmati, W. Xia, D.J. Selkoe, and M.S. Wolfe. 2000. Transition-state analogue inhibitors of γ -secretase bind directly to presenilin-1. *Nat. Cell Biol.* 2:428-433.

- Felsenstein, K.M., K.M. Ingalls, L.W. Hunihan, and S.B. Roberts. 1994. Reversal of the Swedish familial Alzheimer's disease mutant phenotype in cultured cells treated with phorbol 12,13-dibutyrate. *Neurosci. Lett.* 174:173-6.
- Ferri, C.P., M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P.R. Menezes, E. Rimmer, M. Scazufca, for Alzheimer's Disease International. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112-17.
- Fluhrer, R., G. Multhaup, A. Schlicksupp, M. Okochi, M. Takeda, S. Lammich, M. Willem, G. Westmeyer, W. Bode, J. Walter, and C. Haas. 2003. Identification of a β -Secretase Activity, Which Truncates Amyloid β -Peptide after Its Presenilin-dependent Generation. *J Biol Chem* 278:5531-5538.
- Fortini, M.E. 2002. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:673-84.
- Fraering, P.C., M.J. LaVoie, W. Ye, B.L. Ostaszewski, W.T. Kimberly, D.J. Selkoe, and M.S. Wolfe. 2004. Detergent-Dependent Dissociation of Active γ -Secretase Reveals an Interaction between Pen-2 and PS1-NTF and Offers a Model for Subunit Organization within the Complex. *Biochemistry* 43:323-333.
- Francis, R., G. McGrath, J. Zhang, D.A. Ruddy, M. Sym, J. Apfeld, M. Nicoll, M. Maxwell, B. Hai, M.C. Ellis, A.L. Parks, W. Xu, J. Li, M. Gurney, R.L. Myers, C.S. Himes, R.D. Hiesch, C. Ruble, J.S. Nye, and D. Curtis. 2002. aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP, and presenilin protein accumulation. *Dev. Cell.* 3:85-97.
- Friedhoff, P., M. von Bergen, E.M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 2000. Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochem. Biophys. Acta.* 1502:122-32.
- Füllekrug, J., J. Boehm, S. Rottger, T. Nilsson, G. Mieskes, and H.D. Schmitt. 1997. Human Rer1 is localized to the Golgi apparatus and complements the deletion of the homologous Rer1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Cell Biol.* 74:31-40.
- Giaccone, G., F. Tagliavini, G. Linoli, C. Bouras, L. Frigerio, B. Frangione, and O. Bugiani. 1989. Down patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neurosci. Lett.* 97:232-8.
- Glabe, C. 2001. Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* 17:137-45.
- Glenner, G.G., and C.W. Wong. 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120:885-90.

- Goutte, C., M. Tsunozaki, V.A. Hale, and J.R. Priess. 2002. APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:775-779.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, and L.I. Binder. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 83:4913-7.
- Haass, C. 2002. New hope for Alzheimer disease vaccine. *Nat. Med.* 8:1195-6.
- Haass, C. 2004. Take five – BACE and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation. *EMBO J.* 23:483-488.
- Haass, C., A. Capell, M. Citron, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe. 1995. The vacuolar H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 differentially affects proteolytic processing of mutant and wild-type beta-amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 270:6186-92.
- Haass, C., A.Y. Hung, M.G. Schlossmacher, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe. 1993. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J. Biol. Chem.* 268:3021-4.
- Haass, C., and D.J. Selkoe. 1993. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*. 75:1039-42.
- Haass, C. and H. Steiner. 2002. Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol.* 12:556-62.
- Haass, C., M.G. Schlossmacher, A.Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B.L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E.H. Koo, D. Schenk, D.B. Teplow *et al.* 1992. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. 359:322-5.
- Hadland, B., N. Manley, D.M. Su, G. Longmore, C. Moore, M. Wolfe, E. Schroeter, and R. Kopan. 2001. γ -Secretase inhibitors repress thymocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98:7487-7491.
- Hardy, J., and D.J. Selkoe. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297:353-6.
- Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura, and P. Saftig. 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* 11:2615-24.
- Hasegawa, H., N. Sanjo, F. Chen, Y.J. Gu, C. Shier, A. Petit, T. Kawarai, T. Katayama, S.D. Schmidt, P.M. Mathews, G. Schmitt-Ulms, P.E. Fraser, P. St George-Hyslop. 2004. Both the sequence and length of the C terminus of PEN-2 are critical for intermolecular interactions and function of presenilin complexes. *J. Biol. Chem.* 279:46455-63.

- Heber, S., J. Herms, V. Gajic, J. Hainfellner, A. Aguzzi, T. Rüllicke, H. Kretzschmar, C. von Koch, S. Sisodia, P. Tremml, H.-P. Lipp, D.P. Wolfer, and U. Müller. 2000. Mice with Combined Gene Knock-Outs Reveal Essential and Partially Redundant Functions of Amyloid Precursor Protein Family Members. *J. Neurosci.* 20(21):7951-7963.
- Hendriks, L., C.M. van Duijn, P. Cras, M. Cruts, W. Van Hul, F. van Harskamp, A. Warren, M.G. McInnis, S.E. Antonarakis, J.J. Martin *et al.* 1992. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat. Genet.* 1:218-21.
- Hennecke, S. and P. Cosson. 1993. Role of Transmembrane Domains in Assembly and Intracellular Transport of the CD8 Molecule. *J. Biol. Chem.* 268:26607-26612.
- Herms, J., B. Anliker, S. Heber, S. Ring, M. Fuhrmann, H. Kretzschmar, S. Sisodia, and U. Müller. 2004. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J.* 23:4106-4115.
- Herreman, A., L. Serneels, W. Annaert, D. Collen, L. Schoonjans, and B. De Strooper. 2000. Total inactivation of γ -secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 2:461-2.
- Hu, X., C.W. Hicks, W. He, P. Wong, W.B. Macklin, B.D. Trapp, and R. Yan. 2006. Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* 9: 1520-1525.
- Hu, Y., and M.E. Fortini. 2003. Different cofactor activities in γ -secretase assembly: evidence for a nicastrin-Aph-1 subcomplex. *J. Cell Biol.* 161:685-690.
- Hung, A.Y., C. Haass, R.M. Nitsch, W.Q. Qiu, M. Citron, R.J. Wurtman, J.H. Growdon, and D.J. Selkoe. 1993. Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J. Biol. Chem.* 268:22959-62.
- Hussain, I., D. Powell, D.R. Howlett, D.G. Tew, T.D. Meek, C. Chapman, I.S. Gloger, K.E. Murphy, C.D. Southan, D.M. Ryan, T.S. Smith, D.L. Simmons, F.S. Walsh, C. Dingwall, and G. Christie. 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* 14:419-27.
- Jacobsen, J.S., M.A. Spruyt, A.M. Brown, S.R. Sahasrabudhe, A.J. Blume, M.P. Vitek, H.A. Muenkel, and J. Sonnenberg-Reines. 1994. The release of Alzheimer's disease beta amyloid peptide is reduced by phorbol treatment. *J. Biol. Chem.* 269:8376-82.
- Jorm, A.F. Cross-national comparisons of the occurrence of alzheimer's and vascular dementias. 1991. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 240:218-222.
- Kaether, C., A. Capell, D. Edbauer, E. Winkler, B. Novak, H. Steiner, and C. Haass. 2004. The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and γ -secretase activity. *EMBO J.* 23:4738-4748.

- Kaether C., C. Haass, and H. Steiner. 2006. Assembly, Trafficking and Function of γ -Secretase. *Neurodegenerative Dis.* 3:275-283.
- Kaether C., J. Scheuermann, M. Fassler, S. Zilow, K. Shirotani, C. Valkova, B. Novak, S. Kacmar, H. Steiner, and C. Haass. 2007. Endoplasmic reticulum retention of the γ -secretase complex component Pen2 by Rer1. *EMBO rep.* 8:743-748.
- Kaether, C., S. Lammich, D. Edbauer, M. Ertl, J. Rietdorf, A. Capell, H. Steiner, and C. Haass. 2002. Presenilin-1 affects trafficking and processing of β APP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 158:551-561.
- Kamal, A., A. Almenar-Queralt, J.F. LeBlanc, E.A. Roberts, and L.S. Goldstein. 2001. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature.* 414:643-8.
- Kang, J., H.G. Lemaire, A. Unterbeck, J.M. Salbaum, C.L. Masters, K.H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, and B. Muller-Hill. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 325:733-6.
- Kim, J., B. Kleizen, R. Choy, G. Thinakaran, S.S. Sisodia, and R.W. Schekman. 2007. Biogenesis of γ -secretase early in the secretory pathway. *J. Cell Biol.* 179:951-963.
- Kim, S.-H. and S.S. Sisodia. 2005a. A Sequence within the First Transmembrane Domain of Pen-2 Is Critical for Pen-2-mediated Endoproteolysis of Presenilin 1. *J. Biol. Chem.* 280:1992-2001.
- Kim, S.-H. and S.S. Sisodia. 2005b. Evidence that the "NF" motif in transmembrane domain 4 of presenilin 1 is critical for binding with Pen-2. *J. Biol. Chem.* 280:41953-41966.
- Kim, S.-H., T. Ikeuchi, C. Yu, and S.S. Sisodia. 2003. Regulated Hyperaccumulation of Presenilin-1 and the " γ -Secretase" Complex. *J. Biol. Chem.* 278:33992-34002.
- Kim, S.-H., Y.I. Yin, Y.-M. Li, and S.S. Sisodia. 2004. Evidence That Assembly of an Active γ -Secretase Complex Occurs in the Early Compartments of the Secretory Pathway. *J. Biol. Chem.* 279:48615-48619.
- Kimberly, W.T., M.J. LaVoie, B.L. Ostaszewski, W. Ye, M.S. Wolfe, and D.J. Selkoe. 2003. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:6382-7.
- Kimberly, W.T., W. Xia, T. Rahmati, M.S. Wolfe, and D.J. Selkoe. 2000. The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for γ -secretase activity and amyloid β -protein generation. *J. Biol. Chem.* 275:3173-8.
- Kins, S., N. Lauther, A. Szodorai, and K. Beyreuther. 2006. Subcellular Trafficking of the Amyloid Precursor Protein Gene Family and Its Pathogenic Role in Alzheimer's Disease. *Neurodegenerative Dis.* 3:218-226.

- Kitazume, S., Y. Tachida, R. Oka, K. Shirotani, T.C. Saido, and Y. Hashimoto. 2001. Alzheimer's β -secretase, β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13554–13559.
- Koike, H., S. Tomioka, H. Sorimachi, T.C. Saido, K. Maruyama, A. Okuyama, A. Fujisawa-Sehara, S. Ohno, K. Suzuki, and S. Ishiura. 1999. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an α -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem. J.* 343:371-375.
- Koo, E.H., and S.L. Squazzo. 1994. Evidence that production and release of amyloid β -protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 269:17386-9.
- Koo, E.H., S.L. Squazzo, D.J. Selkoe, and C.H. Koo. 1996. Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *J. Cell Sci.* 109:991-8.
- Kopan, R., and A. Goate. 2002. Aph-2/Nicastrin: an essential component of γ -secretase and regulator of Notch signaling and Presenilin localization. *Neuron.* 33:321-4.
- Kumar-Singh S., J. Theuns, B. Van Broeck, D. Pirici, K. Vennekens, E. Corsmit, M. Cruts, B. Dermaut, R. Wang, and C. Van Broeckhoven. 2006. Mean age-of-onset of familial alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40. *Hum Mutat.* 27:686-95.
- Lai, E.C. 2002. Notch cleavage: Nicastrin helps Presenilin make the final cut. *Curr Biol.* 12:R200-2.
- Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass, and F. Fahrenholz. 1999. Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:3922-7.
- Lammich, S., M. Okochi, M. Takeda, C. Kaether, A. Capell, A.-K. Zimmer, D. Edbauer, J. Walter, H. Steiner, and C. Haass. 2002. Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Ab-like peptide. *J. Biol. Chem.* 277:44754-44759.
- LaPointe, C., and R.K. Taylor. 2000. The Type 4 Prepilin Peptidase Comprise a Novel Family of Aspartic Acid Proteases. *J. Biol. Chem.* 275:1502-1510.
- LaVoie, M.J., P.C. Fraering, B.L. Ostaszewski, W. Ye, W.T. Kimberly, M.S. Wolfe, and D.J. Selkoe. 2003. Assembly of the γ -Secretase Complex Involves Early Formation of an Intermediate Subcomplex of Aph-1 and Nicastrin. *J. Biol. Chem.* 278:37213-37222.
- Lazarov, V. K., P.C. Fraering, W. Ye, M.S. Wolfe, D.J. Selkoe, and H. Li. 2006. Electron microscopic structure of purified, active gamma-secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:6889–6894.

