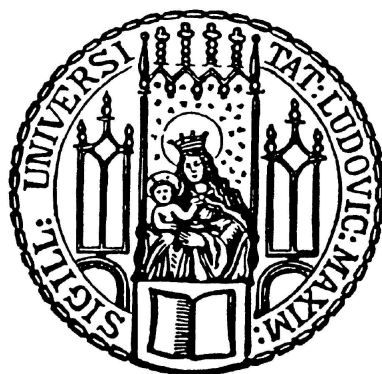


DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Untersuchungen zu Wirkungsweise und
molekularen Angriffszielen von
 γ -Sekretasemodulatoren als potentielle
Alzheimer Therapeutika



vorgelegt von

AMELIE EBKE,
geb. GUTSMIEDL
aus München
2012

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Harald Steiner betreut und von Frau PD Dr. Konstanze Winklhofer vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 16. Juli 2012

Amelie Ebke

Dissertation eingereicht am 17. Juli 2012
Erstgutachterin: PD Dr. Konstanze Winklhofer
Zweitgutachter: Prof. Dr. Harald Steiner
Mündliche Prüfung am 10. September 2012

**Erstzunehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei
Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.**

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929),
US-amerikanischer Ökonom und Soziologe

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden zum Teil in folgenden Publikationen veröffentlicht:

R.M. Page, **A. Gutsmedl**, A. Fukumori, E. Winkler, C. Haass, and H. Steiner. β -Amyloid precursor protein mutants respond to γ -secretase modulators. *J Biol Chem*, 285(23):17798-810, 2010.

A. Ebke, T. Luebbers, A. Fukumori, K. Shirotani, C. Haass, K. Baumann, and H. Steiner. Novel γ -secretase enzyme modulators directly target presenilin protein. *J Biol Chem*, 286(43):37181-6, 2011.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Die Alzheimer Erkrankung	5
1.1.1 Neuropathologische Merkmale	5
1.1.2 Die genetische Basis der Alzheimer Erkrankung	7
1.1.3 Die Amyloidkaskaden-Hypothese	8
1.2 Das Amyloidvorläuferprotein (APP)	9
1.3 Prozessierung des APP	11
1.3.1 α -Sekretase und α -Spaltung	12
1.3.2 β -Sekretase und β -Spaltung	13
1.3.3 γ -Sekretase und sequenzielles Spaltungsmodell	14
1.3.4 Einfluss der APP- β CTF-Dimerisierung auf die Spaltungsaktivität der γ -Sekretase	16
1.3.5 Abfolge und Lokalisation der APP-Spaltungsprozesse	17
1.4 Biochemie der γ -Sekretase	18
1.4.1 Komponenten des γ -Sekretasekomplexes	20
1.4.1.1 Presenilin (PS)	20
1.4.1.2 Nicastrin (NCT)	23
1.4.1.3 PEN-2	24
1.4.1.4 APH-1	24
1.4.2 Assemblierung des γ -Sekretasekomplexes	25
1.4.3 γ -Sekretase-Modulatorproteine	26
1.4.4 Substrate der γ -Sekretase	27
1.5 FAD-Mutationen und deren molekulare Mechanismen	28
1.6 Pharmakologische Manipulation der γ -Sekretaseaktivität	30
1.6.1 γ -Sekretaseinhibitoren (GSIs)	30
1.6.2 γ -Sekretasemodulatoren (GSMs)	33
1.6.3 Bindungsstellen und Wirkmechanismus von GSMs	35
1.7 Signalpeptidpeptidase (SPP) und homologe Proteasen	37
1.8 Zielsetzung der experimentellen Arbeit	38
2 Ergebnisse	39
2.1 Reaktion von APP-Substratmutanten auf GSM-Behandlung	39
2.1.1 Glycinmutanten in der G ₂₉ xxxG ₃₃ -Region des A β -Peptids sind überwiegend für GSM-Behandlung empfänglich	39
2.1.2 Die K28E-Mutante spricht auf GSM-Behandlung an	44
2.1.3 Für APP-FAD-Mutanten lässt sich A β ₄₂ im zellfreien System durch GSM-1-Behandlung senken	46
2.2 Charakterisierung der GSM-Klasse der Aminopyrimidine	47
2.2.1 Aminopyrimidin-Derivate sind potente GSMs im Zellkultursystem	47
2.2.2 RO-02 inhibiert die Produktion von NICD und AICD in Zellen nicht	49
2.2.3 Alle sechs γ -Sekretasekomplexe sprechen auf RO-02-Behandlung an	50
2.2.4 RO-02 ist im zellfreien System aktiv	52
2.3 Molekulare Angriffsziele der Aminopyrimidin-GSMs	54
2.3.1 RO-57-BpB als Werkzeug zur Charakterisierung der molekularen Angriffspunkte der Aminopyrimidin-GSMs	54

2.3.2	PS1- und PS2-NTF sind die molekularen Angriffsziele von RO-57-BpB . . .	57
2.3.3	APP ist kein Zielprotein von RO-57-BpB	60
2.3.4	SPP, SPPL2a und SPPL3 sind keine Zielproteine von RO-57-BpB	61
2.3.5	Kompetitionsstudien mit GSMs und GSIs deuten auf gemeinsame und überlappende Bindungsstellen hin	64
2.3.6	Das Kompetitionsverhalten von RO-53 deutet auf eine distinkte Bindungsstelle im γ -Sekretasekomplex hin	68
3	Diskussion	72
3.1	Dimerisierung des APP- β CTF als Modulator der γ -Sekretaseaktivität	72
3.2	GxxxG-Mutanten zeigen eine abgeschwächte Reaktion auf GSM-Behandlung . .	74
3.3	Die Wirksamkeit der NSAID-ähnlichen GSMs ist unabhängig von Lysin 28 der $A\beta$ -Domäne	75
3.4	Vergleich der Reaktion von APP- und PS-FAD-Mutanten auf GSM-Behandlung .	76
3.5	Charakterisierung der neuen GSM-Klasse der Aminopyrimidine	77
3.6	Das PS-NTF ist das Zielprotein der Aminopyrimidin-GSMs	77
3.7	Kompetitionsstudien geben Hinweise auf die Bindungsstelle von RO-57-BpB . . .	81
3.8	Mögliche Mechanismen der γ -Sekretasemodulation	85
3.9	Ausblick	87
4	Material und Methoden	90
4.1	Material	90
4.1.1	Geräte und Verbrauchsmittel	90
4.1.2	Reagenzien	92
4.1.3	GSIs und GSMs	94
4.1.4	Primer und Plasmide	95
4.1.5	Zelllinien	96
4.1.6	Antikörper	96
4.2	Methoden	98
4.2.1	Molekularbiologische Methoden	98
4.2.1.1	QuikChange-PCR	98
4.2.1.2	Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese und Aufrei- nigung von DNA-Fragmenten	99
4.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	99
4.2.1.4	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	99
4.2.1.5	Transformation von DNA in kompetente <i>E. coli</i>	100
4.2.1.6	Präparation von Plasmid-DNA	100
4.2.1.7	Sequenzierung	100
4.2.2	Zellkulturmethoden	100
4.2.2.1	Kultivierung von HEK293-Zellen	100
4.2.2.2	Transfektion	101
4.2.2.3	Behandlung mit GSIs und GSMs	101
4.2.3	Proteinbiochemische Methoden	102
4.2.3.1	Gesamtzellysat	103
4.2.3.2	Präparation von Membranfraktionen	103
4.2.3.3	Präparation von γ -Sekretase aus Membranfraktionen	104
4.2.3.4	Aktivitätsassay mit aufgereinigter und rekonstituierter γ -Sekretase .	105
4.2.3.5	Aktivitätsassay mit Membranfraktionen	106
4.2.3.6	Immunpräzipitation (IP) von $A\beta$	106
4.2.3.7	Proteinkonzentrationsbestimmung durch BCA	107
4.2.3.8	Photoaffinitätsmarkierungsassay mit RO-57-BpB	107

4.2.3.9	SDS-PAGE	108
4.2.3.10	Immunoblot	110
4.2.3.11	Elektrochemolumineszenz-Immunoassay zur Quantifizierung von A β	111
4.2.3.12	Massenspektrometrie	111
4.2.4	Statistik und Software	112
Literatur		113
IUPAC-Namen der verwendeten Substanzen		143
Abkürzungsverzeichnis		144
Danksagung		147
Lebenslauf		148
Publikationen		150

Zusammenfassung

Die Alzheimer Erkrankung ist weltweit die bedeutendste Demenzform und stellt neben dem individuellen Schicksalsschlag für jeden Betroffenen und dessen Familie auch eine große wirtschaftliche Belastung für die älter werdende Gesellschaft dar. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es aber keine zugelassene krankheitsmodulierende Therapie.

Behandlungsansätze konzentrieren sich auf das 42 Aminosäuren (AS) lange Amyloid β -Peptid ($A\beta_{42}$), das im Laufe der Krankheitsentstehung in den sog. Amyloidplaques aggregiert und als kausal für die Alzheimer Erkrankung angesehen wird. $A\beta$ entsteht aus dem Amyloidvorläuferprotein (APP, engl. *amyloid precursor protein*) durch die sequenzielle katalytische Aktivität der β - und γ -Sekretase, was die beiden Aspartatproteasen zu wichtigen Zielproteinen für die Medikamentenentwicklung macht. Die γ -Sekretase ist ein aus den vier Proteinen Presenilin 1 oder 2 (PS), Nicastrin (NCT), APH-1aS, -1aL oder 1b und PEN-2 zusammengesetzter Intramembranproteasekomplex, der die Spaltung von Typ I-Transmembranproteinen katalysiert. Nach dem Abtrennen der Ektodomäne durch die β -Sekretase spaltet die γ -Sekretase zuerst die intrazelluläre Domäne von APP (AICD, engl. *APP intracellular domain*) vom APP β -C-terminalen Fragment (APP- β CTF) ab und verkürzt dann den verbleibenden Substratrest weiter, bis schließlich kurze $A\beta$ -Peptide mit heterogenem N-Terminus von 37 bis 43 AS Länge aus der Membran entlassen werden. Unter physiologischen Bedingungen entsteht dabei hauptsächlich $A\beta_{40}$, gefolgt von $A\beta_{38}$ und $A\beta_{42}$, während $A\beta_{37}$ und $A\beta_{43}$ nur in sehr geringer Menge produziert werden. Für Mutationen in APP oder PS, die in Verbindung mit der familiären Variante der Alzheimer Erkrankung (FAD, engl. *familial Alzheimer's disease*) auftreten, ist der Anteil von $A\beta_{42}$ am Gesamt- $A\beta$ meist erhöht.

Hohe Erwartungen werden in γ -Sekretasemodulatoren (GSMs) gesetzt, die im Gegensatz zu den γ -Sekretaseinhibitoren (GSIs) höchstwahrscheinlich mit weit weniger Nebenwirkungen behaftet sind, weil sie nicht die Abspaltung funktionell wichtiger ICDs hemmen, wie z.B. der Notch1-ICD (NICD). GSMs verändern die Zusammensetzung der $A\beta$ -Peptide, lassen die APP-ICD- (AICD) und Gesamt- $A\beta$ -Produktion jedoch unberührt. Dabei sind für die therapeutische Anwendung solche GSMs interessant, die die Produktion von $A\beta_{42(43)}$ hemmen, während gleichzeitig die Produktion von $A\beta_{38}$ und kürzeren $A\beta$ -Peptiden stimuliert wird. Als erste GSMs wurden Substanzen aus der Klasse der nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Medikamente (NSAIDs, engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*) identifiziert, deren saure Carboxygruppe für die modulatorische Aktivität notwendig ist. Entscheidende Nachteile dieser Substanzen sind ihre niedrige Potenz und schlechte Gehirngängigkeit. Im Laufe der Substanzentwicklung wurden neue acidische sowie nicht-acidische GSMs entdeckt, die deutlich potenter sind und auf eine zukünftige Anwendung beim Patienten hoffen lassen.

Für NSAID-ähnliche GSMs wurden die AS 28 bis 36 des APP- β CTF als Bindungsstelle beschrieben. Des Weiteren wurde der Wirkmechanismus dieser GSMs mit einer Dimerisierung der Substrat-Transmembrandomänen (TMDs) in Verbindung gebracht. Dabei soll die Dimerisierung des APP- β CTF über ein GxxxG-Motiv, das innerhalb der GSM-Bindungsstelle liegt, die A β -Produktion direkt modulieren, indem bei geschwächter Dimerisierung vermehrt A β_{38} und weniger A β_{42} entsteht. NSAID-ähnliche GSMs könnten nach diesem Modell durch die Substratbindung mit der Dimerisierung interferieren und somit die A β -Produktion modulieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden APP- β CTF-Mutanten des GxxxG-Motivs sowie APP-FAD-Mutanten in der Region der γ -Sekretasespaltstellen im zellfreien System auf Zusammensetzung der A β -Peptide und Modulierbarkeit hin untersucht. Dabei wurde für die GxxxG-Mutanten keine Kopplung der A β_{42} -Produktion mit einer Dimerisierung beobachtet. Des Weiteren sprachen alle untersuchten Mutanten auf GSM-Behandlung an, wenngleich das Reaktionsvermögen in Richtung abnehmender Dimerisierungsneigung der Mutanten abgeschwächt war. Auch die K28E-Mutante, die eine mögliche Interaktion der GSM-Carboxygruppe mit der positiv geladenen Seitenkette von K28 unterbinden sollte, war für GSM-Behandlung empfänglich. Da die meisten PS-FAD-Mutanten für die A β_{42} -senkende Wirkung von GSMs der ersten Generation unempfindlich sind, wurde untersucht, ob APP-FAD-Mutanten auf GSM-Behandlung ansprechen. Dabei konnte A β_{42} für alle untersuchten APP-FAD-Mutanten durch GSM-Behandlung gesenkt werden. Insgesamt sprechen die mit den APP- β CTF-Mutanten erhobenen Daten also gegen eine Substratbindung von GSMs.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die neue nicht-acidische GSM-Klasse der Aminopyrimidine funktionell charakterisiert und das (oder die) Zielprotein(e) dieser GSMs bestimmt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Stellvertreter dieser Substanzklasse in Zellkultur das von allen sechs γ -Sekretasekomplexen produzierte A β_{42} reduzieren kann, die Produktion der NICD bis zu 500-fachem IC₅₀ (A β_{42}) nicht inhibiert und auch im zellfreien System als GSM wirkt. Mit Hilfe eines Derivats zur Photoaffinitätsmarkierung wurden PS1- und PS2-NTF als Zielproteine der Aminopyrimidin-GSMs gefunden. Mit PS verwandte Proteasen wie die Signalpeptidpeptidase (SPP) und SPP-ähnliche Proteasen sowie das APP- β CTF als Substrat wurden nicht spezifisch gebunden. Kompetitionsstudien gaben Hinweise auf die Lage der Bindungsstelle der Aminopyrimidin-GSMs im PS-NTF im Vergleich zu der von anderen GSMs und GSIs. Die Identifizierung von PS als molekularen Angriffspunkt der Aminopyrimidin-GSMs etabliert die allosterische Modulation als Wirkmechanismus von GSMs der zweiten Generation.

Insgesamt tragen die Ergebnisse dieser Arbeit zum Verständnis des Mechanismus der γ -Sekretasemodulation bei. Des Weiteren könnte die Identifizierung des PS-NTF als mo-

lekularer Angriffspunkt der Aminopyrimidin-GSMs sowie die zukünftige Eingrenzung der GSM-Bindungsstelle dabei helfen, noch spezifischere und potentere GSMs zu entwickeln, was im Hinblick auf den möglichen Einsatz von GSMs als krankheitsmodulierende Therapie für die Alzheimer Erkrankung von großer Bedeutung ist.

Summary

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia worldwide and represents one of the major challenges for the ageing society. However, there is no approved disease-modifying therapy available. Most research efforts concentrate on the pathogenic amyloid β 42 ($A\beta_{42}$) peptide, that aggregates during AD development into amyloid plaques and is believed to be causative for the disease. $A\beta$ is derived from sequential cleavage of amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretase. Therefore, these two aspartate proteases are major drug targets for the development of effective AD therapeutics. The γ -secretase complex consists of four components, presenilin 1 or 2 (PS), nicastrin (NCT), APH-1aS, -1aL or 1b and PEN-2 and cleaves type-I transmembrane proteins. After shedding of the ectodomain by β -secretase, the APP intracellular domain (AICD) is released from the APP β -C-terminal fragment (APP- β CTF) by γ -secretase. In a stepwise and sequential manner, γ -secretase shortens the remaining substrate, until $A\beta$ peptides of 37 to 43 amino acids in length are released from the membrane. Under physiological conditions, $A\beta_{40}$ represents the major species, followed by $A\beta_{38}$ and the pathogenic $A\beta_{42}$, while $A\beta_{37}$ and $A\beta_{43}$ are produced in only very minor amounts. Most mutations in APP and PS that cause familial Alzheimer's disease (FAD) increase the ratio of $A\beta_{42}$ to $A\beta_{total}$.

Lowering of $A\beta_{42}$ production by γ -secretase modulators (GSMs) is a promising approach towards AD treatment, as these compounds are much less prone to side effects compared to γ -secretase inhibitors (GSIs). Importantly, they do not inhibit the production of functionally crucial ICDs such as the Notch1 ICD (NICD). In general, GSMs change the ratios of the different $A\beta$ species, but do not affect AICD or total $A\beta$ production. Relevant for AD therapy are GSMs that lower the production of $A\beta_{42(43)}$ and increase $A\beta_{38}$ and shorter species. The first described GSMs belong to the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and contain an acidic carboxy group which is essential for their activity. However, these compounds suffer from low potency and poor brain penetration. Therefore, pharmaceutical companies screened for high potency acidic and non-acidic GSMs that could be used in future clinical applications.

Previous studies mapped the binding site of NSAID-type GSMs to amino acids 28 to 36 in the APP- β CTF. Furthermore, the dimerization of substrate transmembrane domains was implicated in their mechanism of action. Weakening the dimerization

via a GxxxG motif that lies within the GSM binding site was proposed to modulate γ -secretase activity, as GxxxG mutants produced more $A\beta_{38}$ and less $A\beta_{42}$. According to this model, substrate-targeting NSAID-type GSMs could interfere with the substrate dimerization and therefore modulate $A\beta$ production.

As a first part of this study, APP- β CTF GxxxG dimerization mutants were examined for their effect on γ -secretase activity and modulation. It was shown that $A\beta_{42}$ production was not coupled with dimerization strength, and all investigated GxxxG mutants responded to GSM treatment. However, the response was attenuated for mutants of low dimerization strength. Furthermore, the mutation of lysine 28 to glutamate, which was proposed to interfere with the interaction of the positively charged side group with the carboxy group of NSAID-type GSMs, had no effect on the response to GSM treatment. As most PS-FAD-mutants are resistant to the $A\beta_{42}$ -lowering effect of first generation GSMs, APP-FAD-mutants in the region of the γ -secretase cleaving sites were investigated for their response to GSM treatment. Importantly, for all investigated APP-FAD-mutants, $A\beta_{42}$ could be lowered in a similar manner to wildtype. Taken together, the results obtained with the APP- β CTF mutants argue clearly against a substrate-targeting mechanism of GSM action.

As a second part, novel non-acidic GSMs of aminopyrimidine-type were functionally characterized and their molecular target was determined. One further analysed representative compound could lower $A\beta_{42}$ for all six existing combinations of γ -secretase subunits. In addition, the GSM treatment did not interfere with NICD generation up to 500 fold of the IC_{50} ($A\beta_{42}$) and was also effective in a cell free assay. By using a photoaffinity labeling derivative, the PS-NTF was identified as target of aminopyrimidine-type GSMs. Interestingly, signal peptide peptidase (SPP) and SPP like proteases, which are related to PS, were not observed to be specifically bound by the photoaffinity probe. No substrate-binding was detected as the APP- β CTF failed to be isolated with the photoaffinity labeling derivative. Binding was competed to different extents by GSIs and GSMs of diverse structural classes suggesting the existence of overlapping or shared binding sites for some compound classes with the aminopyrimidine-type GSMs. The identification of PS as a molecular target of GSMs establishes allosteric modulation of enzyme activity as a mechanism of action for second-generation GSMs.

Taken together, the results of this study may help to understand the complex mechanism of γ -secretase modulation. Furthermore, the identification of the molecular target of aminopyrimidine-type GSMs and the future characterization of its binding site may ultimately help in developing more specific and potent GSMs by rational drug design. Considering the potential use of GSMs in a disease-modifying therapy, the understanding of their molecular target(s) and mode(s) of action is of utmost importance.

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer Erkrankung

Demenzen stellen für die älter werdende Gesellschaft eine große sozioökonomische Herausforderung dar. Die Alzheimer Erkrankung [1, 2] ist dabei mit einem Anteil von etwa 60% der Fälle die bedeutendste Demenzform. Aktuelle Schätzungen gehen von etwa 30 Millionen Erkrankten weltweit aus [3], in Deutschland sind über eine Million Menschen von der Alzheimer Erkrankung betroffen [4]. Jedes Jahr kommen weltweit etwa fünf Millionen neue Fälle hinzu [3,5], und die Zahl der Betroffenen wird sich laut Hochrechnungen alle 20 Jahre verdoppeln [3]. Die damit auf die Gesundheitssysteme zukommenden Kosten sind beträchtlich [5,6], und zusammen mit dem Bedarf an Pflegekräften stellen sie die Gesellschaft vor erhebliche Probleme [7].

Milde kognitive Beeinträchtigungen (MCI, engl. *mild cognitive impairment*) [8,9], die Übergangsformen zwischen normalem Altern und Demenz, treten deutlich häufiger auf als Demenzen. Die Genauigkeit der Vorhersage der Progressionswahrscheinlichkeit von MCI zur Demenz hat sich in den letzten Jahren durch eine Kombination von verschiedenen bildgebenden Verfahren wie Glukose-Positronenemissions- und Magnetresonanztomografie mit Biomarkeranalyse im Liquor cerebrospinalis deutlich verbessert [10,11]. Doch bis zum heutigen Tag gibt es keine effektive Therapie gegen die Alzheimer Erkrankung. Selbst wenn zukünftige Interventionen nur sehr moderat den Beginn einer Demenz hinauszögern oder die Progression der Krankheit verlangsamen könnten, würde sich daraus schon eine signifikante Abnahme der gesamtgesellschaftlichen Belastung ergeben [5]. Deshalb sind auch kleine Fortschritte in Richtung einer krankheitsmodulierenden Therapie von großer Bedeutung, um die finanzielle Belastung für die Gesundheitssysteme sowie die ökonomischen und gesellschaftlichen Probleme abzufedern [12].

Schon im Jahre 1901 beschrieb der Psychiater Alois Alzheimer die klinischen Symptome der ersten mit der Krankheit diagnostizierten Patientin, Auguste Deter, als Desorientierung, Halluzinationen, Vergesslichkeit sowie die Unfähigkeit, sich verbal und schriftlich auszudrücken [13]. Bei der post-mortem-Analyse des Gehirns beobachtete er eine ausgeprägte Hirnatrophie sowie neurofibrilläre Bündel innerhalb der Neuronen und extrazelluläre Amyloidplaques [14,15]. Alzheimer war mit seinen akkuraten Beschreibungen seiner Zeit voraus; seine grundlegenden Beobachtungen zur Pathologie der Krankheit werden bis heute als korrekt angesehen.

1.1.1 Neuropathologische Merkmale

Neurofibrilläre Bündel, Amyloidplaques und der Verlust von Synapsen stellen die wichtigsten neuropathologischen Merkmale der Alzheimer Erkrankung dar, wobei fortschrei-

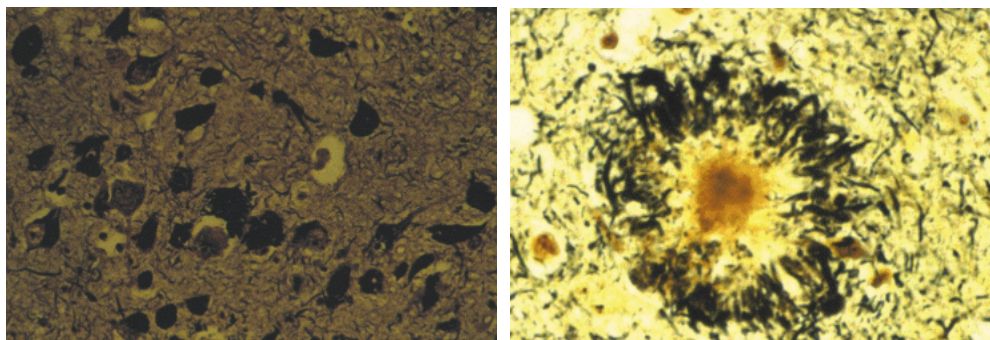


Abbildung 1: **Lichtmikroskopische Darstellung der neuropathologischen Hauptmerkmale der Alzheimer Erkrankung.** Links sind neurofibrilläre Bündel mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Sie erscheinen schwarz und füllen die Zellkörper und Fortsätze der zerebralen kortikalen pyramidalen Neuronen. Rechts ist eine Aufnahme eines silbergefärbten Amyloidplaques abgebildet. Um ihn herum sind dystrophe Neuriten zu sehen, die wiederum mit neurofibrillären Bündeln gefüllt sind. Die Bilder sind entnommen aus [16].

tender Verlust von Synapsen sowie die Anzahl der neurofibrillären Bündel besser mit der Ausprägung der klinischen Symptome der Krankheit korreliert als die Anzahl der Amyloidplaques [17, 18].

Neurofibrilläre Bündel (siehe Abb. 1 links) bestehen hauptsächlich aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau, das unter physiologischen Bedingungen die Stabilität von axonalen Mikrotubuli und die damit verbundenen Prozesse reguliert [19]. Im Rahmen der Pathologie wird das Tau-Protein hyperphosphoryliert [20, 21], was die Dissoziation von den Mikrotubuli zur Folge hat. Schließlich aggregiert das hyperphosphorylierte Tau in neurofibrillären Bündeln und verliert somit seine Funktion als Stabilisator der Mikrotubuli [22]. Weshalb es zur Hyperphosphorylierung von Tau kommt ist noch nicht abschließend geklärt. Interessanterweise ist die Tau-Pathologie nicht auf die Alzheimer Erkrankung beschränkt, sondern tritt auch bei vielen anderen neurodegenerativen Krankheiten wie der frontotemporalen Demenz auf [23].

Amyloidplaques, die für die Alzheimer Erkrankung spezifischen extrazellulären Ablagerungen (siehe Abb. 1 rechts), kommen in verschiedenen Formen vor, die wichtigsten sind die diffusen und die neuritischen Plaques. Diffuse Plaques sind auch bei gesunden Probanden häufiger zu beobachten, während neuritische Plaques charakteristisch für die Alzheimer-Pathologie sind [24, 25]. Diese bestehen überwiegend aus Amyloid- β ($A\beta$) Peptiden von 37 bis 43 Aminosäuren (AS) Länge, die Spaltprodukte des Amyloidvorläuferproteins (APP, engl. *amyloid precursor protein*) sind [26–28], wobei $A\beta_{42}$ den Hauptanteil darstellt [29, 30]. Die Bedeutung der Plaques und ihrer oligomeren Vorstufen für die Pathologie der Alzheimer Erkrankung wird bei der Vorstellung der

Amyloidkaskaden-Hypothese (siehe 1.1.3) ausführlich diskutiert.

1.1.2 Die genetische Basis der Alzheimer Erkrankung

Die Alzheimer-Erkrankungsfälle lassen sich gemäß dem Krankheitsbeginn und den genetischen Ursachen in zwei Gruppen einteilen: durch krankheitsauslösende Mutationen bedingte und sog. "sporadische" Fälle. Dabei tritt die überwiegende Mehrheit der Fälle ohne Vorhandensein einer klar krankheitsauslösenden und segregierenden Mutation auf.

Für die sporadische Alzheimer Erkrankung stellt zunehmendes Alter immer noch den größten Risikofaktor dar: Die Inzidenz verdoppelt sich ab einem Alter von etwa 65 Jahren alle fünf Jahre, mit 85 Jahren ist statistisch jeder dritte Mensch von der Alzheimer Erkrankung betroffen [2]. Lange Zeit war das $\epsilon 4$ -Allel des für das Apolipoprotein E (ApoE) kodierenden Gens (*APOE* $\epsilon 4$) der einzige allgemein anerkannte genetische Risikofaktor für die spät auftretende Alzheimer Erkrankung [31, 32]. Im Vergleich zum vorherrschenden $\epsilon 3$ -Allel steigt beim heterozygoten $\epsilon 4$ das Erkrankungsrisiko auf das dreifache, beim homozygoten $\epsilon 4$ sogar auf bis das zwölfwache [33]. Dahingegen ist beim $\epsilon 2$ -Allel das Risiko deutlich erniedrigt [34]. Interessanterweise unterscheiden sich die Allele jeweils nur an zwei AS-Positionen [32]. Der Mechanismus ist noch nicht abschließend geklärt (eine Übersicht bietet [32]), aber ApoE scheint aber sowohl auf den Abbau/die Beseitigung [35] als auch auf die Ablagerung/Fibrillogenese [36] von A β einen Einfluss zu haben. Dabei scheint das $\epsilon 2$ -Allel eine protektive, das $\epsilon 4$ -Allel hingegen eine aggregationsfördernde Wirkung zu haben.

Kürzlich durchgeführte großangelegte genomweite Assoziationsstudien (GWAS), die nach bekannten SNPs (engl. *single nucleotide polymorphisms*) in Korrelation zur Alzheimer Erkrankung suchten, identifizierten nach *APOE* $\epsilon 4$ mehrere neue interessante potentielle Risikogene, darunter *CLU* (kodiert für Clusterin) [37, 38], *PICALM* (kodiert für das Phosphatidylinositol-bindende Clathrin-Assemblierungsprotein) [37], *CR1* (kodiert für den Komplementrezeptor 1, engl. *complement receptor 1*) [38] und *BIN1* (kodiert für den verbrückenden Integrator 1, engl. *bridging integrator 1*) [39]. Diese Proteine übernehmen Aufgaben im Immunsystem und bei der Entzündungsantwort (Clusterin, CR1), im Lipidmetabolismus (Clusterin) und im endocytischen Transportweg (PICALM, BIN1) [40]. Für ein weiteres im Proteintransport in Neuronen beteiligtes Protein, SorLA (auch ApoE Rezeptor LR11), wurden ebenfalls mit der spät auftretenden Alzheimer Erkrankung assoziierte SNPs gefunden [41]. SorLA reguliert wahrscheinlich den Transport von APP [42] und ist in Lymphoblasten von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden in der Expression erniedrigt [43]. Es ist noch zu klären, inwiefern die korrelierten Faktoren auch kausal für die Pathogenese sind; jedoch ist abzusehen, dass die sich spät manifestierende Alzheimer Erkrankung eine multifaktorielle Krankheit ist,

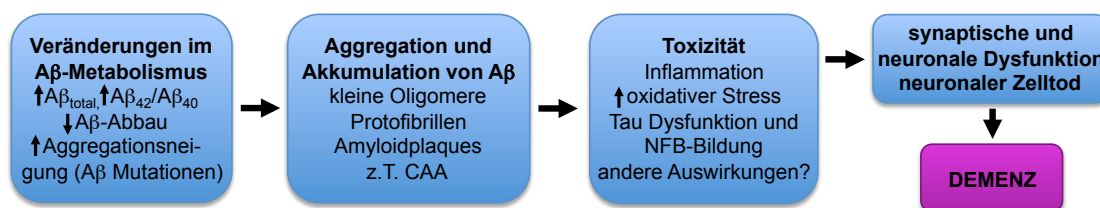


Abbildung 2: Die Abfolge der pathogenen Prozesse, die nach der Amyloidkaskaden-Hypothese zur Alzheimer Erkrankung führen. Neben der dargestellten sequenziellen Abfolge könnten die Aβ-Oligomere auch direkt zu einer Fehlfunktion der Synapsen führen. CAA, cerebrale Amyloidangiopathie; NFB, neurofibrilläre Bündel.

bei sich viele Faktoren über eine lange Entstehungszeit hin addieren.

Als kausal für die familiären Varianten der Alzheimer Erkrankung (FAD, engl. *familial Alzheimer's disease*) haben sich Mutationen im Presenilin 1 oder 2 (PS1 oder PS2, siehe Abb. 13), der katalytischen Untereinheit der γ -Sekretase sowie im APP (siehe Abb. 14) herausgestellt. Diese sind in der von Marc Cruts gepflegten Datenbank annotiert (im Internet zugänglich unter www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/). Zusammengefasst haben die Mutationen mit wenigen Ausnahmen einen stimulierenden Einfluss auf die Aβ-Aggregation, entweder indem sie Aβ₄₂/Aβ₄₀ [44] und auch selten Aβ₄₃/Aβ₄₀ [45] erhöhen oder indem sie die Aggregationsneigung des Aβ₄₂ selbst verstärken, was nur bestimmte Mutationen im APP betrifft. Die familiäre Form der Krankheit beginnt im Mittel deutlich früher als bei den sporadischen Fällen, je nach Aggressivität der FAD-Mutation zwischen 25 und 60 Jahren [46]. Die genaue Lage der FAD-Mutationen und ihre Mechanismen werden im Detail im Kapitel 1.5 behandelt.

1.1.3 Die Amyloidkaskaden-Hypothese

Die Amyloidkaskaden-Hypothese (schematische Darstellung siehe Abb. 2) ist das vorherrschende Modell für den Ablauf der Alzheimer-Pathologie. Außerdem haben in den vergangenen zehn Jahren die meisten Strategien für krankheitsmodulierende Therapien auf der Amyloidkaskaden-Hypothese aufgebaut [25,47]. Im Zentrum der Hypothese steht die Bildung der Amyloidplaques und diverser oligomerer Vorstufen. Diese Prozesse werden als ursächlich für die Entstehung der Alzheimer Erkrankung angesehen. Ursprünglich von John Hardy aufgestellt, waren zuerst die Amyloidplaques im Fokus der Aufmerksamkeit als Verursacher der Pathologie, d.h. der Bildung von neurofibrillären Bündel, der Fehlfunktion von Synapsen, der vaskulären Schäden und schließlich des Absterbens von Neuronen [24,48]. Zur Entstehung der Amyloidplaques können verschiedene Mechanismen wie erhöhte Produktion von Aβ, eine verändertes Schnittmuster der γ -Sekretase

und/oder der reduzierte Abbau von A β beitragen. Normalerweise wird A β von Peptidasen wie Neprilysin [49] und dem insulinaabbauenden Enzym (IDE, engl. *insulin degrading enzyme*) [50] abgebaut. Subtile Störungen im A β -Metabolismus wie verminderte Beseitigung des A β können über Jahrzehnte zur Bildung der Plaques führen. Lange Zeit stand nur A β_{42} als toxische Spezies im Fokus, mittlerweile wurde aber gezeigt, dass auch A β_{43} stark neurotoxisch ist [45]. Des Weiteren scheint für die Aggregationsneigung das Verhältnis von A β_{42} zu A β_{40} mindestens genauso wichtig wie die absolute Konzentration von A β_{42} zu sein [51].

Vor etwa zehn Jahren kamen A β -Oligomere, vor allem Di- und Trimere, ins Zentrum der Aufmerksamkeit vieler Forscher, nachdem entdeckt worden war, dass diese die hippokampale Langzeitpotenzierung inhibieren [52], die synaptische Plastizität beeinträchtigen [53] und Tau-abhängig die Degeneration von Neuriten verursachen [54]. Trotz der Veröffentlichung vieler Studien zur Toxizität der Oligomere ist deren Rolle in der Alzheimer Erkrankung als alleinige toxische Spezies noch umstritten. Potentiell problematisch ist, dass verschiedene Labore unterschiedlichste Protokolle und Quellen für die A β -Oligomere verwenden und dass zudem unklar ist, wie sich die Oligomere bei Inkubation auf den Zellen in ihrem Aggregationsstatus verändern [55–57]. Des Weiteren ist der Mechanismus der Toxizität noch nicht verstanden: Neben direkter Schädigung der Zellmembran [58] wird die Bindung von A β -Oligomeren an verschiedene Rezeptoren diskutiert, darunter interessanterweise auch das Prionprotein [59], das von entscheidender Bedeutung für verschiedene transmissible spongiforme Enzephalopathien ist. Es konnte jedoch mehrfach gezeigt werden, dass die A β -Toxizität von Tau abhängig ist [60,61]. Insgesamt konnte aber bis heute keine lückenlose Beweisführung für die Amyloidkaskaden-Hypothese erbracht werden [62], und besonders die Frage nach ihrer Bedeutung für die sporadische Alzheimer Erkrankung bleibt offen.

1.2 Das Amyloidvorläuferprotein (APP)

Das APP gehört zu einer Familie von konservierten Typ I-Transmembranproteinen [63]. Orthologe wurden u.a. in *C. elegans* (APL-1) [64], *Drosophila* (APPL) [65,66] und Zebrafisch (APPa und APPb) [67] identifiziert. Die drei in Säugetieren vorhandenen Homologe, APP [27,28], APLP1 [68] und APLP2 [69], teilen große Bereiche konservierter Sequenz, v.a. in den E1- und E2-Domänen (siehe Abb. 3). Vom ubiquitär exprimierten, aber im Gehirn angereicherten APP gibt es drei für A β kodierende *Splicing*-Varianten von 695, 751 und 770 AS Länge [70], die maturen Proteinen mit einem Molekulargewicht von 100 bis 135 kDa entsprechen [71]. APP695 ist dabei die Hauptisoform in Neuronen [72]; dieser Variante fehlt ein Sequenzabschnitt zwischen E1- und E2-Domäne, die Serinproteasen vom Kunitztyp inhibiert (KPI-Domäne) [70,73].

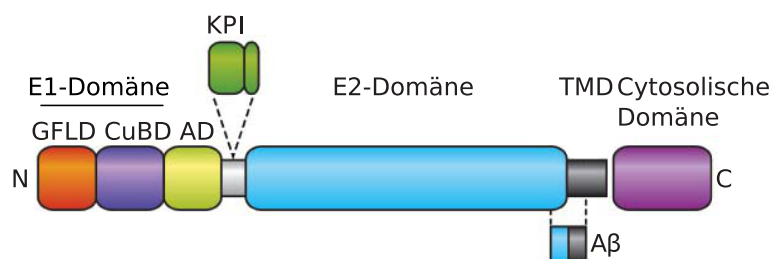


Abbildung 3: **Domänenstruktur von APP.** *GFLD*, Wachstumsfaktor ähnliche Domäne (engl. *growth factor like domain*); *CuBD*, Cu^+ -bindende Domäne; *AD*, acidische Domäne; *KPI*, Kunitz-Proteasen-inhibierende Domäne; *TMD*, Transmembrandomäne. Schema modifiziert nach [74].

APP durchläuft den sekretorischen Transportweg und wird dabei posttranslational modifiziert, u.a. mit N- und O-Glykosylierungen sowie Phosphorylierungen [75]. Trotz intensiver Forschung ist die physiologische Funktion des Vollängenproteins noch nicht abschließend verstanden. APP wurden Funktionen in verschiedenen zellbiologischen Prozessen wie Signaltransduktion (als Rezeptor mit noch unbekanntem Liganden), neuronaler Migration [76] und neuritischem Wachstum [77] sowie Zelladhäsion und Synaptogenese [78] beigemessen. Am gesichertsten gilt dabei die Funktion als synaptisches Adhäsionsmolekül, wobei die geringe Verweildauer von APP an der Zelloberfläche eher für eine regulatorische als eine strukturelle Rolle spricht [79]. Die Funktionen der Spaltprodukte von APP werden im Abschnitt der APP-Prozessierung vorgestellt (siehe 1.3).

Aus der Vielfalt an Untersuchungen zu Mausmodellen mit Deletionen der Gene der APP-Familie konnten einige interessante Erkenntnisse gewonnen werden. Werden APP [80, 81], APLP1 [82] oder APLP2 [83] einzeln deletiert, zeigen die Mäuse nur sehr milde neuronale Defizite; es konnte kein Verlust von Neuronen in APP-defizienten Tieren beobachtet werden [84]. Interessanterweise sind Kombinationen dieser Deletionen nur letal, wenn sie APLP2 einschließen [82]: So besitzen Mäuse ohne APP sowie APLP2 schlecht ausgebildete neuromuskuläre Synapsen und sterben kurz nach der Geburt [85]. APLP2 scheint also lebensnotwendige Aufgaben zu übernehmen, wenn APP oder APLP1 abwesend ist. Zusätzlich zu diesen Phänotypen zeigen Tiere mit einer Deletion aller drei Proteine eine kortikale Dysplasie, die an eine Lissenzephalie Typ II beim Menschen erinnert [86]. Insgesamt weisen die Mausmodelle darauf hin, dass die Proteine aus der APP-Familie redundante, aber wichtige Funktionen bei der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems sowie bei der neuronalen Migration und Adhäsion übernehmen. Aus diesen Modellen ist *per se* jedoch nicht ersichtlich, ob das Vollängenprotein oder eines seiner Spaltprodukte das funktionstragende Molekül ist.

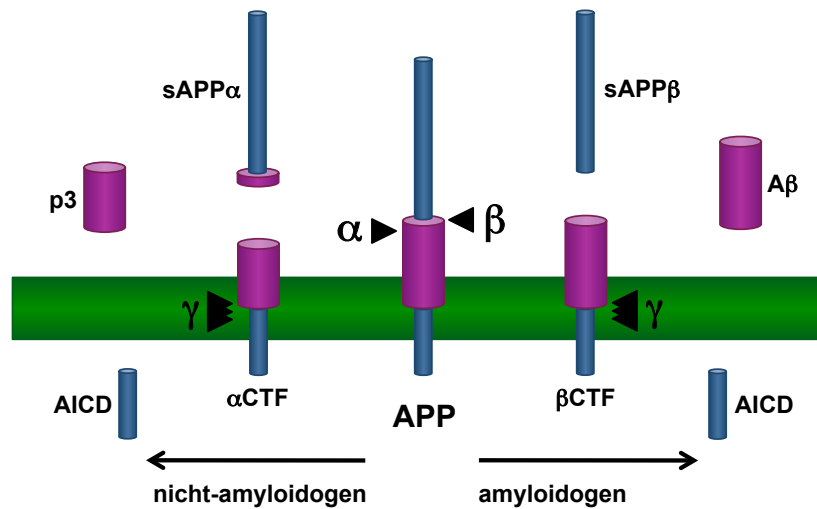


Abbildung 4: Schematische Übersicht über die proteolytische Prozessierung von APP. Die A β -Domäne im APP ist lila hervorgehoben; α kennzeichnet den Schnitt der α -Sekretase, analog β den der β -Sekretase und γ die Schnittstellen der γ -Sekretase. Nicht-amyloidogener und amyloidogener Weg sind durch Pfeile angedeutet.

1.3 Prozessierung des APP

Auf seinem Weg durch den sekretorischen Transportweg an die Zelloberfläche sowie nach der Endocytose ist das APP-Vollängenprotein das Substrat von sequenziellen Proteolyse, an denen mehrere Sekretasen beteiligt sind. Diese Spaltungen werden klassischerweise zwei Pfaden zugeordnet: dem nicht-amyloiden Weg, bei dem kein aggregierendes Peptid freigesetzt wird, und dem amyloiden Weg, bei dem das A β sekretiert wird (siehe Abb. 4).

Im nicht-amyloiden Weg wird das APP zuerst von der α - und im Anschluss von der γ -Sekretase gespalten. Die α -Sekretase schneidet in der A β -Domäne vor AS 17, also innerhalb der A β -Sequenz, wodurch die Freisetzung des A β im Anschluss an die α -Sekretaseaktivität ausgeschlossen ist [87] (siehe Abb. 5). In diesem Schritt entsteht das lösliche APP α (sAPP α , engl. *soluble APP α*) sowie das APP- α CTF (C83) [87], das von der γ -Sekretase geschnitten wird. Dadurch wird die intrazelluläre Domäne des APPs (AICD, engl. *APP intracellular domain*) [88] in das Cytosol und die p3-Fragmente in den extrazellulären Raum freigesetzt [89,90].

Im amyloiden Weg hingegen spaltet die β -Sekretase das APP zum löslichen APP β (sAPP β , engl. *soluble APP β*) [75,91] und APP- β CTF (C99) [71], bevor dieses zum Substrat für die γ -Sekretase wird. Im letzten Schritt entsteht wiederum durch die γ -Sekretase die AICD sowie das A β -Peptid, das sekretiert wird. Zunächst wurde ange-



Abbildung 5: **Lokalisation der β -, β' -, α - und γ -Schnittstellen im APP.** Die TMD ist blau unterlegt, die Nummerierungen der Sequenz orientieren sich an der angegebenen APP-Isoform bzw. am A β . Mit grünen Pfeilen sind die Schnittstellen der einzelnen Sekretasen gekennzeichnet.

nommen, dass die Entstehung des A β -Peptids ein rein pathologisches Ereignis darstellt. Diese Sichtweise änderte sich jedoch, als vor 20 Jahren entdeckt wurde, dass Zelllinien neuronalen sowie nicht-neuronalen Ursprungs A β sekretieren [92–95] und darüberhinaus A β auch im Liquor cerebrospinalis (CSF, engl. *cerebrospinal fluid*) von gesunden Menschen nachgewiesen werden kann [93, 94]. Heute ist klar, dass die A β -Produktion ein normaler physiologischer Prozess ist. Im folgenden wird auf die einzelnen Spaltungsprozesse und die beteiligten Proteasen näher eingegangen.

1.3.1 α -Sekretase und α -Spaltung

APP wird konstitutiv von der sogenannten α -Sekretase an der Zelloberfläche prozessiert [87]. Drei Mitglieder der Familie der ADAM-Proteasen (engl. *A disintegrin and metalloproteinase*) wurden für die α -Sekretase vorgeschlagen: ADAM9 [96], ADAM10 [97] und ADAM17 (auch TACE, engl. *Tumor necrosis factor- α convertase*) [98]. ADAMs sind Typ I-Transmembranproteine, die zu der Familie der Zink-Metalloproteasen gehören. APP ist nur eines der vielen Substrate der ADAMs: Sie fungieren auch für TNF- α (engl. *Tumor necrosis factor- α*), N-Cadherin, Notch, Ephrin, L-Selektin und viele andere Membranproteine als sog. *Sheddases* [99, 100] und kontrollieren damit über die Freisetzung und Aktivierung von Wachstumsfaktoren und -regulatoren bedeutende Prozesse wie Neurogenese und Gehirnentwicklung [101, 102], Herzentwicklung und Angiogenese [103–105]. Nach deutlicher *in vivo*-Evidenz [106] konnte in einer weiteren biochemischen Studie gezeigt werden, dass ADAM10 die physiologisch relevante α -Sekretase für das APP in Neuronen ist [107].

Dem aus der α -Spaltung von APP hervorgehenden sAPP α werden allgemein protektive und stimulierende Eigenschaften für Neuritenwachstum, Synaptogenese und Zelladhäsion zugeschrieben [108, 109]. Dabei scheinen die letzten 16 AS des sAPP α , um die der C-Terminus des sAPP α länger ist als der des sAPP β (siehe Abb. 5), von besonderer Bedeutung zu sein, denn das sAPP β besitzt kaum neuroprotektive Eigenschaften [110, 111] und wurde sogar mit neurodegenerativen Prozessen in Zusammenhang gebracht [74]

(siehe 1.3.2). Im Einklang damit ist die Beobachtung, dass das sAPP α die milden Defekte der APP-Defizienz aufheben kann [112]. Interessanterweise wurde gezeigt, dass die Expression des sAPP α die Letalität der APP/APLP2-Ausschaltung zum großen Teil aufheben kann [113], nicht aber die Expression des sAPP β [114].

1.3.2 β -Sekretase und β -Spaltung

Die β -Spaltung von APP erfolgt hauptsächlich in endocytischen Vesikeln [92, 115, 116]. BACE1 (engl. *β -site APP cleaving enzyme 1*) wurde von mehreren Forschungsgruppen gleichzeitig als die β -Sekretase für APP identifiziert [117–121]. Dieses Typ I-Transmembranprotein ist eine klassische Aspartatprotease mit typischen D (T/S) G (S/T)-Motiven im aktiven Zentrum [119]. Bald nach der Identifizierung wurde die katalytische Domäne von BACE1 zusammen mit einem Inhibitor kokristallisiert [122]: Die Struktur zeigte, dass das aktive Zentrum offener und weniger hydrophob als bei anderen klassischen Aspartatproteasen ist. BACE1 kann humanes APP neben der Hauptschnittstelle vor AS 1 der A β -Sequenz auch vor AS 11 (als β' bezeichnet) [119, 123] und AS 34 [124] spalten, was zu verkürzten A β -Peptiden führt (siehe Abb. 5). Das homologe BACE2 hat auch geringe β -Sekretaseaktivität auf APP, spaltet jedoch bevorzugt nahe der α -Schnittstelle [125] und ist zudem im Gehirn im Vergleich zu BACE1 nur sehr schwach exprimiert [126]. Das Ausschalten von BACE1 in Mäusen unterbindet die A β -Sekretion [127–129]. Des weiteren verlieren Mäuse, die eine APP-FAD-Mutation allein oder zusammen mit einer PS1-FAD-Mutation überexprimieren, bei genetischer Deletion von BACE1 die typische Plaque-Pathologie [130, 131]. Dies kann auch durch Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen die β -Schnittstelle im APP erreicht werden [132]. Insgesamt weisen diese Befunde darauf hin, dass BACE1 unter physiologischen Bedingungen in Neuronen die einzige β -Sekretase ist.

BACE1 hat neben APP noch viele weitere Substrate, u.a. APLP1 und 2, Neuregulin1, Interleukinrezeptor2, Sialyltransferase ST6GalI. (eine Übersicht bietet [133]). Um so überraschender ist es, dass beim Ausschalten von BACE1 in der Maus zunächst kein offensichtlicher, drastischer Phänotyp beobachtet wurde [127–129]. Jedoch konnten in Verhaltenstests Auffälligkeiten festgestellt werden [134], außerdem neigen diese Tiere zu Krampfanfällen [135]. Bemerkenswerterweise zeigen die Mäuse eine stark beeinträchtigte Myelinierung im PNS [136], jedoch nur sehr schwache Reduktion im ZNS [137]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden β -Sekretaseinhibitoren als alternative Strategie zur Inhibition der A β -Produktion mit weniger Nebenwirkungen als γ -Sekretaseinhibitoren (siehe 1.6.1) eingestuft und werden von mehreren Pharmaunternehmen entwickelt (eine Übersicht bietet [138]). Ob die Inhibition der Prozessierung von BACE1-Substraten im Menschen aber wirklich unbedenklich ist lässt sich bei heutigem Stand der Forschung

noch nicht abschließend beurteilen.

Die neuroprotektiven Eigenschaften des sAPP β unter Stressbedingungen wie Exzitotoxizität und Glukosemangel wurden als 50- bis 100-fach schwächer als die des sAPP α beschrieben [110]. Des weiteren scheint das sAPP β keinen positiven Einfluss auf die Langzeitpotenzierung zu haben [139], jedoch wurde für das Fragment ebenfalls eine stimulierende Wirkung auf axonales Wachstum beobachtet [140]. Vor kurzem wurde unter Wachstumsfaktorentzug ein neues N-terminales APP-Fragment (N-APP) von 35 kDa identifiziert, das an den DR6 (engl. *death receptor 6*), der zur TNF-Rezeptorfamilie gehört, binden und *in vitro* Axondegeneration und neuronalen Zelltod über Caspase 6 induzieren kann [74]. Interessanterweise scheint das N-APP nur aus dem sAPP β freigesetzt zu werden [74]. Meprin β wurde als potentiell relevante Protease identifiziert [141]; für die entstehenden N-APP-Fragmente mit 11 bzw. 25 kDa Masse konnte jedoch keine Toxizität auf primäre Neuronen detektiert werden [141]. N-APP ähnlicher Größe wurde unabhängig von vorangehender α - oder β -Sekretaseaktivität gefunden [142], während eine weitere Studie bei Wachstumsfaktorentzug *in vitro* nur eine starke Reduktion der APP-Prozessierung und kein neu entstehendes N-APP-Fragment beobachtete [143]. Bis jetzt konnte das N-APP von 35 kDa und seine proapoptotische Wirkung also nicht unabhängig bestätigt werden.

1.3.3 γ -Sekretase und sequenzielles Spaltungsmodell

Die γ -Sekretase ist für die regulierte Intramembranproteolyse (RIP) von APP verantwortlich. Die Regulation wird dabei über das *Shedding* durch α - und β -Sekretase ausgeübt, da nur Proteine mit kurzen extrazellulären Domänen von der γ -Sekretase als Substrat akzeptiert werden. Ein erster Hinweis darauf war die Beobachtung, dass die Spaltungseffizienz durch die γ -Sekretase negativ mit der Länge der Ektodomäne des Substrats korreliert [144]. Des weiteren ließen sich APP und Notch nur ohne lange luminale Domäne mit der γ -Sekretase koolisieren [145]. Zudem konnte auch für eine verwandte GxGD-Protease, SPPL2b, gezeigt werden, dass deren Schnitteffizienz für das Bri2-Substrat bei Verlängerung der Ektodomäne dramatisch abfällt [146] (siehe 1.7).

Detaillierte Informationen zur γ -Sekretase enthalten die nächsten Kapitel, an dieser Stelle wird zunächst auf die APP-Prozessierung durch die γ -Sekretase eingegangen. Im ersten sog. e-Schnitt spaltet das Enzym das APP- α CTF oder das APP- β CTF in der TMD nahe der cytosolischen Seite, wodurch die 50 oder 51 AS lange AICD freigesetzt wird [147–150]. Die Funktionen der AICD werden kontrovers diskutiert: Vorgeschlagen wurden v.a. eine regulatorische Rolle in Genexpression, Cytoskelettdynamik und Apoptose [151]. Ein YENPTY-Motiv im cytosolischen Teil der AICD wurde als Bindungsstelle für viele Interaktionspartner des APP vorgeschlagen (eine Übersicht bietet [151]). Gleich-

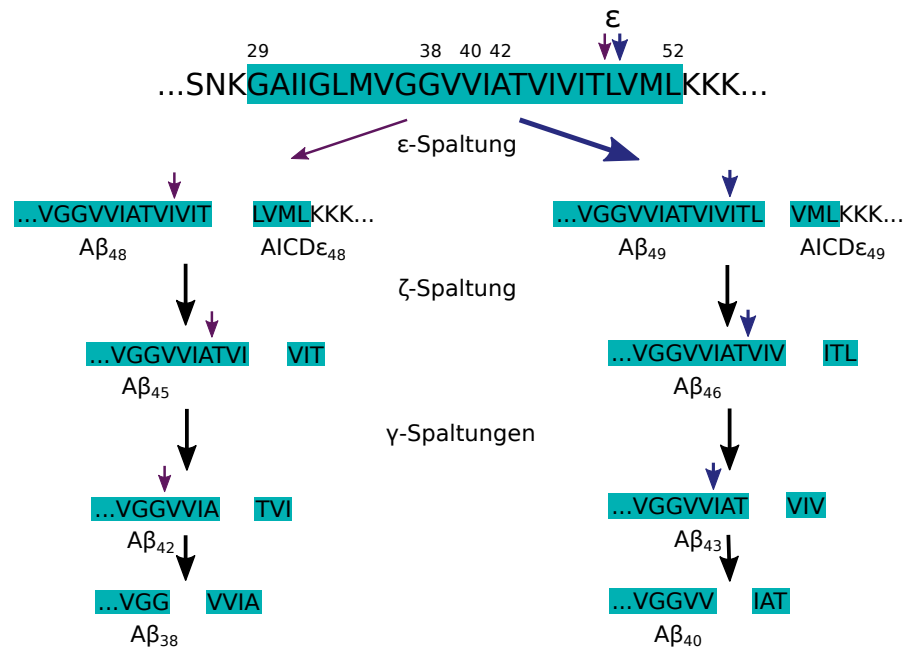


Abbildung 6: Schematische Darstellung der sequentiellen Spaltung des APP-βCTFs durch die γ-Sekretase. Links ist die Produktlinie ausgehend von AICD_{ε48} dargestellt, rechts die von AICD_{ε49} aus, die weitaus häufiger beschriftet wird. Es ist zu beachten, dass der letzte Schritt in der linken Produktlinie von Aβ₄₂ zu Aβ₃₈ für viele PS-FAD-Mutationen keine adäquate Beschreibung darstellt.

zeitig stimuliert dieses Motiv aber auch die Endocytose des APP [152, 153], so dass es schwierig ist, die verschiedenen Funktionen voneinander zu trennen. Besonders die Rolle der AICD als Transkriptionsregulator [154] ist umstritten [155, 156]. Die AICD wird sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* durch das IDE schnell abgebaut [50, 157], was eine Analyse ihrer Funktionen erschwert.

Nach dem Abtrennen der AICD spaltet die γ-Sekretase den in der Membran verbleibenden Teil der CTFs weiter, bis das Fragment kurz genug ist, um aus der Membran zu entweichen. Dabei werden im Falle des APP-αCTF die sogenannten p3-Fragmente sekretiert [89, 90], für die noch keine Funktion beschrieben wurde. Wenn zuerst die β-Sekretase das APP gespalten hat, verbleiben nach der Freisetzung der AICD 48 bzw. 49 AS lange Aβ-Peptide in der Membran, die von der γ-Sekretase weiter prozessiert werden, bis schließlich kurze Aβ-Spezies zwischen 37 und 43 AS Länge freigesetzt werden. Dabei stellt Aβ₄₀ bei der WT-γ-Sekretase etwa 75 - 85% der sekretierten Aβ-Spezies dar. Aβ₃₈ und Aβ₄₂ machen zusammen etwa 15 - 20% aus, während Aβ₃₇ und Aβ₄₃ in nur sehr geringen Mengen (je etwa 1%) detektierbar sind.

Nach und nach wurden längere Aβ-Peptide entdeckt, denen Spaltungen zwischen der

ϵ - und der γ -Schnittstelle entsprechen. Als erstes Intermediat zwischen ϵ - und γ -Schnittstelle wurde das $A\beta_{46}$ identifiziert [158], das ebenfalls durch γ -Sekretaseaktivität im sog. ζ -Schnitt entsteht und ein Vorläufer von $A\beta_{40}$ ist [159]. Mit modifizierter Harnstoff-Tris-Tricin-SDS-PAGE konnten weitere lange $A\beta$ -Spezies detektiert werden [160]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass aus $A\beta_{48}$ bevorzugt $A\beta_{42}$ sowie aus $A\beta_{49}$ bevorzugt $A\beta_{40}$ entsteht [161], und Inhibitorstudien deuteten darauf hin, dass die gleiche γ -Sekretaseaktivität für ϵ -, ζ - und γ -Spaltung verantwortlich ist [162]. All diese Befunde führten zur Etablierung des sequenziellen Spaltungsmodells [163], das für WT- γ -Sekretase große Akzeptanz hat. Danach gibt es zwei Produktlinien, ausgehend von den ϵ -Spaltungen nach AS 49 und 48 (siehe Abb. 6), wobei die nach AS 49 die Hauptschnittstelle ist [164]. Im Verlauf dieser Produktlinien werden jeweils Tripeptide freigesetzt, was zu den Endprodukten $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$ führt. $A\beta_{38}$ soll hauptsächlich aus $A\beta_{42}$ durch Abspaltung eines Tetrapeptids entstehen [163]. Dies wurde jedoch nur für WT- γ -Sekretase gezeigt; für viele PS-FAD-Mutationen sind $A\beta_{42}$ und $A\beta_{38}$ nicht gekoppelt, d.h. eine Zunahme von $A\beta_{42}$ /Gesamt- $A\beta$ geht meist nicht mit einer Abnahme von $A\beta_{38}$ /Gesamt- $A\beta$ einher [165–167].

Als interessanter Gesichtspunkt sei noch erwähnt, dass die Lipidumgebung einen starken Einfluss auf die γ -Sekretaseaktivität haben kann. Zum einen findet die $A\beta$ -Produktion wahrscheinlich hauptsächlich in (womöglich nur transient existierenden) Mikrodomänen der Membran statt, die reich an Cholesterin und Sphingomyelin sind (sog. *lipid rafts*) [168,169]. Des weiteren moduliert Cholesterin die $A\beta$ -Produktion [170]; dies könnte aber auch ein indirekter Effekt des veränderten Transports von APP sein [171] (siehe 1.3.5). Zum anderen konnte aber kürzlich mit aufgereinigter γ -Sekretase und Rekonstitution in Vesikel mit definierter Lipidzusammensetzung gezeigt werden, dass die γ -Sekretaseaktivität direkt von der Lipidumgebung beeinflusst wird [172–174]. Dabei ist besonders hervorzuheben, dass bei Verlängerung der Fettsäureketten und damit Zunahme der Membrandicke $A\beta_{42/43}$ /Gesamt- $A\beta$ signifikant abnimmt, sogar für eine aggressive FAD-Mutante wie PS1 L166P [173].

1.3.4 Einfluss der APP- β CTF-Dimerisierung auf die Spaltungsaktivität der γ -Sekretase

Helixpackungsmotive innerhalb von Membranen bestehen meist aus einer AS mit kurzer Seitenkette (wie Glycin, Alanin, Serin, Threonin oder Prolin), gefolgt von drei aliphatischen AS und einer weiteren AS mit kurzer Seitenkette [176,177], wobei das GxxxG-Motiv am häufigsten anzutreffen ist [177,178]. Das APP- β CTF besitzt wie eine beträchtliche Anzahl anderer γ -Sekretasesubstrate konsequente GxxxG-Motive in der TMD nahe der Ektodomäne [179]. Dieses potentielle Dimerisierungsmotiv in APP reicht von Gly-

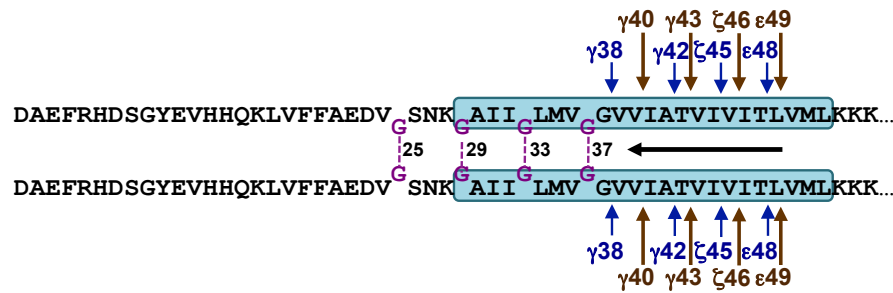


Abbildung 7: Die vorgeschlagene Dimerisierung des APP-βCTF über GxxxG-Motive. Munter *et al.* [175] postulierten ein Modell, nach dem die γ -Sekretaseaktivität durch Dimerisierung des APP-βCTF über GxxxG-Motive moduliert wird. Dabei könne die γ -Sekretase umso besser zu kürzeren A β -Peptiden “durchschneiden”, je schwächer die Dimerisierung ist. In blau und braun sind die beiden Produktlinien nach dem sequenziellen Spaltungsmodell eingezeichnet. Die Richtung der Spaltungsabfolge durch die γ -Sekretase ist durch den schwarzen Pfeil angedeutet.

ein 25 über Glycin 29 (für das die TMD-Grenze von APP annotiert ist) und Glycin 33 bis Glycin 37 (siehe Abb. 7). Mittels eines Dimerisierungsassays konnte in bakteriellen Membranen bestätigt werden, dass ein A β_{29-42} -Peptid dimerisiert, während bestimmte Mutanten des Glycin 29 und Glycin 33 in diesem System weit schwächer dimerisieren [175]. Dabei nahm die Dimerisierungsstärke von der G29A- über die G33A- und die G29A/G33A- bis zur G33I-Mutante hin ab. Interessanterweise korrelierte eine Veränderung im Spaltungsmuster der γ -Sekretase mit der Abnahme der Dimerisierungsstärke: Wurde die Dimerisierung durch Mutation des Glycin 29 und/oder des Glycin 33 geschwächt, war A β_{38} /Gesamt-A β erhöht und A β_{42} /Gesamt-A β erniedrigt [175]. Zudem wurden vermehrt kurze A β -Peptide wie A β_{34} und A β_{37} produziert. Aufgrund dieser Daten postulierten Munter *et al.* ein Modell, nachdem die Produktion von A β_{42} und A β_{38} strikt daran gekoppelt sind, wie stark die APP-TMD-Helices miteinander interagieren.

1.3.5 Abfolge und Lokalisation der APP-Spaltungsprozesse

Auf seinem Weg durch den sekretorischen Transportweg (siehe Abb. 8) trifft das APP zuerst auf BACE1 im späten Golgi-Apparat, dann auf ADAM10 an der Plasmamembran und nach Reinternalisierung wiederum auf BACE1 in endosomalen Vesikeln, wo unter physiologischen Bedingungen die Hauptaktivität von BACE1 zu beobachten ist. Für die schwedische APP-FAD-Mutante (APP^{sw}, siehe 1.5), für die die β -Spaltung dramatisch erhöht ist, ist jedoch ein großer Teil der BACE1-Aktivität in späte Golgi-Kompartimente verschoben [181–183], ebenso wird bei Deletion des Internalisierungssignals das APP vermehrt durch ADAM10 gespalten [112]. Außerdem ist zu beachten, dass die α -Sekreta-

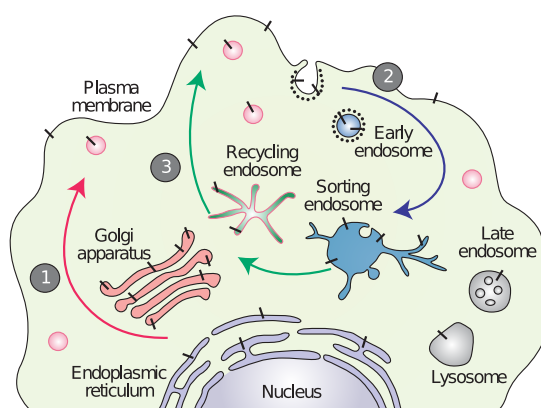


Abbildung 8: **Transport des APP entlang des sekretorischen Pfads und Abfolge der Spaltung durch α -, β - und γ -Sekretase.** Im ersten Schritt reift das APP entlang des sekretorischen Pfads und wird bis zur Plasmamembran transportiert (1), wo eine rasche Internalisierung in endosomale Vesikel erfolgt (2). Danach kann das APP zur Plasmamembran oder zum Golginetzwerk zurücktransportiert werden (3). Während die α -Sekretase das APP an der Zelloberfläche schneidet, ist die β -Sekretase im späten Golgi und in endosomalen Vesikeln aktiv. *Nucleus*, Zellkern; *Plasma membrane*, Plasmamembran; *Early endosome*, frühes Endosom; *Late endosome*, spätes Endosom; *Sorting endosome*, sortierendes Endosom; *Recycling endosome*, zurückkehrendes Endosom; *Lysosome*, Lysosom; Abbildung entnommen aus [180].

se das C99 auch zum C83 verkürzen kann [184,185] und Überexpression von ADAM10 in Mäusen den A β -Spiegel im Gehirn im Vergleich zur WT-Situation reduzieren kann [106]. Die γ -Sekretase ist ebenfalls hauptsächlich in endosomalen Kompartimenten, jedoch auch an der Plasmamembran anzutreffen; sie akzeptiert beide CTFs und hat keinen Einfluss auf eine mögliche Konkurrenz zwischen α - und β -Sekretase.

1.4 Biochemie der γ -Sekretase

Der Begriff " γ -Sekretase" wurde zum ersten Mal im Jahr 1993 verwendet, um die proteolytische Aktivität zu beschreiben, die APP in der TMD schneidet [187]. Heute ist klar, dass die γ -Sekretase für die Intramembranproteolyse von einer Vielzahl an Typ I-Transmembranproteinen verantwortlich ist [179] (siehe 1.4.4). Dieser Enzymkomplex besteht aus vier Proteinen: Presenilin 1 oder 2, A Φ H-1aS/1aL oder 1b (engl. *anterior pharynx defective phenotype 1*), PEN-2 (engl. *presenilin enhancer-2*) und Nicastrin (siehe Abb. 9). Die vier Komponenten liegen im Komplex wahrscheinlich in einer 1:1:1:1 Stöchiometrie vor [188]. Alle vier Untereinheiten sind integrale Membranproteine und notwendig, aber auch ausreichend für die proteolytische Aktivität der γ -Sekretase [189–192].

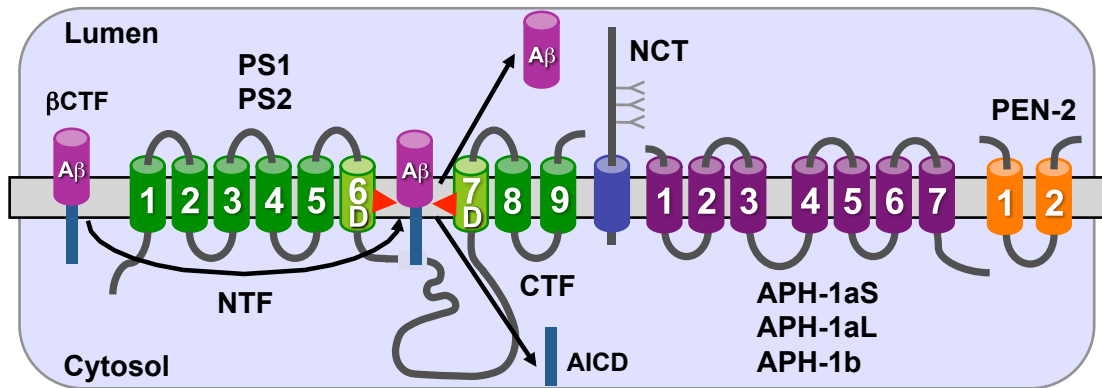


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Zusammensetzung des γ -Sekretasekomplexes einschließlich der amyloidogenen Prozessierung des APP- β CTF. Die Abbildung zeigt die mature Form des Komplexes, mit in der Ektodomäne glykosyliertem Nicastrin (NCT) und in das N-terminale (NTF) und das C-terminale Fragment (CTF) (auto)endoproteolysiertem Presenilin 1 bzw. 2 (PS1, PS2). Die PS-TMDs 6 und 7, die die beiden katalytischen Aspartate (D) enthalten, sind hell hervorgehoben. Modifiziert nach [186].

Das berechnete Molekulargewicht eines 1:1:1-Komplexes beträgt etwa 200 bis 250 kDa, jedoch läuft der γ -Sekretasekomplex sowohl aus solubilisierten Membranen als auch in aufgereinigter Form in Nativgelelektrophorese bei etwa 500 kDa [157, 188, 193–195]. Dies bedeutet, dass der Komplex entweder insgesamt dimerisiert oder dass zusätzliche Kofaktoren (siehe 1.4.3) zusammen mit den vier obligatorischen γ -Sekretaseuntereinheiten einen übergeordneten Komplex bilden. Durch Raster-Transmissionselektronenmikroskopie (STEM, engl. *scanning transmission electron microscopy*) wurde die Masse des Komplexes auf 230 kDa geschätzt [196]. Strukturmodelle der γ -Sekretase wurden bis dato durch verschiedene Elektronenmikroskopie-Techniken mit einer Auflösung von 12 bis 22 Å gewonnen [196–198], da es bisher nicht gelang, die γ -Sekretase für eine Röntgenstrukturanalyse zu kristallisieren. Alle drei Strukturen zeigen den Komplex als sphärischen Partikel von etwa 100 Å mit einer [198] oder mehreren [196, 197] wasserzugänglichen Kavitäten von etwa 40 Å Tiefe, wobei das aktive Zentrum, visualisiert durch einen goldmarkierten gebundenen Übergangszustandsanalog-Inhibitor, in eine dieser Kavitäten ragt [198]. Durch chemische Querverknüpfung von endogenen Cysteinen und Lysininen sowie Koimmunpräzipitationsstudien konnte zudem die relative Anordnung der Proteine zueinander im Komplex besser verstanden werden [199] (siehe Abb. 10), wobei weitere Interaktionen, die mit dieser Methode nicht detektiert werden können, vorhanden sein können.

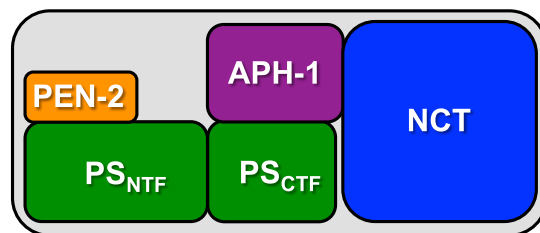


Abbildung 10: **Modell der Anordnung der Proteine im γ -Sekretasekomplex, abgeleitet von chemischen Querverknüpfungsstudien.** Alle sich im Schema direkt berührenden Proteine haben direkten Kontakt bzw. befinden sich in engem Abstand von maximal 10-12 Å. Es ist zu beachten, dass weitere Interaktionen existieren können, die mit den eingesetzten Längen der Quervernetzer nicht detektiert werden können. Modifiziert nach [199].

1.4.1 Komponenten des γ -Sekretasekomplexes

1.4.1.1 Presenilin (PS)

Die Preseniline wurden mit der Identifikation von PS1 [200, 201] sowie PS2 [202, 203] als "Alzheimer-Gene" entdeckt. In Säugetieren gibt es zwei Homologe, PS1 und PS2, die etwa 63% Sequenzidentität aufweisen [204] und nicht innerhalb des gleichen γ -Sekretasekomplexes vorkommen [204–206]. Bei der Analyse von Familien mit Fällen der familiären Alzheimer Erkrankung wurden Mutationen der kodierenden Region des PS1 und des PS2 identifiziert (siehe 1.5), für die gezeigt werden konnte, dass sie $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ erhöhen und damit die γ -Sekretaseaktivität beeinflussen [44, 207–209]. Parallel dazu wurde entdeckt, dass Sel-12, das PS1-Homolog in *C. elegans*, essentieller Bestandteil des Notch-Signalwegs ist [210]. Weitere Hinweise auf die Funktion von PS1 als katalytische Untereinheit der γ -Sekretase ergaben sich aus der Analyse von PS1-defizienten Mäusen, die wegen des Defekts im Notch-Signalweg noch während der Embryonalentwicklung sterben [211–213]. In neuronalen Kulturen von diesen Mäusen fand sich eine starke Inhibition der γ -Sekretasespaltung von APP-CTFs: Sowohl $A\beta$ als auch das p3-Peptid waren in ihrer Konzentration stark erniedrigt, während die APP-CTFs akkumulierten [212–214]. Mäuse ohne PS2 hingegen zeigen nur milde Symptome, was auf eine untergeordnete Rolle bei der Prozessierung von Notch1 hindeutet [215, 216]. Inhibitoren gegen Aspartatproteasen hemmen die γ -Sekretaseaktivität [217, 218], was in Kombination mit Mutagenesestudien zur Identifikation der beiden katalytischen Aspartate in TMD 6 und 7 führte [216, 219, 220]. Des weiteren bestätigten Photoaffinitätsmarkierungsstudien mit Übergangszustandsanalog- [221, 222] sowie mit allosterischen Inhibitoren [223] gegen die γ -Sekretaseaktivität eine spezifische Bindung dieser Substanzen an PS1 und PS2.

Die Preseniline bilden eine Neun-TMD-Topologie aus, wobei der N-Terminus der cytosolischen und der C-Terminus der luminalen Seite zugewandt ist [224–229] (siehe Abb. 11). Diese ungewöhnlichen Aspartatproteasen besitzen anstatt der typischen D (T/S) G (S/T)-Motive neben einem konservierten Aspartat in TMD 6 ein GxGD-Motiv in TMD 7 [230]. Sie sind mit polytopischen Aspartatproteasen bakteriellen Ursprungs, den Typ 4-Prepilinpeptidasen (TFPP) [231] sowie den Preflagellinpeptidasen (PFP) [232], verwandt und teilen mit ihnen das GxGD-Motiv [231, 232]. Beide Glycine im GxGD-Motiv sind konserviert: An diesen Positionen wird nur eine Mutation zu Alanin akzeptiert, was die Notwendigkeit einer kurzen Seitenkette der AS an diesen Stellen zeigt [230, 233]. Interessanterweise verhalten sich sowohl die PS1 G382A- als auch die G384A-Variante wie FAD-Mutanten, d.h. $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ist für diese Mutanten erhöht, bis jetzt wurde aber nur die G384A-Mutante tatsächlich in Patienten gefunden [234]. Die x-Position toleriert auch weniger konservative Mutationen und steuert die Substratspezifität der jeweiligen GxGD-Protease [235] (unpublizierte Daten, B. Kretner und H. Steiner). Neben den Motiven um die katalytischen Aspartate existiert ein weiteres konserviertes Motiv, das PxL-Motiv (PAL in PS, ein *Alignment* von GxGD-Proteasen unterschiedlicher Herkunft findet sich in [236]), das für die γ -Sekretaseaktivität, jedoch nicht für die Stabilität des Komplexes von Bedeutung ist [237]. Es befindet sich höchstwahrscheinlich nahe des aktiven Zentrums in der wasserzugänglichen Pore und beeinflusst dessen Konformation [238–240]. Mehr Informationen zur Topologie von PS befinden sich im übernächsten Absatz.

Im Laufe der Reifung der γ -Sekretase wird PS in der Verbindung zwischen TMD 6 und 7 zu einem etwa 30 kDa großen NTF (sechs TMDs) und einem etwa 20 kDa großen CTF (drei TMDs) endoproteolytisch [241]. Neben einigen deutlichen Hinweisen [242–244] konnte durch die Rekonstitution der γ -Sekretase in Hefe gezeigt werden, dass PS sich höchstwahrscheinlich selbst spaltet [189]. Eine kürzlich erschienene Mutagenesestudie konnte darüber hinaus klar zeigen, dass die Endoproteolyse schrittweise und im Abstand von jeweils drei AS erfolgt, was stark an den sequenziellen Spaltungsmechanismus der γ -Sekretase bei APP erinnert und den Mechanismus der Autoproteolyse stark untermauert [245]. Die entstandenen Fragmente bleiben als Heterodimer in der maturen Form der γ -Sekretase assoziiert [204, 246–248] und sind stabiler als das Holoprotein [249, 250]. Funktionelle Implikationen einer fehlenden Endoproteolyse sind aber nicht vollständig geklärt, da es inaktive und aktive PS1-Mutanten mit gestörter Endoproteolyse gibt. In einer vor kurzem erschienenen Studie wurde gezeigt, dass ein rekombinant in Bakterien hergestelltes und aufgereinigtes PS1- Δ Exon 9 in bestimmten Lipidmischungen ohne die NCT, APH-1 und PEN-2 geringfügige artifizielle γ -Sekretaseaktivität besitzt [251]. Ob dieser Ansatz aber zur Kristallisation einer solchen

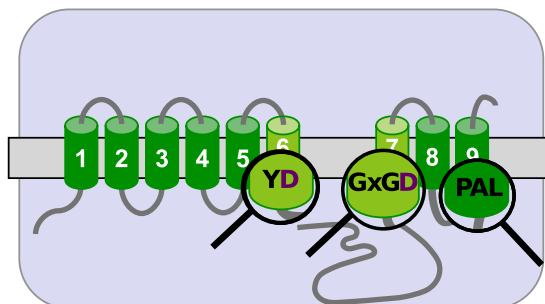


Abbildung 11: **Modell der Topologie von PS1.** Die TMDs 6 und 7 enthalten die katalytischen Aspartate und sind heller dargestellt; unter der Lupe sind die drei konservierten Motive in den TMDs 6, 7 und 9 zu sehen.

PS1-Mutante führen kann bleibt abzuwarten.

Analysen der Wasserzugänglichkeit von ausgewählten, künstlich eingeführten Cysteinen (SCAM, engl. *substituted cysteine accessibility method*) führten zu genaueren Modellen zur Topologie von PS1 in der Membran. Danach sind sowohl die TMDs 6 und 7 [252, 253] und Teile von TMD 9 um das PAL-Motiv [238, 240] Teil einer hydrophilen Pore. Auch die TMD 1, die in der AS-Sequenz weit von den katalytischen Motiven entfernt ist, befindet sich nahe dem aktiven Zentrum, denn ausgewählte AS aus der TMD 1 lassen sich mit dem GxGD- und dem PAL-Motiv querverknüpfen [254]. Ein Vergleich der Kristallstruktur von FlaK, einer Preflagellinpeptidase aus einer Archea [255], mit den biochemisch erlangten Strukturdaten für PS1 legt den Schluss nahe, dass die Bereiche um die drei konservierten Motive auch dreidimensional ähnlich angeordnet sein könnten [256]. Eine NMR-Strukturanalyse des PS1-CTFs in SDS-Mizellen bestätigte die Drei-TMD-Topologie [227], zeigte jedoch auch, dass Teile der vermeintlich unstrukturierten Sequenz vor TMD 7 unter diesen Bedingungen eine membran-assoziierte α -Helix ausbilden [257].

Den Presenilinen werden weitere Funktionen außerhalb des γ -Sekretasekomplexes zugeordnet, die unabhängig von der katalytischen Aktivität sind (eine gute Übersicht bietet [258]). Für PS wurde u.a. gezeigt, dass es den intrazellulären Transport von β -Catenin und damit den Wnt-Signalweg beeinflusst [259, 260]. Darüber hinaus wurde für PS eine Funktion als passiver Ca^{2+} -Kanal im ER vorgeschlagen [261], wobei eine vor kurzem erschienene Studie diese Hypothese anzweifelt [262]. Weiterhin wurde dem PS1-Holoprotein eine entscheidende Funktion in der Autophagie zugeordnet [263, 264], wo es durch Regulation der Glykosylierung einer vATPase-Untereinheit für die Ansäuerung der Autophagosomen verantwortlich sein soll [263].

1.4.1.2 Nicastrin (NCT)

NCT wurde als Interaktionspartner von PS1 bzw. PS2 durch Koimmunpräzitationsstudien identifiziert [265]. Gleichzeitig wurde es als unverzichtbare Komponente im Notch-Signalweg in *C. elegans* [266, 267] und *Drosophila* [268] sowie in der Maus [269] beschrieben. Dieses Typ I-Transmembranprotein ist mit etwa 110 kDa die größte Komponente des γ -Sekretasekomplexes und besitzt als einzige Untereinheit eine große Ektodomäne, die eine sehr thermostabile Struktur aufweist [270]. Mehrere Stellen in dieser Ektodomäne werden auf dem Weg durch den sekretorischen Pfad O- und komplex N-glykosyliert [157, 271, 272]; die komplexe Glykosylierung ist neben der (Auto)Endoproteolyse von PS ein Anzeichen für die Reifung des γ -Sekretasekomplexes [273], ist jedoch für die proteolytische Aktivität nicht notwendig [274–276].