- Lee, H.J., K.M. Jung, Y.Z. Huang, L.B. Bennett, J.S. Lee, L. Mei, and T.W. Kim. 2002a. Presenilin-dependent γ -secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. *J. Biol. Chem.* 277:6318-23.
- Lee, S., S. Shah, H. Li, C. Yu, W. Han, and G. Yu. 2002b. Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of APP and Notch. *J. Biol. Chem.* 277:45013-45019.
- Leem, J.Y., S. Vijayan, P. Han, D. Cai, M. Machura, K.O. Lopes, M.L. Veselits, H. Xu, and G. Thinakaran. 2002. Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin. *J. Biol. Chem.* 277:19236-40.
- Levy, E., M.D. Carman, I.J. Fernandez-Madrid, M.D. Power, I. Lieberburg, S.G. van Duinen, G.T. Bots, W. Luyendijk, and B. Frangione. 1990. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science.* 248:1124-6.
- Levy-Lahad, E., E.M. Wijsman, E. Nemens, L. Anderson, K.A. Goddard, J.L. Weber, T.D. Bird, and G.D. Schellenberg. 1995. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science.* 269:970-3.
- Li, Y.M., M. Xu, M.T. Lai, Q. Huang, J.L. Castro, J. DiMuzio-Mower, T. Harrison, C. Lellis, A. Nadin, J.G. Neduvelli, R.B. Register, M.K. Sardana, M.S. Shearman, A.L. Smith, X.P. Shi, K.C. Yin, J.A. Shafer, and S.J. Gardell. 2000. Photoactivated γ -secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature.* 405:689-94.
- Lichtenthaler, S.F., D. Beher, H.S. Grimm, R. Wang, M.S. Shearman, C.L. Masters, and K. Beyreuther. 2002. The intramembrane cleavage site of the amyloid precursor protein depends on the length of its transmembrane domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:1365-70.
- Lichtenthaler S.F., D.I. Dominguez, G.G. Westmeyer, K. Reiss, C. Haass, P. Saftig, B. De Strooper, and B. Seed. 2003. The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem* 278:48713-48719.
- Lichtenthaler, S.F., and H. Steiner. 2007. Sheddases and intramembrane-cleaving proteases: RIPpers of the membrane. *EMBO Rep.* 8:537-541.
- Lin, X., G. Koelsch, S. Wu, D. Downs, A. Dashti, and J. Tang. 2000. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:1456-60.
- Luo, W., H. Wang, H. Li, B.S. Kim, S. Shah, H.-J. Lee, G. Thinakaran, T.-W. Kim, G. Yu, and H. Xu. 2003. PEN-2 and APH-1 Coordinately Regulate Proteolytic Processing of Presenilin 1. *J. Biol. Chem.* 278:7850-7854.

- Luo, Y., B. Bolon, S. Kahn, B.D. Bennett, S. Babu-Khan, P. Denis, W. Fan, H. Kha, J. Zhang, Y. Gong, L. Martin, J.C. Louis, Q. Yan, W.G. Richards, M. Citron, and R. Vassar. 2001. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat. Neurosci.* 4:231-2.
- Mandelkow, E.M., and E. Mandelkow. 1998. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 8:425-7.
- Marambaud, P., J. Shioi, G. Serban, A. Georgakopoulos, S. Sarnier, V. Nagy, L. Baki, P. Wen, S. Efthimiopoulos, Z. Shao, T. Wisniewski, and N.K. Robakis. 2002. A presenilin-1/ γ -secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J.* 21:1948-56.
- Masters, C.L., G. Simms, N.A. Weinman, G. Multhaup, B.L. McDonald, and K. Beyreuther. 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:4245-9.
- Maurer, K., und U. Maurer. 1998. Alzheimer. Das Leben eines Arztes und die Karriere einer Krankheit. Piper, München.
- Miech, R.A., J.C. Breitner, P.P. Zandi, A.S. Khachaturian, J.C. Anthony, and L. Mayer. 2002. Incidence of AD may decline in the early 90's for men, later for women: The Cache County study. *Neurology* 58(2):209-18.
- Milward, E.A., R. Papadopoulos, S.J. Fuller, R.D. Moir, D. Small, K. Beyreuther, and C.L. Masters. 1992. The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron.* 9:129-37.
- Mizutani, T., Y. Taniguchi, T. Aoki, N. Hashimoto, and T. Honjo. 2001. Conservation of the biochemical mechanisms of signal transduction among mammalian Notch family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:9026-31.
- Morais, V.A., A.S. Crystal, D.S. Pijak, D. Carlin, J. Costa, V.M.-Y. Lee, and R.W. Doms. 2003. The Transmembrane Region of Nicastrin Mediates Direct Interactions with APH-1 and the γ -Secretase Complex. *J. Biol. Chem.* 278:43284-43291.
- Morris, H.R., M.N. Khan, J.C. Janssen, J.M. Brown, J. Perez-Tur, M. Baker, M. Ozansoy, J. Hardy, M. Hutton, N.W. Wood, A.J. Lees, T. Revesz, P. Lantos, and M.N. Rossor. 2001. The genetic and pathological classification of familial frontotemporal dementia. *Arch. Neurol.* 58:1813-6.
- Mullan, M., F. Crawford, K. Axelman, H. Houlden, L. Lilius, B. Winblad, and L. Lannfelt. 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat. Genet.* 1:345-7.
- Mumm, J.S., and R. Kopan. 2000. Notch signaling: from the outside in. *Dev. Biol.* 228:151-65.

- Naruse, S., G. Thinakaran, J.J. Luo, J.W. Kusiak, T. Tomita, T. Iwatsubo, X. Qian, D.D. Ginty, D.L. Price, D.R. Borchelt, P.C. Wong, and S.S. Sisodia. 1998. Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron*. 21:1213-21.
- Ni, C.Y., M.P. Murphy, T.E. Golde, and G. Carpenter. 2001. γ -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science*. 294:2179-2181.
- Nishimoto, I., T. Okamoto, Y. Matsuura, S. Takahashi, Y. Murayama, and E. Ogata. 1993. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature*. 362:75-9.
- Odetti, P., G. Angelini, D. Dapino, D. Zaccheo, S. Garibaldi, F. Dagna-Bricarelli, G. Piombo, G. Perry, M. Smith, N. Traverso, and M. Tabaton. 1998. Early glyoxidation damage in brains from Down's syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243:849-51.
- Okochi, M., H. Steiner, A. Fukumori, H. Tanii, T. Tomita, T. Tanaka, T. Iwatsubo, T. Kudo, C. Haass, and M. Takeda. 2002. Presenilins mediate a dual intramembraneous γ -secretase cleavage of Notch, which is required for signaling and removal of the transmembrane domain. *EMBO J.* 21:5408-16.
- Ott, A., M.M.B. Breteler, F. van Harskamp, J.C. Claus, T.J.M. van der Cammen, D.E. Grobbee, and A. Hofman. 1995. Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *Brit. Med. J.* 310:970-973.
- Pasternak, S.H., R.D. Bagshaw, M. Guiral, S. Zhang, C.A. Ackerley, B.J. Pak, J.W. Callahan, and D.J. Mahuran. 2003. Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. *J. Biol. Chem.* 278: 26687-26694.
- Pearson, W.R. and D.J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:2444-2448
- Peschon, J.J., J.L. Slack, P. Reddy, K.L. Stocking, S.W. Sunnarborg, D.C. Lee, W.E. Russell, B.J. Castner, R.S. Johnson, J.N. Fitzner, R.W. Boyce, N. Nelson, C.J. Kozlosky, M.F. Wolfson, C.T. Rauch, D.P. Cerretti, R.J. Paxton, C.J. March, and R.A. Black. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*. 282:1281-4.
- Pike, C.J., B.J. Cummings, R. Monzavi, and C.W. Cotman. 1994. Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 63:517-31.
- Poeck, K. und W. Hacke. 2001. Neurologie. Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- Ponting, C.P., M. Hutton, A. Nyborg, M. Baker, K. Jansen, and T.E. Golde. 2002. Identification of a novel family of presenilin homologues. *Hum. Mol. Genet.* 11:1037-44.

- Prokop, S., K. Shirovani, D. Edbauer, C. Haass, and H. Steiner. 2004. Requirement of PEN-2 for Stabilization of the Presenilin N-/C-terminal Fragment Heterodimer within the γ -Secretase Complex. *J. Biol. Chem.* 279:23255-23261.
- Ratovitski, T., H.H. Slunt, G. Thinakaran, D.L. Price, S.S. Sisodia, and D.R. Borchelt. 1997. Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin. *J. Biol. Chem.* 272:24536-41.
- Reth, M., J. Hombach, J. Wienands, K.S. Campbell, N. Chien, L.B. Justement, and J.C. Cambier. 1991. The B-cell antigen receptor complex. *Immunology Today* 12:196-201.
- Roberds, S.L., J. Anderson, G. Basi, M.J. Bienkowski, D.G. Branstetter, K.S. Chen, S.B. Freedman, N.L. Frigon, D. Games, K. Hu, K. Johnson-Wood, K.E. Kappenman, T.T. Kawabe, I. Kola, R. Kuehn, M. Lee, W. Liu, R. Motter, N.F. Nichols, M. Power, D.W. Robertson, D. Schenk, M. Schoor, G.M. Shopp, M.E. Shuck, S. Sinha, K.A. Svensson, G. Tatsuno, H. Tintrup, J. Wijsman, S. Wright, and L. McConlogue. 2001. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum. Mol. Genet.* 10:1317-24.
- Rogaev, E.I., R. Sherrington, E.A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda, *et al.* 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature.* 376:775-8.
- Saitoh, T., M. Sundsmo, J.M. Roch, N. Kimura, G. Cole, D. Schubert, T. Oltersdorf, and D.B. Schenk. 1989. Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell.* 58:615-22.
- Sandbrink, R., C.L. Masters, and K. Beyreuther. 1994. Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4-amyloid protein precursor-like proteins. *J. Biol. Chem.* 269:14227-34.
- Sastre, M., H. Steiner, K. Fuchs, A. Capell, G. Multhaup, M.M. Condron, D.B. Teplow, and C. Haass. 2001. Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep.* 2:835-41.
- Sato, K., M. Sato, and A. Nakano. 2003. Rer1p, a Retrieval Receptor for ER Membrane Proteins, Recognizes Transmembrane Domains in Multiple Modes. *Mol. Biol. Cell* 14:3605-3616.
- Sato, M., K. Sato, and A. Nakano. 1996. Endoplasmic Reticulum Localization of Sec12p Is Achieved by Two Mechanisms: Rer1p-dependent Retrieval That Requires the Transmembrane Domain and Rer1p-independent Retention That Involves the Cytoplasmic Domain. *J. Cell Biol.* 134:279-293.

- Sato, M., K. Sato, and A. Nakano. 2004. Endoplasmic Reticulum Quality Control of Unassembled Iron Transporter Depends on Rer1p-mediated Retrieval from the Golgi. *Mol. Biol. Cell* 15:1417-1424.
- Sato, T., T.S. Diehl, S. Narayanan, S. Funamoto, Y. Ihara, B. De Strooper, H. Steiner, C. Haass, and M.S. Wolfe. 2007. Active γ -Secretase Complexes Contain Only One of Each Component. *J. Biol. Chem.* 282:33985-33993.
- Saunders, A., T.-W. Kim, and R. Tanzi. 1999. BACE Maps to Chromosome 11 and a BACE Homolog, BACE2, Reside in the Obligate Down Syndrome Region of Chromosome 21. *Science.* 286:1255a.
- Saxena, M.T., E.H. Schroeter, J.S. Mumm, and R. Kopan. 2001. Murine Notch homologs (N1-4) undergo presenilin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 276:40268-73.
- Schaegger, H., and G. von Jagow. 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199:223-231.
- Schupf, N., B. Patel, W. Silverman, W.B. Zigman, N. Zhong, B. Tycko, P.D. Mehta, and R. Mayeux. 2001. Elevated plasma amyloid beta-peptide 1-42 and onset of dementia in adults with Down syndrome. *Neurosci. Lett.* 301:199-203.
- Seals, D.F., and S.A. Courtneidge. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17:7-30.
- Seiffert, D., J.D. Bradley, C.M. Rominger, D.H. Rominger, F. Yang, J.E. Meredith, Jr., Q. Wang, A.H. Roach, L.A. Thompson, S.M. Spitz, J.N. Higaki, S.R. Prakash, A.P. Combs, R.A. Copeland, S.P. Arneric, P.R. Hartig, D.W. Robertson, B. Cordell, A.M. Stern, R.E. Olson, and R. Zaczek. 2000. Presenilin-1 and -2 are molecular targets for gamma-secretase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 275:34086-91.
- Selkoe, D.J. 1994. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10:373-403.
- Selkoe, D.J. 1996. Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 271:18295-8.
- Selkoe, D.J. 1999. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature.* 399:A23-31.
- Selkoe, D.J. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81:741-66.
- Selkoe, D.J. 2004. Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat. Cell Biol.* 6:1054-1561.
- Selkoe, D.J., and D. Schenk. 2003. Alzheimer's Disease: Molecular Understanding Predicts Amyloid-Based Therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43:545-84.