Des Weiteren ist ein konserviertes DYIGS-Motiv in der Ektodomäne für die Reifung und die Aktivität der γ -Sekretase von Bedeutung. Mutationen in diesem Motiv schwächen die Interaktion von NCT mit PS und führen zu einer Reduktion der A β -Sekretion [265, 277]. Das DYIGS-Motiv ist Teil der etwa 200 AS großen DAP-Domäne (engl. *DYIGS and peptidase domain*), die in ähnlicher Form in einigen Aminopeptidasen zu finden ist [278]. Für das E333 in derselben Domäne wurde beschrieben, dass es für die für NCT vorgeschlagene Rolle als Substratrezeptor wesentlich ist [279]. Seine Carboxygruppe soll demnach mit dem freien N-Terminus der direkten γ -Sekretasesubstrate interagieren [279, 280]. Allerdings fanden andere Studien, dass durch Mutation des kritischen Glutamats wohl hauptsächlich die Reifung des Komplexes und nicht zwangsläufig die Substraterkennung gestört ist [281, 282]. Bei Verwendung von Antikörpern gegen die Ektodomäne wird aber eine reduzierte γ -Sekretaseaktivität bei normaler Komplexmaturierung beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Antikörper die Interaktion der NCT-Ektodomäne mit dem Substrat stören könnten [276, 283]. Klar ist jedoch, dass die gesamte Ektodomäne unabdingbar für die Maturierung des γ -Sekretasekomplexes ist [274, 284]. Außerdem wird die Prozessierung von Notch und APP durch teilweise Deletion der DAP-Domäne [277] sowie Mutation von einzelnen Cysteinen in der NCT-Ektodomäne [285] differenziell beeinträchtigt. Generell ist aber problematisch, dass der γ -Sekretasekomplex bei vielen untersuchten NCT-Mutanten mit nur sehr geringer Effizienz maturiert, so dass unklar ist, ob die Reduktion der γ -Sekretaseaktivität daher rührt, dass sich das Substrat und der im ER zurückgehaltene Komplex nicht treffen können, oder ob eine NCT-Substrat-Interaktion gestört ist [276, 285]. Deshalb ist es schwierig, aus diesen Studien für NCT die Funktion als (alleinigen) Substratrezeptor abzuleiten.

Bei Anwesenheit bestimmter Mutationen in PS scheint NCT für die γ -Sekretaseaktivität nicht nötig zu sein [286]. Sehr umstritten sind allerdings die Ergebnisse einer Studie, die Hinweise darauf geben will, dass die proteolytische Aktivität der WT- γ -Se-

ekretase nicht von NCT abhängig ist [287]. Problematisch ist dabei die geringe Stabilität des WT-PS1/PEN-2/APH-1-Subkomplexes [287], und die geringe Restaktivität, die nur unter Anwesenheit von Proteasominhibitor beobachtet werden kann, erscheint angesichts der Letalität der NCT-Defizienz in Modellorganismen nicht von Relevanz. Dieser Befund stellt aber dennoch ein weiteres Argument gegen die Substratrezeptorfunktion von NCT dar.

1.4.1.3 PEN-2

PEN-2 (engl. *presenilin enhancer 2*) wurde, wie der Name es andeutet, in einem genetischen Screen im Fadenwurm *C. elegans* identifiziert, in dem nach Genen gesucht wurde, die den Notch-Phänotyp der Deletionsmutante des PS1-Homologs Sel-12 verstärken [288]. Als PEN-1 wurde im gleichen Screen APH-1 (siehe 1.4.1.4) gefunden. Durch Koimmunpräzipitations- und RNAi-Experimente in Zellkultur wurde bestätigt, dass PEN-2 eine integrale Komponente des γ -Sekretasekomplexes ist [205]. PEN-2 ist mit einem Molekulargewicht von 12 kDa die kleinste Komponente des γ -Sekretasekomplexes und zeigt eine Haarnadeltopologie [289], wobei beide Termini ins Lumen bzw. in den extrazellulären Raum ragen (siehe Abb. 9). Dabei ist der proximale Teil der TMD 1 essentiell für die Endoproteolyse von PS [290], während der distale Bereich ein ER-Retentionssignal enthält und den Transport des assemblierten γ -Sekretasekomplexes aus dem ER reguliert [291] (siehe 1.4.2). Der C-Terminus von PEN-2 hingegen ist von besonderer Bedeutung für die Stabilität des Proteins sowie die Stabilisierung von PS-NTF und PS-CTF nach der Endoproteolyse [292–294]. Im γ -Sekretasekomplex interagiert PEN-2 mit dem PS-NTF [199] über dessen TMD 4 [295]. Mittels SCAM-Analyse wurde für den N-terminalen Teil der TMD 1 sowie für die hydrophile Schleife zwischen den beiden TMDs gezeigt, dass diese Bereiche von der luminalen Seite her wasserzugänglich sind, was bedeuten könnte, dass sie Teil der katalytischen Pore sind [296]. Der Phänotyp der Maus ohne PEN-2 entspricht einer vollen Notch-Defizienz, was eine physiologische Bestätigung der bedeutsamen Rolle von PEN-2 im γ -Sekretasekomplex ist [296].

1.4.1.4 APH-1

APH-1 (engl. *anterior pharynx defective phenotype 1*) wurde sowohl zusammen mit NCT (NCT als APH-2) [266] als auch mit PEN-2 (APH-1 als PEN-1) [288] in genetischen Screens für PS-Interaktionspartner in *C. elegans* gefunden (siehe 1.4.1.2 und 1.4.1.3). Außerdem wurde es als weitere essentielle Komponente im Notch-Signalweg in *C. elegans* identifiziert [297]. Zudem konnte für APH-1 eine Interaktion mit PS und NCT gezeigt werden, und dieser Komplex ist für die APP-Prozessierung notwendig [298]. Diese Ergeb-

nisse deuteten stark darauf hin, dass APH-1 eine Untereinheit des γ -Sekretasekomplexes ist. APH-1 ist mit sieben TMDs und nur sehr kurzen extramembranösen Bereichen ein sehr hydrophobes Protein [299]. Im Menschen existieren zwei APH-1-Homologe, APH-1a und -1b, von denen APH-1a zusätzlich in zwei *Splice*-Varianten, APH-1aS und 1aL (engl. *short* und *long*) auftritt [288, 297]. Ähnlich wie für PS1 und PS2 ist in jedem γ -Sekretasekomplex nur eine APH-1-Untereinheit vorhanden [206]. Somit können, in Kombination mit PS1 und PS2, sechs verschiedene γ -Sekretasekomplexe auftreten, die alle bei Anwesenheit von PS1- bzw. PS2-FAD-Mutationen pathogene $A\beta_{42}$ -Spiegel produzieren, unabhängig von der APH-1-Untereinheit [300]. In der Maus ist die Situation noch komplexer: Dort fand eine Genduplikation des APH-1b statt, so dass es zwei äquivalente Proteine zum humanen APH-1b, nämlich APH-1b und -1c gibt [301]. APH-1a ist ubiquitärer exprimiert als APH-1b und -1c und scheint auch im Gehirn sowie während der Embryonalentwicklung von größerer Bedeutung für die $A\beta$ -Produktion zu sein [302, 303]. Dieser Befund wird auch von Deletionsstudien in der Maus gestützt, wo der Verlust von APH-1a embryonal letal ist, während Mäuse ohne APH-1b und/oder APH-1c keinen auffälligen Phänotyp zeigen [304]. Als Tiere ohne APH-1b und -1c mit APPPS1-Tieren gekreuzt wurden, wurde eine reduzierte Plaquelastung ohne Notch-Defizienzphänotyp beobachtet [305], was jedoch nicht überrascht, wenn die γ -Sekretaseaktivität reduziert, aber nicht unter eine Schwelle abgesenkt ist, ab der der Notch-Signalweg nicht mehr aktiv ist.

1.4.2 Assemblierung des γ -Sekretasekomplexes

RNAi-Experimente und Untersuchungen von Zellen, denen eine der vier Komponenten des γ -Sekretasekomplexes fehlt, lieferten Aufschluss darüber, wie die Assemblierung des Komplexes erfolgt. Aus diesen Studien konnte das folgende Modell der Komplexassemblierung abgeleitet werden (siehe Abb. 12): Zunächst bindet immatures NCT im ER an APH-1, und dieser dimere Komplex bildet das Grundgerüst, an dem der weitere Aufbau des γ -Sekretasekomplexes stattfindet [284, 306, 307]. APH-1 ist im Gegensatz den anderen Untereinheiten bei Abwesenheit von PS nicht destabilisiert [306]. Die anderen drei Komponenten NCT, PS und PEN-2 werden schnell abgebaut, wenn jeweils eine Komponente des Komplexes fehlt [205, 308, 309]; so verursacht z.B. die APH-1a-Defizienz eine Reduktion der anderen drei Komplexpartner [206]. Im Anschluss bindet das PS-Holoprotein an den APH-1/NCT-Komplex. Für diesen trimeren Komplex kann keine γ -Sekretaseaktivität detektiert werden, und er wird, gemessen am immaturren NCT, immer noch im ER zurückgehalten [310, 311]. Erst wenn PEN-2 als letzte Komponente an den trimeren Komplex bindet, kann der vollständige Komplex das ER verlassen und bis an die Plasmamembran gelangen [273, 312]. Die Bindung von PEN-2, der limitie-

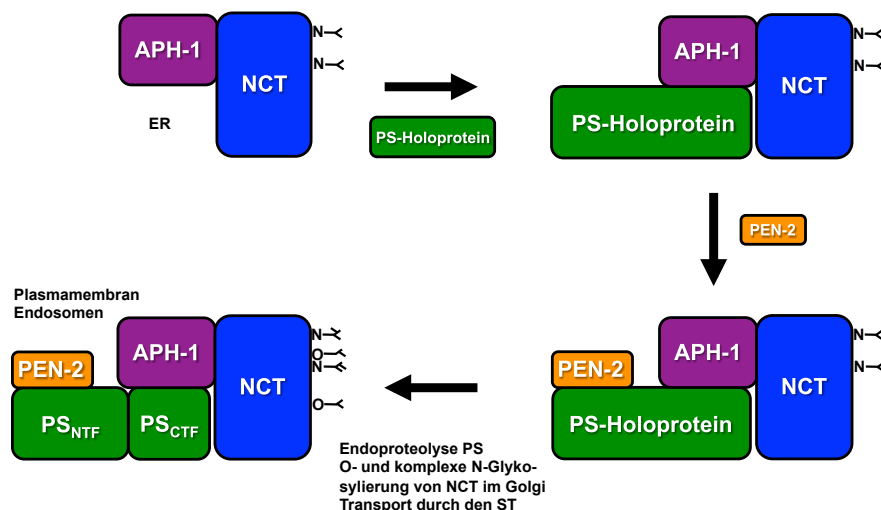


Abbildung 12: **Schematische Darstellung der γ -Sekretasekomplex-Assemblierung.** Zunächst bindet nur teilweise glykosyliertes NCT an APH-1, als dritte Komponente kommt das PS-Holoprotein dazu. Erst nach der Bindung von PEN-2 findet die (Auto)Endoproteolyse des PS-Holoproteins statt und der Komplex kann entlang des sekretorischen Transportwegs vollständig maturieren. *ER*, Endoplasmatisches Retikulum; *ST*, sekretorischer Transportweg.

rende Faktor in der γ -Sekretaseassemblierung, stimuliert die (Auto)Endoproteolyse des PS-Holoproteins [190,313] und erlaubt das Verlassen des ER, was die komplexe Glykosylierung von NCT und somit die vollständige Maturierung des Komplexes ermöglicht.

Über die Regulation der Assemblierung ist nicht viel bekannt. Der ER-Retentionsfaktor Rer1p, der nicht assemblierte Untereinheiten von Proteinkomplexen im ER zurückhält bzw. vom Golgi-Apparat zurückholt [314,315], scheint jedoch maßgeblich daran beteiligt zu sein. Dabei wurden zwei verschiedene Wirkmechanismen vorgeschlagen: Zum einen könnte Rer1p an immatures NCT binden und die Interaktion mit APH-1 behindern [316], zum anderen könnte Rer1p an PEN-2 binden, solange dieses noch nicht im γ -Sekretasekomplex integriert ist [291]. Außerdem existiert ein weiteres Retentionssignal in PS [317]. Sobald PEN-2 an den Komplex assoziiert, werden die beiden ER-Retentionssignale in PEN-2 und PS maskiert, und der Komplex kann das ER verlassen [317].

1.4.3 γ -Sekretase-Modulatorproteine

In den letzten Jahren wurde für einige Proteine eine Funktion als Modulator der γ -Sekretaseaktivität beschrieben. Hervorzuheben sind dabei besonders die beiden negativen Regulatoren Tmp21 [318] und CD147 [319] sowie der positive Regulator GSAP [320]. Dabei wurde für diese Proteine eine selektive Wirkung auf die A β - bei gleichzeitig unveränderter AICD-Produktion gezeigt [318–320]. Dies ist jedoch schwer mit dem sequen-

ziellen Spaltungsmodell in Einklang zu bringen und spricht eher für Mechanismen, in denen der A β -Spiegel nach der Produktion reguliert wird.

Tmp21 (Transmembranprotein mit 21 kDa Molekulargewicht) gehört zur Familie der Typ I-orientierten p24-Cargoproteine und ist ein Bestandteil der vesikulären Transportmaschinerie [321]. Dieses Protein konnte mit dem γ -Sekretasekomplex sowohl koimmunpräzipitiert [318] als auch koisoliert werden [195, 322]. Bei Depletion oder Herunterregulation von Tmp21 durch siRNA nahm die A β -Produktion im Vergleich zur Kontrolle ab [318]. Jedoch konnte Tmp21 nicht zusammen mit γ -Sekretasekomplex isoliert werden, der mit dem biotinylierten Übergangszustandanalog-Inhibitor L-685,458 gefällt wurde [195, 323]. Deshalb ist die Funktion von Tmp21 als γ -Sekretasekomplexkomponente [318] womöglich überbewertet. Neben einer Regulation der γ -Sekretaseaktivität wurde ein Einfluss von Tmp21 auf den Transport und die Maturierung von APP vorgeschlagen [323].

CD147 (auch Basigin genannt), ein Glykoprotein, das die Produktion und Sekretion von Matrixmetalloproteasen stimuliert, wurde als neben Tmp21 als weitere regulatorische Untereinheit der γ -Sekretase beschrieben [319]. Allerdings kann es ebenso wie Tmp21 nicht mit aktivem γ -Sekretasekomplex koisoliert werden [195]. Zudem lieferte eine weitere Studie starke Hinweise darauf, dass die Regulation des A β -Spiegels nicht auf einer Interaktion mit der γ -Sekretase, sondern auf einer Stimulation des A β -Abbaus beruht [324].

GSAP (γ -Sekretase aktivierendes Protein), das 16 kDa große C-terminale Fragment des uncharakterisierten PION-Proteins, wurde als molekulares Zielprotein des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib [325] identifiziert [320], der selbst [326] oder über Abbauprodukte [327] die A β -Produktion hemmen soll. Im Gegensatz zu Tmp21 und CD147 soll GSAP als positiver Regulator der γ -Spaltung fungieren. Eine Bestätigung der Relevanz des GSAP durch eine unabhängige Arbeitsgruppe bleibt jedoch abzuwarten.

1.4.4 Substrate der γ -Sekretase

Für die γ -Sekretase sind mittlerweile über 80 Substrate beschrieben (eine gute Übersicht bieten [179, 328]). Alle Substrate sind Typ I-Transmembranproteine mit kurzen N-terminalen extramembranösen Sequenzen. Zwei unbestätigte Ausnahmen sind ein Typ II-Transmembranprotein, die β 1,6-Acetylglukosaminyltransferase [329], die im Golgi-Apparat lokalisiert ist, und ein polytopisches Transmembranprotein, die Glutamatrezeptoruntereinheit 3 [330]. Da die Ektodomäne bei allen bisher beschriebenen Substraten zu groß für eine direkte Prozessierung durch die γ -Sekretase ist, muss diese durch eine andere Protease abgetrennt werden. Diese *Sheddasen* sind jedoch für viele γ -Sekretasesubstrate noch nicht beschrieben worden [179]. Viele Ektodomänen enthalten Berei-

che, die für die Zelladhäsion von Bedeutung sind, während der C-Terminus oftmals an Signaltransduktion und Genregulation beteiligt ist. Deshalb liegt der Schluss nahe, dass die γ -Sekretase mehr ist als ein "Proteasom der Membran" [331]. Die ungefähre Lokalisation der ϵ - sowie der γ -Schnittstellen innerhalb der Membran scheint ähnlich zu sein, jedoch konnten bis jetzt keine Konsensus-Erkennungssequenzen ermittelt werden. Des Weiteren ist auch der Mechanismus der Substraterkennung noch nicht aufgeklärt. Als gut untersuchte Beispiele sind neben den Mitgliedern der Notch- [332] und APP-Familie E- und N-Cadherin [333], ErbB4 [334], Neuregulin1 [335], Interleukin1-Rezeptor2 [336] und CD44 [337] als γ -Sekretasesubstrate zu nennen.

1.5 FAD-Mutationen und deren molekulare Mechanismen

In PS1 [201, 207–209, 338, 339] wurden bis heute 185 und in PS2 [202, 203, 340] 13 FAD-Mutationen identifiziert (die Zahlen wurden der Marc-Cruts-Datenbank entnommen, siehe www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/), die alle $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ erhöhen und fast gleichmäßig verteilt in der gesamten Proteinsequenz lokalisiert sind. Einige willkürlich ausgewählte PS1-FAD-Mutationen sind in Abb. 13 dargestellt. $A\beta_{43}$ wurde in den meisten Studien nicht untersucht, aber wahrscheinlich ist eine $A\beta_{43}$ -Erhöhung eher die Ausnahme. Umstritten ist die Hypothese, dass ein durch PS-FAD-Mutationen ausgelöster Aktivitätsverlust der γ -Sekretase auch entscheidend zur Entstehung der familiären Alzheimer Erkrankung beiträgt (sog. *loss-of-function*-Theorie) [341, 342]. Obwohl die meisten PS-FAD-Mutanten ebenso viel Gesamt- $A\beta$ wie das WT-Enzym produzieren, gibt es einzelne beschriebene Fälle von dramatischem Aktivitätsverlust, so z.B. bei der L435F-Mutante [343]. Erwähnenswert ist außerdem die vor kurzem identifizierte PS1-R278I-Mutante, die $A\beta_{43}/A\beta_{40}$ sowie $A\beta_{43}/A\beta_{42}$ stark erhöht und in ihrer Gesamtaktivität deutlich reduziert ist [45].

Die 33 bis jetzt gefundenen FAD-Mutationen im APP haben, verglichen mit FAD-Mutationen in PS1 und PS2, vielfältigere Effekte. Fast alle Mutationen lassen sich gemäß ihrer Wirkung zu einer von drei Gruppen zuordnen: i) Die Mutation erhöht $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, ii) die Mutation beeinflusst das Aggregationsverhalten von $A\beta$ oder iii) die Mutation bewirkt, dass das APP von der β -Sekretase vermehrt oder von der α -Sekretase seltener geschnitten wird, was eine erhöhte Gesamt- $A\beta$ -Produktion zur Folge hat. Interessanterweise scharen sich die Mutationen je nach Wirkung in verschiedenen Bereichen der APP-Sequenz: Die $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -erhöhenden Mutationen befinden sich hauptsächlich zwischen AS 43 und 47 des $A\beta$, also im Bereich der Schnittstellen der γ -Sekretase [344] (siehe 1.3.3), wie z.B. die London V46I-Mutante, die die erste identifizierte FAD-Mutation überhaupt war [345, 346]. Hingegen fördern Mutationen des E22 und D23, die die Ladung des $A\beta$ -Peptids ändern, die Bildung von Protofibrillen, wie z.B. die arktische Mutati-

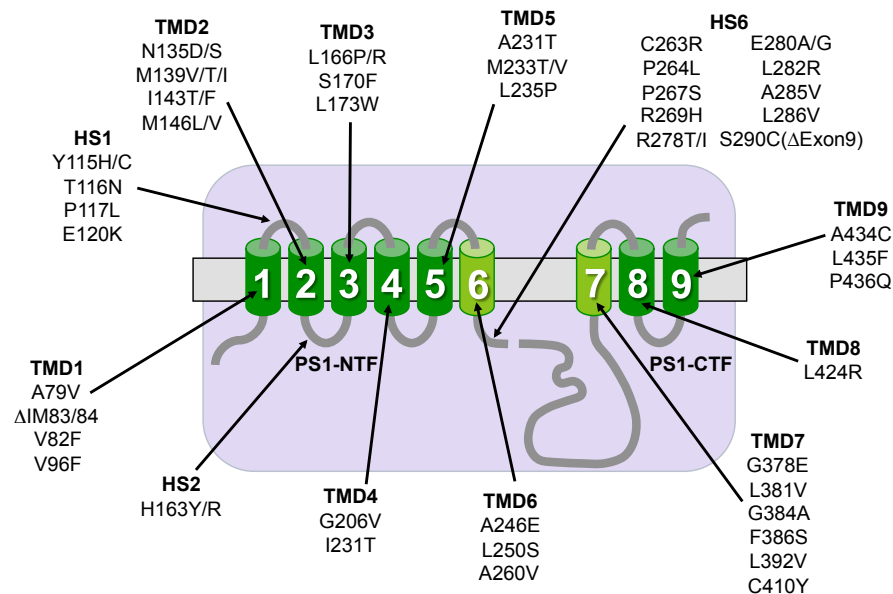


Abbildung 13: Schematische Darstellung von PS1 und der Lokalisation willkürlich ausgewählter FAD-Mutationen in PS1. Die Abbildung soll verdeutlichen, dass die Mutationen über das gesamte Protein verteilt sind. Lediglich in der großen hydrophilen Schleife des PS1-CTF sind mit zwei Mutationen im Vergleich zur restlichen Sequenz nur wenige FAD-Mutationen lokalisiert. *TMD*, Transmembrandomäne; *HS*, hydrophile Schleife.

on E22G [347]. In die dritte Gruppe fällt die schwedische Mutation $K_{670}M_{671}/N_{670}L_{671}$ (APP770-Nummerierung) [348,349], die bewirkt, dass die β -Sekretase das APP vermehrt prozessiert [348]. Zwei weitere, vor kurzem identifizierte Mutationen mit ähnlicher Auswirkung sind die E11K-Mutante, die die Spaltung an einer alternativen β -Schnittstelle (siehe 1.3.2) unterdrückt und somit auch zu vermehrter Aktivität der β -Sekretase bei der Hauptschnittstelle führt [350], sowie die K16N-Mutante, die zur Unterdrückung der α -Sekretasespaltung führt und die Toxizität des WT- $A\beta_{42}$ bei der Bildung von heteromeren Oligomeren verstärkt [351]. Auch eine als FAD-Mutation eingestufte APP-Genduplikation [352] führt zu erhöhter Gesamt- $A\beta$ -Produktion und zu früh auftretender Alzheimer Erkrankung, was darauf hindeutet, dass auch die absolute Menge der $A\beta$ -Peptide von Bedeutung ist (sog. Dosiseffekt). Dies wird auch vom Befund gestützt, dass bei Trisomie des Chromosoms 21 (Down Syndrom [353]), auf dem das für APP kodierende Gen lokalisiert ist, das Risiko für die Alzheimer Erkrankung deutlich erhöht ist. Eine Ausnahme bildet die flämische A21G-Mutante, die vermutlich über die Aufhebung der Produktinhibition der γ -Sekretase zu erhöhter $A\beta$ -Produktion führt [354].

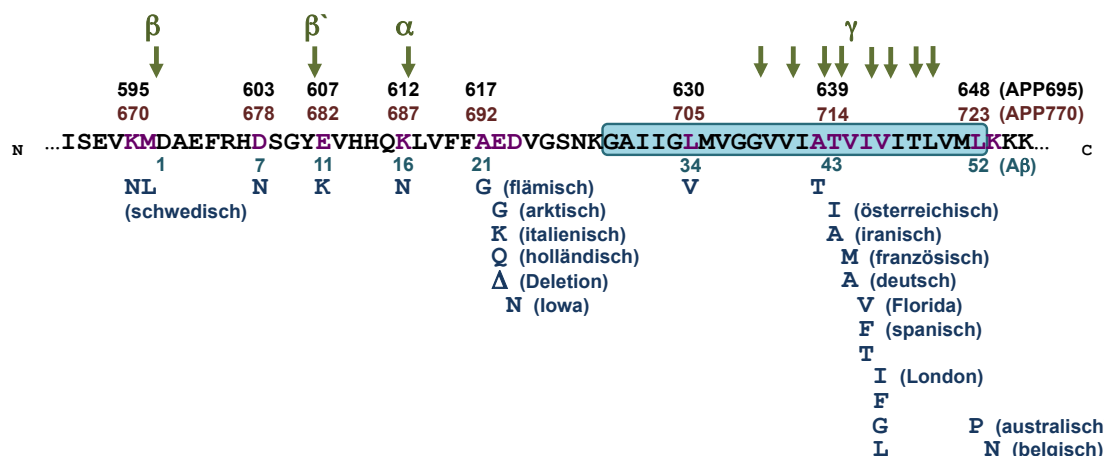


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Lokalisation der FAD-Mutationen im APP. Die TMD ist blau unterlegt, die Nummerierungen der Sequenz orientieren sich an der angegebenen APP-Isoform bzw. am A β . Wenn Eigennamen der Mutationen existieren, sind diese in Klammern angegeben. Von 33 entdeckten Mutationen sind 25 dargestellt, da der Rest entweder Genduplikationen sind oder die Mutation nachträglich als nicht-pathogen eingestuft wurde. Mit grünen Pfeilen sind die Schnittstellen von α -, β - und γ -Sekretase gekennzeichnet.

1.6 Pharmakologische Manipulation der γ -Sekretaseaktivität

1.6.1 γ -Sekretaseinhibitoren (GSIs)

Als Aspartatprotease ist die γ -Sekretase für Breitbandinhibitoren wie Pepstatin empfänglich [355]. Die ersten GSIs mit annehmbarer Spezifität für die γ -Sekretase und verwandte GxGD-Proteasen waren Übergangszustandsanaloge wie L-685,458 [218] (Strukturformel siehe Abb. 15) und III-31-C [222]. Für diese GSIs konnte gezeigt werden, dass sie PS-NTF und PS-CTF photoaffinitätsmarkieren, und bestätigten somit PS als katalytische Unter-einheit der γ -Sekretase [221,222]. Interessanterweise wurde für Übergangszustandsana-loga ein nicht-kompetitiver Wirkmechanismus beschrieben [355], was darauf hindeutet, dass es in der γ -Sekretase noch eine weitere Bindungsstelle für Substrate gibt. Des weite-ren konnte bei Präzipitation mit III-31-C das APP- α CTF mit dem γ -Sekretasekomplex koisoliert werden [145]. Weitere Arbeiten unterstützten die Idee einer Andockstelle für das Substrat nahe des aktiven Zentrums [356–360] und führten zur Entwicklung von al-losterischen helikalen Inhibitoren, die diese Andockstelle blockieren sollen [361]. Ferner wurde auch für β -helikale Peptide gezeigt, dass sie die γ -Sekretase inhibieren und mit α -helikalen Inhibitoren um die Bindung an die γ -Sekretase kompetieren können [362].

Eine weitere wichtige Klasse allosterischer GSIs ist die der Dipeptide mit DAPT [364,365] (Strukturformel siehe Abb. 15) als prominentesten Vertreter, aus deren Wei-terentwicklung die Gruppe der Diazepine wie Compound E [223] und Benzazepine wie

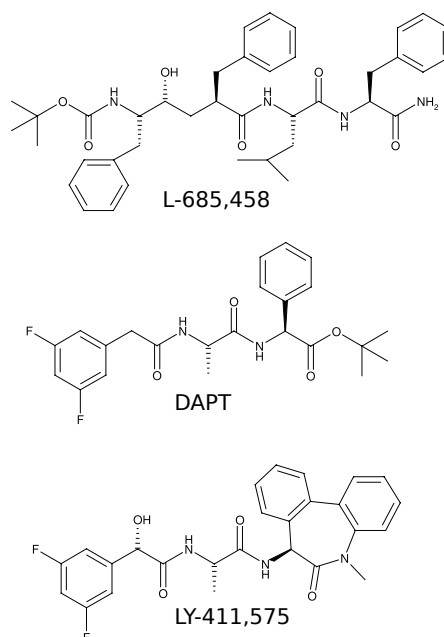


Abbildung 15: **Strukturformeln von drei gut charakterisierten γ -Sekretaseinhibitoren.** Gezeigt sind das Übergangszustandsanalogon L-685,458 und die dipeptidischen GSIs DAPT und LY-411,575. Modifiziert nach [363].

Semagacestat (LY-450,139) [366] und LY-411,575 [367, 368] (Strukturformel siehe Abb. 15, beide GSIs von Eli Lilly) hervorgingen. Für DAPT wurde das PS1-CTF als molekulares Zielprotein beschrieben, wobei DAPT als allosterischer GSI interessanterweise nicht an katalytisch inaktives PS binden konnte, während die Endoproteolyse keine Voraussetzung für die Bindung darstellt [369]. Außerdem war überraschend, dass DAPT nicht das PS2-CTF photoaffinitätsmarkieren konnte [369]. Auch die modifizierten Dipeptide Compound E und ein LY-411,575-Derivat binden an die katalytische Untereinheit der γ -Sekretase, jedoch an das PS1-NTF [370]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Bindungsstelle für dipeptidische GSIs an der Grenzfläche von PS1-NTF und PS1-CTF liegt, da schon in einer früheren Studie für ähnliche Inhibitoren beide PS1-Fragmente als Zielproteine gefunden wurden [223]. Interessanterweise wurde für dipeptidische GSIs auch gezeigt, dass sie an SPP, eine mit PS verwandte GxGD-Protease, binden [370], was auf eine konservierte allosterische Bindungsstelle dieser GSIs hindeutet.

Übergangszustandsanaloge sowie die bis hier beschriebenen allosterischen GSIs hemmen nicht selektiv die Spaltung der APP-CTFs, sondern auch die anderer γ -Sekretase-substrate [363]. Dies kann zu komplexen Nebenwirkungen führen, von denen die auf die Inhibition der NICD-Produktion zurückzuführenden Effekte wie Toxizität im Thymus [371] und im Gastrointestinaltrakt [368, 372, 373] dominieren. So musste eine kli-

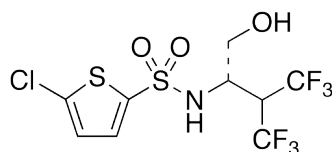


Abbildung 16: **Strukturformel des *Notch sparing* GSIs Begacestat.** Dieses Sulfonamid inhibiert in Zellkultur die A β -Produktion etwa 16-fach stärker als die NICD-Produktion [386]. Entnommen aus [386].

nische Phase III Studie mit Semagacestat trotz Nachweis der A β -Inhibition im Mausmodell [374] und vielversprechender Ergebnisse der Phase I und II Studien [375, 376] abgebrochen werden, da Patienten, die Semagacestat erhalten hatten, eine statistisch signifikant stärkere Verschlechterung der Leistung in kognitiven Tests zeigten als die mit Placebo behandelten Patienten [377, 378]. Die Inhibition der Prozessierung von weiteren γ -Sekretasesubstraten neben APP kann zu der komplexen Nebenwirkung der Verschlechterung kognitiven Fähigkeiten beigetragen haben [379]. Außerdem war das Risiko für Hautkrebs bei Semagacestat-Patienten erhöht, was auf eine Inhibition der Notch1-Spaltung hindeutet. Dennoch wird für bestimmte fortgeschrittene Krebserkrankungen eine Therapie mit GSIs in Erwägung gezogen, um den dort deregulierten Notch1-Signalweg zu inhibieren [380, 381]. Jedoch wurde eine klinische Studie mit GSI-Behandlung für refraktäre akute lymphatische Leukämie vom T-Zell-Typ aufgrund zu hoher Nebenwirkungen bei zu geringem klinischen Nutzen nach Phase I abgebrochen [382]. Klinische Studien für die Anwendung von GSIs bei fortgeschrittenen soliden Tumoren und Metastasen sind dahingegen noch andauernd [383–385].

Um die durch die Hemmung der Notch1-Spaltung verursachten Nebenwirkungen zu umgehen, wurden GSIs entwickelt, die die Produktion von A β deutlich stärker hemmen als die NICD-Produktion, d.h. ein “therapeutisches Konzentrationsfenster” zwischen der Inhibition der beiden Prozesse haben. Die für eine klinische Anwendung entwickelten *Notch sparing* GSIs gehören zur Klasse der Sulfonamide, hervorzuheben sind Begacestat [386, 387] (von Wyeth, Strukturformel siehe Abb. 16) und Avagacestat [388, 389] (von Bristol-Myers Squibb). Doch auch bei diesen GSIs ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Prozessierung anderer γ -Sekretase beeinträchtigt ist und ob das Fehlen von bestimmten ICDs oder eine Akkumulation von CTFs Nebenwirkungen zur Folge haben kann [390]. Außerdem ist unklar, inwieweit ein mögliches Überschießen der A β -Produktion bei Nachlassen der GSI-Wirkung die positiven Effekte des GSIs nivelliert, da akkumuliertes APP- β CTF vermehrt von der wieder aktiven γ -Sekretase prozessiert werden könnte (sog. *rebound effect*, diskutiert in [391]). Interessanterweise war der *re-*

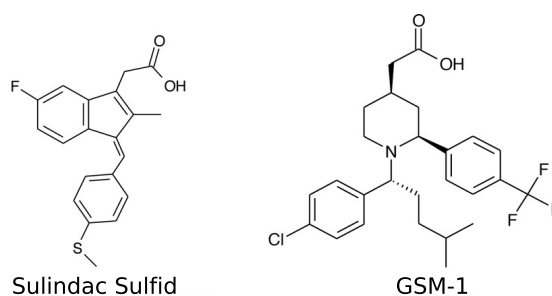


Abbildung 17: **Strukturformeln der beiden acidischen GSMs Sulindac Sulfid und GSM-1.** Während Sulindac Sulfid zur ersten Generation der GSMs gehört, ist GSM-1 ein abgeleiteter GSM ohne COX-Inhibitionswirkung mit etwa 400-fach besser Aktivität. Modifiziert nach [395].

bound effect bei Primaten nach einmaliger Gabe eines GSIs jedoch nur im Plasma und nicht im CSF zu beobachten [392]. Dennoch müsste für eine mögliche Therapie die Gabe des GSIs genau dosiert werden, um die richtige Konzentration im Gehirn zu gewährleisten, bei der die A β -, nicht jedoch die NICD-Produktion inhibiert ist. Eine neue Studie zeigte für Mäuse, die APP^{sw} überexprimieren, dass sowohl mit Semagacestat als auch mit Avagacestat behandelte ältere Tiere nach einer Woche Substanzgabe keine Verbesserung in kognitiven Tests zeigten; asymptotische junge Tiere verschlechterten sich sogar [393]. Diese Beobachtungen können wiederum mit der Inhibition von weiteren ICDs als auch mit der Akkumulation von APP- und weiteren CTFs erklärt werden. Des weiteren zeigen Mäuse bei chronischer GSI-Behandlung eine verringerte Dichte an *Spines* in Dendriten [394]. Bei APP-defizienten Tieren ist dieser Effekt nicht zu beobachten [394]. All diese Faktoren machen es sehr unwahrscheinlich, dass die Inhibition der γ -Sekretase zu einer anerkannten Therapie gegen die Alzheimer Erkrankung wird.

1.6.2 γ -Sekretasemodulatoren (GSMs)

Der Mechanismus der γ -Sekretasemodulation ist als alternativer Ansatz zur Inhibition seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschung und Substanzentwicklung. Als GSM wird allgemein eine Substanz bezeichnet, die die Zusammensetzung der β -Peptide verändert, dabei den Gesamt-A β -Gehalt aber unberührt lässt, d.h. γ -Spaltung nicht inhibiert. Im engeren Sinne sind Substanzen gemeint, die die Spiegel der kurzen A β -Peptide A β_{38} und z.T. auch A β_{37} erhöhen und gleichzeitig die Spiegel der längeren A β -Peptide A $\beta_{42(43)}$ und eventuell auch A β_{40} erniedrigen. GSMs haben im Vergleich zu GSIs einen entscheidenden Vorteil: Sie inhibieren nicht die ϵ -Spaltungsaktivität der γ -Sekretase [396,397]. Damit umgehen GSMs die Nebenwirkungen, die sich aus der Akkumulation von Substraten bzw. dem Fehlen der ICDs ergeben könnten. Als erste GSMs

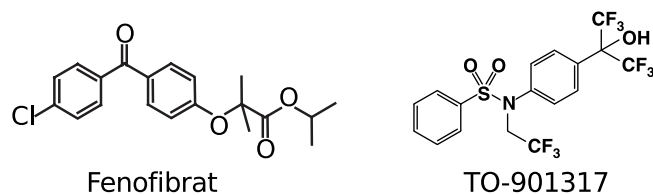


Abbildung 18: **Strukturformeln der beiden inversen GSMs Fenofibrat und TO-901317.** Die Substanzen stammen aus unterschiedlichen Wirkstoffklassen, wobei TO-901317 ein etwa 30-fach potenterer inverser GSM ist als Fenofibrat [404,405]. Strukturformel von Fenofibrat entnommen aus [406], von TO-901317 aus [405].

überhaupt wurden nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente (NSAIDs, engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*) beschrieben [396,398]. Diese Entdeckung beruhte auf der Beobachtung aus retrospektiven epidemiologischen Studien, dass unter Anwenden von bestimmten NSAIDs wie Ibuprofen, Indomethacin oder Sulindac Sulfid (Strukturformel siehe Abb. 17), nicht jedoch Aspirin oder Naproxen, die Prävalenz der Alzheimer Erkrankung geringer war im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden [399–402]. Diese Substanzen werden als entzündungshemmende Schmerzmittel eingesetzt und inhibieren die Cyclooxygenasen (COX) [403]. Alle als GSMs wirksame NSAIDs besitzen eine Carboxygruppe, die für die $A\beta_{42}$ -senkende Wirkung unabdingbar ist [391]. Bald darauf wurden auch inverse GSMs wie das NSAID Celecoxib sowie Fenofibrat [404] und der Leber-X-Rezeptor Agonist TO-901317 [405] (Strukturformeln siehe Abb. 18) entdeckt, die den $A\beta_{42}$ -Spiegel erhöhen sowie gleichzeitig den $A\beta_{38}$ -Spiegel erniedrigen und keine Carboxygruppe besitzen.

Ausgehend von dieser ersten Generation an GSMs ging die Substanzentwicklung zwei Wege (eine gute Übersicht über die GSMs der zweiten Generation bietet der Artikel von Oehrich *et al.* [391]). Als erster Ansatz wurde die Verbesserung von acidischen NSAID-ähnlichen Strukturen angestrebt, d.h. die Erhöhung der Wirksamkeit auf die $A\beta_{42}$ -Inhibition bei gleichzeitiger Reduktion der Wirksamkeit als COX-Inhibitoren. Das Ziel war dabei, die hohe Lipophilie der Substanzen, die eine schlechte Löslichkeit bedingt und Lebertoxizität zur Folge haben kann, zu reduzieren, sowie die Pharmakokinetik des GSMs, v.a. deren Gehirngängigkeit, zu optimieren. Beispielhaft für diese Gruppe ist GSM-1 aus der Klasse der acidischen Piperidine von Merck (Strukturformel siehe Abb. 17), der auch im ersten Teil dieser Dissertation verwendet wurde.

Die zweite Strategie waren großangelegte Screenings nach neuen, strukturell von NSAIDs unterscheidbaren GSMs ohne Carboxygruppe. Da geladene Substanzen die Blut-

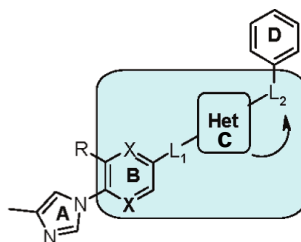


Abbildung 19: **Konsensus-Strukturformel der GSM-Klasse der verbrückten Aromaten.** *X*, C- oder N-Atom; *R*, optionale Methoxygruppe; *Het*, Heterocyclus; *L*_{1,2}, optionale Verbrückung, meist über Amine oder Methylene; der türkis hinterlegte Teil der Struktur ist meist planar. Modifiziert nach [391].

Hirn-Schranke nur begrenzt oder gar nicht passieren können, stellt die negativ geladene Carboxygruppe ein Problem für die Gehirngängigkeit der GSMs dar. Interessanterweise wurde dabei von mehreren Pharmaunternehmen unabhängig voneinander eine ähnliche Grundstruktur entdeckt [391]; Abb. 19 zeigt die Konsensus-Strukturformel. Charakteristisch für diese Substanzen sind vier konsequente, meist (hetero)aromatische Ringe, die z.T. direkt miteinander verbunden oder über sekundäre Amine miteinander verbrückt sind, wobei das Ringsystem B-C oft planar ist. Daher wird als Oberbegriff für diese Subgruppe der GSMs der zweiten Generation auch die Bezeichnung "verbrückte Aromaten" verwendet. Überraschenderweise teilen Substanzklassen unterschiedlicher Pharmafirmen ein Methylimidazolphenyl- bzw. Methylimidazolpyridinringsystem (in Abb. 19 Ringe A und B). Die zentralen Ringe weisen dagegen mehr Variationen auf: bei der TorreyPines-Serie [407] ist Ring C ein Thiazol, während die Grundstruktur von Eisai [408] anstelle von Ring C eine Zimtsäure bzw. eine Zyklisierung zum Piperidon aufweist. In Abb. 20 sind je zwei Derivate von diesen Serien gezeigt, die in dieser Arbeit als Kompetitoren in Photoaffinitätsmarkierungsassays verwendet wurden. Besonders interessant ist die Abweichung vom klassischen Profil, indem auch A β ₄₀ erniedrigt und auch A β ₃₇ erhöht wird, meist leicht verzögert zur Bewegung von A β ₄₂ und A β ₃₈ [407, 408]. Die deutlich bessere Pharmakokinetik und Gehirngängigkeit sowie die gute Aktivität machen diese nicht-acidischen GSMs zu vielversprechenden Kandidaten für die klinische Anwendung.

1.6.3 Bindungsstellen und Wirkmechanismus von GSMs

Erste kinetische Untersuchungen zeigten, dass von NSAIDs abgeleitete GSMs als nicht-kompetitive Inhibitoren für A β ₄₂ wirken, was einen allosterischen Wirkmechanismus dieser Substanzen etablierte [409, 410]. Außerdem konnte mittels FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) gemessen werden, dass sich bei Anwesenheit von Ibuprofen der Abstand

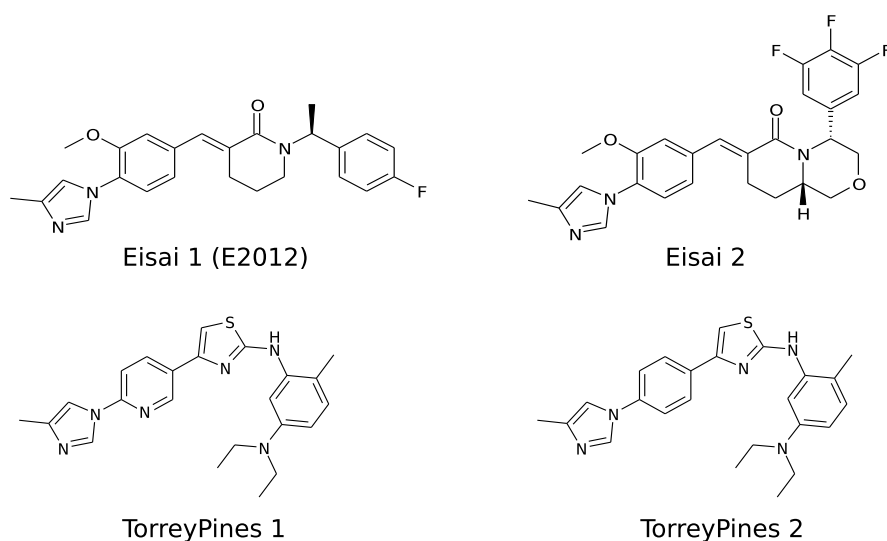


Abbildung 20: **Strukturformeln von ausgewählten verbrückten Aromaten.** Gezeigt sind jeweils zwei Derivate aus den Serien von Eisai und TorreyPines Therapeutics.

zwischen PS1-NTF und PS1-CTF vergrößert [411] und bei Anwesenheit von Fenofibrat ähnlich wie für PS1-FAD-Mutationen verringert [412]. Des weiteren erwiesen sich die meisten untersuchten PS-FAD-Mutanten als resistent gegen die $A\beta_{42}$ -senkende Wirkung der GSMs der ersten Generation [165, 166, 413, 414]. Durch Photoaffinitätsmarkierungsstudien wurde jedoch für Flurbiprofen und Fenofibrat, zwei GSMs der ersten Generation, das APP- β CTF als molekulares Zielprotein gefunden [406]. Die genaue Bindungsstelle wurde auf die AS 28 bis 36 (nach $A\beta$ -Nummerierung) eingegrenzt. In Übereinstimmung damit wurde die Wirkung dieser GSMs als spezifisch für APP beschrieben [415]. Wegen der offensichtlichen Diskrepanzen zu den bereits publizierten Studien wurde von Kukar *et al.* der Mechanismus des “trojanischen Pferdes” postuliert, nachdem NSAID-ähnliche GSMs zuerst an das Substrat und in der Folge auch an die γ -Sekretase binden [406]. Bei FRET-Analyse wurde zudem beobachtet, dass die vom GSM induzierte Konformationsänderung in PS nur bei Anwesenheit von Substrat detektiert werden kann [360]. Deshalb wurde vorgeschlagen, dass erst das Substrat an das Enzym binden muss, bevor der GSM ebenfalls binden kann [360]. Weitere indirekte Hinweise auf eine Interaktion von Sulindac Sulfid und davon abgeleiteten GSMs mit dem $A\beta$ -Peptid und APP- β CTF ergab sich durch Oberflächenplasmonen- und NMR-Spektroskopie [416, 417]. Richter *et al.* beobachten zudem, dass diese Substanzen die Dimerisierung eines $A\beta_{29-42}$ -Fragments in bakteriellen Membranen beeinflussen [416]. Trotzdem bleiben zwei Befunde mit dem Mechanismus der Substratbindung der NSAID-ähnlichen GSMs unvereinbar: So konnte die γ -Spaltung von Notch1 mit Sulindac Sulfid moduliert werden [397], und SPP, ei-

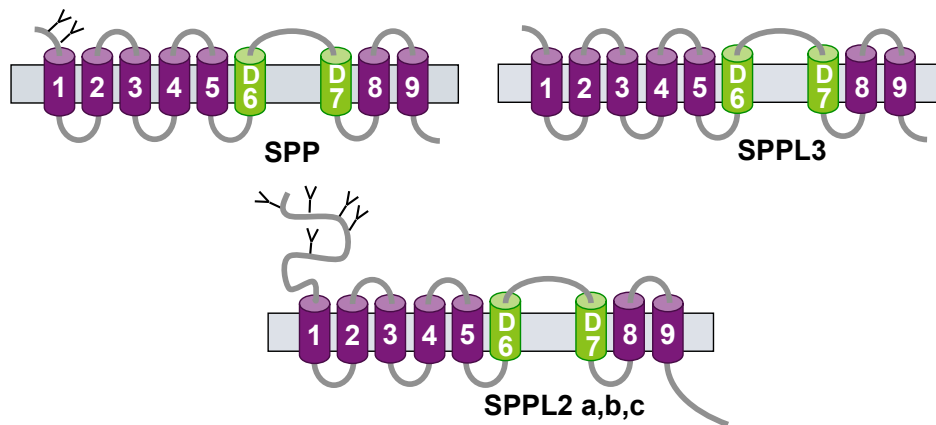


Abbildung 21: **Schematischer Vergleich der Proteasen der SPP(L)-Familie.** Die Topologie dieser Proteasen in der Membran ist im Vergleich zu PS invertiert. SPP und die SPPL2-Proteasen sind im N-terminalen Bereich mehrfach glykosyliert.

ne mit PS verwandte GxGD-Protease (siehe 1.7), sprach ebenfalls auf Behandlung mit diesem GSM an [418].

1.7 Signalpeptidpeptidase (SPP) und homologe Proteasen

Auf der Suche nach neuen PS-Homologen wurden bei Datenbankanalysen im menschlichen Genom vor etwa zehn Jahren die Gene für SPP sowie für vier weitere SPP-ähnliche Proteasen gefunden: SPPL2a, 2b, 2c und SPPL3 [419–421] (siehe Abb. 21). Diese gehören wie auch PS zur Familie der GxGD-Intramembranaspartatproteasen und besitzen ebenfalls neun TMDs. Weitere Gemeinsamkeiten sind die beiden Motive um die katalytischen Aspartate in Form des YD und des GxGD-Motivs in TMD 6 und 7 sowie dem PAL-Motiv in TMD 9 [419–421]; außerhalb dieser Bereiche besteht aber nur eine geringe Sequenzhomologie zu PS. Ein entscheidender Unterschied zu PS ist außerdem, dass SPP und SPPL-Proteasen nicht endoproteolytisch werden und auch keine Kofaktoren für die Aktivität oder die Maturierung benötigen. Auffällig ist des Weiteren die im Vergleich zu PS invertierte Topologie in der Membran [422]; im Einklang damit steht die Beobachtung, dass SPP und SPPL-Proteasen nur Typ II-Transmembranproteine spalten können [423].

SPP ist für den Abbau der Signalpeptide verantwortlich, nachdem die Signalpeptidase diese vom N-Terminus von ins ER translozierten Proteinen abgetrennt hat [424]. Diese Hauptfunktion von SPP erklärt auch deren Lokalisation im ER. Für die SPPL-Proteasen konnte bis jetzt für SPPL2a und 2b sowie für SPPL3 gezeigt werden, dass diese proteolytische Aktivität besitzen. Mehrere Substrate scheinen sowohl von SPPL2a als auch SPPL2b geschnitten zu werden, darunter der Fas-Ligand [425], $\text{TNF}\alpha$ [426, 427]

und Bri2 [428]. Wie für PS konnte auch für SPPL2b und das Substrat Bri2 gezeigt werden, dass das Abtrennen der großen Ektodomäne eine Voraussetzung dafür ist, dass SPPL2b Bri2 schneiden kann [146]. Für SPPL3 wurde bis jetzt noch kein physiologisches Substrat beschrieben; SPPL3 kann aber in einem *in vitro*-Assay ein SPP-Substrat spalten [429]. Insgesamt scheinen sich SPP und SPPL3 sowie die SPPL2-Proteasen untereinander ähnlich zu sein: während für SPPL3 eine Lokalisation im ER [430] bzw. im frühen Golgi-Apparat [427] beschrieben wurde, sind SPPL2a und 2b komplex glykosyliert und sowohl im Golgi-Apparat als auch an der Plasmamembran sowie in endosomalen Vesikeln vorhanden [427] und zeigen damit eine ähnliche Lokalisation wie die γ -Sekretase.

1.8 Zielsetzung der experimentellen Arbeit

Der experimentelle Teil dieser Arbeit widmete sich dem besseren Verständnis der Wirkungsweise und der molekularen Zielproteine von acidischen und nicht-acidischen GSMs. Um die Plauebildung im Rahmen einer potentiellen krankheitsmodifizierenden Therapie zu verlangsamen oder aufzuhalten, stellen GSMs eine Alternative zur Inhibition der γ -Sekretase dar, die sehr wahrscheinlich mit weit weniger Nebenwirkungen behaftet ist.

Im ersten Teil sollten APP-GxxxG-Mutanten sowie APP-FAD-Mutanten auf ihre A β -Bildung und auf ihr Reaktionsvermögen auf GSM-Behandlung hin untersucht werden. Für die GxxxG-Mutanten war publiziert, dass sie die Dimerisierung des APP- β CTFs schwächen und dies einen erhöhtes A β_{38} /Gesamt-A β sowie ein erniedrigtes A β_{42} /Gesamt-A β zur Folge hat [175]. Da gleichzeitig für den Bereich um das GxxxG-Motiv die Bindungsstelle von NSAID-ähnlichen GSMs bestimmt worden war [406], sollte mit der Untersuchung der Reaktionsfähigkeit der GxxxG-Mutanten auf GSM-Behandlung die Brücke zwischen den beiden Studien geschlagen und untersucht werden, ob die Dimerisierung einen Einfluss auf die Wirksamkeit der GSMs hat.

Im zweiten Teil sollte in Zusammenarbeit mit Hoffmann-La Roche Ltd. die GSM-Klasse der Aminopyrimidine in Zellkultur und im zellfreien System charakterisiert werden. Ein weiteres wichtiges Vorhaben war die Bestimmung der molekularen Angriffspunkte der Aminopyrimidin-GSMs, denn zu Beginn der experimentellen Arbeit waren für die Klasse der verbrückten Aromaten, zu denen die Aminopyrimidin-GSMs gehören, noch keine Bindungsdaten bekannt. Da diese nicht-acidischen GSMs der zweiten Generation deutlich wirksamer als die Substanzen der ersten Generation sind und zudem wegen ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften das Potenzial haben, in der Zukunft im Patienten eingesetzt zu werden, war es von besonderer Bedeutung, die Wirkungsweise dieser Substanzen genauer zu charakterisieren sowie die Zielproteine aufzuklären.

2 Ergebnisse

2.1 Reaktion von APP-Substratmutanten auf GSM-Behandlung

2.1.1 Glycinmutanten in der G₂₉xxxG₃₃-Region des A β -Peptids sind überwiegend für GSM-Behandlung empfänglich

Im Jahr 2008 wurde die erste Studie zum molekularen Angriffspunkt von GSMs veröffentlicht: Kukar *et al.* fanden als Bindungsstelle für Flurbiprofen und Fenofibrat die AS 28 bis 36 der A β -Region im APP- β CTF und postulierten damit den neuartigen Wirkmechanismus der Substrat-bindenden niedermolekularen Enzyminhibitoren bzw. -modulatoren [406] (siehe 1.6.3). Dieser überraschende Befund wurde durch SPR- und NMR-Spektroskopie gestützt [416, 417]. Interessanterweise ist die vorgeschlagene Bindungsstelle Teil eines GxxxG-Motivs, das über die Dimerisierung einen Einfluss auf die Spezifität der γ -Sekretase haben soll: Bei Schwächung der Dimerisierung durch Mutagenese eines Glycins wurde ein erhöhtes A β ₃₈/Gesamt-A β sowie ein erniedrigtes A β ₄₂/Gesamt-A β beobachtet [175]. Aus diesen Ergebnissen entstand ein Modell, nach dem NSAID-ähnliche GSMs bei Bindung an das APP- β CTF dessen Dimerisierung verhindern und dadurch die γ -Sekretaseaktivität modulieren [416, 417]. Um dieses Modell zu überprüfen, wurden die Aminosäuren Glycin 29 und Glycin 33 des GxxxG-Motivs mutiert und die Auswirkungen der Mutationen auf die Modulierbarkeit der γ -Sekretaseaktivität durch GSMs untersucht.

Die Untersuchung dieser Mutationen im Zellkultursystem birgt einige potentielle Probleme: Da die produzierten A β -Peptide selbst die Mutationen tragen, kann dies Auswirkungen auf die gemessenen Spiegel der einzelnen A β -Spezies haben. Nach ihrer

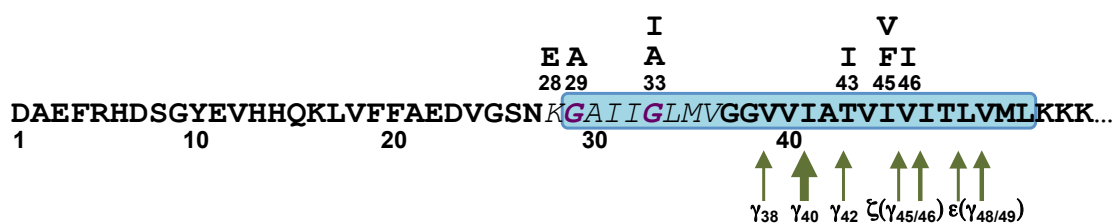


Abbildung 22: **Ausschnitt aus der APP-Sequenz mit der A β -Region und der TMD.** Die Nummerierung beginnt am N-Terminus des A β -Peptids, die Pfeile zeigen die γ -Sekretaseschnittstellen an. Die TMD ist blau unterlegt, die vorgeschlagene Bindungsstelle der NSAID-ähnlichen GSMs ist kursiv gedruckt [406]. Die beiden Glycine 29 und 33 sind lila dargestellt, die für diese Studie ausgewählten synthetischen und FAD-Mutationen sind über der Sequenz aufgeführt. Alle Mutationsbezeichnungen für das APP- β CTF sind an der A β -Nummerierung orientiert.

Freisetzung durch die γ -Sekretase könnten diese Peptide damit prinzipiell veränderter Sekretion, (selektiv) vermehrtem Abbau oder verstärkter Aggregation unterliegen. Um den direkten Einfluss der Mutationen auf die Aktivität der γ -Sekretase bestimmen zu können, wurden daher Aktivitätsassays mit rekombinant hergestellten APP- β CTF-WT-Substrat bzw. -Substratmutanten (im folgenden als C100-His₆ bezeichnet) im zellfreien System durchgeführt. Dabei wurde native, endogene γ -Sekretase aus HEK293-Zellen nach der Vorschrift von Winkler *et al.* [195] anhand ihrer proteinbiochemischen Eigenschaften aufgereinigt und in Lipidvesikel rekonstituiert, um das Enzym wieder in eine natürliche Umgebung zu bringen und damit die enzymatische Aktivität wiederherzustellen.

Zunächst wurde überprüft, ob die γ -Sekretase im zellfreien System für APP- β CTF-Substratmutanten, die in Zellkultur schon gut untersucht waren, ein ähnliches Profil an A β -Peptiden freisetzt wie im zellulärem Kontext. Dazu wurden die I45F- und die V50F-Mutanten ausgewählt, die außerhalb der Region des sekretierten A β liegen und im Vergleich zum WT extreme Änderungen in den produzierten A β -Peptiden zeigen. Für beide Mutanten konnte ein ähnliches Profil an A β -Peptiden wie in Zellkultur beobachtet werden (Abb. 23) [431–433]. Die I45F-Mutante zeigte starke Änderungen im Vergleich zum WT, sowohl A β ₃₈/Gesamt-A β als auch A β ₄₂/Gesamt-A β war deutlich erhöht. Ebenso konnte für die V50F-Mutante die erwartete Absenkung von A β ₃₈/Gesamt-A β und

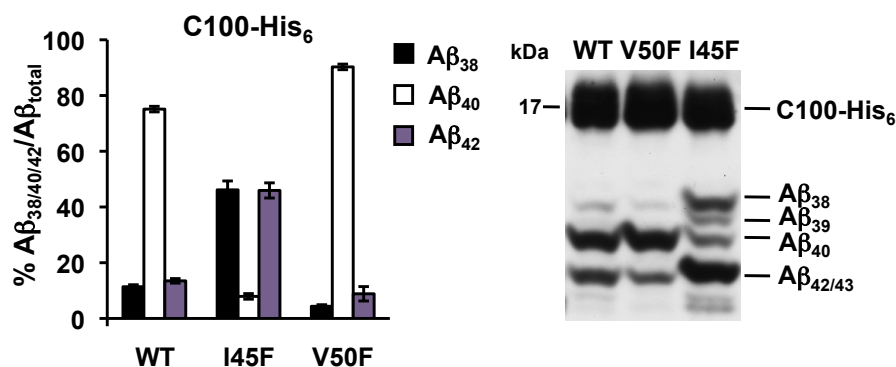


Abbildung 23: Zellfreie γ -Sekretaseaktivitätsassays bestätigen die im Zellkultursystem beobachteten A β -Profile für WT-, I45F- und V50F-Substrat. Aus HEK293-Zellen aufgereinigte, endogene γ -Sekretase wurde mit 0.5 μ M WT- bzw. I45F- sowie V50F-C100-His₆-Substrat inkubiert und die A β -Peptide im Elektrochemolumineszenz-Immunoassay (ECL-IA) gemessen (links). Die A β -Spezies sind als Prozentsatz am Gesamt-A β (A β ₃₈ + A β ₄₀ + A β ₄₂) aufgetragen (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 4). Des Weiteren wurden die A β -Peptide mittels SDS-PAGE (11%iges Harnstoff-Tris-Bicin-Gel) aufgetrennt und mittels Immunoblot (IB) detektiert (rechts). Es ist zu beachten, dass auf dem IB die beiden Mutanten in umgekehrter Reihenfolge aufgetragen sind.

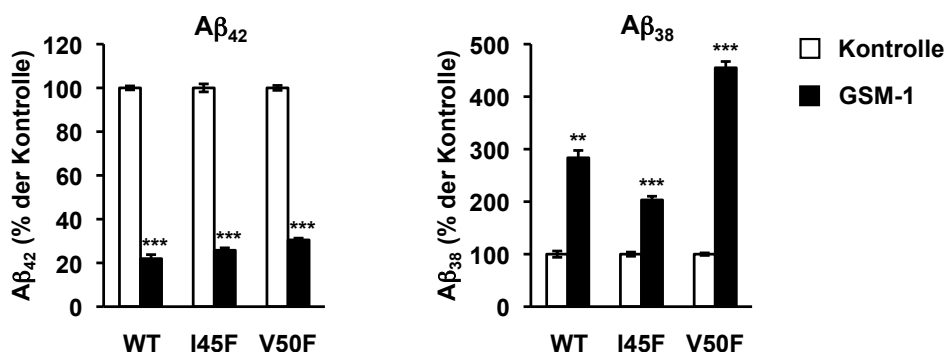


Abbildung 24: Die Modulierbarkeit der A β -Produktion für WT-, I45F- und V50F-Substrat kann im zellfreien System reproduziert werden. Aus HEK293-Zellen aufgereinigte, endogene γ -Sekretase wurde mit 0.5 μ M WT- bzw. I45F- sowie V50F-C100-His₆-Substrat in der Anwesenheit von Kontrolle (DMSO) bzw. 2.5 μ M GSM-1 inkubiert und die A β -Peptide im ECL-IA gemessen. Die A β -Konzentrationen bei GSM-1-Behandlung wurden auf die Konzentrationen bei Kontrollbedingungen normalisiert und in % aufgetragen (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3). Wenn nicht anders angegeben, wurde zur statistischen Analyse der zweiseitige, ungepaarte t-Test verwendet, die Signifikanzniveaus sind p \leq 0.05 (*), p \leq 0.01 (**), und p \leq 0.001 (***).

A β_{42} /Gesamt-A β beobachtet werden. Bei Behandlung mit 2.5 μ M GSM-1 konnte die Produktion von A β_{38} und A β_{42} für beide Substrat-Mutanten in ähnlichem Ausmaß wie für das WT-Substrat moduliert, d.h. A β_{38} erhöht und A β_{42} erniedrigt werden (Abb. 24). (Es sei darauf hingewiesen, dass der IC₅₀ (A β_{42}) für GSM-1 im zellfreien System etwa 14-fach höher ist als in Zellkultur [395] (siehe 4.1.3). Winkler *et al.* [195] beobachteten im zellfreien System bei 2.5 μ M GSM-1 etwa 50% Reduktion von A β_{42} im Vergleich zur Kontrolle.) Dabei wurde für den A β_{38} -Anstieg auch das relative Ausmaß im Vergleich zum Zellkultursystem reproduziert: Während die Zunahme von A β_{38} für die I45F-Mutante geringer als für das WT-Substrat ausfiel, konnte die Produktion von A β_{38} für die V50F-Mutante deutlich stärker als für das WT-Substrat erhöht werden.

Munter *et al.* zeigten in [175], dass die Dimerisierungsstärke der G29A- über die G33A- zur G33I-Mutante abnimmt und brachten die Abnahme der Dimerisierungsstärke mit einer Zunahme an A β_{38} und einer Abnahme an A β_{42} in Zusammenhang. Die Untersuchung der G29A-, G33A- und G33I-Mutanten im zellfreien System bestätigte die Zunahme von A β_{38} /Gesamt-A β in Richtung abnehmender Dimerisierungsstärke (Abb. 25A). Ferner wurde die parallel verlaufende Zunahme von A β_{37} /Gesamt-A β durch Massenspektrometrie detektiert (Abb. 25B). Es wurde jedoch keine kontinuierliche Abnahme von A β_{42} /Gesamt-A β beobachtet. Alle untersuchten GxxxG-Mutanten zeigten im zellfreien System im Vergleich zum WT-Substrat einen leicht erhöhten A β_{42} -Anteil am Gesamt-A β , wenngleich dieser Anteil bei der G33I-Mutante einer größeren Schwankung

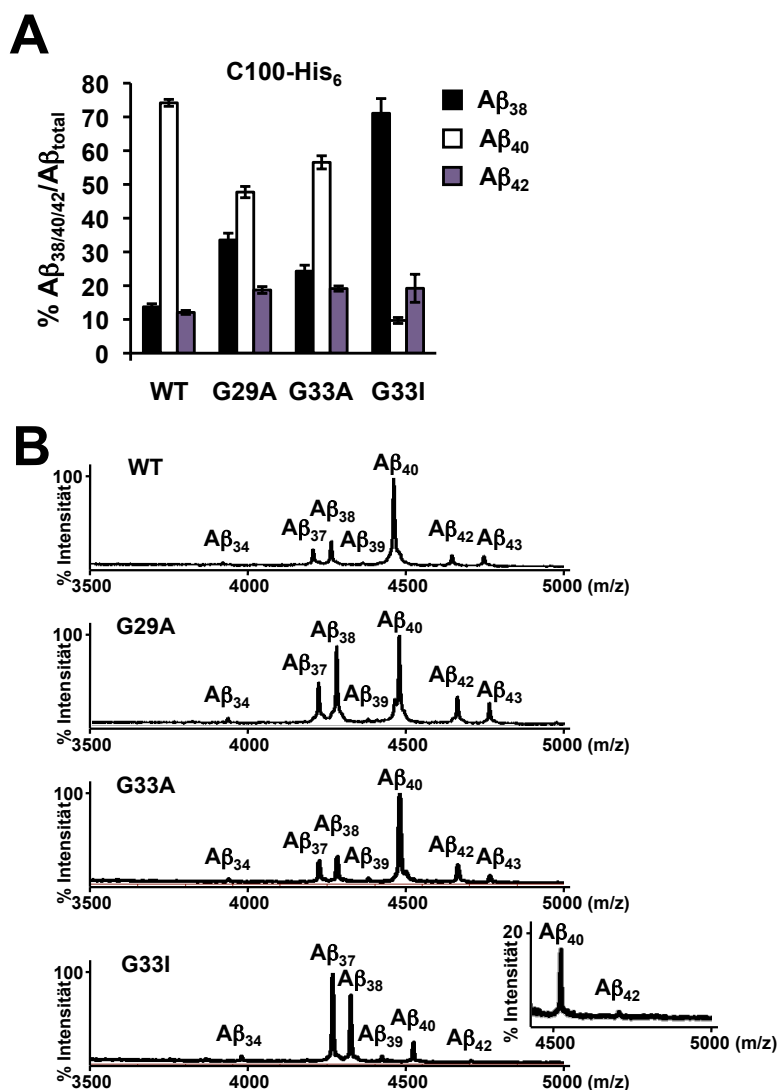


Abbildung 25: GxxxG-Mutanten zeigen im zellfreien System mit Abnahme der Dimerisierungsstärke ein erhöhtes Aβ₃₈/Gesamt-Aβ, aber kein erniedrigtes Aβ₄₂/Gesamt-Aβ. **A.** Aus HEK293-Zellen aufgereinigte, endogene γ-Sekretase wurde mit 0.5 μM WT- bzw. G29A-, G33A- und G33I-C100-His₆-Substrat inkubiert und die Aβ-Peptide im ECL-IA gemessen. Die Aβ-Spezies sind als Prozentsatz am Gesamt-Aβ (Aβ₃₈ + Aβ₄₀ + Aβ₄₂) aufgetragen (Mittelwerte ± Standardfehler, n = 13 - 18). **B.** Nach Durchführung eines Aktivitätsassays wie unter A beschrieben wurden die Aβ-Peptide mit 4G8 Antikörper und PGS immunpräzipitiert und das Eluat massenspektrometrisch analysiert. Der Peak der höchsten Intensität wurde in allen Spektren auf 100% gesetzt. Ein Ausschnitt aus dem Spektrum für die G33I-Mutante wurde vergrößert, um den Aβ₄₂-Peak besser sichtbar zu machen. Alle Massenspektren wurden von A. Fukumori aufgenommen.

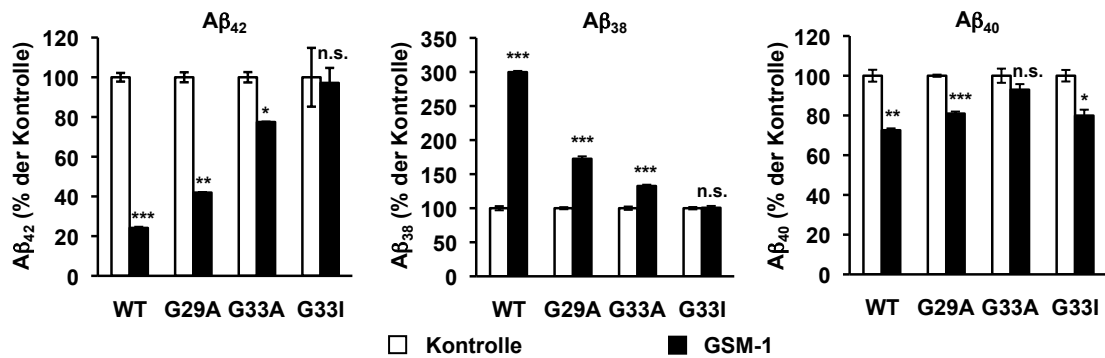


Abbildung 26: GxxxG-Mutanten sprechen im zellfreien System größtenteils auf GSM-1-Behandlung an. Aus HEK293-Zellen aufgereinigte, endogene γ -Sekretase wurde mit 0.5 μ M WT- bzw. G29A-, G33A- und G33I-C100-His₆-Substrat in der Anwesenheit von DMSO (Kontrolle) oder 2.5 μ M GSM-1 inkubiert und die A β -Peptide im ECL-IA gemessen. Die A β -Konzentrationen bei GSM-1-Behandlung wurden auf die Konzentrationen bei Kontrollbedingungen normalisiert und in % aufgetragen (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3).

unterlag. Das vom G33I-Substrat aus produzierte A β ₄₂ konnte massenspektrometrisch kaum detektiert werden (Abb. 25B), was jedoch in der Zunahme der Hydrophobizität dieses Peptids begründet sein kann. Auffallend war ein selektiv für die G29A-Mutante erhöhter Peak für A β ₄₃ im Massenspektrum.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Glycinmutanten auf Behandlung mit GSMs ansprechen. Die Produktion von A β ₃₈ und A β ₄₂ konnte mit GSM-1 sowohl für das WT-Substrat als auch für die G29A- und die G33A-Mutanten signifikant moduliert werden. Die Mutanten sprachen aber mit Abnahme der Dimerisierungsstärke zunehmend

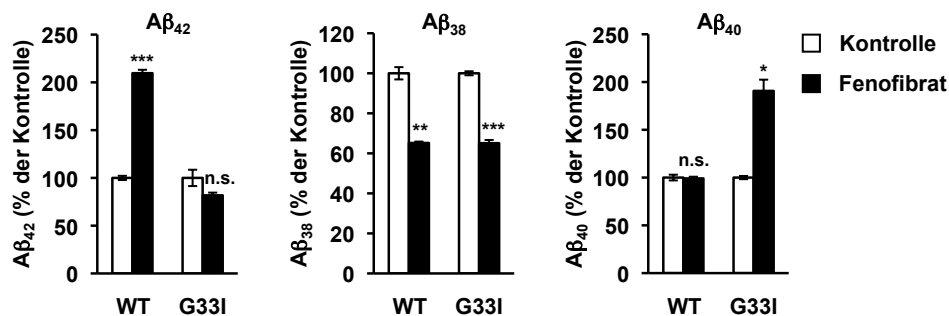


Abbildung 27: Die G33I-Mutante reagiert im zellfreien System partiell auf Behandlung mit Fenofibrat. Aus HEK293-Zellen aufgereinigte, endogene γ -Sekretase wurde mit 0.5 μ M WT- bzw. G33I-C100-His₆-Substrat in der Anwesenheit von DMSO (Kontrolle) oder 150 μ M Fenofibrat inkubiert und die A β -Peptide im ECL-IA gemessen. Die A β -Konzentrationen bei Fenofibrat-Behandlung wurden auf die Konzentrationen bei Kontrollbedingungen normalisiert und in % aufgetragen (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3).

schlechter auf die Behandlung mit GSM-1 an (Abb. 26). Die G33I-Mutante ließ sich bezüglich $A\beta_{38}$ und $A\beta_{42}$ nicht modulieren, zeigte aber eine ähnliche 20%ige Absenkung im $A\beta_{40}$ -Spiegel wie das WT-Substrat. Wegen des im Vergleich zum WT stark erhöhten $A\beta_{38}$ /Gesamt- $A\beta$ für die G33I-Mutante wurde deren Reaktion auf einen inversen GSM untersucht (Abb. 27). Bei Behandlung mit Fenofibrat konnte $A\beta_{38}$ für die G33I-Mutante ähnlich stark wie für den WT-Substrat abgesenkt, $A\beta_{42}$ jedoch nicht erhöht werden. Unerwarteterweise erhöhte die Modulatorbehandlung $A\beta_{40}$ um ca. 100%. Dieser Effekt konnte ebenso im Zellkultursystem beobachtet werden [431]. Somit zeigte die G33I-Mutante eine ungewöhnliche, aber deutliche Reaktion auf die Behandlung mit Fenofibrat.

2.1.2 Die K28E-Mutante spricht auf GSM-Behandlung an

$A\beta_{42}$ -senkende NSAID-ähnliche GSMs verlieren ihre modulatorische Wirkung auf die γ -Sekretase, wenn deren Carboxygruppe deletiert wird [434]. Andererseits lassen sich TO-901317 und Fenofibrat, zwei inverse GSMs, in $A\beta_{42}$ -erniedrigende GSMs umwandeln, indem eine Carboxygruppe an die molekulare Struktur angehängt wird [435, 436]. Wegen der offensichtlich entscheidenden Rolle der negativ geladenen Carboxygruppe für die Absenkung von $A\beta_{42}$ wurde eine Interaktion mit einer positiv geladenen Seitengruppe einer AS im Zielprotein vorgeschlagen [434, 436]. Zudem können einige Carbazolsäuren durch Anbringen eines lipophilen Substituenten, der eine Verankerung in der Membran bewirkt, zu GSMs gemacht werden [437], so dass über eine Interaktion der Säuregruppe

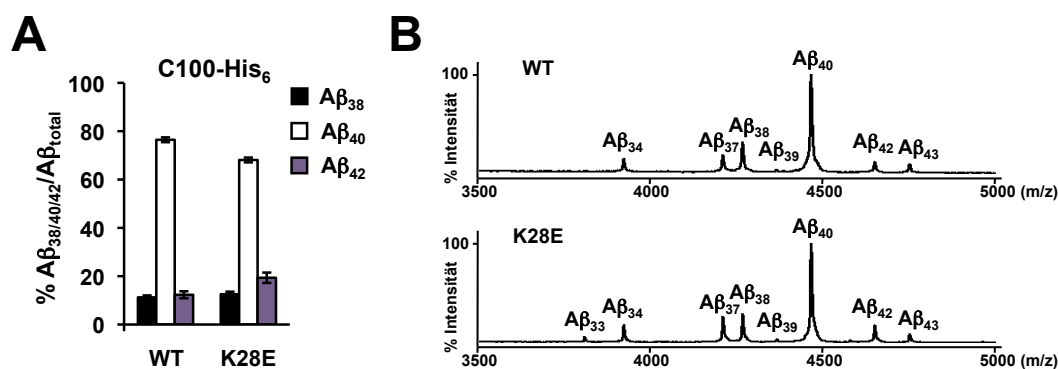


Abbildung 28: Die K28E-Mutante verhält sich im zellfreien System ähnlich wie das WT-Substrat. **A.** Aus HEK293-Zellen aufgereinigte, endogene γ -Sekretase wurde mit 0.5 μ M WT- bzw. K28E-C100-His₆-Substrat inkubiert und die $A\beta$ -Peptide im ECL-IA gemessen. Die $A\beta$ -Spezies sind als Prozentsatz am Gesamt- $A\beta$ ($A\beta_{38}$ + $A\beta_{40}$ + $A\beta_{42}$) aufgetragen (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 5). **B.** Nach Durchführung eines Aktivitätsassays wie unter A beschrieben wurden die $A\beta$ -Peptide mit 4G8 Antikörper und PGS immunpräzipitiert und das Eluat massenspektrometrisch analysiert. Die Intensität des $A\beta_{40}$ -Peaks wurde in beiden Spektren auf 100% gesetzt. Die Massenspektren wurden von A. Fukumori aufgenommen.

mit einer positiv geladenen Seitengruppe einer AS nahe einer TMD im Zielprotein spekuliert wurde [436]. Da Lysin 28 an der TMD-Grenze im APP liegt und außerdem die einzige AS mit positiv geladener Seitengruppe im vorgeschlagenen GSM-Bindungsmotiv ist [406] (siehe Abb. 22), wurde diese AS als Interaktionsstelle für die Carboxygruppe der direkten NSAID-ähnlichen GSMs vorgeschlagen.

Um diese Hypothese zu testen wurde das Lysin 28 durch ein Glutamat ersetzt (K28E), dessen negative Ladung der Seitengruppe die mögliche Interaktion mit der Carboxygruppe behindern und die K28E-Mutante somit resistent gegenüber Modulatorbehandlung machen sollte. Das Profil der A β -Peptide war für die K28E-Mutante sehr ähnlich wie für das WT-Substrat; lediglich der A β_{42} -Anteil war etwas erhöht (Abb. 28A). Der leichte Anstieg des A β_{42} /Gesamt-A β konnte auch durch Massenspektrometrie bestätigt werden; außerdem wurde für die K28E-Mutante im Vergleich zum WT-Substrat ein erhöhter A β_{37} -Peak gemessen (Abb. 28B). Bei Untersuchung der Reaktionsfähigkeit auf GSM-1 zeigte sich, dass die K28E-Mutante, wenn auch abgeschwächt, ebenso wie der WT deutlich auf die Behandlung mit diesem GSM ansprach (Abb. 29A). Auch auf die Behandlung mit dem inversen GSM Fenofibrat sprach die K28E-Mutante für A β_{42} leicht abgeschwächt an, A β_{38} konnte ähnlich wie für das WT-Substrat abgesenkt werden (Abb. 29B). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Aminogruppe des

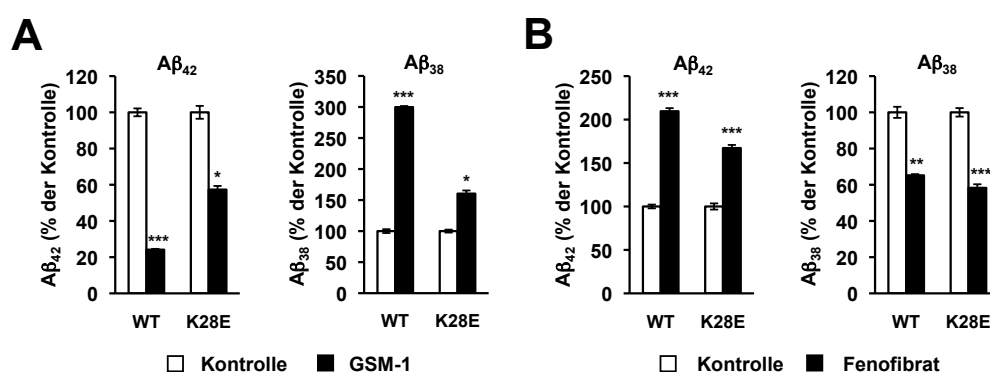


Abbildung 29: Die K28E-Mutante reagiert im zellfreien System auf Behandlung mit GSM-1 und Fenofibrat. **A.** Aus HEK293-Zellen aufgereinigte, endogene γ -Sekretase wurde mit 0.5 μ M WT- bzw. K28E-C100-His₆-Substrat in Anwesenheit von DMSO (Kontrolle) oder 2.5 μ M GSM-1 inkubiert und die A β -Peptide im ECL-IA gemessen. Die A β -Konzentrationen bei GSM-1-Behandlung wurden auf die Konzentrationen bei Kontrollbedingungen normalisiert und in % aufgetragen (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3). **B.** Aus HEK293-Zellen aufgereinigte, endogene γ -Sekretase wurde mit 0.5 μ M WT- bzw. K28E-C100-His₆-Substrat in Anwesenheit von DMSO (Kontrolle) bzw. 150 μ M Fenofibrat inkubiert und die A β -Peptide im ECL-IA gemessen. Die A β -Konzentrationen bei Fenofibrat-Behandlung wurden auf die Konzentrationen bei Kontrollbedingungen normalisiert und in % aufgetragen (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3).

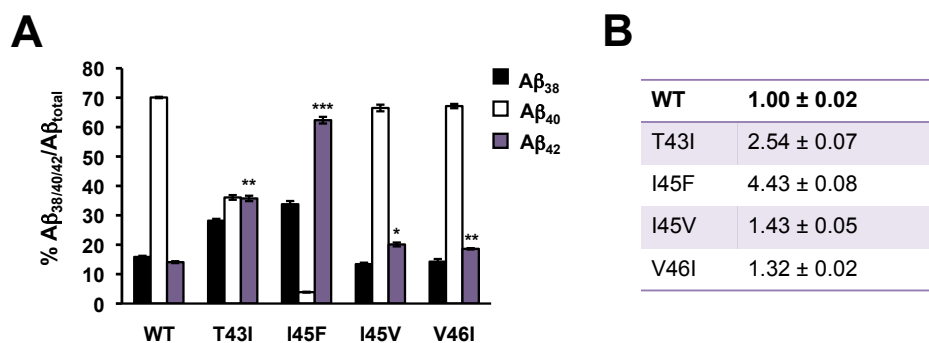


Abbildung 30: **APP-FAD-Mutanten zeigen wie erwartet erhöhte Aβ₄₂-Spiegel.** **A.** Aus HEK293-Zellen aufgereinigte, endogene γ -Sekretase wurde mit 0.5 μ M WT- bzw. T43I-, I45F-, I45V- und V46I-C100-His₆-Substrat inkubiert und die A β -Peptide im ECL-IA gemessen. Die A β -Spezies sind als Prozentsatz am Gesamt-A β (A β ₃₈ + A β ₄₀ + A β ₄₂) aufgetragen (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3). Die Sterne (zweiseitiger, ungepaarter t-Test mit Bonferroni-Postkorrektur) bezeichnen die Signifikanz für das von der jeweiligen Mutante aus produzierte A β ₄₂ im Vergleich zum WT. **B.** Tabelle der A β ₄₂/Gesamt-A β -Spiegel für die untersuchten APP-FAD-Mutanten, normalisiert auf den WT (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3).