- Selkoe, D.J., M.B. Podlisny, C.L. Joachim, E.A. Vickers, G. Lee, L.C. Fritz, and T. Oltersdorf. 1988. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:7341-5.
- Seubert, P., T. Oltersdorf, M.G. Lee, R. Barbour, C. Blomquist, D.L. Davis, K. Bryant, L.C. Fritz, D. Galasko, L.J. Thal *et al.* 1993. Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the β -amyloid peptide. *Nature*. 361:260-3.
- Shah, S., S.-F. Lee, K. Tabuchi, Y.-H. Hao, C. Yu, Q. LaPlant, H. Ball, C. E. Dann III, T. Südhof, and G. Yu. 2005. Nicastrin Functions as a γ -Secretase-Substrate Receptor. *Cell*. 122:435-447.
- Sherrington, R., E.I. Rogaev, Y. Liang, E.A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman *et al.* 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 375:754-60.
- Shin, J., R.L. Dunbrack Jr., S. Lee, and J.L. Strominger. 1991. Signals for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum studied with CD4 truncation mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1981-1922.
- Shirotani, K., D. Edbauer, A. Capell, J. Schmitz, H. Steiner, and C. Haass. 2003. γ -Secretase Activity Is Associated with a Conformational Change of Nicastrin. *J. Biol. Chem.* 278:16474-16477.
- Shirotani, K., D. Edbauer, M. Kostka, H. Steiner, and C. Haass. 2004. Immature nicastrin stabilizes APH-1 independent of PEN-2 and presenilin: identification of nicastrin mutants that selectively interact with APH-1. *J. Neurochem.* 89:1520-1527.
- Shoji, M., T.E. Golde, J. Ghiso, T.T. Cheung, S. Estus, L.M. Shaffer, X.D. Cai, D.M. McKay, R. Tintner, B. Frangione *et al.* 1992. Production of the Alzheimer amyloid β -protein by normal proteolytic processing. *Science*. 258:126-9.
- Sinha, S., J.P. Anderson, R. Barbour, G.S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H.F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S.M. Suomensari, S. Wang, D. Walker, V. John *et al.* 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature*. 402:537-40.
- Sisodia, S.S. 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:6075-9.
- Sisodia, S.S., E.H. Koo, K. Beyreuther, A. Unterbeck, and D.L. Price. 1990. Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science*. 248:492-5.
- Sisodia, S.S., and P.H. St George-Hyslop. 2002. Gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: Where do the presenilins fit in? *Nat. Rev. Neurosci.* 3:281-90.

- Solans, A., X. Estivill, and S. de La Luna. 2000. A new aspartyl protease on 21q22.3, BACE2, is highly similar to Alzheimer's amyloid precursor protein beta-secretase. *Cytogenet. Cell Genet.* 89:177-84.
- Sprecher, C.A., F.J. Grant, G. Grimm, P.J. O'Hara, F. Norris, K. Norris, and D.C. Foster. 1993. Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry.* 32:4481-6.
- Steiner H., E. Winkler, and C. Haass. 2008. Chemical cross-linking provides a model of the gamma-secretase complex subunit architecture and evidence for close proximity of the C-terminal fragment of presenilin with APH-1. *J Biol Chem.* 283:34677-86.
- Steiner, H., E. Winkler, D. Edbauer, S. Prokop, G. Basset, A. Yamasaki, M. Kostka, and C. Haass. 2002. PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J. Biol. Chem.* 277:39062-65.
- Steiner, H., K. Duff, A. Capell, H. Romig, M.G. Grim, S. Lincoln, J. Hardy, X. Yu, M. Picciano, K. Fichtler, M. Citron, R. Kopan, B. Pesold, S. Keck, M. Baader, T. Tomita, T. Iwatsubo, R. Baumeister, and C. Haass. 1999. A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling. *J. Biol. Chem.* 274:28669-73.
- Steiner, H., M. Kostka, H. Romig, G. Basset, B. Pesold, J. Hardy, A. Capell, L. Meyn, M.L. Grim, R. Baumeister, K. Fichtler, and C. Haass. 2000. Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in polytopic bacterial aspartyl proteases. *Nat. Cell Biol.* 2, 848-851.
- Struhl, G., and A. Adachi. 2000. Requirements for presenilin-dependent cleavage of Notch and other transmembrane proteins. *Mol. Cell.* 6:625-636.
- Tagliavini, F., G. Giaccone, B. Frangione, and O. Bugiani. 1988. Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and nondemented individuals. *Neurosci. Lett.* 93:191-6.
- Takasugi, N., T. Tomita, I. Hayashi, M. Tsuruoka, M. Niimura, Y. Takahashi, G. Thinakaran, and T. Iwatsubo. 2003. The role of presenilin cofactors in the γ -Secretase Complex. *Nature* 422:438-441.
- Terry, R.D., N.K. Gonatas, and M. Weiss. 1964. The ultrastructure of the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Trans. Am. Neurol. Assoc.* 89:12.
- Thinakaran, G., D.R. Borchelt, M.K. Lee, H.H. Slunt, L. Spitzer, G. Kim, T. Ratovitsky, F. Davenport, C. Nordstedt, M. Seeger, J. Hardy, A.I. Levey, S.E. Gandy, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, D.L. Price, and S.S. Sisodia. 1996. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron.* 17:181-90.

- Thinakaran, G., C.L. Harris, T. Ratovitski, F. Davenport, H.H. Slunt, D.L. Price, D.R. Borchelt, and S.S. Sisodia. 1997. Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *J. Biol. Chem.* 272:28415-22.
- Thorsett, E.D., and L.H. Latimer. 2000. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:377-82.
- Tolia, A., L. Chavez-Gutierrez, and B. DeStrooper. 2006. Contribution of Presenilin Transmembrane Domains 6 and 7 to a Water-containing Cavity in the γ -Secretase Complex. *J. Biol. Chem.* 281:27633-27642.
- Vassar, R. 2002. beta-Secretase (BACE) as a drug target for alzheimer's disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:1589-602.
- Vassar, R., B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, and M. Citron. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 286:735-41.
- von Arnim C.A., A. Kinoshita, I.D. Peltan, M.M. Tangredi, L. Herl, B.M. Lee, R. Spoelgen, T.T. Hshieh, S. Ranganathan, F.D. Battey *et al.* 2005. The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel β -secretase (BACE1) substrate. *J Biol Chem* 280: 17777-17785.
- Walsh, D.M., I. Klyubin, J.V. Fadeeva, W.K. Cullen, R. Anwyl, M.S. Wolfe, M.J. Rowan, and D.J. Selkoe. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature.* 416:535-9.
- Walter, J., C. Kaether, H. Steiner, and C. Haass. 2001. The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11:585-90.
- Wang, R., D. Sweeney, S.E. Gandy, and S.S. Sisodia. 1996. The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 271:31894-902.
- Wasco, W., K. Bupp, M. Magendantz, J.F. Gusella, R.E. Tanzi, and F. Solomon. 1992. Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10758-62.
- Wasco, W., S. Gurubhagavatula, M.D. Paradis, D.M. Romano, S.S. Sisodia, B.T. Hyman, R.L. Neve, and R.E. Tanzi. 1993. Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat. Genet.* 5:95-100.

- Watanabe N., T. Tomita, C. Sato, T. Kitamura, Y. Morohashi, and T. Iwatsubo. 2005. Pen-2 is incorporated into the gamma-secretase complex through binding to transmembrane domain 4 of presenilin 1. *J. Biol. Chem.* 280: 41967-41975.
- Webpath 1: Klinikum der Universität München, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
<http://psywifo.klinikum.uni-muenchen.de/klinik/historie/3.html>
(letzter Zugriff am 17.01.2008)
- Webpath 2: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism of the National Institutes of Health, Suzanne L. Tyas. Alcohol Use and the Risk of Developing Alzheimer's Disease.
<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh25-4/299-306.htm>
(letzter Zugriff am 17.01.2008)
- Webpath 3: Alzheimer Society of Saskatchewan
http://www.alzheimer.sk.ca/english/Just4Kids/alz_disease-brainpics.shtml
(letzter Zugriff am 17.01.2008)
- Webpath 4: Nature Publishing Group, News@Nature.Com
<http://www.nature.com/news/2004/040726/images/brain.jpg>
(letzter Zugriff am 01.06.2007)
- Webpath 5: Radio Netherlands Wereldomroep
<http://www.rnw.nl/health/html/brain.html>
(letzter Zugriff am 01.06.2007)
- Webpath 6: Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database
<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/>
(letzter Zugriff am 23.01.2008)
- Webpath 7: Alzheimer Research Forum
<http://www.alzforum.org/res/com/mut/app/table1.asp>
(letzter Zugriff am 05.05.2009)
- Weidemann, A., G. König, D. Bunke, P. Fischer, J.M. Salbaum, C.L. Masters, and K. Beyreuther. 1989. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell.* 57:115-26.
- Weihofen, A., K. Binns, M.K. Lemberg, K. Ashman, and B. Martoglio. 2002. Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science.* 296:2215-8.
- Wertkin, A.M., R.S. Turner, S.J. Pleasure, T.E. Golde, S.G. Younkin, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 1993. Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:9513-7.

- Weskamp, G., H. Cai, T.A. Brodie, S. Higashyama, K. Manova, T. Ludwig, and C.P. Blobel. 2002. Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol. Cell Biol.* 22:1537-44.
- Willem M., A.N. Garratt, B. Novak, M. Citron, S. Kaufmann, A. Rittger, B. DeStrooper, P. Saftig, C. Birchmeier, and C. Haass. 2006. Control of peripheral nerve myelination by the β -secretase BACE1. *Science* 314, 664–666.
- Winkler E., S. Hobson, A. Fukumori, B. Dümpelfeld, T. Luebbers, K. Baumann, C. Haass, C. Hopf, and H. Steiner. 2009. Purification, pharmacological modulation, and biochemical characterization of interactors of endogenous human gamma-secretase. *Biochemistry* 48:1183-97.
- Wolfe, M.S., and D.J. Selkoe. 2002. Intramembrane Proteases – Mixing Oil and Water. *Science* 296: 2156-2157.
- Wolfe, M.S., W. Xia, C.L. Moore, D.D. Leatherwood, B. Ostaszewski, T. Rahmati, I.O. Donkor, and D.J. Selkoe. 1999a. Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's γ -secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry*. 38:4720-7.
- Wolfe, M.S., W. Xia, B.L. Ostaszewski, T.S. Diehl, W.T. Kimberly, and D.J. Selkoe. 1999b. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature*. 398:513-7.
- Wong, H.K., T. Sakurai, F. Oyama, K. Kaneko, K. Wada, H. Miyazaki, M. Kurosawa, B. De Strooper, P. Saftig P and N. Nukina. 2005. β -Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and γ -secretase. *J Biol Chem* 280, 23009–23017.
- Yamaguchi, H., Y. Nakazato, S. Hirai, M. Shoji, and Y. Harigaya. 1989. Electron micrograph of diffuse plaques. Initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain. *Am. J. Pathol.* 135:593-7.
- Yan, R., M.J. Bienkowski, M.E. Shuck, H. Miao, M.C. Tory, A.M. Pauley, J.R. Brashier, N.C. Stratman, W.R. Mathews, A.E. Buhl, D.B. Carter, A.G. Tomasselli, L.A. Parodi, R.L. Heinrikson, and M.E. Gurney. 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature*. 402:533-7.
- Yu, G., F. Chen, G. Levesque, M. Nishimura, D.M. Zhang, L. Levesque, E. Rogueva, D. Xu, Y. Liang, M. Duthie, P.H. St George-Hyslop, and P.E. Fraser. 1998. The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains β -catenin. *J. Biol. Chem.* 273:16470-5.