Lysin 28 für die Wirksamkeit der NSAID-ähnlichen GSMs nicht notwendig ist. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass Lysin 28 keine Interaktionsstelle der Carboxygruppe der A β ₄₂-absenkenden NSAID-ähnlichen darstellt.

2.1.3 Für APP-FAD-Mutanten lässt sich Aβ₄₂ im zellfreien System durch GSM-1-Behandlung senken

Während sich A β ₃₈ für die meisten PS1- und PS2-FAD-Mutanten bei Behandlung mit NSAID-ähnlichen GSMs der ersten Generation ähnlich wie beim WT erhöhen lässt, sprechen die meisten dieser Mutanten überraschenderweise nicht mit A β ₄₂ auf die GSM-Behandlung an [165, 166]. Dieser unerwartete Befund legt den Schluss nahe, dass die Produktion von A β ₄₂ und A β ₃₈ für PS1- und PS2-FAD-Mutanten nicht gekoppelt ist [165, 167]. Deshalb sollte für FAD-Mutanten im APP überprüft werden, ob sie auf die A β ₄₂-absenkende Wirkung von NSAID-ähnlichen GSMs ansprechen. Dazu wurden Mutanten ausgewählt, die nahe der γ -Schnittstelle im APP liegen (siehe Abb. 22): die österreichische T43I- [438, 439], die spanische I45F- [440, 441], die Florida I45V- [439, 442] und die London V46I-Mutante [345, 346, 443].

Für alle analysierten APP-FAD-Mutanten konnte im zellfreien System eine Erhöhung von A β ₄₂/Gesamt-A β im Vergleich zum WT festgestellt werden (Abb. 30A), wobei eine Spanne von 1.3-facher (für die V46I-Mutante) bis 4.4-facher (für die I45F-Mutante) Zunahme zu beobachten war (Abb. 30B). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit

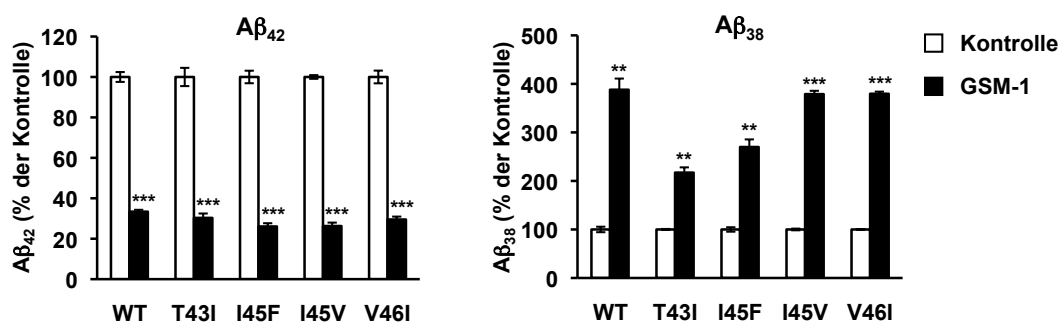


Abbildung 31: **APP-FAD-Mutanten sprechen auf GSM-1-Behandlung an.** Aus HEK293-Zellen aufgereinigte, endogene γ -Sekretase wurde mit $0.5 \mu\text{M}$ WT- bzw. T43I-, I45F-, I45V- und V46I-C100-His₆-Substrat in Anwesenheit von DMSO (Kontrolle) oder $2.5 \mu\text{M}$ GSM-1 inkubiert und die A β -Peptide im ECL-IA gemessen. Die A β -Konzentrationen bei GSM-1-Behandlung wurden auf die Konzentrationen bei Kontrollbedingungen normalisiert und in % aufgetragen (Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$).

den Daten aus Zellkultur [431]. Alle untersuchten FAD-Substratmutanten reagierten auf Behandlung mit GSM-1 mit einer Absenkung von A β_{42} und einer erhöhten Produktion von A β_{38} (siehe Abb. 31). Dieses Ergebnis ist ein weiteres Indiz, das gegen das APP- β CTF als Zielprotein von GSMs spricht.

2.2 Charakterisierung der GSM-Klasse der Aminopyrimidine

2.2.1 Aminopyrimidin-Derivate sind potente GSMs im Zellkultursystem

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit der ZNS-Abteilung von Hoffmann-La Roche Ltd. in Basel wurden ausgewählte GSMs der Klasse der Aminopyrimidine näher charakterisiert, um weiteren Einblick in den Mechanismus der γ -Sekretasemodulation zu gewinnen. Diese Strukturklasse wurde von der Substanzklasse der Aminothiazole abgeleitet [444]. Aminothiazole und andere Strukturklassen gingen aus einem großangelegten Screening hervor, bei dem knapp 800.000 Substanzen auf modulatorische Aktivität auf die A β -Sekretion aus APP-überexprimierenden H4 Zellen getestet wurden [445]. Die charakteristische Grundstruktur der Aminopyrimidin-GSMs besteht aus einem Pyrimidin als zentralen Ring C (Konsensus-Strukturformel der GSM-Klasse der verbrückten Aromaten siehe Abb. 19), der über ein Amin mit einem Benzol (Ring B) verbrückt ist, das wiederum ein Methylimidazol (Ring A) und eine Methoxygruppe als Substituenten trägt [445] (für einen Vergleich mit anderen nicht-acidischen GSMs der zweiten Generation siehe 1.6.2). In Abb. 32 sind die Strukturformeln der drei Derivate RO-02, -03 und -57 und deren Dosiswirkungskurven für HEK293/sw-Zellen (transformierte humane embryonale Nierenzellen, die APP695 mit der schwedischen Mutation K₅₉₅M₅₉₆/N₅₉₅L₅₉₆ überexpri-

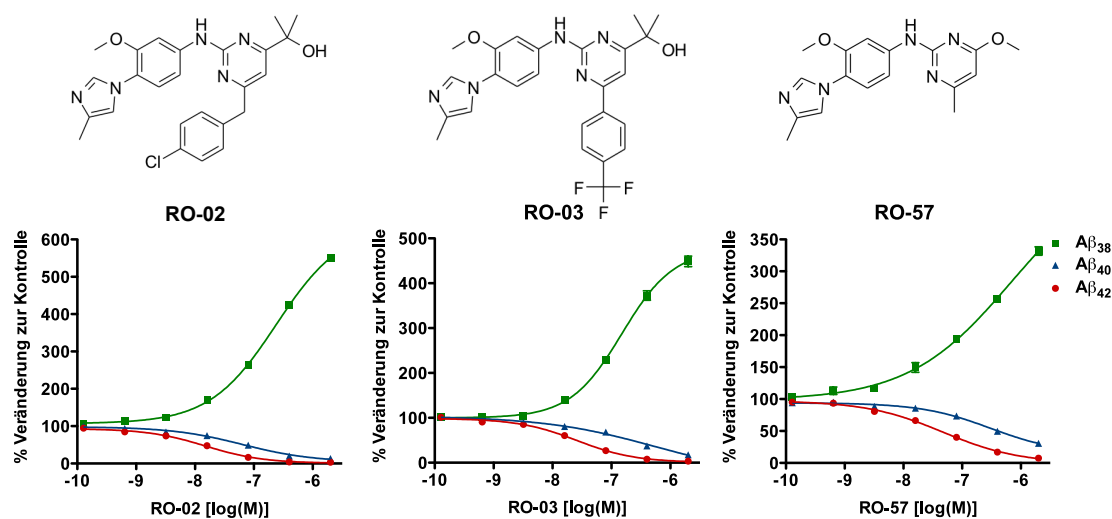


Abbildung 32: RO-02, -03 und -57 sind potente GSMs auf HEK293/sw-Zellen. HEK293/sw-Zellen wurden mit RO-02, -03 und -57 sowie DMSO als Kontrolle behandelt und die Konzentrationen der A β -Peptide im Kulturüberstand anschließend im ECL-IA gemessen. Die Dosiswirkungskurven zeigen die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$. Die Standardfehler sind dabei z.T. so klein, dass sie im Diagramm nicht zu erkennen sind. Über den Dosiswirkungskurven sind die Strukturformeln dieser Aminopyrimidin-GSMs abgebildet. Die IC_{50} -Werte für A β_{42} sind 15 nM ($\log IC_{50} = -7.82 \pm 0.05$) für RO-02, 26 nM ($\log IC_{50} = -7.59 \pm 0.05$) für RO-03 sowie 75 nM ($\log IC_{50} = -7.12 \pm 0.04$) für RO-57.

mieren, siehe 1.1.2, [348]) abgebildet. Diese drei repräsentativen Derivate dieser GSM-Substanzklasse senkten A β_{42} mit IC_{50} -Werten ab, die bis in den niedrig-nanomolaren Bereich reichten (IC_{50} (A β_{42}) = 15 nM ($\log IC_{50} = -7.82 \pm 0.05$) für RO-02, 26 nM ($\log IC_{50} = -7.59 \pm 0.05$) für RO-03 sowie 75 nM ($\log IC_{50} = -7.12 \pm 0.04$) für RO-57). Der Anstieg von A β_{38} setzte für diese Substanzen bei etwas niedrigerer Konzentration ein als die Abnahme von A β_{42} . Im Unterschied zu den von NSAIDs abgeleiteten Modulatoren wie GSM-1 wurde auch eine deutliche Absenkung von A β_{40} beobachtet, die meist etwas verzögert zu der von A β_{42} verlief. Parallel dazu führte die Behandlung mit Aminopyrimidin-GSMs zu einem Anstieg von A β_{37} , der im ECL-Immunoassay nicht gemessen werden kann, jedoch im zellfreien Assay mittels Massenspektrometrie und Trennung der A β -Peptide über SDS-PAGE und Immunoblot detektiert wurde (siehe 2.2.4). Da RO-02 auf HEK293/sw-Zellen der potenteste getestete GSM aus dieser Klasse war, wurde er als Modellsubstanz für weitere Versuche eingesetzt.

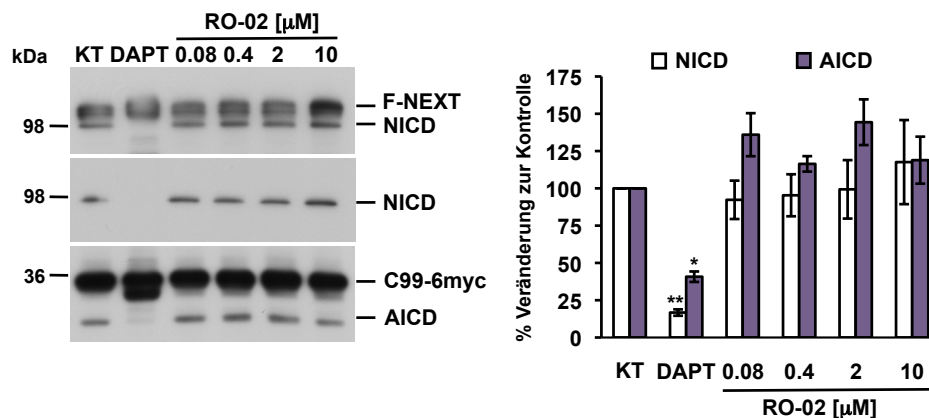


Abbildung 33: RO-02 inhibiert die NICD- und AICD-Produktion in HEK293-Zellen bis 10 μM nicht. Stabil F-NEXT und C99-6myc überexprimierende HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen RO-02 bzw. 1 μM DAPT oder DMSO (Kontrolle) behandelt, die Zellen mit STEN-Lyse aufgeschlossen, die Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und F-NEXT, NICD, C99-6myc sowie AICD anschließend mittels IB detektiert. Links ist ein repräsentativer IB gezeigt (oben α -myc, mitte α -geschnittenes Notch1 vor V1744, unten α -myc), rechts die Quantifizierung der Signale für NICD und AICD (auf Kontrolle normierte Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3 - 5$ für RO-02 und $n = 2$ für DAPT); KT, Kontrolle. Drei der quantifizierten IBs wurden von A. Fukumori durchgeführt.

2.2.2 RO-02 inhibiert die Produktion von NICD und AICD in Zellen nicht

Eine gravierender Nachteil von γ -Sekretaseinhibitoren (GSIs) ist deren mangelnde Selektivität für APP und somit deren Inhibition der Prozessierung anderer wichtiger Substrate wie Notch1 (siehe 1.6.1). Die Inhibition der NICD-Produktion führt bei Mäusen zu schwerwiegenden Nebenwirkungen [363]. Deshalb sollte ausgeschlossen werden, dass RO-02 bei hohen Konzentrationen die Prozessierung des Notch1-Substrats F-NEXT (N-terminal Flag-markiertes Notch1-Konstrukt ohne Ektodomäne, [446]) inhibiert. Dazu wurden HEK293-Zellen, die sowohl F-NEXT als auch C99-6myc (C-terminal 6myc-markiertes APP- β CTF, [237]) stabil überexprimieren, mit ansteigender Dosis von RO-02 behandelt und mittels Immunoblot die Spiegel der intrazellulären Spaltprodukte (AICD und NICD) analysiert. Während der GSI DAPT die Produktion von NICD und AICD im Vergleich zur Behandlung mit DMSO hemmte, konnte für RO-02 bis zu einer getesteten Höchstkonzentration von 10 μM keine Abnahme der ICDs beobachtet werden (Abb. 33). Demzufolge hat RO-02 bis 500-fachem IC_{50} in HEK293-Zellen keine inhibitorische Wirkung auf die γ -Sekretase.

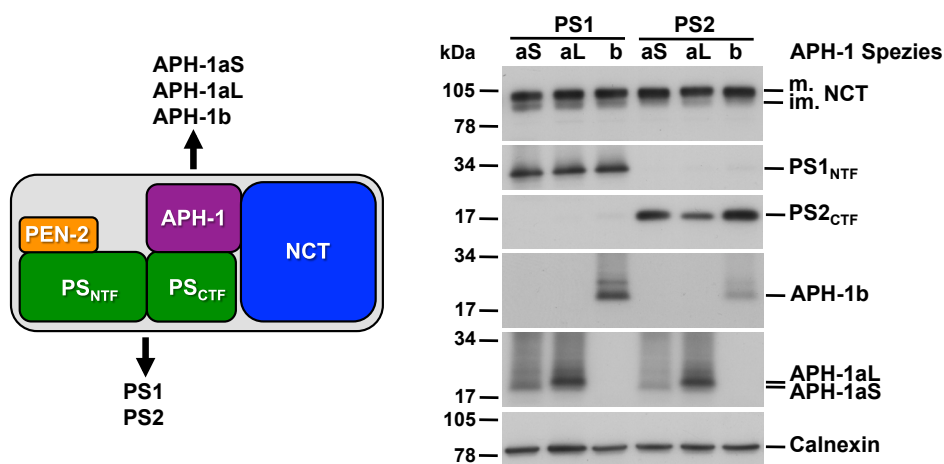


Abbildung 34: Schematische Darstellung der möglichen Zusammensetzung des γ -Sekretasekomplexes und Expressionsanalyse von HEK293/sw-Zellen, die jeweils einen definierten γ -Sekretasekomplex besitzen. Von HEK293/sw-Zellen, die je eine PS- und APH-1-Komponente überexprimieren, wurden Membranfraktionen präpariert und die solubilierten Membranproteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt. Um zu überprüfen, ob die jeweils gewünschte PS- bzw. APH-1-Komponente ausreichend überexprimiert wird, wurden die verschiedenen PS- und APH-1-Homologe bzw. Isoformen mittels IB detektiert und der Austausch der endogenen durch die überexprimierten Preseniline überprüft. Als Kontrolle für die Maturierung der γ -Sekretasekomplexe wurde NCT sowie als Ladekontrolle Calnexin detektiert; *m.*, mature Form von NCT; *im.*, immature Form.

2.2.3 Alle sechs γ -Sekretasekomplexe sprechen auf RO-02-Behandlung an

Bislang war nicht erforscht, ob alle sechs vorkommenden γ -Sekretasekomplexe auf GSM-Behandlung in gleichem Maße ansprechen. Im Menschen kommen von zwei Proteinen im γ -Sekretasekomplex verschiedene Varianten vor, nämlich von PS (PS1 und PS2, siehe 1.4.1.1) und APH-1 (APH-1aS, -1aL und -1b, siehe 1.4.1.4). Womöglich vorhandene Unterschiede in der Aktivität von RO-02 auf verschiedene γ -Sekretasekomplexe könnten zudem weitere Hinweise darauf geben, an welches Protein der GSM bindet. Dafür wurden von K. Shirovani hergestellte HEK293/sw-Zellen verwendet, die jeweils genau einen definierten γ -Sekretasekomplex überexprimieren (Abb. 34). Diese Zelllinien wurden hergestellt, indem zuerst die Expression aller APH-1-Spezies stabil herunterreguliert wurde, danach die einzelnen siRNA-resistenten APH-1-Spezies wieder eingeführt und abschließend entweder PS1 oder PS2 überexprimiert wurde [300]. Die ausreichende Überexpression und Integration von PS1 oder PS2 in den γ -Sekretasekomplex ist dann gegeben, wenn das überexprimierte Homolog die endogenen PS-Proteine in ihrer Expression ersetzt (engl. *replacement*, Abb. 34). Alle γ -Sekretasekomplexe produzierten ein ähnliches Profil an sekretierten A β -Peptiden (Abb. 35). Dies steht im Gegensatz zu einer Stu-

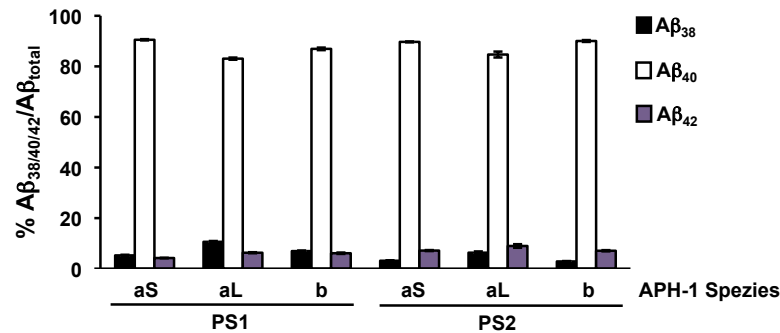


Abbildung 35: Alle sechs γ -Sekretasekomplexe produzieren ein ähnliches Profil an sekretierten A β -Peptiden in HEK293/sw-Zellen. HEK293/sw-Zellen, die je eine PS- und APH-1-Komponente überexprimieren, wurden mit Medium kultiviert und die Konzentrationen der A β -Peptide im Kulturüberstand anschließend im ECL-IA gemessen. Die A β -Spezies sind als Prozentsatz am Gesamt-A β (A β ₃₈ + A β ₄₀ + A β ₄₂) aufgetragen (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3).

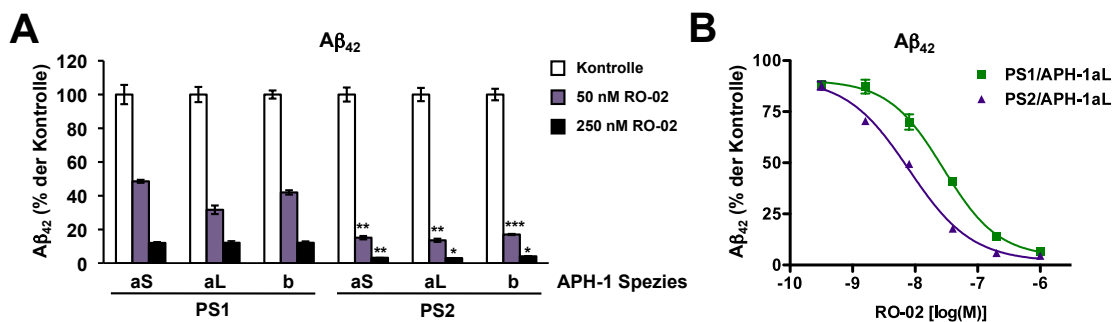


Abbildung 36: Alle sechs γ -Sekretasekomplexe sprechen auf RO-02-Behandlung an. **A.** HEK293/sw-Zellen, die je eine PS- und APH-1-Komponente überexprimieren, wurden mit DMSO (Kontrolle) oder 50 bzw. 250 nM RO-02 behandelt und die Konzentrationen der A β -Peptide im Kulturüberstand anschließend im ECL-IA gemessen. Die A β -Konzentrationen bei RO-02-Behandlung wurden auf die Konzentrationen bei Kontrollbedingungen normalisiert und in % aufgetragen (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3). Die Sterne bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen den entsprechenden PS1- und PS2-enthaltenden γ -Sekretasekomplexen in Bezug auf die relative A β ₄₂-Produktion in Anwesenheit von RO-02. **B.** HEK293/sw-Zellen, die PS1- bzw. PS2-APH-1aL-Komplexe überexprimieren, wurden mit DMSO (Kontrolle) oder RO-02 behandelt und die Konzentrationen der A β -Peptide im Kulturüberstand anschließend im ECL-IA gemessen. Die Dosiswirkungskurven zeigen die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3. Die IC₅₀-Werte für A β ₄₂ sind 28 nM (log IC₅₀ = - 7.55 \pm 0.06) für den PS1/APH-1aL γ -Sekretasekomplex sowie 8 nM (log IC₅₀ = - 8.10 \pm 0.06) für den PS2/APH-1aL γ -Sekretasekomplex, p < 0.001 (z-Test).

die, die für APH-1b-Komplexe in zellfreien Assays zeigte, dass diese signifikant mehr längere A β -Spezies (A β ₄₂, A β ₄₅, A β ₄₆) produzieren als APH-1a-Komplexe [305]. Diese zellfreien Assays wurden mit solubilisierten Membranfraktionen aus Gehirnmateriale von

Mäusen durchgeführt, die jeweils nur eine APH-1-Komponente exprimieren. In zellbasierten Assays mit Neuronen, Fibroblasten und Gehirnextrakten von diesen Tieren konnten Serneels *et al.* die Erhöhung der Spiegel der längeren A β -Spezies jedoch nicht reproduzieren [305]. Dies ist in Übereinstimmung mit den in den HEK/sw-Zellen gemessenen Profilen, in denen der A β_{42} /Gesamt-A β für APH-1b-Komplexe ebenfalls nicht erhöht ist. RO-02 konnte die Produktion von A β_{42} für alle γ -Sekretasekomplexe senken (Abb. 36A). Interessanterweise konnte eine erhöhte Aktivität bezüglich der A β_{42} -Inhibition auf γ -Sekretasekomplexe detektiert werden, die PS2 enthielten. Deshalb wurden für zwei ausgewählte Komplexe (APH-1aL mit PS1 oder PS2) Dosiswirkungskurven für RO-02 gemessen, die bestätigen konnten, dass der IC₅₀ (A β_{42}) für PS2-Komplexe etwa dreimal niedriger als für PS1-Komplexe ist (Abb. 36B). Somit zeigt RO-02 gegenüber allen γ -Sekretasekomplexen Aktivität, wobei diese bezüglich der A β_{42} -Inhibition auf PS2-gegenüber PS1-Komplexen leicht erhöht ist, was auf eine Bindung von RO-02 an PS hindeutet.

2.2.4 RO-02 ist im zellfreien System aktiv

Um zu klären, ob für die Modulation der γ -Sekretaseaktivität durch Aminopyrimidin-GSMs die Anwesenheit des γ -Sekretasekomplexes und des Substrats ausreicht, wurden

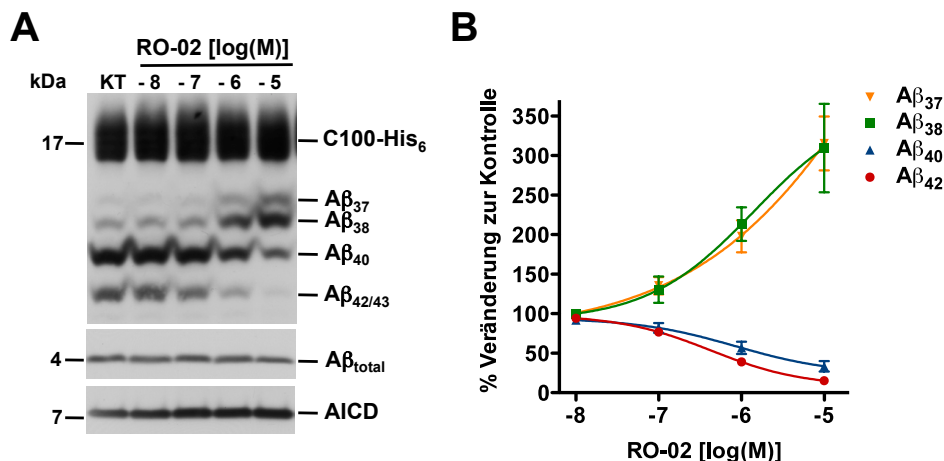


Abbildung 37: **RO-02 moduliert die γ -Sekretaseaktivität im zellfreien System.** Aus HEK293-Zellen aufgereinigte, endogene γ -Sekretase wurde mit 0.5 μ M C100-His₆ in der Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen DMSO (Kontrolle) oder RO-02 inkubiert. A β -Peptide (11%iges Harnstoff-Tris-Bicin-Gel) bzw. Gesamt-A β und AICD (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels IB detektiert. Links ist ein repräsentativer IB gezeigt, rechts die Quantifizierung (auf Kontrolle normierte Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 4); KT, Kontrolle.

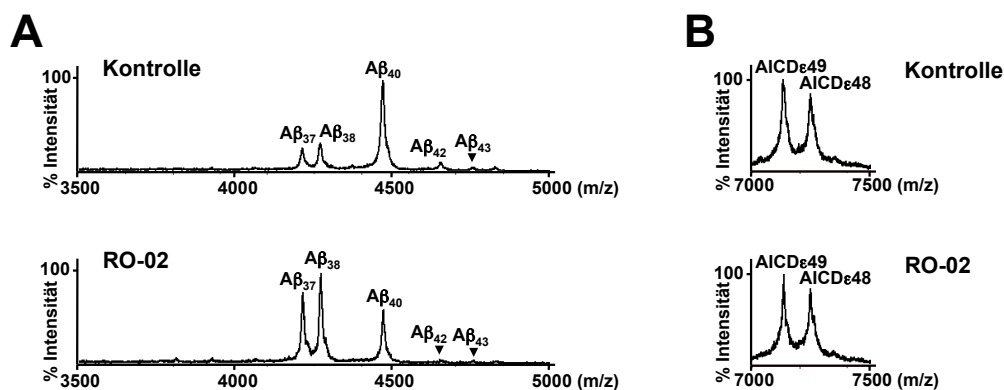


Abbildung 38: **RO-02 moduliert für APP den γ -, aber nicht den ϵ -Schnitt.** **A.** Aus HEK293-Zellen aufgereinigte, endogene γ -Sekretase wurde im zellfreien γ -Sekretaseaktivitätsassay mit 0.5 μ M C100-His₆ in der Anwesenheit von DMSO (Kontrolle) oder 0.5 μ M RO-02 inkubiert. Anschließend wurden die A β -Peptide mit 4G8 Antikörper und PGS immunpräzipitiert und das Eluat massenspektrometrisch analysiert. Der Peak der höchsten Intensität wurde in beiden Spektren auf 100% gesetzt. **B.** Nach Durchführung eines Aktivitätsassays wie unter A beschrieben (allerdings mit 1 μ M RO-02) wurden die AICD-Peptide mit 6687 Antikörper und PAS immunpräzipitiert und das Eluat massenspektrometrisch analysiert. In beiden Spektren wurde die Intensität des AICD_{ε49}-Peaks auf 100% gesetzt. Alle Massenspektren wurden von A. Fukumori aufgenommen.

als nächstes zellfreie γ -Sekretaseaktivitätsassays durchgeführt. Wenn RO-02 in diesem System aktiv ist, ist das ein sehr starker Hinweis darauf, dass kein anderes Protein neben den γ -Sekretasekomponenten und dem Substrat eine entscheidende Rolle im Mechanismus der Modulation durch Aminopyrimidine spielt. Bis zur höchsten eingesetzten Konzentration von 10 μ M RO-02 war keine Inhibition der Produktion von AICD oder Gesamt-A β zu beobachten (Abb. 37A), was in Übereinstimmung mit dem Ergebnis aus dem Zellkultursystem ist (siehe 2.2.2). RO-02 wirkte auf gereinigtes Enzym modulato- risch auf die Produktion von A β -Peptiden (Abb. 37A), jedoch mit einem etwa 30-fach erhöhtem IC₅₀ für A β ₄₂ von 500 nM (Abb. 37B). Die Modulation der γ -Sekretaseaktivität für den γ -Schnitt konnte durch massenspektrometrische Analyse bestätigt werden (Abb. 38A). Parallel dazu wurden im zellfreien System die AICD-Peptide untersucht. Die AICD aus dem zellfreien System ist viel leichter als aus Zellen massenspektrome- trisch untersuchbar, da diese dort schnell abgebaut wird [157]. Interessanterweise sind die relativen Intensitäten der Peaks für die beiden dominant im zellfreien System pro- duzierten AICD-Spezies unverändert (Abb. 38B). Somit scheint RO-02 den ϵ -Schnitt der γ -Sekretase nicht nur nicht zu inhibieren, sondern überhaupt nicht zu beeinflussen. Zusammengefasst lässt sich aus den Aktivitätsassays im zellfreien System schließen, dass entweder die γ -Sekretase oder das Substrat das direkte Ziel von RO-02 ist.

2.3 Molekulare Angriffsziele der Aminopyrimidin-GSMs

2.3.1 RO-57-BpB als Werkzeug zur Charakterisierung der molekularen Angriffspunkte der Aminopyrimidin-GSMs

Um das oder die molekulare(n) Angriffsziel(e) der Aminopyrimidin-GSMs zu identifizieren, sollte ein Photoaffinitätsmarkierungsderivat synthetisiert werden, das eine kovalente Querverknüpfung an ein Kohlenstoffatom im Zielmolekül sowie eine spezifische Aufreinigung des Substanz-Protein-Addukts erlaubt. Für die kovalente Querverknüpfung mit Hilfe von UV-Licht sollte ein Benzophenon verwendet werden, da dies im Gegensatz zu Arylaziden die Verwendung von langwelligem UV-Licht (um 350 nm) erlaubt, so dass die belichteten Proteine möglichst wenig geschädigt werden [448,449]. Des Weiteren kann Benzophenon bei nicht erfolgter Querverknüpfung in den Grundzustand relaxieren, wodurch deutlich höhere Insertionsraten erreicht werden können als mit Arylaziden und Diazirinen, die sich bei der Adsorption des UV-Lichts zersetzen [447,450]. Abb. 39 zeigt das Schema der Photoreaktion mit Benzophenon. Für die Aufreinigung des Photoaddukts bot sich eine molekulare Markierung der Substanz mit Biotin an, da Biotin mit Streptavidin eine starke Interaktion eingeht und die querverknüpften Proteine somit

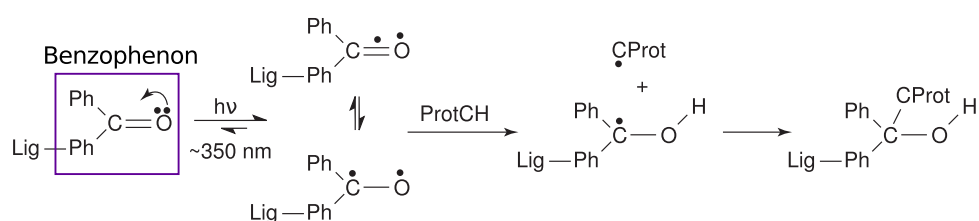


Abbildung 39: **Photoaffinitätsmarkierungsreaktion mit Benzophenon.** Das Benzophenon greift CH-Bindungen im Abstand von bis zu 3 Å an, z.B. am α -C-Atom oder in aliphatischen Seitenketten von AS [448]. *lig*, Ligand, *Ph*, Phenol, *Prot*, Zielprotein; entnommen aus [447].

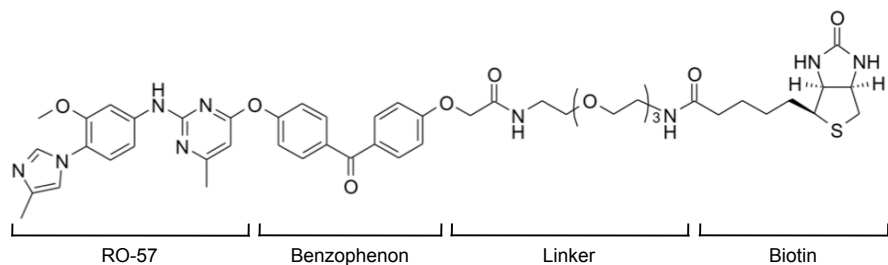


Abbildung 40: **Strukturformel von RO-57-BpB.** Unterhalb der Strukturformel sind die einzelnen Bestandteile der Substanz gekennzeichnet.

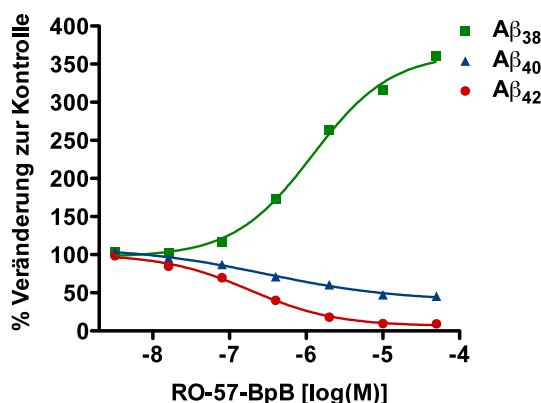


Abbildung 41: **RO-57-BpB wirkt auf HEK293/sw-Zellen als potenter GSM.** HEK293/sw-Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle) oder RO-57-BpB behandelt und die Konzentrationen der A β -Peptide im Kulturüberstand anschließend im ECL-IA gemessen. Die Dosiswirkungskurve zeigt die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3$. Die Standardfehler sind dabei so klein, dass sie im Diagramm nicht zu erkennen sind. Der IC_{50} (A β_{42}) für RO-57-BpB wurde mit 185 nM ($\log IC_{50}$ (A β_{42}) = - 6.73 \pm 0.07) ermittelt.

unter sehr stringenten Bedingungen isoliert werden können.

Dementsprechend synthetisierte Dr. Thomas Luebbers bei F. Hoffmann-La Roche Ltd. in Basel die Substanz RO-57-BpB (BpB für Benzophenon-Biotin, Strukturformel siehe Abb. 40). Die Synthese benutzte RO-57 als GSM-Rückgrat, da dieses Derivat am leichtesten für die Synthese zugänglich war. Zunächst wurde an ein Benzophenon mit kurzem Teil des Linkers schrittweise RO-57 synthetisiert und danach das Biotin mit dem Rest des Linkers addiert (genaue Informationen zur Synthese siehe Anhang von Publikation 2).

Eine zwingende Voraussetzung für die Verwendbarkeit einer Substanz für einen Photoaffinitätsmarkierungsassay ist, dass die Aktivität der Ausgangssubstanz zumindest zum Teil erhalten ist, d.h. in diesem Fall, dass der modifizierte GSM die γ -Sekretaseaktivität noch mit einem akzeptablen IC_{50} ($\leq 10 \mu\text{M}$ für A β_{42}) modulieren kann. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst die Aktivität von RO-57-BpB mit der von RO-57 auf HEK293/sw-Zellen verglichen. Der IC_{50} für A β_{42} für RO-57-BpB (185 nM; $\log IC_{50}$ (A β_{42}) = - 6.73 \pm 0.07) war etwa viermal höher als der für RO-57 (Abb. 41). Da RO-02 im zellfreien Assay mit aufgereinigter γ -Sekretase aktiv ist (wenn auch mit einem etwa 30-fach erhöhten IC_{50} für A β_{42} , siehe 2.2.4) und somit das Ziel dieser GSM-Klasse auf die γ -Sekretase und/oder Substrat eingengt werden konnte, sollte diese Umgebung für den Photoaffinitätsmarkierungsassay verwendet werden. Im zellfreien System unter Standardbedingungen zeigte RO-57-BpB aber nur eine sehr schlechte Aktivität (Abb. 42); A β_{42} konnte mit RO-57-BpB bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 100 μM

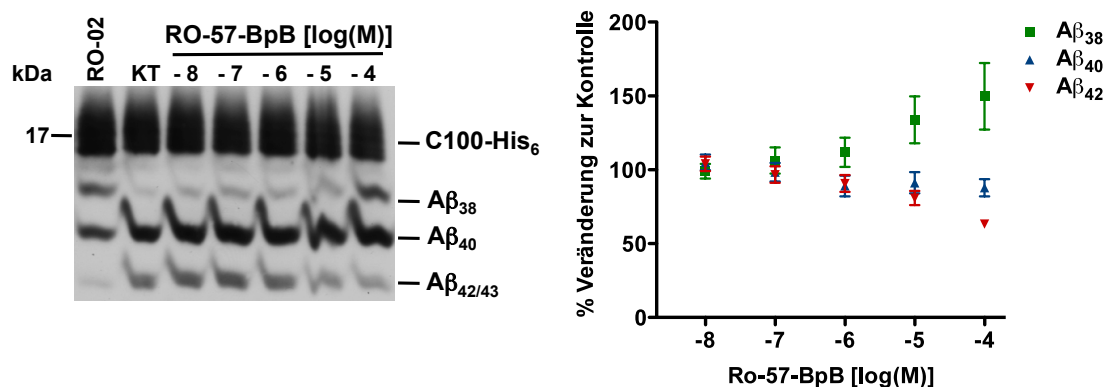


Abbildung 42: **RO-57-BpB zeigt beträchtlichen Aktivitätsverlust im zellfreien System.** Aus HEK293-Zellen aufgereinigte, endogene γ -Sekretase wurde mit 0.5 μ M C100-His₆-Substrat sowie mit steigender Konzentration RO-57-BpB und 1 μ M RO-02 und DMSO als Kontrollen inkubiert, die A β -Peptide mittels SDS-PAGE (11%iges Harnstoff-Tris-Bicin-Gel) aufgetrennt und mittels IB detektiert. Links ist ein repräsentativer IB gezeigt, rechts die Quantifizierung (auf Kontrolle normierte Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 4 - 6); KT, Kontrolle.

nur auf ca. 60% der Kontrolle gesenkt werden. Deshalb wurde versucht, durch Anpassen der Bedingungen des zellfreien Assays die Aktivität von RO-57-BpB in diesem System zu optimieren.

Zu keiner deutlichen Verbesserung führten folgende Anpassungen des zellfreien Assays (RO-02 wurde immer parallel als Positivkontrolle mitgeführt, Daten nicht gezeigt), mit denen die Zugänglichkeit der γ -Sekretase für RO-57-BpB verbessert werden sollte:

- Erhöhung des Volumens des zellfreien Assays unter Beibehaltung der Substratkonzentration, jedoch Erniedrigung der Lipidkonzentration,
- Erniedrigung der Substratkonzentration,
- Veränderung des pH-Wertes von 6.4 auf 5.7, 6.7 und 7.2,
- Inkubation der aufgereinigten γ -Sekretase mit RO-57-BpB vor der Rekonstitution,
- Erhöhung der CHAPSO-Konzentration im Assay von ca. 0.2 auf 0.5%, was der kritischen Mizellenkonzentration des Detergenz entspricht.

Auch die Verwendung von Membranfraktionen, die mit 0.375% CHAPSO (unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration, so dass die Proteine noch in der permeabilisierten Membran sitzen) ansolubilisiert wurden, zusammen mit C100-His₆-Substrat, verbesserte die Aktivität von RO-57-BpB nicht messbar (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde zu Membranfraktionen von HEK293/sw-Zellen gewechselt, die nicht mit Detergenz behandelt wurden und die die γ -Sekretase somit in ihrer authentischen Umgebung enthielten. In diesem System zeigte RO-57-BpB eine deutlich verbesserte Aktivität. Eine Absenkung

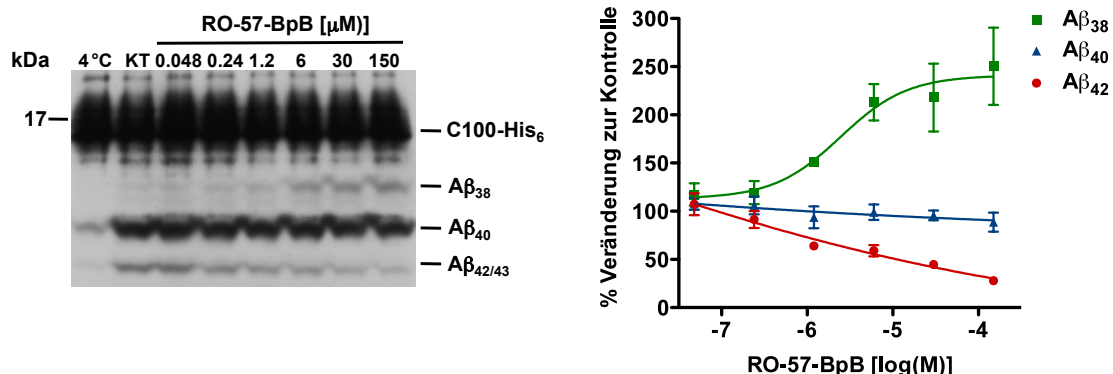


Abbildung 43: RO-57-BpB ist in Membranfraktionen deutlich aktiver als in zellfreien Assays, die die γ -Sekretase nicht in ihrer authentischen Umgebung belassen. Nicht mit Detergenz behandelte Membranfraktionen aus HEK293/sw-Zellen wurden DMSO (Kontrolle) oder mit steigender Konzentration RO-57-BpB inkubiert, die A β -Peptide mit 3552 Antikörper und PAS immunpräzipitiert und die A β -Peptide mittels SDS-PAGE (11%iges Harnstoff-Tris-Bicin-Gel) aufgetrennt und mittels IB detektiert. Um den Hintergrund der mit in der Membran isolierten und somit vor der Durchführung des Assays vorhandenen A β -Peptide abschätzen zu können, wurde eine Probe bei 4°C inkubiert. Links ist ein repräsentativer IB gezeigt, rechts die Quantifizierung (n = 3). Von allen Signalen wurden die der 4°C-Probe abgezogen, die Dosiswirkungskurve zeigt die auf Kontrolle normierten Mittelwerte \pm Standardfehler. KT, Kontrolle.

von A β ₄₂ auf 50% der Kontrolle wurde bei ca. 8,8 μM, 50% der maximal möglichen Abnahme bei 1,8 μM beobachtet (Abb. 43). Somit war dieses System am besten geeignet, um die Photoaffinitätsmarkierungsexperimente durchzuführen. Als Standardkonzentration für den Assay wurde 1 μM RO-57-BpB gewählt. Bei dieser Konzentration konnte A β ₄₂ um ca. 30% abgesenkt werden.

2.3.2 PS1- und PS2-NTF sind die molekularen Angriffsziele von RO-57-BpB

Um das (oder die) Zielprotein(e) von RO-57-BpB zu ermitteln, wurden Membranfraktionen von HEK293-Zellen mit RO-57-BpB sowie RO-57 und RO-02 bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert, mit UV-Licht bestrahlt und die querverknüpften Proteine nach Solubilisierung mit 1% SDS mit Streptavidin isoliert. Unter diesen harschen Bedingungen zerfällt der γ -Sekretasekomplex, was die spezifische Isolierung der Proteine erlaubt, an die RO-57-BpB kovalent gebunden ist. Die isolierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und alle Komponenten des γ -Sekretasekomplexes mittels Immunoblot detektiert. Nach Inkubation mit RO-57-BpB und bei Belichtung wurde ausschließlich für das PS1- und das PS2-NTF ein Signal gefunden; NCT, das PS1- und das PS2-CTF, APH-1aL/S sowie PEN-2 wurden nicht detektiert (Abb. 44, Spur 5 im IB). Dieses Signal wur-

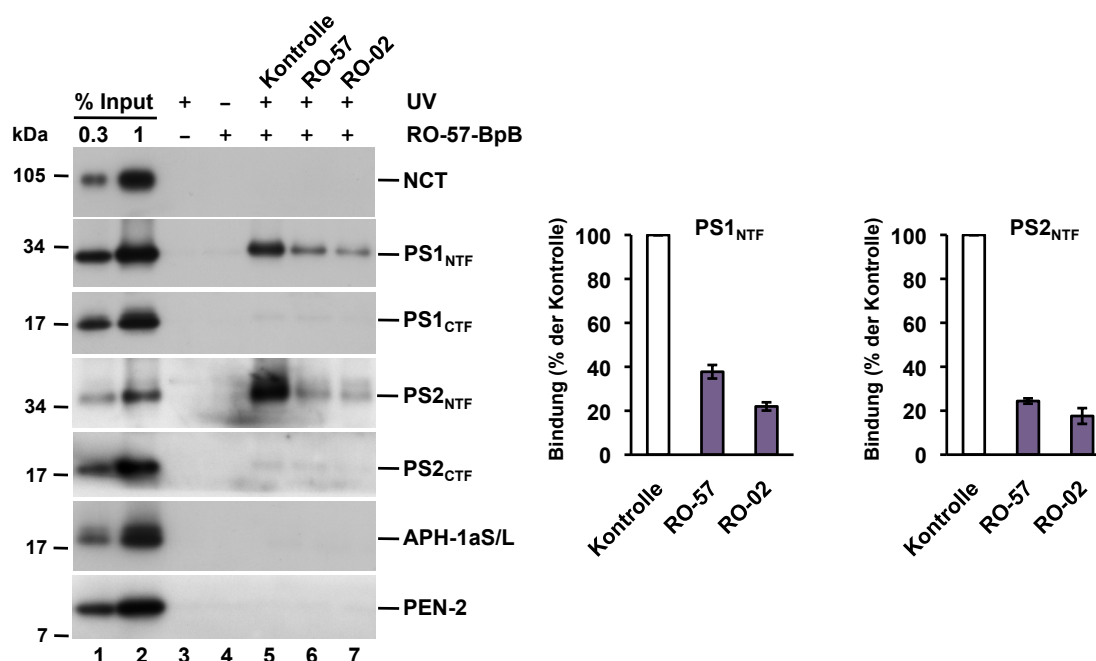


Abbildung 44: **PS1- und PS2-NTF sind die Zielproteine von RO-57-BpB.** Membranfraktionen von HEK293-Zellen wurden mit 1 μ M RO-57-BpB sowie DMSO (Kontrolle) und 100 μ M RO-57 als Kompetitoren im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, die mit Strep-avidin isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und die angegebenen Proteine mittels IB detektiert. Links ist ein repräsentativer IB gezeigt, rechts die Quantifizierung des Signals für PS1- bzw. PS2-NTF. Das Balkendiagramm zeigt die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 5$). Auf eine statistische Analyse der Kompetitionsstärke wurde verzichtet (siehe 4.2.4).

de sowohl in der Abwesenheit des UV-Lichts als auch von RO-57-BpB nicht beobachtet (Abb. 44, Spur 3 und 4 im IB). Bei Konkurrenz mit 100-fachem Überschuss RO-57 und RO-02 war sowohl das PS1- als auch das PS2-NTF-Signal deutlich auf bis zu 20 % reduziert, wobei RO-02 v.a. für das PS1-NTF besser kompetierte (Abb. 44, Spur 6 und 7 im IB und Quantifizierung). Interessanterweise war die Effizienz der Querverknüpfung für das PS2-NTF deutlich höher als für das PS1-NTF.

Vorab waren zur Optimierung des Assays verschiedene Solubilisierungsbedingungen geprüft worden. Bei Solubilisierung mit 1% SDS wurde deutlich weniger Hintergrund bei Abwesenheit von UV-Licht und auch weniger unspezifische Bindung anderer Proteine beobachtet als bei Solubilisierung mit RIPA (1% NP-40, 0.5% Natriumdeoxycholat, 0.1% SDS) [221] bzw. Verdünnung des SDS auf 0.1% vor der Präzipitation (Abb. 45A). Dies betrifft besonders auch die Komponenten des γ -Sekretasekomplexes, die als Proteine mit hydrophoben Transmembrandomänen zur unspezifischen Bindung an Sepharose

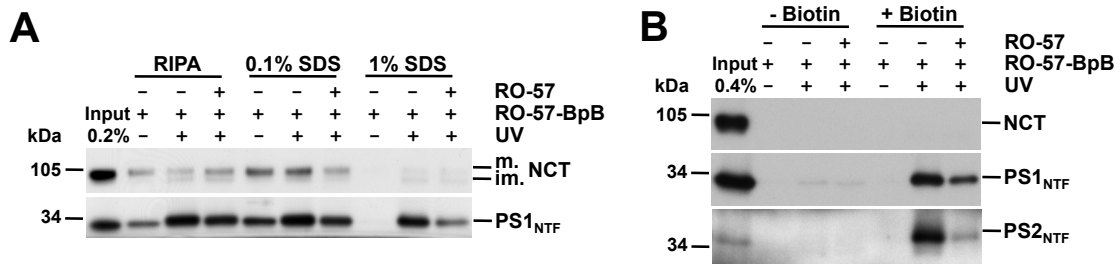


Abbildung 45: **Optimierung der Aufreinigung und Elution der mit Streptavidin isolierten Proteine.** **A.** Membranfraktionen von HEK293-Zellen wurden mit 1 μM RO-57-BpB sowie DMSO und 100 μM RO-57 als Kompetitoren im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, mit RIPA bzw. 1% SDS solubilisiert und die unter RIPA, 0.1 bzw. 1% SDS mit Streptavidin isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und die angegebenen Proteine mittels IB detektiert; *m.*, mature Form von NCT; *im.*, immature Form. **B.** Membranfraktionen von HEK293-Zellen wurden mit 1 μM RO-57-BpB sowie DMSO und 100 μM RO-57 als Kompetitoren im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, die mit Streptavidin isolierten Proteine unter Ab- oder Anwesenheit von 2 mM Biotin eluiert, mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und die angegebenen Proteine mittels IB detektiert.

neigen. Stellvertretend für die unspezifische Bindung von γ -Sekretasekomponenten an die Streptavidin-Sepharose ist in Abb. 45A NCT gezeigt. Außerdem verringerte die harsche Solubilisierungsbedingung auch das unspezifische Signal für das PS1-NTF bei Kompetition mit RO-57. Da die Biotin-Streptavidin-Bindung eine sehr starke nicht-kovalente Interaktion ist und diese Bindung sich eventuell auch nach Inkubation und Erhitzen mit Probenpuffer wieder ausbilden kann, wurde untersucht, ob sich eine Kompetition mit 2 mM Biotin bei der Elution mit Probenpuffer positiv auf die Effizienz der Elution auswirkt [451]. Abb. 45B zeigt, dass die Effizienz der Elution bei Zugabe von Biotin drastisch gesteigert werden konnte. Deshalb wurden diese Bedingungen für alle Photoaffinitätsmarkierungsassays beibehalten. Des weiteren wurde die Belichtungsdauer und das Inkubationsvolumen optimiert (Daten nicht gezeigt); 10 min. Bestrahlung mit UV-Licht bei 365 nm sowie 500 μl Volumen pro Ansatz (ca. 650 μg Gesamtprotein) zeigten das beste Signal- zu Hintergrund-Verhältnis.

Um die Beobachtung aus den initialen Querverknüpfungsexperimenten zu verifizieren, dass die Effizienz der Reaktion für das PS2-NTF deutlich höher als für das PS1-NTF war, wurden stabile HEK293/sw-Zelllinien hergestellt, die PS1 bzw. PS2 mit einer His₆Xpress-Markierung (H₆X) am N-Terminus exprimieren [205]. Prinzipiell könnte die Detektion durch proteinspezifische Antikörper ein Problem darstellen, falls das Epitop durch die Querverknüpfung modifiziert oder die Bindung des Antikörpers sterisch behindert wird. Durch Anbringen einer Markierung an PS1 und PS2 kann dieses Problem umgangen werden, da die Markierung dann unabhängig von der Proteinsequenz de-

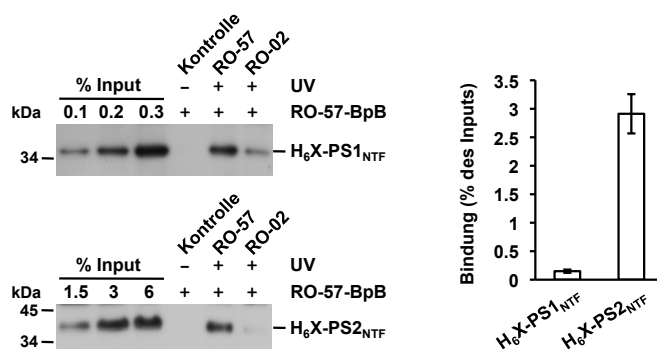


Abbildung 46: **Das PS2-NTF wird deutlich besser photoaffinitätsmarkiert als das PS1-NTF.** Membranfraktionen von HEK293/sw-Zellen, die H₆X-PS1 bzw. H₆X-PS2 überexprimierten, wurden mit 1 μ M RO-57-BpB sowie DMSO und 100 μ M RO-57 als Kompetitoren im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, die mit Streptavidin isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und die H₆X-Markierung mittels IB detektiert. Links sind zwei repräsentative IBs gezeigt, rechts zur Verdeutlichung die Quantifizierung der H₆X-PS1- und H₆X-PS2-Signale, wobei die Werte durch lineare Interpolation ermittelt wurden, da die Antikörperbindung nicht immer im linearen Bereich lag. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 3$).

tektiert werden kann. Mit diesen modifizierten PS1- und PS2-Konstrukten konnte der Befund bestätigt werden, dass die detektierte Bindung an das PS2-NTF weit effizienter ist als die an das PS1-NTF (Abb. 46). Die Quantifizierung der Querverknüpfung aus drei Experimenten mit Hilfe einer Konzentrationsreihe des Inputs zeigte, dass die Querverknüpfungseffizienz für das PS2-NTF zwischen 2 und 5% betrug, während vom PS1-NTF etwa 0.1 bis 0.25% querverknüpft werden konnten (Abb. 46). Damit war die Photoaffinitätsmarkierungseffizienz für das PS2-NTF etwa 20-fach höher als für das PS1-NTF. Somit konnte der anfängliche Befund, dass die Effizienz der Photoaffinitätsmarkierung für das PS2-NTF deutlich höher war als für das PS1-NTF, bestätigt werden.

2.3.3 APP ist kein Zielprotein von RO-57-BpB

Für den NSAID-ähnlichen GSM Flurbiprofen und den inversen GSM Fenofibrat wurde durch Querverknüpfung von modifizierten Derivaten gezeigt, dass sie an die APP-CTFs, aber an keine Komponente des γ -Sekretasekomplexes binden [406]. Deshalb sollte mit Hilfe von RO-57-BpB untersucht werden, ob Aminopyrimidin-GSMs auch an die APP-CTFs, die direkten Substrate der γ -Sekretase, oder an das APP-Vollängenprotein binden. Dazu wurden Membranfraktionen von HEK293/sw-Zellen untersucht, da die endogenen APP-CTFs in HEK293-Zellen bei der geringen Effizienz der Querverknüpfungsreaktion nur schwer zu detektieren wären. Aus Membranfraktionen dieser

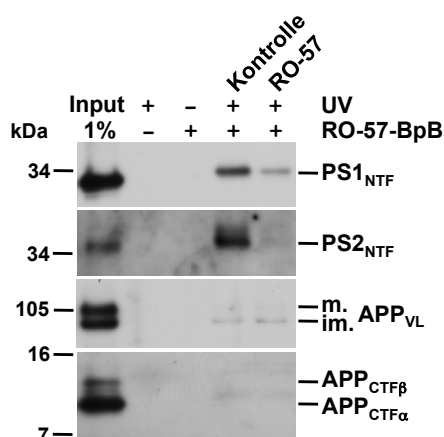


Abbildung 47: Das APP-Vollängenprotein und die APP-CTFs sind keine Zielproteine von RO-57-BpB. Membranfraktionen von HEK293/sw-Zellen wurden mit 1 μ M RO-57-BpB sowie DMSO und 100 μ M RO-57 als Kompetitoren im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, die mit Streptavidin isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und die angegebenen Proteine mittels IB detektiert; *m.*, mature Form; *im.*, immature Form, *VL*, Volllänge.

Zellen konnte mit RO-57-BpB nach Belichtung jedoch weder das APP-Vollängenprotein noch die APP-CTFs spezifisch isoliert werden (Abb. 47). Nach Belichtung wurden sehr schwache Signale für das APP-Vollängenprotein sowie die APP-CTFs detektiert, die jedoch zum einen bei Konkurrenz mit RO-57 in gleicher Stärke vorhanden waren und zudem auch Größenordnungen unter der Signalstärke des PS1- und PS2-NTF lagen, die als Positivkontrolle mit RO-57-BpB querverknüpft werden konnten. Die Spezifität der Photoaffinitätsmarkierung von PS1- und PS2-NTF konnte wiederum durch Konkurrenz mit RO-57 bestätigt werden. Dieser Befund legt nahe, dass APP kein Zielprotein für Aminopyrimidin-GSMs wie RO-57 ist.

2.3.4 SPP, SPPL2a und SPPL3 sind keine Zielproteine von RO-57-BpB

SPP und SPPLs gehören wie die Presenilinen zu den GxGD-Intramembranproteasen (siehe 1.7) [419–421]. Deshalb sollte untersucht werden, ob RO-57-BpB auch an diese Proteasen bindet. Dies hätte Implikationen für die Spezifität der Aminopyrimidin-GSMs sowie den Mechanismus der Modulation. Wenn RO-57-BpB auch an SPP oder eine SPPL-Protease binden würde, könnte auch die Prozessierung von Substraten dieser Proteasen von der Modulation betroffen sein. Gleichzeitig könnte wegen der geringen Sequenzhomologie der SPP(L)-Proteasen zu den Presenilinen außerhalb der konservierten Motive Rückschlüsse auf die Bindungsstelle von RO-57-BpB gezogen werden, d.h. die Region im Protein, an die der wirksame Bestandteil (engl. *active moiety*) der Aminopyrimidine

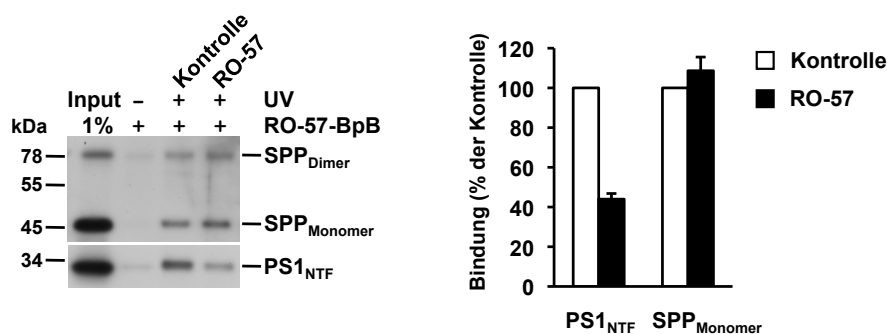


Abbildung 48: **SPP wird nicht spezifisch von RO-57-BpB gebunden.** Membranfraktionen von HEK293-Zellen wurden mit 1 μ M RO-57-BpB sowie DMSO als Kontrolle und 100 μ M RO-57 als Kompetitoren im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, die mit Streptavidin isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und SPP und PS1-NTF mittels IB detektiert. Links ist ein repräsentativer IB gezeigt, rechts die Quantifizierung des Signals für PS1-NTF und SPP von den gescannten IBs. Das Balkendiagramm zeigt die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte \pm Standardfehler (n = 3).

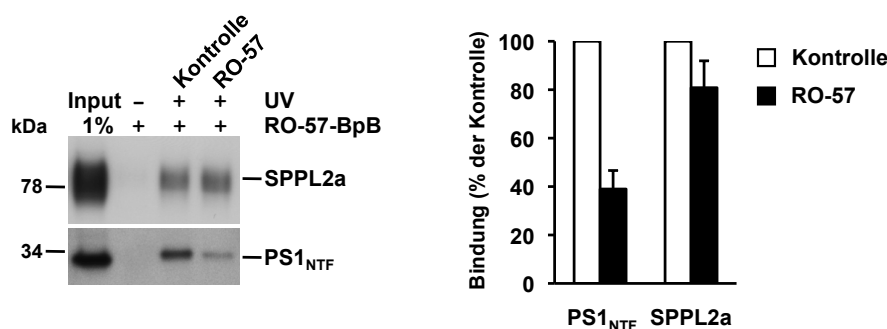


Abbildung 49: **SPPL2a wird nicht spezifisch von RO-57-BpB gebunden.** Membranfraktionen von HEK293-Zellen wurden mit 1 μ M RO-57-BpB sowie DMSO als Kontrolle und 100 μ M RO-57 als Kompetitoren im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, die mit Streptavidin isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und SPPL2a und PS1-NTF mittels IB detektiert. Links ist ein repräsentativer IB gezeigt, rechts die Quantifizierung des Signals für PS1-NTF und SPPL2a. Das Balkendiagramm zeigt die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte \pm Standardfehler (n = 3).

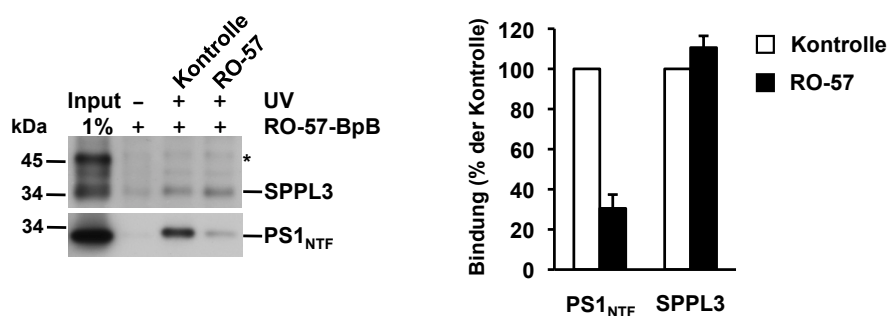


Abbildung 50: **SPPL3 wird nicht spezifisch von RO-57-BpB gebunden.** Membranfraktionen von HEK293-Zellen wurden mit 1 μ M RO-57-BpB sowie DMSO als Kontrolle und 100 μ M RO-57 als Kompetitoren im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, die mit Streptavidin isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und SPP und PS1-NTF mittels IB detektiert. Links ist ein repräsentativer IB gezeigt, rechts die Quantifizierung des Signals für PS1-NTF und SPPL3 von den gescannten IBs. Das Balkendiagramm zeigt die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 3$). Der Stern kennzeichnet eine unspezifisches Signal des Antikörpers gegen SPPL3 (unpublizierte Daten, M. Voss).

bindet. Diese Region müsste dann in einem Bereich liegen, in dem die Proteinsequenz oder zumindest die Sekundärstruktur des Proteins konserviert ist, womöglich nahe des aktiven Zentrums.

In HEK293-Zellen sind endogen SPP, SPPL2a und SPPL3, aber nicht SPPL2b oder 2c in ausreichender Quantität bzw. Qualität mit den im Labor verfügbaren Antikörpern detektierbar. Deshalb sollte für SPP, SPPL2a und SPPL3 untersucht werden, ob RO-57-BpB spezifisch an diese bindet. Dazu wurde der Photoaffinitätsmarkierungsassay wie in 2.3.2 beschrieben durchgeführt, die isolierten Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und dann jeweils mittels Immunoblot SPP, SPPL2a und SPPL3 detektiert. Dabei konnte sowohl für SPP (siehe Abb. 48) als auch für SPPL2a (siehe Abb. 49) und für SPPL3 (siehe Abb. 50) eine ähnliche Photoaffinitätsmarkierungseffizienz mit RO-57-BpB beobachtet werden wie für das PS1-NTF. Jedoch konnte bei Konkurrenz mit RO-57 für keine der drei Proteasen eine Abnahme dieses Signals beobachtet werden, während das Photoaffinitätsmarkierungssignal für das PS1-NTF an RO-57-BpB in jedem Experiment durch RO-57 in erwartetem Maße kompetiert wurde (siehe Abb. 48, 49 und 50, jeweils die Quantifizierung). Somit ist die Querverknüpfung von RO-57-BpB an SPP, SPPL2a und SPPL3 höchstwahrscheinlich unspezifisch.

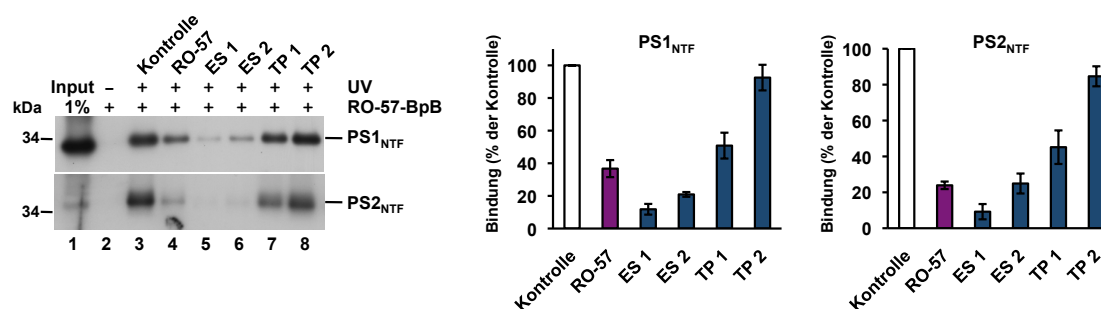


Abbildung 51: Nicht-acidische GSMs der zweiten Generation von Eisai und TorreyPines Therapeutics kompetieren differenziell mit RO-57-BpB um die Bindung an das PS1- und PS2-NTF. Membranfraktionen von HEK293-Zellen wurden mit 1 μ M RO-57-BpB sowie DMSO als Kontrolle und 100 μ M RO-57, ES 1, ES 2, TP 1 und TP 2 als Kompetitoren im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, die mit Streptavidin gefällten Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und PS1- und PS2-NTF mittels IB detektiert. Links ist ein repräsentativer IB gezeigt, rechts die Quantifizierung des Signals für PS1- bzw. PS2-NTF. Das Balkendiagramm zeigt die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 3$).

2.3.5 Wettbewerbsstudien mit GSMs und GSIs deuten auf gemeinsame und überlappende Bindungsstellen hin

Um Hinweise darauf zu finden, ob die Bindungsstelle von RO-57-BpB im PS1- bzw. PS2-NTF mit der Bindungsstelle anderer GSMs sowie GSIs überlappend oder identisch ist, wurden mit verschiedenen Substanzen Wettbewerbsassays gegen die Bindung von RO-57-BpB an das PS1- und PS2-NTF durchgeführt. Dieser Versuchsaufbau kann gute Hinweise darauf geben, ob sich die Bindungsstellen zweier Substanzen überlappen oder nicht. Jedoch kann durch diesen Assay nicht abschließend bewiesen werden, wie das Verhältnis zweier Bindungsstellen zueinander ist. Denn zur Konkurrenz des Photoaffinitätsmarkierungssignals kann es auch kommen, wenn die als Wettbewerber eingesetzte Substanz die Konformation der γ -Sekretase über eine allosterische Bindung so verändert, dass RO-57-BpB schlechter oder nicht mehr binden kann. Außerdem kann das Wettbewerbsverhalten einer Substanz auch von deren physikochemischen Eigenschaften wie z.B. Löslichkeit und Lipophilie beeinflusst werden, die Auswirkungen auf die Verfügbarkeit der Substanz im Wettbewerbsassay haben können.

Als erstes wurden nicht-acidische GSMs der zweiten Generation im Wettbewerbsassay gegen RO-57-BpB untersucht. Die Strukturformeln der verwendeten GSMs von Eisai und TorreyPines Therapeutics ähneln in der linken Hälfte des Moleküls stark den Aminopyrimidin-GSMs (Strukturformeln siehe 1.6.2). ES 1 (in der Literatur auch E2012 genannt [408]) und ES 2, die beiden verwendeten GSMs von Eisai, kompetierten deut-

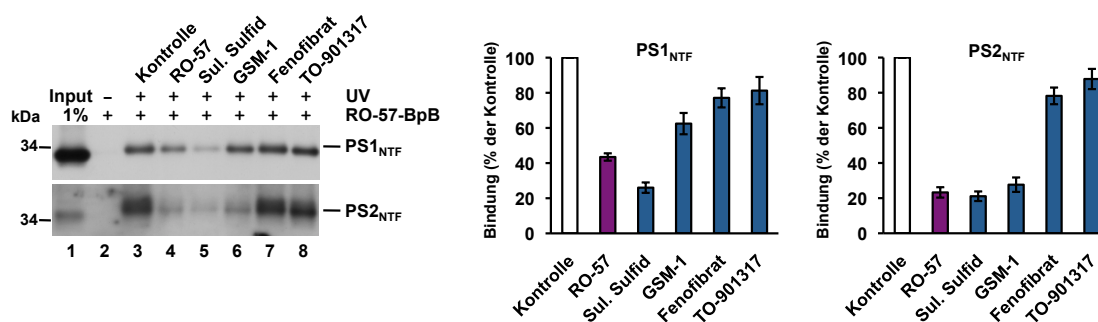


Abbildung 52: NSAID-ähnliche GSMs kompetieren differentiell mit RO-57-BpB um die Bindung an das PS1- und PS2-NTF. Membranfraktionen von HEK293-Zellen wurden mit 1 µM RO-57-BpB sowie DMSO als Kontrolle und 100 µM RO-57, Sulindac Sulfid, GSM-1, Fenofibrat und TO-901317 als Kompetitoren im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, die mit Streptavidin isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und PS1- und PS2-NTF mittels IB detektiert. Links ist ein repräsentativer IB gezeigt, rechts die Quantifizierung des Signals für PS1- bzw. PS2-NTF. Das Balkendiagramm zeigt die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 3 - 6$).

lich mit RO-57-BpB um die Bindung des PS1- und des PS2-NTFs (Abb. 51, Spur 5 und 6 im IB). Für ES 1 war die Konkurrenz sogar deutlich stärker als für RO-57. Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass ES 1 und ES 2 die Bindungsstelle im PS1- bzw. PS2-NTF mit den Aminopyrimidinen teilen. Im Gegensatz dazu zeigten zwei Derivate der Serie A aus Kounnas *et al.* [407], TP 1 und TP 2, ein differenzierteres Bild: Während TP 1 nur geringfügig schlechter als RO-57 und somit partiell mit RO-57-BpB um die Bindung an das PS1- und PS2-NTF kompetierte, zeigte TP 2 kaum Konkurrenz (Abb. 51, Spur 7 und 8 im IB). Dies könnte darauf beruhen, dass TP 2 und RO-57-BpB keine überlappende Bindungsstelle haben. Aber in Anbetracht des partiellen Konkurrenzverhaltens des weniger lipophilen TP 1, dessen Strukturformel sich nur um ein Stickstoffatom von TP 2 unterscheidet (Pyridin statt Benzol), könnte die Reduktion der Konkurrenz von TP 2 im Vergleich zu der von TP 1 auch an erhöhter Lipophilie oder schlechter Löslichkeit von TP 2 liegen (siehe 3.7).

Als nächstes wurde das Konkurrenzverhalten von NSAID-ähnlichen GSMs untersucht. Dabei wurden für $A\beta_{42}$ -erniedrigende und inverse GSMs jeweils ein Vertreter der ersten und der zweiten Generation ausgewählt. Sulindac Sulfid ist als einer der bekanntesten GSMs der ersten Generation ca. 400-fach weniger potent als GSM-1 (siehe 4.1.3). Dennoch kompetierte Sulindac Sulfid erheblich stärker als GSM-1 mit RO-57-BpB um die Bindung an PS1- und PS2-NTF. Für das PS1-NTF war die Konkurrenz sogar stärker als für die Ausgangssubstanz RO-57 (Abb. 52, Spur 5 im IB). GSM-1 hingegen konnte nur für das PS2-NTF in der gleichen Stärke wie RO-57 konkurrieren, für das PS1-NTF

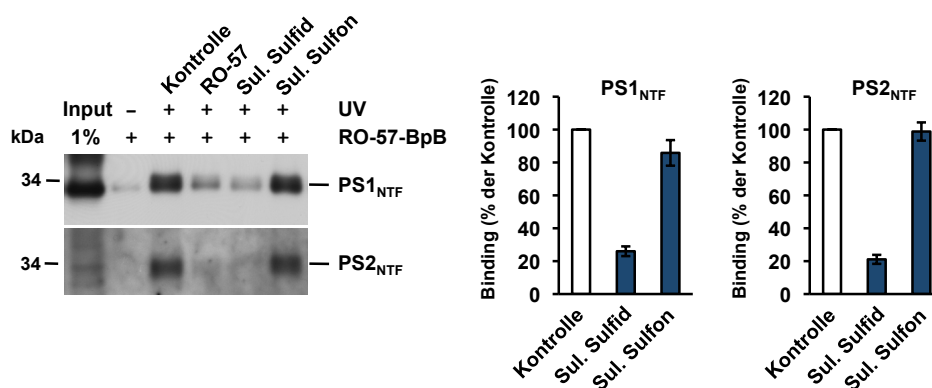


Abbildung 53: **Sulindac Sulfon kompetiert nicht mit RO-57-BpB um die Bindung an das PS1- und PS2-NTF.** Membranfraktionen von HEK293-Zellen wurden mit 1 μ M RO-57-BpB sowie DMSO als Kontrolle und 100 μ M RO-57, Sulindac Sulfid sowie Sulindac Sulfon als Kompetitoren im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, die mit Streptavidin isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und PS1- und PS2-NTF mittels IB detektiert. Links ist ein repräsentativer IB gezeigt, rechts die Quantifizierung des Signals für PS1- bzw. PS2-NTF. Das Balkendiagramm zeigt die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 5$).

war die Konkurrenz deutlich schwächer (Abb. 52, Spur 6 im IB). Im Gegensatz dazu war das Bild für die beiden getesteten inversen GSMs einheitlicher: Sowohl Fenofibrat als auch TO-901317 kompetierten kaum mit RO-57-BpB, etwa in gleichem Ausmaß für PS1- und PS2-NTF (Abb. 52, Spur 7 und 8 im IB).

Angesichts des überraschend starken Konkurrenzverhaltens von Sulindac Sulfid lag es nahe, das Konkurrenzverhalten von Sulindac Sulfon zu prüfen. Das Sulfon ist sowohl bezüglich der COX-Inhibition [452] als auch der γ -Sekretasemodulation inaktiv [396,409]. Wenn dieses inaktive Derivat nun ein ähnlich starkes Konkurrenzverhalten wie das Sulfid zeigte, wäre dies ein starker Hinweis darauf, dass die Konkurrenz des Sulfids auf unspezifische Effekte zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu Sulindac Sulfid konnte das Sulfon aber nicht mit RO-57-BpB um die Bindung an PS1- und PS2-NTF konkurrieren (siehe Abb. 53). Somit kann mit diesem Ergebnis nicht auf einen unspezifischen Effekt im Falle der Konkurrenz von Sulindac Sulfid geschlossen werden.

Abschließend sollte für NSAID-ähnliche $A\beta_{42}$ -senkende GSMs der ersten Generation geprüft werden, ob diese generell stark mit RO-57-BpB konkurrieren und damit eine gemeinsame Bindungsstelle mit den Aminopyrimidin-GSMs im PS-NTF wahrscheinlich ist. Wenn das starke Konkurrenzverhalten in der Grundstruktur der NSAID-ähnlichen GSMs begründet wäre, sollte Indomethacin, das eine ähnliche Struktur wie Sulindac Sulfid besitzt, ebenfalls mit RO-57-BpB um die Bindung an PS1- und PS2-NTF konkurrieren können. Interessanterweise konnte Indomethacin nur äußerst schwach mit RO-57-BpB

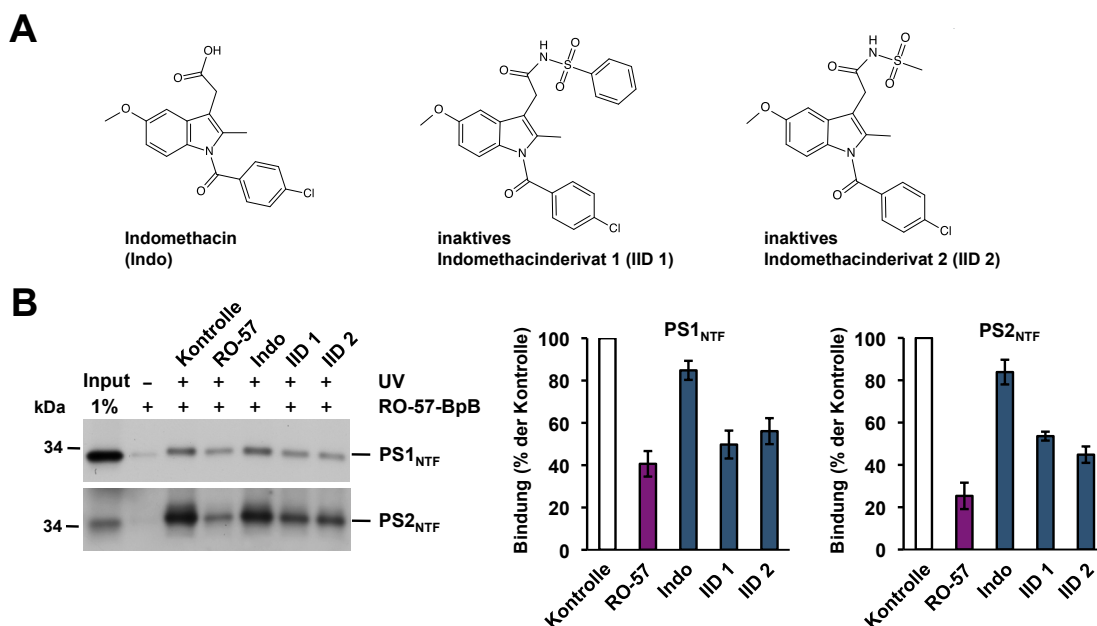


Abbildung 54: **Indomethacin kompetiert nicht mit RO-57-BpB um die Bindung an das PS1- und PS2-NTF.** Membranfraktionen von HEK293-Zellen wurden mit 1 μ M RO-57-BpB sowie DMSO als Kontrolle und 100 μ M RO-57, Indomethacin sowie zwei inaktiven Indomethacinderivaten als Kompetitoren im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, die mit Streptavidin isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und PS1- und PS2-NTF mittels IB detektiert. Links ist ein repräsentativer IB gezeigt, rechts die Quantifizierung des Signals für PS1- bzw. PS2-NTF. Das Balkendiagramm zeigt die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 3$). *Indo*, Indomethacin; *IID 1*, inaktives Indomethacinderivat 1; *IID 2*, inaktives Indomethacinderivat 2.

kompetieren (siehe Abb. 54). Sehr überraschend war jedoch, dass beide inaktive Derivate das PS1- und PS2-NTF-Signal auf etwa 50% reduzierten. Somit zeigten diese Substanzen unabhängig von ihrer (nicht vorhandenen) modulatorischen Aktivität eine Konkurrenz, was darauf hindeutet, dass das Verhalten dieser Substanzklasse mit unspezifischen Nebeneffekten verbunden sein kann und deshalb die Konkurrenz von Sulindac Sulfid mit Vorsicht zu interpretieren ist (siehe 3.7).

Als letzte Substanzgruppe wurden GSIs im Wettbewerbsassay getestet. Dazu wurden Derivate verschiedener Klassen ausgewählt: L-685,458 [218, 221] als Übergangszustandsanalogon, DAPT [364, 365] und LY-411,575 [367, 368] für allosterische, dipeptidische GSIs sowie das Sulfonamid Begacestat [386, 387], das die Prozessierung von APP stärker als die von Notch1 inhibiert (siehe 1.6.1). Da die IC_{50} -Werte für alle verwendeten GSIs im niedrig-nanomolaren Bereich liegen (siehe 4.1.3), wurden sie mit 1 μ M für die Wettbewerbstudien eingesetzt. L-685,458 zeigte als einziger getesteter GSI eine leichte

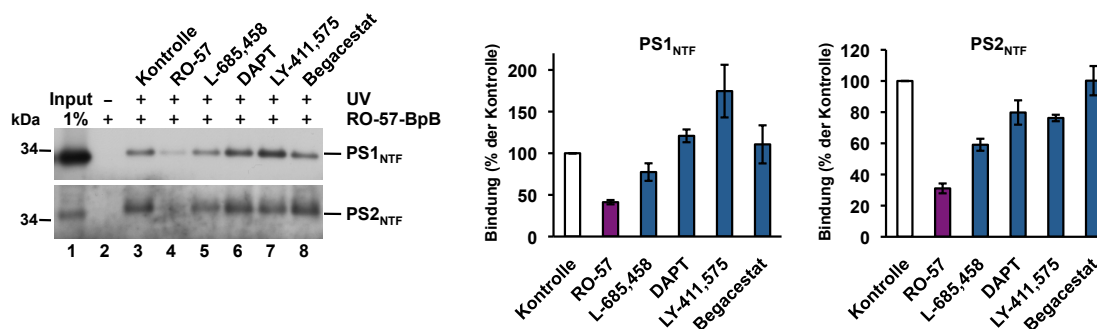


Abbildung 55: **GSI**s kompetieren mehrheitlich nicht mit RO-57-BpB um die Bindung an das PS1- und PS2-NTF. Membranfraktionen von HEK293-Zellen wurden mit 1 µM RO-57-BpB sowie DMSO als Kontrolle und 100 µM RO-57 bzw. 1 µM L-685,458, DAPT, LY-411,575 und Begacestat als Kompetitoren im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, die mit Streptavidin isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und PS1- und PS2-NTF mittels IB detektiert. Links ist ein repräsentativer IB gezeigt, rechts die Quantifizierung des Signals für PS1- bzw. PS2-NTF. Das Balkendiagramm zeigt die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte \pm Standardfehler ($n = 3$).

Kompetition gegen die Bindung von RO-57-BpB an das PS1- und PS2-NTF (Abb. 55, Spur 5); LY-411-575 hingegen kompetierte geringfügig und nur für die Bindung von RO-57-BpB an das PS2-NTF, während die Bindung an das PS1-NTF um etwa 70% erhöht war (Abb. 55, Spur 7). Konkurrenz mit DAPT und Begacestat hatte kaum Einfluss auf die RO-57-BpB-Bindung (Abb. 55, Spur 6 und 8). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass wahrscheinlich nur die Bindungsstellen von RO-57-BpB und L-685,458 überlappen, und dies nur in geringem Ausmaß.

2.3.6 Das Konkurrenzverhalten von RO-53 deutet auf eine distinkte Bindungsstelle im γ -Sekretasekomplex hin

Bei den Experimenten zum Konkurrenzverhalten verschiedener GSMs anderer Strukturklassen gegen die RO-57-BpB-Bindung fiel RO-53 auf, bei dessen Anwesenheit in 100-fachem Überschuss zu RO-57-BpB die Querverknüpfungseffizienz an das PS1- und PS2-NTF dramatisch erhöht war (Daten nicht gezeigt). Diese Signalerhöhung war für keine andere untersuchte Substanzklasse zu beobachten. Deshalb sollte dieser Effekt näher charakterisiert werden. Aus patentrechtlichen Gründen kann an dieser Stelle die Strukturformel von RO-53 nicht gezeigt werden. RO-53 ist ein GSM, dessen Aktivitätsprofil dem der NSAID-ähnlichen GSMs wie GSM-1 ähnelt. Die Substanz hemmt die $A\beta_{40}$ -Produktion bis zu hohen Konzentrationen auf HEK293/sw-Zellen nicht, während sie den $A\beta_{42}$ -Spiegel mit einem IC_{50} von 100 nM absenkt (Abb. 56).

Als erstes sollte überprüft werden, ob auch ein inaktives Derivat der Substanzklas-

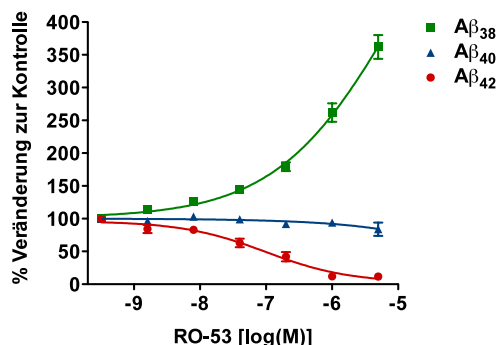


Abbildung 56: **RO-53 zeigt ein ähnliches Modulationsprofil wie acidische GSMs.** HEK293/sw-Zellen wurden mit DMSO (Kontrolle) oder RO-53 behandelt und die Konzentration der A β -Peptide im Kulturüberstand anschließend im ECL-IA gemessen. Die Dosiswirkungskurve zeigt die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 3.

se den gleichen Effekt hervorruft und die erhöhte Photoaffinitätsmarkierungseffizienz von RO-57-BpB bei Anwesenheit von RO-53 somit unabhängig von dessen modulatorischer Aktivität ist. Dazu wurden im Photoaffinitätsmarkierungsassay RO-53 und das inaktive Derivat RO-54 als Kompetitoren verwendet, als Kontrolle wurde NCT detektiert. Während die erhöhte Photoaffinitätsmarkierungseffizienz für RO-53 schon bei einfachem und zehnfachem Überschuss zu RO-57-BpB zu beobachten war, hatte das inaktive Derivat RO-54 nicht diese Wirkung (Abb. 57A). Eine geringe Signalabnahme bei 10 μ M RO-54 war reproduzierbar, die Bedeutung dieser milden Konkurrenz ist aber unklar. Eine Photoaffinitätsmarkierung von NCT wurde unter keiner Bedingung gefunden, was als Kontrolle für mögliche unspezifische Querverknüpfung detektiert wurde. Die Signalerhöhung für die Photoaffinitätsmarkierung des PS-NTF durch RO-57-BpB bei Anwesenheit von RO-53 ist somit spezifisch für die katalytische Untereinheit der γ -Sekretase und abhängig von der modulatorischen Aktivität von RO-53.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob RO-53 die Effizienz der Querverknüpfung von RO-57-BpB unspezifisch erhöht, d.h. ob diese auch bei Konkurrenz mit RO-57 zu beobachten ist, oder ob PS1- und PS2-NTF bei Anwesenheit von RO-53 generell vermehrt unspezifisch an die Streptavidin-Sepharose binden. Deshalb wurde ein Photoaffinitätsmarkierungsassay unter Zugabe von DMSO als Kontrolle sowie 10 μ M RO-53 durchgeführt. Dabei konnte keine Signalerhöhung für den nicht belichteten Ansatz sowie den Ansatz mit RO-57 als Kompetitor bei Anwesenheit von RO-53 beobachtet werden (Abb. 57B). Somit erhöht RO-53 nicht die unspezifische Bindung der PS-NTFs an die Streptavidin-Sepharose.

Die spezifische Steigerung der Querverknüpfungseffizienz von RO-57-BpB an das

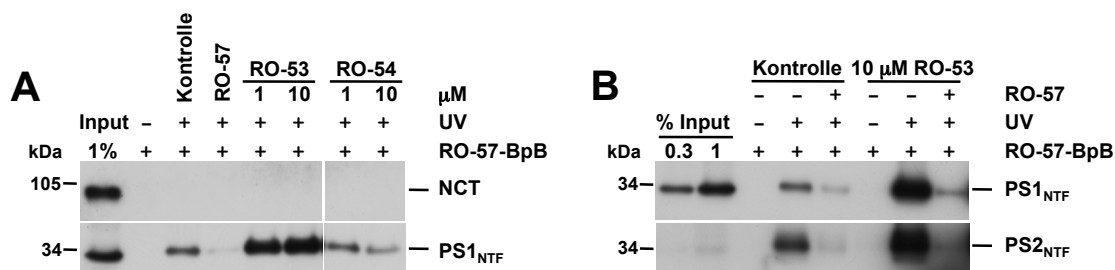


Abbildung 57: **RO-53 erhöht spezifisch die Querverknüpfungseffizienz von RO-57-BpB an das PS1- und PS2-NTF.** **A.** Membranfraktionen von HEK293-Zellen wurden mit 1 μM RO-57-BpB sowie DMSO als Kontrolle, 100 μM RO-57 und angegebenen Konzentrationen an RO-53 und RO-54 als Kompetitoren im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, die mit Streptavidin gefällten Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) und NCT und PS1-NTF mittels IB detektiert. **B.** Native Membranfraktionen von HEK293-Zellen wurden mit 1 μM RO-57-BpB sowie DMSO als Kontrolle, 100 μM RO-57 sowie DMSO bzw. 10 μM RO-53 im Photoaffinitätsmarkierungsassay eingesetzt, die mit Streptavidin gefällten Proteine mittels SDS-PAGE (10-20%iges Tris-Tricin-Gel) aufgetrennt und PS1- und PS2-NTF mittels IB detektiert.

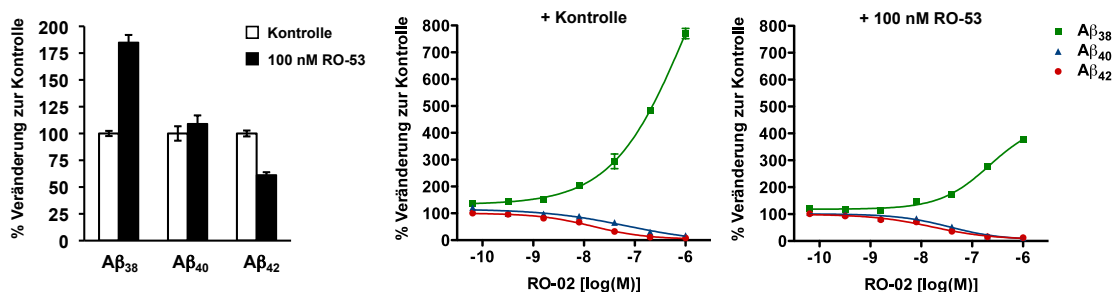


Abbildung 58: **100 nM RO-53 hat keinen Einfluss auf den IC₅₀ (Aβ₄₂) von RO-02.** HEK293/sw-Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe an RO-02 und DMSO als Kontrolle bei Anwesenheit von DMSO als Kontrolle bzw. 100 nM RO-53 behandelt und die Konzentration der Aβ-Peptide im Kulturüberstand anschließend im ECL-IA gemessen. Links der Vergleich der beiden Kontrollwerte der Kurven (mit Kontrolle bzw. 100 nM RO-53). Die Dosiswirkungskurven bei Anwesenheit von Kontrolle bzw. 100 nM RO-53 zeigen die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte ± Standardfehler, n = 3. Die IC₅₀-Werte für Aβ₄₂ für RO-02 sind 15 nM (log IC₅₀ = - 7.83 ± 0.08) bei Anwesenheit von Kontrolle sowie 16 nM (log IC₅₀ = - 7.89 ± 0.14) bei Anwesenheit von 100 nM RO-53.

PS1- und PS2-NTF bei Anwesenheit von RO-53 legte die Prüfung nahe, ob RO-53 die modulatorische Wirkung von RO-02 verbessert. Wenn RO-53 die Affinität von RO-02 an die γ -Sekretase erhöht, d.h. eine Erhöhung der Assoziations- oder eine Erniedrigung der Dissoziationskonstante bewirkt, könnte dies wiederum zu einer höheren Aktivität von RO-02 bei Anwesenheit von RO-53 zur Folge haben. Deshalb wurden Dosiswirkungskurven von RO-02 in An- oder Abwesenheit von 100 nM RO-53 (IC_{50} ($A\beta_{42}$)) auf HEK293/sw-Zellen gemessen (Abb. 58). Wie erwartet erhöhte 100 nM RO-53 allein den $A\beta_{38}$ -Spiegel um ca. 100% und senkte den $A\beta_{42}$ -Spiegel auf etwa 60%, während der $A\beta_{40}$ -Spiegel keine signifikante Änderung zeigte. Es wurde jedoch keine Veränderung des IC_{50} für die $A\beta_{42}$ -Inhibition in Abhängigkeit von RO-53 beobachtet (mit Kontrolle: 15 nM, mit 100 nM RO-53: 16 nM). Der Anstieg des $A\beta_{38}$ -Spiegels war bei Anwesenheit von RO-53 abgeschwächt. Dies kann jedoch darin begründet sein, dass schon beim Startwert dieser Dosiswirkungskurve der $A\beta_{38}$ -Spiegel bei knapp 200% der Kontrolle lag und die $A\beta_{38}$ -Konzentration nicht über einen bestimmten Wert erhöht werden kann. Dieses Ergebnis zeigt, dass RO-53 in einer Konzentration um den IC_{50} ($A\beta_{42}$) zu keiner Aktivitätssteigerung von RO-02 führt. Jedoch gibt das Kompetitionsverhalten von RO-53 im Photoaffinitätsmarkierungsassay Hinweise darauf, dass die GSM-Klasse, aus der RO-53 stammt, eine andere Bindungsstelle besitzt als die Aminopyrimidin-GSMs.

Zusammengefasst konnte im experimentellen Teil dieser Dissertation gezeigt werden, dass APP-Mutanten des GxxxG-Dimerisierungsmotivs sowie FAD-Mutanten in der Region der γ -Sekretasespaltstellen auf GSM-Behandlung ansprechen. Im zweiten Teil wurde die neue nicht-acidische Strukturklasse der Aminopyrimidin-GSMs charakterisiert und das PS-NTF als Zielprotein bestimmt. Insgesamt sprechen die erhobenen Daten gegen den Mechanismus der Substratbindung und für die γ -Sekretase selbst als molekularen Angriffspunkt von GSMs.

3 Diskussion

Diese Dissertation beschäftigt sich mit den molekularen Angriffspunkten und Wirkmechanismen von acidischen und nicht-acidischen GSMs. Im ersten Teil wurde untersucht, ob eine Schwächung einer möglichen Dimerisierung des APP- β CTF über ein GxxxG-Motiv die γ -Sekretaseaktivität moduliert, und ob dimerisierungsschwächende Mutationen die Wirkung dieser GSMs beeinträchtigen. Außerdem wurde für APP-FAD-Mutanten getestet, ob diese auf GSM-Behandlung ansprechen, um so weitere Hinweise darauf zu erhalten, ob das Substrat das Zielprotein der NSAID-ähnlichen GSMs ist. Im zweiten Teil wurde die neue nicht-acidische GSM-Klasse der Aminopyrimidine von F. Hoffmann-La Roche Ltd. in verschiedenen Assay-Systemen charakterisiert. Ferner wurde durch Photoaffinitätsmarkierung das molekulare Angriffsziel der Aminopyrimidin-GSMs bestimmt und mittels Kompetitionsassays Hinweise auf die Lage der Bindungsstelle im Vergleich zu der anderer GSMs und GSIs gewonnen.

3.1 Dimerisierung des APP- β CTF als Modulator der γ -Sekretaseaktivität

Die Frage, ob eine mögliche Dimerisierung des APP- β CTF Auswirkungen auf die γ -Sekretaseaktivität hat, wird schon lange diskutiert. Vor über zehn Jahren beobachteten Scheuermann *et al.* einen starken Einfluss einer erzwungenen Dimerisierung des APP- β CTF auf die A β -Produktion. Eine konstitutive Dimerisierung über Disulfidbrücken durch die K28C-Mutation des APP- β CTF führte zu einer sechs- bis achtfachen Erhöhung der A β -Produktion im Vergleich zum WT-Substrat [453]. Allerdings konnten Munter *et al.* für eine weitere Cysteinmutante, L17C, im Vergleich zum WT nur ein Anstieg von A β_{42} beobachten, und das weitaus weniger dramatisch [175]. Diese Ergebnisse wurden beide durch Analyse von Mutationen gewonnen, die im Bereich der sekretierten A β -Domäne liegen. Jedoch sind nach Mutagenese beobachtete Effekte mit Vorsicht zu interpretieren, da diese nicht zwangsläufig auf die Veränderung der Dimerisierung, sondern auch auf möglicherweise geänderte Eigenschaften des Substrats wie dessen Konformation oder die Positionierung an der γ -Sekretase zurückzuführen sein könnten. Außerdem könnte die Detektion von mutierten A β -Peptiden mittels IB oder ECL-Immunoassay beeinträchtigt sein, wenn diese von den verwendeten Antikörpern schlechter als die WT-Peptide erkannt werden. Deshalb verwendeten Eggert *et al.* eine andere Methode zum Erzwingen der Dimerisierung, indem sie an den C-Terminus des APP bzw. des APP- β CTF eine 12 kDa große FKBP-Domäne (engl. *FK506-binding protein domain*) anbrachten, die bei Zugabe eines spezifischen Liganden dimerisiert [454]. Natürlich ist auch eine solch große zusätzliche Domäne eine dramatische Veränderung des APP- β CTF, verdoppelt

sie doch das Molekulargewicht des direkten Substrats der γ -Sekretase. Außerdem geht die erzwungene Dimerisierung streng genommen nach dem ϵ -Schnitt der γ -Sekretase verloren. Jedoch ist dieser Ansatz zumindest unabhängig von Mutagenese im Bereich der γ -Schnittstellen, und die unveränderte physiologische Zusammensetzung der A β -Peptide war ein Hinweis darauf, dass die FKBP-Domäne die γ -Sekretaseaktivität *per se* nicht beeinträchtigt [454]. Interessanterweise wurde mit dieser Dimerisierungsmethode jedoch genau das Gegenteil davon gefunden, was für die K28C-Mutante gezeigt wurde [453], denn eine erzwungene Dimerisierung führte zu einer deutlichen Reduktion der A β -Produktion [454]. Ebenso uneindeutig ist die Datenlage zum Einfluss der Dimerisierung auf die Zusammensetzung der A β -Spezies. Während Eggert *et al.* keine veränderte Zusammensetzung der A β -Peptide fanden [454], beobachteten Munter *et al.* für dimerisierungsschwächende Mutanten des G₂₉xxxG₃₃-Motivs eine Modulation der γ -Sekretaseaktivität [175]. Dabei war die Modulation sogar strikt mit der Dimerisierungsstärke gekoppelt, denn in dem Maße, wie eine Mutation die Dimerisierung schwächte, war A β ₃₈/Gesamt-A β erhöht und gleichzeitig A β ₄₂/Gesamt-A β erniedrigt [175].

Vor dem Hintergrund der Kontroverse um den Einfluss einer Dimerisierung des APP- β CTF auf die γ -Sekretaseaktivität sollten in dieser Arbeit die GxxxG-Mutanten im zellfreien System untersucht werden. Dieses System bietet im Vergleich zur Zellkultur den klaren Vorteil, dass auf die mutationstragenden A β -Peptide keine potentiellen Sekundäreffekte wie veränderte Sekretion, veränderter oder selektiver Abbau oder verstärkte Aggregation wirken können. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Munter *et al.* konnte allerdings keine Koppelung von A β ₃₈-Zunahme und A β ₄₂-Abnahme beobachtet werden, vielmehr nahm A β ₄₀ gleichzeitig mit der A β ₃₈-Zunahme ab. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen aus Zellkultur, wenngleich dort ein deutlich reduzierter A β ₄₂-Spiegel gemessen wurde [431]. Leider konnte nicht aufgeklärt werden, worin der Befundunterschied zwischen Zellkultur und zellfreiem System begründet ist. Eine Behandlung der Zellen mit verschiedenen Proteaseinhibitoren konnte den A β ₄₂-Spiegel nicht anheben (Daten nicht gezeigt). Da mit der I45F- und der V50F-Mutante aber gezeigt werden konnte, dass die γ -Sekretaseaktivität für Substrate mit Mutationen außerhalb der sekretierten A β -Region im zellfreien System vergleichbar mit Zellkultur ist, liegt der Schluss nahe, dass doch ein der γ -Sekretaseaktivität nachgelagerter Effekt für die Unterschiede verantwortlich sein könnte. Für die G33I-Mutante wurde im zellfreien System ein schwankender A β ₄₂-Spiegel gemessen. Genau für diese Mutante wurde publiziert, dass A β ₄₂ aufgrund einer veränderten Konformation leichter höhere Oligomere ausbildet [455]. Außerdem wurde gezeigt, dass das GxxxG-Motiv in einer Region liegt, die kritisch für die Aggregation ist [456,457]. Somit ist ein verändertes Aggregationsverhalten eine mögliche Erklärung für den reduzierten A β ₄₂-Spiegel im Zellkultursystem.

Der klare Anstieg des $A\beta_{38}$ -Spiegels in Richtung einer möglichen Schwächung der Dimerisierung zeigt aber, dass die Mutagenese der Glycine im GxxxG-Motiv eine Modulation der γ -Sekretaseaktivität zur Folge hat. Dennoch kann der Effekt nicht eindeutig alleine der Dimerisierung zugeordnet werden. Die verwendeten Mutationen könnten auch die Konformation und die Interaktion des Substrats mit der γ -Sekretase verändern. Weiterhin ist zu beachten, dass in einer unabhängigen Studie für die G29L/G33L-Mutante eine drastische Zunahme der Dimerisierung gefunden wurde [458], was die Frage aufwirft, ob die G29A-, G33A- und G33I-Mutanten wirklich die Dimerisierung schwächen.

3.2 GxxxG-Mutanten zeigen eine abgeschwächte Reaktion auf GSM-Behandlung

Auch wenn für die GxxxG-Mutanten nicht abschließend geklärt werden kann, warum sie die γ -Sekretaseaktivität modulieren, so war es dennoch interessant zu untersuchen, ob diese Mutanten auf GSM-Behandlung ansprechen. Das GxxxG-Motiv liegt in dem Bereich, der als Bindungsstelle für Fenofibrat und Flurbiprofen gefunden wurde [406]. Auch stellten weitere Studien einen Zusammenhang zwischen der Dimerisierung und der Wirkungsweise NSAID-ähnlicher GSMs her und schlugen vor, dass GSMs ihre Wirkung über die Störung der Dimerisierung ausüben [416, 417]. Dem gegenüber steht eine Untersuchung, die nahelegt, dass die Interaktion der APP-CTFs mit diesen GSMs geringer Potenz unspezifisch ist [179]. Deshalb sollte im zellfreien System untersucht werden, ob die GxxxG-Mutanten auf GSM-Behandlung ansprechen. Zwar konnte die $A\beta$ -Produktion für die G29A- und die G33A-Mutante mit GSM-1 moduliert werden. Es war jedoch eine deutliche Abschwächung der Reaktion von der G29A- über die G33A- zur G33I-Mutante zu beobachten. Für die G33I-Mutante ließ sich mit GSM-1 überraschenderweise nur der $A\beta_{40}$ -Spiegel modulieren. GSM-1 inhibiert als acidischer GSM die $A\beta_{40}$ -Produktion für den WT nur sehr schwach und im Vergleich zur $A\beta_{42}$ -Produktion stark verzögert. Es ist interessant, dass für die G33I-Mutante nur die $A\beta$ -Spezies auf GSM-1-Behandlung anspricht, die beim WT am schwächsten reagiert. Auch bei Fenofibrat-Behandlung zeigte die G33I-Mutante eine unerwartete Antwort. Die $A\beta_{40}$ -Produktion konnte im zellfreien System ebenso wie in Zellkultur stark stimuliert werden, was bis dato noch für keinen inversen GSM beobachtet wurde [431]. GSM-1 und Fenofibrat zeigten somit für die G33I-Mutante auf $A\beta_{40}$ anstatt wie sonst üblich auf $A\beta_{42}$ modulatorische Aktivität.

Zusammengefasst legen die Ergebnisse zu den GxxxG-Mutanten den Schluss nahe, dass die Glycine im GxxxG-Motiv keine entscheidende mechanistische Rolle für eine mögliche Interaktion von NSAID-ähnlichen GSMs mit dem Substrat spielen. Dennoch lässt sich durch diese Daten eine solche Bindung nicht völlig ausschließen. Es ist jedoch schwer, mit der Analyse der GxxxG-Mutanten eine eindeutige Aussage über die Bedeu-

tung der Dimerisierung für die Wirksamkeit von GSMs zu treffen, weil diese Mutationen nicht nur selektiv die Dimerisierung verändern, sondern über Konformationsänderungen oder veränderte Positionierung am γ -Sekretasekomplex Auswirkungen auf die Spaltungsspezifität und Modulierbarkeit der γ -Sekretaseaktivität haben könnten. Aber unter der Annahme, dass die GxxxG-Mutanten unter anderem zu einer Abschwächung der Dimerisierung führen, zeigen die im zellfreien System erzielten Ergebnisse, dass der Wirkmechanismus von GSMs nicht streng abhängig von der Dimerisierung ist.

3.3 Die Wirksamkeit der NSAID-ähnlichen GSMs ist unabhängig von Lysin 28 der A β -Domäne

Lysin 28 liegt als AS mit polarem Rest genau an der für APP annotierten TMD-Grenze. Für diese AS wurden schon einige Mutagenesestudien veröffentlicht, um die Bedeutung des Lysin 28 für die Produktion und die Zusammensetzung der A β -Peptide zu verstehen [453, 454, 459, 460]. Allerdings wurde für die K28-Mutanten bisher nicht untersucht, wie sie auf GSM-Behandlung ansprechen. Dies ist deshalb interessant, da die positiv geladene ϵ -Aminogruppe der Lysinseitenkette als Interaktionspartner für die Carboxygruppe der acidischen NSAID-ähnlichen GSMs vorgeschlagen wurde [434, 445]. Dafür spricht auch, dass Lysin 28 innerhalb der Bindungsstelle von Flurbiprofen liegt [406]. Deshalb sollte durch Mutagenese von Lysin zu Glutamat untersucht werden, ob durch das Einführen einer AS mit negativ geladener Carboxygruppe in der Seitenkette, was eine Interaktion des APP- β CTF mit dem GSM unterbinden sollte, die A β ₄₂-senkende Wirkung auf das K28E-Substrat aufgehoben werden kann.

Die K28E-Mutante zeigte im zellfreien System eine ähnliche Zusammensetzung der A β -Peptide wie der WT, während in Zellkultur ähnlich wie bei den GxxxG-Mutanten ein stark erhöhtes A β ₃₈/Gesamt-A β sowie ein stark erniedrigtes A β ₄₂/Gesamt-A β zu beobachten war [431]. Dort waren für die K28E-Mutante stark erhöhte Peaks für A β ₃₃ und A β ₃₇ im Massenspektrum zu detektieren, was darauf hindeuten könnte, dass A β ₄₂-K28E in Zellkultur auf 33 bzw. 37 AS proteolytisch verkürzt wird. Dieser Befund ist im Einklang mit den Ergebnissen für die K28Q- und die K28A-Mutante aus Zellkultur, für die A β ₃₃ im Massenspektrum den höchsten Peak darstellt [460]. In früheren Studien wurden für K28-Mutanten (K28S, K28A, widersprüchliche Daten für K28C) im Immunoblot oft nur sehr geringe Mengen an Gesamt-A β detektiert [454, 459], und auch für die K28E-Mutante war A β mit dieser Methode kaum zu detektieren (Daten nicht gezeigt), während ECL-Immunoassay und Massenspektrometrie robuste Signale lieferten. Eine Ursache könnte eine möglicherweise veränderte Konformation der A β -K28E-Peptide sein, so dass der verwendete Antikörper das K28-mutierte A β im Immunoblot schlecht erkennt oder das Laufverhalten in der SDS-PAGE verändert ist.

Wäre eine ionische Wechselwirkung zwischen der positiv geladenen ϵ -Aminogruppe der Lysinseitenkette und der Carboxygruppe der acidischen GSMs entscheidend für deren $A\beta_{42}$ -senkende Wirkung, sollte der Austausch zu einer negativ geladenen Carboxygruppe der Glutamatseitenkette bewirken, dass $A\beta_{42}$ für diese Mutante nicht gesenkt werden kann. Dies war jedoch nicht der Fall. Die K28E-Mutante sprach sowohl mit $A\beta_{38}$ als auch mit $A\beta_{42}$ auf die Behandlung mit GSM-1 und auch Fenofibrat an. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass Lysin 28 keine bedeutende Rolle im Wirkmechanismus von acidischen GSMs spielt.

3.4 Vergleich der Reaktion von APP- und PS-FAD-Mutanten auf GSM-Behandlung

Fast alle PS-FAD-Mutanten reagieren auf Behandlung mit Sulindac Sulfid mit einer Zunahme von $A\beta_{38}$, jedoch nur sehr wenige mit einer Abnahme von $A\beta_{42}$ [165, 166]. Diese selektive Insensitivität für die $A\beta_{42}$ -absenkende Wirkung von GSMs der ersten Generation zeigt, dass $A\beta_{38}$ - und $A\beta_{42}$ -Produktion auch nach Modulatorbehandlung für diese Mutanten entkoppelt ist und somit die strikte Vorläufer-Produkt-Beziehung von $A\beta_{42}$ zu $A\beta_{38}$ gemäß des sequenziellen Spaltungsmodells für PS-FAD-Mutanten nicht zutreffen kann [165, 167]. Bisher war noch nicht untersucht, ob APP-FAD-Mutanten, die außerhalb der freigesetzten $A\beta$ -Sequenz liegen und ein erhöhtes $A\beta_{42}$ /Gesamt- $A\beta$ aufweisen, bei GSM-Behandlung die gleiche Reaktion wie PS-FAD-Mutanten zeigen. Um diese Frage zu klären, wurde wiederum GSM-1 eingesetzt, da dieser etablierte acidische GSM der zweiten Generation etwa 400-fach potenter als Sulindac Sulfid ist. Alle im zellfreien System untersuchten APP-FAD-Mutanten sprachen in ähnlichem Maß wie das WT-Substrat auf die Behandlung mit GSM-1 an. Aber auch für Sulindac Sulfid konnte gezeigt werden, dass dieser GSM für APP-FAD-Mutanten die Entstehung von $A\beta_{38}$ aber auch von $A\beta_{42}$ in Zellkultur modulieren kann [431].

Vor kurzem wurde entdeckt, dass überraschenderweise fast alle untersuchten PS1- und PS2-FAD-Mutanten auf Behandlung mit GSMs der zweiten Generation auch mit einer Absenkung von $A\beta_{42}$ reagieren [395]. Dennoch gibt es Ausnahmen: Für einige starke FAD-Mutanten wie PS1-L166P oder PS2-N141I lässt sich $A\beta_{42}$ auch nicht mit diesen potenten GSMs senken [395]. Außerdem sprechen die meisten PS-FAD-Mutanten im Vergleich zum WT-Enzym verzögert auf die GSM-Behandlung an [414]. Im Gegensatz dazu wurde bis jetzt noch keine APP-FAD-Mutante gefunden, die unempfindlich für die $A\beta_{42}$ -senkende Wirkung von GSMs ist, die meisten sprechen ebenso gut wie der WT auf die GSM-Behandlung an [414, 431]. Diese Befunde sind starke Indizien dafür, dass acidische GSMs der ersten und zweiten Generation mit der γ -Sekretase interagieren, da die Konformation des Enzymkomplexes (WT bzw. FAD) einen Einfluss auf das Reak-

tionsvermögen auf die GSM-Behandlung hat. Dennoch schließen diese Ergebnisse eine zusätzliche Interaktion mit dem Substrat nicht aus, sei es vor oder während der Bindung an die γ -Sekretase. Diese Frage kann nur mit Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten sicher beantwortet werden.

3.5 Charakterisierung der neuen GSM-Klasse der Aminopyrimidine

Als Basis für weitergehende Untersuchungen sollte die neue GSM-Klasse der Aminopyrimidine in verschiedenen *in vitro*-Systemen auf ihre Aktivität hin untersucht werden. Dabei wurde RO-02 als Modells substanz ausgewählt, da dieser GSM die beste Aktivität auf HEK293/sw-Zellen zeigte. Als Besonderheit der Aminopyrimidin-GSMs ist hervorzuheben, dass diese auch $A\beta_{40}$ erniedrigen, ähnlich wie andere verbrückte Aromaten von Eisai und TorreyPines Therapeutics [395]. Da diese Absenkung jedoch bei höheren GSM-Konzentrationen als die von $A\beta_{42}$ eintritt und $A\beta_{37}$ gleichzeitig erhöht wird, nimmt Gesamt- $A\beta$ nicht signifikant ab. Es ist nicht klar, warum sich das Modulationsprofil der verbrückten Aromaten von dem der acidischen GSMs unterscheidet, die $A\beta_{40}$ nicht absenken.

Ein wichtiger Vorteil von GSMs ist, dass sie im Gegensatz zu GSIs die Produktion von ICDs nicht unterbinden. So inhibierte auch RO-02 bis zu einer getesteten Konzentration von 10 μ M, was 500-fachem IC_{50} entspricht, die Produktion von AICD und NICD nicht. Im zellfreien System konnte für die AICD zusätzlich gezeigt werden, dass die relative Zusammensetzung der AICD-Peptide bei RO-02-Behandlung unverändert ist.

Bisher wurde noch für keinen GSM untersucht, ob einer der sechs vorkommenden γ -Sekretasekomplexe unempfindlich für eine Behandlung mit der Substanz ist. Für die Aminopyrimidin-GSMs konnte gezeigt werden, dass alle Komplexe auf RO-02-Behandlung ansprechen. Die unterschiedliche Aktivität auf PS1- und PS2-enthaltende Komplexe weist auf einen Einfluss der PS-Untereinheit auf die Wirksamkeit von RO-02 hin. Für APH-1 hingegen, die einzige weitere Untereinheit, die in mehreren Varianten auftritt, konnte keine Abhängigkeit der Aktivität von RO-02 beobachtet werden.

3.6 Das PS-NTF ist das Zielprotein der Aminopyrimidin-GSMs

Zu Beginn dieser Arbeit waren für GSMs der zweiten Generation noch keine Daten zu deren molekularen Angriffspunkten publiziert. Kounnas *et al.* untersuchten als erste die Zielproteine von nicht-acidischen verbrückten Aromaten aus der Serie von TorreyPines Therapeutics. Dazu wurde jedoch kein Photoaffinitätsmarkierungsassay verwendet, sondern ein GSM an ein Säulenmaterial immobilisiert und die aus dem Zellysat gebundenen Proteine analysiert [407]. Mit dieser Methode konnte PEN-2, aber auch das PS1-NTF

und PS1-CTF aus dem Zellysat zurückgehalten werden [407]. Der Versuchsaufbau zeigte aber mehrere Schwachpunkte: i) Die Spezifität der Interaktion konnte nicht durch Konkurrenz mit freiem GSM kontrolliert werden, da die Substanz zu hydrophob und in der benötigten Konkurrenzkonzentration nicht mehr löslich war. ii) APH-1 wurde nicht untersucht, deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch diese Komponente des γ -Sekretasekomplexes aus dem Zellysat gebunden wurde. iii) Das Experiment wurde unter Detergenzbedingungen (1% Triton-X-100/0.2% Tween20) durchgeführt, bei denen die γ -Sekretase dissoziiert ist. Mit CHAPSO, bei dessen Verwendung die γ -Sekretasekomponenten nicht getrennt werden, wurde zudem keine Retention von PEN-2, PS1-NTF und PS1-CTF gefunden. Diese experimentellen Mängel stellen die Aussagekraft des Ergebnisses insgesamt in Frage.

Da also noch keine zuverlässigen Ergebnisse zu den Zielproteinen der GSMs der zweiten Generation vorlagen, sollte als zentrale Fragestellung dieser Arbeit die molekularen Angriffspunkte der Aminopyrimidin-GSMs aufgeklärt werden. Der Photoaffinitätsmarkierungsassay stellt dabei das Mittel der Wahl dar, da die Substanz dabei unter authentischen Bedingungen, d.h. in der natürlichen Membranumgebung, kovalent an das Zielprotein gebunden werden kann. Außerdem kann die Isolation der querverknüpften Proteine mit Hilfe der Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung unter sehr harschen Bedingungen (1% SDS) erfolgen. Die Spezifität der Photoaffinitätsmarkierung lässt sich zudem durch Konkurrenz mit einem Überschuss der Ausgangssubstanz überprüfen.

Der Photoaffinitätsmarkierungsassay sollte dabei unter Bedingungen durchgeführt werden, in denen sowohl die γ -Sekretase als auch der modifizierte GSM aktiv ist. Obwohl RO-02 im zellfreien System mit aufgereinigter und rekonstituierter γ -Sekretase noch einen akzeptablen IC_{50} für $A\beta_{42}$ von 0.5 μ M zeigte, was etwa eine 30-fache Verschlechterung zu HEK293/sw-Zellen bedeutet, konnte für RO-57-BpB kaum Aktivität in diesem System beobachtet werden. Für mehrere GSMs verschlechterte sich der IC_{50} für $A\beta_{42}$ im zellfreien System unterschiedlich stark (Daten nicht gezeigt), und bei RO-57-BpB war die Differenz besonders ausgeprägt. Auch bei Solubilisierung von Membranfraktionen mit einer CHAPSO-Konzentration unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration und Verwendung von rekombinant hergestelltem Substrat konnte keine Verbesserung der Aktivität von RO-57-BpB erzielt werden. Somit scheint es für die Aminopyrimidin-GSMs je nach Derivat mehr oder weniger von Bedeutung zu sein, dass sich die γ -Sekretase in ihrer authentischen Lipidumgebung befindet. Dabei könnte ein spezifisches Lipid die Bindung des GSMs an das Enzym vermitteln oder erleichtern, oder die korrekte Lipidumgebung wichtig für die Positionierung des GSMs an der γ -Sekretase sein.

Im Photoaffinitätsmarkierungsassay konnte eindeutig das PS-NTF als Zielprotein von RO-57-BpB identifiziert werden. Für keine andere Untereinheit des γ -Sekretase-

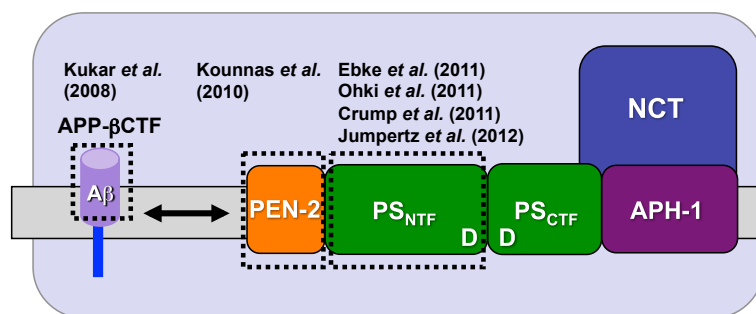


Abbildung 59: **Zusammenfassung von vorgeschlagenen Bindungsstellen für GSMs.** Der NSAID-ähnliche GSM Flurbiprofen und der inverse GSM Fenofibrat wurden an das APP-CTF querverknüpft [406]. Eine Studie mit nicht-acidischen GSMs von TorreyPines bestimmte PEN-2 als Hauptbindungspartner [407], während für verschiedene GSMs der zweiten Generation, den nicht-acidischen Aminopyrimidin-GSM RO-57 (diese Arbeit) bzw. den acidischen GSM-1 [461–463] das PS-NTF als Zielprotein gefunden wurde.

komplexes wurde eine Bindung detektiert. Interessanterweise war die Photoaffinitätsmarkierungseffizienz dabei für das PS2-NTF etwa 20-fach höher als für das PS1-NTF, was zu dem Befund passt, dass RO-02 aktiver auf PS2- als auf PS1-enthaltenden γ -Sekretasekomplexen ist. Allerdings kann aus der Aktivität eines GSMs nicht direkt auf die Photoaffinitätsmarkierungseffizienz geschlossen werden. Zum einen kann die höhere Photoaffinitätsmarkierungseffizienz in einer höheren Affinität oder längeren Verweildauer von RO-57-BpB am PS2- im Vergleich zum PS1-NTF begründet sein. Zum anderen kann auch die spezifische räumliche Anordnung des Proteinerückgrats oder der Seitenketten im PS2-NTF bewirken, dass RO-57-BpB mit höherer Effizienz an das PS2-NTF querverknüpft.

Interessanterweise wurden kurz nach der Publikation der Photoaffinitätsmarkierungsexperimente aus dieser Arbeit drei weitere Studien veröffentlicht, die die Querverknüpfung von GSM-1-BpB bzw. eines Azido-GSM-1 an das PS1-NTF berichten [461–463]. Des weiteren scheint das PS1-NTF auch für ein querverknüpfbares Derivat aus der Serie von nicht-acidischen GSMs von Eisai das molekulare Zielprotein zu sein [464]. Somit wurde für acidische und nicht-acidische GSMs der zweiten Generation das PS-NTF als molekularer Angriffspunkt beschrieben.

Mit der Identifizierung des APP-CTF als Zielprotein von Flurbiprofen und Fenofibrat wurde ein völlig neues Konzept der Substrat-bindenden, niedermolekularen Enzyminhibitoren vorgestellt [406]. Bis dahin war noch kein Fall bekannt, in dem kleine organische, nicht-peptidische Moleküle durch Bindung an das Substrat eine Enzymaktivität inhibieren oder modulieren konnten. GSMs könnten demnach zusammen mit dem Substrat an die γ -Sekretase binden und dort die Positionierung des Substrats oder die Enzymkon-

formation selbst verändern, was zur Modulation des Spaltungsmusters führen könnte. Zusätzlich könnten Substrat-bindende GSMs die Aggregation von A β ₄₂ verhindern, da die vorgeschlagene Bindungsstelle in der A β -Domäne liegt. Aufgrund der neuartigen und möglicherweise dualen Wirkungsweise dieser GSMs erfuhr die Studie von Kukar *et al.* viel Aufmerksamkeit. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass die beiden Ausgangs-GSMs nur eine geringe Potenz (IC₅₀ für A β ₄₂ im mittleren bis hohen mikromolaren Bereich) und die modifizierten GSMs nur ein sehr kleines Fenster zwischen Modulationsaktivität und Toxizität besitzen ([406], ergänzende Informationen). Unterstützende Daten für die Substratbindung kam durch die Gruppe um Gerd Multhaup, die durch SPR-Spektroskopie die Bindung an A β ₄₂ [416] und an rekombinant hergestelltes APP- β CTF [417] zeigten. Jedoch wurde für die SPR-Analyse lipid- und detergenzfreier Puffer verwendet, was bei hydrophoben Membranproteinen problematisch sein kann. Gemäß einer weiteren Studie scheint Sulindac Sulfid unter den von Richter *et al.* verwendeten Bedingungen anfällig für Aggregatbildung zu sein [465]. Diese Aggregate binden wahrscheinlich unspezifisch an A β ₄₂ und fördern wiederum dessen Aggregation [465]. Zuvor wurde von der gleichen Gruppe berichtet, dass rekombinantes APP- β CTF unter den von Kukar *et al.* verwendeten Bedingungen aggregiert und die Bindung der GSMs womöglich unspezifisch ist [466]. Vor dem Hintergrund dieser Debatte, ob GSMs das Substrat als Zielprotein haben, sollte für die weit potentere GSM-Klasse der Aminopyrimidine untersucht werden, ob diese an die APP-CTFs binden. Bemerkenswerterweise wurde keine Querverknüpfung an die APP-CTFs beobachtet. Auch konnte kein Einfluss von erhöhten Substratkonzentrationen auf die Querverknüpfungseffizienz von RO-57-BpB an PS-NTF in Membranfraktionen von HEK293/sw- im Vergleich zu HEK293-Zellen festgestellt werden. Dies ist wiederum im Einklang mit den oben genannten Studien für GSM-1-BpB bzw. -Azid, die ebenfalls keine Bindung an APP-CTFs fanden [461, 463]. Zusammenfassend spricht die Datenlage also gegen das Konzept von Substrat-bindenden GSMs.

Da mit dem PS-NTF ein Teil der katalytischen Untereinheit der γ -Sekretase das Zielprotein von RO-57-BpB ist, sollten auch die zu PS homologen SPP und SPPL-Proteasen auf Bindung von RO-57-BpB hin untersucht werden. Ein Hinweis darauf, dass NSAID-ähnliche GSMs SPP binden könnten, ist die Modulierbarkeit dieser Protease durch Sulindac Sulfid [418]. GSM-1 konnte auch spezifisch an SPP querverknüpft werden [461, 462]. Im Gegensatz dazu wurde jedoch für RO-57-BpB keine spezifische Bindung an SPP, SPPL2a und SPPL3 beobachtet. Interessanterweise war die Querverknüpfungseffizienz an diese Proteasen nicht wesentlich geringer als die an das PS1-NTF. Das Signal konnte jedoch durch Konkurrenz mit 100-fachem Überschuss an RO-57 nicht gesenkt werden. Dieser Befund spricht stark dafür, dass die beobachtete Querverknüpfung unspezifisch ist, auch wenn der Grund für die hohe unspezifische Querverknüpfungseffizienz unklar

ist. Das Ergebnis lässt aber Rückschlüsse auf die Bindungsstelle von RO-57-BpB im PS-NTF zu. Diese liegt höchstwahrscheinlich in einem Bereich, der zwischen den SPP(L)-Proteasen und PS nicht identisch oder zumindest nicht ähnlich ist, und damit außerhalb der unmittelbaren Umgebung des GxGD- sowie des PAL-Motivs, da diese Regionen für diese Proteasen hoch konserviert sind [419–421].

3.7 Kompetitionsstudien geben Hinweise auf die Bindungsstelle von RO-57-BpB

Kompetitionsstudien können gute Hinweise darauf geben, wie die Bindungsstellen von Kompetitor- und Photoaffinitätsmarkierungssubstanzen zueinander stehen, d.h. ob sie übereinstimmen, überlappen oder klar zu unterscheiden sind. Der Kompetitionsassay ist besonders aufschlussreich, wenn die Bindungsstellen der Kompetitorsubstanzen schon beschrieben sind. Wenn ein Kompetitor das Photoaffinitätsmarkierungssignal erniedrigt, deutet dies darauf hin, dass sich die Bindungsstellen überlappen oder sogar identisch sind. Allerdings kann eine Schwächung des Signals auch andere Ursachen haben. So würde eine von der Kompetitorsubstanz induzierte, allosterische Konformationsänderung, die die Bindungsstelle der Photoaffinitätsmarkierungssubstanz verändert, unter Umständen zum gleichen Ergebnis führen. Auch eine Störung der Membranarchitektur durch hohe Kompetitorkonzentrationen sowie dessen potentielle Radikalfängereigenschaften könnten das Photoaffinitätsmarkierungssignal unspezifisch schwächen. Andererseits muss ein unverändert starkes Signal für die Querverknüpfung nicht heißen, dass die Bindungsstellen von Kompetitor- und Photoaffinitätsmarkierungssubstanz nicht in Wechselwirkung stehen. Viele weitere Faktoren können einen Einfluss auf das Wettbewerbsergebnis haben. So können sich physikochemische Eigenschaften der Kompetitorsubstanz wie Hydrophobizität bzw. Lipophilie, Löslichkeit in wässrigen Medium und unspezifische Proteinbindung neben der Potenz im Kompetitionsassay auswirken. Dennoch können Wettbewerbsexperimente mit jeweils mehreren Vertretern einer Substanzgruppe gute Hinweise auf die Bindungsstelle der Photoaffinitätsmarkierungssubstanz liefern. Ein *vice-versa*-Experiment mit der Kompetitorsubstanz als Photoaffinitätsmarkierungssubstanz kann zudem als Bestätigung der Lage der Bindungsstellen zueinander dienen.

Als erstes wurden nicht-acidische GSMs von Eisai und TorreyPines Therapeutics auf deren Verhalten im Kompetitionsassay gegen RO-57-BpB getestet. Dabei waren die Ergebnisse die für zwei untersuchten Piperidon-Derivate von Eisai eindeutig: Beide konnten das Querverknüpfungssignal von RO-57-BpB am PS1- und PS2-NTF stark reduzieren. Dies ist ein sehr deutlicher Hinweis darauf, dass die Bindungsstellen von Aminopyrimidin- und Piperidon-GSMs von Eisai identisch sind. Für das PS1-NTF schwächten die beiden getesteten Derivate das Photoaffinitätsmarkierungssignal sogar stärker als

RO-57. Ein Vergleich der IC_{50} -Werte für $A\beta_{42}$ in HEK293/sw-Zellen zeigt, dass die Potenz nicht als einziges Maß für die Kompetitionsstärke einer Substanz herangezogen werden kann, da diese im Fall von RO-57 und den beiden Eisai-Derivaten sehr ähnlich sind. Wahrscheinlich begünstigen die physikochemischen Eigenschaften der Piperidone eine stärkere Verdrängung von RO-57-BpB. Überraschend war hingegen das Ergebnis für die Thiazol-GSMs von TorreyPines Therapeutics. Trotz der zu den Aminopyrimidin- und den Piperidon-GSMs großen Ähnlichkeit in der linken Hälfte der Molekülstruktur zeigte nur ein Derivat von TorreyPines eine deutliche Competition von RO-57-BpB, wengleich auch nicht so stark wie RO-57 oder die Eisai-Derivate. Dabei unterscheiden sich die beiden Thiazole nur um ein Stickstoffatom im Ringsystem B (siehe 1.6.2). Durch den Pyridin-Ring ist das Derivat, das die bessere Competition zeigt, wahrscheinlich besser in wässriger Umgebung löslich als das Benzol-Derivat. Insgesamt sind die verwendeten GSMs von TorreyPines deutlich lipophiler als die verwendeten Aminopyrimidin- und Piperidon-GSMs. Das Verhalten des Pyridin-Thiazols lässt eine zumindest überlappende Bindungsstelle vermuten. Für das Benzol-Thiazol sprechen die Daten zwar für eine im Vergleich zu RO-57-BpB distinkte Bindungsstelle, andererseits wäre es wirklich erstaunlich, wenn der Austausch eines Atoms die Bindungsstelle so stark ändern würde.

Für NSAID-ähnliche Substanzen wurde das Kompetitionsverhalten von $A\beta_{42}$ -senkenden und inversen GSMs untersucht. Die beiden getesteten inversen GSMs, Fenofibrat und TO-901317, zeigten eine vergleichsweise schwache Competition und haben höchstwahrscheinlich nicht das PS-NTF als Hauptbindungspartner. GSM-1 zeigte für PS1 und PS2 ein unterschiedliches Kompetitionsverhalten; für das PS2-NTF konnte GSM-1 das Photoaffinitätsmarkierungssignal um etwa 80% reduzieren, während die Competition für das PS1-NTF nur etwa halb so stark war. Dies deutet darauf hin, dass die Bindungsstellen von RO-57-BpB und GSM-1 im PS1- und PS2-NTF in unterschiedlicher Konformation sind und diese sich im PS2-NTF deutlich stärker überlappen oder stören als im PS1-NTF. Eine Studie zur Bindungsstelle des Azido-GSM-1 stellte mit der Untersuchung des Kompetitionsverhaltens von nicht-acidischen GSMs das *vice-versa*-Experiment vor [463]. Interessanterweise fanden Jumpertz *et al.*, dass verschiedene nicht-acidische GSMs die Querverknüpfung eines Azido-GSM-1 unterschiedlich stark beeinträchtigten [463]. Der sehr gut mit RO-57-BpB kompetierende GSM E2012 von Eisai (ES 1) zeigte dabei eine partielle Competition mit dem Azido-GSM-1 am PS1-NTF [463], was in Übereinstimmung mit den Daten aus der vorliegenden Untersuchung ist. In einer umfangreichen Studie konnten Ohki *et al.* die Querverknüpfungsstelle von GSM-1-BpB auf die C-terminale Hälfte in TMD 1 im PS1-NTF eingrenzen [461]. Doch das muss nicht bedeuten, dass RO-57-BpB die gleiche Querverknüpfungsstelle besitzt. Die beiden Substanzen könnten auch an der Stelle kompetieren, an der die jeweils aktiven Reste an das PS-NTF binden.

Die starke Konkurrenz von Sulindac war sehr unerwartet, auch angesichts der geringen Potenz der Substanz als GSM. Das inaktive Derivat Sulindac Sulfon zeigte diese Konkurrenz nicht, was darauf hindeutet, dass das Ergebnis für das Sulfid spezifisch ist. Jedoch zeigte ein weiterer NSAID-ähnlicher GSM, Indomethacin, keine Konkurrenz, was deutlich macht, dass sich das Verhalten von Sulindac Sulfid nicht für die Klasse der NSAID-ähnlichen GSMs verallgemeinern lässt. Überraschenderweise konnten die beiden getesteten inaktiven Indomethacinderivate das Querverknüpfungssignal deutlich schwächen, was insgesamt die Interpretation der Ergebnisse mit NSAID-ähnlichen Derivaten erschwert. Für Sulindac Sulfid konnte zudem gezeigt werden, dass es sich leicht in Membranen einlagert, und zwar stärker als Sulindac Sulfon [467]. Dabei kann es vielleicht bei hohen Konzentrationen zur Störung der Membranarchitektur kommen. Außerdem besitzt Sulindac Sulfid deutlich stärkere Radikalfängereigenschaften in der Membran als das Sulfon [468]. Damit könnte Sulindac Sulfid durch das Abfangen von Radikalen die kovalente Verknüpfung von RO-57-BpB an das Protein unterbinden.

Für GSIs war das Bild klarer: Hier kompetierte L-685,458 als einziger GSI deutlich mit RO-57-BpB um die Bindung an das PS2-NTF. Dies deutet darauf hin, dass die RO-57-BpB-Bindungsstelle, besonders im Fall von PS2, in die Bindungsstelle des Übergangszustandsanalog hineintragt. Allerdings konnte für die meisten Substanzen am PS2-NTF eine stärkere Konkurrenz beobachtet werden als am PS1-NTF. Dies könnte auch daran liegen, dass das spezifische Photoaffinitätsmarkierungssignal von RO-57-BpB am PS2-NTF stärker ist und damit mehr Spielraum zum unspezifischen Hintergrund besteht. Weiterhin war das Konkurrenzverhalten von LY-411,575 auffällig, der am PS1-NTF zu vermehrter Querverknüpfung von RO-57-BpB führte, wenngleich die Zunahme eine große Schwankung zeigte. Interessanterweise wurde für ein LY-411,575-Derivat ebenfalls das PS-NTF als Bindungsstelle bestimmt [370]. Die Bindungsstellen von RO-57-BpB und LY-411,575 scheinen sich aber nicht zu überlappen. Die Konkurrenz mit DAPT und Begacestat hatte kaum Einfluss auf die RO-57-BpB-Bindung.

Ein einzigartiges Verhalten zeigte RO-53, ein weiterer nicht-acidischer GSM der zweiten Generation, der nicht zu der Gruppe der Aminopyrimidin-GSMs gehört. Die drastische Verstärkung des Konkurrenzsignal schließt eine identische oder überlappende Bindungsstelle mit RO-57-BpB aus. Die Bindung von RO-53 bewirkt höchstwahrscheinlich eine Konformationsänderung, die zu diesem unerwarteten Konkurrenzergebnis führt. Dabei könnten zwei Mechanismen zur erhöhten RO-57-BpB-Querverknüpfung führen. Zum einen könnte die Konformationsänderung die Querverknüpfungsumgebung so verändern, dass RO-57-BpB effizienter quervernetzen kann. Zum anderen könnte die Konformationsänderung die Bindungsstelle von RO-57-BpB öffnen. Zwar spricht dagegen, dass eine IC_{50} ($A\beta_{42}$)-Konzentration an RO-53 den IC_{50} ($A\beta_{42}$) von RO-02 nicht

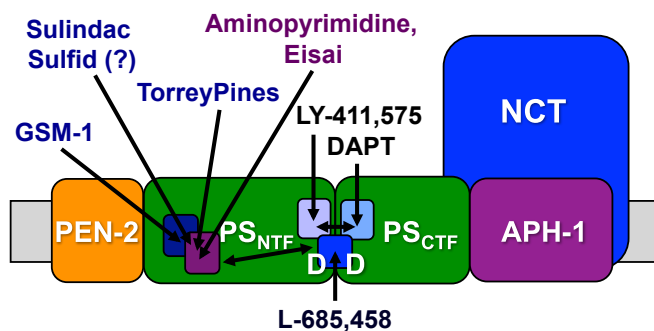


Abbildung 60: Mögliche Lage der Bindungsstelle von RO-57-BpB, abgeleitet aus **Kompetitionsstudien mit GSIs und GSMs**. Kleine Kästchen im PS-NTF und -CTF deuten die Bindungsstellen der Substanzen an, für die das Zielprotein schon bestimmt wurde. Aminopyrimidin-GSMs und die getesteten GSMs von Eisai besitzen vermutlich die gleiche Bindungsstelle. Die getesteten GSMs von TorreyPines, GSM-1 und vielleicht auch Sulindac Sulfid zeigen wahrscheinlich (mindestens) eine überlappende Bindungsstelle mit RO-57-BpB. Die Bindungsstelle von L-685,458 interferiert leicht mit der von RO-57-BpB, während die Bindungsstelle von LY-411,575 und DAPT nicht mit ihr in Wechselwirkung steht. Sowohl für ein LY-411,575-Derivat [370] als auch für DAPT [369] wurde eine (partielle) Konkurrenz mit L-685,458 sowie gegeneinander gezeigt, was aber auch durch eine ähnliche Lage der Bindungsstellen an der Grenzfläche zwischen PS-NTF und PS-CTF zu erklären wäre.

verringert. Wenn jedoch GSMs nur transient an den γ -Sekretasekomplex binden, ist es unwahrscheinlich, dass sich beide GSMs in geringen Konzentrationen oft genug am gleichen Enzymkomplex treffen, um einen signifikanten Effekt zu verursachen. Deshalb kann dieser Mechanismus nicht ausgeschlossen werden. Erste Experimente mit BpB-modifizierten GSMs der Strukturklasse von RO-53 deuten allerdings auf eine andere Untereinheit des γ -Sekretasekomplexes als molekulares Angriffsziel hin. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Bindung an eine andere Untereinheit eine Konformationsänderung im gesamten γ -Sekretasekomplex verursachen könnte, die sich auch auf die Konformation des PS-NTF auswirkt.

Zusammenfassend lässt sich aus den Konkurrenzexperimenten die Bindungsstelle von RO-57-BpB folgendermaßen näher eingrenzen (Abb. 60): Die Bindungsstelle von RO-57-BpB liegt im PS-NTF, und wahrscheinlich ist diese Bindungsstelle überlappend bis identisch mit der der getesteten verbrückten aromatischen GSMs von Eisai und TorreyPines. Dies lässt vermuten, dass der linke Teil der Molekülstruktur, den viele verbrückten aromatischen GSMs besitzen [391], wichtig für die Wirkung dieser GSM-Gruppe sein könnte. Im Gegensatz dazu scheint die Bindungsstelle von GSM-1, der an die TMD 1 im PS1-NTF querverknüpft [461], mit der Bindungsstelle von RO-57-BpB nur leicht zu überlappen. Das Konkurrenzverhalten von Sulindac Sulfid ist nicht für $A\beta_{42}$ -senkende NSAID-ähnliche GSMs repräsentativ, wie das Ergebnis von Indomethacin zeigt. Deshalb

ist mit dieser Methode nicht abschließend zu beurteilen, ob das wenig potente und als Substrat-bindend beschriebene Sulindac Sulfid wirklich an das PS-NTF bindet. Des weiteren könnte die Bindungsstelle von RO-57-BpB teilweise in die Umgebung oder Nähe des aktiven Zentrums hineinragen. Mit dem PS1-CTF bindenden DAPT [369] sowie dem PS1-NTF bindenden L-411,575 [370], Begacestat, RO-53 sowie inversen GSMs wie Fenofibrat und TO-901317 scheint es keine Überlappung der Bindungsstellen zu geben.

3.8 Mögliche Mechanismen der γ -Sekretasemodulation

Bis heute ist wenig über den genauen Mechanismus der γ -Sekretasemodulation bekannt. Für Fenofibrat, Ibuprofen, Flurbiprofen und GSM-1 konnte mittels FRET gezeigt werden, dass sich in deren Anwesenheit der mittlere Abstand von PS1-NTF und PS1-CTF verändert [411, 412, 461]. Dieser Assay wird häufig als Indikator für eine Konformationsänderung im PS verwendet. Für GSM-1 konnte außerdem nachgewiesen werden, dass er die Querverknüpfung eines Übergangszustandsanalog-Inhibitors an eine *Subsite* des aktiven Zentrums verstärkt [462]. Dies deutet darauf hin, dass GSM-1 die Architektur des aktiven Zentrums allosterisch verändert. Anbetracht der Ergebnisse für die eben genannten GSMs ist es sehr wahrscheinlich, dass auch andere Klassen von GSMs wie die Aminopyrimidine bei der Bindung an die γ -Sekretase eine Konformationsänderung bewirken und somit als allosterische Modulatoren der Enzymaktivität fungieren. Nach dieser Konformationsänderung sind mehrere Szenarien denkbar, die bei aktuellem Forschungsstand aber rein hypothetisch sind.

Die eine Gruppe an Hypothesen betrifft die Substratbindung durch die γ -Sekretase. Dabei könnte sich mit einer Konformationsänderung die Positionierung des Substrats an der γ -Sekretase verändern, was direkt ein verändertes Schnittmuster zur Folge haben könnte. Allerdings ist dieser Mechanismus eher unwahrscheinlich, da die ϵ -Spaltung des APP- β CTF von der γ -Sekretasemodulation nicht bis nur schwach beeinflusst wird. Für RO-02 konnte keine qualitative Änderung der Zusammensetzung der AICD-Peptide beobachtet werden. Im Gegensatz dazu verschieben NSAID-ähnliche GSMs der ersten und zweiten Generation das Verhältnis von AICD ϵ_{49} und AICD ϵ_{48} leicht (unpublizierte Daten, K. Mori). Im Vergleich zum Effekt auf die γ -Spaltung ist die Auswirkung auf die ϵ -Spaltung aber als gering einzuschätzen. Des weiteren könnte eine Konformationsänderung zu einer Erhöhung der Assoziationskonstante K_a bzw. zu einer Erniedrigung der Dissoziationskonstante K_d des Substrats an der γ -Sekretase führen. Damit würde das Substrat im Mittel länger am Enzym verweilen, so dass die γ -Sekretase in beiden (hypothetischen) Produktlinien vermehrt bis zu den kurzen A β_{37} - und A β_{38} -Peptiden “durchschneiden” könnte, bevor A β aus der Membran entlassen und schließlich sekretiert wird.

Ein weiterer denkbarer Mechanismus wäre eine durch die Konformation bedingte

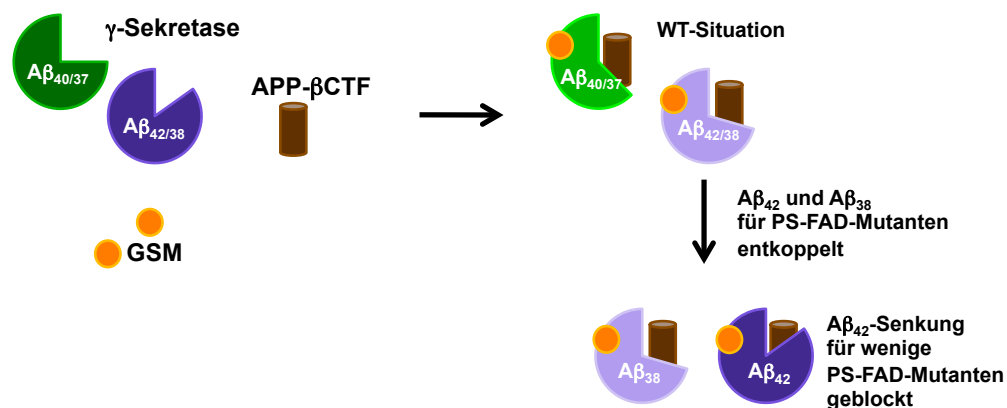


Abbildung 61: **Hypothetischer Mechanismus der γ -Sekretasemodulation.** Ausgangspunkt ist die Annahme, dass unterschiedliche Konformationen der γ -Sekretase für den ϵ -Schnitt bei AS 49 oder 48 verantwortlich sind. Im Schema sind diese Konformationen durch Kreise mit unterschiedlichem Öffnungswinkel dargestellt, auf denen die Endprodukte der γ -Sekretasespaltung vermerkt sind. Die Konformation des Enzyms könnte z.B. einen Einfluss darauf haben, wie das Substrat am aktiven Zentrum positioniert wird. Im Anschluss an den ϵ -Schnitt spaltet die γ -Sekretase das Substrat dann entlang der beiden Produktlinien ($A\beta_{49} - A\beta_{46} - A\beta_{43} - A\beta_{40} - A\beta_{37}$ bzw. $A\beta_{48} - A\beta_{45} - A\beta_{42} - A\beta_{38}$). Binden GSMs an die γ -Sekretase, könnten sie eine Konformationsänderung bewirken (angedeutet durch einen veränderten Öffnungswinkel der Kreise), die zur Folge hat, dass die γ -Sekretase entlang der Produktlinien vermehrt bis zu kürzeren $A\beta$ -Peptiden spaltet, also zu $A\beta_{37}$ anstatt $A\beta_{40}$ und zu $A\beta_{38}$ anstatt $A\beta_{42}$. Für viele PS-FAD-Mutanten ist die Produktion von $A\beta_{42}$ und $A\beta_{38}$ entkoppelt, da die Zunahme von $A\beta_{42}$ /Gesamt- $A\beta$ nicht mit einer Abnahme von $A\beta_{38}$ /Gesamt- $A\beta$ einhergeht. Außerdem sprechen einige wenige PS-Mutanten wie PS1 L166P oder PS2 N141I nicht auf den $A\beta_{42}$ -senkenden Effekt von potenten GSMs der zweiten Generation an, während die $A\beta_{38}$ -Produktion ähnlich wie beim WT-Enzym stimuliert werden kann, was eine weitere Entkopplung von $A\beta_{42}$ und $A\beta_{38}$ darstellt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass eine $A\beta_{42}$ -produzierende "FAD-Konformation" der γ -Sekretase nicht durch GSM-Behandlung beeinflusst werden kann, sei es, weil der GSM an sie nicht binden oder weil er die pathologische Konformation nicht ändern kann. Die $A\beta_{38}$ -produzierende Konformation bleibt jedoch für die Wirkung des GSMs empfänglich.

Steigerung der Prozessivität der γ -Sekretase selbst, so dass sie in einer bestimmten Zeitspanne mehr Proteolysen katalysieren könnte. Damit würden GSMs sozusagen als molekulare Aktivatoren wirken, die die γ -Sekretase in eine prozessivere Konformation bringen, so dass die Abfolge der Spaltungen schneller abläuft, wenn das Substrat erst einmal gebunden hat. Es ist anzunehmen, dass die Sekretion von $A\beta$ ein statistischer Prozess ist. Das bedeutet, dass $A\beta$ ab einer gewissen Kürze ($A\beta_{42}$ in Zellkultur, $A\beta_{43}$ wird meist nur schlecht sekretiert) mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit aus der Membran entweicht, und diese Wahrscheinlichkeit nimmt mit der Verkürzung des hydrophoben C-Terminus zu. In diesem Modell würde eine schnellere Abfolge der Katalyse bewirken, dass die Peptide im Mittel kürzer sind, wenn sie die Membran verlassen.

Schon Takami *et al.* beobachteten bei Sulindac Sulfid-Behandlung eine verstärkte Freisetzung des VVIA-Tetrapeptids, das der Verkürzung von $A\beta_{42}$ zu $A\beta_{38}$ entspricht [163]. Auch Chavez-Gutierrez *et al.* präsentierten vor kurzem deutliche Hinweise darauf, dass GSMs nach dem sequenziellen Spaltungsmodell vor allem über die vermehrte Katalyse des vierten γ -Sekretaseschnitts von $A\beta_{42}$ zu $A\beta_{38}$ bzw. $A\beta_{40}$ zu $A\beta_{37}$ wirken könnten [469]. Diese Betrachtungsweise ist in Übereinstimmung mit den letzten beiden vorgestellten Modellen, ist in der Form allerdings zu stark vereinfacht. Das sequenzielle Spaltungsmodell wurde streng genommen nur für WT- γ -Sekretase gezeigt [163]. Für PS-FAD-Mutanten, die für die $A\beta_{42}$ -senkende Wirkung von GSMs unempfindlich sind, bietet dieses Modell keine gute Erklärung, da dort $A\beta_{38}$ trotz gleichbleibendem $A\beta_{42}$ zunimmt [165, 166]. Für diese Mutanten muss angenommen werden, dass $A\beta_{38}$ nicht (ausschließlich) aus $A\beta_{42}$ entsteht. Eine alternative Erklärung wäre, dass es für PS1 L166P und PS2 N141I distinkte Konformationen der γ -Sekretase geben könnte, die letztendlich $A\beta_{38}$ und $A\beta_{42}$ generieren (siehe Abb. 61). Wenn ein GSM nun an die γ -Sekretase bindet, könnte er nur bei der $A\beta_{38}$ -produzierenden Konformation eine Konformationsänderung bewirken; die $A\beta_{42}$ -produzierende, "pathologische" Konformation könnte "eingefroren" und damit unempfindlich für GSM-Behandlung sein.

Weiterführende Studien sind nötig, um den Mechanismus der γ -Sekretase noch besser zu verstehen. Eine wichtige Frage ist, wie die Tri- und Tetrapeptidfreisetzung nach dem sequenziellen Spaltungsmodell für PS1 L166P und PS2 N141I ohne und mit GSM-Behandlung aussieht. Aus welchem Peptid entsteht $A\beta_{38}$ unter diesen Bedingungen hauptsächlich? Letztendlich können nur Kristallstrukturen von verschiedenen Konformationen der γ -Sekretase zusammen mit einem Substratanalogon in An- oder Abwesenheit von GSMs ein genaues Bild der Konformationsänderungen und deren Auswirkungen und somit des Mechanismus der γ -Sekretasemodulation liefern.

3.9 Ausblick

GSMs stellen einen sehr vielversprechenden Ansatz zur krankheitsmodulierenden oder sogar präventiven Therapie der Alzheimer Erkrankung dar, da sie höchstwahrscheinlich mit deutlich weniger Nebenwirkungen behaftet sind als GSIs. Mittlerweile befinden sich schon zwei GSMs der zweiten Generation in klinischen Studien, nämlich ein acidisches Derivat von EnVivo Pharmaceuticals sowie ein verbrückter Aromat von Eisai [378, 391]. Deshalb ist es von großer Bedeutung, die molekulare Angriffspunkte von GSMs zu kennen sowie den Mechanismus der γ -Sekretasemodulation genau zu verstehen. Für die Klasse der Aminopyrimidin-GSMs konnte in dieser Arbeit eindeutig das PS-NTF als Zielprotein identifiziert werden. Mit Hilfe der Kompetitionsstudien konnten Hinweise darauf gewonnen werden, wie die Bindungsstelle der Aminopyrimidin-GSMs im Verhältnis zu denen

von anderen GSMs und GSIs stehen. Wie bereits detailliert dargelegt wurde, sind diese Ergebnisse gute Anhaltspunkte, aber kein direkter Nachweis für eine Bindungsstelle eines Photoaffinitätsmarkierungs-GSMs.

Durch Integration einer Erkennungssequenz für eine spezifische Protease in die verschiedenen hydrophilen Schleifen des PS-NTF könnte die Querverknüpfungsregion näher eingegrenzt werden, indem nach Querverknüpfung und Behandlung mit der spezifischen Protease überprüft wird, welcher Teil des PS-NTF mit Streptavidin isoliert werden kann. Voraussetzung dafür ist aber, dass diese PS-Mutanten die Maturierung des γ -Sekretasekomplexes erlauben, im Idealfall physiologische Zusammensetzung der A β -Peptide zeigen sowie auf Behandlung mit RO-57-BpB ansprechen. Auch massenspektrometrische Untersuchungen nach Querverknüpfung und Verdau mit Trypsin oder Cyanobromid könnten, falls das isolierte PS-NTF-Fragment nicht zu hydrophob ist, zum Eingrenzen der Querverknüpfungsregion von RO-57-BpB beitragen. In diesem Experiment sollte aufgrund der deutlich höheren Querverknüpfungseffizienz mit einer PS2-überexprimierenden Zelllinie gearbeitet werden.

Die eben beschriebenen Versuche könnten zum Eingrenzen der genauen Querverknüpfungsstelle von RO-57-BpB im PS-NTF führen. Dennoch ist es sehr wichtig zu verstehen, dass die Querverknüpfungsstelle nicht zwangsläufig mit der Bindungsstelle des aktiven Teils von RO-57-BpB übereinstimmen muss. RO-57-BpB wurde nach Kenntnis der Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Aminopyrimidin-GSMs so konstruiert, dass die Modifikation die Aktivität der Substanz möglichst wenig beeinträchtigt. Des Weiteren zeigt ein Vergleich mit anderen verbrückten aromatischen GSMs, dass die linke Hälfte der Grundstruktur bei fast allen Substanzen sehr ähnlich ist [391]. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass dieser Teil der Struktur funktionell von großer Bedeutung ist und vielleicht sogar die Bindung an das Protein vermittelt. Die Bindungsstelle dieser Struktur könnte distinkt von der Querverknüpfungsstelle sein und bei ausreichender Nähe von TMDs sogar eine andere TMD betreffen. Ein sehr starker Hinweis auf die tatsächliche Bindungsstelle wäre eine Deletions- oder Punktmutante im PS-NTF, die sowohl in den γ -Sekretasekomplex integriert als auch physiologische A β -Produktion erlaubt, gleichzeitig aber überhaupt nicht mehr auf GSM-Behandlung anspricht. Bis dato wurde noch keine PS-Mutante gefunden, die nicht mit einer Erhöhung der A β ₃₈-Produktion auf GSM-Behandlung reagiert. Es ist aber möglich, dass solche eine Mutation nicht existiert, falls die Aminopyrimidin-GSMs ihre Wirkungsweise über die Bindung an eine stark konservierte Region im PS ausüben, deren Mutagenese zur Inaktivierung von PS führt.

Weiter wäre es lohnend zu untersuchen, inwieweit sich die durch das APP- β CTF gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des Mechanismus der Aminopyrimidin-GSMs auch auf weitere Substrate der γ -Sekretase übertragen lassen. Durch Massenspektrometrie

ließe sich klären, ob für andere Substrate der ϵ -Schnitt ebenfalls nicht betroffen ist. Dies wäre deshalb interessant, da höchstwahrscheinlich für die meisten Substrate die ICDs die funktionstragenden Spaltprodukte sind und nicht die sekretierten β -Peptide. Wäre der N-Terminus der ICDs durch die Modulation verändert, könnte dies einen veränderten Abbau dieser Fragmente bewirken. Gemäß der sog. "Regel des N-Terminus" ist die N-terminale AS eines Proteins maßgeblich für dessen Stabilität und beeinflusst, mit welcher Rate dieses Protein vom Proteasom abgebaut wird [470]. Eine veränderte Stabilität der ICDs könnte wiederum Auswirkungen auf physiologische Prozesse haben, in denen ICDs wichtige Funktionen übernehmen.

Zudem wäre es aufschlussreich, die Bindungsstellen von GSM-1-BpB und RO-57-BpB am PS-NTF zu vergleichen. Dazu sollte in einem *vice-versa*-Experiment die Konkurrenz von RO-57 gegen GSM-1-BpB untersucht werden. Warum ist bei den acidischen GSMs wie GSM-1 im Gegensatz zu verbrückten Aromaten $A\beta_{40}$ und $A\beta_{37}$ von der Modulation nicht betroffen? Lässt sich eine Verbindung herstellen zwischen unterschiedlichen Bindungsstellen und den unterschiedlichen Mechanismen der Modulation, die bei den beiden Substanzklassen zu beobachten sind?

Insgesamt ist ein besseres Verständnis des Mechanismus der γ -Sekretasemodulation von größtem Interesse. Mit einem Anhalten der Substratspaltung durch die γ -Sekretase vor dem γ -Schnitt könnte untersucht werden, ob auch der ζ -Schnitt, d.h. $A\beta_{45}$ und $A\beta_{46}$, von der Modulation betroffen sind. Damit könnte gezeigt werden, ob GSMs schon vor dem γ -Schnitt in die $A\beta$ -Produktlinien eingreifen. Dies würde für eine veränderte Substratpositionierung an der γ -Sekretase sprechen. Außerdem wäre es sehr spannend zu klären, warum einige PS-FAD-Mutanten wie PS1-L166P nur für die $A\beta_{42}$ -senkende Wirkung der bisher getesteten GSMs unempfindlich sind. Ist die Bindung der GSMs beeinträchtigt? Dies könnte mittels Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten getestet werden. Oder können die GSMs für diese PS-FAD-Mutanten keine Konformationsänderung bewirken, die zu der Inhibition der $A\beta_{42}$ -Produktion führen würde? Dazu könnten FRET-Werte der PS-Mutanten in Ab- und Anwesenheit von GSM oder selektiv die Wasserzugänglichkeit von ins PS eingeführten Cysteinen mittels SCAM verglichen werden, wobei eine Veränderung ein deutlicher Hinweis für eine Konformationsänderung von PS wäre. Außerdem könnte das sequenzielle Spaltungsmodell für PS-FAD-Mutanten überprüft und kinetische Studien in Ab- und Anwesenheit von GSM durchgeführt werden.

Die Beantwortung dieser offenen Fragestellungen wäre auch ein großer Gewinn für das Verständnis des Mechanismus der γ -Sekretase selbst, der auch nach über 15 Jahren intensiver Forschung in seinen Einzelheiten noch nicht verstanden und nach wie vor sehr faszinierend ist.

4 Material und Methoden

Vorbemerkung. Aus Gründen der Zweckmäßigkeit sind die in einer Methode verwendeten Puffer direkt vor der Methode aufgeführt, obwohl sie streng genommen zu den Materialien gehören.

4.1 Material

4.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Gerät bzw. Verbrauchsmaterial	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresekammer (Modelle B1A und B2)	Owl Separation Systems
Alu- und Frischhaltefolie	Drogeriemarkt
Autoklav (Tuttnauer 3850 EL)	Systec
CO ₂ -Inkubator (Hera cell)	Heraeus, Kendro
ECL-IA-Lesegerät (SECTOR Imager 2400)	Meso Scale Discovery
Eppendorff Reaktionsgefäße (0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)	Eppendorff
Eppendorff Reaktionsgefäße für Ultrazentrifuge (1.5 ml)	Beckman
Falcons (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Filmentwickler (Curix 60)	Agfa
Filme (Super RX)	Fuji
Gasbrenner (Gasprofi 2)	W _L D Tec
Gefrierschrank - 20 °C	Elektrolux, Liebherr
Gefrierschrank - 80 °C	Heraeus, Kendro
Gelelektrophoresekammer für Harnstoff-Tris-Bicin-Gele (Mighty small II Hoefer)	Hoefer
Gelelektrophoresekammer für Harnstoff-Tris-Glycin- und Tris-Tricin-Gele (Mini-PROTEAN 3)	Bio-Rad
Gelelektrophoresekammer für Tris-Tricin-Gele (X Cell Sure Lock Mini)	Invitrogen
Gelgießapparaturen	Hoefer, Bio-Rad
Geltrockner (Slab Gel Dryer 2000)	Savant
Glasflaschen, -kolben und -messzylinder	VWR International
Glaspipette zum Gelladen	Hamilton
Heizblöcke 37, 42, 65 und 95 °C	Liebisch
Inkubatoren 37 und 56 °C	Heraeus
Isopropanolboxen (Nalgene Mr. Frosty Cryo 1°C)	Thermo Scientific
Kamera (CCD Video Camera Module)	Raiser
Kühlschrank 4 °C	Elektrolux, Siemens
Küvetten (Einweg)	Sarstedt
Magnetrührer	IKA Labortechnik
Membranen:	
Nitrocellulosemembran (Protran)	GE Healthcare
PVDF-Membran (Immobilon-P)	Millipore

Mikrowelle	Bosch
Mikroskop (Wilovert S 10x 4/10/20)	Hund
Multikanalpipette	Eppendorff
N ₂ -Tank (Chronos)	Messer Griesheim
Nadeln (Sterican 21, 23 und 27 G)	B. Braun
Nanodrop (NanoPhotometer)	Implen
Netzgerät (Power Pac 300)	Bio-Rad
Netzgeräte (EPS 3501 XC, EPS 1001) für Hoefer Systeme	GE Healthcare
Pasteurpipetten	Sarstedt
Parafilm	Bemis Flexible Packaging
PCR-Maschine (Gene Amp PCR system 2400)	Perkin Elmer
pH-Elektrode (BlueLine 23 pH)	Schott
pH-Meter (Inolab pH Level 1)	WTW
Photometer:	
für Küvetten: SmartSpec™ 3000	Bio-Rad
für 96 Well-Platten: PowerWave XS	BioTek
Pipetten (P2, P20, P200, P1000)	Gilson
Pipetten mit Filter, steril und nicht-steril (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Pipettenspitzen (für P2, P20/P200, P1000)	Sarstedt
Pipettenspitzen fürs Gelladen (MultiFlex-Tips 0.5- 200 µl)	Roth
Pipettierhilfe (Accu-Jet)	Brand
Protein-Gelelektrophoresekammer (Mini-PROTEAN 3, für Schägger- und Tris-Glycin-Gele)	Bio-Rad
Protein-Gelelektrophoresekammer Xcell SureLock Mini-Cell (für Tris-Tricin-Gele)	Invitrogen
Quantifizierer (LAS-4000)	Fuji
Rotator (Rotoshake Genie)	Scientific Industries
Scanner Perfection 4870 Photo	Epson
Schüttler (KM2)	Edmund Bühler
Schüttler 37°C für Bakterienkulturen (Certomat BS-1)	B. Braun Biotech
SDS-PAGE-Kammer (für Tris-Tricin-Gele)	Invitrogen
Skalpell	B. Braun
Sonifizierer (W-250D) mit großer und kleiner Spitze	Branson
Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml)	Terumo
Sterilbank	Heraeus, Kendro
Streptavidinbeschichtete Analyseplatten für ECL-IA	Meso Scale Discovery
Thermoschüttler	Eppendorff
UV-Lampe (3UV, 8 W, 230 V, 50 Hz)	UVP
UV-Lampe (DNA Analytik, 302 nm)	UVP
UV-Lampe (DNA Präparation, 365 nm)	Vetter GmbH
Vortexer (Vortex Genie 2)	Scientific Industries
Waagen:	
analytisch (0.0001 - 200 g)	Ohaus
standard (0.001 - 2000 g)	Ohaus

Wasserbad	
Wasserentionisierer (Milli-Q)	Millipore
Whatman-Papier	GE Healthcare
Zentrifugen und Rotoren:	
Minizentrifuge (Galaxy MiniStar)	VWR International
Ultrazentrifuge (Optima), Rotoren TLA-55 und MLA-80	Beckman
Ultrazentrifuge (L7-55), Rotor Ti 70	Beckman
Tischzentrifuge für Eppendorff Reaktionsgefäße (5424)	Eppendorff
Kühltischzentrifuge (Fresco 17)	Heraeus, Kendro
große Kühltischzentrifuge (2-16 PK)	Sigma
Kühlzentrifuge (Megafuge 40R)	Thermo Scientific
große Kühlzentrifuge (Avanti J-20XP), Rotoren JA10 und JA25.50	Beckman
Zellkulturschalen (24, 12, 6 Wells; Einzelplatten mit 6 und 10 cm Durchmesser)	Nunc
Zellscraper	Costar

4.1.2 Reagenzien

Chemikalien waren i.d.R. vom Reinheitsgrad p.a. (*pro analysi*).