- Yu, G., M. Nishimura, S. Arawaka, D. Levitan, L. Zhang, A. Tandon, Y.Q. Song, E. Rogaeva, F. Chen, T. Kawarai, A. Supala, L. Levesque, H. Yu, D.S. Yang, E. Holmes, P. Milman, Y. Liang, D.M. Zhang, D.H. Xu, C. Sato, E. Rogaev, M. Smith, C. Janus, Y. Zhang, R. Aebersold, L.S. Farrer, S. Sorbi, A. Bruni, P. Fraser, and P. St George-Hyslop. 2000. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. *Nature*. 407:48-54.
- Zerangue, N., B. Schwappach, Y.N. Jan, and L.Y. Jan. 1999. A New ER Trafficking Signal Regulates the Subunit Stoichiometry of Plasma Membrane K_{ATP} Channels. *Neuron* 22:537-548.
- Zhang, Z., P. Nadeau, W. Song, D. Donoviel, M. Yuan, A. Bernstein, and B.A. Yankner. 2000. Presenilins are required for γ -secretase cleavage of β APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat. Cell Biol.* 2:463-465.

VII ANHANG

VII.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A β	Amyloid- β -Peptid
A β x-y	Amyloid β -Peptid, beginnend mit Aminosäure x und endend mit Aminosäure y. Die Nummerierung der Aminosäuren ist bezogen auf die allgemein gebräuchliche Nummerierung der A β -Domäne, wobei D597, bezogen auf β APP ₆₉₅ , der Aminosäure 1 entspricht.
AD	Alzheimer's Disease (<i>Alzheimer'sche Erkrankung/Demenz vom Alzheimer-Typ</i>)
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease (<i>Disintegrin Metalloprotease</i>)
AICD	APP Intracellular Domain (<i>Intrazelluläre Domäne von APP</i>)
AK	Antikörper
Aph1	Anterior pharynx defective 1 (<i>Defekte im anterioren Pharynx</i>)
APP _x	Amyloid Precursor Protein (<i>Amyloid Vorläufer Protein</i>) Es gibt Isoformen unterschiedlicher Länge; die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Isoform ist mit x bezeichnet.
APP _x sw	APP _x mit der Doppelmutation K595N/M596L (bezogen auf APP ₆₉₅), beobachtet bei einer schwedischen Familie mit hereditärem Morbus Alzheimer. Durch die Doppelmutation wird die A β -Produktion erheblich erhöht.
APP CTF α_x	C-terminales APP-Fragment, entstanden durch α -Sekretase-Spaltung beginnend mit Aminosäure x. Die Nummerierung der Aminosäuren ist bezogen auf die allgemein gebräuchliche Nummerierung der A β -Domäne, wobei D597, bezogen auf β APP ₆₉₅ , der Aminosäure 1 entspricht.

APP CTF β_x	C-Terminales APP Fragment entstanden durch β -Sekretase-Spaltung beginnend mit Aminosäure x. Die Nummerierung der Aminosäuren ist bezogen auf die allgemein gebräuchliche Nummerierung der A β -Domäne, wobei D597, bezogen auf APP ₆₉₅ , der Aminosäure 1 entspricht.
APP _s β	Lösliches APP entstanden durch β -Sekretase-Spaltung
APP _{sa} / α'	Lösliches APP entstanden durch α -Sekretase- oder durch α -Sekretase-ähnliche Spaltung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosyltriphosphat
BACE	β -site APP Cleaving Enzyme (<i>β-Sekretase</i>)
β APP	β -Amyloid Precursor Protein (<i>β-Amyloid Vorläufer Protein</i>)
bp	Basepairs (<i>Basenpaare</i>)
BSA	Bovine Serum Albumine (<i>Rinderserumalbumin</i>)
CD4	Cluster of differentiation 4 (<i>Differenzierungscluster 4</i>)
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
COP-I	Coat protein complex I (<i>Hüllenproteinkomplex I</i>)
COP-II	Coat protein complex II (<i>Hüllenproteinkomplex II</i>)
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins oder Peptids
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (<i>Desoxyribonukleinsäure</i>)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	Familial Alzheimer's Disease (<i>hereditäre Form der Alzheimerschen Erkrankung</i>)
FCS	Fetal calf serum (<i>fötales Kälberserum</i>)

GFP	Green Fluorescent Protein (<i>grün fluoreszierendes Protein</i>)
GTP	Guanidyltriphosphat
HEK	Human Embryonic Kidney (<i>humane embryonale Nierenzellen</i>)
HRP	Horseradish Peroxidase (<i>Rettich-Peroxidase</i>)
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
Kb	Kilobasen
LB-Medium	Low-Salt Luria-Bertani Medium
mRNA	<i>messenger-ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)</i>
Nct	Nicastrin
NICD	Notch Intracellular Domain (<i>Intrazelluläre Domäne des Notch-1 Rezeptors</i>)
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins oder Peptids
p3	Spaltprodukt des β APP nach α - und γ -Sekretase-Spaltung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (<i>phosphat-gepufferte Kochsalzlösung</i>)
PCR	Polymerase Chain Reaction (<i>Polymerasekettenreaktion</i>)
Pen2	Presenilin enhancer gene 2 (<i>Presenilin-Verstärker-Gen 2</i>)
PS	Presenilin
PS CTF	C-terminales Fragment von Presenilin
PS NTF	N-terminales Fragment von Presenilin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonucleicacid (<i>Ribonukleinsäure</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumduodecylsulfat
siRNA	Small interfering RNA
Sw-Zellen	HEK 293 SwAPP Zellen
TBST	Tris Buffered Saline containing Tween 20 (<i>Tris gepufferte Kochsalzlösung supplementiert mit Tween 20</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	<i>trans</i> Golgi-Netzwerk
TM	Transmembrandomäne

TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
wt	Wildtyp-Form eines Gens/Proteins/Peptids

Einbuchstabencode der Aminosäuren

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

VII.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Seite	
I.1	Alois Alzheimer	11
I.2	Inzidenz und Prävalenz von Demenzen in Deutschland in Abhängigkeit vom Lebensalter	13
I.3	Auguste D.	14
I.4	Oberfläche des Gehirns eines Alzheimer-Patienten im Vergleich mit dem Gehirn einer gesunden älteren Kontrollperson	15
I.5	Frontalschnitt des Gehirns von Alzheimer-Patienten im Vergleich mit gesunden Personen	15
I.6	Dokumentation neurofibrillärer Bündel nach Alois Alzheimer	16
I.7	Histopathologische Merkmale der Demenz vom Alzheimer-Typ	16
I.8	Schematische Darstellung der hypothetischen Amyloidkaskade	21
I.9	Schematische Darstellung des Amyloid-Vorläufer-Proteins	22
I.10	Proteolytische Prozessierung von APP durch α -, β - und γ -Sekretase	24
I.11	Übersicht über die FAD-Mutationen im APP-Gen	25
I.12	Elektronenmikroskopische 3D-Struktur des γ -Sekretase-Komplexes	30
I.13	Prozessierung des Notch-Rezeptors im Vergleich zur der des β APP	31
I.14	Struktur des PS1-Proteins und Lokalisation einiger FAD-Mutationen innerhalb des PS1-Proteins	33
I.15	Schematische Darstellung des γ -Sekretase-Komplexes	35
I.16	Schematisches Modell zur Assemblierung der γ -Sekretase im ER	39
I.17	Modell zur Retention multimerer Zelloberflächenproteine im ER	41
II.1	Schema der Klonierungsstrategie zur Herstellung des chimären CD4-TM1 _{Pen2} -Fusionsproteins und verwandter Konstrukte	51
III.1	Schematische Darstellung des GFP-Pen2-Fusionsproteins	74
III.2	Das GFP-Pen2-Protein lokalisiert unterschiedlich je nach Expressionslevel	74
III.3	Kokalisation von GFP-Pen2 mit Lamp-2	75
III.4	Schema der Ausgangs-/ Reporterproteine und resultierender Fusionskonstrukte	76

III.5	Zelluläre Lokalisation der in Abb. III.4 dargestellten Fusionskonstrukte	78
III.6	Deglykosylierungsverhalten von CD4, CD4-TM _{APP} und CD4-TM1 _{Pen2}	79
III.7	Schematische Darstellung der verwendeten CD4-TM1 _{Pen2} -Konstrukte	81
III.8	Zelluläre Lokalisation der CD4-TM1 _{Pen2} -Konstrukte	81
III.9	Schematische Darstellung der verwendeten C-terminal variierten CD4-TM1 _{Pen2} -Konstrukte	84
III.10	Zelluläre Lokalisation der verwendeten C-terminal variierten CD4-TM1 _{Pen2} -Konstrukte	85
III.11	CLUSTAL W (1.83) Alignment von Pen2-Homologen verschiedener Spezies	86
III.12	Zelluläre Lokalisation des CD4-TM1 _{Pen2} N33L-Konstrukts	88
III.13	Deglykosylierungsverhalten von CD4, CD4-TM1 _{Pen2} N33L, und CD4-TM1 _{Pen2}	89
III.14	Ergebnisse der FASTA-Suche nach dem Pen2-Retentionssignal	90
III.15	Schematische Darstellung des (GFP-)Pen2-TM1 _{mut} -Konstrukts	91
III.16	Transiente Expression von GFP-Pen2 und GFP-Pen2-TM1 _{mut} in Sw-Zellen	91
III.17	Mutation des konservierten Asparaginrestes innerhalb des Retentionssignals führt zu vermehrtem Export von GFP-Pen2	93
III.18	Nct, Presenilin N- oder C-Terminus und Pen2 interagieren nicht mit CD4-TM1 _{Pen2}	94
III.19	Vielfältige biochemische Phänotypen in Sw-Zellen nach Mutation der TM1 von Pen2	96
III.20	Herabgesetzte Maturierung des γ -Sekretase-Komplexes in Sw-Zellen nach Mutation der TM1 von Pen2	99
IV.1	Schematische Darstellung des ER-Retentions-Signals im Gesamtkontext des Pen2-Proteins	103
IV.2	Schematisches Modell des Assemblierungsprozesses der γ -Sekretase unter Berücksichtigung der hier präsentierten Ergebnisse	114

VII.3 TABELLENVERZEICHNIS

	Seite
Tab. II.1 Übersicht der verwendeten Vektorsysteme	42
Tab. II.2 Im Labor bereits vorhandene Konstrukte	42
Tab. II.3 Zusammenstellung der hergestellten DNA-Konstrukte	43
Tab. II.4 Zusammenstellung der verwendeten PCR-Oligonukleotide und der entsprechenden cDNA-Matrizes	44
Tab. II.5 Zelllinien	56
Tab. II.6 Primäre monoklonale Antikörper	60
Tab. II.7 Primäre polyklonale Antikörper	61
Tab. II.8 Sekundäre Antikörper	62
Tab. II.9 Zusammensetzung der jeweiligen SDS-Minigele	68

VII.5 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Johanna Charlotte Scheuermann, geboren am 20.01.1982 in Starnberg

Ausbildung

- seit Mai 2006 Forschung zur zweiten Promotionsarbeit (PhD), Genome Biology Programme und Developmental Biology Programme des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Heidelberg
- Mai 2006 Approbation als Ärztin
- Dezember 2005 Dritte Ärztliche Prüfung (Note 1,0 – Gesamtnote aller ärztlichen Examina 1,66)
- November 1999 bis Dezember 2005 Humanmedizinstudium an der TU (bis 2001) und LMU München mit Aufenthalten an der Harvard Medical School in Boston (2005) und der Université Pierre et Marie Curie in Paris (2004/2005)
- 2002 bis 2004 Promotionsstudiengang Molekulare Medizin der LMU
- 1992 bis 1999 Gymnasium Tutzing (Überspringen einer Jahrgangsstufe 1994 und 1996), Abiturnote 1,0

Stipendien

- seit 2006 Promotionsstipendium des EMBL
- 2005 Auslandsstipendium der Munich-Harvard Alliance der Medizinischen Fakultät der LMU
- 2003 bis 2004 Stipendium des Promotionsstudiengangs Molekulare Medizin, Förderprogramm für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der LMU
- 2000 bis 2005 Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes

VII.5 SCHRIFTENVERZEICHNIS

Kaether C., J. Scheuermann, M. Fassler, S. Zilow, K. Shirotani, C. Valkova, B. Novak, S. Kacmar, H. Steiner, and C. Haass.

Endoplasmic reticulum retention of the γ -secretase complex component Pen2 by Rer1.

EMBO rep. 8:743-748. 2007.

Fassler M., M. Zocher, S. Klare, A.G. de la Fuente, J. Scheuermann, A. Capell, C. Haass, C. Valkova, A. Veerappan, D. Schneider, and C. Kaether.

Masking of transmembrane-based retention signals controls ER export of gamma-secretase.

Traffic 11:250-258. 2010. Epub 2009 5 November.

J.C. Scheuermann, A. Gaytán de Ayala Alonso, K. Oktaba, N. Ly-Hartig, R.K. McGinty, S. Fraterman, M. Wilm, T.W. Muir, and J. Mueller.

Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB.

Nature - accepted 25 February 2010.

VII.6 DANK

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Christian Haass - für die freundliche Überlassung des Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung und die großartige fachliche und persönliche Unterstützung und Beratung. Seine Begeisterung für Wissenschaft ist in großem Maße ansteckend für mich gewesen.

Ganz herzlichen Dank an meinen Betreuer Dr. Christoph Kaether, auf dessen Ideen diese Arbeit basiert. Seine große Hilfsbereitschaft und sein enormes Wissen besonders in allen Fragen der Mikroskopie haben diese Arbeit ermöglicht und bereichert. Danke für alle Gespräche, die freundschaftliche Atmosphäre und den großen Spaß, den ich in seinem Labor (dem „zweiten Zuhause“) hatte.

Herrn Professor Dr. Jürgen Heesemann möchte ich als Vorsitzendem des Programms FöFoLe (Förderung, Forschung und Lehre) der Medizinischen Fakultät der LMU für die Förderung danken, die ich im Rahmen des Promotionsstudiengangs Molekulare Medizin erfahren konnte. Die Zusatzveranstaltungen und Statusseminare waren für mich ein großer Gewinn. Außerdem danke ich ihm herzlich für seine persönliche Unterstützung und die Ermunterung zu einer grundlagenwissenschaftlichen Tätigkeit.

Dank für fruchtbare Diskussionen und Hilfe aller Art gilt all meinen ehemaligen Laborkollegen, insbesondere Dr. Dieter Edbauer, PD Dr. Regina Fluhrer, Dr. Stefanie Neumann, Prof. Dr. Harald Steiner, PD Dr. Stefan Lichenthaler, Dr. Keiro Shirovani, Dr. Anja Capell, Dr. Michael Willem, Bozo Novak und Hartmut Kaiser.

Es gibt eine Reihe weiterer Personen, die mir den Start in die Wissenschaft durch ihre Förderung und Ermunterung direkt oder indirekt erleichtert haben, hierzu gehören Prof. Dr. Tom Aretz (Harvard Medical School), Prof. Dr. Davor Solter (MPI für Immunbiologie, Freiburg), Prof. Dr. Michael Hallek (LMU München, jetzt Universität Köln), Dr. Grace Wei (MPI für Immunbiologie, Freiburg, jetzt UCSF, San Francisco), Dr. Ulrike Leser (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg), Fr. Brigitte Schönhofer-Czech, Hr. Werner Hoffmann und Hr. Norbert Kloyer (alle Gymnasium Tutzing).

Die Studienstiftung des deutschen Volkes und insbesondere mein ehemaliger Vertrauensdozent, Prof. Dr. August König, haben mir einerseits durch ihre Förderung, andererseits durch Hilfe und Ratschläge in vielen wichtigen Studien- und Promotionsfragen entscheidende Impulse gegeben, auch dafür bin ich sehr dankbar.

Bei allen Freunden und Verwandten möchte ich mich herzlich für ihre unschätzbare Unterstützung und ihr Verständnis bedanken. Ein ganz besonders großes und herzliches Danke dafür geht an Antje.

Meine Großeltern haben mir wichtige Eindrücke und Einstellungen vermittelt, die man als Mensch und Wissenschaftler braucht und haben so zu vielem beigetragen, was für diese Arbeit wichtig war.

Meine Eltern haben mich stets gefördert und mir zahllose Erfahrungen ermöglicht, die wesentlich für die Entwicklung meiner Interessen und für meine Entscheidungen waren. Für ihre weise und liebevolle Unterstützung und Geduld bin ich ihnen dankbar. Und dafür, dass sie mir schon im Kindergartenalter gezeigt haben, wie bemerkenswert Pantoffeltierchen und Amöben sind - zum Beispiel. Ohne meine Eltern wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Endoplasmic reticulum retention of the γ -secretase complex component Pen2 by Rer1

Christoph Kaether^{1,2+}, Johanna Scheuermann¹, Matthias Fassler², Sonja Zilow¹, Keiro Shirotani¹, Christina Valkova², Bozidar Novak¹, Slavomir Kacmar², Harald Steiner¹ & Christian Haass¹

¹Laboratory for Alzheimer's and Parkinson's Disease Research, Department of Biochemistry, Center For Integrated Protein Science Munich and Adolf-Butenandt-Institute, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany, and ²Leibniz Institute for Age Research-Fritz Lipmann Institute, Jena, Germany

γ -Secretase is involved in the production of amyloid β -peptide, which is the principal component of amyloid plaques in the brains of patients with Alzheimer disease. γ -Secretase is a complex composed of presenilin (PS), nicastrin, anterior pharynx-defective phenotype 1 (Aph1) and PS enhancer 2 (Pen2). We previously proposed a mechanism of complex assembly by which unassembled subunits are retained in the endoplasmic reticulum (ER) and only the fully assembled complex is exported from the ER. We have now identified Retention in endoplasmic reticulum 1 (Rer1) as a protein that is involved in the retention/retrieval of unassembled Pen2 to the ER. Direct binding of unassembled Pen2 to Rer1 is mediated by the first transmembrane domain of Pen2, and a conserved asparagine in this domain is required. Down-regulation of Rer1 leads to increased surface localization of Pen2, whereas overexpression of Rer1 stabilizes unassembled Pen2. To our knowledge, Rer1 is the first identified interaction partner of mammalian transmembrane-based retention/retrieval signals.

Keywords: Alzheimer disease; γ -secretase; ER retention; ER retrieval; Pen2

EMBO reports (2007) 8, 743–748. doi:10.1038/sj.embor.7401027

INTRODUCTION

γ -Secretase is one of two proteases involved in the production of amyloid β -peptide, which is the principal component of amyloid plaques in the brains of patients with Alzheimer disease. γ -Secretase is a high-molecular-weight complex composed of presenilin (PS) 1 or PS2, nicastrin (Nct), anterior pharynx-defective phenotype 1 (Aph1) and PS enhancer 2 (Pen2; for a review, see Haass, 2004).

¹Laboratory for Alzheimer's and Parkinson's Disease Research, Department of Biochemistry, Center For Integrated Protein Science Munich and Adolf-Butenandt-Institute, Ludwig-Maximilians-Universität, München 80336, Germany

²Leibniz Institute for Age Research-Fritz Lipmann Institute, Jena 07743, Germany

+Corresponding author. Tel: +49 3641 656 230; Fax: +49 3641 656 335;

E-mail: ckaether@fli-leibniz.de

Received 8 January 2007; revised 1 June 2007; accepted 4 June 2007;
published online 6 July 2007

γ -Secretase assembles in the endoplasmic reticulum (ER; Kim *et al*, 2004; Capell *et al*, 2005), but how the complex is assembled and transported to the plasma membrane is not fully understood. We recently proposed a model for γ -secretase complex assembly and transport (Kaether *et al*, 2004, 2006). According to this model, the assembly of γ -secretase is controlled by mechanisms similar to those that mediate the assembly of ion channels and multimeric cell-surface receptors. Here, control mechanisms ensure that only fully assembled complexes leave the ER and travel to the plasma membrane. Retention—we use the term retention for retention, retrieval or a combination of both—of unassembled subunits is achieved by exposing ER-retention signals that can be cytosolic (Zerangue *et al*, 1999) or within transmembrane domains (TMDs; Bonifacino *et al*, 1991). After complex assembly, these retention signals are masked and ER export is permitted. As predicted from this model, a new type of ER-retention signal was identified in the carboxyl terminus of PS1 (Kaether *et al*, 2004). However, at present, the cellular mechanism by which unassembled γ -secretase complex components are retained in or retrieved to the ER is not known. Retention in endoplasmic reticulum 1 (Rer1p) is a 22-kDa yeast protein involved in the retrieval of several ER-localized proteins and in the retrieval of unassembled subunits of multimeric complexes (Sato *et al*, 2003). Its mammalian homologue might be a candidate for ER retention/retrieval of unincorporated γ -secretase complex components. Rer1p is predicted to have a W-shaped topology with four TMDs, and amino and C termini located in the cytosol (Boehm *et al*, 1994), and recognizes polar amino acids in TMDs (Sato *et al*, 2003). Such TMD-based retention signals have also been described for several subunits of mammalian multimeric complexes (Bonifacino *et al*, 1991; Reth *et al*, 1991; Hennecke & Cosson, 1993), but no interaction partners or molecular machinery have been described. A human homologue of Rer1p was shown to rescue a yeast strain defective in Rer1p (Füllekrug *et al*, 1997), but its function in mammalian cells has not been described so far.

We have now investigated ER retention of Pen2 and shown that human Rer1 is involved in this process by binding to a signal in the first TMD (TM1) of Pen2.

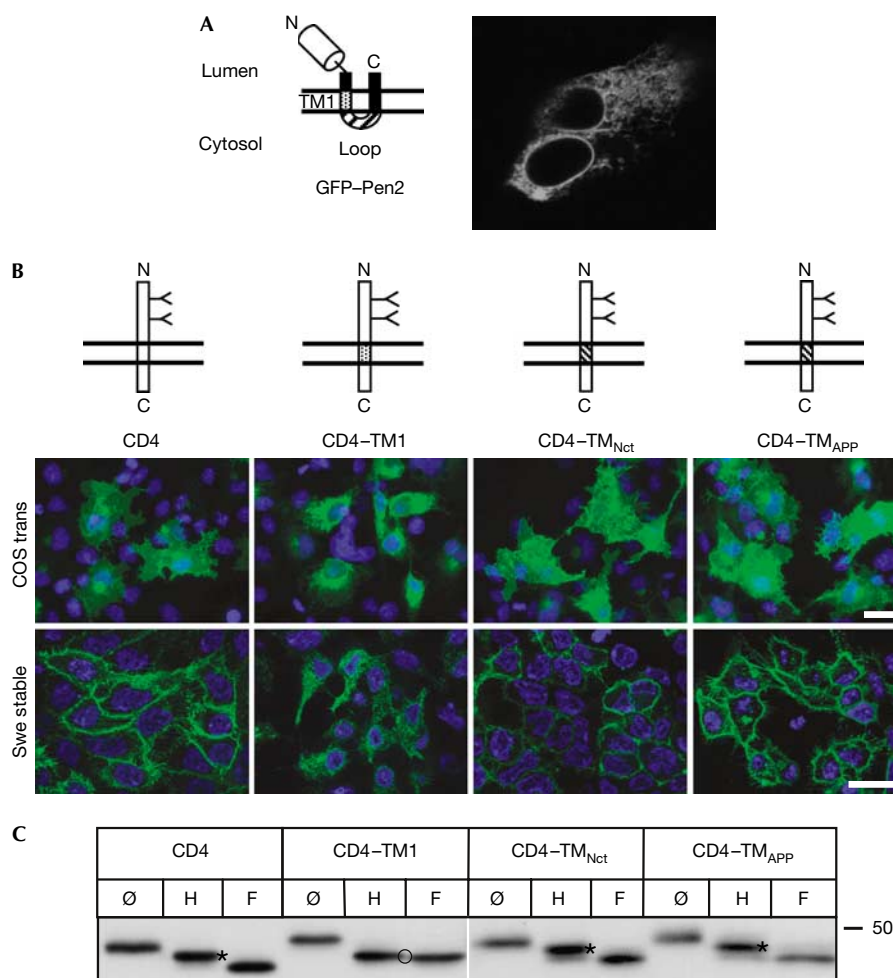


Fig 1 | The first transmembrane domain of Pen2 contained an endoplasmic reticulum-retention signal. (A) GFP-Pen2 topology (left) and confocal image of living cells transiently expressing GFP-Pen2 (right). (B) CD4 constructs were used to determine ER-retention signals. The two N-glycosylation sites in CD4 are indicated. Transiently transfected COS cells or Swe cells stably expressing the indicated constructs were processed for immunofluorescence with CD4 antibodies. Images were exposed and processed identically. For Swe cells, single confocal-like apotome sections are shown, resulting in a ring-like plasma membrane-staining. (C) Deglycosylation experiments confirmed ER retention of the CD4-TM1 construct. Lysates of Swe cells stably expressing CD4 variants, as indicated, were immunoprecipitated with CD4 antibodies (circle with a slash), or immunoprecipitated and digested with endoH (H) or N-glycosidase F (F). Asterisks, EndoH resistant, indicating transport through the Golgi; circle, EndoH sensitive, indicating ER retention. The white line indicates assembly from different areas of the blot. APP, amyloid precursor protein; CD4, cluster of differentiation 4; endoH, endoglycosidase H; ER, endoplasmic reticulum; GFP, green fluorescent protein; Nct, nicastrin; Pen2, presenilin enhancer 2; TM1, first TMD of Pen2; TMD, transmembrane domain.