Reagenz	Hersteller
N-Acetylglucosamin	Sigma
Acrylamid	Applichem
Acryl-/Bisacrylamid 19:1 (40%)	Bio-Rad
Acryl-/Bisacrylamid 37.5:1 (40%)	Serva
Agarose	Invitrogen
6-Amino-n-Caprinsäure	Fluka
Ampicillin	Roth
APS, Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Bacto-Agar	BD
Bacto-Trypton	BD
Bacto-Hefeextrakt	BD
Begacestat	F. Hoffmann-La Roche Ltd.
Bicin, N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin	Sigma
Bisacrylamid, N,N'-Methylen-bisacrylamid	Serva
Bis-Tris, 2-bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-Propandiol	Sigma
Blasticidin	Invitrogen
Brij-35	Thermo Scientific
Bromphenolblau	Fluka
BSA, Bovines Serumalbumin	Sigma
CaCl ₂	Merck

CHAPSO, 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propansulfonat	Biomol
Chloramphenicol	Sigma
DAPT	Boehringer-Ingelheim
DDM, N-dodecyl- β -D-Maltosid	Calbiochem
Digitonin	Calbiochem
DMSO, Dimethylsulfoxid	Sigma
DNA-Marker, 1kB Plus	Invitrogen
DTT, Dithiothreitol	Biomol
ECL Immunoblotdetektionskit	GE Healthcare
ECL ⁺	GE Healthcare
EDTA, Ethylendiamintetraacetat	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Flag M2-Agarose	Sigma
G418, Geneticin	Invitrogen
Glycerin	Roth
Glycin	Appllichem
L-Glutamin	Invitrogen
Harnstoff	Serva
Hygromycin B	Invitrogen
I-Block	Tropix
Imidazol	Sigma
IPTG	Roth
Kanamycin	Roth
Kaliumacetat	Sigma
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
L-685,458	Calbiochem
Lipofectamin2000	Invitrogen
Lubrol WX	von 1969
LY-411,575	F. Hoffmann-La Roche Ltd.
β -Mercaptoethanol	Roth
Methylmannosepyranosid	Fluka
Natriumborat	Merck
Natriumcitrat	Merck
NaCl	Roth
Natriumdesoxycholat	Sigma
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	Merck
NaOH	Roth
(NH ₄) ₂ SO ₄	Fluka
NP-40	Sigma
octyl- β -D-Glucopyranosid	Sigma
Penicillin/Streptomycin	PAA

L- α -Phosphatidylcholin, Typ XVI-E	Sigma
PIPES	Sigma
poly-L-Lysin	Sigma
Ponceau S	Sigma
2-Propanol (Isopropanol)	Merck
Protein-A-Sepharose	Sigma
Protein-G-Sepharose	GE Healthcare
Puromycin	Invitrogen
Q-Sepharose	GE Healthcare
SDS, Natriumdodecylsulfat	Serva
SeeBlue Plus2 Proteinstandard	Invitrogen
Sulfopropyl (SP)-Sepharose	GE Healthcare
Streptavidin-Sepharose	GE Healthcare
TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Roth
Tricin, N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin	Biomol
Tris, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Applichem
10-20%ige Tris-Tricin-Gele	Invitrogen
Triton-X-100	Merck
Trypsin/EDTA	Invitrogen
Tween-20	Merck
Weizenkeimagglutinin-Agarose (WKA-Agarose)	Calbiochem
Zeocin	Invitrogen

4.1.3 GSIs und GSMs

Die in dieser Studie eingesetzten GSIs sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die IC_{50} -Werte für die Inhibition von $A\beta_{40}$ sind der angegebenen Literatur entnommen. Strukturformeln finden sich in Abb. 15 und 16, die IUPAC-Namen im Anhang.

Substanz	$IC_{50} \pm$ Standardfehler für $A\beta_{40}$ in CHO/sw-Zellen [386]	IC_{50} für $A\beta_{40}$ aus Originalstudien [Referenz]
L-685,458	281.2 ± 34.2 nM	113 nM (CHO/APP- β CTF-Zellen) [218]
DAPT	41.7 ± 9.5 nM	20 nM (HEK293/APP-Zellen) [364]
LY-411,575	0.32 ± 0.0 nM	0.085 nM (HEK293/sw-Zellen) [368]
Begacestat	14.8 ± 1.2 nM	-

Die in dieser Studie verwendeten GSMs sind in der folgenden Tabelle gelistet. Die IC_{50} -Werte für die Inhibition von $A\beta_{42}$ in HEK/sw-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit bzw. in [395] bestimmt oder der Literatur entnommen. Für die beiden inversen GSMs

Fenofibrat und TO-901317 sind die EC_{50} -Werte für die Stimulation der $A\beta_{42}$ -Produktion angegeben. Strukturformeln finden sich in den Abb. 17, 18, 20 und 32, die IUPAC-Namen im Anhang.

Substanz	IC_{50} für $A\beta_{42}$ in HEK293/sw-Zellen, ggf. \pm Standardfehler
RO-02	15 nM ($\log IC_{50} = - 7.82 \pm 0.05$)
RO-03	26 nM ($\log IC_{50} = - 7.59 \pm 0.05$)
RO-53	100 nM ($\log IC_{50} = - 7.01 \pm 0.18$)
RO-57	47 nM ($\log IC_{50} = - 7.33 \pm 0.07$)
RO-57-BpB	185 nM ($\log IC_{50} = - 6.73 \pm 0.07$)
ES 1 (E2012)	75 nM ($\log IC_{50} = - 7.12 \pm 0.04$)
ES 2	40 nM ($\log IC_{50} = - 7.39 \pm 0.12$) [395]
TP 1	43 nM ($\log IC_{50} = - 7.36 \pm 0.05$)
TP 2	45 nM ($\log IC_{50} = - 7.34 \pm 0.10$) [395]
GSM-1	180 nM ($\log IC_{50} = - 6.75 \pm 0.16$) [395]
Sulindac Sulfid	ca. 70 μ M [395]
Indomethacin	ca. 25 μ M (CHO/APP-Zellen) [396]
Fenofibrat	ca. 100 μ M (EC_{50}) (H4/sw-Zellen) [404]
TO-901317	ca. 3.6 μ M (EC_{50}) (H4/sw-Zellen) [405]

4.1.4 Primer und Plasmide

Für die Aufreinigung von C100-His₆-Mutanten wurden mittels QuikChange-Mutagenese die entsprechenden Mutationen im APP-C100-His₆ (in pQE60-Vektor, Qiagen) eingeführt. Die dazu verwendeten Primer sind in folgender Tabelle aufgeführt. Das jeweils fett gedruckte Basentriplett codiert für die mutierte AS.

Primer	Sequenz
K28E_fwd	5'-GATGTGGGTTCAAAC GAAGGT GCAATCATTGGAC-3'
K28E_rev	5'-TCCAATGATTGCACCT TTCG TTTGAACCCACATC-3'
G29A_fwd	5'-GTGGGTTCAAACAA AGCT GCAATCATTGGACTC-3'
G29A_rev	5'-GAGTCCAATGATTGC AGCT TTTGAACCCAC-3'
G33A_fwd	5'-AAAGGTGCAATCATT GCACT CATGGTGGGCGG-3'
G33A_rev	5'-CGCCCACCATGAG TGCA ATGATTGCACCTTTG-3'
G33I_fwd	5'-AAAGGTGCAATCATT ATACT CATGGTGGGCGG-3'
G33I_rev	5'-ACCGCCCACCATGAG TATA ATGATTGCACCTTTG-3'
T43I_fwd	5'-GGTGTGTCATAGCG ATAGT GATCGTCATCAC-3'
T43I_rev	5'-GGTGATGACGATCA CTATC GCTATGACAACACC-3'
I45F_fwd	5'-GTCATAGCGACAGT GTTTCG TATCACCTTGGTG-3'
I45F_rev	5'-CACCAAGGTGATGAC GAACA CTGTCGCTATGAC-3'
V46I_fwd	5'-ATAGCGACAGT GATCAT CATCACCTTGGTGATG-3'
V46I_rev	5'-CATCACCAAGGT GATGAT GATCACTGTCGCTATG-3'
V50F_fwd	5'-ATCGTCATCACCT TTCAT GCTGAAGAAGAAAC-3'
V50F_rev	5'-TTTCTTCTTCAG CAATGA ACAAGGTGATGACGATC-3'

Zur Etablierung neuer klonaler H₆X-PS1 bzw. -PS2 HEK293/sw-Zelllinien wurde ein pcDNA4/HisC-H₆X-PS1- bzw. -PS2-Konstrukt [205] verwendet.

4.1.5 Zelllinien

Für die Vervielfältigung von Plasmiden wurden *E. coli* DH5 α genutzt, für die Expression von C100-His₆-Substraten *E. coli* BL21(DE3)_{RIL}.

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturlinien sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Zelllinie	Resistenzen	Transgene	Quelle/Referenz
HEK293S ^a	-	-	Zellpellets von F. Hoffmann-La Roche Ltd.
HEK293	-	-	H. Steiner [348]
HEK293/sw	G ^b	APPsw	H. Steiner [348]
HEK293_C99	H ^c , Z ^d	C99-6myc, F-NEXT	A. Fukumori [471]
-6myc_F-NEXT			
B21-3	G, H, B ^e , Z, P ^f	APPsw, <i>kd</i> ^g APH-1a/b, APH-1aS, PS1	K. Shirotani [300], [471]
B22-3	G, H, B, Z, P	APPsw, <i>kd</i> APH-1a/b, APH-1aL, PS1	K. Shirotani [300], [471]
B23-3	G, H, B, Z, P	APPsw, <i>kd</i> APH-1a/b, APH-1b, PS1	K. Shirotani [300], [471]
B11-1	G, H, B, Z, P	APPsw, <i>kd</i> APH-1a/b, APH-1aS, PS2	K. Shirotani [300], [471]
B12-3	G, H, B, Z, P	APPsw, <i>kd</i> APH-1a/b, APH-1aL, PS2	K. Shirotani [300], [471]
B13-4	G, H, B, Z, P	APPsw, <i>kd</i> APH-1a/b, APH-1b, PS2	K. Shirotani [300], [471]
HEK293/sw_ His ₆ X-PS1	G, Z	His ₆ X-PS1	[205]
HEK293/sw_ His ₆ X-PS2	G, Z	His ₆ X-PS2	[205]

^ain Suspension gewachsen

^bG418

^cHygromycin B

^dZeocin

^eBlasticidin

^fPuromycin

^g*knockdown*, Herunterregulierung

4.1.6 Antikörper

Detaillierte Angaben zu den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die in Maus und Ratte erzeugten Antikörper sind monoklonalen, die im Kaninchen erzeugten Antikörper polyklonalen Ursprungs.

Antikörper	Epitop	Spezies	IB ^a	IP ^b	Quelle/Referenz
PS1N	PS1-NTF, AS 41-49	m ^c	1:2000	-	R. Nixon [472]
5023 (identisch zu 3027, [473])	PS1-CTF, AS 263-407	k ^d	1:1000	-	[471]
2972	PS2-NTF, AS 2-87	k	1:1000	-	[340]
BI.HF5c	PS2-CTF, AS 297-356	m	1:5000	-	[474]
1638g ^e	PEN-2, AS 4-15	k	2 µg/ml	-	[205]
435g	APH-1b, AS 244-257	k	1 µg/ml	-	[206]
4319g (identisch zu 2021g [206])	APH-1a, AS 103-115	k	1 µg/ml	-	[471]
N1660	NCT, AS 693-709	k	1 µg/ml	-	Sigma
5H7	SPP, AS 57-75	m	u.H. ^f	-	E. Kremmer ^g
6E9	SPPL2a, AS 199-217	m	u.H.	-	M. Voss <i>et al.</i> ^g
7F9	SPPL3, AS 247-261	r	u.H.	-	M. Voss <i>et al.</i> ^g
6687	APP695, AS 675-695	k	1:2000	1:300	[230]
2D8	Aβ, AS 1-16	r ^h	1 µg/ml	-	[300]
2D8-Biotin	Aβ, AS 1-16	r	-	1:1000	[300]
3552	Aβ, AS 1-40	k	-	1:300	[235]
4G8	Aβ, AS 17-24	m	-	1:300	Covance
α-Aβ ₃₈ -Ruthenium	Aβ	m	-	1:1000	MSD
BAP24-Ruthenium	Aβ, AS 34-40	m	-	1:1000	F. Hoffmann-La Roche [475]
BAP15-Ruthenium	Aβ, AS 36-42	m	-	1:1000	F. Hoffmann-La Roche [475]
SPA-860	Calnexin C-Terminus	m	1:10000	-	Stressgene
9E10	c-myc-Peptid	m	1:2000	-	SantaCruz
αXpress	Xpress-Peptid	m	1:2000	-	Invitrogen
Val1744	geschnittenes Notch1, vor Val1744	k	1:2000	-	Cell Signaling Technology
Penta-His	His ₆ -Peptid	m	1:2000	-	Qiagen
F7425	Flag-Peptid	k	1:2000	-	Sigma
Flag M2	Flag-Peptid	m	-	1:300 ⁱ	Sigma
α-Maus-HRP	Maus IgG	n.a. ^j	1:5000	-	Promega
α-Kaninchen-HRP	Kaninchen IgG	n.a.	1:10000	-	Promega
α-Ratte-HRP	Ratte IgG	z ^k	1:5000	-	SantaCruz

^aVerdünnung für Immunoblot

^bVerdünnung für Immunpräzipitation; für Antikörper mit Biotin oder Ruthenium für ECL-IA

^cm, Maus

^dk, Kaninchen

^eg, affinitätsgereinigt

^funverdünnter Hybridomaüberstand

^gunpubliziert

^hr, Ratte

ⁱkonjugiert an Agarose

^jnicht angegeben

^kz, Ziege

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 QuikChange-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) ermöglicht die Vervielfältigung und zielgerichtete Mutagenese von DNA-Fragmenten. Für die eingesetzten Primer sei auf 4.1.4 verwiesen. Bei der Konstruktion der Primer wurden darauf geachtet, dass diese am 3' Ende mit G oder C endeten sowie dass der GC-Gehalt der Sequenzen zwischen 40 und 60% und die Schmelztemperatur T_m zwischen 50 und 70°C lag. Die lyophilisierten Primer (Thermo Scientific) wurden zu 100 pmol/ μ l in TE-Puffer (siehe 4.2.3) aufgenommen.

Um gezielt Punktmutationen im pQE60-C100-His₆ einzuführen, wurde das QuikChange-Protokoll von Stratagene verwendet. Dazu wurden Mutageneseprimer gewählt, die - flankiert von etwa 12 bis 15 Basen - in der Mitte die entsprechenden ausgetauschten Basen enthielten, wobei das Codontriplett verwendet wurde, für das möglichst wenig Basen verändert werden mussten.

Der QuikChange-PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

Plasmid-DNA	10 ng
Vorwärtsprimer (100 pM/ μ l)	0.5 μ l
Reversprimer (100 pM/ μ l)	0.5 μ l
dNTP-Mix (10 mM, Roche)	0.4 μ l
10x Reaktionspuffer complete	2 μ l
Pfu-DNA-Polymerase (1 U/ μ l, PeqLab)	0.8 μ l
dH ₂ O	ad 20 μ l

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert. Als Kontrolle wurde ein identischer Ansatz pipettiert, bei dem die Polymerase durch H₂O ersetzt wurde. Die Reaktion wurde mit dem folgenden Temperaturprotokoll im Thermozykler inkubiert:

Schritt	Dauer	Temperatur	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	3 min.	95°C	1
Denaturierung	30 sek.	95°C	
Primeranlagerung	1 min.	Annealing- Temperatur, 50-60°C	16-18
Elongation	2 min. pro kB Fragmentlänge	68°C	
abschließende Elongation	5 min.	68°C	1

Die jeweilige Annealing-Temperatur wurde der T_m der komplementären Sequenz angepasst. Üblicherweise wurde mit $T_m - 5^\circ\text{C}$ begonnen.

Nach der Amplifikation wurde das Ausgangsplasmid mit 0.4 μ l DpnI für 1.5 h bei 37°C verdaut. DpnI schneidet nur methylierte DNA, daher sollte nur das Templat, das aus *dam+* DH5 α isoliert wurde, nicht aber das Amplifikationsprodukt der PCR verdaut

werden. Vom verdauten Reaktionsmix wurden 10 µl in 60 µl kompetente DH5α transformiert (siehe 4.2.1.5). Die Anzahl der Kolonien auf der Kontrollplatte ist ein Maß für die Qualität des Verdau des Ausgangsplasmids. Wenn auf der Mutageneseplatte mindestens 5x mehr Kolonien als auf der Kontrollplatte gewachsen waren, wurden Minipräparationen von DNA (siehe 4.2.1.6) aus zwei Klonen durchgeführt und die Plasmide per Sequenzierung auf die Mutation hin überprüft (siehe 4.2.1.7).

4.2.1.2 Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

50x TAE-Puffer	2 M Tris-HCl pH 8.0, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA pH 8.0
6x DNA-Ladepuffer	50% Glycerin, 0.25% (w/v) Bromphenolblau, 10 mM EDTA pH 8.0
Agarosegele	1-2% Agarose in 1x TAE-Puffer

Agarose wurde zu 1% in 1x TAE-Puffer eingewogen, durch Kochen gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0.2 µg/µl versetzt. Für zu trennende DNA-Fragmente, die kürzer als 500 Bp waren, wurden 2%ige Agarosegele verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Vol. 6x DNA-Ladepuffer gemischt und mit 1 kB Plus DNA-Marker (Invitrogen) bei 100 V in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Die DNA wurde mit Hilfe des eingelagerten Ethidiumbromids unter UV-Licht bei 302 nm visualisiert und ggf. zur Präparation ausgeschnitten. Die DNA enthaltenden Gelstücke wurden mit 200 µl NT-Puffer je 100 mg versetzt, bei 50°C unter Schütteln gelöst und über eine Säule gemäß der Anleitung des Herstellers aufgereinigt und mit 50 µl Elutionspuffer von der Säule gelöst (NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel).

4.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die Konzentrationsermittlung wurde die Absorption der DNA-Lösung bei 260 nm im UV-Spektrometer (Nanodrop) bestimmt. Durch gleichzeitige Messung der Adsorption bei 280 nm kann die Verunreinigung mit Protein qualitativ abgeschätzt werden; der Quotient A_{260nm}/A_{280nm} sollte mindestens 1.8 betragen.

4.2.1.4 Herstellung kompetenter *E. coli*

LB-Medium	1% Bacto-Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 17.25 mM NaCl, autoklaviert bei 120°C und 1.2 bar für 20 min.
Transformationspuffer	50 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin, 10 mM PIPES pH 6.6

Unter Kompetenz versteht man die Fähigkeit von Zellen, exogene DNA aufzunehmen. *E. coli* DH5α bzw. BL21(DE3)_{RIL} wurden in 5 ml LB-Medium für 2 - 3 h bei 37°C inkubiert, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 0.2 erreicht war. Mit diesem Inokulat wurde eine 400 ml Kultur angeimpft, diese wiederum für 2 - 3 h geschüttelt, bis wiederum die OD_{600nm} der Kultur 0.2 betrug. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (3000 g, 4°C, 10 min.) pelletiert, in 200 ml Transformationspuffer resuspendiert und 20 min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 20 ml Transformationspuffer aufgenommen und aliquotiert. Bis zur Verwendung wurden die kompetenten *E. coli* bei - 80°C gelagert.

4.2.1.5 Transformation von DNA in kompetente *E. coli*

Zu 60 µl auf Eis aufgetauten, kompetenten *E. coli* DH5α oder BL21(DE3)_{RIL} wurde 10 µl Ligationsansatz pipettiert. Nach 15 min. Inkubation auf Eis wurden die DNA-Zell-Mischung für 45 sek. auf 42°C erwärmt, danach für 2 min. auf Eis abgekühlt und mit zehnfachem Vol. LB-Medium ohne Antibiotika versetzt. Die Zellsuspension wurde für 30 min. bei 37 °C geschüttelt, danach abzentrifugiert (3000 g, RT, 5 min.) und das in 100 µl resuspendierte Zellpellet auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) ausgebracht. Nach Inkubation bei 37°C ü.N. wurden Kulturen zur DNA-Präparation angeimpft, wenn das Verhältnis der Koloniezahl auf der Re-ligationsplatte ohne Insert zu denen auf der Ligationsplatte mit Insert mindestens 1:3 betrug (siehe 4.2.1.6).

4.2.1.6 Präparation von Plasmid-DNA

LB_{amp}-Medium	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin; Stocklösung 1000x in H ₂ O
LB_{kan}-Medium	LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin; Stocklösung 1000x in H ₂ O
LB_{chlor}-Medium	LB-Medium mit 15 µg/ml Chloramphenicol (zur Selektion von <i>E. coli</i> BL21(DE3) _{RIL}); Stocklösung 1000x in Ethanol

Zur Präparation von bis zu 20 µg Plasmid-DNA wurden 3 ml LB-Medium für DH5α und 10 ml für BL21(DE3)_{RIL} mit je einer Kolonie angeimpft und ü.N. bei 37°C geschüttelt, wobei das LB-Medium das Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) und im Falle der BL21(DE3)_{RIL} zusätzlich Chloramphenicol enthielt. Die Präparation in kleinem Maßstab erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kits (Macherey-Nagel) gemäß der Anleitung des Herstellers, wobei die DNA mit 50 µl Elutionspuffer von der Säule gelöst wurde.

Zur Gewinnung von bis zu 1 mg DNA wurden 200 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotika (siehe oben) für *E. coli* DH5α und 600 ml für BL21(DE3)_{RIL} und das NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet. Üblicherweise wurde das DNA-Pellet in 400 µl H₂O resuspendiert und die Konzentration nach Bestimmung mittels Nanodrop auf 1 µg/µl eingestellt.

4.2.1.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach Sanger ([476]) durch GATC Biotech unter Beachtung der Hinweise zur Probenvorbereitung (<http://www.gatc-biotech.com/de/info-center/dna-konzentrationund-volumen/single-read-sequencing-sample-requirements.html>).

4.2.2 Zellkulturmethoden

4.2.2.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und unter Anwesenheit von 5% CO₂ gehalten. Untransfizierte bzw. nicht stabil transfizierte HEK293-Zellen wurden mit Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) unter Zugabe von 10% fötalem Rinderserum (FBS, engl. *fetal bovine serum*, Sigma), 1% L-Glutamin (2 mM, PAA) und 1%

Penicillin/Streptomycin (100 U/ml/100 µg/ml, PAA) kultiviert. Zur Selektion der Expression bei stabil transgenen Zelllinien wurden folgende Antibiotika verwendet (siehe 4.1.5): G418 (Geneticin, 200 µg/ml, Invitrogen), Zeocin (200 µg/ml, Invitrogen), Blastidicin (10 µg/ml, PAA), Hygromycin B (100 µg/ml, Invitrogen) und Puromycin (0.5 µg/ml, Invitrogen). Um Zellen auf neue Kulturschalen auszubringen, wurde eine Ausgangsplatte von 10 cm Durchmesser mit 5 ml PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA (Invitrogen) bei RT abgelöst. Die trypsinierten Zellen wurden in Medium aufgenommen, das mit den richtigen Selektionsantibiotika versetzt war, bei 1000 g und RT für 5 min. pelletiert, im Anschluss in Medium resuspendiert und auf die gewünschte Anzahl an Schalen verteilt. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen wie eben beschrieben mit Hilfe von Trypsin von den Zellkulturschalen gelöst, abzentrifugiert, in Einfriermedium (FBS mit 10% DMSO) resuspendiert und in einer Isopropanolbox im - 80°C-Gefrierschrank langsam eingefroren (1°C pro min. Abkühlung).

4.2.2.2 Transfektion

Für eine transiente Transfektion von HEK293-Zellen wurden Schalen mit poly-L-Lysin beschichtet, da sich die Zellen bei Behandlung leicht von der Zellkulturschale ablösen. Dazu wurde 10 µg/ml poly-L-Lysin (in PBS, sterilfiltriert) für 30 min. bei RT in den Schalen inkubiert, üblicherweise 0.5 ml pro Well einer 24-Well-Platte. Anschließend wurde 3x mit PBS gewaschen und beim letzten Mal das PBS sorgfältig vollständig abgesaugt. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in antibiotikafreiem Medium in beschichteten Schalen ausgesät, so dass die Konfluenz bei Transfektion etwa 80% betrug. Für eine Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser wurden 16 µg der zu transfizierenden DNA sowie 40 µl Lipofectamin 2000 (Invitrogen) auf je 1 ml OptiMEM vorgelegt, vorsichtig gemischt und für 5 min. bei RT inkubiert. Danach wurden beide Lösungen gemischt und für weitere 20 min. inkubiert. In der Zwischenzeit wurde auf die zu transfizierenden Zellen 7 ml frisches antibiotikafreies Medium gegeben, anschließend wurde der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen ausgebracht. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium gegen frisches ausgetauscht und die Zellen ggf. ü.N. mit den entsprechenden Substanzen behandelt (siehe 4.2.2.3) und am nächsten Tag mit kaltem PBS gewaschen und darin abgeschabt (siehe 4.2.3.2). Zur Etablierung von stabil transgenen Zelllinien wurden die Zellen auf unbeschichteten Platten transfiziert und 24 h nach der Transfektion 1:100 bis 1:1000 in frisches Medium ohne Selektionsantibiotika umgesetzt. 48 h nach der Transfektion wurde dann das gewünschte Selektionsantibiotikum (in doppelter Konzentration im Vergleich zur normalen Kultivierung, siehe 4.2.2.1) zugegeben. Nach etwa drei Wochen wurden Einzelzellklone durch Aufsaugen mit einer 200 µl-Pipette in 24 Well-Platten übertragen, expandiert und auf die Überexpression des gewünschten Transgenes hin untersucht (siehe 4.2.3.1).

4.2.2.3 Behandlung mit GSIs und GSMs

Zur Behandlung mit GSIs und GSMs wurden HEK293/sw-Zellen (ggf. mit weiteren überexprimierten Transgenen) in Medium ohne Selektionsantibiotika auf poly-L-Lysin beschichteten Platten (siehe 4.2.2.2) ausgesät und bei ca. 70% Konfluenz ü.N. (i.d.R. 16 h) mit den gewünschten Substanzen inkubiert. Für ECL-Immunoassays wurden i.d.R.

24 Well-Platten verwendet, worin die Zellen mit 500 µl Medium kultiviert wurden. Die DMSO-Konzentration wurde in allen Proben angeglichen und betrug maximal 0.2%. Nach der Inkubation wurde das Medium durch Zentrifugation bei 10000 g und 4°C für 10 min. von Zellen und Debris befreit und bis zur weiteren Analyse mittels IP (siehe 4.2.3.6) bzw. ECL-Immunoassay (siehe 4.2.3.11) bei - 20°C aufbewahrt.

4.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Aufreinigung von C100-His₆-Substraten aus *E. coli* BL21(DE3)_{RIL}

LB_{amp/chlor}-Medium	siehe 4.2.1.6
TE-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA
Harnstoffpuffer	20 mM Tris-HCl pH 8.5, 6 M Harnstoff, 1% Triton-X-100, 1% SDS, 1 mM CaCl ₂ , 100 mM NaCl
Verdünnungspuffer	20 mM Tris-HCl pH 8.5, 150 mM NaCl
Triton-X-100 Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 8.5, 300 mM NaCl, 1% Triton-X-100
SDS-Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 8.5, 300 mM NaCl, 0.2% SDS
Imidazol-Waschpuffer (20 mM Imidazol)	SDS-Waschpuffer mit 20 mM Imidazol
Elutionspuffer 1 (100 mM Imidazol)	SDS-Waschpuffer mit 100 mM Imidazol
Elutionspuffer 2 (500 mM Imidazol)	SDS-Waschpuffer mit 500 mM Imidazol

Als Vorkultur wurden 50 ml LB_{amp}-Medium mit Chloramphenicol (siehe 4.2.1.6) mit BL21(DE3)_{RIL} angeimpft, die mit pQE60 mit der DNA-Sequenz des zu reinigenden C100-His₆-Substratproteins transformiert waren und diese ü.N. bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit der Vorkultur 800 ml einer Hauptkultur mit gleichem Medium zu einer OD_{600nm} von 0.25 angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0.5 geschüttelt. Zur Kontrolle der Reinigung durch SDS-PAGE wurde vor der Induktion eine Aliquot der Zellsuspension genommen, ebenso wie in jedem weiteren Schritt. Durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) wurde die Expression des Transgens induziert. Nach 4 - 5 h Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 g, 4°C, 10 min.) geerntet und das Pellet pro g Masse in 10 ml kaltem TE-Puffer mit PI complete (Roche) resuspendiert. Die Zellen wurden für 10 min. je 30 sek. mit Ultraschall auf Eis aufgeschlossen, mit einem Pausenintervall von jeweils 30 sek. Nach Abzentrifugation der unlöslichen Bestandteile (24000 g, 4°C, 20 min.) wurden diese nochmals im gleichen Vol. TE-Puffer resuspendiert und der Vorgang wiederholt. Das Pellet der zweiten Zentrifugation wurde in 4 ml Harnstoffpuffer mit PI complete je g Masse des ursprünglichen Zellpellets aufgenommen und durch Ultraschall-Beschallung sorgfältig resuspendiert. Zur vollständigen Solubilisierung wurde die Lösung ü.N. im Kühlraum geschüttelt.

Nach Abzentrifugation der nicht-solubilisierten Bestandteile (24000 g, 4°C, 20 min.) wurde die Proteinkonzentration im Überstand mittels BCA (siehe 4.2.3.7) gemessen. Der Überstand wurde vor der Zugabe von Säulenmaterial 1:5 mit Verdünnungspuffer gemischt. Zur Bindung des überexprimierten Proteins wurde pro 40 mg gemessenem Protein 1 ml abzentrifugierte Ni-NTA-Agarose (Qiagen), die mit 20 mM Tris-HCl pH 8.5 gewaschen wurde, zum verdünnten Überstand gegeben und die Suspension 4 h bis ü.N. im Kühlraum über Kopf rotiert. Zur weiteren Behandlung wurde die Agarose auf eine gestopfte Spritze (2 ml) transferiert und je 3x mit einem Säulenvolumen Triton-X-, SDS- und Imidazolwaschpuffer gewaschen. Zur Elution wurde 7x ein halbes Vol.

Elutionspuffer 1 auf die Agarose getropft und die Fraktionen gesammelt. Abschließend wurde mit einem Vol. Elutionspuffer 2 eluiert. Die Effizienz und Qualität der Reinigung wurde durch SDS-PAGE und anschließende Coomassiefärbung bzw. IB überprüft. Von den zwei Elutionsfraktionen, die am meisten C100-His₆ enthielten, wurde mittels BCA (siehe 4.2.3.7) die Proteinkonzentration bestimmt und Aliquots bei - 20°C gelagert.

4.2.3.1 Gesamtzellysat

STEN Lysepuffer 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40

Vorbemerkung: Für die Detektion von NCT, PS1- bzw. PS2-NTF und -CTF, C99-6myc und AICD-6myc sowie F-NEXT und NICD sind Gesamtzellysate ausreichend bzw. nötig. Für die Detektion von APH-1aL/S, -b und PEN-2 sind Membranfraktionen besser geeignet.

Adhärenz wachsende Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und pro Zellkulturschale von 10 cm Durchmesser in 1 ml kaltem PBS abgeschabt. Die durch Zentrifugation bei 1000 g und 4°C für 5 min. pelletierten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei - 20°C aufbewahrt.

Zur Lyse wurde das Zellpellet von einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale von 10 cm Durchmesser in 500 µl STEN Lysepuffer resuspendiert und sorgfältig gevortext, für ein Zellpellet von einer 6-Well-Platte wurde entsprechend weniger STEN Lysepuffer eingesetzt. Nach 20 min. Inkubation bei 4°C wurden Zellkerne und -debris bei 16000 g und 4°C für 20 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels BCA (siehe 4.2.3.7) bestimmt.

4.2.3.2 Präparation von Membranfraktionen

Hypotoner Puffer 15 mM NaCitrat pH 6.4, 1 mM EDTA
3x Bis-Tris-Puffer 200 mM 6-Amino-n-Caprinsäure, 150 mM Bis-Tris pH 7.0
Membranpuffer 1x Bis-Tris-Puffer mit 1 mM EDTA, 5% Glycerin, 10 mM DTT

Ernte adhärenz wachsender Zellen. Adhärenz wachsende Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und pro Zellkulturschale in etwa 1 ml PBS abgeschabt. Zur Pelletierung der Zellen wurde die Suspension bei 2000 g und 4°C für 5 min. zentrifugiert und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff gefroren.

Zellyse und Klärung des Lysats. Das Zellpellet wurde pro 1 g Masse in 10 ml kalten hypotonem Puffer aufgenommen und gut resuspendiert. Die OD_{600nm} wurde auf 2.00 ± 0.05 eingestellt und aus dem endgültigen Volumen die Anzahl der Zellen in Einheiten von 10 cm Zellkulturschalen errechnet, denen die Zellsuspension entspricht. Im Folgenden wurde mit "Zellkulturschalen" als Einheit weiter gerechnet. Dabei entsprach eine Schale einem Volumen von 850 µl. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ggf. bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert. Nach dem Auftauen im kalten Wasserbad wurden Brji-35 und Lubrol WX aus 10% Stocklösungen zu einer Endkonzentration von 1% zugegeben und das Lysat nach 20 minütiger Inkubation auf Eis bei 2500 g und 4°C für 30 min. zentrifugiert, um ganze Zellen und Nuklei zu pelletieren.

Membranpräzipitation und Resuspension. Der Überstand aus der vorangegangenen Zentrifugation wurde mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 5% und DTT zu 10 mM versetzt. Die Membranen wurden mittels Ultrazentrifugation bei 130000 g und 4°C für 60 min. pelletiert. Das Pellet wurde in 50 µl Membranpuffer pro Zellkulturschale mit Hilfe eines Potters sorgfältig resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Membranen bei - 80°C gelagert.

4.2.3.3 Präparation von γ -Sekretase aus Membranfraktionen

Resuspensionspuffer	1x Bis-Tris-Puffer mit 5% Glycerin, 1 mM EDTA, 0.1% DDM, 1 mM DTT, 0.5% Digitonin
4x Citratpuffer	5 mM NaCitrat pH 6.4, 5% Glycerin, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 0.1% DDM, 0.5% Digitonin
Q-Puffer	0.35x Bis-Tris-Puffer mit 5% Glycerin, 1 mM EDTA, 0.1% DDM, 1 mM DTT, 0.5% Digitonin
Q-Puffer mit CHAPSO	0.35x Bis-Tris-Puffer mit 5% Glycerin, 1 mM EDTA, 1% CHAPSO, 1 mM DTT
Assaypuffer	35 mM NaCitrat pH 6.4, 3.5% Glycerin, 30 mM DTT, 0.66 mg/ml L- α -Phosphatidylcholin (Stocklösung L- α -Phosphatidylcholin 10mg/ml in H ₂ O für 20 min. auf Eis mit Ultraschall behandeln)

Alle folgenden Angaben beziehen sich auf eine Einheit von 16 Zellkulturschalen. Bei größeren Ansätzen wurde das Volumen entsprechend multipliziert.

Solubilisierung der Membranen. Nach dem Auftauen auf Eis wurde zu den Membranen 10 mM DTT zugegeben. Die Membranen wurden daraufhin mit 1% DDM und 2% Digitonin solubilisiert. Die Lösung wurde im Anschluss mittels Zentrifugation bei 100000 g und 4°C für 40 min. von nicht-solubilisierten Membranbestandteilen geklärt.

Ammoniumsulfatfällung. Zum Abtrennen eines großen Teils der unerwünschten Membranproteine wurde der Überstand mit 4 M (NH₄)₂SO₄ zu 48% (v/v) versetzt und bei 16000 g und 4°C für 20 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin mit 4 M (NH₄)₂SO₄ auf eine Endkonzentration von 80% (v/v) gebracht. Nach kurzer Inkubation bei - 20°C und 10 min. auf Eis wurde die γ -Sekretase enthaltende Fraktion bei 16000 g und 4°C für 30 min. pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer mit 50% (v/v) 4 M (NH₄)₂SO₄ resuspendiert. Zur Pelletierung aller ungelösten Proteine wurde wiederum bei 16000 g und 4°C für 15 min. zentrifugiert.

Bindung an WKA-Agarose und Elution. Für die Aufreinigung von γ -Sekretasekomplexen mit vollständig glykosyliertem Nicastrin über die Bindung an Lektin wurden 250 µl einer 1:6 Weizenkeimagglutinin-Agarose (WKA-Agarose)-Suspension 3x mit H₂O gewaschen und in 400 µl Resuspensionspuffer ohne (NH₄)₂SO₄ aufgenommen. Zur WKA-Agarose wurde das resuspendierte Pellet der zweiten Ammoniumsulfatfällung gegeben und die Suspension im Kühlraum für etwa 90 min. geschüttelt. Danach wurde die Agarose 4x für wenige min. mit 300 µl 1x Citratpuffer mit 300 mM Methylmannosepyranosid gewaschen. Zur Elution wurden auf die WKA-Agarose 80 µl 1x Citratpuffer mit 200 mM N-Acetylglucosamin gegeben und die Mischung für 20 min. im Kühlraum

geschüttelt. Daraufhin wurde die Suspension über eine mit einer Fritte gestopften gelben Spitze bei 2500 g für 2 min. von der Agarose befreit.

Ionenaustauschchromatographie mit SP-Sephrose. Das Eluat von der WKA-Agarose wurde mit 0.5 M Citrat pH 6.4 und 0.5 M Essigsäure pH 5.0 auf einen pH von 5.5 eingestellt. 90 µl einer 1:2 SP-Sephrose-Suspension wurden 3x mit H₂O und 1x mit 800 µl 1x Citratpuffer gewaschen. Die Lösung wurde im Anschluss mit der gewaschenen SP-Sephrose für 40 min. im Kühlraum geschüttelt. Danach wurde die Suspension erneut durch eine Fritte zentrifugiert.

Bindung an Q-Sephrose und Elution. Das Filtrat der Sulfopropyl (SP)-Sephrose wurde mit 3x Bis-Tris pH 7.0 sowie 0.5 M NaBorat pH 9.0 auf einen pH-Wert von 7.0 zurückgebracht. 25 µl einer 1:2 Q-Sephrose Suspension wurde 3x mit H₂O und 1x mit Q-Puffer gewaschen und im Anschluss mit der neutralisierten Lösung über Nacht im Kühlraum geschüttelt. Die Sepharose wurde 1x jeweils mit 200 µl Q-Puffer mit CHAPSO und Q-Puffer mit CHAPSO und 100 mM NaCl gewaschen und dann zur Elution mit 48 µl Q-Puffer mit CHAPSO und 500 mM NaCl für 60 min. im Kühlraum geschüttelt.

Rekonstitution der γ -Sekretase. Das filtrierte Eluat der Q-Sephrose wurde unter Vortexen mit 4.6-fachem Vol. Assaypuffer verdünnt, in dem die enthaltenen Lipide durch das Behandeln mit Ultraschall Lipidvesikel gebildet hatten. Zusätzlich wurde die Lösung mit 1/25 Vol. an 25x PI-Mix versetzt, so dass die Lipidkonzentration ca. 0.5 mg/ml betrug. Die Mischung aus gereinigter γ -Sekretase und Lipidvesikeln wurde für mindestens 8 h im Kühlraum geschüttelt, um den Enzymkomplex in die Lipidumgebung zu rekonstituieren, d.h. in die Vesikel zu integrieren.

4.2.3.4 Aktivitätsassay mit aufgereinigter und rekonstituierter γ -Sekretase

Für Aktivitätsassays mit rekonstituierter γ -Sekretase wurde diese mit 0.5 µM C100-His₆ über Nacht bei 37°C geschüttelt. Dazu wurde das aufgereinigte C100-His₆ (siehe 4.2.3) mit 0.2% SDS auf 20 µM gebracht und mit 10 mM DTT (zum Schutz vor Oxidation im Aktivitätsassay) bei 65°C für 10 min. denaturiert. Anschließend wurde die Substratlösung auf 6.6 µM in 0.1% SDS verdünnt, um die SDS-Konzentration schrittweise zu reduzieren. Während der Inkubation bei 65°C wurde die γ -Sekretasepräparation auf RT gebracht und ggf. mit der gewünschten Konzentration an GSIs bzw. GSMs oder DMSO als Kontrolle versetzt. Dabei wurde eine maximale DMSO-Konzentration von 2.5% nicht überschritten. Nach der Verdünnung des Substrates wurde dieses zur vorbereiteten γ -Sekretase gegeben. Für eine Analyse des Gesamt-A β und der individuellen Spezies per Immunblot sowie für einen A β ₃₈-, A β ₄₀- und A β ₄₂-ECL-Immunoassay wurde in der Regel γ -Sekretase von 0.6 Zellkulturschalen eingesetzt, für eine massenspektrometrische Analyse von 2 Zellkulturschalen (siehe 4.2.3.12). Die Aktivitätsassays wurden ü.N. (i.d.R. 16 h) bei 37°C geschüttelt und die Reaktion je nach gewünschter Analyse-methode durch Zugabe von Harnstoff-Tris-Bicin-Probenpuffer (siehe 4.2.3.9) bzw. durch Verdünnung in Verdünnungspuffer (siehe 4.2.3.11) oder MS-IP-Puffer (siehe 4.2.3.12) gestoppt.

4.2.3.5 Aktivitätsassay mit Membranfraktionen

STEN 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% NP-40

Membranfraktionen von HEK293- bzw. HEK293/sw-Zellen wurden gemäß Abschnitt 4.2.3.2 präpariert, jedoch ohne den Brij 35/Lubrol WX-Extraktionsschritt. Für Aktivitätsassays mit nicht-solubilisierten Membranfraktionen wurden pro Ansatz Membranfraktionen äquivalent zu 1.5 10 cm-Zellkulturschalen HEK293/sw-Zellen (ca. 1 mg Gesamtprotein) verwendet. Diese wurden ggf. mit GSIs bzw. GSMs oder DMSO als Kontrolle versetzt und ü.N. bei 37°C geschüttelt. Um den Hintergrund der mit in der Membran isolierten und somit vor der Durchführung des Assays vorhandenen A β -Peptide abschätzen zu können, wurde eine Probe bei 4°C inkubiert. Nach Verdünnung auf 0.1% SDS mit STEN und Zentrifugation bei 16000 g und 4°C für 30 min. wurde A β durch Immunpräzipitation aufkonzentriert (siehe 4.2.3.6) und mittels SDS-PAGE (siehe 4.2.3.9) und IB (siehe 4.2.3.10) analysiert.

Für Assays mit aufgereinigtem C100-His₆ (siehe 4.2.3) wurden pro Ansatz Membranfraktionen äquivalent zu 1.5 10 cm-Zellkulturschalen HEK293-Zellen (ca. 1 mg Gesamtprotein) verwendet, die mit 1% CHAPSO für 30 min. bei 4°C solubilisiert wurden. Nach anschließender Verdünnung auf 0.375% CHAPSO wurden die Proben durch Zentrifugation bei 16000 g und 4°C für 30 min. von nicht solubilisierten Bestandteilen befreit und nach Zugabe von 0.5 μ M C100-His₆ (siehe 4.2.3.4) und ggf. GSIs bzw. GSMs oder DMSO als Kontrolle ü.N. bei 37°C geschüttelt. Die Reaktion wurde wie oben beschrieben gestoppt und ebenso A β analysiert.

4.2.3.6 Immunpräzipitation (IP) von A β

Tris-Stocklösung	750 mM Tris-HCl pH 8.0, 125 mM EDTA
STEN-NaCl	50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% NP-40, 0.5 M NaCl
STEN-SDS	50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% NP-40, 0.1% SDS
STEN	50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% NP-40

Um A β aus verschiedenen Proben (konditioniertes Medium, solubilierte Membranfraktionen) immunzufällen, wurden die Proben durch Zentrifugation bei 16000 g und 4°C für 10 min. von unlöslichen Bestandteilen befreit. Auf einer 10 cm-Zellkulturschale HEK293/sw-Zellen mit ca. 70 % Konfluenz wurden 7 ml Medium ohne Antibiotika ü.N. inkubiert und davon 1 ml zur IP pro Probe für den IB verwendet. Zur Inhibition des A β -Abbaus und zur Neutralisation wurden 40 μ l Tris-Stocklösung auf 1 ml Medium gegeben. Alle Proben wurden mit 3 μ l 3552-Antikörper (siehe 4.1.6) und je 15 μ l Protein-A-Sepharose (PAS), die im jeweiligen IP-Puffer äquilibriert wurde, versetzt und für mindestens 8 h bei 4°C geschüttelt. Im Anschluss wurde die PAS mit jeweils 1 ml STEN-NaCl, STEN-SDS und STEN gewaschen und mit 15 μ l Harnstoff-Tris-Bicin-Probenpuffer (siehe 4.2.3.9) durch Inkubation bei 95°C für 10 min. eluiert.

4.2.3.7 Proteinkonzentrationsbestimmung durch BCA

Beim Bicinchoninsäure-Assay reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Protein, d.h. mit Cystein, Tyrosin, Tryptophan oder Peptidbindungen, zu einwertigen Kupferionen. Diese bilden mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch ausgewertet werden kann. Der Assay wurde in 96-Well-Platten pipettiert, mit einer Proteinstandardkurve mit BSA von 0.5 bis 10 µg unter Zugabe des Puffers, in dem sich die Proben befanden. Die Arbeitslösung wurde gemäß den Angaben des Herstellers (Uptima) angesetzt und davon 200 µl pro Well verwendet. Der Assay wurde für 30 min. bei 37°C inkubiert, anschließend die Absorption bei 562 nm im Spektrometer gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve berechnet.

4.2.3.8 Photoaffinitätsmarkierungsassay mit RO-57-BpB

Verdünnungspuffer	1x Bis-Tris-Puffer (siehe 4.2.3.2) mit 1 mM EDTA und 10 mM DTT
Solubilisierungspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% NP-40, 1% SDS
Blockpuffer für Sepharose	1% I-Block (Tropix) in 1x PBS
1.7x Harnstoff-Probenpuffer mit Biotin	200 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 M Harnstoff, 20% Glycerin, 3.33% SDS, 1.67% DTT, Spatelspitze Bromphenolblau, 4 mM Biotin

Membranfraktionen von HEK293 bzw. HEK293/sw-Zellen wurden gemäß Abschnitt 4.2.3.2 präpariert, jedoch ohne den Brij 35/Lubrol WX-Extraktionsschritt. Pro Ansatz wurden Membranen äquivalent zu einer 10 cm-Zellkulturschale (ca. 650 µg Gesamtprotein) von 50 µl auf 500 µl mit Verdünnungspuffer mit 1x PI complete verdünnt. Für den Photoaffinitätsmarkierungsassay wurde 1 µM RO-57-BpB sowie, wo angegeben, Kompetitorsubstanzen (1 µM GSIs, 100 µM GSMs) oder DMSO als Kontrolle zu den Membranfraktionen gegeben und diese für 2 h bei 4°C im Dunkeln geschüttelt. Die Photoaktivierung von RO-57-BpB erfolgte bei 365 nm mit einer 3UV (8 W, 230 V, 50 Hz) UV-Lampe (UVP) für 10 min. bei einem Abstand von 1.5 cm zu der Oberfläche der Proben auf Eis. Um die Höhe des Flüssigkeitsstands sowie den Abstand zu der Oberfläche der Proben zu minimieren wurde die Belichtung in 12-Well-Platten durchgeführt. Im Anschluss wurden die Membranen durch Zentrifugation bei 16000 g und 4°C für 30 min. pelletiert und in 500 µl Solubilisierungspuffer je Ansatz für 30 min. bei RT solubilisiert. Währenddessen wurde pro Ansatz 15 µl Streptavidin-Sepharose-Suspension (GE Healthcare) mehrmals mit Blockpuffer gewaschen, darin für 30 min. geblockt und danach in Solubilisierungspuffer äquilibriert. Nach Abzentrifugation unlöslicher Bestandteile aus den solubilierten Membranfraktionen bei 16000 g und RT für 30 min. wurde zu den Proben je 15 µl Streptavidin-Sepharose-Suspension gegeben und die Mischung für 1 h bei RT geschüttelt. Nach 3x Waschen mit 500 µl Solubilisierungspuffer wurden die gebundenen Proteine mit 12 µl 1.7x Harnstoff-Probenpuffer mit Biotin bei 65°C für 10 min. von der Streptavidin-Sepharose eluiert (finale Biotinkonzentration ca. 2 mM). Für den Input wurde eine entsprechende Menge der verdünnten Membranen ebenfalls abzentrifugiert, solubilisiert und nach erneuter Zentrifugation mit dem gleichen Probenpuffer versetzt.

Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend die angegebenen Proteine durch IB nachgewiesen (siehe 4.2.3.9 und 4.2.3.10).

4.2.3.9 SDS-PAGE

Vorbemerkung: Zur Trennung der Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes wurden i.d.R. Tris-Tricin-Gele verwendet, ebenso zur Detektion des Gesamt-A β bzw. APP und AICD. Für die Trennung von PS1- bzw. PS2-NTF und -CTF, z.B. bei der Untersuchung von Einzelzellklonen, die PS1- und PS2-Varianten überexprimieren, wurden 12%ige Harnstoff-Tris-Glycin-Gele eingesetzt, für die Trennung von C99-6myc und AICD-6myc sowie F-NEXT und NICD wurden 10%ige Harnstoff-Tris-Glycin-Gele verwendet. Die verschiedenen A β -Spezies wurden über ein Harnstoff-Tris-Bicin-Gel aufgetrennt.

Tris-Tricin-Gel von Invitrogen.

10x Tris-Tricin-Laufpuffer	1 M Tris-HCl, 1 M Tricin, 1% SDS
3x Laemmli-Harnstoff-Probenpuffer	188 mM Tris-HCl pH 6.8, 6% SDS, 30% Glycerin, 7.5% β -Mercaptoethanol, 6 M Harnstoff, Spatelspitze Bromphenolblau

Proben wurden mit 3x Laemmli-Harnstoff-Probenpuffer versetzt und für 5 min. bei 65°C denaturiert. Die SDS-PAGE erfolgte mit 1x Tris-Tricin-Laufpuffer in einer X Cell Sure Lock Mini Gelelektrophoresekammer bei 80 V, bis die Proben in der Lauffront fokussiert waren. Danach wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

Tris-Tricin-Gel nach Schägger.

Gelpuffer für Schäggergele	3 M Tris-HCl pH 8.45, 0.3% SDS
5x Schäggergel-Laufpuffer	1 M Tris-HCl pH 8.9

Alternativ zu kommerziell erhältlichen Tris-Tricin-Gelen wurde folgende Vorschrift für Tris-Tricin-Gele nach Schägger [477] verwendet (Angaben für zwei 1.5 mm dicke Gele), z.B. um die Expression der C100-His₆-Substrate in *E. coli* BL21(DE3)_{RIL} zu überprüfen.

	Trenngel 16.5%	Spacergel 9% (2.7 cm)	Sammelgel 4% (1.7 cm)
H ₂ O	-	3.65 ml	4.2 ml
Gelpuffer	3.5 ml	2.5 ml	1.55 ml
Glycerin (32%)	3.5 ml	-	-
Acryl-/Bisacrylamid (32:1, 49.5%)	3.5 ml	1.35 ml	0.5 ml
APS (10%)	32.5 μ l	35 μ l	100 μ l
TEMED	3.25 μ l	4 μ l	15 μ l

Die APS-Lösung wurde stets frisch angesetzt. Trenngel und Spacergel wurden gleichzeitig polymerisiert und gegossen. Die SDS-PAGE erfolgte mit 1x Tris-Tricin-Laufpuffer innen (Kathode, s. oben) und Schäggergellaufpuffer außen (Anode) in einer Mini-PROTEAN 3 Gelelektrophoresekammer unter den oben beschriebenen Bedingungen.

Harnstoff-Tris-Glycin-Gele.

4x Trenngelpuffer	1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.4% SDS
4x Sammelgelpuffer	0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS
Tris-Glycin-Laufpuffer mit SDS	25 mM Tris-HCl, 200 mM Glycin, 0.1% SDS

Die Angaben in folgender Tabelle beziehen sich auf zwei 1.5 mm dicke Gele.

	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Sammelgel
Harnstoff 8 M	5.25 ml	5.25 ml	5 ml
H ₂ O	2.25 ml	1.5 ml	1.825 ml
4x Trenngelpuffer	3.75 ml	3.75 ml	-
4x Sammelgelpuffer	-	-	2.5 ml
Acryl-/Bisacrylamid (37.5:1, 40%)	3.75 ml	4.5 ml	0.975 ml
APS (10%)	30 µl	30 µl	30 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl

Die Harnstofflösung wurde stets frisch angesetzt, Trenngel und Sammelgel wurden nacheinander polymerisiert und gegossen. Die SDS-PAGE erfolgte in Tris-Glycin-Laufpuffer mit SDS in einer Mini-PROTEAN 3 Gelelektrophoresekammer unter den oben beschriebenen Bedingungen.

Harnstoff-Tris-Bicin-Gel nach Wiltfang.

Trenngelpuffer	1.6 M Tris, 0.4 M H ₂ SO ₄
Spacergelpuffer	0.8 M Bis-Tris, 0.2 M H ₂ SO ₄
Sammelgelpuffer	0.72 M Bis-Tris, 0.32 M Bicin
2x Harnstoff-Tris-Bicin-Probenpuffer	0.72 M Bis-Tris, 0.32 M Bicin, 2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 30% Saccharose, Spatelspitze Bromphenolblau
Kathodenpuffer	0.2 M Bicin, 0.25% SDS, 0.1 M NaOH
Anodenpuffer	0.2 M Tris, 0.05 M H ₂ SO ₄

Dieses modifizierte Gelsystem nach Wiltfang [478] wurde zur Auftrennung von Aβ-Peptiden verwendet (Angaben für zwei 1.5 mm dicke Gele):

	Trenngel 11%	Spacergel (1.2 cm)	Sammelgel (1.3 cm)
Harnstoff	9.6 g	-	-
H ₂ O	2 ml	1.36 ml	740 µl
SDS (20%)	100 µl	20 µl	15 µl
Trenngelpuffer	5 ml	-	-
Spacergelpuffer	-	2 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	1.5 ml
Acryl-/Bisacrylamid (19:1, 40%)	5.5 ml	600 µl	675 µl
APS (10%)	80 µl	16 µl	18 µl
TEMED	10 µl	4 µl	6 µl

Der Harnstoff wurde in Trenngelpuffer und H₂O aufgenommen. Die Mischung wurde in der Mikrowelle erwärmt, bis der Harnstoffs sich löste. Die drei Schichten wurden zwischen die 8x9 cm Hoefer Gelplatten gegossen und das Gel üblicherweise am nächsten Tag verwendet. Das Gel wurde bis zur Verwendung feucht abgedeckt bei RT ü.N. zwischengelagert. Die Proben wurden in 2x Harnstoff-Tris-Bicin-Probenpuffer aufgenommen und 10 min. bei 95°C denaturiert. Die SDS-PAGE erfolgte in einer Mighty small II Hoefer Gelelektrophoresekammer, mit Kathodenpuffer innen und Anodenpuffer außen unter den oben beschriebenen Bedingungen.

4.2.3.10 Immunoblot

10x Tris-Glycin-Blotpuffer	250 mM Tris-HCl, 2M Glycin
TBS/Tween	100 mM Tris-HCl pH 7.4, 1.5 M NaCl, 1% Tween-20
Ponceau S-Lösung	0.5% Ponceau S, 5% Essigsäure in H ₂ O
Blockpuffer	0.2% I-Block (Tropix), 0.1% Tween-20, in PBS
10x PBS	1.4 M NaCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O, 17.5 mM KH ₂ PO ₄ , 27 mM KCl, pH 7.4

Proteintransfer auf Membranen. Für die Detektion aller Proteine außer A β wurden zum Blotting PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membranen verwendet. Diese wurden für wenige min. mit Isopropanol benetzt und im Anschluss mit H₂O gewaschen, bevor sie in Blotpuffer äquilibriert wurden. Nitrocellulosemembranen für die Detektion von A β wurden direkt in Blotpuffer gegeben. Das Polyacrylamidgel und die Membran wurden mit jeweils einem Schwamm und drei Filterpapieren auf jeder Seite in eine Blotkassette (Bio-Rad) eingespannt, wobei die Membran Richtung Anode und das Polyacrylamidgel Richtung Kathode platziert wurde. Der Transfer erfolgte bei 400 mA für 60 min. in einer Mini Trans-Blot Transfer Kammer, zur Kühlung wurde ein Eisblock in die Kammer eingehängt. Für Proteine mit einem Molekulargewicht unter 20 kDa wurde ggf. einige min. kürzer geblottet. Nitrocellulosemembranen, auf denen A β detektiert werden sollte, wurden nach dem Blotting für etwa 5 min. in 1x PBS gekocht, um die Zugänglichkeit der Antikörperbindungsstellen zu verbessern. Ggf. wurde der Transfer durch kurze Anfärbung der Proteine mit Ponceau S überprüft. Dazu wurde die Membran kurz in H₂O gewaschen und anschließend für ca. 1 min. mit der Ponceau S-Lösung gefärbt. Dann wurde die Ponceau S-Lösung entfernt und mit H₂O gewaschen, bis sich die Proteinbanden auf der Membran vom Hintergrund abhoben. Danach wurde weiter mit H₂O gewaschen, bis die Membran vollständig entfärbt war.

Blocken und Inkubation mit dem Primärantikörper. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen wurde diese für 1 h in Blockpuffer bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran in die Blockpuffer mit Primärantikörper in der für ihn spezifischen Verdünnung in eine abgedeckte Schale gegeben und diese über Nacht im Kühlraum sanft geschüttelt.

Waschen und Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Nach 3x Waschen für 10 min. in TBS/Tween wurde die Membran für 1 h mit dem HRP-gekoppelten Se-

kundärantikörper bei RT inkubiert. Dabei wurde für monoklonale Primärantikörper der Sekundärantikörper 1:5000, für polyklonale 1:10000 in Blockpuffer verdünnt.

Waschen und Detektion. Nach erneutem 3x Waschen wurden die Proteine mit ECL oder ECL Plus sichtbar gemacht. Dazu wurde die Membran kurz durch H₂O gezogen, abgetropft und für 5 min. auf Klarsichtfolie mit dem gewünschten Reagenz inkubiert. Im Anschluss wurden die Proteinbanden durch Belichtung eines Films visualisiert. Zur Quantifizierung von Signalen wurden die Membranen im LAS-4000-Quantifizierer (Fuji) belichtet.

4.2.3.11 Elektrochemolumineszenz-Immunoassay zur Quantifizierung von A β

Verdünnungspuffer (für zellfreie Assays)	0.5% Triton-X-100 in PBS
Blockpuffer	1% BSA, 0.05% Tween-20 in PBS
Waschpuffer	0.05% Tween-20 in PBS

Die Antikörper BAP-15 (α A β ₄₂) und BAP-24 (α A β ₄₀) wurden gemäß der Vorschrift von MSD mit einer Sulphoruthenium-Markierung versehen, der markierte α A β ₃₈ wurde direkt von MSD bezogen (siehe 4.1.6). Mit Streptavidin beschichtete 96-Well-Platten wurden bei RT für 30 min. mit 100 μ l Blockpuffer je Loch geschüttelt. Die Inkubation mit 2D8-Biotin (1:1000 in Blockpuffer, je 100 μ l pro Loch) erfolgte im ü.N. im Kühlraum oder für 1 bis 1.5 h bei RT. Zum Entfernen von ungebundenem Primärantikörper wurde zweimal kurz mit je 100 μ l Waschpuffer pro Well gewaschen. Zur Bestimmung von A β aus zellfreien Assays wurden diese mit 520 μ l Verdünnungspuffer verdünnt. Kulturüberstände wurden für 5 min. bei 2500 g zentrifugiert und dann direkt vermessen, die Probe für A β ₄₀ ggf. 1:2 - 1:5 in Medium verdünnt. Für jedes Peptid wurde eine Standardreihe von 30000 bis 370 ng/ml in serieller Verdünnung 1:3 in dem Puffer angesetzt, in dem sich auch die Proben befanden (TBS mit 0.5% Triton-X-100 bzw. DMEM mit 10% FCS). Sowohl von den Standards als auch von den Proben wurden jeweils 75 μ l in je zwei Wells zur Doppelbestimmung pipettiert. Danach wurden 25 μ l des entsprechenden Antikörpers (1:1000 verdünnt in Blockpuffer) hinzugefügt und die Platten 2 h im Dunkeln bedeckt bei RT geschüttelt. Nach 3x Waschen mit Waschpuffer wurde in jedes Well 100 μ l 1x Lesepuffer von MSD pipettiert und unmittelbar danach die Lichtemission bei 620 nm im MSD Sector Imager 2400 Reader gemessen. Aus den Emissionswerten der Standards und der Proben wurden mit der MSD Discovery Workbench Software die Konzentrationen von A β ₃₈, A β ₄₀ und A β ₄₂ in den Proben bestimmt.

4.2.3.12 Massenspektrometrie

Tris-EDTA-Stocklösung	750 mM Tris-HCl pH 8.0, 125 mM EDTA
20x MS-IP-Puffer	200 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.8 M NaCl, 100 mM EDTA, 2% N-octyl-Glucopyranosid
MS-Matrix	Trifluoressigsäure:Wasser:Acetonitril (1:20:20), gesättigt mit α -cyano-4-hydroxy-Zimtsäure

Zellfreie Aktivitätsassays mit γ -Sekretase, die von zwei 10 cm-Zellkulturschalen HEK293-Zellen isoliert wurde, wurden mit 1x MS-Immunpräzipitationspuffer (MS-IP-Puffer) auf 1 ml verdünnt und bei 100000 g und 4°C für 1 h zentrifugiert. Für die Immunfällung von

A β wurde zum Überstand der Zentrifugation 3 μ l 4G8-Antikörper und 15 μ l Protein-G-Sepharose (PGS) pipettiert. Für die Detektion von AICD wurden 15 μ l Protein-A-Sepharose (PAS) mit 5 μ l 6687-Antikörper für 1 h bei RT vorinkubiert, mit MS-IP-Puffer gewaschen und zum verdünnten Aktivitätsassay gegeben. Diese Suspension wurde ü.N. im Kühlraum über Kopf rotiert. Für die Immunpräzipitation von A β aus Zellkulturüberständen wurden 7 ml Medium, das ü.N. auf einer dicht bewachsenen 10 cm-Zellkulturschale inkubiert wurde, durch Zentrifugation (10000 g, 4°C, 10 min.) von ganzen Zellen und Debris befreit und zur Neutralisation und Inhibition des A β -Abbaus 1:25 mit Tris-EDTA-Stocklösung sowie mit 3 μ l 4G8-Antikörper und 15 μ l PGS versetzt. Nach 3x Waschen der PGS bzw. PAS mit 1x MS-IP sowie H₂O wurde die Flüssigkeit vollständig von der Sepharose abgesaugt. Zur Elution wurde 10 μ l Matrix auf die Sepharose gegeben, davon wurde 6x 0.8 μ l auf die Probenplatte aufgetropft. Die Spektren der Proben wurden anschließend im Massenspektrometer vermessen und die Daten mit dem Data Explorer analysiert.

4.2.4 Statistik und Software

t- und z-Tests zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurden mit Microsoft Excel berechnet. Der beim t- und z-Test ermittelte p-Wert gibt an, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, bei gültiger Nullhypothese zufällig das erhaltene oder ein noch "besseres" Ergebnis zu erhalten. Übliche Abstufungen sind $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) und $p \leq 0.001$ (***). Wenn nicht anders angegeben, wurde der zweiseitige, ungepaarte t-Test verwendet, der als Eingabe die einzelnen Replikate verlangt. Bei multiplen t-Tests wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet, bei der das Signifikanzniveau angepasst wird, indem es durch die Anzahl der Vergleiche geteilt wird. Wenn z.B. $n = 5$ Vergleiche durchgeführt werden, gilt folglich (*) für $p \leq \frac{0.05}{5} = 0.01$. Wenn Mittelwerte mit Standardabweichungen gegeben waren, wie beim Vergleich von zwei IC₅₀-Werten aus einer Dosiswirkungskurve, wurde der z-Test verwendet. Bei der Analyse der Konkurrenzexperimente wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet, da nicht eindeutig zwischen einem direkten Effekt (überlappende oder gemeinsame Bindungsstelle zweier Substanzen) und indirekten Effekten (die Kompetitorsubstanz ändert die Konformation des Enzyms) unterschieden werden kann. Außerdem hängt die Stärke der Konkurrenz auch von vielen weiteren Faktoren wie z.B. den physikochemischen Eigenschaften der Kompetitorsubstanz ab (Aktivität, Löslichkeit, unspezifische Bindung an hydrophobe Bereiche anderer Proteine). Deshalb wurden die Konkurrenzdaten nicht mit t-Tests analysiert, sondern lediglich die eigentliche Effektgröße beurteilt und beschrieben.

Sequenzanalysen wurden mit Hilfe von ApE Universal durchgeführt. Signale von Immunoblots wurden mit der MultiGauge-Software von Fujifilm ausgewertet. Balkendiagramme wurden in Microsoft Excel erstellt, die Dosiswirkungskurven in Prism. Filme wurden mit einem Epson-Scan digitalisiert, mit Gimp bearbeitet und die Abbildungen in Microsoft Powerpoint und Inkscape zusammengestellt. Diese Arbeit wurde mit L^AT_EX verfasst.

Literatur

- [1] C. Ballard, S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland, and E. Jones. Alzheimer's disease. *Lancet*, 377(9770):1019–31, 2011.
- [2] H.W. Querfurth and F.M. LaFerla. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 362(4):329–44, 2010.
- [3] C.P. Ferri, 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. Sczufca, and for Alzheimer's Disease International. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366(9503):2112–7, 2005.
- [4] U. Ziegler and G. Doblhammer. Prävalenz und Inzidenz von Demenz in Deutschland - Eine Studie auf Basis von Daten der gesetzlichen Krankenversicherungen von 2002. *Gesundheitswesen*, 71(5):281–90, 2009.
- [5] R. Brookmeyer, E. Johnson, K. Ziegler-Graham, and H.M. Arrighi. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 3(3):186–91, 2007.
- [6] P. Kiencke, D. Daniel, C. Grimm, and R. Rychlik. Direct costs of Alzheimer's disease in Germany. *Eur J Health Econ*, 12(6):533–9, 2011.
- [7] H. Hampel, D. Prvulovic, S. Teipel, F. Jessen, C. Luckhaus, L. Frölich, M.W. Riepe, R. Dodel, T. Leyhe, L. Bertram, W. Hoffmann, F. Faltraco, and for the German Task Force on Alzheimer's Disease (GTF-AD). The future of Alzheimer's disease: the next 10 years. *Prog Neurobiol*, 95(4):718–28, 2011.
- [8] C. DeCarli. Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, aetiology, and treatment. *Lancet Neurol*, 2(1):15–21, 2003.
- [9] E. Mariani, R. Monastero, and P. Mecocci. Mild cognitive impairment: a systematic review. *J Alzheimers Dis*, 12(1):23–35, 2007.
- [10] G. Miller. Alzheimer's biomarker initiative hits its stride. *Science*, 326(5951):386–9, 2009.
- [11] H. Hampel, R. Frank, K. Broich, S.J. Teipel, R.G. Katz, J. Hardy, K. Herholz, A.L.W. Bokde, F. Jessen, Y.C. Hoessler, W.R. Sanhai, H. Zetterberg, J. Woodcock, and K. Blennow. Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nat Rev Drug Discov*, 9(7):560–74, 2010.
- [12] P.D. Meek, K. McKeithan, and G.T. Schumock. Economic considerations in Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy*, 18(2):68–73, 1998.
- [13] K. Maurer, S. Volk, and H. Gerbaldo. Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet*, 349(9064):1546–9, 1997.
- [14] A. Alzheimer. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *All Z Psychoat Psych-Gerichtl Med*, 64(1-2):146–8, 1907.
- [15] A. Alzheimer. Über eigenartige Krankheitsfälle des späten Alters. *Z Ges Neurol Psychiat*, 4(1):356–85, 1911.
- [16] S.S. Sisodia and P.H. St George-Hyslop. γ -Secretase, notch, A β and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci*, 3(4):281–90, 2002.
- [17] R.D. Terry, E. Masliah, D.P. Salmon, N. Butters, R. DeTeresa, R. Hill, L.A. Hansen, and R. Katzman. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, 30(4):572–80, 1991.
- [18] H. Braak, E. Braak, D. Yilmazer, R.A. de Vos, E.N. Jansen, and J. Bohl. Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm*, 103(4):455–90, 1996.
- [19] D.G. Drubin and M.W. Kirschner. Tau protein function in living cells. *J Cell Biol*, 103(6):2739–46, 1986.
- [20] M. Goedert, M.G. Spillantini, N.J. Cairns, and R.A. Crowther. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron*, 8(1):159–68, 1992.

- [21] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, and L.I. Binder. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (τ) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(13):4913–7, 1986.
- [22] P. Friedhoff, M. von Bergen, E.M. Mandelkow, P. Davies, and E. Mandelkow. A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(26):15712–7, 1998.
- [23] L.M. Shaw, M. Korecka, C.M. Clark, V.M.-Y. Lee, and J.Q. Trojanowski. Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis and monitoring therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 6(4):295–303, 2007.
- [24] J. Hardy and D.J. Selkoe. The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580):353–6, 2002.
- [25] D.J. Selkoe. Resolving controversies on the path to Alzheimer’s therapeutics. *Nat Med*, 17(9):1060–5, 2011.
- [26] J. Kang, H.G. Lemaire, A. Unterbeck, J.M. Salbaum, C.L. Masters, K.H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, and B. Müller-Hill. The precursor of Alzheimer’s disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106):733–6, 1987.
- [27] D. Goldgaber, M.I. Lerman, O.W. McBride, U. Saffiotti, and D.C. Gajdusek. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer’s disease. *Science*, 235(4791):877–80, 1987.
- [28] R.E. Tanzi, J.F. Gusella, P.C. Watkins, G.A. Bruns, P. St George-Hyslop, M.L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D.M. Kurnit, and R.L. Neve. Amyloid β protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*, 235(4791):880–4, 1987.
- [29] A.E. Roher, J.D. Lowenson, S. Clarke, A.S. Woods, R.J. Cotter, E. Gowing, and M.J. Ball. β -Amyloid (1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(22):10836–40, 1993.
- [30] T. Iwatsubo, A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. Nukina, and Y. Ihara. Visualization of $A\beta_{42(43)}$ and $A\beta_{40}$ in senile plaques with end-specific $A\beta$ monoclonals: evidence that an initially deposited species is $A\beta_{42(43)}$. *Neuron*, 13(1):45–53, 1994.
- [31] E.H. Corder, A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G.W. Small, A.D. Roses, J.L. Haines, and M.A. Pericak-Vance. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer’s disease in late onset families. *Science*, 261(5123):921–3, 1993.
- [32] J. Kim, J.M. Basak, and D.M. Holtzman. The role of apolipoprotein E in Alzheimer’s disease. *Neuron*, 63(3):287–303, 2009.
- [33] J.W. Ashford. *APOE* genotype effects on Alzheimer’s disease onset and epidemiology. *J Mol Neurosci*, 23(3):157–65, 2004.
- [34] E.H. Corder, A.M. Saunders, N.J. Risch, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, Jr, J.B. Rimmer, P.A. Locke, P.M. Conneally, and K.E. Schmechel. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet*, 7(2):180–4, 1994.
- [35] Q. Jiang, C.Y.D. Lee, S. Mandrekar, B. Wilkinson, P. Cramer, N. Zelcer, K. Mann, B. Lamb, T.M. Willson, J.L. Collins, J.C. Richardson, J.D. Smith, T.A. Comery, D. Riddell, D.M. Holtzman, P. Tontonoz, and G.E. Landreth. ApoE promotes the proteolytic degradation of $A\beta$. *Neuron*, 58(5):681–93, 2008.
- [36] D.M. Holtzman, K.R. Bales, T. Tenkova, A.M. Fagan, M. Parsadanian, L.J. Sartorius, B. Mackey, J. Olney, D. McKeel, D. Wozniak, and S.M. Paul. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6):2892–7, 2000.
- [37] D. Harold, R. Abraham, P. Hollingworth, R. Sims, A. Gerrish, M.L. Hamshere, J.S. Pahwa, V. Moskva, K. Dowzell, A. Williams, N. Jones, C. Thomas, A. Stretton, A.R. Morgan, S. Lovestone, J. Powell, P. Proitsi, M.K. Lupton, C. Brayne, D.C. Rubinsztein, et al. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer’s disease. *Nat Genet*, 41(10):1088–93, 2009.

- [38] J.-C. Lambert, S. Heath, G. Even, D. Campion, K. Sleegers, M. Hiltunen, O. Combarros, D. Zelenika, M.J. Bullido, B. Tavernier, L. Letenneur, K. Bettens, C. Berr, F. Pasquier, N. Fiévet, P. Barberger-Gateau, S. Engelborghs, P. De Deyn, I. Mateo, A. Franck, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 41(10):1094–9, 2009.
- [39] S. Seshadri, A.L. Fitzpatrick, M.A. Ikram, A.L. DeStefano, V. Gudnason, M. Boada, J.C. Bis, A.V. Smith, M.M. Carassquillo, J.C. Lambert, D. Harold, E.M.C. Schrijvers, R. Ramirez-Lorca, S. Debette, W.T. Longstreth, Jr, A.C.J.W. Janssens, V.S. Pankratz, J.F. Dartigues, P. Hollingworth, T. Aspelund, CHARGE Consortium, GERAD1 Consortium, and EADI1 Consortium. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*, 303(18):1832–40, 2010.
- [40] R.J. Guerreiro and J. Hardy. Alzheimer's disease genetics: lessons to improve disease modelling. *Biochem Soc Trans*, 39(4):910–6, 2011.
- [41] E. Rogaeva, Y. Meng, J.H. Lee, Y. Gu, T. Kawarai, F. Zou, T. Katayama, C.T. Baldwin, R. Cheng, H. Hasegawa, F. Chen, N. Shibata, K.L. Lunetta, R. Pardossi-Piquard, C. Bohm, Y. Wakutani, L.A. Cupples, K.T. Cuenco, R.C. Green, L. Pinessi, et al. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*, 39(2):168–77, 2007.
- [42] O.M. Andersen, J. Reiche, V. Schmidt, M. Gotthardt, R. Spoelgen, J. Behlke, C.A.F. von Arnim, T. Breiderhoff, P. Jansen, X. Wu, K.R. Bales, R. Cappai, C.L. Masters, J. Gliemann, E.J. Mufson, B.T. Hyman, S.M. Paul, A. Nykjaer, and T.E. Willnow. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(38):13461–6, 2005.
- [43] C.R. Scherzer, K. Offe, M. Gearing, H.D. Rees, G. Fang, C.J. Heilman, C. Schaller, H. Bujo, A.I. Levey, and J.J. Lah. Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 61(8):1200–5, 2004.
- [44] D. Scheuner, C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T.D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, E. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D. Selkoe, and S. Younkin. Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*, 2(8):864–70, 1996.
- [45] T. Saito, T. Suemoto, N. Brouwers, K. Sleegers, S. Funamoto, N. Mihira, Y. Matsuba, K. Yamada, P. Nilsson, J. Takano, M. Nishimura, N. Iwata, C. Van Broeckhoven, Y. Ihara, and T.C. Saido. Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A γ ₄₃. *Nat Neurosci*, 14(8):1023–32, 2011.
- [46] D.J. Selkoe. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, 81(2):741–66, 2001.
- [47] E. Karran, M. Mercken, and B. De Strooper. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 10(9):698–712, 2011.
- [48] J.A. Hardy and G.A. Higgins. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054):184–5, 1992.
- [49] N. Iwata, S. Tsubuki, Y. Takaki, K. Shirotani, B. Lu, N.P. Gerard, C. Gerard, E. Hama, H.J. Lee, and T.C. Saido. Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. *Science*, 292(5521):1550–2, 2001.
- [50] W. Farris, S. Mansourian, Y. Chang, L. Lindsley, E.A. Eckman, M.P. Frosch, C.B. Eckman, R.E. Tanzi, D.J. Selkoe, and S. Guenette. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7):4162–7, 2003.
- [51] I. Kuperstein, K. Broersen, I. Benilova, J. Rozenski, W. Jonckheere, M. Debulpaep, A. Vandersteen, I. Segers-Nolten, K. Van Der Werf, V. Subramaniam, D. Braeken, G. Callewaert, C. Bartic, R. D'Hooge, I.C. Martins, F. Rousseau, J. Schymkowitz, and B. De Strooper. Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β ₄₂ to A β ₄₀ ratio. *EMBO J*, 29(19):3408–20, 2010.
- [52] D.M. Walsh, I. Klyubin, J.V. Fadeeva, W.K. Cullen, R. Anwyl, M.S. Wolfe, M.J. Rowan, and D.J. Selkoe. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature*, 416(6880):535–9, 2002.

- [53] G.M. Shankar, S. Li, T.H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N.E. Shepardson, I. Smith, F.M. Brett, M.A. Farrell, M.J. Rowan, C.A. Lemere, C.M. Regan, D.M. Walsh, B.L. Sabatini, and D.J. Selkoe. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*, 14(8):837–42, 2008.
- [54] M. Jin, N. Shepardson, T. Yang, G. Chen, D. Walsh, and D.J. Selkoe. Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(14):5819–24, 2011.
- [55] G. Bitan, E.A. Fradinger, S.M. Spring, and D.B. Teplow. Neurotoxic protein oligomers - what you see is not always what you get. *Amyloid*, 12(2):88–95, 2005.
- [56] B. O'Nuallain, D.B. Freir, A.J. Nicoll, E. Risse, N. Ferguson, C.E. Herron, J. Collinge, and D.M. Walsh. Amyloid β -protein dimers rapidly form stable synaptotoxic protofibrils. *J Neurosci*, 30(43):14411–9, 2010.
- [57] I. Benilova, E. Karran, and B. De Strooper. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*, 15(3):349–57, 2012.
- [58] S. Campioni, B. Mannini, M. Zampagni, A. Pensalfini, C. Parrini, E. Evangelisti, A. Relini, M. Stefani, C.M. Dobson, C. Cecchi, and F. Chiti. A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. *Nat Chem Biol*, 6(2):140–7, 2010.
- [59] J. Lauren, D. A. Gimbel, H. B. Nygaard, J. W. Gilbert, and S. M. Strittmatter. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid- β oligomers. *Nature*, 457(7233):1128–32, 2009.
- [60] E.D. Roberson, K. Scarce-Levie, J.J. Palop, F. Yan, I.H. Cheng, T. Wu, H. Gerstein, G.-Q. Yu, and L. Mucke. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*, 316(5825):750–4, 2007.
- [61] L.M. Ittner, Y.D. Ke, F. Delerue, M. Bi, A. Gladbach, J. van Eersel, H. Wölfing, B.C. Chieng, M.J. Christie, I.A. Napier, A. Eckert, M. Staufenbiel, E. Hardeman, and J. Götz. Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142(3):387–97, 2010.
- [62] J. Hardy. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem*, 110(4):1129–34, 2009.
- [63] H. Zheng and E.H. Koo. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener*, 6(1):27, 2011.
- [64] I. Daigle and C. Li. *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human β -amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(24):12045–9, 1993.
- [65] D.R. Rosen, L. Martin-Morris, L.Q. Luo, and K. White. A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human β -amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(7):2478–82, 1989.
- [66] L.Q. Luo, L.E. Martin-Morris, and K. White. Identification, secretion, and neural expression of APPL, a *Drosophila* protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci*, 10(12):3849–61, 1990.
- [67] A. Musa, H. Lehrach, and V.A. Russo. Distinct expression patterns of two zebrafish homologues of the human APP gene during embryonic development. *Dev Genes Evol*, 211(11):563–7, 2001.
- [68] W. Wasco, K. Bupp, M. Magendantz, J.F. Gusella, R.E. Tanzi, and F. Solomon. Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid β protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(22):10758–62, 1992.
- [69] W. Wasco, S. Gurubhagavatula, M.D. Paradis, D.M. Romano, S.S. Sisodia, B.T. Hyman, R.L. Neve, and R.E. Tanzi. Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid β protein precursor. *Nat Genet*, 5(1):95–100, 1993.
- [70] N. Kitaguchi, Y. Takahashi, Y. Tokushima, S. Shiojiri, and H. Ito. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature*, 331(6156):530–2, 1988.

- [71] D.J. Selkoe, M.B. Podlisny, C.L. Joachim, E.A. Vickers, G. Lee, L.C. Fritz, and T. Oltersdorf. β -Amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(19):7341–5, 1988.
- [72] S.S. Sisodia, E.H. Koo, P.N. Hoffman, G. Perry, and D.L. Price. Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci*, 13(7):3136–42, 1993.
- [73] R.E. Tanzi, A.I. McClatchey, E.D. Lamperti, L. Villa-Komaroff, J.F. Gusella, and R.L. Neve. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer’s disease. *Nature*, 331(6156):528–30, 1988.
- [74] A. Nikolaev, T. McLaughlin, D.D.M. O’Leary, and M. Tessier-Lavigne. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*, 457(7232):981–9, 2009.
- [75] A. Weidemann, G. König, D. Bunke, P. Fischer, J.M. Salbaum, C.L. Masters, and K. Beyreuther. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer’s disease A4 amyloid protein. *Cell*, 57(1):115–26, 1989.
- [76] T.L. Young-Pearse, J. Bai, R. Chang, J.B. Zheng, J.J. LoTurco, and D.J. Selkoe. A critical function for β -amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci*, 27(52):14459–69, 2007.
- [77] D.H. Small, H.L. Clarris, T.G. Williamson, G. Reed, B. Key, S.S. Mok, K. Beyreuther, C.L. Masters, and V. Nurcombe. Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis*, 1(4-5):275–85, 1999.
- [78] Z. Wang, B. Wang, L. Yang, Q. Guo, N. Aithmitti, Z. Songyang, and H. Zheng. Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis. *J Neurosci*, 29(35):10788–801, 2009.
- [79] C. Reinhard, S.S. Hébert, and B. De Strooper. The amyloid- β precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J*, 24(23):3996–4006, 2005.
- [80] U. Müller, N. Cristina, Z.W. Li, D.P. Wolfer, H.P. Lipp, T. Rütlicke, S. Brandner, A. Aguzzi, and C. Weissmann. Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified β -amyloid precursor protein gene. *Cell*, 79(5):755–65, 1994.
- [81] H. Zheng, M. Jiang, M.E. Trumbauer, D.J. Sirinathsinghji, R. Hopkins, D.W. Smith, R.P. Heavens, G.R. Dawson, S. Boyce, M.W. Conner, K.A. Stevens, H.H. Slunt, S.S. Sisodia, H.Y. Chen, and L.H. Van der Ploeg. β -Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*, 81(4):525–31, 1995.
- [82] S. Heber, J. Herms, V. Gajic, J. Hainfellner, A. Aguzzi, T. Rütlicke, H. von Kretschmar, C. von Koch, S. Sisodia, P. Tremml, H.P. Lipp, D.P. Wolfer, and U. Müller. Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci*, 20(21):7951–63, 2000.
- [83] C.S. von Koch, H. Zheng, H. Chen, M. Trumbauer, G. Thinakaran, L.H. van der Ploeg, D.L. Price, and S.S. Sisodia. Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging*, 18(6):661–9, 1997.
- [84] A.L. Phinney, M.E. Calhoun, D.P. Wolfer, H.P. Lipp, H. Zheng, and M. Jucker. No hippocampal neuron or synaptic bouton loss in learning-impaired aged β -amyloid precursor protein-null mice. *Neuroscience*, 90(4):1207–16, 1999.
- [85] P. Wang, G. Yang, D.R. Mosier, P. Chang, T. Zaidi, Y.-D. Gong, N.-M. Zhao, B. Dominguez, K.-F. Lee, W.-B. Gan, and H. Zheng. Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci*, 25(5):1219–25, 2005.
- [86] J. Herms, B. Anliker, S. Heber, S. Ring, M. Fuhrmann, H. Kretschmar, S. Sisodia, and U. Müller. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J*, 23(20):4106–15, 2004.