RESULTS AND DISCUSSION

The TM1 of Pen2 contains an ER-retention motif

First, we confirmed that unassembled Pen2 localized to the ER. For this, we transiently overexpressed a green fluorescent protein (GFP)-Pen2 fusion protein (Fig 1A) in human embryonic kidney 293 cells (HEK293). This showed prominent ER staining, consistent with previous findings (Fig 1A; Bergman *et al*, 2004; Crystal *et al*, 2004). Then, the domains in Pen2 that are responsible for its ER retention were identified by using cluster of differentiation 4 (CD4), a type I reporter protein previously used to identify ER-retention signals (Zerangue *et al*, 1999; Kaether *et al*, 2004). Consistent with previous results (Zerangue *et al*, 1999; Kaether *et al*, 2004), transient expression of CD4 in COS

cells or stable expression in HEK293 Swe cells led to the accumulation of the protein in the plasma membrane (Fig 1B). Addition of the Pen2 intracellular loop to the C-terminus of CD4 had no effect on localization, as the protein was efficiently transported to the plasma membrane (data not shown). Swapping the second TMD of Pen2 in tumour necrosis factor (TNF) α , a type II reporter, did not prevent the protein from leaving the ER (supplementary Fig 1 online). By contrast, when the CD4 TMD was replaced by the TM1 of Pen2, the resulting construct CD4-TM1 showed prominent ER staining in transiently transfected COS and stably transfected Swe cells, suggesting that TM1 mediates ER retention (Fig 1B). ER localization of CD4-TM1 was not due to misfolding, destruction of an ER-export motif or other motif

important for cell surface localization of CD4, as insertion of the TMD of Nct or amyloid precursor protein (APP) did not lead to ER retention of CD4 (Fig 1B, for CD4-TM_{Nct}; see also Capell *et al*, 2005). Further evidence of ER retention of CD4-TM1 was obtained by deglycosylation experiments (Fig 1C). Similarly to CD4, CD4-TM_{Nct} and CD4-TM_{APP} were endoglycosidase H (endoH) resistant, indicating transport to the late Golgi and beyond. By contrast, CD4-TM1 remained endoH sensitive, confirming that it did not reach late Golgi compartments (Fig 1C). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of HEK cells stably expressing CD4 variants was used as an additional method for demonstrating selective retention of CD4-TM1. Cells were labelled with CD4 antibodies with or without permeabilization, sorted with FACS and then the fraction of plasma membrane-localized antigen against total CD4 antigen was determined. In the case of CD4, CD4-TM_{Nct} and CD4-TM_{APP}, 71 ± 2%, 67 ± 3% and 73% of total CD4 antigen were at the plasma membrane, respectively, showing efficient plasma membrane transport. By contrast, CD4-TM1-expressing cells had only 14 ± 1% of total CD4 antigen at the plasma membrane, showing efficient intracellular retention and fully corroborating the results from the immunofluorescence and deglycosylation experiments. Together, these data show that the TM1 of Pen2 is sufficient to mediate ER retention of a reporter protein.

The distal part of TM1 mediates ER retention

To specify further the domain important for the retention of CD4-TM1, we replaced parts of the CD4 TMD with corresponding parts of the Pen2 TM1 (schematized in supplementary Fig 1 online). CD4 variants were transfected in COS cells and the subcellular distribution of the fusion proteins was analysed by immunofluorescence. Only the C-terminal part of TM1 retained the corresponding CD4 construct in the ER (supplementary Fig 1 online).

An asparagine in TM1 is part of an ER-retention signal

Charged or polar amino acids in TMDs have been shown to be crucially involved in ER retention (Bonifacino *et al*, 1991; Sato *et al*, 2003). The TM1 of Pen2 contains an asparagine (N) in the domain responsible for ER retention, which is highly conserved across species. To test the involvement of this polar amino acid in ER retention, we mutated it to leucine (L) in CD4-TM1 and analysed the subcellular distribution of the mutant by immunofluorescence and deglycosylation experiments. Mutation of N to L partly destroyed the ER-retention motif, as shown by immunofluorescence (Fig 2A). This was confirmed by deglycosylation experiments showing equal amounts of endoH-resistant and nonresistant CD4-TM1_{N/L}, in contrast to the fully endoH-sensitive CD4-TM1 (Fig 2A). This indicates that the conserved N residue is important but not fully sufficient for ER retention.

Retention of CD4-TM1 is mediated by Rer1

The yeast protein Rer1p was shown to mediate ER retention of proteins by binding to polar amino acids within TMDs (Sato *et al*, 2003). To test whether its human homologue Rer1 is involved in the retention of CD4-TM1, we stably expressed V5-tagged human RER1 together with CD4 variants and carried out co-immunoprecipitation experiments (Fig 2B). CD4-TM1 co-precipitated with Rer1, whereas CD4 alone or CD4-TM1_{N/L} did not co-precipitate with Rer1. This suggests that Rer1 binds to CD4-TM1 and that this

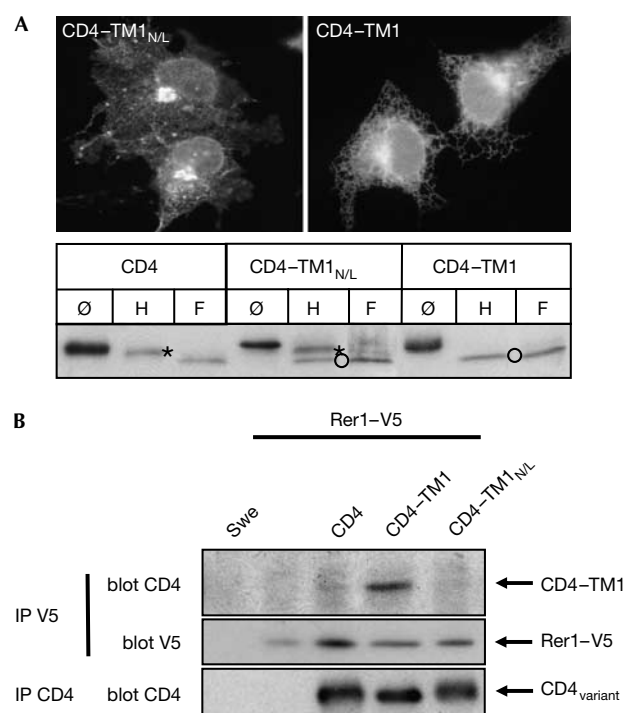


Fig 2 | Rer1 retained CD4-TM1 in the endoplasmic reticulum.

(A) Retention of CD4-TM1 was dependent on a crucial asparagine in TM1. COS cells were transiently transfected with CD4-TM1_{N/L} or CD4-TM1 and processed for CD4 immunofluorescence. Deglycosylation experiments verified partial destruction of the ER-retention motif in CD4-TM1_{N/L}. Cell lysates of Swe cells stably expressing the indicated constructs were treated as in Fig 1C. Asterisks, endoH resistant; circles, endoH sensitive. (B) Rer1 bound to CD4-TM1 is dependent on the asparagine within TM1. CHAPSO cell lysates from Swe cells and Swe cells stably expressing Rer1-V5 alone or together with CD4 variants were immunoprecipitated with a V5 antibody and blotted as indicated. Expression of CD4 variants was analysed by IP, followed by western blot using CD4 antibodies. CD4, cluster of differentiation 4; endoH, endoglycosidase H; F, N-glycosidase F; IP, immunoprecipitation; L, leucine; N, asparagine; Pen2, presenilin enhancer 2; TM1, first TMD of Pen2; TMD, transmembrane domain.

is dependent on the crucial asparagine in TM1. To test directly whether endogenous Rer1 is involved in ER retention of CD4-TM1, we used short interfering RNA (siRNA) and FACS analysis to investigate the plasma membrane localization of CD4 variants. Cells stably expressing CD4, CD4-TM1 or CD4-TM_{Nct} were transfected with Rer1 or control siRNA and collected at different time points. We verified that Rer1 was efficiently downregulated on Rer1 siRNA treatment, but not by using control siRNA (Fig 3A). CD4 surface labelling was determined with FACS, and the relative changes in surface labelling between Rer1 and control transfected cells were determined at each time point for each cell line (Fig 3B). Downregulation of Rer1 did not affect the secretory pathway, as transport of CD4 and CD4-TM_{Nct} to the plasma membrane was not significantly affected (Fig 3B). By contrast, in cells transfected with Rer1 siRNA, an 80% increase in CD4-TM1 plasma membrane staining was observed after 24 h. This increased

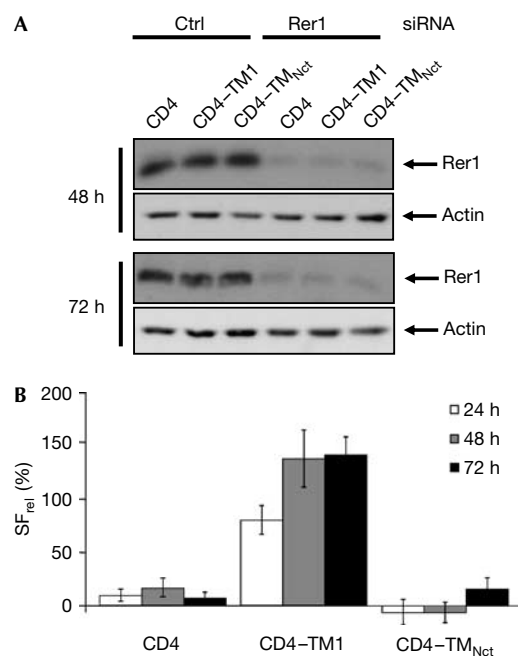


Fig 3 | Endogenous Rer1 was involved in the retention of CD4-TM1. (A) Cells stably expressing the indicated CD4 variant were transfected with siRNA, lysed after the indicated time points and blotted for Rer1 and actin as a loading control. Rer1 is significantly downregulated in Rer1 but not control (Ctrl) siRNA-transfected cells. (B) Cells from (A) were analysed by fluorescence-activated cell sorting after the indicated time points using CD4 antibodies. The ratio of surface labelling of control and Rer1 siRNA-transfected cells (SF_{rel}) is shown, where 0% indicates no change in surface staining between Rer1 and control siRNA-transfected cells. Note that absolute surface levels between CD4- and CD4-TM1-expressing cells differ strongly, as 86% of CD4-TM1 is retained intracellularly, whereas 71% of CD4 is at the plasma membrane. CD4, cluster of differentiation 4; Nct, nicastrin; Pen2, presenilin enhancer 2; siRNA, short interfering RNA; TM1, first TMD of Pen2; TMD, transmembrane domain.

to 137% after 48 h and 141% after 72 h (Fig 3B). These data strongly indicate that Rer1 is involved in ER retention of CD4-TM1.

Rer1 selectively binds to unassembled Pen2

Next, we wanted to test whether Rer1 would also bind to Pen2 itself. Rer1-V5 was stably expressed together with the N-terminally Myc-tagged Pen2 or Pen2_{N/L}. Both variants assembled into a functional γ -secretase complex, indicating correct folding and function (supplementary Fig 2D online and data not shown). Co-immunoprecipitation experiments indicated that Rer1 bound to Pen2 dependent on the crucial asparagine in TM1 (Fig 4A), validating the data obtained with the CD4 reporter protein. To analyse whether Rer1 binds to γ -secretase complex-assembled or unassembled Pen2, co-immunoprecipitations were carried out in cells stably expressing Rer1-V5 and Myc-Pen2 variants (Fig 4B). Immunoprecipitation with a V5 antibody precipitated Pen2, but not Nct, Aph1a or PS1, the other γ -secretase complex components, indicating that Rer1V5 binds to only unassembled Pen2 (Fig 4B). By contrast, immunoprecipitation with a Myc antibody co-precipitated Myc-Pen2 together with mature Nct, Aph1 and

PS1 (Fig 4B). These data showed that there was a fraction of Myc-Pen2 in the cell assembled into a γ -secretase complex and not binding to Rer1, and another fraction that was unassembled and bound Rer1. Unassembled Pen2_{N/L}, which is not able to bind to Rer1 (Fig 4A), is expected to escape the ER-retention mechanism and to accumulate at the plasma membrane. Indeed, stably expressed GFP-tagged Pen2 accumulated 1.6 times more at the plasma membrane when the crucial asparagine in TM1 was mutated, supporting the data obtained with the CD4 variants (supplementary Fig 2A,C online).

In cells stably overexpressing Rer1, endogenous levels of Pen2 were increased (Fig 4C), whereas levels of Pen2 messenger RNA were unchanged (Fig 4D), indicating stabilization of unassembled Pen2 by binding to Rer1 and confirming an interaction of the two proteins. The levels of mature Nct, PS1 fragments and Aph1a, indicative of the total amount of mature γ -secretase complex, were unchanged, further supporting the data that Rer1 selectively interacts with unassembled Pen2 (Fig 4C). We noted that, on overexpression of Rer1, the immature/mature Nct ratio consistently changed towards mature Nct, the complex assembled form (Fig 4C). This might be a consequence of the increased Pen2 levels, which might increase γ -secretase assembly and export out of the ER. Indeed, Pen2 was shown to be rate limiting for γ -secretase complex assembly (Kimberly et al, 2003; Takasugi et al, 2003).

Together, these data indicate that unassembled Pen2 is retained/retrieved in the ER by Rer1, a process that requires a crucial asparagine in the TM1 of Pen2. Rer1 specifically binds to and retains unassembled Pen2, supporting our hypothesis that a quality control system ensures that only fully assembled γ -secretase complex—but not unassembled subunits—can leave the ER. Furthermore, we identify Pen2 as the first substrate of mammalian Rer1, opening the possibility to study previously uncharacterized ER-retention mechanisms governed by TM-based retention signals.

METHODS

Antibodies and cell lines. Nct, Aph1a, PS1 N- and C-terminal fragment, GFP and CD4 were detected as described previously (Kaether et al, 2004). For FACS sorting, CD4-APC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) was used. For the detection of Myc-tagged Pen2 and haemagglutinin (HA)-tagged TNF α , monoclonal 9E10 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and anti-HA (Sigma) were used, respectively. Rer1 was detected using a custom-made affinity-purified polyclonal anti-serum against the C terminus of human Rer1 (Eurogentec, Seraing, Belgium). HEK293 cells stably expressing Swedish mutant APP (Swe) were described previously (Citron et al, 1992).

Complementary DNA constructs and transfections. Human RER1 was amplified from a brain cDNA library, by using standard PCR and appropriate primers that allowed subcloning into pcDNA6/V5-His (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). TNF α -HA was obtained from S. Lichtenthaler and CD4-TM_{Nct} from A. Capell (Capell et al, 2005). For siRNA approaches, a mixture of four siRNA duplexes against Rer1 and control siRNA (both from Dharmacon, Lafayette, CO, USA) were transfected by using Amaxa nucleofector technology. CD4 and TNF α fusion constructs were cloned by using standard molecular cloning techniques and pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen). Amino-acid sequences of TMDs

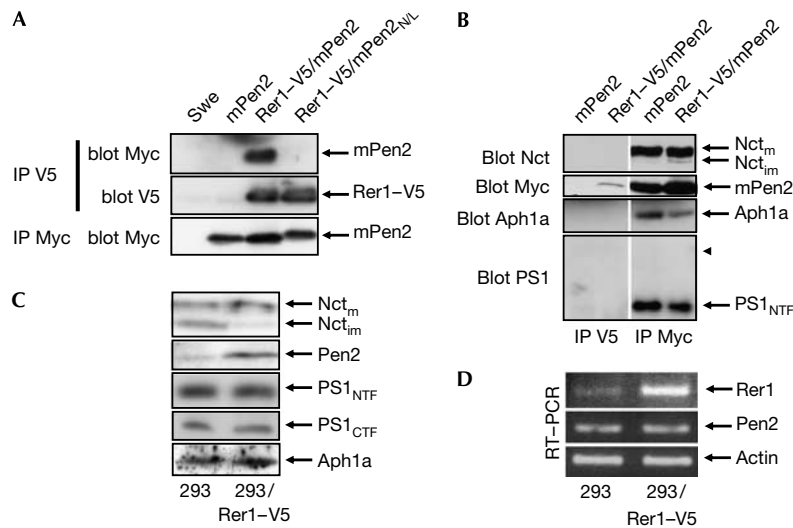


Fig 4 | Rer1 selectively bound to unassembled Pen2 and retained it in the endoplasmic reticulum. (A) Rer1 immunoprecipitated Pen2 dependent on the asparagine within TM1. Lysates from Swe cells and Swe cells stably expressing the indicated proteins were immunoprecipitated with the V5 antibody and blotted as indicated. Expression of mPen2 variants was analysed by IP/blot using Myc antibodies. Note that Pen2_{N/L} has a slower mobility compared with Pen2. (B) Rer1 bound to unassembled Pen2. Lysates from Swe cells stably expressing Myc-tagged Pen2 (mPen2) alone or together with Rer1-V5 were immunoprecipitated with a V5 antibody and subsequently with Myc antibodies and blotted for Nct, PS1, Aph1a and Myc. The arrowhead indicates the position of the PS1 holoprotein, not present in both co-immunoprecipitations. The white line indicates the assembly from different areas of the blot. (C) Rer1-V5 stabilizes endogenous Pen2. Membrane preparations of HEK293 cells and HEK293 cells overexpressing Rer1-V5 were probed for Nct, Pen2, PS1_{NTF}, PS1_{CTF} and Aph1a. (D) RT-PCR of cells with or without stably expressing Rer-V5 was carried out for actin, Rer1 and Pen2 messenger RNA. Aph, anterior pharynx-defective phenotype; CTF, C-terminal fragment; HEK293, human embryonic kidney 293 cells; IP, immunoprecipitation; subscript im, immature; L, leucine; subscript m, mature; mPen2, Myc-Pen2; N, asparagine; Nct, nicastrin; NTF, N-terminal fragment; Pen2, PS enhancer 2; PS, presenilin; TM1, first TMD of Pen2; TMD, transmembrane domain.

and adjacent domains are shown in supplementary Fig 1A online. Mutations were introduced using the QuikChange site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). N-terminally tagged Myc-Pen2 and GFP-Pen2 were cloned using PCR and pCMV-Myc and pEGFP-C1, respectively (both Clontech, Mountain View, CA, USA). Cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Pen2 variants were stably expressed in HEK293 cells stably expressing Pen2 siRNA (Prokop *et al*, 2004). Primer sequences and cloning details are available on request.

Co-immunoprecipitation. Co-immunoprecipitation was carried out from cell lysates extracted in 2% CHAPSO/citrate (pH 6.4) and protease inhibitor mix with antibodies as indicated. Immunoprecipitated proteins were separated on 8% or 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gels, 11% urea gels or 10–20% Tris-tricine gels (Invitrogen), and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were cut at appropriate positions and blotted with antibodies as indicated.

Deglycosylation and cell surface biotinylation. Deglycosylation and cell surface biotinylation experiments were carried out as described previously (Kaether *et al*, 2002). Total GFP-Pen2 (from direct lysate) and cell surface levels (from streptavidin precipitation) on western blots were quantified using a Fluorchem 4800 system (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA).

Fluorescence-activated cell sorting analysis. FACS analysis was carried out by using a BD FACSCalibur and standard protocols. The fractions of CD4 antigen at the plasma membrane against total were determined using a Cytotif/Cytoperm kit from BD

(Heidelberg, Germany) in three independent experiments. The relative increase in surface fluorescence after siRNA transfection was measured as follows. The amount of CD4 antigen at the plasma membrane was determined using FACS after control siRNA transfection (CD4_{ctrl}) and Rer1 siRNA transfection (CD4_{Rer1}). The relative increase was then calculated by CD4_{Rer1}/CD4_{ctrl}-1.

Microscopy. Immunofluorescence was carried out using standard protocols and Alexa 555- or 586-labelled secondary antibodies (Molecular Probes, Breda, The Netherlands). Microscopy and image acquisition was carried out as described previously (Kaether *et al*, 2004), with the modification that for some images a Zeiss Apotome was used (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Reverse transcription-PCR. Total RNA was isolated using NucleoSpin[®] RNAII (Macherey-Nagel, Düren, Germany). RT-PCR was carried out using the ThermoScript[™] RT-PCR system (Invitrogen) and primers specific for human Rer1, Pen2 and β -actin.

Supplementary information is available at *EMBO reports* online (<http://www.emboreports.org>).

Note added in proof. During the revision of this paper, a study suggesting a binding of Rer1 to Nct, but not to Pen2, was presented, a finding not supported by our data (Spasic *et al*, 2007).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Hans & Ilse Breuer Foundation for the confocal microscope, A. Capell for CD4-TM_{Nct} cDNA, S. Lichtenthaler for TNF α cDNA and S. Lammich for the brain cDNA library. This work was supported by the Molecular Medicine Program of the Medical Faculty

(FöFoLe) of the Ludwigs-Maximilians-Universität München (to J.S.) and grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (CIPSM to C.H., SFB596 to C.H. and H.S., and SFB604 to C.K.).

REFERENCES

- Bergman A, Hansson EM, Pursglove SE, Farmery MR, Lannfelt L, Lendahl U, Lundkvist J, Naslund J (2004) Pen-2 is sequestered in the endoplasmic reticulum and subjected to ubiquitylation and proteasome-mediated degradation in the absence of presenilin. *J Biol Chem* **279**: 16744–16753
- Boehm J, Ulrich HD, Ossig R, Schmitt HD (1994) Kex2-dependent invertase secretion as a tool to study the targeting of transmembrane proteins which are involved in ER→Golgi transport in yeast. *EMBO J* **13**: 3696–3710
- Bonifacino JS, Cosson P, Shah N, Klausner RD (1991) Role of potentially charged transmembrane residues in targeting proteins for retention and degradation within the endoplasmic reticulum. *EMBO J* **10**: 2783–2793
- Capell A, Beher D, Prokop S, Steiner H, Kaether C, Shearman MS, Haass C (2005) γ -Secretase complex assembly within the early secretory pathway. *J Biol Chem* **280**: 6471–6478
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature* **360**: 672–674
- Crystal AS, Morais VA, Fortna RR, Carlin D, Pierson TC, Wilson CA, Lee VM, Doms RW (2004) Presenilin modulates Pen-2 levels posttranslationally by protecting it from proteasomal degradation. *Biochemistry* **43**: 3555–3563
- Füllekrug J, Boehm J, Rottger S, Nilsson T, Mieskes G, Schmitt HD (1997) Human Rer1 is localized to the Golgi apparatus and complements the deletion of the homologous Rer1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Cell Biol* **74**: 31–40
- Haass C (2004) Take five-BACE and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation. *EMBO J* **23**: 483–488
- Hennecke S, Cosson P (1993) Role of transmembrane domains in assembly and intracellular transport of the CD8 molecule. *J Biol Chem* **268**: 26607–26612
- Kaether C, Lammich S, Edbauer D, Ertl M, Rietdorf J, Capell A, Steiner H, Haass C (2002) Presenilin-1 affects trafficking and processing of β AAP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J Cell Biol* **158**: 551–561
- Kaether C, Capell A, Edbauer D, Winkler E, Novak B, Steiner H, Haass C (2004) The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and γ -secretase activity. *EMBO J* **23**: 4738–4748
- Kaether C, Haass C, Steiner H (2006) Assembly, trafficking and function of γ -secretase. *Neurodegener Dis* **3**: 275–283
- Kim SH, Yin YI, Li YM, Sisodia SS (2004) Evidence that assembly of an active γ -secretase complex occurs in the early compartments of the secretory pathway. *J Biol Chem* **279**: 48615–48619
- Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003) γ -Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6382–6387
- Prokop S, Shirotani K, Edbauer D, Haass C, Steiner H (2004) Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the γ -secretase complex. *J Biol Chem* **279**: 23255–23261
- Reth M, Hombach J, Wienands J, Campbell KS, Chien N, Justement LB, Cambier JC (1991) The B-cell antigen receptor complex. *Immunol Today* **12**: 196–201
- Sato K, Sato M, Nakano A (2003) Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Mol Biol Cell* **14**: 3605–3616
- Spasic D, Raemaekers T, Dillen K, Declerck I, Baert V, Serneels L, Fullekrug J, Annaert W (2007) Rer1p competes with APH-1 for binding to nicastrin and regulates γ -secretase complex assembly in the early secretory pathway. *J Cell Biol* **176**: 629–640
- Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T (2003) The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex. *Nature* **422**: 438–441
- Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* **22**: 537–548