- [87] F.S. Esch, P.S. Keim, E.C. Beattie, R.W. Blacher, A.R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure, and P.J. Ward. Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*, 248(4959):1122–4, 1990.
- [88] C. McLendon, T. Xin, C. Ziani-Cherif, M.P. Murphy, K.A. Findlay, P.A. Lewis, I. Pinnix, K. Sambamurti, R. Wang, A. Fauq, and T.E. Golde. Cell-free assays for gamma-secretase activity. *FASEB J*, 14(15):2383–6, 2000.
- [89] C. Haass, M.G. Schlossmacher, A.Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B.L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E.H. Koo, D. Schenk, and D.B. Teplow. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359(6393):322–5, 1992.
- [90] C. Haass, A.Y. Hung, M.G. Schlossmacher, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe. β -Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem*, 268(5):3021–4, 1993.
- [91] P. Seubert, T. Oltersdorf, M.G. Lee, R. Barbour, C. Blomquist, D.L. Davis, K. Bryant, L.C. Fritz, D. Galasko, and L.J. Thal. Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the β -amyloid peptide. *Nature*, 361(6409):260–3, 1993.
- [92] C. Haass, E.H. Koo, A. Mellon, A.Y. Hung, and D.J. Selkoe. Targeting of cell-surface β -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*, 357(6378):500–3, 1992.
- [93] P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, S. Sinha, M. Schlossmacher, J. Whaley, and C. Swindlehurst. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature*, 359(6393):325–7, 1992.
- [94] M. Shoji, T.E. Golde, J. Ghiso, T.T. Cheung, S. Estus, L.M. Shaffer, X.D. Cai, D.M. McKay, R. Tintner, and B. Frangione. Production of the Alzheimer amyloid β protein by normal proteolytic processing. *Science*, 258(5079):126–9, 1992.
- [95] J. Busciglio, D.H. Gabuzda, P. Matsudaira, and B.A. Yankner. Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(5):2092–6, 1993.
- [96] H. Koike, S. Tomioka, H. Sorimachi, T.C. Saido, K. Maruyama, A. Okuyama, A. Fujisawa-Sehara, S. Ohno, K. Suzuki, and S. Ishiura. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an α -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J*, 343:371–5, 1999.
- [97] S. Lammich, E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass, and F. Fahrenholz. Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7):3922–7, 1999.
- [98] J.D. Buxbaum, K.N. Liu, Y. Luo, J.L. Slack, K.L. Stocking, J.J. Peschon, R.S. Johnson, B.J. Castner, D.P. Cerretti, and R.A. Black. Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem*, 273(43):27765–7, 1998.
- [99] D.R. Edwards, M.M. Handsley, and C. J. Pennington. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*, 29(5):258–89, 2008.
- [100] S.M. Le Gall, P. Bobé, K. Reiss, K. Horiuchi, X.-D. Niu, D. Lundell, D.R. Gibb, D. Conrad, P. Saftig, and C.P. Blobel. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor α , L-selectin, and tumor necrosis factor α . *Mol Biol Cell*, 20(6):1785–94, 2009.
- [101] J. Lin, J. Luo, and C. Redies. Differential expression of five members of the ADAM family in the developing chicken brain. *Neuroscience*, 157(2):360–75, 2008.
- [102] E. Jorissen, J. Prox, C. Bernreuther, S. Weber, R. Schwanbeck, L. Serneels, A. Snellinx, K. Craessaerts, A. Thathiah, I. Tesseur, U. Bartsch, G. Weskamp, C.P. Blobel, M. Glatzel, B. De Strooper, and P. Saftig. The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci*, 30(14):4833–44, 2010.
- [103] H.-M. Zhou, G. Weskamp, V. Chesneau, U. Sahin, A. Vortkamp, K. Horiuchi, R. Chiusaroli, R. Hahn, D. Wilkes, P. Fisher, R. Baron, K. Manova, C.T. Basson, B. Hempstead, and C.P. Blobel. Essential role for ADAM19 in cardiovascular morphogenesis. *Mol Cell Biol*, 24(1):96–104, 2004.

- [104] K. Kurohara, K. Komatsu, T. Kurisaki, A. Masuda, N. Irie, M. Asano, K. Sudo, Y.-I. Nabeshima, Y. Iwakura, and A. Sehara-Fujisawa. Essential roles of Meltrin β (ADAM19) in heart development. *Dev Biol*, 267(1):14–28, 2004.
- [105] K. Glomski, S. Monette, K. Manova, B. De Strooper, P. Saftig, and C.P. Blobel. Deletion of ADAM10 in endothelial cells leads to defects in organ-specific vascular structures. *Blood*, 118(4):1163–74, 2011.
- [106] R. Postina, A. Schroeder, I. Dewachter, J. Bohl, U. Schmitt, E. Kojro, C. Prinzen, K. Endres, C. Hiemke, M. Blessing, P. Flamez, A. Dequenue, E. Godaux, F. van Leuven, and F. Fahrenholz. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*, 113(10):1456–64, 2004.
- [107] P.-H. Kuhn, H. Wang, B. Dislich, A. Colombo, U. Zeitschel, J.W. Ellwart, E. Kremmer, S. Rossner, and S.F. Lichtenthaler. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J*, 29(17):3020–32, 2010.
- [108] N. Gakhar-Koppole, P. Hundeshagen, C. Mandl, S.W. Weyer, B. Allinquant, U. Müller, and F. Ciccolini. Activity requires soluble amyloid precursor protein α to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway. *Eur J Neurosci*, 28(5):871–82, 2008.
- [109] S. Chasseigneaux and B. Allinquant. Functions of $A\beta$, sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *J Neurochem*, 120 Suppl 1:99–108, 2012.
- [110] K. Furukawa, S.W. Barger, E.M. Blalock, and M.P. Mattson. Activation of K^+ channels and suppression of neuronal activity by secreted β -amyloid-precursor protein. *Nature*, 379(6560):74–8, 1996.
- [111] E. Copanaki, S. Chang, A. Vlachos, J.-A. Tschäpe, U.C. Müller, D. Kögel, and T. Deller. sAPP α antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress. *Mol Cell Neurosci*, 44(4):386–93, 2010.
- [112] S. Ring, S.W. Weyer, S.B. Kilian, E. Waldron, C.U. Pietrzik, M.A. Filippov, J. Herms, C. Buchholz, C.B. Eckman, M. Korte, D.P. Wolfer, and U.C. Müller. The secreted β -amyloid precursor protein ectodomain APPs α is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci*, 27(29):7817–26, 2007.
- [113] S.W. Weyer, M. Klevanski, A. Delekate, V. Voikar, D. Aydin, M. Hick, M. Filippov, N. Drost, K.L. Schaller, M. Saar, M.A. Vogt, P. Gass, A. Samanta, A. Jäschke, M. Korte, D.P. Wolfer, J.H. Caldwell, and U.C. Müller. APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP. *EMBO J*, 30(11):2266–80, 2011.
- [114] H. Li, B. Wang, Z. Wang, Q. Guo, K. Tabuchi, R.E. Hammer, T.C. Südhof, and H. Zheng. Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates *transthyretin* and *Klotho* gene expression without rescuing the essential function of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(40):17362–7, 2010.
- [115] E.H. Koo and S.L. Squazzo. Evidence that production and release of amyloid β -protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*, 269(26):17386–9, 1994.
- [116] E.H. Koo, S.L. Squazzo, D.J. Selkoe, and C.H. Koo. Trafficking of cell-surface amyloid β -protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *J Cell Sci*, 109(5):991–8, 1996.
- [117] I. Hussain, D. Powell, D.R. Howlett, D.G. Tew, T.D. Meek, C. Chapman, I.S. Gloger, K.E. Murphy, C.D. Southan, D.M. Ryan, T.S. Smith, D.L. Simmons, F.S. Walsh, C. Dingwall, and G. Christie. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase. *Mol Cell Neurosci*, 14(6):419–27, 1999.
- [118] S. Sinha, 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. Suomensaaari, S. Wang, D. Walker, J. Zhao, L. McConlogue, and V. John. Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature*, 402(6761):537–40, 1999.

- [119] R. Vassar, 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. β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286(5440):735–41, 1999.
- [120] R. Yan, M.J. Bienkowski, M.E. Shuck, H. Miao, M.C. Tory, A.M. Pauley, J.R. Brashier, N.C. Stratman, W.R. Mathews, A.E. Buhl, D.B. Carter, A.G. Tomasselli, L.A. Parodi, R.L. Heinrikson, and M.E. Gurney. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature*, 402(6761):533–7, 1999.
- [121] X. Lin, G. Koelsch, S. Wu, D. Downs, A. Dashti, and J. Tang. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4):1456–60, 2000.
- [122] L. Hong, G. Koelsch, X. Lin, S. Wu, S. Terzyan, A.K. Ghosh, X.C. Zhang, and J. Tang. Structure of the protease domain of memapsin 2 (β -secretase) complexed with inhibitor. *Science*, 290(5489):150–3, 2000.
- [123] K. Liu, R.W. Doms, and V. M.-Y. Lee. Glu11 site cleavage and N-terminally truncated A β production upon BACE overexpression. *Biochemistry*, 41(9):3128–36, 2002.
- [124] R. Fluhner, G. Multhaup, A. Schlicksupp, M. Okochi, M. Takeda, S. Lammich, M. Willem, G. Westmeyer, W. Bode, J. Walter, and C. Haass. Identification of a β -secretase activity, which truncates amyloid β -peptide after its presenilin-dependent generation. *J Biol Chem*, 278(8):5531–8, 2003.
- [125] M. Farzan, C.E. Schnitzler, N. Vasilieva, D. Leung, and H. Choe. BACE2, a β -secretase homolog, cleaves at the β site and within the amyloid- β region of the amyloid- β precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(17):9712–7, 2000.
- [126] B.D. Bennett, S. Babu-Khan, R. Loeloff, J.C. Louis, E. Curran, M. Citron, and R. Vassar. Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem*, 275(27):20647–51, 2000.
- [127] H. Cai, Y. Wang, D. McCarthy, H. Wen, D.R. Borchelt, D.L. Price, and P.C. Wong. BACE1 is the major β -secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nat Neurosci*, 4(3):233–4, 2001.
- [128] S.L. Roberds, J. Anderson, G. Basi, M.J. Bienkowski, D.G. Branstetter, K.S. Chen, S.B. Freedman, N.L. Frigon, D. Games, K. Hu, K. Johnson-Wood, K.E. Kappenman, T.T. Kawabe, I. Kola, R. Kuehn, M. Lee, W. Liu, R. Motter, N.F. Nichols, M. Power, et al. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary β -secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet*, 10(12):1317–24, 2001.
- [129] Y. Luo, 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. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation. *Nat Neurosci*, 4(3):231–2, 2001.
- [130] F.M. Laird, H. Cai, A.V. Savonenko, M.H. Farah, K. He, T. Melnikova, H. Wen, H.-C. Chiang, G. Xu, V.E. Koliatsos, D.R. Borchelt, D.L. Price, H.-K. Lee, and P.C. Wong. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid- β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci*, 25(50):11693–709, 2005.
- [131] M. Ohno, E.A. Sametsky, L.H. Younkin, H. Oakley, S.G. Younkin, M. Citron, R. Vassar, and J.F. Disterhoft. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*, 41(1):27–33, 2004.
- [132] M. Arbel-Ornath, M. Becker, P. Rabinovich-Toidman, M. Gartner, and B. Solomon. Immunomodulation of A β PP processing alleviates amyloid- β -related pathology in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Alzheimers Dis*, 22(2):469–82, 2010.
- [133] M. Willem, S. Lammich, and C. Haass. Function, regulation and therapeutic properties of β -secretase (BACE1). *Semin Cell Dev Biol*, 20(2):175–82, 2009.
- [134] S.M. Harrison, A.J. Harper, J. Hawkins, G. Duddy, E. Grau, P.L. Pugh, P.H. Winter, C.S. Shilliam, Z.A. Hughes, L.A. Dawson, M.I. Gonzalez, N. Upton, M.N. Pangalos, and C. Dingwall. BACE1 (β -secretase) transgenic and knockout mice: identification of neurochemical deficits and behavioral changes. *Mol Cell Neurosci*, 24(3):646–55, 2003.

- [135] D. Kobayashi, M. Zeller, T. Cole, M. Buttini, L. McConlogue, S. Sinha, S. Freedman, R.G.M. Morris, and K.S. Chen. BACE1 gene deletion: impact on behavioral function in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 29(6):861–73, 2008.
- [136] M. Willem, A.N. Garratt, B. Novak, M. Citron, S. Kaufmann, A. Rittger, B. De Strooper, P. Saftig, C. Birchmeier, and C. Haass. Control of peripheral nerve myelination by the β -secretase BACE1. *Science*, 314(5799):664–6, 2006.
- [137] X. Hu, C.W. Hicks, W. He, P. Wong, W.B. Macklin, B.D. Trapp, and R. Yan. BACE1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci*, 9(12):1520–5, 2006.
- [138] A.K. Ghosh, M. Brindisi, and J. Tang. Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 120(S1):71–83, 2012.
- [139] C.J. Taylor, D.R. Ireland, I. Ballagh, K. Bourne, N.M. Marechal, P.R. Turner, D.K. Bilkey, W.P. Tate, and W.C. Abraham. Endogenous secreted amyloid precursor protein- α regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol Dis*, 31(2):250–60, 2008.
- [140] S. Chasseigneaux, L. Dinc, C. Rose, C. Chabret, F. Couplier, P. Topilko, G. Mauger, and B. Alinquant. Secreted amyloid precursor protein β and secreted amyloid precursor protein β induce axon outgrowth *in vitro* through Egr1 signaling pathway. *PLoS One*, 6(1):e16301, 2011.
- [141] T. Jefferson, U. Čaušević, M. and auf dem Keller, O. Schilling, S. Isbert, R. Geyer, W. Maier, S. Tschickardt, T. Jumpertz, S. Weggen, J.S. Bond, C.M. Overall, C.U. Pietrzik, and C. Becker-Pauly. Metalloprotease meprin β generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments *in vivo*. *J Biol Chem*, 286(31):27741–50, 2011.
- [142] L.J. Vella and R. Cappai. Identification of a novel amyloid precursor protein processing pathway that generates secreted N-terminal fragments. *FASEB J*, 26(7):2930–40, 2012. in press.
- [143] Q. Guo, H. Li, S.S.K. Gaddam, N.J. Justice, C.S. Robertson, and H. Zheng. Amyloid precursor protein revisited: NEURON-SPECIFIC EXPRESSION AND HIGHLY STABLE NATURE OF SOLUBLE DERIVATIVES. *J Biol Chem*, 287(4):2437–45, 2012.
- [144] G. Struhl and A. Adachi. Requirements for presenilin-dependent cleavage of Notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell*, 6(3):625–36, 2000.
- [145] W.P. Esler, W.T. Kimberly, B.L. Ostaszewski, W. Ye, T.S. Diehl, D.J. Selkoe, and M.S. Wolfe. Activity-dependent isolation of the presenilin- γ -secretase complex reveals Nicastrin and a γ substrate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(5):2720–5, 2002.
- [146] L. Martin, R. Fluhrer, and C. Haass. Substrate requirements for SPPL2b-dependent regulated intramembrane proteolysis. *J Biol Chem*, 284(9):5662–70, 2009.
- [147] M. Sastre, H. Steiner, K. Fuchs, A. Capell, G. Multhaup, M.M. Condron, D.B. Teplow, and C. Haass. Presenilin-dependent γ -secretase processing of β -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep*, 2(9):835–41, 2001.
- [148] Y. Gu, H. Misonou, T. Sato, N. Dohmae, K. Takio, and Y. Ihara. Distinct intramembrane cleavage of the β -amyloid precursor protein family resembling γ -secretase-like cleavage of Notch. *J Biol Chem*, 276(38):35235–8, 2001.
- [149] C. Yu, S.H. Kim, T. Ikeuchi, H. Xu, L. Gasparini, R. Wang, and S.S. Sisodia. Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment γ . EVIDENCE FOR DISTINCT MECHANISMS INVOLVED IN γ -SECRETASE PROCESSING OF THE APP AND NOTCH1 TRANSMEMBRANE DOMAINS. *J Biol Chem*, 276(47):43756–60, 2001.
- [150] A. Weidemann, S. Eggert, F.B.M. Reinhard, M. Vogel, K. Paliga, G. Baier, C.L. Masters, K. Beyreuther, and G. Evin. A novel ϵ -cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry*, 41(8):2825–35, 2002.
- [151] T. Müller, H.E. Meyer, R. Egensperger, and K. Marcus. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics - relevance for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 85(4):393–406, 2008.

- [152] A. Lai, S.S. Sisodia, and I.S. Trowbridge. Characterization of sorting signals in the β -amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, 270(8):3565–73, 1995.
- [153] R.G. Perez, S. Soriano, J.D. Hayes, B. Ostaszewski, W. Xia, D.J. Selkoe, X. Chen, G.B. Stokin, and E.H. Koo. Mutagenesis identifies new signals for β -amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including $A\beta_{42}$. *J Biol Chem*, 274(27):18851–6, 1999.
- [154] X. Cao and T.C. Südhof. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, 293(5527):115–20, 2001.
- [155] S.S. Hébert, L. Serneels, A. Tolia, K. Craessaerts, C. Derks, M.A. Filippov, U. Müller, and B. De Strooper. Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO Reports*, 7(7):739–45, 2006.
- [156] E. Waldron, S. Isbert, A. Kern, S. Jaeger, A.M. Martin, S.S. Hébert, C. Behl, S. Weggen, B. De Strooper, and C.U. Pietrzik. Increased AICD generation does not result in increased nuclear translocation or activation of target gene transcription. *Exp Cell Res*, 314(13):2419–33, 2008.
- [157] D. Edbauer, M. Willem, S. Lammich, H. Steiner, and C. Haass. Insulin-degrading enzyme rapidly removes the β -amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J Biol Chem*, 277(16):13389–93, 2002.
- [158] G. Zhao, G. Mao, J. Tan, Y. Dong, M.-Z. Cui, S.-H. Kim, and X. Xu. Identification of a new presenilin-dependent ζ -cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 279(49):50647–50, 2004.
- [159] G. Zhao, M.-Z. Cui, G. Mao, Y. Dong, J. Tan, L. Sun, and X. Xu. γ -Cleavage is dependent on ζ -cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain. *J Biol Chem*, 280(45):37689–97, 2005.
- [160] Y. Qi-Takahara, M. Morishima-Kawashima, Y. Tanimura, G. Dolios, N. Hirotsu, Y. Horikoshi, F. Kametani, M. Maeda, T.C. Saido, R. Wang, and Y. Ihara. Longer forms of amyloid β protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by γ -secretase. *J Neurosci*, 25(2):436–45, 2005.
- [161] S. Funamoto, M. Morishima-Kawashima, Y. Tanimura, N. Hirotsu, T.C. Saido, and Y. Ihara. Truncated carboxyl-terminal fragments of β -amyloid precursor protein are processed to amyloid β -proteins 40 and 42. *Biochemistry*, 43(42):13532–40, 2004.
- [162] G. Zhao, J. Tan, G. Mao, M.-Z. Cui, and X. Xu. The same γ -secretase accounts for the multiple intramembrane cleavages of APP. *J Neurochem*, 100(5):1234–46, 2007.
- [163] M. Takami, Y. Nagashima, Y. Sano, S. Ishihara, M. Morishima-Kawashima, S. Funamoto, and Y. Ihara. γ -Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of β -carboxyl terminal fragment. *J Neurosci*, 29(41):13042–52, 2009.
- [164] T. Sato, N. Dohmae, Y. Qi, N. Kakuda, H. Misonou, R. Mitsumori, H. Maruyama, E.H. Koo, C. Haass, K. Takio, M. Morishima-Kawashima, S. Ishiura, and Y. Ihara. Potential link between amyloid β -protein 42 and C-terminal fragment γ 49-99 of β -amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 278(27):24294–301, 2003.
- [165] R.M. Page, K. Baumann, M. Tomioka, B.I. Perez-Revuelta, A. Fukumori, H. Jacobsen, A. Flohr, T. Luebbbers, L. Ozmen, H. Steiner, et al. Generation of $A\beta_{38}$ and $A\beta_{42}$ is independently and differentially affected by familial Alzheimer disease-associated presenilin mutations and γ -secretase modulation. *J Biol Chem*, 283(2):677–83, 2008.
- [166] E. Czirr, S. Leuchtenberger, C. Dorner-Ciossek, A. Schneider, M. Jucker, E.H. Koo, C.U. Pietrzik, K. Baumann, and S. Weggen. Insensitivity to $A\beta_{42}$ -lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs and γ -secretase inhibitors is common among aggressive presenilin-1 mutations. *J Biol Chem*, 282(34):24504–13, 2007.
- [167] E. Czirr, B.A. Cottrell, S. Leuchtenberger, T. Kukar, T.B. Ladd, H. Esselmann, S. Paul, R. Schubel, J.W. Torpey, C.U. Pietrzik, T.E. Golde, J. Wiltfang, K. Baumann, E.H. Koo, and S. Weggen. Independent generation of $A\beta_{42}$ and $A\beta_{38}$ peptide species by γ -secretase. *J Biol Chem*, 283(25):17049–54, 2008.

- [168] S.J. Lee, U. Liyanage, P.E. Bickel, W. Xia, P.T. Lansbury, Jr, and K.S. Kosik. A detergent-insoluble membrane compartment contains A β *in vivo*. *Nat Med*, 4(6):730–4, 1998.
- [169] R. Ehehalt, P. Keller, C. Haass, C. Thiele, and K. Simons. Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*, 160(1):113–23, 2003.
- [170] M. Simons, P. Keller, B. De Strooper, K. Beyreuther, C.G. Dotti, and K. Simons. Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11):6460–4, 1998.
- [171] C. Guardia-Laguarta, M. Coma, M. Pera, J. Clarimón, L. Sereno, J.M. Agulló, L. Molina-Porcel, E. Gallardo, A. Deng, O. Berezovska, B.T. Hyman, R. Blesa, T. Gómez-Isla, and A. Lleó. Mild cholesterol depletion reduces amyloid- β production by impairing APP trafficking to the cell surface. *J Neurochem*, 110(1):220–30, 2009.
- [172] P. Osenkowski, W. Ye, R. Wang, M.S. Wolfe, and D.J. Selkoe. Direct and potent regulation of γ -secretase by its lipid microenvironment. *J Biol Chem*, 283(33):22529–40, 2008.
- [173] E. Winkler, F. Kamp, J. Scheuring, A. Ebke, A. Fukumori, and H. Steiner. Generation of Alzheimer disease-associated A $\beta_{42/43}$ by γ -secretase can directly be inhibited by modulation of membrane thickness. *J Biol Chem*, 285(25):21326–34, 2012.
- [174] O. Holmes, S. Paturi, W. Ye, M.S. Wolfe, and D.J. Selkoe. The effects of membrane lipids on the activity and processivity of purified γ -secretase. *Biochemistry*, 51(17):3565–75, 2012.
- [175] L.M. Munter, P. Voigt, A. Harmeier, D. Kaden, K.E. Gottschalk, C. Weise, R. Pipkorn, M. Schaefer, D. Langosch, and G. Multhaup. GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of A β_{42} . *EMBO J*, 26(6):1702–12, 2007.
- [176] M.J. Sternberg and W.J. Gullick. A sequence motif in the transmembrane region of growth factor receptors with tyrosine kinase activity mediates dimerization. *Protein Eng*, 3(4):245–8, 1990.
- [177] A. Senes, M. Gerstein, and D.M. Engelman. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with β -branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol*, 296(3):921–36, 2000.
- [178] W.P. Russ and D.M. Engelman. The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol*, 296(3):911–9, 2000.
- [179] A.J. Beel and C.R. Sanders. Substrate specificity of γ -secretase and other intramembrane proteases. *Cell Mol Life Sci*, 65(9):1311–34, 2008.
- [180] C. Haass, C. Kaether, G.I. Thinakaran, and S. Sisodia. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(5):a006270, 2012.
- [181] C. Haass, C.A. Lemere, A. Capell, M. Citron, P. Seubert, D. Schenk, L. Lannfelt, and D.J. Selkoe. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer’s disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med*, 1(12):1291–6, 1995.
- [182] G. Thinakaran, D.B. Teplow, R. Siman, B. Greenberg, and S.S. Sisodia. Metabolism of the “Swedish” amyloid precursor protein variant in neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the “ β -secretase” site occurs in the golgi apparatus. *J Biol Chem*, 271(16):9390–7, 1996.
- [183] R.G. Perez, S.L. Squazzo, and E.H. Koo. Enhanced release of amyloid β -protein from codon 670/671 Swedish mutant beta-amyloid precursor protein occurs in both secretory and endocytic pathways. *J Biol Chem*, 271(15):9100–7, 1996.
- [184] P. Cupers, M. Bentahir, K. Craessaerts, I. Orlans, H. Vanderstichele, P. Saftig, B. De Strooper, and W. Annaert. The discrepancy between presenilin subcellular localization and γ -secretase processing of amyloid precursor protein. *J Cell Biol*, 154(4):731–40, 2001.
- [185] S. Jäger, S. Leuchtenberger, A. Martin, E. Czirr, J. Wesselowski, M. Dieckmann, E. Waldron, C. Korth, E.H. Koo, M. Heneka, S. Weggen, and C.U. Pietrzik. α -Secretase mediated conversion of the amyloid precursor protein derived membrane stub C99 to C83 limits A β generation. *J Neurochem*, 111(6):1369–82, 2009.
- [186] H. Steiner, R. Fluhner, and C. Haass. Intramembrane proteolysis by γ -secretase. *J Biol Chem*, 283(44):29627–33, 2008.

- [187] C. Haass and D.J. Selkoe. Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide. *Cell*, 75(6):1039–42, 1993.
- [188] T. Sato, T.S. Diehl, S. Narayanan, S. Funamoto, Y. Ihara, B. De Strooper, H. Steiner, C. Haass, and M.S. Wolfe. Active γ -secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem*, 282(47):33985–93, 2007.
- [189] D. Edbauer, E. Winkler, J.T. Regula, B. Pesold, H. Steiner, and C. Haass. Reconstitution of γ -secretase activity. *Nat Cell Biol*, 5(5):486–8, 2003.
- [190] N. Takasugi, T. Tomita, I. Hayashi, M. Tsuruoka, M. Niimura, Y. Takahashi, G. Thinakaran, and T. Iwatsubo. The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex. *Nature*, 422(6930):438–41, 2003.
- [191] S.-H. Kim, T. Ikeuchi, C. Yu, and S.S. Sisodia. Regulated hyperaccumulation of presenilin-1 and the “ γ -secretase” complex. EVIDENCE FOR DIFFERENTIAL INTRAMEMBRANOUS PROCESSING OF TRANSMEMBRANE SUBSTRATES. *J Biol Chem*, 278(36):33992–4002, 2003.
- [192] W.T. Kimberly, M.J. LaVoie, B.L. Ostaszewski, W. Ye, M.S. Wolfe, and D.J. Selkoe. γ -Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(11):6382–7, 2003.
- [193] M.R. Farmery, L.O. Tjernberg, S.E. Pursglove, A. Bergman, B. Winblad, and J. Näslund. Partial purification and characterization of γ -secretase from post-mortem human brain. *J Biol Chem*, 278(27):24277–84, 2003.
- [194] O. Nyabi, M. Bentahir, K. Horré, A. Herreman, N. Gottardi-Littell, C. Van Broeckhoven, P. Merchiers, K. Spittaels, W. Annaert, and B. De Strooper. Presenilins mutated at Asp-257 or Asp-385 restore Pen-2 expression and Nicastrin glycosylation but remain catalytically inactive in the absence of wild type Presenilin. *J Biol Chem*, 278(44):43430–6, 2003.
- [195] E. Winkler, S. Hobson, A. Fukumori, B. Dümpelfeld, T. Luebbbers, K. Baumann, C. Haass, C. Hopf, and H. Steiner. Purification, pharmacological modulation, and biochemical characterization of interactors of endogenous human γ -secretase. *Biochemistry*, 48(6):1183–97, 2009.
- [196] P. Osenkowski, H. Li, W. Ye, D. Li, L. Aeschbach, P.C. Fraering, M.S. Wolfe, D.J. Selkoe, and H. Li. Cryoelectron microscopy structure of purified γ -secretase at 12 Å resolution. *J Mol Biol*, 385(2):642–52, 2009.
- [197] V.K. Lazarov, P.C. Fraering, W. Ye, M.S. Wolfe, D.J. Selkoe, and H. Li. Electron microscopic structure of purified, active γ -secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(18):6889–94, 2006.
- [198] F. Renzi, X. Zhang, W.J. Rice, C. Torres-Arancivia, Y. Gomez-Llorente, R. Diaz, K. Ahn, C. Yu, Y.-M. Li, S.S. Sisodia, and I. Ubarretxena-Belandia. Structure of γ -secretase and its trimeric pre-activation intermediate by single-particle electron microscopy. *J Biol Chem*, 286(24):21440–9, 2011.
- [199] H. Steiner, E. Winkler, and C. Haass. Chemical crosslinking provides a model of the γ -secretase complex subunit architecture and evidence for close proximity of the C-terminal fragment of presenilin with APH-1. *J Biol Chem*, 283(50):34677–86, 2008.
- [200] Alzheimer’s Disease Collaborative Group. The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nat Genet*, 11(2):219–22, 1995.
- [201] R. Sherrington, E.I. Rogaeve, Y. Liang, E.A. Rogaeve, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, J.F. Foncin, A.C. Bruni, M.P. Montesi, S. Sorbi, I. Rainero, L. Pinessi, L. Nee, I. Chumakov, D. Pollen, A. Brookes, P. Sanseau, R.J. Polinsky, W. Wasco, H.A. Da Silva, J.L. Haines, M.A. Pericak-Vance, R.E. Tanzi, A.D. Roses, P.E. Fraser, J.M. Rommens, and P.H. St George-Hyslop. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer’s disease. *Nature*, 375(6534):754–60, 1995.
- [202] E. Levy-Lahad, W. Wasco, P. Poorkaj, D.M. Romano, J. Oshima, W.H. Pettingell, C.E. Yu, P.D. Jondro, S.D. Schmidt, and K. Wang. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer’s disease locus. *Science*, 269(5226):973–7, 1995.

- [203] E.I. Rogaev, R. Sherrington, E.A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, and T. Tsuda. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, 376(6543):775–8, 1995.
- [204] G. Yu, F. Chen, G. Levesque, M. Nishimura, D.M. Zhang, L. Levesque, E. Rogaeva, D. Xu, Y. Liang, M. Duthie, P.H. St George-Hyslop, and P.E. Fraser. The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains β -catenin. *J Biol Chem*, 273(26):16470–5, 1998.
- [205] H. Steiner, E. Winkler, D. Edbauer, S. Prokop, G. Basset, A. Yamasaki, M. Kostka, and C. Haass. PEN-2 is an integral component of the γ -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem*, 277(42):39062–5, 2002.
- [206] K. Shirovani, D. Edbauer, S. Prokop, C. Haass, and H. Steiner. Identification of distinct γ -secretase complexes with different APH-1 variants. *J Biol Chem*, 279(40):41340–5, 2004.
- [207] D.R. Borchelt, G. Thinakaran, C.B. Eckman, M.K. Lee, F. Davenport, T. Ratovitsky, C.M. Prada, G. Kim, S. Seekins, D. Yager, H.H. Slunt, R. Wang, M. Seeger, A.I. Levey, S.E. Gandy, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, D.L. Price, S.G. Younkin, and S.S. Sisodia. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio *in vitro* and *in vivo*. *Neuron*, 17(5):1005–13, 1996.
- [208] K. Duff, C. Eckman, C. Zehr, X. Yu, C.M. Prada, J. Perez-tur, M. Hutton, L. Buee, Y. Harigaya, D. Yager, D. Morgan, M.N. Gordon, L. Holcomb, L. Refolo, B. Zenk, J. Hardy, and S. Younkin. Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, 383(6602):710–3, 1996.
- [209] M. Citron, D. Westaway, W. Xia, G. Carlson, T. Diehl, G. Levesque, K. Johnson-Wood, M. Lee, P. Seubert, A. Davis, D. Kholodenko, R. Motter, R. Sherrington, B. Perry, H. Yao, R. Strome, I. Lieberburg, J. Rommens, S. Kim, D. Schenk, P. Fraser, P. St George Hyslop, and D.J. Selkoe. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid β -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med*, 3(1):67–72, 1997.
- [210] D. Levitan and I. Greenwald. Facilitation of *lin-12*-mediated signalling by *sel-12*, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature*, 377(6547):351–4, 1995.
- [211] P.C. Wong, H. Zheng, H. Chen, M.W. Becher, D.J. Sirinathsinghji, M.E. Trumbauer, H.Y. Chen, D.L. Price, L.H. Van der Ploeg, and S.S. Sisodia. Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature*, 387(6630):288–92, 1997.
- [212] B. De Strooper, P. Saftig, K. Craessaerts, H. Vanderstichele, G. Guhde, W. Annaert, K. Von Figura, and F. Van Leuven. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, 391(6665):387–90, 1998.
- [213] S. Naruse, G. Thinakaran, J.J. Luo, J.W. Kusiak, T. Tomita, T. Iwatsubo, X. Qian, D.D. Ginty, D.L. Price, D.R. Borchelt, P.C. Wong, and S.S. Sisodia. Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron*, 21(5):1213–21, 1998.
- [214] Z. Zhang, P. Nadeau, W. Song, D. Donoviel, M. Yuan, A. Bernstein, and B.A. Yankner. Presenilins are required for γ -secretase cleavage of β -APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat Cell Biol*, 2(7):463–5, 2000.
- [215] A. Herreman, D. Hartmann, W. Annaert, P. Saftig, K. Craessaerts, L. Serneels, L. Umans, V. Schrijvers, F. Checler, H. Vanderstichele, V. Baekelandt, R. Dressel, P. Cupers, D. Huylebroeck, A. Zwijsen, F. Van Leuven, and B. De Strooper. Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(21):11872–7, 1999.
- [216] H. Steiner, K. Duff, A. Capell, H. Romig, M.G. Grim, S. Lincoln, J. Hardy, X. Yu, M. Picciano, K. Fichteler, M. Citron, R. Kopan, B. Pesold, S. Keck, M. Baader, T. Tomita, T. Iwatsubo, R. Baumeister, and C. Haass. A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid β -peptide production and notch signaling. *J Biol Chem*, 274(40):28669–73, 1999.

- [217] M.S. Wolfe, W. Xia, C.L. Moore, D.D. Leatherwood, B. Ostaszewski, T. Rahmati, I.O. Donkor, and D.J. Selkoe. Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's γ -secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry*, 38(15):4720–7, 1999.
- [218] M.S. Shearman, D. Beher, E.E. Clarke, H.D. Lewis, T. Harrison, P. Hunt, A. Nadin, A.L. Smith, G. Stevenson, and J.L. Castro. L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid β -protein precursor γ -secretase activity. *Biochemistry*, 39(30):8698–704, 2000.
- [219] M.S. Wolfe, W. Xia, B.L. Ostaszewski, T.S. Diehl, W.T. Kimberly, and D.J. Selkoe. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature*, 398(6727):513–7, 1999.
- [220] W.T. Kimberly, W. Xia, T. Rahmati, M.S. Wolfe, and D.J. Selkoe. The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for γ -secretase activity and amyloid β -protein generation. *J Biol Chem*, 275(5):3173–8, 2000.
- [221] Y.M. Li, M. Xu, M.T. Lai, Q. Huang, J.L. Castro, J. DiMuzio-Mower, T. Harrison, C. Lellis, A. Nadin, J.G. Neduveilil, et al. Photoactivated γ -secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature*, 405(6787):689–94, 2000.
- [222] W.P. Esler, W.T. Kimberly, B.L. Ostaszewski, T.S. Diehl, C.L. Moore, J.Y. Tsai, T. Rahmati, W. Xia, D.J. Selkoe, and M.S. Wolfe. Transition-state analogue inhibitors of γ -secretase bind directly to presenilin-1. *Nat Cell Biol*, 2(7):428–34, 2000.
- [223] D. Seiffert, J.D. Bradley, C.M. Rominger, D.H. Rominger, F. Yang, J.E. Meredith Jr, Q. Wang, A.H. Roach, L.A. Thompson, S.M. Spitz, 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. Presenilin-1 and -2 are molecular targets for γ -secretase inhibitors. *J Biol Chem*, 275(44):34086–91, 2000.
- [224] C. Kaether, A. Capell, D. Edbauer, E. Winkler, B. Novak, H. Steiner, and C. Haass. The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and γ -secretase activity. *EMBO J*, 23(24):4738–48, 2004.
- [225] H. Laudon, E.M. Hansson, K. Melén, A. Bergman, M.R. Farmery, B. Winblad, U. Lendahl, G. von Heijne, and J. Näslund. A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem*, 280(42):35352–60, 2005.
- [226] A. Henricson, L. Käll, and E.L.L. Sonnhammer. A novel transmembrane topology of presenilin based on reconciling experimental and computational evidence. *FEBS J*, 272(11):2727–33, 2005.
- [227] Y.S. Oh and R.J. Turner. Topology of the C-terminal fragment of human presenilin 1. *Biochemistry*, 44(35):11821–8, 2005.
- [228] Y.S. Oh and R.J. Turner. Evidence that the COOH terminus of human presenilin 1 is located in extracytoplasmic space. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289(3):C576–81, 2005.
- [229] D. Spasic, A. Tolia, K. Dillen, V. Baert, B. De Strooper, S. Vrijens, and W. Annaert. Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway. *J Biol Chem*, 281(36):26569–77, 2006.
- [230] H. Steiner, M. Kostka, H. Romig, G. Basset, B. Pesold, J. Hardy, A. Capell, L. Meyn, M.L. Grim, R. Baumeister, et al. Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat Cell Biol*, 2(11):848–51, 2000.
- [231] C.F. LaPointe and R.K. Taylor. The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. *J Biol Chem*, 275(2):1502–10, 2000.
- [232] S.L. Bardy and K.F. Jarrell. Cleavage of preflagellins by an aspartic acid signal peptidase is essential for flagellation in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Mol Microbiol*, 50(4):1339–47, 2003.
- [233] B.I. Pérez-Revuelta, A. Fukumori, S. Lammich, A. Yamasaki, C. Haass, and H. Steiner. Requirement for small side chain residues within the GxGD-motif of presenilin for γ -secretase substrate cleavage. *J Neurochem*, 112(4):940–50, 2010.

- [234] M. Cruts, H. Backhovens, S.Y. Wang, G. Van Gassen, J. Theuns, C.D. De Jonghe, A. Wehnert, J. De Voecht, G. De Winter, and P. Cras. Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum Mol Genet*, 4(12):2363–71, 1995.
- [235] A. Yamasaki, S. Eimer, M. Okochi, A. Smialowska, C. Kaether, R. Baumeister, C. Haass, and H. Steiner. The GxGD motif of presenilin contributes to catalytic function and substrate identification of γ -secretase. *J Neurosci*, 26(14):3821–8, 2006.
- [236] Y.K. Moliaka, A. Grigorenko, D. Madera, and E.I. Rogaev. Impas 1 possesses endoproteolytic activity against multipass membrane protein substrate cleaving the presenilin 1 holoprotein. *FEBS Lett*, 557(1-3):185–92, 2004.
- [237] J. Wang, A.L. Brunkan, S. Hecimovic, E. Walker, and A. Goate. Conserved “PAL” sequence in presenilins is essential for γ -secretase activity, but not required for formation or stabilization of γ -secretase complexes. *Neurobiol Dis*, 15(3):654–66, 2004.
- [238] C. Sato, S. Takagi, T. Tomita, and T. Iwatsubo. The C-terminal PAL motif and transmembrane domain 9 of presenilin 1 are involved in the formation of the catalytic pore of the γ -secretase. *J Neurosci*, 28(24):6264–71, 2008.
- [239] J. Wang, D. Beher, A.C. Nyborg, M.S. Shearman, T.E. Golde, and A. Goate. C-terminal PAL motif of presenilin and presenilin homologues required for normal active site conformation. *J Neurochem*, 96(1):218–27, 2006.
- [240] A. Tolia, K. Horré, and B. De Strooper. Transmembrane domain 9 of presenilin determines the dynamic conformation of the catalytic site of γ -secretase. *J Biol Chem*, 283(28):19793–803, 2008.
- [241] G. Thinakaran, 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. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives *in vivo*. *Neuron*, 17(1):181–90, 1996.
- [242] H. Steiner, H. Romig, B. Pesold, U. Philipp, M. Baader, M. Citron, H. Loetscher, H. Jacobsen, and C. Haass. Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis. *Biochemistry*, 38(44):14600–5, 1999.
- [243] W.A. Campbell, M.-K. Iskandar, M.L.O. Reed, and W. Xia. Endoproteolysis of presenilin *in vitro*: inhibition by γ -secretase inhibitors. *Biochemistry*, 41(10):3372–9, 2002.
- [244] D. Beher, J.D. Wrigley, A. Nadin, G. Evin, C.L. Masters, T. Harrison, J.L. Castro, and M.S. Shearman. Pharmacological knock-down of the presenilin 1 heterodimer by a novel γ -secretase inhibitor: IMPLICATIONS FOR PRESENILIN BIOLOGY. *J Biol Chem*, 276(48):45394–402, 2001.
- [245] A. Fukumori, R. Fluhner, H. Steiner, and C. Haass. Three-amino acid spacing of presenilin endoproteolysis suggests a general stepwise cleavage of γ -secretase-mediated intramembrane proteolysis. *J Neurosci*, 30(23):7853–62, 2010.
- [246] A. Capell, J. Grünberg, B. Pesold, A. Diehlmann, M. Citron, R. Nixon, K. Beyreuther, D.J. Selkoe, and C. Haass. The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. *J Biol Chem*, 273(6):3205–11, 1998.
- [247] G. Thinakaran, J.B. Regard, C.M. Bouton, C.L. Harris, D.L. Price, D.R. Borchelt, and S.S. Sisodia. Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP. *Neurobiol Dis*, 4(6):438–53, 1998.
- [248] C.A. Saura, T. Tomita, F. Davenport, C.L. Harris, T. Iwatsubo, and G. Thinakaran. Evidence that intramolecular associations between presenilin domains are obligatory for endoproteolytic processing. *J Biol Chem*, 274(20):13818–23, 1999.
- [249] T. Ratovitski, H.H. Slunt, G. Thinakaran, D.L. Price, S.S. Sisodia, and D.R. Borchelt. Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin. *J Biol Chem*, 272(39):24536–41, 1997.
- [250] H. Steiner, A. Capell, B. Pesold, M. Citron, P.M. Kloetzel, D.J. Selkoe, H. Romig, K. Mendla, and C. Haass. Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. *J Biol Chem*, 273(48):32322–31, 1998.

- [251] K. Ahn, C.C. Shelton, Y. Tian, X. Zhang, M.L. Gilchrist, S.S. Sisodia, and Y.-M. Li. Activation and intrinsic γ -secretase activity of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(50):21435–40, 2010.
- [252] C. Sato, Y. Morohashi, T. Tomita, and T. Iwatsubo. Structure of the catalytic pore of γ -secretase probed by the accessibility of substituted cysteines. *J Neurosci*, 26(46):12081–8, 2006.
- [253] A. Tolia, L. Chavez-Gutierrez, and B. De Strooper. Contribution of presenilin transmembrane domains 6 and 7 to a water-containing cavity in the γ -secretase complex. *J Biol Chem*, 281(37):27633–42, 2006.
- [254] S. Takagi, A. Tominaga, C. Sato, T. Tomita, and T. Iwatsubo. Participation of transmembrane domain 1 of presenilin 1 in the catalytic pore structure of the γ -secretase. *J Neurosci*, 30(47):15943–50, 2010.
- [255] S.L. Bardy and K.F. Jarrell. FlaK of the archaeon *Methanococcus maripaludis* possesses preflagellin peptidase activity. *FEMS Microbiol Lett*, 208(1):53–9, 2002.
- [256] J. Hu, Y. Xue, S. Lee, and Y. Ha. The crystal structure of GXGD membrane protease FlaK. *Nature*, 475(7357):528–31, 2011.
- [257] S. Sobhanifar, B. Schneider, F. Löhner, D. Gottstein, T. Ikeya, K. Mlynarczyk, W. Pulawski, U. Ghoshdastider, M. Kolinski, S. Filipek, P. Güntert, F. Bernhard, and V. Dötsch. Structural investigation of the C-terminal catalytic fragment of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(21):9644–9, 2010.
- [258] M.R. Hass, C. Sato, R. Kopan, and G. Zhao. Presenilin: RIP and beyond. *Semin Cell Dev Biol*, 20(2):201–10, 2009.
- [259] M. Nishimura, G. Yu, G. Levesque, D.M. Zhang, L. Ruel, F. Chen, P. Milman, E. Holmes, Y. Liang, T. Kawarai, E. Jo, A. Supala, E. Rogaeva, D.M. Xu, C. Janus, L. Levesque, Q. Bi, M. Duthie, R. Rozmahel, K. Mattila, L. Lannfelt, D. Westaway, H.T. Mount, J. Woodgett, and P. St George-Hyslop. Presenilin mutations associated with Alzheimer disease cause defective intracellular trafficking of β -catenin, a component of the presenilin protein complex. *Nat Med*, 5(2):164–9, 1999.
- [260] E. Noll, M. Medina, D. Hartley, J. Zhou, N. Perrimon, and K.S. Kosik. Presenilin affects arm/ β -catenin localization and function in *Drosophila*. *Dev Biol*, 227(2):450–64, 2000.
- [261] H. Tu, O. Nelson, A. Bezprozvanny, Z. Wang, S.-F. Lee, Y.-H. Hao, L. Serneels, B. De Strooper, G. Yu, and I. Bezprozvanny. Presenilins form ER Ca^{2+} leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer’s disease-linked mutations. *Cell*, 126(5):981–93, 2006.
- [262] D. Shilling, D.-O.D. Mak, D.E. Kang, and J.K. Foskett. Lack of evidence for presenilins as endoplasmic reticulum Ca^{2+} leak channels. *J Biol Chem*, 287(14):10933–44, 2012. in press.
- [263] J.-H. Lee, W.H. Yu, A. Kumar, S. Lee, P. Mohan, C.M. Peterhoff, D.M. Wolfe, M. Martinez-Vicente, A.C. Massey, G. Sovak, Y. Uchiyama, D. Westaway, A.M. Cuervo, and R.A. Nixon. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, 141(7):1146–58, 2010.
- [264] K.M. Neely, K.N. Green, and F.M. LaFerla. Presenilin is necessary for efficient proteolysis through the autophagy-lysosome system in a γ -secretase-independent manner. *J Neurosci*, 31(8):2781–91, 2011.
- [265] G. Yu, 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. Rogaeva, M. Smith, C. Janus, Y. Zhang, R. Aebbersold, L.S. Farrer, S. Sorbi, A. Bruni, P. Fraser, and P. St George-Hyslop. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. *Nature*, 407(6800):48–54, 2000.
- [266] C. Goutte, W. Hepler, K.M. Mickey, and J.R. Priess. *aph-2* encodes a novel extracellular protein required for GLP-1-mediated signaling. *Development*, 127(11):2481–92, 2000.
- [267] D. Levitan, G. Yu, P. St George Hyslop, and C. Goutte. *APH-2/nicastrin* functions in LIN-12/Notch signaling in the *Caenorhabditis elegans* somatic gonad. *Dev Biol*, 240(2):654–61, 2001.

- [268] Y. Hu, Y. Ye, and M.E. Fortini. Nicastrin is required for γ -secretase cleavage of the Drosophila Notch receptor. *Dev Cell*, 2(1):69–78, 2002.
- [269] T. Li, G. Ma, H. Cai, D.L. Price, and P.C. Wong. Nicastrin is required for assembly of presenilin/ γ -secretase complexes to mediate Notch signaling and for processing and trafficking of β -amyloid precursor protein in mammals. *J Neurosci*, 23(8):3272–7, 2003.
- [270] R. Fluhrer, F. Kamp, G. Grammer, B. Nuscher, H. Steiner, K. Beyer, and C. Haass. The nicastrin ectodomain adopts a highly thermostable structure. *Biol Chem*, 392(11):995–1001, 2011.
- [271] J.Y. Leem, S. Vijayan, P. Han, D. Cai, M. Machura, K.O. Lopes, M.L. Veselits, H. Xu, and G. Thinakaran. Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin. *J Biol Chem*, 277(21):19236–40, 2002.
- [272] D.S. Yang, A. Tandon, F. Chen, G. Yu, H. Yu, S. Arawaka, H. Hasegawa, M. Duthie, S.D. Schmidt, T.V. Ramabhadran, R.A. Nixon, P.M. Mathews, S.E. Gandy, H.T.J. Mount, P. St George-Hyslop, and P.E. Fraser. Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its binding to presenilins. *J Biol Chem*, 277(31):28135–42, 2002.
- [273] C. Kaether, S. Lammich, D. Edbauer, M. Ertl, J. Rietdorf, A. Capell, H. Steiner, and C. Haass. Presenilin-1 affects trafficking and processing of β APP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J Cell Biol*, 158(3):551–61, 2002.
- [274] K. Shirovani, D. Edbauer, A. Capell, J. Schmitz, H. Steiner, and C. Haass. γ -Secretase activity is associated with a conformational change of nicastrin. *J Biol Chem*, 278(19):16474–7, 2003.
- [275] A. Herreman, G. Van Gassen, M. Bentahir, O. Nyabi, K. Craessaerts, U. Mueller, W. Annaert, and B. De Strooper. γ -Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the golgi apparatus but not its complex glycosylation. *J Cell Sci*, 116(6):1127–36, 2003.
- [276] X. Zhang, R.J. Hoey, G. Lin, A. Koide, B. Leung, K. Ahn, G. Dolios, M. Paduch, T. Ikeuchi, R. Wang, Y.-M. Li, S. Koide, and S.S. Sisodia. Identification of a tetratricopeptide repeat-like domain in the nicastrin subunit of γ -secretase using synthetic antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(22):8534–9, 2012. in press.
- [277] F. Chen, G. Yu, S. Arawaka, M. Nishimura, T. Kawarai, H. Yu, A. Tandon, A. Supala, Y.Q. Song, E. Rogaeva, P. Milman, C. Sato, C. Yu, C. Janus, J. Lee, L. Song, L. Zhang, P.E. Fraser, and P.H. St George-Hyslop. Nicastrin binds to membrane-tethered Notch. *Nat Cell Biol*, 3(8):751–4, 2001.
- [278] R. Fagan, M. Swindells, J. Overington, and M. Weir. Nicastrin, a presenilin-interacting protein, contains an aminopeptidase/transferrin receptor superfamily domain. *Trends Biochem Sci*, 26(4):213–4, 2001.
- [279] S. Shah, S.F. Lee, K. Tabuchi, Y.H. Hao, C. Yu, Q. LaPlant, H. Ball, C.E. Dann, T. Südhof, and G. Yu. Nicastrin functions as a γ -secretase-substrate receptor. *Cell*, 122(3):435–47, 2005.
- [280] D.R. Dries, S. Shah, Y.-H. Han, C. Yu, S. Yu, M.S. Shearman, and G. Yu. Glu-333 of nicastrin directly participates in γ -secretase activity. *J Biol Chem*, 284(43):29714–24, 2009.
- [281] K. Shirovani, D. Edbauer, M. Kostka, H. Steiner, and C. Haass. Immature nicastrin stabilizes APH-1 independent of PEN-2 and presenilin: identification of nicastrin mutants that selectively interact with APH-1. *J Neurochem*, 89(6):1520–7, 2004.
- [282] L. Chávez-Gutiérrez, A. Tolia, E. Maes, T. Li, P.C. Wong, and B. de Strooper. Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for γ -secretase complex maturation but not for its activity. *J Biol Chem*, 283(29):20096–105, 2008.
- [283] I. Hayashi, S. Takatori, Y. Urano, Y. Miyake, J. Takagi, M. Sakata-Yanagimoto, H. Iwanari, S. Osawa, Y. Morohashi, T. Li, P.C. Wong, S. Chiba, T. Kodama, T. Hamakubo, T. Tomita, and T. Iwatsubo. Neutralization of the γ -secretase activity by monoclonal antibody against extracellular domain of nicastrin. *Oncogene*, 31(6):787–98, 2012.
- [284] V.A. Morais, A.S. Crystal, D.S. Pijak, D. Carlin, J. Costa, V.M.-Y. Lee, and R.W. Doms. The transmembrane domain region of nicastrin mediates direct interactions with APH-1 and the γ -secretase complex. *J Biol Chem*, 278(44):43284–91, 2003.

- [285] A. Pamrén, J. Wanngren, L.O. Tjernberg, B. Winblad, R. Bhat, J. Näslund, and H. Karlström. Mutations in nicastrin protein differentially affect amyloid β -peptide production and Notch protein processing. *J Biol Chem*, 286(36):31153–8, 2011.
- [286] E. Futai, S. Yagishita, and S. Ishiura. Nicastrin is dispensable for γ -secretase protease activity in the presence of specific presenilin mutations. *J Biol Chem*, 284(19):13013–22, 2009.
- [287] G. Zhao, Z. Liu, M.X.G. Ilagan, and R. Kopan. γ -Secretase composed of PS1/pen-2/aph-1a can cleave notch and amyloid precursor protein in the absence of nicastrin. *J Neurosci*, 30(5):1648–56, 2010.
- [288] R. Francis, 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. Hiebsch, C. Ruble, J.S. Nye, and D. Curtis. aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell*, 3(1):85–97, 2002.
- [289] A.S. Crystal, V.A. Morais, T.C. Pierson, D.S. Pijak, D. Carlin, V.M.-Y. Lee, and R.W. Doms. Membrane topology of γ -secretase component PEN-2. *J Biol Chem*, 278(22):20117–23, 2003.
- [290] S.-H. Kim and S.S. Sisodia. A sequence within the first transmembrane domain of PEN-2 is critical for PEN-2-mediated endoproteolysis of presenilin 1. *J Biol Chem*, 280(3):1992–2001, 2005.
- [291] C. Kaether, J. Scheuermann, M. Fassler, S. Zilow, K. Shirotani, C. Valkova, B. Novak, S. Kacmar, H. Steiner, and C. Haass. Endoplasmic reticulum retention of the γ -secretase complex component PEN-2 by Rer1. *EMBO Rep*, 8(8):743–8, 2007.
- [292] S. Prokop, K. Shirotani, D. Edbauer, C. Haass, and H. Steiner. Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the γ -secretase complex. *J Biol Chem*, 279(22):23255–61, 2004.
- [293] H. Hasegawa, 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, and P. St George-Hyslop. Both the sequence and length of the C terminus of PEN-2 are critical for intermolecular interactions and function of presenilin complexes. *J Biol Chem*, 279(45):46455–63, 2004.
- [294] S. Prokop, C. Haass, and H. Steiner. Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain determines its function in the stabilization of presenilin fragments. *J Neurochem*, 94(1):57–62, 2005.
- [295] N. Watanabe, T. Tomita, C. Sato, T. Kitamura, Y. Morohashi, and T. Iwatsubo. Pen-2 is incorporated into the γ -secretase complex through binding to transmembrane domain 4 of presenilin 1. *J Biol Chem*, 280(51):41967–75, 2005.
- [296] L. Bammens, L. Chávez-Gutiérrez, A. Tolia, A. Zwijsen, and B. De Strooper. Functional and topological analysis of Pen-2, the fourth subunit of the γ -secretase complex. *J Biol Chem*, 286(14):12271–82, 2011.
- [297] C. Goutte, M. Tsunozaki, V.A. Hale, and J.R. Priess. APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(2):775–9, 2002.
- [298] S.-F. Lee, S. Shah, H. Li, C. Yu, W. Han, and G. Yu. Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid- β precursor protein and Notch. *J Biol Chem*, 277(47):45013–9, 2002.
- [299] R.R. Fortna, A.S. Crystal, V.A. Morais, D.S. Pijak, V. M.-Y. Lee, and R.W. Doms. Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of APH-1, a component of the γ -secretase complex. *J Biol Chem*, 279(5):3685–93, 2004.
- [300] K. Shirotani, M. Tomioka, E. Kremmer, C. Haass, and H. Steiner. Pathological activity of familial Alzheimer’s disease-associated mutant presenilin can be executed by six different γ -secretase complexes. *Neurobiol Dis*, 27(1):102–7, 2007.
- [301] B. De Strooper. Aph-1, pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active γ -secretase complex. *Neuron*, 38(1):9–12, 2003.
- [302] S.S. Hébert, L. Serneels, T. Dejaegere, K. Horr , M. Dabrowski, V. Baert, W. Annaert, D. Hartmann, and B. De Strooper. Coordinated and widespread expression of γ -secretase *in vivo*: evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiol Dis*, 17(2):260–72, 2004.

-
- [303] G. Ma, T. Li, D.L. Price, and P.C. Wong. APH-1a is the principal mammalian APH-1 isoform present in γ -secretase complexes during embryonic development. *J Neurosci*, 25(1):192–8, 2005.
- [304] L. Serneels, T. Dejaegere, K. Craessaerts, K. Horre, E. Jorissen, T. Tousseyn, S. Hebert, M. Coolen, G. Martens, A. Zwijsen, et al. Differential contribution of the three Aph1 genes to γ -secretase activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(5):1719–24, 2005.
- [305] L. Serneels, J. Van Biervliet, K. Craessaerts, T. Dejaegere, K. Horre, T. Van Houtvin, H. Esselmann, S. Paul, M.K. Schafer, O. Berezovska, B.T. Hyman, B. Sprangers, R. Scot, L. Moons, M. Jucker, Z. Yang, P.C. May, E. Karran, J. Wiltfang, R. D’Hooge, and B. De Strooper. γ -Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer’s disease. *Science*, 324(5927):639–42, 2009.
- [306] Y. Gu, F. Chen, N. Sanjo, T. Kawarai, H. Hasegawa, M. Duthie, W. Li, X. Ruan, A. Luthra, H.T.J. Mount, A. Tandon, P.E. Fraser, and P. St George-Hyslop. APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin-nicastrin complexes. *J Biol Chem*, 278(9):7374–80, 2003.
- [307] M.J. LaVoie, P.C. Fraering, B.L. Ostaszewski, W. Ye, W.T. Kimberly, M.S. Wolfe, and D.J. Selkoe. Assembly of the γ -secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem*, 278(39):37213–22, 2003.
- [308] D. Edbauer, E. Winkler, C. Haass, and H. Steiner. Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid β -peptide production via complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(13):8666–71, 2002.
- [309] A. Bergman, E.M. Hansson, S.E. Pursglove, M.R. Farmery, L. Lannfelt, U. Lendahl, J. Lundkvist, and J. Näslund. 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(16):16744–53, 2004.
- [310] J. Kim and R. Schekman. The ins and outs of presenilin 1 membrane topology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(4):905–6, 2004.
- [311] A. Capell, D. Beher, S. Prokop, H. Steiner, C. Kaether, M.S. Shearman, and C. Haass. γ -Secretase complex assembly within the early secretory pathway. *J Biol Chem*, 280(8):6471–8, 2005.
- [312] J.H. Chyung, D.M. Raper, and D.J. Selkoe. γ -Secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J Biol Chem*, 280(6):4383–92, 2005.
- [313] W.-j. Luo, H. Wang, H. Li, B.S.S Kim, S. Shah, H.-J. Lee, G. Thinakaran, T.-W. Kim, G. Yu, and H. Xu. PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem*, 278(10):7850–4, 2003.
- [314] K. Sato, M. Sato, and A. Nakano. Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Mol Biol Cell*, 14(9):3605–16, 2003.
- [315] M. Sato, K. Sato, and A. Nakano. Endoplasmic reticulum quality control of unassembled iron transporter depends on Rer1p-mediated retrieval from the golgi. *Mol Biol Cell*, 15(3):1417–24, 2004.
- [316] D. Spasic, T. Raemaekers, K. Dillen, I. Declerck, V. Baert, L. Serneels, J. Fullekrug, and W. Annaert. Rer1p competes with APH-1 for binding to nicastrin and regulates γ -secretase complex assembly in the early secretory pathway. *J Cell Biol*, 176(5):629–40, 2007.
- [317] M. Fassler, 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 γ -secretase. *Traffic*, 11(2):250–8, 2010.
- [318] F. Chen, H. Hasegawa, G. Schmitt-Ulms, T. Kawarai, C. Bohm, T. Katayama, Y. Gu, N. Sanjo, M. Glista, E. Rogaeva, Y. Wakutani, R. Pardossi-Piquard, X. Ruan, A. Tandon, F. Chelcler, P. Marambaud, K. Hansen, D. Westaway, P. St George-Hyslop, and P. Fraser. TMP21 is a presenilin complex component that modulates γ -secretase but not ϵ -secretase activity. *Nature*, 440(7088):1208–12, 2006.

- [319] S. Zhou, H. Zhou, P.J. Walian, and B.K. Jap. CD147 is a regulatory subunit of the γ -secretase complex in Alzheimer's disease amyloid β -peptide production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(21):7499–504, 2005.
- [320] G. He, W. Luo, P. Li, C. Remmers, W.J. Netzer, J. Hendrick, K. Bettayeb, M. Flajolet, F. Gorelick, L.P. Wennogle, and P. Greengard. γ -Secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature*, 467(7311):95–8, 2010.
- [321] R. Blum, P. Feick, M. Puype, J. Vandekerckhove, R. Klengel, W. Nastainczyk, and I. Schulz. Tmp21 and p24A, two type I proteins enriched in pancreatic microsomal membranes, are members of a protein family involved in vesicular trafficking. *J Biol Chem*, 271(29):17183–9, 1996.
- [322] T. Wakabayashi, K. Craessaerts, L. Bammens, M. Bentahir, F. Borgions, P. Herdewijn, A. Staes, E. Timmerman, J. Vandekerckhove, E. Rubinstein, C. Boucheix, K. Gevaert, and B. De Strooper. Analysis of the γ -secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains. *Nat Cell Biol*, 11(11):1340–6, 2009.
- [323] K.S. Vetrivel, P. Gong, J.W. Bowen, H. Cheng, Y. Chen, M. Carter, P.D. Nguyen, L. Placanica, F.T. Wieland, Y.M. Li, M.Z. Kounnas, and G. Thinakaran. Dual roles of the transmembrane protein p23/TMP21 in the modulation of amyloid precursor protein metabolism. *Mol Neurodegener*, 2:4–16, 2007.
- [324] K.S. Vetrivel, X. Zhang, X. Meckler, H. Cheng, S. Lee, P. Gong, K.O. Lopes, Y. Chen, N. Iwata, K.-J. Yin, J.-M. Lee, A.T.T. Parent, T.C. Saido, Y.-M. Li, S.S. Sisodia, and G. Thinakaran. Evidence that CD147 modulation of β -amyloid ($A\beta$) levels is mediated by extracellular degradation of secreted $A\beta$. *J Biol Chem*, 283(28):19489–98, 2008.
- [325] S.J. Lee and J.Y.J. Wang. Exploiting the promiscuity of imatinib. *J Biol*, 8(3):30, 2009.
- [326] W.J. Netzer, F. Dou, D. Cai, D. Veach, S. Jean, Y. Li, W.G. Bornmann, B. Clarkson, H. Xu, and P. Greengard. Gleevec inhibits β -amyloid production but not Notch cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(21):12444–9, 2003.
- [327] P.C. Fraering, W. Ye, M.J. LaVoie, B.L. Ostaszewski, D.J. Selkoe, and M.S. Wolfe. γ -Secretase substrate selectivity can be modulated directly via interaction with a nucleotide-binding site. *J Biol Chem*, 280(51):41987–96, 2005.
- [328] A. Haapasalo and D.M. Kovacs. The many substrates of presenilin/ γ -secretase. *J Alzheimers Dis*, 25(1):3–28, 2011.
- [329] S. Nakahara, T. Saito, N. Kondo, K. Moriwaki, K. Noda, S. Ihara, M. Takahashi, Y. Ide, J. Gu, H. Inohara, Taiichi Katayama, M. Tohyama, T. Kubo, N. Taniguchi, and E. Miyoshi. A secreted type of β 1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V), a novel angiogenesis inducer, is regulated by γ -secretase. *FASEB J*, 20(14):2451–9, 2006.
- [330] E.L. Meyer, N. Strutz, L.C. Gahring, and S.W. Rogers. Glutamate receptor subunit 3 is modified by site-specific limited proteolysis including cleavage by γ -secretase. *J Biol Chem*, 278(26):23786–96, 2003.
- [331] R. Kopan and M.X.G. Ilagan. γ -Secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(6):499–504, 2004.
- [332] B. De Strooper, W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J.S. Mumm, E.H. Schroeter, V. Schrijvers, M.S. Wolfe, W.J. Ray, A. Goate, and R. Kopan. A presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 398(6727):518–22, 1999.
- [333] P. Marambaud, J. Shioi, G. Serban, A. Georgakopoulos, S. Sarnar, V. Nagy, L. Baki, P. Wen, S. Efthimiopoulos, Z. Shao, T. Wisniewski, and N.K. Robakis. A presenilin-1/ γ -secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J*, 21(8):1948–56, 2002.
- [334] C.Y. Ni, M.P. Murphy, T.E. Golde, and G. Carpenter. γ -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science*, 294(5549):2179–81, 2001.

- [335] T. DeJaegere, L. Serneels, M.K. Schäfer, J. Van Biervliet, K. Horr , C. Depboylu, D. Alvarez-Fischer, A. Herreman, M. Willem, C. Haass, G.U. H glinger, R. D'Hooge, and B. De Strooper. Deficiency of Aph1B/C- γ -secretase disturbs Nrg1 cleavage and sensorimotor gating that can be reversed with antipsychotic treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(28):9775–80, 2008.
- [336] P.-H. Kuhn, E. Marjaux, A. Imhof, B. De Strooper, C. Haass, and S.F. Lichtenthaler. Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by α -, β -, and γ -secretase. *J Biol Chem*, 282(16):11982–95, 2007.
- [337] S. Lammich, M. Okochi, M. Takeda, C. Kaether, A. Capell, A.K. Zimmer, D. Edbauer, J. Walter, H. Steiner, and C. Haass. Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an A β -like peptide. *J Biol Chem*, 277(47):44754–9, 2002.
- [338] D.R. Borchelt, T. Ratovitski, J. van Lare, M.K. Lee, V. Gonzales, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, D.L. Price, and S.S. Sisodia. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*, 19(4):939–45, 1997.
- [339] L. Holcomb, M.N. Gordon, E. McGowan, X. Yu, S. Benkovic, P. Jantzen, K. Wright, I. Saad, R. Mueller, D. Morgan, S. Sanders, C. Zehr, K. O'Campo, J. Hardy, C.M. Prada, C. Eckman, S. Younkin, K. Hsiao, and K. Duff. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med*, 4(1):97–100, 1998.
- [340] T. Tomita, K. Maruyama, T.C. Saido, H. Kume, K. Shinozaki, S. Tokuhira, A. Capell, J. Walter, J. Grünberg, C. Haass, T. Iwatsubo, and K. Obata. The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid β protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(5):2025–30, 1997.
- [341] J. Shen and R.J. Kelleher, 3rd. The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(2):403–9, 2007.
- [342] B. De Strooper. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep*, 8(2):141–6, 2007.
- [343] E.A. Heilig, W. Xia, J. Shen, and R.J. Kelleher, 3rd. A presenilin-1 mutation identified in familial Alzheimer disease with cotton wool plaques causes a nearly complete loss of γ -secretase activity. *J Biol Chem*, 285(29):22350–9, 2010.
- [344] N. Suzuki, T.T. Cheung, X.D. Cai, A. Odaka, L. Otvos, Jr, C. Eckman, T.E. Golde, and S.G. Younkin. An increased percentage of long amyloid β protein secreted by familial amyloid β protein precursor (β APP717) mutants. *Science*, 264(5163):1336–40, 1994.
- [345] A. Goate, M.C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, R. Mant, P. Newton, K. Rooke, P. Roques, C. Talbot, M. Pericak-Vance, A. Roses, R. Williamson, M. Rossor, M. Owen, and J. Hardy. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311):704–6, 1991.
- [346] S. Naruse, S. Igarashi, H. Kobayashi, K. Aoki, T. Inuzuka, K. Kaneko, T. Shimizu, K. Iihara, T. Kojima, and T. Miyatake. Mis-sense mutation Val-Ile in exon 17 of amyloid precursor protein gene in Japanese familial Alzheimer's disease. *Lancet*, 337(8747):978–9, 1991.
- [347] C. Nilsberth, A. Westlind-Danielsson, C.B. Eckman, M.M. Condron, K. Axelman, C. Forsell, C. Stenh, J. Luthman, D.B. Teplow, S.G. Younkin, J. Näslund, and L. Lannfelt. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nat Neurosci*, 4(9):887–93, 2001.
- [348] M. Citron, T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A.Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg, and D.J. Selkoe. Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature*, 360(6405):672–4, 1992.
- [349] M. Mullan, F. Crawford, K. Axelman, H. Houlden, L. Lilius, B. Winblad, and L. Lannfelt. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nat Genet*, 1(5):345–7, 1992.

- [350] L. Zhou, N. Brouwers, I. Benilova, A. Vandersteen, M. Mercken, K. Van Laere, P. Van Damme, D. Demedts, F. Van Leuven, K. Slegers, K. Broersen, C. Van Broeckhoven, R. Vandenberghe, and B. De Strooper. Amyloid precursor protein mutation E682K at the alternative β -secretase cleavage β' -site increases $A\beta$ generation. *EMBO Mol Med*, 3(5):291–302, 2011.
- [351] D. Kaden, A. Harmeier, C. Weise, L.M. Munter, V. Althoff, B.R. Rost, P.W. Hildebrand, D. Schmitz, M. Schaefer, R. Lurz, S. Skodda, R. Yamamoto, S. Arlt, U. Finckh, and G. Multhaup. Novel APP/ $A\beta$ mutation K16N produces highly toxic heteromeric $A\beta$ oligomers. *EMBO Mol Med*, 4(7):647–59, 2012. in press.
- [352] A. Rovelet-Lecrux, D. Hannequin, G. Raux, N. Le Meur, A. Laquerrière, A. Vital, C. Dumanchin, S. Feuillette, A. Brice, M. Vercelletto, F. Dubas, T. Frebourg, and D. Campion. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*, 38(1):24–6, 2006.
- [353] W.B. Zigman and I.T. Lott. Alzheimer’s disease in Down syndrome: neurobiology and risk. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 13(3):237–46, 2007.
- [354] Y. Tian, B. Bassit, D. Chau, and Y.-M. Li. An APP inhibitory domain containing the Flemish mutation residue modulates γ -secretase activity for $A\beta$ production. *Nat Struct Mol Biol*, 17(2):151–8, 2010.
- [355] G. Tian, C.D. Sobotka-Briner, J. Zysk, X. Liu, C. Birr, M.A. Sylvester, P.D. Edwards, C.D. Scott, and B.D. Greenberg. Linear non-competitive inhibition of solubilized human γ -secretase by pepstatin A methylester, L-685,458, sulfonamides, and benzodiazepines. *J Biol Chem*, 277(35):31499–505, 2002.
- [356] A.Y. Kornilova, C. Das, and M.S. Wolfe. Differential effects of inhibitors on the γ -secretase complex. MECHANISTIC IMPLICATIONS. *J Biol Chem*, 278(19):16470–3, 2003.
- [357] O. Berezovska, P. Ramdya, J. Skoch, M.S. Wolfe, B.J. Bacskai, and B.T. Hyman. Amyloid precursor protein associates with a nicastrin-dependent docking site on the presenilin 1- γ -secretase complex in cells demonstrated by fluorescence lifetime imaging. *J Neurosci*, 23(11):4560–6, 2003.
- [358] P. Ramdya, J. Skoch, B.J. Bacskai, B.T. Hyman, and O. Berezovska. Activated Notch1 associates with a presenilin-1/ γ -secretase docking site. *J Neurochem*, 87(4):843–50, 2003.
- [359] A.Y. Kornilova, F. Bihel, C. Das, and M.S. Wolfe. The initial substrate-binding site of γ -secretase is located on presenilin near the active site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(9):3230–5, 2005.
- [360] K. Uemura, K.C. Farner, T. Hashimoto, N. Nasser-Ghodsi, M.S. Wolfe, E.H. Koo, B.T. Hyman, and O. Berezovska. Substrate docking to γ -secretase allows access of γ -secretase modulators to an allosteric site. *Nat Commun*, 1:130, 2010.
- [361] C. Das, O. Berezovska, T.S. Diehl, C. Genet, I. Buldyrev, J.-Y. Tsai, B.T. Hyman, and M.S. Wolfe. Designed helical peptides inhibit an intramembrane protease. *J Am Chem Soc*, 125(39):11794–5, 2003.
- [362] Y. Imamura, N. Watanabe, N. Umezawa, T. Iwatsubo, N. Kato, T. Tomita, and T. Higuchi. Inhibition of gamma-secretase activity by helical beta-peptide foldamers. *J Am Chem Soc*, 131(21):7353–9, 2009.
- [363] T. Tomita. Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer’s disease treatment. *Expert Rev Neurother*, 9(5):661–79, 2009.
- [364] H.F. Dovey, V. John, J.P. Anderson, L.Z. Chen, P. de Saint Andrieu, L.Y. Fang, S.B. Freedman, B. Folmer, E. Goldbach, E.J. Holsztynska, K.L. Hu, K.L. Johnson-Wood, S.L. Kennedy, D. Kholodenko, J.E. Knops, L.H. Latimer, M. Lee, Z. Liao, I.M. Lieberburg, R.N. Motter, et al. Functional γ -secretase inhibitors reduce β -amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem*, 76(1):173–81, 2001.
- [365] T.A. Lanz, C.S. Himes, G. Pallante, L. Adams, S. Yamazaki, B. Amore, and K.M. Merchant. The γ -secretase inhibitor N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester reduces $A\beta$ levels in vivo in plasma and cerebrospinal fluid in young (plaque-free) and aged (plaque-bearing) Tg2576 mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 305(3):864–71, 2003.

- [366] D.B. Henley, P.C. May, R.A. Dean, and E.R. Siemers. Development of semagacestat (LY450139), a functional γ -secretase inhibitor, for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother*, 10(10):1657–64, 2009.
- [367] T.A. Lanz, J.D. Hosley, W.J. Adams, and K.M. Merchant. Studies of A β pharmacodynamics in the brain, cerebrospinal fluid, and plasma in young (plaque-free) Tg2576 mice using the gamma-secretase inhibitor N2-[(2S)-2-(3,5-difluorophenyl)-2-hydroxyethanoyl]-N1-[(7S)-5-methyl-6-oxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-yl]-L-alaninamide (LY-411575). *J Pharmacol Exp Ther*, 309(1):49–55, 2004.
- [368] G.T. Wong, D. Manfra, F.M. Poulet, Q. Zhang, H. Josien, T. Bara, L. Engstrom, M. Pinzon-Ortiz, J.S. Fine, H.-J.J. Lee, L. Zhang, G.A. Higgins, and E.M. Parker. Chronic treatment with the γ -secretase inhibitor LY-411,575 inhibits β -amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem*, 279(13):12876–82, 2004.
- [369] Y. Morohashi, T. Kan, Y. Tominari, H. Fuwa, Y. Okamura, N. Watanabe, C. Sato, H. Natsugari, T. Fukuyama, T. Iwatsubo, and T. Tomita. C-terminal fragment of presenilin is the molecular target of a dipeptidic γ -secretase-specific inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester). *J Biol Chem*, 281(21):14670–6, 2006.
- [370] H. Fuwa, Y. Takahashi, Y. Konno, N. Watanabe, H. Miyashita, M. Sasaki, H. Natsugari, T. Kan, T. Fukuyama, T. Tomita, and T. Iwatsubo. Divergent synthesis of multifunctional molecular probes to elucidate the enzyme specificity of dipeptidic γ -secretase inhibitors. *ACS Chem Biol*, 2(6):408–18, 2007.
- [371] B.K. Hadland, N.R. Manley, D. Su, G.D. Longmore, C.L. Moore, M.S. Wolfe, E.H. Schroeter, and R. Kopan. γ -Secretase inhibitors repress thymocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13):7487–91, 2001.
- [372] J. Milano, J. McKay, C. Dagenais, L. Foster-Brown, F. Pognan, R. Gadiant, R.T. Jacobs, A. Zacco, B. Greenberg, and P.J. Ciaccio. Modulation of notch processing by γ -secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol Sci*, 82(1):341–58, 2004.
- [373] J.H. van Es, M.E. van Gijn, O. Riccio, M. van den Born, M. Vooijs, H. Begthel, M. Cozijnsen, S. Robine, D.J. Winton, F. Radtke, and H. Clevers. Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*, 435(7044):959–63, 2005.
- [374] P.C. May, Z. Yang, W.Y. Li, P.A. Hyslop, E.R. Siemers, and L.N. Boggs. Multi-compartmental pharmacodynamic assessment of the functional γ -secretase inhibitor LY450139 in PDAPP transgenic mice and non-transgenic mice. *Neurobiol Aging*, 25(suppl2):65, 2004.
- [375] E.R. Siemers, J.F. Quinn, J. Kaye, M.R. Farlow, A. Porsteinsson, P. Tariot, P. Zoulnouni, J.E. Galvin, D.M. Holtzman, D.S. Knopman, et al. Effects of a γ -secretase inhibitor in a randomized study of patients with Alzheimer disease. *Neurology*, 66(4):602–4, 2006.
- [376] A.S. Fleisher, R. Raman, E.R. Siemers, L. Becerra, C.M. Clark, R.A. Dean, M.R. Farlow, J.E. Galvin, E.R. Peskind, J.F. Quinn, A. Sherzai, B.B. Sowell, P.S. Aisen, and L.J. Thal. Phase 2 safety trial targeting amyloid beta production with a γ -secretase inhibitor in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 65(8):1031–8, 2008.
- [377] K. Samson. NerveCenter: Phase III Alzheimer trial halted: Search for therapeutic biomarkers continues. *Ann Neurol*, 68(4):A9–A12, 2010.
- [378] B.P. Imbimbo and G.A.M. Giardina. γ -Secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: disappointments and hopes. *Curr Top Med Chem*, 11(12):1555–70, 2011.
- [379] N.F. Schor. What the halted phase III γ -secretase inhibitor trial may (or may not) be telling us. *Ann Neurol*, 69(2):237–9, 2011.
- [380] P. Rizzo, C. Osipo, K. Foreman, T. Golde, B. Osborne, and L. Miele. Rational targeting of notch signaling in cancer. *Oncogene*, 27(38):5124–31, 2008.
- [381] L.M. Sarmiento and J.T. Barata. Therapeutic potential of notch inhibition in T-cell acute lymphoblastic leukemia: rationale, caveats and promises. *Expert Rev Anticancer Ther*, 11(9):1403–15, 2011.

- [382] D.J. Deangelo, R.M. Stone, L.B. Silverman, W. Stock, E.C. Attar, I. Fearen, A. Dallob, C. Matthews, J. Stone, S.J. Freedman, and J. Aster. A phase I clinical trial of the notch inhibitor MK-0752 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-ALL) and other leukemias. *J Clin Oncol*, 24(18S):6585, 2006.
- [383] M. Fouladi, C.F. Stewart, J. Olson, L.M. Wagner, A. Onar-Thomas, M. Kocak, R.J. Packer, S. Goldman, S. Gururangan, A. Gajjar, T. Demuth, L.E. Kun, J.M. Boyett, and R.J. Gilbertson. Phase I trial of MK-0752 in children with refractory CNS malignancies: a pediatric brain tumor consortium study. *J Clin Oncol*, 29(26):3529–34, 2011.
- [384] I. Krop, T. Demuth, T. Guthrie, P.Y. Wen, W.P. Mason, P. Chinnaiyan, N. Butowski, M.D. Groves, S. Kesari, S.J. Freedman, S. Blackman, J. Watters, A. Loboda, A. Podtelezchnikov, J. Lunceford, C. Chen, M. Giannotti, J. Hing, R. Beckman, and P. Lorusso. Phase I pharmacologic and pharmacodynamic study of the γ -secretase (Notch) inhibitor MK-0752 in adult patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 30(19):2307–13, 2012. in press.
- [385] A.W. Tolcher, W.A. Messersmith, S.M. Mikulski, K.P. Papadopoulos, E.L. Kwak, D.G. Gibbon, A. Patnaik, G.S. Falchook, A. Dasari, G.I. Shapiro, J.F. Boylan, Z.-X. Xu, K. Wang, A. Koehler, J. Song, S.A. Middleton, J. Deutsch, M. Demario, R. Kurzrock, and J.J. Wheler. Phase I study of RO4929097, a γ -secretase inhibitor of Notch signaling, in patients with refractory metastatic or locally advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 30(19):2348–53, 2012. in press.
- [386] R.L. Martone, H. Zhou, K. Atchison, T. Comery, J.Z. Xu, X. Huang, X. Gong, M. Jin, A. Kreft, B. Harrison, S.C. Mayer, S. Aschmies, C. Gonzales, M.M. Zaleska, D.R. Riddell, E. Wagner, P. Lu, S.-C. Sun, J. Sonnenberg-Reines, A. Oganessian, et al. Begacestat (GSI-953): A novel, selective thiophene sulfonamide inhibitor of amyloid precursor protein γ -secretase for the treatment of Alzheimer’s disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 331(2):598–608, 2009.
- [387] S.C. Mayer, A.F. Kreft, B. Harrison, M. Abou-Gharbia, M. Antane, S. Aschmies, K. Atchison, M. Chlenov, D.C. Cole, T. Comery, G. Diamantidis, J. Ellingboe, K. Fan, R. Galante, C. Gonzales, D.M. Ho, M.E. Hoke, Y. Hu, D. Huryn, U. Jain, et al. Discovery of begacestat, a notch-1-sparing γ -secretase inhibitor for the treatment of Alzheimer’s disease. *J Med Chem*, 51(23):7348–51, 2008.
- [388] K.W. Gillman, J.E. Starrett, M.F. Parker, K. Xie, J.J. Bronson, L.R. Marcin, K.E. McElhone, C.P. Bergstrom, R.A. Mate, R. Williams, J.E. Meredith, C.R. Burton, D.M. Barten, J.H. Toyn, S.B. Roberts, K.A. Lentz, J.G. Houston, R. Zaczek, C.F. Albright, C.P. Decicco, J.E. Macor, and R.E. Olson. Discovery and evaluation of BMS-708163, a potent, selective and orally bioavailable γ -secretase inhibitor. *ACS Med Chem Lett*, 1(3):120–4, 2010.
- [389] G. Tong, J.-S. Wang, O. Sverdlov, S.-P. Huang, R. Slemmon, R. Croop, L. Castaneda, H. Gu, O. Wong, H. Li, R.M. Berman, C. Smith, C.F. Albright, and R.C. Dockens. Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, single-ascending dose study of the oral γ -secretase inhibitor BMS-708163 (avagacestat): tolerability profile, pharmacokinetic parameters, and pharmacodynamic markers. *Clin Ther*, 34(3):654–67, 2012.
- [390] A. Lleó and C.A. Saura. γ -Secretase substrates and their implications for drug development in Alzheimer’s disease. *Curr Top Med Chem*, 11(12):1513–27, 2011.
- [391] D. Oehlrich, D.J.-C. Berthelot, and H.J.M. Gijzen. γ -Secretase modulators as potential disease modifying anti-Alzheimer’s drugs. *J Med Chem*, 54(3):669–98, 2011.
- [392] J.J. Cook, K.R. Wildsmith, D.B. Gilberto, M.A. Holahan, G.G. Kinney, P.D. Mathers, M.S. Michener, E.A. Price, M.S. Shearman, A.J. Simon, J.X. Wang, G. Wu, K.E. Yarasheski, and R.J. Bateman. Acute γ -secretase inhibition of nonhuman primate CNS shifts amyloid precursor protein (APP) metabolism from amyloid-beta production to alternative APP fragments without amyloid- β rebound. *J Neurosci*, 30(19):6743–50, 2010.
- [393] Y. Mitani, J. Yarimizu, K. Saita, H. Uchino, H. Akashiba, Y. Shitaka, K. Ni, and N. Matsuoka. Differential effects between γ -secretase inhibitors and modulators on cognitive function in amyloid precursor protein-transgenic and nontransgenic mice. *J Neurosci*, 32(6):2037–50, 2012.
- [394] T. Bittner, M. Fuhrmann, S. Burgold, C.K.E. Jung, C. Volbracht, H. Steiner, G. Mitteregger, H.A. Kretzschmar, C. Haass, and J. Herms. γ -Secretase inhibition reduces spine density *in vivo* via an amyloid precursor protein-dependent pathway. *J Neurosci*, 29(33):10405–9, 2009.

- [395] B. Kretner, A. Fukumori, A. Gutsmiel, R.M. Page, T. Luebbers, G. Galley, K. Baumann, C. Haass, and H. Steiner. Attenuated A β ₄₂ responses to low potency γ -secretase modulators can be overcome for many pathogenic presenilin mutants by second-generation compounds. *J Biol Chem*, 286(17):15240–51, 2011.
- [396] S. Weggen, J.L. Eriksen, P. Das, S.A. Sagi, R. Wang, C.U. Pietrzik, K.A. Findlay, T.E. Smith, M.P. Murphy, T. Bulter, et al. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β ₄₂ independently of cyclooxygenase activity. *Nature*, 414(6860):212–16, 2001.
- [397] M. Okochi, A. Fukumori, J. Jiang, N. Itoh, R. Kimura, H. Steiner, C. Haass, S. Tagami, and M. Takeda. Secretion of the notch-1 A β -like peptide during notch signaling. *J Biol Chem*, 281(12):7890–8, 2006.
- [398] J.L. Eriksen, S.A. Sagi, T.E. Smith, S. Weggen, P. Das, D.C. McLendon, V.V. Ozols, K.W. Jessing, K.H. Zavitz, E.H. Koo, and T.E. Golde. NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target γ -secretase and lower A β ₄₂ *in vivo*. *J Clin Invest*, 112(3):440–9, 2003.
- [399] J. Rogers, L.C. Kirby, S.R. Hempelman, D.L. Berry, P.L. McGeer, A.W. Kaszniak, J. Zaluski, M. Cofield, L. Mansukhani, and P. Willson. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer’s disease. *Neurology*, 43(8):1609–11, 1993.
- [400] P.L. McGeer, M. Schulzer, and E.G. McGeer. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer’s disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology*, 47(2):425–32, 1996.
- [401] W.F. Stewart, C. Kawas, M. Corrada, and E.J. Metter. Risk of Alzheimer’s disease and duration of NSAID use. *Neurology*, 48(3):626–32, 1997.
- [402] J.C. Anthony, J.C. Breitner, P.P. Zandi, M.R. Meyer, I. Jurasova, M.C. Norton, and S.V. Stone. Reduced prevalence of AD in users of NSAIDs and H2 receptor antagonists: the Cache County study. *Neurology*, 54(11):2066–71, 2000.
- [403] W.L. Smith, D.L. DeWitt, and R.M. Garavito. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 69:145–82, 2000.
- [404] T. Kukar, M.P. Murphy, J.L. Eriksen, S.A. Sagi, S. Weggen, T.E. Smith, T. Ladd, M.A. Khan, R. Kache, J. Beard, M. Dodson, S. Merit, V.V. Ozols, P.Z. Anastasiadis, P. Das, A. Fauq, E.H. Koo, and T.E. Golde. Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting A β ₄₂ production. *Nat Med*, 11(5):545–50, 2005.
- [405] C. Czech, M.P. Burns, L. Vardanian, A. Augustin, H. Jacobsen, K. Baumann, and G.W. Rebeck. Cholesterol independent effect of LXR agonist TO-901317 on γ -secretase. *J Neurochem*, 101(4):929–36, 2007.
- [406] T.L. Kukar, T.B. Ladd, M.A. Bann, P.C. Fraering, R. Narlawar, G.M. Maharvi, B. Healy, R. Chapman, A.T. Welzel, R.W. Price, et al. Substrate-targeting γ -secretase modulators. *Nature*, 453(7197):925–9, 2008.
- [407] M.Z. Kounnas, A.M. Danks, S. Cheng, C. Tyree, E. Ackerman, X. Zhang, K. Ahn, P. Nguyen, D. Comer, L. Mao, C. Yu, D. Pleynet, P.J. Digregorio, G. Velicelebi, K.A. Stauderman, W.T. Comer, W.C. Mobley, Y.-M. Li, S.S. Sisodia, R.E. Tanzi, and S.L. Wagner. Modulation of γ -secretase reduces β -amyloid deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Neuron*, 67(5):769–80, 2010.
- [408] E. Portelius, B. Van Broeck, U. Andreasson, M.K. Gustavsson, M. Mercken, H. Zetterberg, H. Borghys, and K. Blennow. Acute effect on the A β isoform pattern in CSF in response to γ -secretase modulator and inhibitor treatment in dogs. *J Alzheimers Dis*, 21(3):1005–12, 2010.
- [409] Y. Takahashi, I. Hayashi, Y. Tominari, K. Rikimaru, Y. Morohashi, T. Kan, H. Natsugari, T. Fukuyama, T. Tomita, and T. Iwatsubo. Sulindac sulfide is a noncompetitive γ -secretase inhibitor that preferentially reduces A β ₄₂ generation. *J Biol Chem*, 278(20):18664–70, 2003.
- [410] D. Beher, E.E. Clarke, J.D.J. Wrigley, A.C.L. Martin, A. Nadin, I. Churcher, and M.S. Shearman. Selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives target γ -secretase at a novel site: EVIDENCE FOR AN ALLOSTERIC MECHANISM. *J Biol Chem*, 279(42):43419–26, 2004.

- [411] A. Lleó, O. Berezovska, L. Herl, S. Raju, A. Deng, B.J. Bacskai, M.P. Frosch, M. Irizarry, and B.T. Hyman. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs lower A β ₄₂ and change presenilin 1 conformation. *Nat Med*, 10(10):1065–6, 2004.
- [412] K. Uemura, C.M. Lill, X. Li, J.A. Peters, A. Ivanov, Z. Fan, B. De Strooper, B.J. Bacskai, B.T. Hyman, and O. Berezovska. Allosteric modulation of PS1/ γ -secretase conformation correlates with amyloid β _{42/40} ratio. *PLoS One*, 4(11):e7893, 2009.
- [413] S. Weggen, J.L. Eriksen, S.A. Sagi, C.U. Pietrzik, V. Ozols, A. Fauq, T.E. Golde, and E.H. Koo. Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid β ₄₂ production by direct modulation of γ -secretase activity. *J Biol Chem*, 278(34):31831–7, 2003.
- [414] S. Hahn, T. Brüning, J. Ness, E. Czirr, S. Baches, H. Gijssen, C. Korth, C.U. Pietrzik, B. Bulic, and S. Weggen. Presenilin-1 but not amyloid precursor protein mutations present in mouse models of Alzheimer’s disease attenuate the response of cultured cells to γ -secretase modulators regardless of their potency and structure. *J Neurochem*, 116(3):385–95, 2011.
- [415] S.A. Sagi, C.B. Lessard, K.D. Winden, H. Maruyama, J.C. Koo, S. Weggen, T.L. Kukar, T.E. Golde, and E.H. Koo. Substrate sequence influences γ -secretase modulator activity: role of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 286(46):39794–803, 2011.
- [416] L. Richter, L.M. Munter, J. Ness, P.W. Hildebrand, M. Dasari, S. Unterreitmeier, B. Bulic, M. Beyermann, R. Gust, B. Reif, S. Weggen, D. Langosch, and G. Multhaup. Amyloid β ₄₂ peptide (A β ₄₂)-lowering compounds directly bind to A β and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(33):14597–602, 2010.
- [417] A. Botev, L.M. Munter, R. Wenzel, L. Richter, V. Althoff, J. Ismer, U. Gerling, C. Weise, B. Kokschi, P.W. Hildebrand, R. Bittl, and G. Multhaup. The amyloid precursor protein C-terminal fragment C100 occurs in monomeric and dimeric stable conformations and binds γ -secretase modulators. *Biochemistry*, 50(5):828–35, 2011.
- [418] T. Sato, A.C. Nyborg, N. Iwata, T.S. Diehl, T.C. Saido, T.E. Golde, and M.S. Wolfe. Signal peptide peptidase: biochemical properties and modulation by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Biochemistry*, 45(28):8649–56, 2006.
- [419] C.P. Ponting, M. Hutton, A. Nyborg, M. Baker, K. Jansen, and T.E. Golde. Identification of a novel family of presenilin homologues. *Hum Mol Genet*, 11(9):1037–44, 2002.
- [420] A. Weihofen, K. Binns, M.K. Lemberg, K. Ashman, and B. Martoglio. Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science*, 296(5576):2215–8, 2002.
- [421] A.P. Grigorenko, Y.K. Moliaka, G.I. Korovaitseva, and E.I. Rogaev. Novel class of polytopic proteins with domains associated with putative protease activity. *Biochemistry (Mosc)*, 67(7):826–35, 2002.
- [422] E. Friedmann, M.K. Lemberg, A. Weihofen, K.K. Dev, U. Dengler, G. Rovelli, and B. Martoglio. Consensus analysis of signal peptide peptidase and homologous human aspartic proteases reveals opposite topology of catalytic domains compared with presenilins. *J Biol Chem*, 279(49):50790–8, 2004.
- [423] A.C. Nyborg, A.Y. Kornilova, K. Jansen, T.B. Ladd, M.S. Wolfe, and T.E. Golde. Signal peptide peptidase forms a homodimer that is labeled by an active site-directed γ -secretase inhibitor. *J Biol Chem*, 279(15):15153–60, 2004.
- [424] M. Paetzel, A. Karla, N.C.J. Strynadka, and R.E. Dalbey. Signal peptidases. *Chem Rev*, 102(12):4549–80, 2002.
- [425] V. Kirkin, N. Cahuzac, F. Guardiola-Serrano, S. Huault, K. Lücknerath, E. Friedmann, N. Novac, W.S. Wels, B. Martoglio, A.-O. Hueber, and M. Zörnig. The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death Differ*, 14(9):1678–87, 2007.
- [426] R. Fluhrer, G. Grammer, L. Israel, M.M. Condrón, C. Haffner, E. Friedmann, C. Böhlend, A. Imhof, B. Martoglio, D.B. Teplow, and C. Haass. A γ -secretase-like intramembrane cleavage of TNF α by the GxGD aspartyl protease SPPL2b. *Nat Cell Biol*, 8(8):894–6, 2006.

- [427] E. Friedmann, E. Hauben, K. Maylandt, S. Schlegler, S. Vreugde, S.F. Lichtenthaler, P.-H. Kuhn, D. Stauffer, G. Rovelli, and B. Martoglio. SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNF α in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nat Cell Biol*, 8(8):843–8, 2006.
- [428] L. Martin, R. Fluhner, K. Reiss, E. Kremmer, P. Saftig, and C. Haass. Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b. *J Biol Chem*, 283(3):1644–52, 2008.
- [429] A.C. Nyborg, L. Herl, O. Berezovska, A.V. Thomas, T.B. Ladd, K. Jansen, B.T. Hyman, and T.E. Golde. Signal peptide peptidase (SPP) dimer formation as assessed by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) in intact cells. *Mol Neurodegener*, 1:16, 2006.
- [430] P. Krawitz, C. Haffner, R. Fluhner, H. Steiner, B. Schmid, and C. Haass. Differential localization and identification of a critical aspartate suggest non-redundant proteolytic functions of the presenilin homologues SPPL2b and SPPL3. *J Biol Chem*, 280(47):39515–23, 2005.
- [431] R.M. Page, A. Gutsmedl, A. Fukumori, E. Winkler, C. Haass, and H. Steiner. β -Amyloid precursor protein mutants respond to γ -secretase modulators. *J Biol Chem*, 285(23):17798–810, 2010.
- [432] S.F. Lichtenthaler, R. Wang, H. Grimm, S.N. Uljon, C.L. Masters, and K. Beyreuther. Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer’s disease γ -secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(6):3053–8, 1999.
- [433] J. Tan, G. Mao, M.Z. Cui, S.C. Kang, B. Lamb, B.S. Wong, M.S. Sy, and X. Xu. Effects of γ -secretase cleavage-region mutations on APP processing and A β formation: interpretation with sequential cleavage and α -helical model. *J Neurochem*, 107(3):722–33, 2008.
- [434] A. Zall, D. Kieser, N. Höttecke, E.C. Naumann, B. Thomaszewski, K. Schneider, D.T. Steinbacher, R. Schubel, S. Masur, K. Baumann, and B. Schmidt. NSAID-derived γ -secretase modulation requires an acidic moiety on the carbazole scaffold. *Bioorg Med Chem*, 19(16):4903–9, 2011.
- [435] R. Narlawar, K. Baumann, C. Czech, and B. Schmidt. Conversion of the LXR-agonist TO-901317 - from inverse to normal modulation of γ -secretase by addition of a carboxylic acid and a lipophilic anchor. *Bioorg Med Chem Lett*, 17(19):5428–31, 2007.
- [436] S. Baumann, N. Höttecke, R. Schubel, K. Baumann, and B. Schmidt. NSAID-derived γ -secretase modulators. Part III: Membrane anchoring. *Bioorg Med Chem Lett*, 19(24):6986–90, 2009.
- [437] R. Narlawar, B.I. Pérez Revuelta, K. Baumann, R. Schubel, C. Haass, H. Steiner, and B. Schmidt. N-Substituted carbazolyloxyacetic acids modulate Alzheimer associated γ -secretase. *Bioorg Med Chem Lett*, 17(1):176–82, 2007.
- [438] S. Kumar-Singh, C. De Jonghe, M. Cruts, R. Kleinert, R. Wang, M. Mercken, B. De Strooper, H. Vanderstichele, A. Löfgren, I. Vanderhoeven, H. Backhovens, E. Vanmechelen, P.M. Krosel, and C. Van Broeckhoven. Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a γ 42-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated A β ₄₂ in Alzheimer’s disease. *Hum Mol Genet*, 9(18):2589–98, 2000.
- [439] C. De Jonghe, C. Esselens, S. Kumar-Singh, K. Craessaerts, S. Serneels, F. Checler, W. Annaert, C. Van Broeckhoven, and B. De Strooper. Pathogenic APP mutations near the γ -secretase cleavage site differentially affect A β secretion and APP C-terminal fragment stability. *Hum Mol Genet*, 10(16):1665–71, 2001.
- [440] C. Guardia-Laguarta, M. Pera, J. Clarimón, J.L. Molinuevo, R. Sánchez-Valle, A. Lladó, M. Coma, T. Gómez-Isla, R. Blesa, I. Ferrer, and A. Lleó. Clinical, neuropathologic, and biochemical profile of the amyloid precursor protein I716F mutation. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69(1):53–9, 2010.
- [441] R.J. Guerreiro, M. Baquero, R. Blesa, M. Boada, J.M. Brás, M.J. Bullido, A. Calado, R. Crook, C. Ferreira, A. Frank, T. Gómez-Isla, I. Hernández, A. Lleó, A. Machado, P. Martínez-Lage, J. Masdeu, L. Molina-Porcel, J.L. Molinuevo, P. Pastor, J. Pérez-Tur, et al. Genetic screening of Alzheimer’s disease genes in Iberian and African samples yields novel mutations in presenilins and APP. *Neurobiol Aging*, 31(5):725–31, 2010.

- [442] C.B. Eckman, N.D. Mehta, R. Crook, J. Perez-Tur, G. Prihar, E. Pfeiffer, N. Graff-Radford, P. Hinder, D. Yager, B. Zenk, L.M. Refolo, C.M. Prada, S.G. Younkin, M. Hutton, and J. Hardy. A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of $A\beta_{42(43)}$. *Hum Mol Genet*, 6(12):2087–9, 1997.
- [443] K. Yoshioka, T. Miki, T. Katsuya, T. Ogihara, and Y. Sakaki. The 717Val-Ile substitution in amyloid precursor protein is associated with familial Alzheimer’s disease regardless of ethnic groups. *Biochem Biophys Res Commun*, 178(3):1141–6, 1991.
- [444] T. Luebbbers, S. Jolidon, A. Flohr, L. Ozmen, H. Jacobsen, P. David-Pierson, D. Roth, and K. Baumann. Development of selective γ -secretase modulators for the potential treatment of AD. Poster at the 10th International Conference on Alzheimer’s and Parkinson’s Disease, March 9-13, 2011.
- [445] K. Baumann, A. Flohr, E. Goetschi, H. Jacobsen, S. Jolidon, and T. Luebbbers. Modulators for amyloid β . Patent WO 2009103652, F. Hoffmann-La Roche AG, 2009.
- [446] M. Okochi, H. Steiner, A. Fukumori, H. Tanii, T. Tomita, T. Tanaka, T. Iwatsubo, T. Kudo, M. Takeda, and C. Haass. Presenilins mediate a dual intramembranous γ -secretase cleavage of notch-1. *EMBO J*, 21(20):5408–16, 2002.
- [447] G. Dormán and G.D. Prestwich. Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol*, 18(2):64–77, 2000.
- [448] G. Dormán and G.D. Prestwich. Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry*, 33(19):5661–73, 1994.
- [449] G.D. Prestwich, G. Dormán, J.T. Elliott, D.M. Marecak, and A. Chaudhary. Benzophenone photoprobes for phosphoinositides, peptides and drugs. *Photochem Photobiol*, 65(2):222–34, 1997.
- [450] E.L. Vodovozova. Photoaffinity labeling and its application in structural biology. *Biochemistry (Mosc)*, 72(1):1–20, 2007.
- [451] J.N. Rybak, S.B. Scheurer, D. Neri, and G. Elia. Purification of biotinylated proteins on streptavidin resin: a protocol for quantitative elution. *Proteomics*, 4(8):2296–9, 2004.
- [452] T.Y. Shen and C.A. Winter. Chemical and biological studies on indomethacin, sulindac and their analogs. *Adv Drug Res*, 12:90–245, 1977.
- [453] S. Scheuermann, B. Hamsch, L. Hesse, J. Stumm, C. Schmidt, D. Beher, T.A. Bayer, K. Beyreuther, and G. Multhaup. Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer’s disease. *J Biol Chem*, 276(36):33923–9, 2001.
- [454] S. Eggert, B. Midthune, B. Cottrell, and E.H. Koo. Induced dimerization of the amyloid precursor protein leads to decreased amyloid- β protein production. *J Biol Chem*, 284(42):28943–52, 2009.
- [455] A. Harmeier, C. Wozny, B.R. Rost, L.M. Munter, H. Hua, O. Georgiev, M. Beyermann, P.W. Hildebrand, C. Weise, W. Schaffner, D. Schmitz, and G. Multhaup. Role of amyloid- β glycine 33 in oligomerization, toxicity, and neuronal plasticity. *J Neurosci*, 29(23):7582–90, 2009.
- [456] T. Sato, P. Kienlen-Campard, M. Ahmed, W. Liu, H. Li, J.I. Elliott, S. Aimoto, S.N. Constantinescu, J.-N. Octave, and S.O. Smith. Inhibitors of amyloid toxicity based on β -sheet packing of $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$. *Biochemistry*, 45(17):5503–16, 2006.
- [457] L.W. Hung, G.D. Ciccotosto, E. Giannakis, D.J. Tew, K. Perez, C.L. Masters, R. Cappai, J.D. Wade, and K.J. Barnham. Amyloid- β peptide ($A\beta$) neurotoxicity is modulated by the rate of peptide aggregation: $A\beta$ dimers and trimers correlate with neurotoxicity. *J Neurosci*, 28(46):11950–8, 2008.
- [458] P. Kienlen-Campard, B. Tasiaux, J. Van Hees, M. Li, S. Huysseune, T. Sato, J.Z. Fei, S. Aimoto, P.J. Courttoy, S.O. Smith, S.N. Constantinescu, and J.-N. Octave. Amyloidogenic processing but not amyloid precursor protein (APP) intracellular C-terminal domain production requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GxxxG motifs. *J Biol Chem*, 283(12):7733–44, 2008.
- [459] Z. Ren, D. Schenk, G.S. Basi, and I.P. Shapiro. Amyloid β -protein precursor juxtamembrane domain regulates specificity of γ -secretase-dependent cleavages. *J Biol Chem*, 282(48):35350–60, 2007.

- [460] T.L. Kukar, T.B. Ladd, P. Robertson, S.A. Pintchovski, B. Moore, M.A. Bann, Z. Ren, K. Jansen-West, K. Malphrus, S. Eggert, H. Maruyama, B.A. Cottrell, P. Das, G.S. Basi, E.H. Koo, and T.E. Golde. Lysine 624 of the amyloid precursor protein (APP) is a critical determinant of amyloid β peptide length: support for a sequential model of γ -secretase intramembrane proteolysis and regulation by the amyloid β precursor protein (APP) juxtamembrane region. *J Biol Chem*, 286(46):39804–12, 2011.
- [461] Y. Ohki, T. Higo, K. Uemura, N. Shimada, S. Osawa, O. Berezovska, S. Yokoshima, T. Fukuyama, T. Tomita, and T. Iwatsubo. Phenylpiperidine-type γ -secretase modulators target the transmembrane domain 1 of presenilin 1. *EMBO J*, 30(23):4815–24, 2011.
- [462] C.J. Crump, B.A. Fish, S.V. Castro, D.-M. Chau, N. Gertsik, K. Ahn, C. Stiff, N. Pozdnyakov, K.R. Bales, D.S. Johnson, and Y.-M. Li. Piperidine acetic acid based γ -secretase modulators directly bind to Presenilin-1. *ACS Chem Neurosci*, 2(12):705–710, 2011.
- [463] T. Jumpertz, A. Rennhack, J. Ness, S. Baches, C.U. Pietrzik, B. Bulic, and S. Weggen. Presenilin is the molecular target of acidic γ -secretase modulators in living cells. *PLoS One*, 7(1):e30484, 2012.
- [464] H. Amino, A. Ishibashi, H. Hagiwara, Y. Murata, T. Sasaki, O. Takenaka, and T. Miyagawa. Pharmacology and mechanism of action of a novel γ -secretase modulator. Poster at the 10th International Conference on Alzheimer’s and Parkinson’s Disease, March 9-13, 2011.
- [465] P.J. Barrett, C.R. Sanders, S.A. Kaufman, K. Michelsen, and J.B. Jordan. NSAID-based γ -secretase modulators do not bind to the amyloid- β polypeptide. *Biochemistry*, 50(47):10328–42, 2011.
- [466] A.J. Beel, P. Barrett, P.D. Schnier, S.A. Hitchcock, D. Bagal, C.R. Sanders, and J.B. Jordan. Nonspecificity of binding of γ -secretase modulators to the amyloid precursor protein. *Biochemistry*, 48(50):11837–9, 2009.
- [467] S.S. Fan and T.Y. Shen. Membrane effects of antiinflammatory agents. 1. Interaction of sulindac and its metabolites with phospholipid membrane, a magnetic resonance study. *J Med Chem*, 24(10):1197–202, 1981.
- [468] F. Santos, L. Teixeira, M. Lúcio, H. Ferreira, D. Gaspar, J.L.F.C. Lima, and S. Reis. Interactions of sulindac and its metabolites with phospholipid membranes: an explanation for the peroxidation protective effect of the bioactive metabolite. *Free Radic Res*, 42(7):639–50, 2008.
- [469] L. Chávez-Gutiérrez, L. Bammens, I. Benilova, A. Vandersteen, M. Benurwar, M. Borgers, S. Lismon, L. Zhou, S. Van Cleynenbreugel, H. Esselmann, J. Wiltfang, L. Serneels, E. Karran, H. Gijzen, J. Schymkowitz, F. Rousseau, K. Broersen, and B. De Strooper. The mechanism of γ -secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J*, 31(10):2261–74, 2012.
- [470] A. Bachmair, D. Finley, and A. Varshavsky. *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, 234(4773):179–86, 1986.
- [471] A. Ebke, T. Luebbbers, A. Fukumori, K. Shirotani, C. Haass, K. Baumann, and H. Steiner. Novel γ -secretase enzyme modulators directly target presenilin protein. *J Biol Chem*, 286(43):37181–6, 2011.
- [472] A. Capell, R. Saffrich, J.C. Olivo, L. Meyn, J. Walter, J. Grünberg, P. Mathews, R. Nixon, C. Dotti, and C. Haass. Cellular expression and proteolytic processing of presenilin proteins is developmentally regulated during neuronal differentiation. *J Neurochem*, 69(6):2432–40, 1997.
- [473] J. Walter, J. Grünberg, A. Capell, B. Pesold, A. Schindzielorz, M. Citron, K. Mendla, P. St George-Hyslop, G. Multhaup, D.J. Selkoe, and C. Haass. Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an *in vivo* substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10):5349–54, 1997.
- [474] H. Steiner, H. Romig, M.G. Grim, U. Philipp, B. Pesold, M. Citron, R. Baumeister, and C. Haass. The biological and pathological function of the presenilin-1 Δ exon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J Biol Chem*, 274(12):7615–8, 1999.

- [475] M. Brockhaus, J. Grünberg, S. Röhrig, H. Loetscher, N. Wittenburg, R. Baumeister, H. Jacobsen, and C. Haass. Caspase-mediated cleavage is not required for the activity of presenilins in amyloidogenesis and notch signaling. *Neuroreport*, 9(7):1481–6, 1998.
- [476] F. Sanger, S. Nicklen, and A.R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–7, 1977.
- [477] H. Schägger and G. von Jagow. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166(2):368–79, 1987.
- [478] J. Wiltfang, A. Smirnov, B. Schnierstein, G. Kelemen, U. Matthies, H.W. Klafki, M. Staufienbiel, G. Hüther, E. Rüther, and J. Kornhuber. Improved electrophoretic separation and immunoblotting of β -amyloid ($A\beta$) peptides 1-40, 1-42, and 1-43. *Electrophoresis*, 18(3-4):527–32, 1997.

IUPAC-Namen der verwendeten Substanzen

Die IUPAC-Namen aller verwendeten Substanzen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt, mit Ausnahme von RO-53 und RO-54, die aus patentrechtlichen Gründen nicht gezeigt werden können.

Substanz	IUPAC-Name
L-685,458	<i>N</i> -{(2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-2-Benzyl-5-[(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)amino]-4-hydroxy-6-phenylhexanoyl}-L-leucyl-L-phenylalaninamid
DAPT	<i>tert</i> -Butyl (2 <i>S</i>)-({ <i>N</i> -[(3,5-difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl}-amino)(phenyl)acetat
LY-411,575	<i>N</i> ² -[(2 <i>S</i>)-2-(3,5-Difluorophenyl)-2-hydroxyethanoyl]- <i>N</i> ¹ -[(7 <i>S</i>)-5-methyl-6-oxo-6,7-dihydro-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>b</i> , <i>d</i>]azepin-7-yl]-L-alaninamid
Begacestat	5-Chloro- <i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-3,3,3-trifluoro-1-(hydroxymethyl)-2-(trifluoromethyl)propyl]thiophen-2-sulfonamid
RO-02	2-{6-(4-Chloro-benzyl)-2-[3-methoxy-4-(4-methyl-imidazol-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-propan-2-ol
RO-03	2-[2-[3-Methoxy-4-(4-methyl-imidazol-1-yl)-phenylamino]-6-(4-trifluoromethyl-phenyl)-pyrimidin-4-yl]-propan-2-ol
RO-57	[3-Methoxy-4-(4-methyl-imidazol-1-yl)-phenyl]-(4-methoxy-6-methyl-pyrimidin-2-yl)-amin
RO-57-BpB	<i>N</i> -(1-(4-(4-(2-(3-Methoxy-4-(4-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)phenylamino)-6-methylpyrimidin-4-yl)oxy)benzoyl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatetradecan-14-yl)-5-((3 <i>aS</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>aR</i>)-2-oxohexahydro-1 <i>H</i> -thieno[3,4- <i>d</i>]imidazol-4-yl)pentanamid
ES 1	1-[(<i>S</i>)-1-(4-Fluoro-phenyl)-ethyl]-3-[1-[3-methoxy-4-(4-methyl-imidazol-1-yl)-phenyl]-meth-(<i>E</i>)-yliden]-piperidin-2-on
ES 2	(4 <i>R</i> ,9 <i>aS</i> , <i>E</i>)-7-(3-Methoxy-4-(4-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)benzyliden)-4-(3,4,5-trifluorophenyl)hexahydropyrido[2,1- <i>c</i>][1,4]-oxazin-6(1 <i>H</i>)-on
TP 1	<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ¹ -Diethyl-4-methyl- <i>N</i> ³ -{4-[6-(4-methyl-imidazol-1-yl)-pyridin-3-yl]-thiazol-2-yl}-benzen-1,3-diamin
TP 2	<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ¹ -Diethyl-4-methyl- <i>N</i> ³ -{4-[4-(4-methyl-imidazol-1-yl)-phenyl]-thiazol-2-yl}-benzen-1,3-diamin
Sulindac Sulfid	2-[6-Fluoro-2-methyl-3-[(4-methylsulfanylphenyl)methyliden]inden-1-yl]acetat
Sulindac Sulfon	2-[6-Fluoro-2-methyl-3-[(4-methylsulfonylphenyl)methyliden]inden-1-yl]acetat
Indomethacin	2-[1-(4-Chloro-benzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl]acetat
inaktives Indomethacinderivat 1	<i>N</i> -{2-[1-(4-Chloro-benzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl]-acetyl}-methansulfonamid
inaktives Indomethacinderivat 2	<i>N</i> -{2-[1-(4-Chloro-benzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl]-acetyl}-benzensulfonamid
GSM-1	[(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-[(<i>R</i>)-1-(4-Chloro-phenyl)-4-methyl-pentyl]-2-(4-trifluoromethyl-phenyl)-piperidin-4-yl]-acetat
Fenofibrat	Propan-2-yl 2-{4-[(4-chlorophenyl)carbonyl]phenoxy}-2-methyl-propanoat
TO-901317	<i>N</i> -(2,2,2-Trifluoro-ethyl)- <i>N</i> -[4-(2,2,2-tri-fluoro-1-hydroxy-1-trifluoromethyl-ethyl)-phenyl]-benzensulfonamid

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
A β	Amyloid β -Peptid
Abb.	Abbildung
ADAM	Disintegrin- und Metalloprotease (engl. <i>A disintegrin and metalloproteinase</i>)
AICD	APP intrazelluläre Domäne (engl. <i>APP intracellular domain</i>)
APH-1	engl. <i>Anterior pharynx-defective phenotype 1</i>
APLP	Homolog des APP (engl. <i>APP like protein</i>)
APP	Amyloid Vorläufer Protein (engl. <i>amyloid precursor protein</i>)
APP- α CTF	α -C-terminales Fragment des APP, Produkt der Spaltung von APP durch ADAM-10
APP- β CTF	β -C-terminales Fragment des APP, Produkt der Spaltung von APP durch BACE1
APS	Ammoniumperoxid
AS	Aminosäure(n)
BACE	β -APP schneidendes Enzym (engl. <i>β-APP cleaving enzyme</i>)
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumine</i>)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHAPSO	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy- 1-propansulfonat
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins oder Peptids
CTF	C-terminales Fragment
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltopyranosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL-IA	Elektrochemolumineszenz-Immunoassay (engl. <i>SIA, sandwich immunosorbent assay</i>)
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FAD	familiäre Alzheimer Erkrankung (engl. <i>familial Alzheimer's disease</i>)
F-NEXT	Flag-markiertes Notch1-Konstrukt ohne Ektodomäne (engl. <i>Flag-tagged Notch1ΔE construct</i>)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
ggf.	gegebenenfalls
GSI	γ -Sekretaseinhibitor
GSM	γ -Sekretasemodulator
GSM-1	γ -Sekretasemodulator-1
h	Stunde(n)

HEK-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzellen (engl. <i>human embryonic kidney cells</i>)
IB	Immunoblot
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration; Konzentration eines Inhibitors, bei der 50% der maximalen Inhibition beobachtet wird
ICD	Intrazelluläres Fragment (engl. <i>intracellular domain</i>)
i-CliP	Intramembranprotease (engl. <i>intramembrane cleaving protease</i>)
i.d.R.	in der Regel
IP	Immunpräzipitation
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Medium für Bakterienkulturen (engl. <i>lysogeny broth</i>)
min.	Minuten
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins oder Peptids
NCT	Nicastrin
NFB	Neurofibrilläre Bündel
NICD	Notch1 intrazelluläre Domäne (engl. <i>Notch1 intracellular domain</i>)
NMR-Spektroskopie	Kernspinresonanz-Spektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NSAID	nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente (engl. <i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>)
NTF	N-terminales Fragment
OD	optische Dichte
PAS	Protein-A-Sepharose
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PEN-2	Presenilin Verstärker Protein 2 (engl. <i>Presenilin enhancer 2</i>)
PGS	Protein-G-Sepharose
PI-Mix	Proteaseinhibitormix complete (Roche)
PFP	Preflagellinpeptidasen
PS	Presenilin
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sAPP α	lösliches APP α -Fragment (engl. <i>soluble APPα</i>)
sAPP β	lösliches APP β -Fragment (engl. <i>soluble APPβ</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek.	Sekunden
sog.	sogenannte (-er, -es)
SP-Sepharose	Sulfopropyl-Sepharose
SPP	Signalpeptidpeptidase

SPPL	Homologe der Signalpeptidpeptidase (engl. <i>signal peptide peptidase like</i>)
SPR-Spektroskopie	Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (engl. <i>surface plasmon resonance</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
TFPP	Typ 4-Prepilinpeptidase
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TMD	Transmembrandomäne
U	<i>Units</i> , 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Substratumsatz unter angegebenen Bedingungen
ü.N.	über Nacht
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen(teile)
WKA-Agarose	Weizenkeimagglutinin-Agarose
WT	Wildtyp
z.T.	zum Teil

Aminosäuren

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

Nukleobasen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanidin
T	Thymin

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle all denen danke sagen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes danke ich Prof. Dr. Christian Haass und Prof. Dr. Harald Steiner ganz herzlich für die Anbahnung des Projekts mit der ZNS-Abteilung von F. Hoffmann-La Roche Ltd. Dieses Projekt nahm einen Großteil meiner Dissertation ein und stellte sich als sehr spannend und lohnenswert heraus. Außerdem danke ich beiden für die Bereitstellung der Materialien und des Arbeitsplatzes. Insbesondere gilt mein herzlicher Dank Prof. Dr. Harald Steiner, der mich über die gesamte Arbeit betreut und kontinuierlich unterstützt hat. Er hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein großer Dank geht auch an PD Dr. Konstanze Winklhofer, die die Vertretung vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie sowie mein Erstgutachten übernommen hat. Auch den weiteren Prüfungskommissionsmitgliedern, besonders Prof. Dr. Jochen Herms und PD Dr. Stylianos Michalakis für die Beteiligung an der mündlichen Prüfung, sowie Prof. Dr. Martin Biel und Prof. Dr. Stefan Zahler danke ich für ihr Engagement.

Bei der Zusammenarbeit mit F. Hoffmann-La Roche Ltd. möchte ich ganz besonders Dr. Karlheinz Baumann hervorheben. Er war ein zuverlässiger Ansprechpartner bei allen Fragen rund um GSMs und ich habe ihn als kompetenten und hilfsbereiten externen Betreuer schätzen gelernt. Weiter danke ich Robert Schubeneil und Viviane Anquez für technische Hilfe und Unterstützung während meiner Aufenthalte bei F. Hoffmann-La Roche Ltd. Dr. Thomas Luebbers sei herzlichen Dank für die Synthese von RO-57-BpB, denn ohne diesen GSM wären die Ergebnisse des zweiten Teils der Arbeit nicht möglich gewesen. Sowohl Dr. Baumann als auch Dr. Luebbers stellten auch über das Ende des Projekts hinaus immer wieder GSMs zur Verfügung, was nicht selbstverständlich ist. Weiter gilt mein Dank auch Dr. Georg Schmid und seinen Mitarbeitern für die Kultivierung von HEK293S-Zellen und Bereitstellung von Zellpellets für die γ -Sekretasereinigung.

Weiter gilt mein Dank besonders Dr. Richard Page für die gute Zusammenarbeit bei seinem APP-Projekt und Dr. Akio Fukumori für die Messung der Massenspektren sowie für viele hilfreiche wissenschaftliche Diskussionen. Edith Winkler hat mich in die experimentelle Arbeit mit der γ -Sekretase eingeführt und wusste bei technischen Problemen sehr oft weiter. Ein Dankeschön geht auch an Gabi Basset, Brigitte Nuscher und Sabine Odoy für die technische Unterstützung sowie an Dr. Keiro Shirotani für die von ihm hergestellten Zelllinien und an PD Dr. Regina Fluhner für die Antikörper gegen SPP, SPPL2a und SPPL3. Zur guten Atmosphäre im γ -Sekretaselabor hat für mich v.a. mein Labor-Sparringspartner Benedikt Kretner beigetragen, mit dem längere Abende im Labor nie langweilig wurden. Außerdem danke ich Dr. Peer-Hendrik Kuhn für anregende wissenschaftliche Diskussionen und wichtige technische Tips. Weiter möchte ich Daniel Fleck, Matthias Voss, Anna Pilsel, Teresa Bachhuber nennen, aber auch allen anderen aus dem Haass-Labor, die ich jetzt nicht mit Namen erwähnt habe, sei an dieser Stelle ausdrücklich für die gute Zusammenarbeit gedankt.

Mein abschließender Dank gilt meiner Familie: Meine Schwiegereltern Helga und Hartmut Ebke haben mich wie echte Eltern stets moralisch unterstützt und damit erheblich zum Gelingen der Dissertation beigetragen. Ganz besonders danke ich aber meinem Mann Johannes, der stets an meiner Seite steht und mit dem ich nicht zuletzt auch die Leidenschaft für naturwissenschaftliche Fragestellungen teile.

Diese Arbeit wurde durch das Graduiertenprogramm "Protein Dynamics in Health and Disease" im Rahmen des Elitenetzwerks Bayern sowie durch die DFG gefördert.

Lebenslauf Amelie Ebke, geb. Gutsmedl

Die privaten Informationen aus dem Lebenslauf sind aus Gründen des Datenschutzes in der Online-Version nicht enthalten.

Publikationen

R.M. Page, **A. Gutschmiedl**, A. Fukumori, E. Winkler, C. Haass, and H. Steiner. β -Amyloid precursor protein mutants respond to γ -secretase modulators. *J Biol Chem*, 285(23):17798-810, 2010.

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

A. Ebke, T. Luebbbers, A. Fukumori, K. Shirotani, C. Haass, K. Baumann, and H. Steiner. Novel γ -secretase enzyme modulators directly target presenilin protein. *J Biol Chem*, 286(43):37181-6, 2011.

E. Winkler, F. Kamp, J. Scheuring, **A. Ebke**, A. Fukumori, H. Steiner. Generation of Alzheimer disease-associated $A\beta_{42/43}$ by γ -secretase can directly be inhibited by modulation of membrane thickness. *J Biol Chem* 2012, 287(25): 21326-34.

Posterpräsentationen und Vorträge bei internationalen Konferenzen

9. Eibsee-Meeting “Cellular Mechanisms of Alzheimer’s Disease”, Grainau, 11.-14. Nov. 2009: Modulation of $A\beta$ generation is effective for FAD-associated and artificial mutations of APP. R.M. Page, **A. Gutschmiedl**, A. Fukumori, E. Winkler, C. Haass and H. Steiner. (Poster)

10. International Conference on Alzheimer’s and Parkinson’s Diseases, Barcelona, 9.-13. März 2011: *In vitro* characterization of novel $A\beta_{42}$ -lowering γ -secretase modulators. **A. Gutschmiedl**, A. Fukumori, B. Kretner, R.M. Page, T. Luebbbers, E. Winkler, C. Haass, K. Baumann and H. Steiner. (Poster)

7. Fabisch Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology - Regulated Intramembrane Proteolysis in Cancer Development and Neurodegenerative Diseases, Potsdam, 5.-7. Okt. 2011: Novel γ -secretase modulators directly target presenilin. **A. Ebke**. (Vortrag)

11. Eibsee-Meeting “Cellular Mechanisms of Neurodegeneration”, Grainau, 12.-15. Okt. 2011: Novel γ -secretase modulators directly target presenilin. **A. Ebke**, T. Luebbbers, A. Fukumori, K. Shirotani, K. Baumann, C. Haass and H. Steiner. (Poster)

Publikationen

Seite 151 - 163:

R.M. Page, **A. Gutsmedl**, A. Fukumori, E. Winkler, C. Haass, and H. Steiner. β -Amyloid precursor protein mutants respond to γ -secretase modulators. *J Biol Chem*, 285(23):17798-810, 2010.

Seite 164 - 178:

A. Ebke, T. Luebbers, A. Fukumori, K. Shirovani, C. Haass, K. Baumann, and H. Steiner. Novel γ -secretase enzyme modulators directly target presenilin protein. *J Biol Chem*, 286(43):37181-6, 2011. (mit ergänzenden Informationen)

β -Amyloid Precursor Protein Mutants Respond to γ -Secretase Modulators*[†]

Received for publication, January 29, 2010, and in revised form, March 25, 2010. Published, JBC Papers in Press, March 26, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.103283

Richard M. Page, Amelie Gutsmedl, Akio Fukumori, Edith Winkler, Christian Haass¹, and Harald Steiner²

From the German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) and Adolf-Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, 80336 Munich, Germany

Pathogenic generation of the 42-amino acid variant of the amyloid β -peptide ($A\beta$) by β - and γ -secretase cleavage of the β -amyloid precursor protein (APP) is believed to be causative for Alzheimer disease (AD). Lowering of $A\beta_{42}$ production by γ -secretase modulators (GSMs) is a hopeful approach toward AD treatment. The mechanism of GSM action is not fully understood. Moreover, whether GSMs target the $A\beta$ domain is controversial. To further our understanding of the mode of action of GSMs and the cleavage mechanism of γ -secretase, we analyzed mutations located at different positions of the APP transmembrane domain around or within the $A\beta$ domain regarding their response to GSMs. We found that $A\beta_{42}$ -increasing familial AD mutations of the γ -secretase cleavage site domain responded robustly to $A\beta_{42}$ -lowering GSMs, especially to the potent compound GSM-1, irrespective of the amount of $A\beta_{42}$ produced. We thus expect that familial AD patients carrying mutations at the γ -secretase cleavage sites of APP should respond to GSM-based therapeutic approaches. Systematic phenylalanine-scanning mutagenesis of this region revealed a high permissiveness to GSM-1 and demonstrated a complex mechanism of GSM action as other $A\beta$ species ($A\beta_{41}$, $A\beta_{39}$) could also be lowered besides $A\beta_{42}$. Moreover, certain mutations simultaneously increased $A\beta_{42}$ and the shorter peptide $A\beta_{38}$, arguing that the proposed precursor-product relationship of these $A\beta$ species is not general. Finally, mutations of residues in the proposed GSM-binding site implicated in $A\beta_{42}$ generation (Gly-29, Gly-33) and potentially in GSM-binding (Lys-28) were also responsive to GSMs, a finding that may question APP substrate targeting of GSMs.

Alzheimer disease (AD)³ is the most common neurodegenerative disorder worldwide. The β -amyloid precursor protein (APP), a type I membrane protein, plays a central role in the pathogenesis of the disease (1). Sequential cleavage of APP by β - and γ -secretase generates the amyloid- β ($A\beta$) peptide, which deposits as plaques in the brain of affected patients and represents one of the principal pathological hallmarks of the disease (1). γ -Secretase is an intramembrane-cleaving protease complex, which cleaves the APP transmembrane domain (TMD) in a progressive, stepwise manner via cleavages at the ϵ -, ζ -, and γ -sites until it is sufficiently shortened to allow the release of $A\beta$ from the membrane (2–4). $A\beta$ peptides generated by γ -secretase cleavage differ in their C termini. The major product released is $A\beta_{40}$, whereas $A\beta_{38}$ and $A\beta_{42}$ represent minor species (1). The highly aggregation-prone, neurotoxic $A\beta_{42}$ is believed to be causative for AD by initiating a cascade of pathogenic events, which ultimately causes neurodegeneration and dementia (1). Increased production of $A\beta_{42}$ underlies the vast majority of mutations associated with familial AD (FAD), which manifests with a very early disease onset. The majority of FAD mutations have been found in PS1, the catalytic subunit of γ -secretase (5), whereas only a few mutations were found in its homolog PS2. Few FAD-associated mutations were also found in APP, and those that affect γ -secretase cleavage toward an increased $A\beta_{42}$ production localize to the C terminus of the APP TMD in the vicinity of the γ -secretase cleavage sites. Fluorescence resonance energy transfer-based studies suggest that changes in the generation of $A\beta_{42}$ are due to alterations in the conformation of PS (6–10).

Inhibition of $A\beta_{42}$ production is a major approach to therapeutically target AD. Selective $A\beta_{42}$ -lowering drugs, so-called γ -secretase modulators (GSMs) such as certain non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), have been identified as promising and attractive alternatives to inhibitors of γ -secretase, which target the active site and thus affect the processing of other physiologically important γ -secretase substrates, such as Notch1 (11). GSMs inhibit $A\beta_{42}$ production with little effect on $A\beta_{40}$ generation and the processing of other important γ -secretase substrates (12). Inhibition of $A\beta_{42}$ by these compounds is accompanied by an increased production of $A\beta_{38}$ (13). Because inverse modulators have also been identified (14), it was initially believed that the production of these peptides is

* This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Collaborative Research Center (SFB596) "Molecular Mechanisms of Neurodegeneration" (to H. S. and C. H.)) and the Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie ("Degenerative Dementias: Target identification, Validation and Translation into Treatment Strategies" (to C. H. and H. S.)), the Alzheimer Research Award of the Hans and Ilse Breuer Foundation (to H. S.), and the Center for Integrated Protein Science Munich.

[†] This article was selected as a Paper of the Week.

¹ Supported by a research professorship from The LMUexcellent program. To whom correspondence may be addressed: German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) and Adolf-Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, Schillerstr. 44, 80336 Munich, Germany. Tel.: 49-89-2180-75471; Fax: 49-89-2180-75415; E-mail: christian.haass@med.uni-muenchen.de.

² To whom correspondence may be addressed: German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) and Adolf-Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, Schillerstr. 44, 80336 Munich, Germany. Tel.: 49-89-2180-75480; Fax: 49-89-2180-75415; E-mail: harald.steiner@med.uni-muenchen.de.

³ The abbreviations used are: AD, Alzheimer disease; FAD, familial AD; $A\beta$, amyloid β -peptide; APP, β -amyloid precursor protein; GSM, γ -secretase modulator; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; PS, presenilin; TMD, transmembrane domain; WT, wild type; HEK, human embryonic kidney; Bicine, *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)glycine.

interdependent, pointing to the possibility that $A\beta_{42}$ might represent the precursor of $A\beta_{38}$. Evidence has been presented that $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ derive from two different product lines by stepwise cleavage roughly every three residues at positions $\epsilon 49$ – $\zeta 46$ – $\gamma 43$ – $\gamma 40$ and $\epsilon 48$ – $\zeta 45$ – $\gamma 42$ of the $A\beta$ domain, from which cleavages occur further downstream to generate $A\beta_{39}$, $A\beta_{38}$, and $A\beta_{37}$ (15, 16), with $A\beta_{38}$ primarily originating from the $A\beta_{42}$ -generating product line (16). In addition, dimerization of the APP TMD mediated by its central GXXXG helix-interaction motif has been suggested to affect the formation of $A\beta_{42}$ (17). Substitution of the glycine residues to reduce APP TMD dimerization was shown to lower the production of $A\beta_{42}$, whereas increasing that of $A\beta_{38}$ (17). Mechanistically, it was suggested that dimerization via the GXXXG motif imposes a sterical hindrance for γ -secretase to proceed with stepwise processing such that $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ are normally released as final products. Decreasing dimerization strength would resolve this sterical constraint, now allowing γ -secretase to efficiently proceed to more N-terminal cleavage sites, thus generating shorter $A\beta$ species, mostly $A\beta_{38}$ (17). Interestingly, the GXXXG sequence is part of a GSM-binding site mapped to residues $A\beta 29$ – 36 (GAIIGLMV) in the APP TMD (18). This region is known to be critical for $A\beta$ aggregation (19–21), and aggregation inhibitors interacting with this region also act as GSMs (18). However, a recent study demonstrated that dimerization *per se* might not be a factor that determines γ -secretase cleavage specificity (22), and whether GXXXG mutants inhibit dimerization is controversial (23). In addition, the lack of a consistent response to GSMs regarding an inversely correlated production of $A\beta_{42}$ and $A\beta_{38}$ by PS FAD mutants observed earlier argued against a strict precursor-product relationship between $A\beta_{42}$ and $A\beta_{38}$ (24, 25). Moreover, while this manuscript was in preparation, a biophysical study failed to demonstrate GSM-binding to the APP substrate, however, and suggested that the reported GSM-APP interaction (18) was unspecific (26).

Interestingly, lowering of $A\beta_{42}$ by GSMs is not effective for the majority of the PS FAD mutants investigated so far. In particular, aggressive FAD mutants that manifest with a very early disease onset due to their strongly increased $A\beta_{42}$ production do not respond at all, whereas increased $A\beta_{38}$ production was nevertheless still observed (24, 25). Whether or not APP FAD mutants respond to GSMs has not been conclusively studied yet, however (27). To address this question specifically as well as to gain a greater understanding of the mode of action of GSMs, in particular in light of the controversial data regarding the mechanism and binding site, we decided to study the action of GSMs on APP cleavage by γ -secretase in more detail. Analysis of FAD-associated APP mutations in the γ -secretase cleavage site region together with systematic phenylalanine-scanning mutagenesis of this region showed that all mutants respond robustly to the potent γ -secretase modulator GSM-1 (24), which was used as the principal GSM in this study, independent of the amount of $A\beta_{42}$ produced by the mutant. Thus, unlike the majority of FAD mutants in PS1, APP TMD mutants at the γ -secretase cleavage sites are susceptible to GSMs, suggesting that the respective APP FAD mutant carriers should positively respond to GSM-based AD therapies. However, $A\beta_{42}$ and $A\beta_{38}$ generation was not strictly coupled, further arguing against a

general mechanistic relationship for the generation of these $A\beta$ species. Furthermore, GSM treatment was also found to lower $A\beta_{39}$ and $A\beta_{41}$ generation, demonstrating considerable imprecision and flexibility in the modulation of γ -secretase cleavage specificity in response to GSMs. Finally, we also investigated the impact of mutants close to or within the proposed GSM-binding site in the APP TMD. Because such mutants give rise to mutant $A\beta$ species, these were also investigated in cell-free assays using purified γ -secretase and APP substrate (28) to circumvent potentially altered cellular metabolic fates of the mutant peptides in cultured cells. In both cell-based and cell-free assays, we found that GSM treatment could still effect changes in the ratios of $A\beta$ species generated, a finding that may question GSM-binding within the $A\beta$ domain.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies—Monoclonal antibody 2D8 against $A\beta 1$ –16 and polyclonal antibody 3552 to $A\beta 1$ –40 were described previously (29, 30). Monoclonal antibody 4G8 against $A\beta 17$ –24 was obtained from Covance. The C-terminal specific anti- $A\beta_{38}$ antibody was obtained from Meso Scale Discovery, and C-terminal specific anti- $A\beta_{40}$ (BAP24) and anti- $A\beta_{42}$ (BAP15) antibodies were a kind gift of Dr. Manfred Brockhaus (Roche).

cDNA Constructs—cDNA encoding APP^{sw}-6myc (31) was recloned into pcDNA3.1/zeo(+) (Invitrogen). The given mutations were generated in this and in the C99-6myc construct (31) by QuikChange mutagenesis (Stratagene) using oligonucleotide primers encoding the respective point mutations. Likewise, QuikChange mutagenesis was used to generate C100-His₆ mutant substrate constructs in pQE60::C100-His₆. These were expressed in *Escherichia coli* and purified as described (32).

Cell Culture and cDNA Transfections—Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum and penicillin/streptomycin on poly-L-lysine-coated plates. Cells were plated at a density of 200,000 cells/24-well plate or 1,000,000 cells/6-well plate, and the following day, cells were transiently transfected with the indicated APP cDNAs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Suspension-adapted HEK293S cells were cultivated in instrumented 10-liter bioreactors using a Roche Applied Science proprietary serum-free hydrolysate-containing culture medium.

Analysis of Secreted $A\beta$ from Cultured Cells—Following transfection, HEK293 cells were incubated for 24 h before media change and overnight incubation for 16 h in the presence of sulindac sulfide, flurbiprofen, or fenofibrate (all Sigma), GSM-1 (kind gift of Dr. Karlheinz Baumann, Roche), or vehicle control (dimethyl sulfoxide (DMSO)). Conditioned media were then collected and immediately analyzed by sandwich immunoassay to quantify $A\beta$ species, or following immunoprecipitation, subjected to Tris-Bicine urea SDS-PAGE or mass spectrometry analysis. For $A\beta$ quantitation, drug treatments were performed in triplicate, and all media samples were measured in duplicate for $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$. For the analysis of modulation, data are always plotted as the percentage of change in the concentration of $A\beta$ species from vehicle-treated cells, which are normalized to 100% for each cell line.

APP Mutants Respond to GSMs

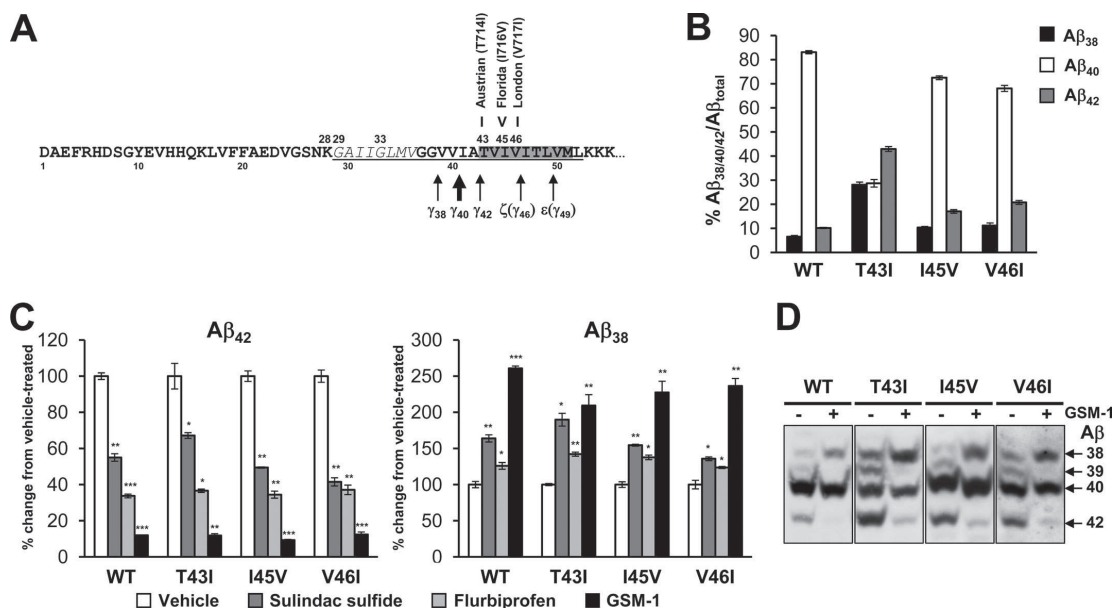


FIGURE 1. Effect of GSM-1 on A β species of APP FAD mutants. *A*, schematic of the APP amino acid sequence encompassing the A β peptide and the transmembrane region of APP (*underlined*). Amino acids are numbered from position 1 of the A β peptide, and *arrows* indicate the positions of γ -secretase cleavage. The location of APP FAD mutations selected for analysis together with the corresponding mutant amino acids are indicated above the sequence. The amino acids subjected to phenylalanine scan are *boxed in gray* and contain the I45F and V46F mutants as additional FAD mutations. The reported GSM-binding site in APP is shown in *italics*. *B*, sandwich immunoassay of A β ₃₈, A β ₄₀, and A β ₄₂ species from conditioned media of cells overexpressing WT or the indicated APP FAD mutants. A β ₄₂ is increased for the three FAD mutants analyzed. Strikingly, in addition to a dramatic increase in A β ₄₂ for T43I, A β ₃₈ is also increased at the expense of A β ₄₀. Each species is plotted as a percentage of the total A β (A β ₃₈ + A β ₄₀ + A β ₄₂) measured for each cell line. *Bars* represent the mean of 6 experiments with *error bars* indicating the S.E. *C*, sandwich immunoassay showing the effect of 50 μ M sulindac sulfide, 250 μ M flurbiprofen, or 1 μ M GSM-1 treatment on A β ₄₂ (*left panel*) and A β ₃₈ (*right panel*) in cells expressing WT or the indicated APP FAD mutants. GSM-1 has the highest modulation potency for both species of A β , and all mutants respond to treatment by decreasing A β ₄₂ and increasing A β ₃₈ to a similar extent as WT. Both A β species can also be effectively modulated with the other less potent compounds. *Bars* represent the mean of 3 experiments with *error bars* indicating the S.E. Statistical significance is calculated by paired Student's *t* test (two-tailed distribution); ***, *p* < 0.001, **, *p* < 0.01, *, *p* < 0.05. *D*, Tris-Bicine urea SDS-PAGE analysis of A β species from cells expressing WT or the indicated APP FAD mutants upon 1 μ M GSM-1 treatment. A β ₃₉ appears as a prominent species for T43I and V46F, and interestingly, this is also abolished along with A β ₄₂ upon GSM-1 treatment.

γ -Secretase *In Vitro* Assays— γ -Secretase was purified as described previously (28) except that HEK293S cells (kind gift of Georg Schmid and Elvira da Silva, Roche) were used as an enzyme source. *In vitro* γ -secretase activity was assessed as described using purified γ -secretase (Q-Sepharose eluate) and purified WT and mutant C100-His₆ substrates in the presence or absence of GSM-1 or fenofibrate (28).

Quantification of A β —Secreted A β peptides in conditioned medium were quantified by a sandwich immunoassay using the Meso Scale Discovery SECTOR Imager 2400 as described previously (24). Quantification of total A β used essentially the same procedure except that for detection, 4G8 mouse monoclonal and ruthenylated anti-mouse antibodies were used in combination. For more sensitive detection of A β species (for the Phe mutants), the Meso Scale Discovery A β triplex sandwich immunoassay was used. Here, Meso Scale Discovery C-terminal specific antibodies were instead prespotted into each well, and a ruthenylated 6E10 antibody was used as the detection antibody. Meso Scale Discovery A β peptide standards were used for the Meso Scale Discovery triplex immunoassay. A β peptides generated by γ -secretase *in vitro* assays were quantified using the Meso Scale Discovery sandwich immunoassay as described (28).

SDS-PAGE and Mass Spectrometry Analysis of A β —Secreted A β was analyzed from medium conditioned overnight for 16 h by combined immunoprecipitation/immunoblotting using antibodies 3552/2D8 followed by Tris-Bicine urea SDS-PAGE (33). To analyze A β by mass spectrometry, A β species were immunoprecipitated from conditioned media or from γ -secretase *in vitro* assays using antibody 4G8 and subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry analysis as described previously (24, 28).

RESULTS

FAD Mutants in the γ -Secretase Cleavage Site Region Respond to GSMs—To address the question whether APP FAD mutants respond to GSM treatment, we introduced the Austrian T43I (T714I), Florida I45V (I716V), and London V46I (V717I) (34–36) mutations into APPsw-6myc, a well characterized and frequently used APP substrate (31), which was used as backbone for these and all other mutants of the APP TMD (Fig. 1A) analyzed in this study. The cDNA constructs were transiently transfected into HEK293 cells, and levels of secreted A β species generated by WT APP and the APP FAD mutants were analyzed by a highly sensitive specific A β immunoassay, which allows the detection and quantitation of A β ₃₈, A β ₄₀, and A β ₄₂

species (24, 29). As expected, the ratios of $A\beta_{42}$ to total $A\beta$ (i.e. the sum of $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$, and $A\beta_{42}$) were increased for all mutants (Fig. 1B). The strongest increase was observed for the T43I mutant. Unexpectedly, this mutant also showed a strongly increased $A\beta_{38}/A\beta_{total}$ ratio, whereas that of $A\beta_{40}/A\beta_{total}$ was reduced. This behavior was not observed for the I45V and V46I FAD mutants and appeared to be characteristic for the T43I mutant. We thus conclude that certain FAD mutants occurring in the APP TMD can increase $A\beta_{38}$ and $A\beta_{42}$ in parallel.

We next screened various GSMs to see whether the increased levels of $A\beta_{42}$ produced from these mutants could be lowered. As shown in Fig. 1C, all GSMs were effective. GSM-1, a previously described GSM that is effective in the low micromolar range (24, 28), was overall the most potent compound with regard to modulation of the APP mutants. This GSM was capable of strongly reducing $A\beta_{42}$ production from WT APP as well as from all three FAD mutants. The reduction of $A\beta_{42}$ levels observed was $\sim 90\%$ as compared with the untreated controls. Consistent with previous results (24), GSM-1 increased the levels of $A\beta_{38}$ produced from WT APP. Likewise, a robust increase of $A\beta_{38}$ was also observed for the T43I, I45V, and V46I mutants. The NSAIDs sulindac sulfide and flurbiprofen were capable of reducing $A\beta_{42}$ production for these mutants to a similar extent to WT APP, although flurbiprofen was more potent in this regard. Sulindac sulfide was more potent than flurbiprofen with regard to the modulation of $A\beta_{38}$ levels, although all mutants responded by increasing $A\beta_{38}$ upon treatment with either compound (Fig. 1C). As GSM-1 was the most effective modulator, we focused on this compound for the analysis of $A\beta$ species by Tris-Bicine urea SDS-PAGE, which allows an effective separation of $A\beta$ species. The modulatory effects were confirmed, and in addition, this analysis showed that the production of $A\beta_{39}$ was reduced by GSM-1 treatment as well (Fig. 1D). Taken together, these data show that FAD mutants within the APP TMD that change the specificity of γ -secretase cleavage and thereby increase the production of $A\beta_{42}$ are susceptible to different GSMs. GSM-1-mediated inhibition of $A\beta_{42}$ generation is accompanied by an increased production of $A\beta_{38}$, a strong inhibition of $A\beta_{39}$, but has little effect on $A\beta_{40}$. Since GSM-1 elicited the most potent effects with regard to both $A\beta_{42}$ and $A\beta_{38}$ modulation, this compound was used as the principal GSM for all subsequent modulation experiments in this study.

Phenylalanine Mutants of the γ -Secretase Cleavage Site Region Respond to GSM-1—To investigate whether mutations of the γ -secretase cleavage site region of APP are generally susceptible to GSM-1 as shown above for a subset of FAD mutants, we next analyzed previously described phenylalanine mutants, which span the region between the γ - and ϵ -cleavage sites and thus allow a systematic analysis of the GSM-1 response to mutants within this region (37, 38). These well characterized Phe mutants cover the sequence from A β 43–51 of the A β domain and include two other FAD mutants, the Spanish I45F (I716F) (39) and the V46F (V717F) Indiana mutation (40). Analysis of the profile of the $A\beta$ species generated by these mutants by Tris-Bicine urea SDS-PAGE was entirely consistent with that of the previous reports (37, 38) (Fig. 2A). Each mutant affected the profile of $A\beta$ species produced by γ -secretase in an

individual and characteristic manner. In agreement with the previous results (37, 38), the most striking changes were observed for the V44F, I45F, I47F, and V50F mutants. The I45F mutant produced the lowest amount of $A\beta_{40}$ and the highest amount of $A\beta_{42}$, whereas the V50F mutant produced almost exclusively $A\beta_{40}$. Similarly, the V44F and I47F mutants produced very little $A\beta_{42}$, but interestingly, both gave rise to the production of an alternative $A\beta$ species, which migrated somewhat slower than $A\beta_{42}$ and apparently represented $A\beta_{41}$ (37, 38). Consistent with the previous reports (37, 38), the T43F–V46F mutants produced higher levels of the shorter $A\beta$ variants $A\beta_{38}$ and $A\beta_{39}$ than the T48F–V50F mutants. The highest level of $A\beta_{38}$ was observed for the V44F mutant, which did not generate detectable levels of $A\beta_{39}$. Only small amounts of $A\beta_{37}$ were produced for WT APP and all of the Phe mutants.

Having confirmed the characteristic $A\beta$ profile for each mutant, we next investigated whether and how the mutants would respond to GSM-1 treatment. Following drug treatment, changes in $A\beta_{42}$ and $A\beta_{38}$ were assessed by the $A\beta$ immunoassay. As shown in Fig. 2B, as compared with the untreated controls, GSM-1 potently lowered the levels of $A\beta_{42}$ of WT APP and all the Phe mutants by ~ 70 – 80% , even for the V44F mutant, which produced only extremely small amounts of $A\beta_{42}$. Strikingly, the Phe mutants behaved differently in their response to GSM-1 with regard to its potency in increasing the levels of $A\beta_{38}$ (Fig. 2B). Although WT APP showed the expected robust increase of $A\beta_{38}$, the T43F, V44F, and I45F mutants were less responsive to GSM-1 treatment with respect to $A\beta_{38}$. The FAD-associated V46F as well as the M51F mutant responded to GSM-1 similarly to WT APP. In contrast, GSM-1 treatment induced the production of considerably higher levels of $A\beta_{38}$ in the I47F, T48F, L49F, and V50F mutants, the latter mutant showing the maximal increase of $A\beta_{38}$ among these mutants (~ 6 -fold increase as compared with control). Interestingly, Tris-Bicine urea SDS-PAGE analysis revealed that GSM-1 effected a strong decrease of $A\beta_{41}$ for the V44F and of $A\beta_{39}$ for the V46F mutant, which were selected to analyze the modulation of alternative $A\beta$ species (Fig. 2C). Consistent with the results above, $A\beta_{38}$ was increased for both mutants in response to GSM-1, and $A\beta_{42}$ was decreased by GSM-1 treatment for the V46F mutant (Fig. 2C). Mass spectrometry analysis confirmed these results (Fig. 2D). Taken together, all APP Phe mutants responded robustly to the $A\beta_{42}$ -lowering capacity of GSM-1, further supporting our notion that $A\beta_{42}$ produced from APP mutant carriers harboring $A\beta_{42}$ -increasing mutations in the γ -secretase cleavage site domain can be expected to be targetable by GSMs. Furthermore, these data show that additional γ -secretase cleavages can be modulated, suggesting substantial flexibility in the modulation of γ -secretase cleavage specificity.

Mutants of the GXXXG Motif in the APP TMD Respond to GSMs—We next investigated whether mutation of the glycine residues of the GXXXG motif, which had been implicated in the production of $A\beta_{38}$ and $A\beta_{42}$ (17) and which lie within the proposed GSM-binding site of APP (18), would affect GSM-induced changes of γ -secretase cleavage specificity. APPsw-6myc constructs containing the G29A, the G33A, or the stronger G33I substitution described previously (17) were

APP Mutants Respond to GSMs

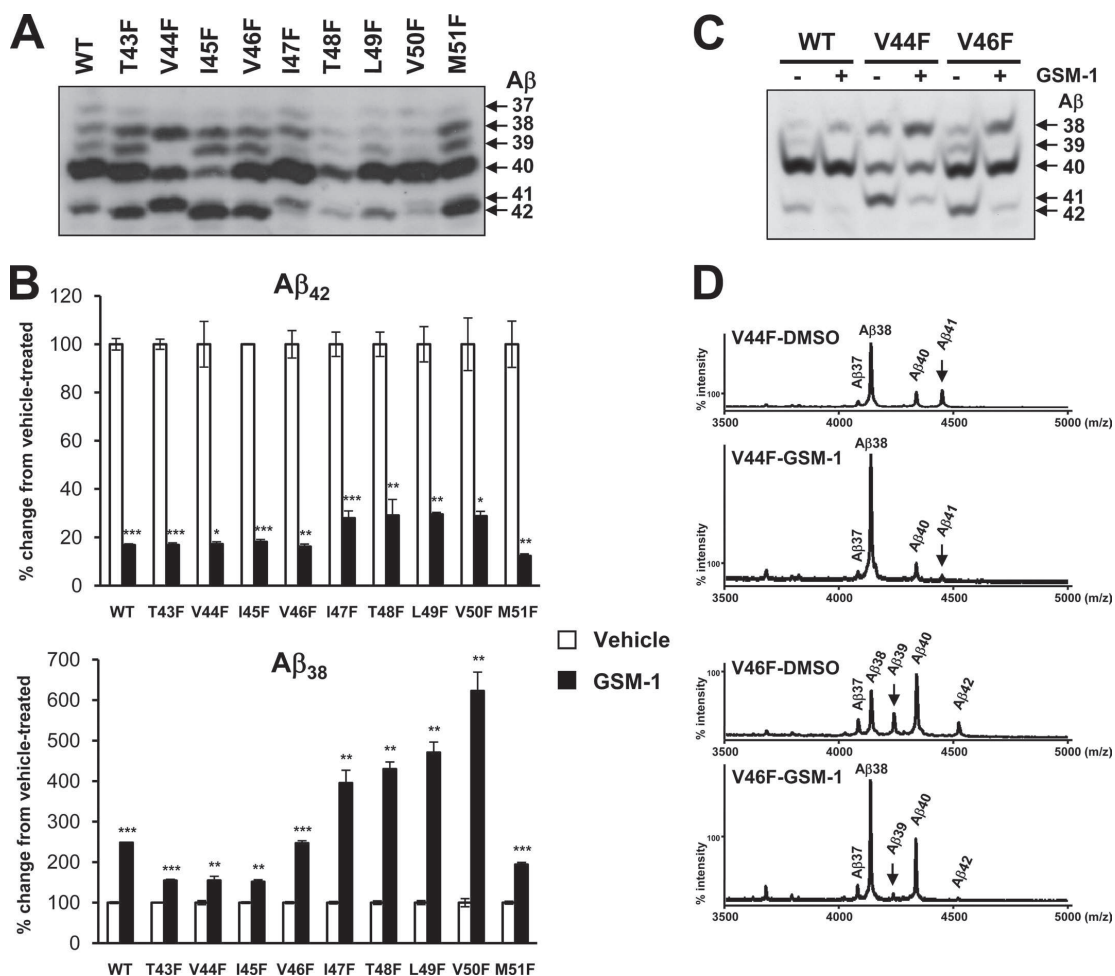


FIGURE 2. Effect of GSM-1 on A β species of APP phenylalanine mutants. *A*, Tris-Bicine urea SDS-PAGE immunoblot of A β species from cells expressing WT or the indicated phenylalanine mutants of APP. For Phe substitutions from positions 43–46, γ -secretase appears to generate a broad spectrum of peptides, from A β_{37} to A β_{42} . From positions 47–50, A β_{40} is the predominant species, and other species are greatly reduced. Notably, V44F and I47F produce predominantly A β_{41} instead of A β_{42} . *B*, sandwich immunoassay showing the effect of 1 μ M GSM-1 treatment on A β_{42} (upper panel) and A β_{38} (lower panel) in cells expressing WT or the indicated APP Phe mutants. The more sensitive Meso Scale Discovery triplex assay was used here to detect A β peptides with low abundance such as A β_{42} for the V44F mutant. All mutants respond to treatment by decreasing A β_{42} to a similarly dramatic extent. However, the increase in A β_{38} depends upon the amino acid position within the TMD, with a clear pattern of increasing response the further away the Phe mutation is from position 44. Bars represent the mean of 3 experiments with error bars indicating the S.E. Statistical significance is calculated by paired Student's *t* test (two-tailed distribution); ***, $p < 0.001$, **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$. *C*, Tris-Bicine urea SDS-PAGE immunoblot of WT and V44F and V46F mutant A β species in the presence of GSM-1 or vehicle. For the V44F mutant, the species migrating as A β_{41} could be lowered upon GSM-1 treatment, as could the A β_{39} species produced by the V46F mutant. *D*, mass spectrometry of V44F and V46F mutant A β species in the presence of GSM-1 or vehicle. For the V44F mutant, the increased generation of A β_{41} in place of A β_{42} was confirmed, and this species could be lowered by GSM-1 treatment. The spectra for the V46F mutant also confirm that A β_{38} was indeed robustly increased upon GSM-1 treatment and that both A β_{39} and A β_{42} are lowered. The intensities of the A β_{40} peaks were set at 100% in the spectra. DMSO, dimethyl sulfoxide.

transiently transfected into HEK293 cells, and the ratios of the secreted A β_{38} , A β_{40} , and A β_{42} species to total A β were examined by the A β immunoassay to assess changes in γ -secretase cleavage specificity. As shown in Fig. 3A, the G29A mutant showed a normal A β_{40} /A β_{total} ratio but an increased A β_{38} /A β_{total} ratio and a decreased A β_{42} /A β_{total} ratio. The G33A mutant displayed an even higher A β_{38} /A β_{total} ratio, but unlike the G29A mutant, it showed a normal A β_{42} /A β_{total} ratio similar

to that of the WT control. In further contrast to this mutant, a decreased A β_{40} /A β_{total} ratio was immediately apparent for the G33A mutant, and this effect was observed even more strongly for the G33I mutant. For this mutant, A β_{38} became the principal species representing $\sim 90\%$ of the total A β measurable as compared with A β_{40} , which represented only $\sim 10\%$ of total A β , whereas A β_{42} was almost undetectable. Thus, the G33I mutant showed a strong change in γ -secretase cleavage specificity,

APP Mutants Respond to GSMs

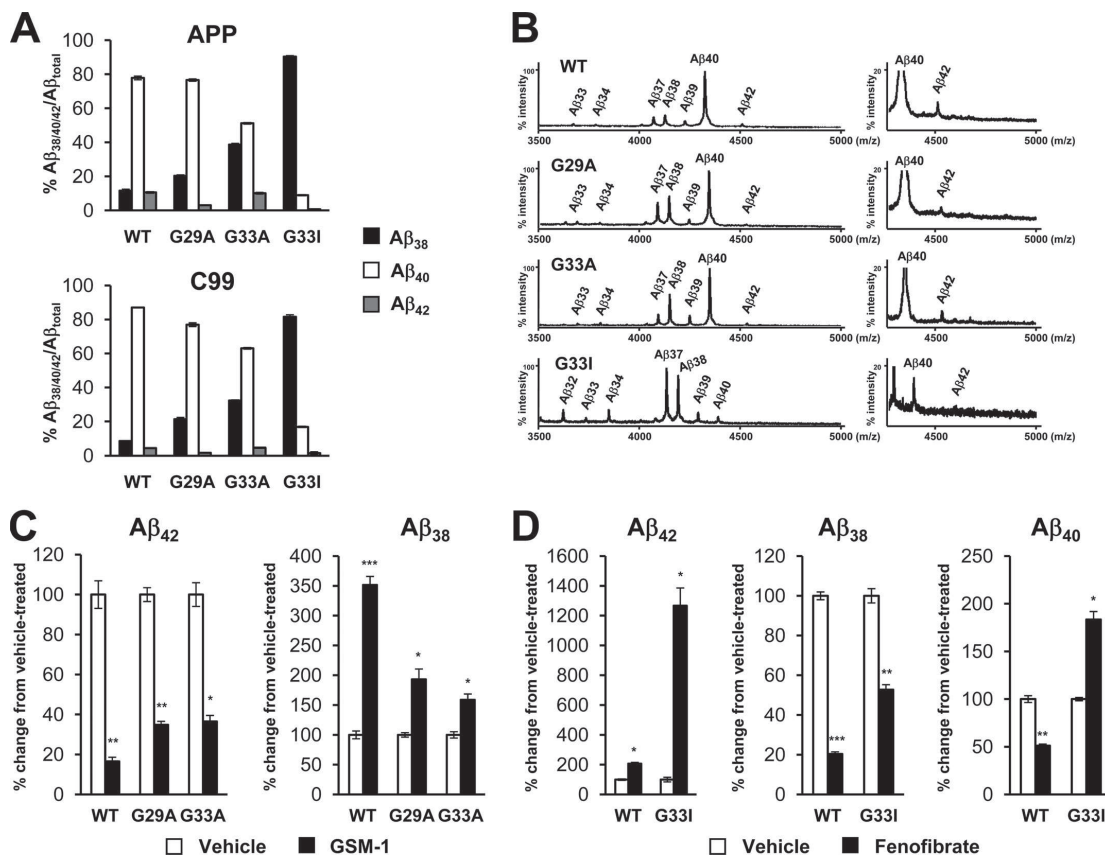


FIGURE 3. Profile of Aβ peptides generated in cells from APP GXXXG mutants and their response to GSMs. A, sandwich immunoassay of Aβ₃₈, Aβ₄₀, and Aβ₄₂ species that were isolated from conditioned media of cells overexpressing WT and the indicated glycine mutants of APPsw-6myc (upper panel) and C99-6myc (lower panel). For both substrates, the increase in Aβ₃₈ correlates with the reported decrease in dimerization strength. This correlates with a decrease in Aβ₄₀, but there is no correlation to Aβ₄₂. Each species is plotted as a percentage of the total Aβ (Aβ₃₈ + Aβ₄₀ + Aβ₄₂) measured for each cell line. Bars represent the mean of 3 experiments with error bars indicating the S.E. B, mass spectrometry of Aβ species from WT and the indicated Gly mutants of APP. For Aβ₃₈, Aβ₄₀, and Aβ₄₂, the spectra closely reflect the immunoassay measurements. However, Gly-33 substitutions exhibit increased Aβ₃₈ production, and G29A and G33I both exhibit increased Aβ₃₇ production. Indeed, for G33I, there is a general shift toward shorter Aβ peptides, with Aβ₃₇ the predominant species. The intensities of the highest Aβ peaks were set at 100% in the spectra. Magnified parts of the spectra are shown on the right-hand side to better visualize the Aβ₄₂ peaks. C, sandwich immunoassay showing the effect of 1 μM GSM-1 treatment on Aβ₄₂ and Aβ₃₈ in cells expressing WT or the indicated APP Gly mutants. Both mutants respond to treatment by decreasing Aβ₄₂ by ~70% and increasing Aβ₃₈, although the magnitude of the increase depends upon the starting ratio of Aβ₃₈. Bars represent the mean of 3 experiments with error bars indicating the S.E. Statistical significance is calculated by paired Student's *t* test (two-tailed distribution); ***, *p* < 0.001, **, *p* < 0.01, *, *p* < 0.05. D, sandwich immunoassay showing the effect of 50 μM fenofibrate treatment on Aβ₄₂, Aβ₃₈, and Aβ₄₀ in cells expressing WT or the G33I mutant of APP. Both WT and the G33I mutant respond to treatment by increasing Aβ₄₂, and this increase is more pronounced for the mutant. Aβ₃₈ could also be decreased for both WT and G33I, although the decrease was less pronounced for the mutant. Strikingly, Aβ₄₀ could also be increased for G33I, in contrast to the decrease that is observed for WT. Bars represent the mean of 3 experiments with error bars indicating the S.E. Statistical significance is calculated by paired Student's *t* test (two-tailed distribution); ***, *p* < 0.001, **, *p* < 0.01, *, *p* < 0.05.

apparently at the expense of the normally major Aβ₄₀ species. These results were confirmed using the C99-6myc substrate (31) to preclude any effects of dimerization of full-length APP via its ectodomain that may have affected its downstream processing and to rule out that the Swedish mutation at the β-secretase cleavage site of APPsw-6myc may have influenced the results (Fig. 3A). We next investigated whether the Gly mutants might also affect other Aβ species, which were not measured by our Aβ immunoassay. Tris-Bicine urea SDS-PAGE analysis was, however, hampered by an aberrant electrophoretic migration behavior of the mutant peptides, which precluded a clear

assessment of the identity of the bands observed and revealed altered biochemical properties of the mutant peptides as compared with WT Aβ (data not shown). We therefore analyzed the profile of Aβ species by mass spectrometry, which confirmed the Aβ profiles of WT and the Gly mutants and additionally revealed substantial levels of Aβ₃₇ and even shorter species for the G33I mutant (Fig. 3B) in full agreement with previous results (17). Thus, although overall the Gly mutants favor the production of shorter species, mostly Aβ₃₈, they do not consistently change the cleavage specificity of γ-secretase toward a reduced production of Aβ₄₂ but rather affect that of

APP Mutants Respond to GSMs

TABLE 1

Levels of the individual A β peptides (A β_{38} , A β_{40} , A β_{42}) measured for mutants of the proposed GSM-binding site

Levels of individual A β species were measured by A β sandwich immunoassay using 2D8 as capture antibody and C-terminal-specific antibodies to A β_{38} , A β_{40} , and A β_{42} for detection (n = number of independent experiments). Total A β levels measured by using 4G8 as a capture antibody (which detects all species including e.g. A β_{37}) were similar to those of the WT control except for the G33I mutant, which showed an ~30–40% reduction of total A β (data not shown). Surprisingly, A β could not be detected for the K28E mutant in cultured cells and the cell-free assay system by SDS-PAGE (data not shown). This may reflect a potential alteration of the folding of Lys-28 mutant A β peptides (45), which could possibly have affected their detectability in some of the previous reports (22, 46, 47).