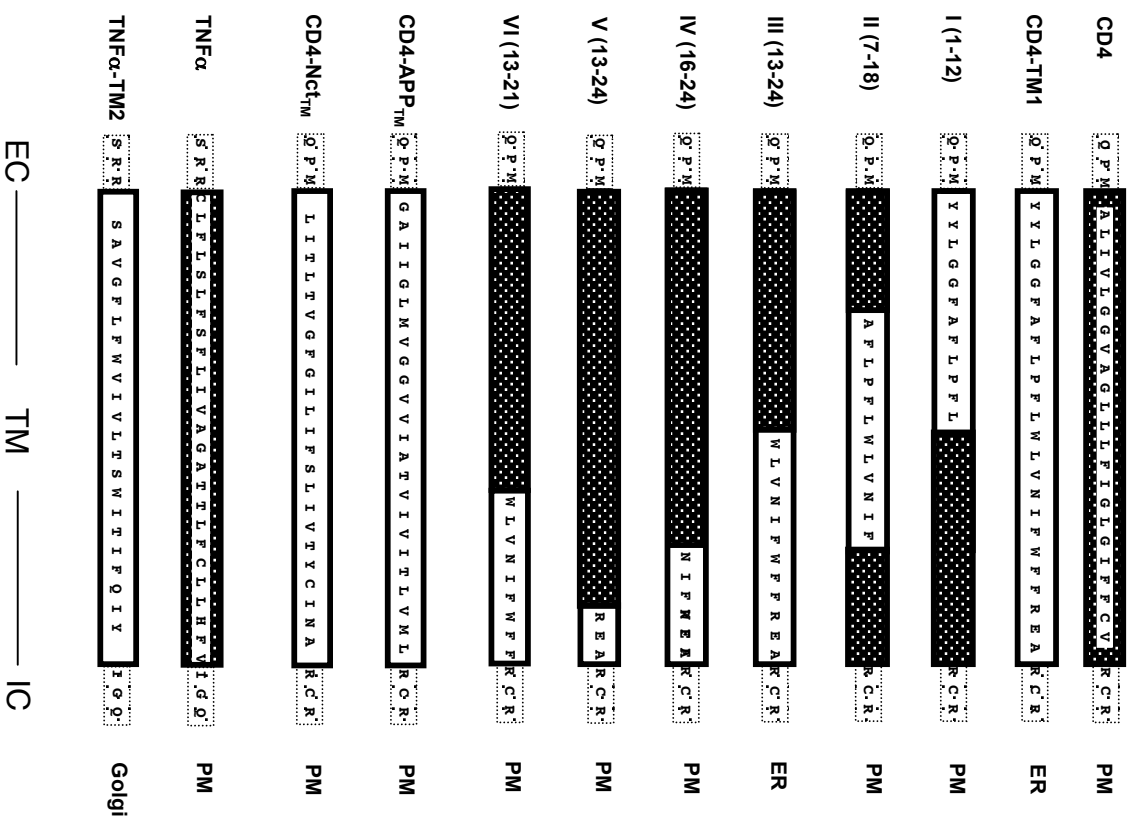
Supplemental data

Supplemental Fig. 1: ER-retention of Pen2 was mediated by the distal part of TM1. A) Scheme of the constructs used for determination of sorting signals in Pen2. Relevant amino acids are depicted. The dark box corresponds to CD4 or TNF α TMDs as indicated, the white blocks labels introduced amino acids derived from Pen2 or APP or Nct, as indicated. Dotted boxes refer to the flanking regions of the TMD at the N- and C-terminus, respectively. EC, extracellular domain, IC, intracellular domain. B) COS cells transiently transfected with the various constructs were processed for immunofluorescence using anti-CD4 antibodies or HA antibodies for TNF α -constructs (TNF α is HA-tagged at the C-term.). Only CD4-TM1 and construct III were retained/retrieved in the ER. TNF α -TM2 was clearly exported out of the ER and localized to the Golgi.

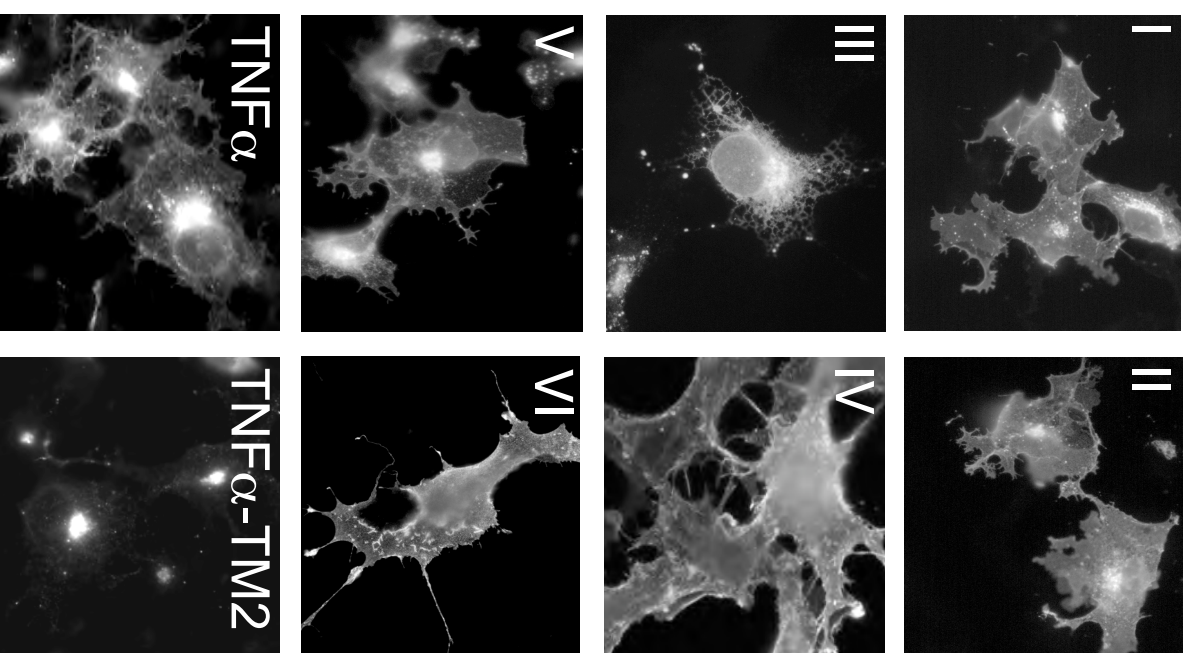
Supplemental Figure 2: Unassembled Pen2, which is deficient in Rer1 binding, escaped the retention machinery and was exported out of the ER. A) Living cells stably expressing GFP-Pen2 (GP2) or GP2_{N/L} were imaged by confocal microscopy. Note the increased surface staining (arrows) in GFP-Pen2_{N/L} expressing cells. When stably expressed, complex-associated GFP-Pen2 accumulates in endosomes/lysosomes and at the PM, similar to PS1-GFP (Kaether et al., 2002) and Nct-GFP (C.K., unpublished). The prominent ER staining seen in PS1-GFP expressing cells (Kaether et al., 2004; Kaether et al., 2002) is not observed in GFP-Pen2 stably expressing cells, presumably because most of the unassembled Pen2 is rapidly degraded (Bergman et al., 2004; Crystal et al., 2004). Both GFP-Pen2 and GFP-Pen2_{N/L} were expressed at similar levels as shown in the western blots below the images. Nct served as loading control. B) GFP-Pen2_{N/L} was at the plasma membrane as shown by the costaining of living cells with rhodamine-labeled wheat germ agglutinin (WGA). C) Cell surface biotinylation showed accumulation of GFP-Pen2_{N/L} on the PM. The amount of GFP-Pen2 on the PM was set to 1, and the amount of GFP-Pen2_{N/L} at the PM related to that (see

methods). Error bar indicate standard deviation, n=6 independent experiments. D) GFP-Pen2 and GFP-Pen2_{N/L} assembled in a γ -secretase complex and were fully functional. Swe cells, Swe cells stably expressing a Pen2 RNAi and Swe cells stably expressing Pen2 RNAi and GFP-Pen2 or GFP-Pen2_{N/L} were immunoprecipitated and blotted as indicated. Both Pen2 variants coprecipitated mature Nct and rescued Nct maturation and PS1 endoproteolysis, indicating full functionality. White lines indicate assembly of blot from different areas. The asterisk denotes an unspecific background band.

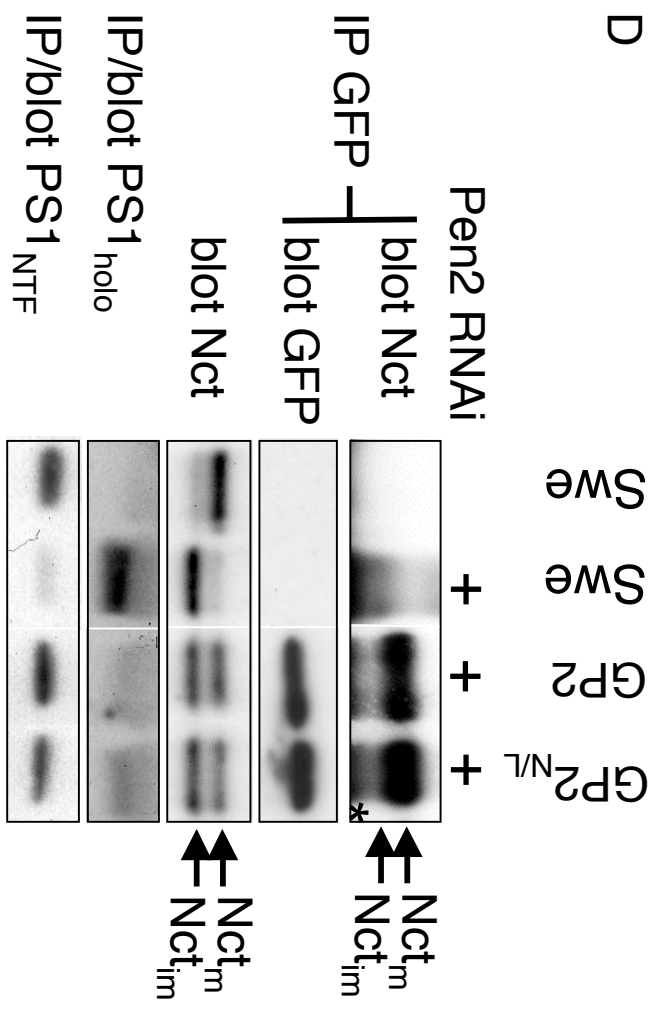
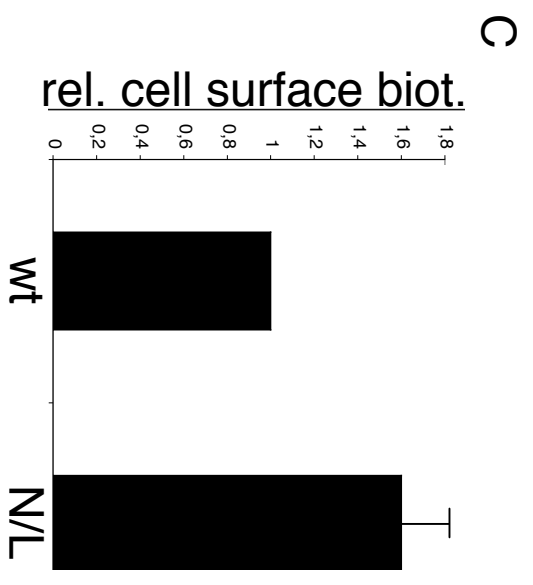
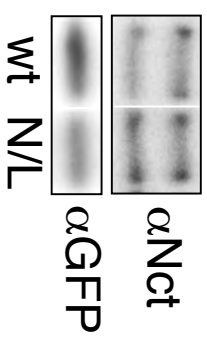
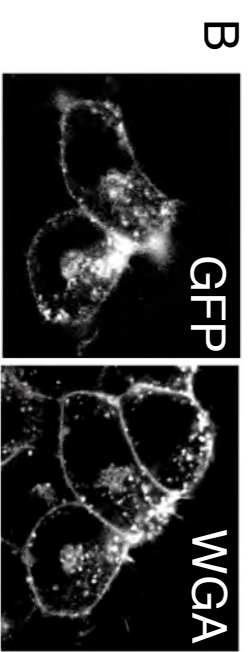
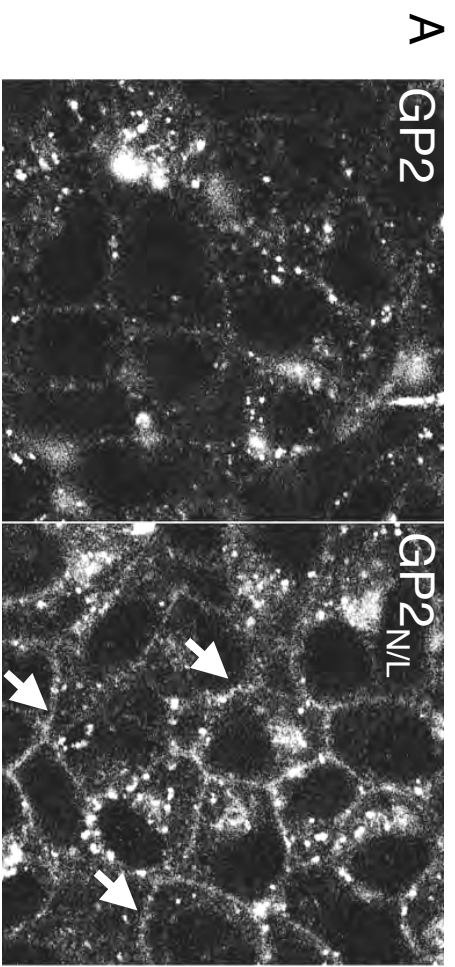
A



B



suppl. Fig. 1



Suppl. Fig. 2