	A β_{38}	A β_{40}	A β_{42}	n
	<i>pg/ml</i>			
Cultured cells				
WT	2428 \pm 164	14327 \pm 64	2432 \pm 72	3
G29A	4134 \pm 159	8838 \pm 49	513 \pm 10	3
G33A	6517 \pm 6	8356 \pm 76	1845 \pm 14	3
G33I	2942 \pm 20	326 \pm 5	52 \pm 1	3
K28E	2686 \pm 40	2112 \pm 71	50 \pm 6	3
Cell-free assay				
WT	1911 \pm 227	9952 \pm 776	1584 \pm 98	18
G29A	4086 \pm 453	5588 \pm 348	2136 \pm 93	14
G33A	3667 \pm 292	7693 \pm 635	2448 \pm 87	13
G33I	1692 \pm 222	217 \pm 24	403 \pm 85	14
K28E	1589 \pm 180	6267 \pm 471	1904 \pm 148	14

A β_{40} . This was also reflected by the average amounts of the individual A β species measured in additional experiments (Table 1).

Having determined the changes in γ -secretase cleavage specificity for the Gly mutants, we next asked whether they would show a GSM response. A β_{42} levels could be robustly lowered for the G29A and G33A mutants by GSM-1 treatment (Fig. 3C). Concomitantly, GSM-1 treatment caused an increase of A β_{38} levels for the G29A and G33A mutants. Probably due to the higher A β_{38} starting levels of the mutants, the increase was attenuated as compared with WT APP. Given its favored production of shorter A β species such as A β_{38} , the G33I mutant was tested for its ability to respond to the inverse GSM fenofibrate (Fig. 3D). This showed that fenofibrate treatment caused a dramatic increase of A β_{42} (Fig. 3D), which had almost been undetectable for this mutant at baseline (see above). Furthermore, A β_{38} could still be lowered, despite its high baseline level for this mutant. Surprisingly, A β_{40} was increased in response to fenofibrate treatment as well (Fig. 3D), a modulation that, to our knowledge has so far not been observed for inverse GSMs. Thus, these data show that substitution of the glycine residues of the GXXXG motif does not interfere with the modulation of A β levels by GSMs.

APP TMD Mutants Respond to GSMs in a Cell-free γ -Secretase Assay Using Purified Components—A potential complication in the analysis of A β produced from Gly mutant APP is that these particular A β peptides are mutated within the A β domain itself and that their altered biochemical properties might potentially have an impact on the levels of Gly mutant A β peptides detectable in cultured cells downstream of production (e.g. altered secretion, enhanced degradation, or aggregation). In particular, the G33I mutant A β_{42} has been described as a highly aggregation-prone peptide (21). We therefore also carried out cell-free assays using purified recombinant APP C-terminal fragment-based C100-His₆ substrates containing selected Phe mutants, the G29A, G33A, or G33I mutants, and

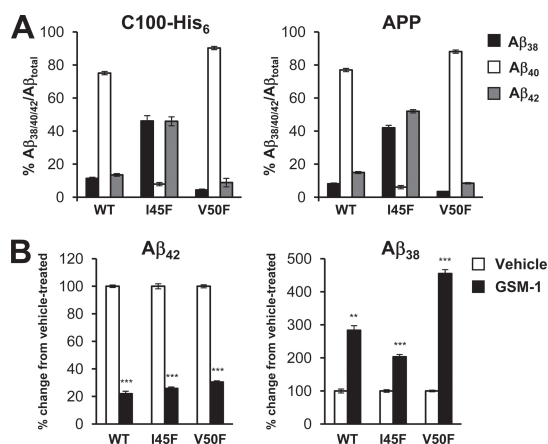


FIGURE 4. Validation of cell-free assay system concerning the cleavage specificity of purified γ -secretase on mutant APP C-terminal fragment based C100-His₆ substrates. *A*, sandwich immunoassay of A β_{38} , A β_{40} , and A β_{42} species that were generated in cell-free assays (28) from WT, I45F, or V50F mutant C100-His₆ substrates or that were isolated from conditioned media of cells overexpressing the corresponding APPsw-6myc constructs. Bars represent the mean of 4 and 3 experiments, respectively, with error bars indicating the S.E. *B*, sandwich immunoassay showing the effect of 2.5 μ M GSM-1 treatment on A β_{38} , A β_{40} , and A β_{42} generated from WT, I45F, and V50F mutant C100-His₆ substrates in cell-free assays. Modulation of A β species from mutant substrates is reproducible in our cell-free system, further proving that our purified γ -secretase displays all characteristics of the enzyme *in vivo*. Bars represent the mean of 3 experiments with error bars indicating the S.E.

purified lipid-reconstituted γ -secretase (28). We first monitored the production of A β peptides from C100-His₆ substrates containing the I45F or V50F mutants, *i.e.* substrates that should generate high amounts of both A β_{38} and A β_{42} and low amounts of A β_{40} (I45F) or almost exclusively A β_{40} (V50F). Importantly, in contrast to the Gly mutants within the A β domain, A β species generated from the Phe mutants are WT in sequence. Therefore, altered effects with respect to the cellular metabolism of A β do not apply to these mutations. As shown in Fig. 4A, the production of A β_{38} , A β_{40} , and A β_{42} peptides as assessed by A β immunoassay from WT, I45F, and V50F C100-His₆ substrates was consistent with the results obtained for these mutants in cultured cells and the previous reports by others (37, 38). We next monitored whether the I45F and V50F mutants would respond to GSM-1 treatment, which indeed proved to be the case (Fig. 4B). The responses of the two mutants to GSM-1 with respect to A β_{42} and A β_{38} generation were very similar to those observed in cultured cells, thus confirming the results described above and validating the cell-free assay for the analysis of APP TMD mutant substrates.

Analysis of the A β species generated in the *in vitro* assay revealed that the Gly mutants caused an increased relative production not only of A β_{38} , but surprisingly also of A β_{42} , whereas concomitantly reducing that of A β_{40} (Fig. 5A), although we noticed a greater variability of G33I mutant A β_{42} in this assay (Table 1). Mass spectrometry analysis of mutant A β peptides confirmed this unexpected result and revealed that G29A, and in particular the G33I mutant, addi-

APP Mutants Respond to GSMs

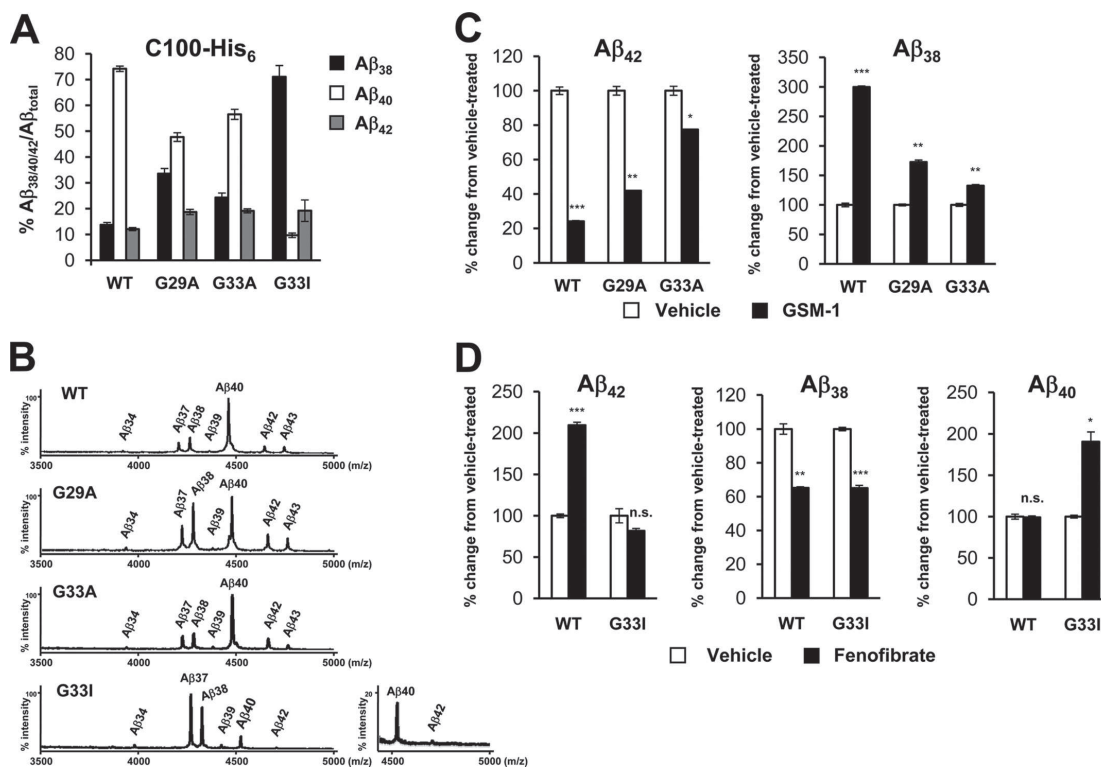


FIGURE 5. Profile of A β peptides generated *in vitro* from purified C100-His₆ GXXXG mutants and their response to GSMs. *A*, sandwich immunoassay of A β ₃₈, A β ₄₀, and A β ₄₂ species that were generated in cell-free assays (28) from WT and the indicated Gly mutant substrates. Comparable with results from cultured cells (Fig. 3*A*), the increase in A β ₃₈ correlates with a decrease in A β ₄₀ for these mutants. However, unexpectedly and in contrast to the cell culture data, robust amounts of A β ₄₂ could be detected for all Gly mutants. Each species is plotted as a percentage of the total A β (A β ₃₈ + A β ₄₀ + A β ₄₂) measured for each substrate. Bars represent the mean of 13–18 experiments with error bars indicating the S.E. *B*, mass spectrometry of A β species that were generated in cell-free assays (28) from WT and the indicated Gly mutant substrates. The data reflect the immunoassay measurements for A β ₃₈, A β ₄₀, and A β ₄₂, with the exception of low detectable amounts of A β ₄₂ for the G33I mutant, possibly due to reasons described under “Results.” In parallel with a decrease in A β ₄₀, a mild—robust increase in A β ₃₇ is observed for the Gly mutants *in vitro*. The intensities of the highest A β peaks were set at 100% in the spectra. A magnified part of the spectrum of the G33I mutant is shown on the right-hand side to better visualize the A β ₄₂ peak. *C*, sandwich immunoassay showing the effect of 2.5 μ M GSM-1 treatment on A β ₄₂ and A β ₃₈ generated from WT and Gly mutant substrates in cell-free assays. In parallel with the observed increase in A β ₃₈ for the G29A and G33A mutants, the response of A β ₃₈ to GSM-1 is significant but attenuated. Likewise, the decrease of A β ₄₂ is diminished but still significant for these mutants. Bars represent the mean of 3 experiments with error bars indicating the S.E. Statistical significance is calculated by paired Student’s *t* test (two-tailed distribution); ***, *p* < 0.001, **, *p* < 0.01, *, *p* < 0.05. *D*, sandwich immunoassay showing the effect of 150 μ M fenofibrate treatment on A β ₄₂, A β ₃₈, and A β ₄₀ generated from WT and G33I mutant substrates in cell-free assays. Here, A β ₄₂ does not respond to modulation, whereas both A β ₃₈ and A β ₄₀ do. Bars represent the mean of 3 experiments with error bars indicating the S.E. Statistical significance is calculated by paired Student’s *t* test (two-tailed distribution); ***, *p* < 0.001, **, *p* < 0.01, *, *p* < 0.05. *n.s.* denotes not significant.

tionally generated A β ₃₇. Although A β ₄₂ was robustly produced by γ -secretase for the G29A, G33A, and G33I mutants, it was less well detectable by mass spectrometry for the latter mutant. This is most likely because of very low ionization efficiency due to the increased hydrophobicity of this mutant peptide (Fig. 5*B*). Thus, although increased generation of A β ₃₈ from Gly mutants was a consistent observation in both cultured cells and the cell-free *in vitro* assay using purified components, the A β ₄₂ levels detected differed between these two systems. Assessment of A β production in the latter assay system shows that γ -secretase can in fact generate substantial amounts of A β ₄₂ from the Gly mutant substrates as solely A β production is assessed in this system.

We next assessed the response of the Gly mutants to GSM-1. Consistent with previous results (28), WT APP showed a clear

response with lowered A β ₄₂ and increased amounts of A β ₃₈. Again, GSM-1 effected a change in the A β species produced by the Gly mutants by lowering the production of A β ₄₂ and increasing that of A β ₃₈ (Fig. 5*C*). This was clearly observed for the G29A mutant and in attenuated form for the G33A mutant (Fig. 5*C*) but unexpectedly, not observed for the G33I mutant, which instead showed an ~20% reduction of A β ₄₀ in response to GSM-1 (data not shown). Although A β ₄₂ production could not be increased further by fenofibrate treatment for the G33I mutant, it responded effectively to this inverse GSM with respect to both A β ₃₈ and A β ₄₀ generation (Fig. 5*D*), similar to the results obtained for this mutant in cultured cells. Taken together, these data show that the Gly mutants are susceptible to pharmacological modulation of γ -secretase cleavage specificity both in cultured cells as well as in the cell-free system,

APP Mutants Respond to GSMs

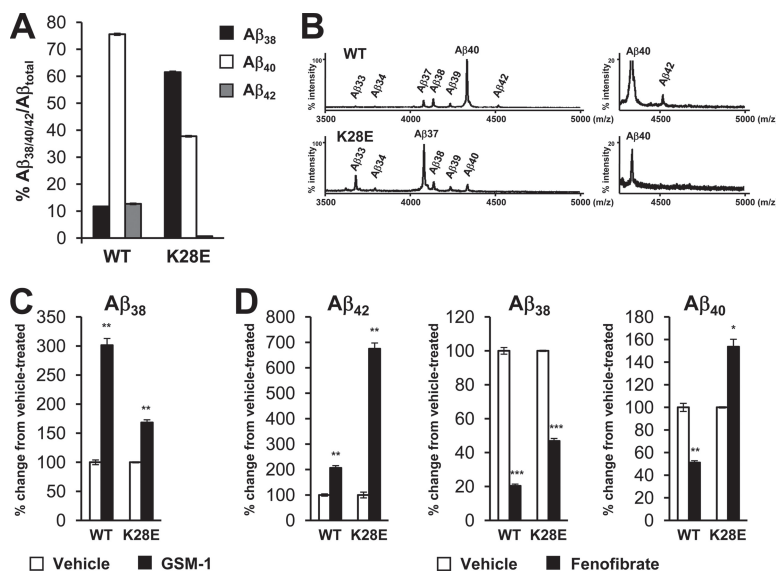


FIGURE 6. Profile of Aβ peptides generated in cells from the APP K28E mutant and its response to GSMs. *A*, sandwich immunoassay of Aβ₃₈, Aβ₄₀, and Aβ₄₂ species that were isolated from conditioned media of cells overexpressing WT and the K28E mutant of APP. This substitution results in a dramatic increase in Aβ₃₈ and a decrease in Aβ₄₀ and Aβ₄₂, the latter being close to the detection limit of the immunoassay. Each species is plotted as a percentage of the total Aβ (Aβ₃₈ + Aβ₄₀ + Aβ₄₂) measured for each cell line. *Bars* represent the mean of 3 experiments with *error bars* indicating the S.E. *B*, mass spectrometry of Aβ species from WT and the K28E mutant of APP. The spectra closely reflect the immunoassay measurements for Aβ₃₈, Aβ₄₀, and Aβ₄₂, but similar to the G31I mutation, there is again a shift toward shorter Aβ peptides, with Aβ₃₇, the predominant species and Aβ₃₃, also becoming a major species. The intensities of the highest Aβ peaks were set at 100% in the spectra. Magnified parts of the spectra are shown on the *right-hand side* to better visualize the presence or absence of Aβ₄₂ peaks. *C*, sandwich immunoassay showing the effect of 1 μM GSM-1 treatment on Aβ₃₈ in cells expressing WT or the K28E mutant of APP. A decrease in Aβ₄₂ could not be reliably determined for the K28E mutant given the low starting level for this mutant. However, Aβ₃₈ could be robustly increased. *Bars* represent the mean of 3 experiments with *error bars* indicating the S.E. Statistical significance is calculated by paired Student's *t* test (two-tailed distribution); **, *p* < 0.01. *D*, sandwich immunoassay showing the effect of 50 μM fenofibrate treatment on Aβ₄₂, Aβ₄₀, and Aβ₃₈ in cells expressing WT or the K28E mutant of APP. Both WT and the K28E mutant respond to treatment by increasing Aβ₄₂, and this increase is more pronounced for the mutant. Strikingly, Aβ₄₀ could be increased for K28E, similar to G31I, and Aβ₃₈ could also be effectively decreased for both WT and K28E. *Bars* represent the mean of 3 experiments with *error bars* indicating the S.E. Statistical significance is calculated by paired Student's *t* test (two-tailed distribution); ***, *p* < 0.001, **, *p* < 0.01, *, *p* < 0.05.

despite differences in the relative amounts of each Aβ species generated.

The K28E APP Mutant Responds to GSMs—It has been speculated that GSMs may shift the position of the substrate in the membrane plane relative to the γ-secretase active site. Aβ₄₂-raising GSMs and Aβ₄₂-lowering GSMs would either pull the substrate out from the membrane or, respectively, sink it into the membrane (18). Interestingly, all so far described Aβ₄₂-lowering GSMs have a carboxyl group, whereas Aβ₄₂-raising GSMs lack this group. The positively charged lysine 28 residue of the Aβ domain located directly at the extracellular border of the membrane could potentially form a salt bridge with the carboxyl group of Aβ₄₂-lowering GSMs, which as a consequence might position the γ42 site away from the γ-secretase active site. To address such a potential mechanistic contribution of Lys-28 in GSM binding, we substituted this residue by the negatively charged glutamate. As shown in Fig. 6A, assessment of the Aβ ratios revealed that Aβ₃₈ was the major species detected for the K28E mutant (~60% of the total Aβ). The

Aβ₄₀/Aβ_{total} ratio was strongly reduced, as was the Aβ₄₂/Aβ_{total} ratio, indicating a strong preference for γ-secretase cleavage at the γ38 site (see Table 1 for average Aβ levels measured in additional experiments). Mass spectrometry confirmed this result and additionally revealed a substantial increase of the shorter Aβ species Aβ₃₇ and Aβ₃₃ (Fig. 6B). Despite the already high Aβ₃₈ levels, they could still be significantly increased by GSM-1 treatment (Fig. 6C). The levels of Aβ₄₂ were too low such that changes were at the limit of detection, and no significant changes were observed for the levels of Aβ₄₀ (data not shown). These data suggest that the proposed electrostatic interaction does not play an essential role for the mechanism of γ-secretase modulation. Finally, treatment of the K28E mutant with fenofibrate showed that Aβ₄₂ could be tremendously increased, whereas Aβ₃₈ could still be substantially lowered. Interestingly, fenofibrate caused an increase of Aβ₄₀ as well (Fig. 6D). This result shows that the K28E mutant responds to GSMs of two different classes.

As above, to investigate modulation of γ-secretase cleavage by an independent assay, which assesses production in the absence of cellular metabolism, we also investigated the K28E mutant in the *in vitro* system using a C100-His₆ K28E mutant

substrate. In the cell-free assay, a slightly increased Aβ₄₂/Aβ_{total} ratio and a decreased Aβ₄₀/Aβ_{total} ratio were observed for this mutant, whereas the Aβ₃₈/Aβ_{total} ratio was similar to that of the WT substrate (Fig. 7A; see Table 1 for average Aβ levels of all experiments performed). Mass spectrometry confirmed this Aβ profile (Fig. 7B). Thus, unlike in cultured cells, the K28E mutant behaved as a comparably normal γ-secretase substrate in the cell-free assay. GSM-1 behaved as a modulator on the K28E mutant, lowering Aβ₄₂ and increasing Aβ₃₈ production. As compared with WT, the response of the K28E mutant to GSM-1 was attenuated, however (Fig. 7C). As shown in Fig. 7D, we also observed inverse modulation for the K28E mutant with fenofibrate. Taken together, despite the observed differences in the amounts of Aβ species detected in cultured cells *versus* the cell-free system, the K28E mutant was clearly responsive to GSMs both in cultured cells and *in vitro* using purified components, suggesting that Lys-28 of the Aβ domain is unlikely to play a major role for the action of GSMs.

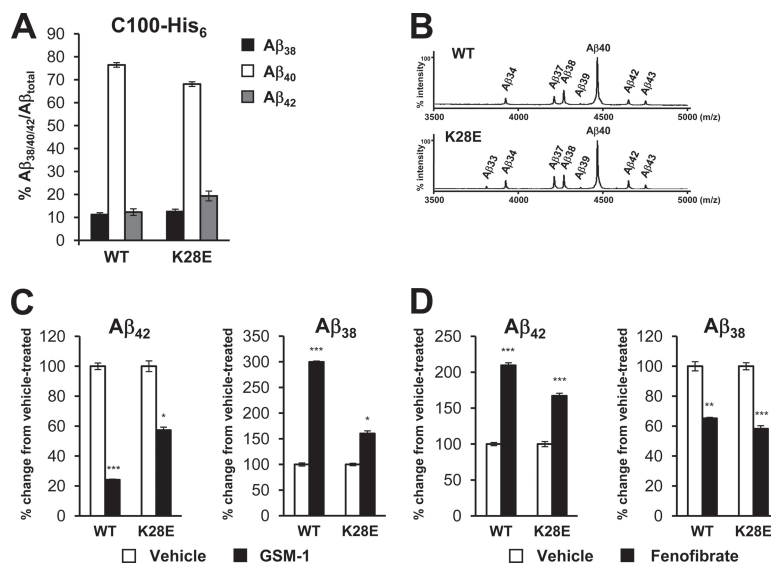


FIGURE 7. Profile of A β peptides generated *in vitro* from the C100-His₆ K28E mutant and its response to GSMs. *A*, sandwich immunoassay of A β_{38} , A β_{40} , and A β_{42} species that were generated in cell-free assays (28) from C100-His₆ WT and K28E mutant substrates. Each species is plotted as a percentage of the total A β (A β_{38} + A β_{40} + A β_{42}) measured for each substrate. The K28E mutant shows a mildly increased A β_{42} ratio as compared with the WT. *Bars* represent the mean of 5 experiments with *error bars* indicating the S.E. *B*, mass spectrometry of A β species that were generated in cell-free assays (28) from WT and K28E mutant substrates. The spectra closely reflect the immunoassay measurements for A β_{38} , A β_{40} , and A β_{42} , showing a slightly higher relative peak for the A β_{42} species in the K28E mutant. Note also the higher relative peak of A β_{37} in this mutant in comparison with the WT spectrum. The intensities of the A β_{40} peaks were set at 100% in the spectra. *C*, sandwich immunoassay showing the effect of 2.5 μ M GSM-1 treatment on A β_{42} and A β_{38} generated from WT and K28E mutant substrates in cell-free assays. Both A β_{38} and A β_{42} species could be significantly modulated for this mutant *in vitro*, but to a lower extent as compared with the WT. *Bars* represent the mean of 3 experiments with *error bars* indicating the S.E. Statistical significance is calculated by paired Student's *t* test (two-tailed distribution); ***, $p < 0.001$, *, $p < 0.05$. *D*, sandwich immunoassay showing the effect of 150 μ M fenofibrate on A β_{42} and A β_{38} generated from WT and K28E mutant substrates in cell-free assays. The K28E mutant is, like the WT, also susceptible to inverse modulation. *Bars* represent the mean of 3 experiments with *error bars* indicating the S.E. Statistical significance is calculated by paired Student's *t* test (two-tailed distribution); ***, $p < 0.001$, **, $p < 0.01$.

DISCUSSION

In this study, we have investigated the impact of GSMs on a variety of APP mutants to better understand their mode of action as well as the cleavage mechanism of γ -secretase. A summary of our principal findings is shown in Table 2. We establish that naturally occurring pathogenic mutations of the γ -secretase cleavage site region in the APP TMD, which affect the precision of γ -secretase cleavage toward an increased production of A β_{42} , respond to GSM treatment. These mutants even respond as strongly as WT APP following treatment with GSM-1, a well characterized potent GSM (24), which was selected as the principal GSM in this study. FAD patients with mutations in APP that affect γ -secretase cleavage should therefore be susceptible to GSM treatment. In addition, phenylalanine-scanning mutagenesis analysis of the γ -secretase cleavage site region revealed responsiveness to GSM-1 for all mutants. We found that even very strong mutants among those, such as the I45F mutant that produces high amounts of A β_{42} , responded to GSM-1. The I45F mutant represents the most aggressive APP FAD mutation identified so far with an extremely early disease onset of 31 years (39). Based on our

data, we therefore conclude that treatment with GSMs might provide a successful therapeutic option also for these mutant carriers and others of the γ -secretase cleavage site domain with pathogenic A β_{42} production that may be identified in the future. Interestingly, our results contrast with those obtained recently for PS mutations (24, 25). Most of the PS FAD mutations investigated were not responsive to NSAIDs that act as A β_{42} -lowering GSMs, such as sulindac sulfide. In particular, very strong and aggressive mutations producing high levels of A β_{42} , such as PS1 L166P, and others, were not susceptible to the A β_{42} -lowering capacity of sulindac sulfide. This mutant was also not responsive to the more potent GSM-1 (24). Thus, our data indicate that the mode of action of GSMs is different for FAD mutants of APP and PS, *i.e.* different for substrate and protease. We also note that AD mouse models expressing human APP FAD mutants as transgene, such as some of the ones investigated here (*e.g.* V46I or V46F), should be more suitable for *in vivo* validation of GSMs than models that additionally express strong PS FAD mutations.

Recent data suggested that GSMs target the substrate rather than the protease by binding to the A β domain at residues 29–36 (18). Thus, it appeared possible that the modulatory capacity of GSMs could be different from that observed for the protease if they were targeting the substrate. Moreover, the GXXXG motif lying in this region was shown to determine A β_{42} and A β_{38} production in an inverse and interdependent manner via dimerization of the TMD. Our data do not support a mechanistic coupling of A β_{38} and A β_{42} production, however. The T43I and I45F (FAD) mutants both simultaneously increased A β_{38} and A β_{42} production and lowered that of A β_{40} , suggesting that the production of A β_{38} and A β_{42} is not necessarily coupled in an inverse manner. Furthermore, the analysis of Phe mutants showed that although A β_{42} production was lowered for all mutants upon GSM-1 treatment, the concomitant increase in A β_{38} production was attenuated for T43F, V44F, and I45F mutants, indicating uncoupling effects. Interestingly, for the T43I, I45V, V46I, and V46F FAD mutants, the increased production of A β_{38} induced by GSM-1 was accompanied by a reduced production of A β_{39} in addition to A β_{42} , which might indicate a (precursor-product) relationship between these two peptides. Moreover, as evident for the V44F mutant, which produced a high amount of A β_{41} , we

APP Mutants Respond to GSMs

TABLE 2

Summary of mutations, their effects on A β generation, and their responsiveness to modulation

The relative change in the A β_{42} /A β_{total} and A β_{38} /A β_{total} ratio as determined by A β immunoassay for each mutant as compared with WT is indicated by arrows (for the phenylalanine mutants, also refer to Fig. 2A for a representative Tris-Bicine urea gel analysis). Additionally, the magnitude of response to GSMs as compared with WT is indicated (WT response is equivalent to +++). All responses summarized in this table refer to GSM-1, except for some mutants in the proposed GSM-binding site. For mutants therein that have a strong A β_{38} bias, it was often more appropriate to use fenofibrate to test modulation capability.

Mutant	A β_{42} /A β_{total} ratio change from WT	A β_{42} GSM response	A β_{38} /A β_{total} ratio change from WT	A β_{38} GSM response
FAD				
T43I	↑↑↑	+++	↑↑↑	+++
I45V	↑↑↑	+++	↑↑↑	+++
V46I	↑↑↑	+++	↑↑↑	+++
Phenylalanine scan				
T43F	↑↑↑	+++	↑↑↑	+
V44F	↓↓↓	+++	↑↑↑	+
I45F ^a	↑↑↑	+++	↑↑↑	+
V46F ^a	↑↑↑	+++	↑↑↑	+++
I47F	↓↓↓	+++	↓↓↓	++++
T48F	↓↓↓	+++	↓↓↓	++++
L49F	=	+++	↓↓↓	++++
V50F	↓↓↓	+++	↓↓↓	+++++
M51F	↑↑↑	+++	↑↑↑	++
Proposed GSM-binding site				
Cell-based assay				
G29A	↓↓	+++	↑↑	++
G33A	=	+++	↑↑	+
G33I	↓↓↓	+++++ ^b	↑↑↑	++ ^b
K28E	↓↓↓	+++++ ^b	↑↑↑	++ ^c
Cell-free assay				
G29A	↑	+++	↑↑	++
G33A	↑	+	↑↑	+
G33I	↑	= ^b	↑↑	+++ ^b
K28E	↑	++ ^c	=	++ ^c

^a These phenylalanine mutations are also FAD mutations.

^b Fenofibrate response.

^c Fenofibrate and GSM-1 response.

found that also, this A β species could be lowered by GSM-1 treatment. Thus, not only A β_{42} production, but also A β_{39} and A β_{41} production, can be lowered in response to a GSM. Taken together, these data are difficult to reconcile with the model that production of A β_{42} and A β_{38} is interdependent. The relationship between A β_{42} and A β_{38} is apparently more complex, and production of A β_{38} from A β_{42} (16) may in fact occur only in the WT situation.

Although our results obtained for mutants of the GXXXG dimerization motif are to a large extent consistent with previously reported findings (17), we noted some differences. Although we observed an increase in A β_{38} for all mutants, we did not detect a consistent concomitant change in A β_{42} with respect to both A β_{42} /A β_{total} ratios and absolute levels of this species. As particularly evident for the G33A and the G33I mutants, the increase in A β_{38} rather correlated with reduced A β_{40} levels. The decrease of A β_{40} may be explained for the G33I mutant by the concomitant increase of A β_{37} , which could be derived from the A β_{40} product line but not for the G33A mutant, where the A β_{37} increase was not observed. The Gly mutants were responsive to GSM-1, which effectively lowered A β_{42} for G29A and G33A, while increasing A β_{38} levels. Likewise, the G33I mutant, which showed the highest A β_{38} levels among the Gly mutants investigated, responded effectively to the inverse GSM fenofibrate, which lowered A β_{38} and increased A β_{42} to detectable levels for this A β_{38} -biased mutant. Interestingly, fenofibrate also effected a strong increase of A β_{40} for this mutant. Such a property has to our knowledge not yet been observed for an inverse GSM. These observations suggest that the glycine residues in the proposed GSM-binding site of APP do not play an essential role for potential GSM binding at

this site. In addition, these data suggest that pharmacological modulation of γ -secretase cleavage specificity appears not to be linked in an essential manner with GXXXG-dependent APP TMD interactions, whether involving dimerization or not (17, 23).

Because the GXXXG mutant substrates give rise to mutated A β peptides, whose altered biochemical properties may affect the levels detectable in cultured cells downstream of production, we also analyzed these using our recently described validated cell-free *in vitro* system consisting of purified γ -secretase and purified APP substrate (28). In this assay system, solely the production of A β is analyzed independent of *e.g.* altered secretion or degradation. As compared with cultured cells, similar results were obtained regarding the production of A β_{38} and A β_{40} in this system. In contrast, however, the rather substantial A β_{42} production observed for all mutants in the cell-free system using purified components shows that γ -secretase can *per se* generate A β_{42} from Gly mutant substrates. It is important to note that the cell-free assay system was fully validated by the I45F and V50F mutant substrates. These mutants represent two extremes of APP mutants regarding the production of A β_{38} and A β_{42} and, in contrast to the Gly mutants, generate A β_{38} , A β_{40} , and A β_{42} peptides without internal mutations. Both mutants behaved exactly as in cultured cells, proving that the γ -secretase enzyme itself is in the correct conformation in the *in vitro* assay and thus further validating the cell-free assay used. It remains possible that the altered biochemical properties of Gly mutant A β_{42} as compared with WT A β peptides may differentially affect the fate of this peptide in the two systems and thus account for the observed differences. Alternatively, it is also possible that slight conformational alterations may occur for

substrates carrying mutations within the A β domain regarding the γ 42 site cleavage, such as that of certain Gly mutant substrates, in the *in vitro* system. In agreement with the modulation results from cultured cells, responsiveness to GSM-1 was also observed for the Gly mutants in the cell-free system, although differences regarding the respective GSM response were noticed for the G33I mutant.

An interesting residue that might contribute to GSM binding in the APP TMD is lysine 28. This residue, which lies directly adjacent to the GSM-binding site in the APP TMD, might form a salt bridge between the positively charged ϵ -amino group of the lysine side chain and the negatively charged carboxyl group of GSMs, which is essential for their A β ₄₂-lowering activity (41). This ionic interaction might change the position of the APP TMD relative to the active site of γ -secretase, thus mediating a change in its cleavage specificity. However, our data show that the K28E mutant was susceptible to GSM-1 treatment, suggesting that an ionic interaction mediated by Lys-28 does not contribute to a potential GSM-APP interaction. The K28E mutant was also responsive to the inverse GSM fenofibrate, which lacks the carboxyl group and thus is apparently effective in the absence of an ionic interaction. Interestingly, mass spectrometric analysis revealed A β ₃₃ and A β ₃₇ as major A β species (species that are not detected by our A β immunoassay), possibly indicating that the K28E mutant A β might be turned over to shorter A β peptides in cultured cells. Analysis of the K28E mutant substrate in the cell-free system, however, *i.e.* in the absence of cellular metabolism, revealed that this mutant is normally processed by purified γ -secretase with only minor changes in the profile of A β species as compared with the WT APP control. Importantly, GSM-1 was also effective on the K28E mutant in this system, further suggesting that the membrane-flanking lysine residue does not play a major role for the mode of action of carboxyl group-containing GSMs.

With respect to the mechanism of γ -secretase cleavage, our data show an uncoupling of A β ₃₈ and A β ₄₂ generation for APP mutations located at different sites in the APP TMD, including mutations at or within the proposed GSM-binding site. All mutants allow a change of γ -secretase cleavage specificity with respect to the generation of A β ₃₈ and A β ₄₂ in response to GSMs. GSM-mediated modulation of γ -secretase cleavage specificity was shown to occur largely independent of the glycine residues of the GXXXG motif within the proposed GSM-binding site of APP, which were implicated in the generation of A β ₄₂ (17). Although these data do not entirely exclude GSM binding to this site, they suggest that the glycine residues are unlikely to play an essential mechanistic role for the mode of action of GSMs, irrespective of the current controversy regarding the GSM-APP interaction (18, 26). The GSM response of APP TMD mutants shown here, irrespective of their site and the amounts of A β ₄₂ generated, may favor a substrate-independent targeting mechanism of GSMs. Binding studies with more potent high affinity GSMs rather than the currently existing low affinity compounds (18) will provide important answers by clarifying whether GSMs target the enzyme, which was initially suggested by several previous studies (6, 27, 42–44). Mechanistically, NSAIDs that lower A β ₄₂ were suggested to allosterically

alter the conformation of PS (6, 10, 44), and conformational changes of PS opposite to that induced by such NSAIDs were also observed for PS FAD mutants (6, 7, 10). It is thus conceivable that many aggressive PS FAD mutations are locked in a conformation that makes the PS-substrate interaction refractory to the A β ₄₂-lowering capacity of GSMs (24, 25). Clearly, as shown in this study, mutations in the APP substrate are permissive to GSMs, suggesting that the substrate is conformationally more flexible than the γ -secretase enzyme, allowing APP substrate positioning such that the γ 42 site is less exposed to the active site of γ -secretase. Thus, unlike the situation for PS FAD mutants, AD mouse models carrying APP FAD mutant transgenes should be useful for the *in vivo* evaluation of GSMs, and APP FAD mutant carriers are expected to be susceptible to GSM-based therapeutic strategies for AD treatment.

Acknowledgments—We thank Alison Goate for APPsw-6myc and C99-6myc constructs, Karlheinz Baumann for GSM-1, Manfred Brockhaus for the A β ₄₀ and A β ₄₂ specific antibodies, Georg Schmid and Elvira da Silva for HEK293S cells, and Gabriele Basset for technical assistance. We also thank Stefan Lichtenthaler for critical reading of the manuscript and helpful discussion.

REFERENCES

- Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 101–112
- Steiner, H., Fluhner, R., and Haass, C. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 29627–29631
- Tolia, A., and De Strooper, B. (2009) *Semin. Cell. Dev. Biol.* **20**, 211–218
- Wolfe, M. S. (2009) *Semin. Cell. Dev. Biol.* **20**, 219–224
- Steiner, H. (2008) *Curr. Alzheimer Res.* **5**, 147–157
- Lleó, A., Berezovska, O., Herl, L., Raju, S., Deng, A., Bacskai, B. J., Frosch, M. P., Irizarry, M., and Hyman, B. T. (2004) *Nat. Med.* **10**, 1065–1066
- Berezovska, O., Lleó, A., Herl, L. D., Frosch, M. P., Stern, E. A., Bacskai, B. J., and Hyman, B. T. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 3009–3017
- Tesco, G., Ginestroni, A., Hiltunen, M., Kim, M., Dolios, G., Hyman, B. T., Wang, R., Berezovska, O., and Tanzi, R. E. (2005) *J. Neurochem.* **95**, 446–456
- Herl, L., Thomas, A. V., Lill, C. M., Banks, M., Deng, A., Jones, P. B., Spoelgen, R., Hyman, B. T., and Berezovska, O. (2009) *Mol. Cell. Neurosci.* **41**, 166–174
- Uemura, K., Lill, C. M., Li, X., Peters, J. A., Ivanov, A., Fan, Z., DeStrooper, B., Bacskai, B. J., Hyman, B. T., and Berezovska, O. (2009) *PLoS One* **4**, e7893
- Tomita, T. (2009) *Expert Rev. Neurother.* **9**, 661–679
- Weggen, S., Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Pietrzik, C. U., Golde, T. E., and Koo, E. H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 30748–30754
- Weggen, S., Eriksen, J. L., Das, P., Sagi, S. A., Wang, R., Pietrzik, C. U., Findlay, K. A., Smith, T. E., Murphy, M. P., Bulter, T., Kang, D. E., Marquez-Sterling, N., Golde, T. E., and Koo, E. H. (2001) *Nature* **414**, 212–216
- Kukar, T., Murphy, M. P., Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Weggen, S., Smith, T. E., Ladd, T., Khan, M. A., Kache, R., Beard, J., Dodson, M., Merit, S., Ozols, V. V., Anastasiadis, P. Z., Das, P., Fauq, A., Koo, E. H., and Golde, T. E. (2005) *Nat. Med.* **11**, 545–550
- Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirotsu, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T. C., Wang, R., and Ihara, Y. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 436–445
- Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., and Ihara, Y. (2009) *J. Neurosci.* **29**, 13042–13052
- Munter, L. M., Voigt, P., Harmeier, A., Kaden, D., Gottschalk, K. E., Weise, C., Pipkorn, R., Schaefer, M., Langosch, D., and Multhaup, G. (2007) *EMBO J.* **26**, 1702–1712

APP Mutants Respond to GSMs

18. Kukar, T. L., Ladd, T. B., Bann, M. A., Fraering, P. C., Narlawar, R., Maharvi, G. M., Healy, B., Chapman, R., Welzel, A. T., Price, R. W., Moore, B., Rangachari, V., Cusack, B., Eriksen, J., Jansen-West, K., Verbeeck, C., Yager, D., Eckman, C., Ye, W., Sagi, S., Cottrell, B. A., Torpey, J., Rosenberry, T. L., Fauq, A., Wolfe, M. S., Schmidt, B., Walsh, D. M., Koo, E. H., and Golde, T. E. (2008) *Nature* **453**, 925–929
19. Sato, T., Kienlen-Campard, P., Ahmed, M., Liu, W., Li, H., Elliott, J. L., Aimoto, S., Constantinescu, S. N., Octave, J. N., and Smith, S. O. (2006) *Biochemistry* **45**, 5503–5516
20. Hung, L. W., Ciccotosto, G. D., Giannakis, E., Tew, D. J., Perez, K., Masters, C. L., Cappai, R., Wade, J. D., and Barnham, K. J. (2008) *J. Neurosci.* **28**, 11950–11958
21. Harmeier, A., Wozny, C., Rost, B. R., Munter, L. M., Hua, H., Georgiev, O., Beyermann, M., Hildebrand, P. W., Weise, C., Schaffner, W., Schmitz, D., and Multhaup, G. (2009) *J. Neurosci.* **29**, 7582–7590
22. Eggert, S., Midthune, B., Cottrell, B., and Koo, E. H. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 28943–28952
23. Kienlen-Campard, P., Tasiaux, B., Van Hees, J., Li, M., Huyseune, S., Sato, T., Fei, J. Z., Aimoto, S., Courtoy, P. J., Smith, S. O., Constantinescu, S. N., and Octave, J. N. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 7733–7744
24. Page, R. M., Baumann, K., Tomioka, M., Pérez-Revuelta, B. I., Fukumori, A., Jacobsen, H., Flohr, A., Luebbbers, T., Ozmen, L., Steiner, H., and Haass, C. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 677–683
25. Czirr, E., Cottrell, B. A., Leuchtenberger, S., Kukar, T., Ladd, T. B., Esselmann, H., Paul, S., Schubel, R., Torpey, J. W., Pietrzik, C. U., Golde, T. E., Wiltfang, J., Baumann, K., Koo, E. H., and Weggen, S. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 17049–17054
26. Beel, A. J., Barrett, P., Schnier, P. D., Hitchcock, S. A., Bagal, D., Sanders, C. R., and Jordan, J. B. (2009) *Biochemistry* **48**, 11837–11839
27. Weggen, S., Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Pietrzik, C. U., Ozols, V., Fauq, A., Golde, T. E., and Koo, E. H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 31831–31837
28. Winkler, E., Hobson, S., Fukumori, A., Dümpelfeld, B., Luebbbers, T., Baumann, K., Haass, C., Hopf, C., and Steiner, H. (2009) *Biochemistry* **48**, 1183–1197
29. Shirotani, K., Tomioka, M., Kremmer, E., Haass, C., and Steiner, H. (2007) *Neurobiol. Dis.* **27**, 102–107
30. Yamasaki, A., Eimer, S., Okochi, M., Smialowska, A., Kaether, C., Baumeister, R., Haass, C., and Steiner, H. (2006) *J. Neurosci.* **26**, 3821–3828
31. Wang, J., Brunkan, A. L., Hecimovic, S., Walker, E., and Goate, A. (2004) *Neurobiol. Dis.* **15**, 654–666
32. Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003) *Nat. Cell. Biol.* **5**, 486–488
33. Wiltfang, J., Smirnov, A., Schnierstein, B., Kelemen, G., Matthies, U., Klafki, H. W., Staufienbiel, M., Hüther, G., Rütger, E., and Kornhuber, J. (1997) *Electrophoresis* **18**, 527–532
34. Kumar-Singh, S., De Jonghe, C., Cruts, M., Kleinert, R., Wang, R., Mercken, M., De Strooper, B., Vanderstichele, H., Löfgren, A., Vanderhoeven, I., Backhovens, H., Vanmechelen, E., Kroisel, P. M., and Van Broeckhoven, C. (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2589–2598
35. Eckman, C. B., Mehta, N. D., Crook, R., Perez-tur, J., Prihar, G., Pfeiffer, E., Graff-Radford, N., Hinder, P., Yager, D., Zenk, B., Refolo, L. M., Prada, C. M., Younkin, S. G., Hutton, M., and Hardy, J. (1997) *Hum. Mol. Genet.* **6**, 2087–2089
36. Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., et al. (1991) *Nature* **349**, 704–706
37. Lichtenthaler, S. F., Wang, R., Grimm, H., Uljon, S. N., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 3053–3058
38. Tan, J., Mao, G., Cui, M. Z., Kang, S. C., Lamb, B., Wong, B. S., Sy, M. S., and Xu, X. (2008) *J. Neurochem.* **107**, 722–733
39. Guardia-Laguarta, C., Pera, M., Clarimón, J., Molinuevo, J. L., Sánchez-Valle, R., Lladó, A., Coma, M., Gómez-Isla, T., Blesa, R., Ferrer, I., and Lleó, A. (2010) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**, 53–59
40. Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B., and Benson, M. D. (1991) *Science* **254**, 97–99
41. Narlawar, R., Baumann, K., Czech, C., and Schmidt, B. (2007) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 5428–5431
42. Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Smith, T. E., Weggen, S., Das, P., McLendon, D. C., Ozols, V. V., Jessing, K. W., Zavitz, K. H., Koo, E. H., and Golde, T. E. (2003) *J. Clin. Invest.* **112**, 440–449
43. Takahashi, Y., Hayashi, I., Tominari, Y., Rikimaru, K., Morohashi, Y., Kan, T., Natsugari, H., Fukuyama, T., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 18664–18670
44. Behr, D., Clarke, E. E., Wrigley, J. D., Martin, A. C., Nadin, A., Churcher, I., and Shearman, M. S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 43419–43426
45. Grant, M. A., Lazo, N. D., Lomakin, A., Condrón, M. M., Arai, H., Yamin, G., Rigby, A. C., and Teplow, D. B. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 16522–16527
46. Ren, Z., Schenk, D., Basí, G. S., and Shapiro, I. P. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 35350–35360
47. Scheuermann, S., Hamsch, B., Hesse, L., Stumm, J., Schmidt, C., Behr, D., Bayer, T. A., Beyreuther, K., and Multhaup, G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 33923–33929

Novel γ -Secretase Enzyme Modulators Directly Target Presenilin Protein^{*[5]}

Received for publication, June 30, 2011, and in revised form, August 19, 2011. Published, JBC Papers in Press, September 6, 2011, DOI 10.1074/jbc.C111.276972

Amelie Ebke^{+§1}, Thomas Luebbers[¶], Akio Fukumori^{+§}, Keiro Shirotnani^{||}, Christian Haass^{+§2}, Karlheinz Baumann^{¶3}, and Harald Steiner^{+§4}

From the [†]Adolf-Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, 80336 Munich, Germany, the [§]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), 80336 Munich, Germany, the ^{||}Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine, Fukushima 960-1295, Japan, and the [¶]Preclinical CNS Research, Pharmaceuticals Division, F. Hoffmann-La Roche Limited, CH-4070 Basel, Switzerland

Background: γ -Secretase modulators (GSMs) hold great potential as anti-Alzheimer disease drugs, but their molecular target(s) are not established.

Results: The catalytic subunit of γ -secretase, presenilin, was identified as a direct target of novel GSMs.

Conclusion: Enzyme-targeting GSMs establish allosteric modulation as a mechanism of GSM action.

Significance: The identification of presenilin as GSM target may contribute to the development of therapeutically active GSMs.

γ -Secretase is essential for the generation of the neurotoxic 42-amino acid amyloid β -peptide ($A\beta_{42}$). The aggregation-prone hydrophobic peptide, which is deposited in Alzheimer disease (AD) patient brain, is generated from a C-terminal fragment of the β -amyloid precursor protein by an intramembrane cleavage of γ -secretase. Because $A\beta_{42}$ is widely believed to trigger AD pathogenesis, γ -secretase is a key AD drug target. Unlike inhibitors of the enzyme, γ -secretase modulators (GSMs) selectively lower $A\beta_{42}$ without interfering with the physiological function of γ -secretase. The molecular target(s) of GSMs and hence the mechanism of GSM action are not established. Here we demonstrate by using a biotinylated photocross-linkable derivative of highly potent novel second generation GSMs that γ -secretase is a direct target of GSMs. The GSM photoprobe specifically bound to the N-terminal fragment of presenilin, the catalytic subunit of γ -secretase, but not to other γ -secretase subunits. Binding was differentially competed by GSMs of diverse structural classes, indicating the existence of overlapping/multiple GSM binding sites or allosteric alteration of the photoprobe binding site. The β -amyloid precursor protein C-terminal fragment previously implicated as the GSM binding site was not targeted by the compound. The identification of presenilin as the molecular target of GSMs directly establishes allosteric modulation of enzyme activity as a mechanism of GSM action and may contribute to the development of therapeutically active GSMs for the treatment of AD.

Alzheimer disease (AD),⁵ the major cause of senile dementia, is caused by an accumulation of the aggregation-prone amyloid- β peptide ($A\beta$) in the brain of affected patients (1). $A\beta$ is a small 37–43-amino acid secreted peptide that is generated from the β -amyloid precursor protein (APP) by the sequential action of two membrane-bound proteases, β - and γ -secretase (1). The latter enzyme is an intramembrane-cleaving protease composed of presenilin (PS) 1 or 2 as the catalytic subunit, APH-1a or -b, nicastrin, and PEN-2 (2–4). γ -Secretase liberates $A\beta$ from the membrane by a stepwise cleavage of the APP C-terminal fragment (CTF) that β -secretase generates via shedding of the APP ectodomain (1). As inhibition and/or modulation of $A\beta$ generation are promising therapeutic strategies to treat AD, β - and γ -secretase are key AD drug targets, and inhibitors of both enzymes are investigated in clinical trial studies (5).

Apart from APP, a number of other γ -secretase substrates have been identified (3). Among these, Notch1 represents a substrate of major importance for the regulation of cell differentiation during embryonic development as well as in adulthood (6). Cleavage of Notch1 by γ -secretase gives rise to the Notch1 intracellular domain (NICD), which acts in the nucleus as an essential transcriptional regulator (6). Unfortunately, direct inhibition of $A\beta$ generation by γ -secretase inhibitors (GSI) is problematic due to the inhibition of the Notch signaling pathway (5), and a large clinical phase 3 trial has also recently been halted due to the appearance of severe side effects.

In contrast to GSIs, γ -secretase modulators (GSMs) may offer safer alternatives for AD therapy. Such drugs typically shift the cleavage specificity of γ -secretase toward the increased

* This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB596) (to H. S. and C. H.), the Bundesministerium für Bildung und Forschung (KNDD) (to C. H. and H. S.), and the Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM).

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Materials and Methods, Table 1, and Figs. 1–4.

¹ Supported by the Elitenetzwerk Bayern.

² Supported by a research professorship from the LMUexcellent program.

³ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 41-61-688-8397; Fax: 41-61-688-4484; E-mail: karlheinz.baumann@roche.com.

⁴ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 49-89-2180-75480; Fax: 49-89-2180-75415; E-mail: harald.steiner@med.uni-muenchen.de.

⁵ The abbreviations used are: AD, Alzheimer disease; $A\beta$, amyloid β -peptide; AICD, APP intracellular domain; APP, β -amyloid precursor protein; Bicine, *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)glycine; CTF, C-terminal fragment; GSI, γ -secretase inhibitor; GSM, γ -secretase modulator; NICD, Notch1 intracellular domain; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; NTF, N-terminal fragment; PS, presenilin; DAPT, *N*-[(3,5-difluorophenyl)acetyl]-*L*-alanyl-2-phenylglycine-1,1-dimethylethyl ester.

production of the shorter peptide $A\beta_{38}$, whereas concomitantly reducing the generation of the pathogenic $A\beta_{42}$ species. A subset of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as sulindac sulfide and other cyclooxygenase inhibitors, was identified 10 years ago as the first GSMs (7). Although clinical efficacy has yet to be demonstrated, the discovery of $A\beta_{42}$ -lowering GSMs has opened a new opportunity for AD drug discovery, and more potent and brain-penetrant second generation compounds have been identified and developed since the first study (5). These compounds differ structurally from the first generation compounds. Most of the new compounds lack the acidic carboxyl group of NSAIDs and typically consist of bridged aromates (5). [Supplemental Table 1](#) shows representatives of these compounds that were used in this study.

Certain low potency GSMs such as the NSAIDs flurbiprofen and sulindac sulfide have been reported to bind to the APP CTF as well as to $A\beta$ in the N-terminal third of the APP transmembrane domain (8–10), although this interaction was questioned by others (11). Another study identified the γ -secretase subunit PEN-2 as the principal target of non-NSAID-type second generation GSMs (12). However, this study was conducted under conditions in which the γ -secretase complex was dissociated and with isolated PEN-2, *i.e.* under non-native conditions. Thus, the identity of the binding site(s) of GSMs has been unsettled and remained a major open question. Here we identify the N-terminal fragment of PS, but not PEN-2 or the APP CTF, as the binding site of novel highly potent GSMs with bridged aromatic structural scaffold.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Compounds—Systematic names and synthesis of RO-02, RO-03, RO-57, and RO-57-BpB, as well as synthesis and/or source of all other compounds used, are provided in the [supplemental material](#).

Characterization of GSMs—Modulatory activities of GSMs, including dose-response curves, were analyzed in cell-based and cell-free γ -secretase assays as described previously (13–15). Additional details are described in the [supplemental material](#), including cell lines and antibodies used for analysis.

Photoaffinity Labeling—Membrane fractions of HEK293 cells were incubated in the presence or absence of RO-57-BpB and competitor compounds as indicated and following photoactivation of RO-57-BpB with UV light solubilized in SDS-containing buffer. After a clarifying spin, proteins covalently bound to RO-57-BpB were captured with streptavidin-Sepharose. Following three washes, bound proteins were eluted in biotin- and urea-containing sample buffer and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Experimental details and information on the antibodies used for analysis are given in the [supplemental material](#).

RESULTS

We identified a series of a novel class of bridged aromatic aminopyrimidine-derived compounds as highly potent second generation GSMs with IC_{50} values for inhibition of $A\beta_{42}$ reaching the low nanomolar range (28). One of these compounds, RO-02 (Fig. 1A), was characterized as a prototype in cell-based and cell-free assays in more detail. RO-02 robustly lowered

$A\beta_{42}$ species in HEK293 cells stably expressing the APP^{sw} mutant (HEK293/sw) ($IC_{50} = 15$ nM; $\log IC_{50} = -7.82 \pm 0.05$), increased the short species $A\beta_{38}$, and consistent with the behavior of GSMs of this structural class (12), also inhibited $A\beta_{40}$ formation (Fig. 1B). Formation of the NICD and likewise that of the APP intracellular domain (AICD; the counterpart of $A\beta$) was spared by RO-02 in HEK293 cells stably coexpressing the Notch- and APP-based γ -secretase substrates F-NEXT (16) and C99-6myc (17) up to a concentration of at least 10 μ M, *i.e.* of more than 500 times the IC_{50} ($A\beta_{42}$) (Fig. 1C). We next asked whether RO-02 would be effective on distinct γ -secretase complexes using HEK293/sw cell lines stably expressing all possible combinations of PS and APH-1 (Fig. 1D). As shown in Fig. 1E, all six individual complexes generated a similar profile of secreted $A\beta$ species. The compound effectively lowered $A\beta_{42}$ generation of all six γ -secretase complexes with an apparently increased potency for PS2-containing γ -secretase complexes (Fig. 1F; see also [supplemental Fig. 1](#)). Finally, the potent and preferential $A\beta_{42}$ -lowering activity of RO-02 was confirmed in rat primary cortical neurons (IC_{50} ($A\beta_{42}$) = 13 nM; $\log IC_{50} = -7.90 \pm 0.04$) (Fig. 1G). To further characterize the mode of action of RO-02 and to address the question whether the compound may target γ -secretase directly, we next investigated whether RO-02 could also modulate γ -secretase activity in a cell-free *in vitro* assay using purified enzyme complex reconstituted into lipid vesicles (15). Dose-response analysis showed that RO-02 modulated the generation of $A\beta$ species by γ -secretase from the recombinant APP substrate C100-His₆ as expected (IC_{50} ($A\beta_{42}$) = 0.5 μ M under these conditions) and without affecting the levels of total $A\beta$ and total AICD (Fig. 1H). Mass spectrometry analysis showed that RO-02 did not alter the relative levels of the AICD species generated in the cell-free assay when used at a concentration modulatory for the γ -sites (1 μ M), suggesting that the compound does not modulate ϵ -cleavage (Fig. 1I).

Although the cell-free assay data provide evidence that RO-02 may target γ -secretase directly, they do not prove this as they do not demonstrate direct binding of the drug to its target. Therefore, to unambiguously identify the molecular target(s) of our compounds, a derivative of RO-02 was synthesized (RO-57) that facilitated linkage of a photoactivatable benzophenone group coupled to a biotin moiety (RO-57-BpB) to capture cross-linked target protein(s) by a streptavidin pull-down after photoactivation of the compound (Fig. 2A). The parental compound RO-57 and the photosensitive derivative RO-57-BpB modulated γ -secretase in cultured HEK293/sw cells with an IC_{50} ($A\beta_{42}$) of 47 nM ($\log IC_{50} = -7.33 \pm 0.07$) and 185 nM ($\log IC_{50} = -6.73 \pm 0.07$), respectively (Fig. 2B). When total membrane fractions of untransfected HEK293 cells were probed with 1 μ M RO-57-BpB, a concentration that inhibits $A\beta_{42}$ production by ~30% ([supplemental Fig. 2](#)), the PS1 and PS2 N-terminal fragments (NTFs) were identified as molecular targets of RO-57-BpB (Fig. 2C). Capture of the PS NTFs was observed neither in the absence of RO-57-BpB nor in the presence of RO-57-BpB but in the absence of UV irradiation. Labeling of PS1 and PS2 NTFs was strongly inhibited in the presence of a 100-fold molar excess of the parental compound RO-57, demonstrating specific cross-linking. As expected, the close and more potent structural relative of RO-57, RO-02, highly effi-

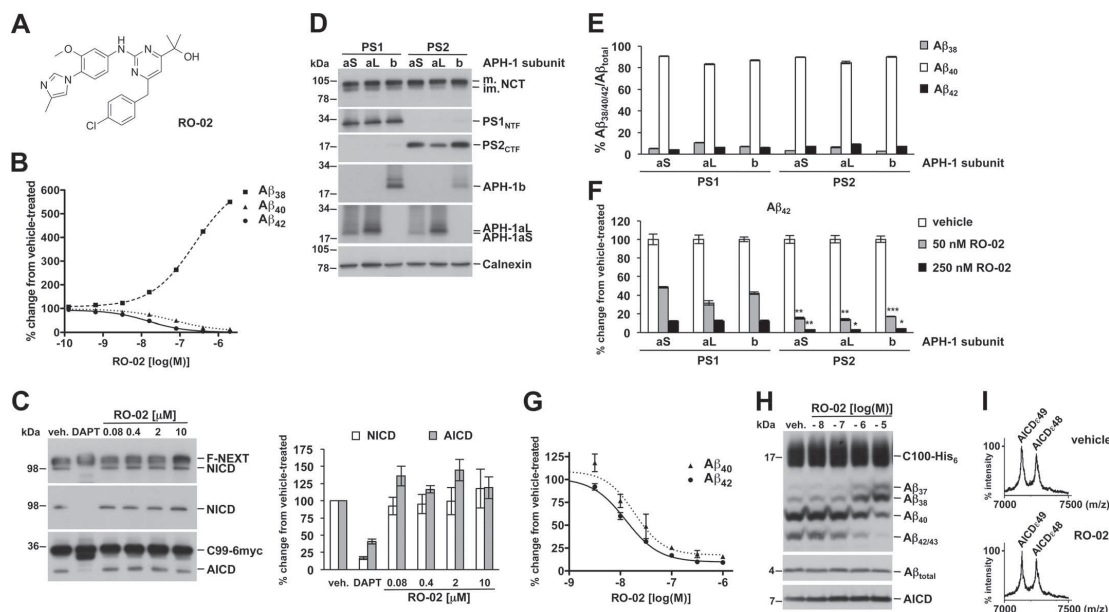


FIGURE 1. RO-02, a novel non-acidic GSM, lowers $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ generation with high potency. *A*, structure of RO-02. *B*, dose-response analysis of γ -secretase activity modulation by RO-02 in HEK293/sw cells by $A\beta$ sandwich immunoassay. Data are represented as mean \pm S.E. ($n = 3$). Note that for most data points, error bars are too small to be displayed. *C*, RO-02 dose-response analysis of NICD and AICD formation in HEK293 cells stably co-expressing F-NEXT and C99-6myc as assessed by immunoblot analysis. Quantitation of NICD and AICD formation is shown in the right panel. Data are represented as mean \pm S.E. (RO-02, $n = 3$ –5; DAPT (1 μ M), $n = 2$). veh., vehicle. *D*–*F*, RO-02 modulates the activity of all six γ -secretase complexes. *D*, immunoblot analysis of expression of γ -secretase complex components in HEK293/sw cells stably expressing the individual combinations of PS and APH-1 with calnexin as loading control. NCT, nicastrin; *m*., mature; *im*., immature; *S*, short splice variant; *L*, long splice variant. Profile of secreted $A\beta$ species (*E*) and $A\beta_{42}$ response to RO-02 (*F*) of the six γ -secretase complexes as determined by $A\beta$ sandwich immunoassay. Data in *E* and *F* are represented as mean \pm S.E. ($n = 3$). Asterisks indicate significant differences between corresponding PS1- and PS2-containing complexes for their relative $A\beta_{42}$ generation in the presence of RO-02 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, two-tailed unpaired Student's *t* test). *G*, RO-02 dose-response analysis of $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ generation in cultured rat primary cortical neurons by $A\beta$ ELISA. Data are represented as mean \pm S.E. ($n = 2$). *H*, RO-02 dose-response analysis in a cell-free assay using purified γ -secretase by immunoblot analysis of $A\beta$ species separated by Tris-Bicine urea SDS-PAGE and total $A\beta$ and AICD. *I*, mass spectrometry analysis of AICD species generated in the presence or absence (vehicle) of RO-02 (1 μ M).

ciently competed for PS NTF labeling by RO-57-BpB (Fig. 2C). Consistent with our results above (Fig. 1F), we noted that labeling of the PS2 NTF was stronger than that of PS1. These results could be confirmed with RO-03, another potent compound of our GSM series (supplemental Fig. 3). As further shown in Fig. 2C, no capture was observed for any other γ -secretase subunits. Because certain GSM photoprobes, which were based on the low potency compounds flurbiprofen or fenofibrate, have previously been reported to bind to the APP CTF γ -secretase substrates (8), we performed labeling experiments using isolated membranes from HEK293/sw cells. These experiments showed that RO-57-BpB failed to specifically label APP CTFs, suggesting that compounds of this structural class used here are not substrate-targeting GSMs (Fig. 2D).

To further investigate whether the binding site of RO-57-BpB may also be targeted by other GSMs, we next tested whether other classes of GSMs could compete for binding of RO-57-BpB. Two structurally similar bridged aromatic second generation GSMs from Eisai Co., Ltd. (ES 1 (= E2012 (18)) and ES 2) (supplemental Table 1) also efficiently competed for labeling of the PS NTFs by RO-57-BpB (Fig. 3A), whereas, interestingly, the bridged aromates from TorreyPines Therapeutics (TP 1 and TP 2) (supplemental Table 1) showed differential

effects. While one of the compounds (TP 1) partially prevented PS NTF labeling, the other one (TP 2) did not (Fig. 3A). The acidic GSMs sulindac sulfide, a low potency GSM (7), and GSM-1, a much more potent second generation acidic GSM (13), also competed for PS NTF labeling by RO-57-BpB (Fig. 3B). GSM-1 showed a differential effect and competed for labeling of the PS1 NTF by RO-57-BpB only weakly, whereas PS2 NTF labeling was more strongly reduced. The inverse GSMs fenofibrate (19) and the more potent TO-901317 (20) did weakly reduce the capture of PS NTF by RO-57-BpB. Considering its low potency ($IC_{50}(A\beta_{42}) = 70 \mu$ M (14)), the labeling competition of sulindac sulfide was unexpectedly strong. However, although the lack of labeling competition by its inactive analog sulindac sulfone suggested specificity (7, 21) (supplemental Fig. 4), the potential contribution of other factors to the observed labeling competition by sulindac sulfide could not be excluded (see "Discussion").

Finally, we investigated whether binding of RO-57-BpB to the PS NTF was affected by different classes of highly potent GSIs including the transition-state analog L-685,458, the dipeptidic GSIs DAPT and LY-411,575, and begacestat, a Notch-sparing sulfonamide-type GSI (5). As shown in Fig. 3C, the investigated GSIs did not or only weakly inhibited labeling

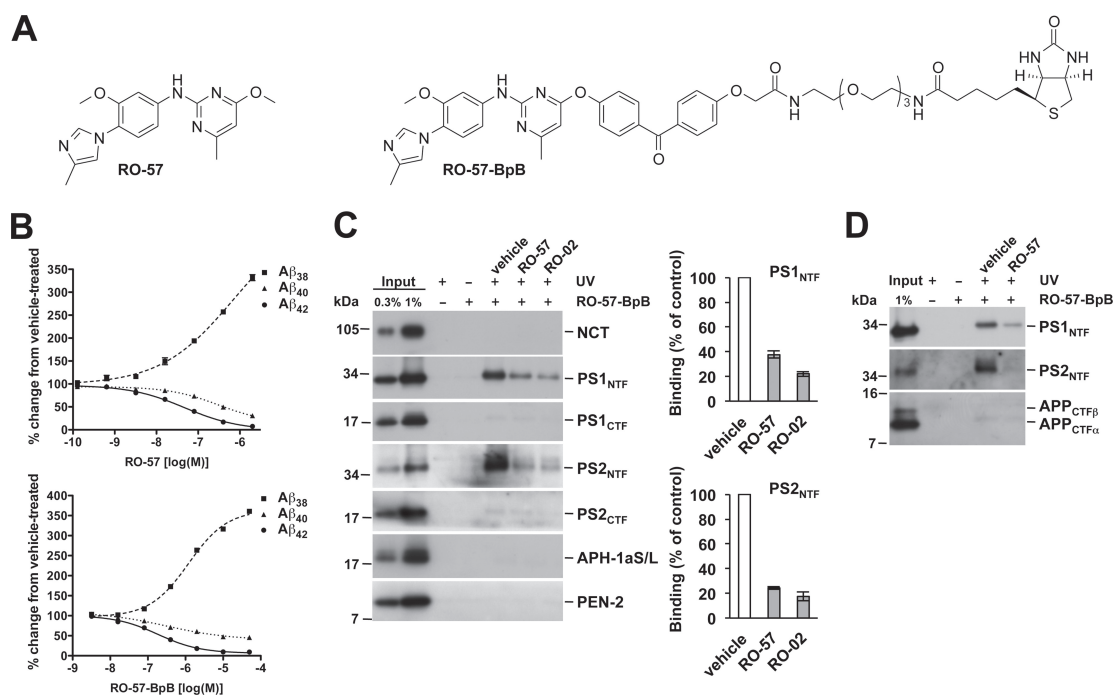


FIGURE 2. **RO-57-BpB targets the PS N-terminal fragment.** *A*, structures of RO-57 and its photoaffinity labeling derivative RO-57-BpB. *B*, dose-response analysis of γ -secretase activity modulation by RO-57 and RO-57-BpB in HEK293/sw cells by $A\beta$ sandwich immunoassay. Data are represented as mean \pm S.E. ($n = 3$). Note that for most data points, error bars are too small to be displayed. *C*, specific labeling by photoactivated RO-57-BpB of the PS1 and PS2 NTFs but not the other γ -secretase subunits as detected by immunoblot analysis. Quantitation of PS NTF binding is shown in the *right panel*. Data are represented as mean \pm S.E. ($n = 5$). NCT, nicastrin. *D*, the absence of APP CTF labeling by RO-57-BpB as detected by immunoblot analysis.

of the PS NTFs and LY-411,575 rather increased labeling of the PS1 NTF. Taken together, the various GSMs and GSIs differentially competed for PS NTF labeling by RO-57-BpB. With respect to the GSMs, the above results indicate that the binding site of RO-57-BpB might be shared for some GSMs such as the Eisai compounds, whereas for other compounds, the binding site may overlap or be located elsewhere. L-685,458 was the only GSI capable of competing for labeling to some extent, indicating some overlap of the RO-57-BpB binding site with the catalytic site. Alternatively, the competitor compounds used may allosterically alter the RO-57-BpB binding site.

DISCUSSION

The identity of the molecular target(s) of GSMs and thus also the mechanism(s) of GSM action are not yet understood and represent major unresolved questions in the AD drug discovery field (8–12). Here we have provided evidence that γ -secretase is a direct target of new potent second generation GSMs with non-acidic bridged aromatic structure. The compounds target the NTF of its catalytic subunits PS1 and PS2. Binding of PS2 by RO-57-BpB was substantially stronger than that of PS1, indicating that these compounds may preferentially target PS2. This is also supported by the more potent $A\beta_{42}$ inhibition by RO-02 of γ -secretase containing PS2 as catalytic subunit.

To further characterize the binding site targeted by RO-57-BpB in the PS NTF, we investigated whether other GSMs of similar or

different structural scaffold would be able to compete with binding of RO-57-BpB to its target site. Such labeling competition experiments can indicate whether a binding site is shared between different compounds, although they do not discriminate for the alternative possibility that the competitor compound may allosterically alter the binding site of the labeling compound. Each of the two GSMs from Eisai and TorreyPines Therapeutics were tested as representatives of other bridged aromatic GSMs structurally related to our compounds. Both Eisai compounds efficiently competed for labeling of the PS NTF, but only one of the TorreyPines Therapeutics compounds (TP 1) was effective and displayed partial competition. Although it is thus likely that the Eisai compounds target the same site as our compounds, the binding site of the TorreyPines Therapeutics compounds may partially overlap or locate elsewhere (12). The partial labeling competition (TP 1) or its absence (TP 2) could, however, also be due to less favorable physicochemical properties of the TorreyPines Therapeutics compounds, such as high lipophilicity and/or low solubility that may have caused reduced drug availability in the labeling competition experiments.

Consistent with its previously reported direct allosteric interaction with γ -secretase (22), labeling competition was also observed for sulindac sulfide, suggesting that this NSAID-type acidic GSM may target the binding site of our GSMs. However, despite the finding that its inactive analog sulindac sulfone did

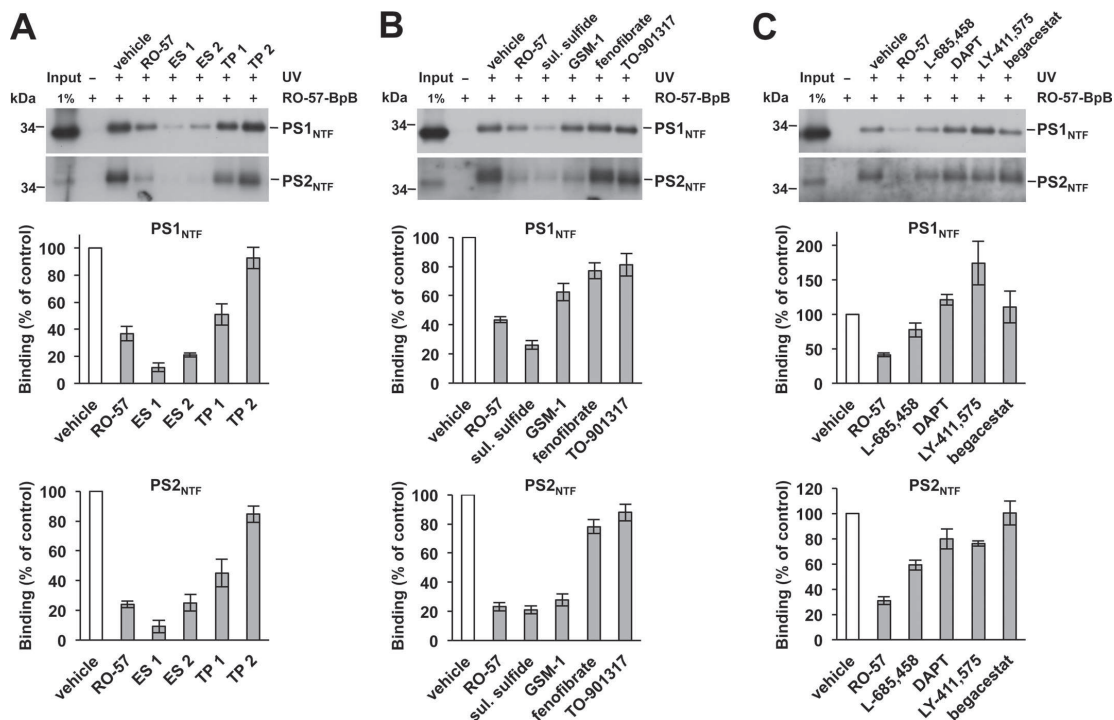


FIGURE 3. **GSMs and GSIs differentially compete for PS NTF labeling by RO-57-BpB.** A–C, competition assay of PS NTF labeling by RO-57-BpB (1 μ M) with other non-acidic GSMs (from Eisai and TorreyPines Therapeutics, each 100 μ M) (A), acidic GSMs (sulindac sulfide and GSM-1, each 100 μ M) and inverse GSMs (fenofibrate and TO-901317, each 100 μ M) (B), and GSIs (L-685,458, DAPT, LY-411,575, and begacestat, each 1 μ M) with different mechanisms of action (C). Quantitation of PS NTF binding is shown in the lower panels of A–C. Data are represented as mean \pm S.E. ($n = 3$ –6).

not compete, it could not be definitively answered whether sulindac sulfide targeted the same site as our GSM photoprobe. For example, the differential effects on labeling competition by these drugs could also have been due to their distinct radical scavenging (23) or membrane-partitioning properties (24).

The second generation acidic compound GSM-1 only weakly competed with RO-57-BpB for PS1 NTF labeling, whereas the drug robustly competed for the labeling of the PS2 NTF. This suggests that the GSM binding sites in the PS1 and PS2 NTFs may have somewhat different conformations and indicates that the binding site of GSM-1 overlaps only partially with that of RO-57-BpB in PS1. The inverse modulators behaved as comparably mild competitors in these assays, suggesting that the PS NTFs are not their principal targets. With the exception of the transition state analog L-685,458, which displayed moderate labeling competition, the GSIs competed for labeling of the PS NTFs very weakly or not at all. The GSM binding site identified here may therefore partially overlap with that of the active site. However, as mentioned before, these interpretations should be taken with some caution as allosteric modulation of the RO-57-BpB binding site by the competitor compounds and/or other factors discussed above influencing labeling competition cannot always be excluded. Vice versa binding experiments using photoactivatable derivatives of the GSMs and GSIs used as competitor compounds in this study against our GSMs would be needed to clarify these issues.

The identification of γ -secretase as a direct target of GSMs also sheds further light on the mechanism of action of GSMs. Although a substrate-targeting mode of GSM action had been suggested (8), the majority of the earlier studies suggested that GSMs target the enzyme (21, 22, 25, 26). By covalent binding of the RO-57-BpB GSM derivative to the PS NTF, but not to APP CTFs, our photoaffinity labeling data now demonstrate this directly for our compounds. Our data thus support previous studies that suggested an allosteric mechanism of GSM action (21, 22, 27), which, however, did not demonstrate direct GSM binding to γ -secretase by GSM photoprobes. Future studies should now aim at a further refinement of the GSM binding site(s) within the PS NTF. Together with this study, such studies will aid in the development of highly effective and hopefully clinically safe GSMs as anti-AD drugs.

Acknowledgments—We thank Edith Winkler and in particular Peer-Hendrik Kuhn for valuable technical advice. We are grateful to Ralph Nixon for antibody PS1N, Manfred Brockhaus for the antibodies BAP15 and BAP24, Masayasu Okochi for the F-NEXT and Alison Goate for the C99-6myc construct, Georg Schmid and Elvira da Silva for HEK293S cell production, Guido Galley for TorreyPines Therapeutics compounds, Helmut Jacobsen for compound analysis in primary neurons, and the Boehringer Ingelheim Pharma KG for DAPT.

REFERENCES

- Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 101–112
- Steiner, H., Fluhner, R., and Haass, C. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 29627–29631
- Wakabayashi, T., and De Strooper, B. (2008) *Physiology* **23**, 194–204
- Wolfe, M. S. (2009) *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 219–224
- Tomita, T. (2009) *Expert. Rev. Neurother.* **9**, 661–679
- Bray, S. J. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 678–689
- Weggen, S., Eriksen, J. L., Das, P., Sagi, S. A., Wang, R., Pietrzik, C. U., Findlay, K. A., Smith, T. E., Murphy, M. P., Bulter, T., Kang, D. E., Marquez-Sterling, N., Golde, T. E., and Koo, E. H. (2001) *Nature* **414**, 212–216
- Kukar, T. L., Ladd, T. B., Bann, M. A., Fraering, P. C., Narlawar, R., Maharvi, G. M., Healy, B., Chapman, R., Welzel, A. T., Price, R. W., Moore, B., Rangachari, V., Cusack, B., Eriksen, J., Jansen-West, K., Verbeeck, C., Yager, D., Eckman, C., Ye, W., Sagi, S., Cottrell, B. A., Torpey, J., Rosenberry, T. L., Fauq, A., Wolfe, M. S., Schmidt, B., Walsh, D. M., Koo, E. H., and Golde, T. E. (2008) *Nature* **453**, 925–929
- Richter, L., Munter, L. M., Ness, J., Hildebrand, P. W., Dasari, M., Unterreitmeier, S., Bulic, B., Beyermann, M., Gust, R., Reif, B., Weggen, S., Langosch, D., and Multhaup, G. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 14597–14602
- Botev, A., Munter, L. M., Wenzel, R., Richter, L., Althoff, V., Ismer, J., Gerling, U., Weise, C., Koksche, B., Hildebrand, P. W., Bittl, R., and Multhaup, G. (2011) *Biochemistry* **50**, 828–835
- Beel, A. J., Barrett, P., Schnier, P. D., Hitchcock, S. A., Bagal, D., Sanders, C. R., and Jordan, J. B. (2009) *Biochemistry* **48**, 11837–11839
- Kounnas, M. Z., Danks, A. M., Cheng, S., Tyree, C., Ackerman, E., Zhang, X., Ahn, K., Nguyen, P., Comer, D., Mao, L., Yu, C., Pleyner, D., Digregorio, P. J., Velicelebi, G., Stauderman, K. A., Comer, W. T., Mobley, W. C., Li, Y. M., Sisodia, S. S., Tanzi, R. E., and Wagner, S. L. (2010) *Neuron* **67**, 769–780
- Page, R. M., Baumann, K., Tomioka, M., Pérez-Revuelta, B. I., Fukumori, A., Jacobsen, H., Flohr, A., Luebbbers, T., Ozmen, L., Steiner, H., and Haass, C. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 677–683
- Kretner, B., Fukumori, A., Gutsmedl, A., Page, R. M., Luebbbers, T., Galley, G., Baumann, K., Haass, C., and Steiner, H. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 15240–15251
- Winkler, E., Hobson, S., Fukumori, A., Dümpelfeld, B., Luebbbers, T., Baumann, K., Haass, C., Hopf, C., and Steiner, H. (2009) *Biochemistry* **48**, 1183–1197
- Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tani, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M., and Haass, C. (2002) *EMBO J.* **21**, 5408–5416
- Wang, J., Brunkan, A. L., Hecimovic, S., Walker, E., and Goate, A. (2004) *Neurobiol. Dis.* **15**, 654–666
- Portelius, E., Van Broeck, B., Andreasson, U., Gustavsson, M. K., Mercken, M., Zetterberg, H., Borghys, H., and Blennow, K. (2010) *J. Alzheimers Dis.* **21**, 1005–1012
- Kukar, T., Murphy, M. P., Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Weggen, S., Smith, T. E., Ladd, T., Khan, M. A., Kache, R., Beard, J., Dodson, M., Merit, S., Ozols, V. V., Anastasiadis, P. Z., Das, P., Fauq, A., Koo, E. H., and Golde, T. E. (2005) *Nat. Med.* **11**, 545–550
- Czech, C., Burns, M. P., Vardanian, L., Augustin, A., Jacobsen, H., Baumann, K., and Rebeck, G. W. (2007) *J. Neurochem.* **101**, 929–936
- Takahashi, Y., Hayashi, I., Tominari, Y., Rikimaru, K., Morohashi, Y., Kan, T., Natsugari, H., Fukuyama, T., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 18664–18670
- Behr, D., Clarke, E. E., Wrigley, J. D., Martin, A. C., Nadin, A., Churcher, L., and Shearman, M. S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 43419–43426
- Santos, F., Teixeira, L., Lúcio, M., Ferreira, H., Gaspar, D., Lima, J. L., and Reis, S. (2008) *Free Radic. Res.* **42**, 639–650
- Fan, S. S., and Shen, T. Y. (1981) *J. Med. Chem.* **24**, 1197–1202
- Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Smith, T. E., Weggen, S., Das, P., McLendon, D. C., Ozols, V. V., Jessing, K. W., Zavitz, K. H., Koo, E. H., and Golde, T. E. (2003) *J. Clin. Invest.* **112**, 440–449
- Sato, T., Nyborg, A. C., Iwata, N., Diehl, T. S., Saido, T. C., Golde, T. E., and Wolfe, M. S. (2006) *Biochemistry* **45**, 8649–8656
- Lleó, A., Berezovska, O., Herl, L., Raju, S., Deng, A., Bacskai, B. J., Frosch, M. P., Irizarry, M., and Hyman, B. T. (2004) *Nat. Med.* **10**, 1065–1066
- Baumann, K., Flohr, A., Goetschi, E., Jacobsen, H., Jolidon, S., and Luebbbers, T. (August 27, 2009) World Intellectual Property Organization (WIPO) Patent WO2009103652

Ebke et al., Supplementary Information

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Antibodies

Monoclonal and polyclonal antibodies, respectively, to the N-termini of PS1 (PS1N (1)) and PS2 (2972 (2)), to the C-terminus of PS2 (BI.HF5C (3)), to the N-terminus of PEN-2 (1638 (4)) and to the C-terminus of APH-1b (435 (5)) were described before. Polyclonal antibodies 5023 to the C-terminus of PS1 and 4319 to APH-1aS/L, respectively, are identical to antibodies 3027 (6) and 2021 (5) described previously. Polyclonal antibody N1660 to the NCT C-terminus was obtained from Sigma. Monoclonal and polyclonal antibodies, respectively, to A β 1-40 (3552 (7)) and A β 1-16 (2D8 (8)) and to the C-terminus of APP 6687 (9) have been described. C-terminal specific anti-A β antibodies to A β ₄₀ (BAP24) and A β ₄₂ (BAP15) were kindly provided by Dr. Manfred Brockhaus (Roche Applied Science) and to A β ₃₈ obtained from Meso Scale Discovery, respectively. Monoclonal antibodies to the c-myc (9E10) and the His₆ epitopes (Penta-His) were obtained from Santa Cruz Biotechnology and Qiagen, respectively. Cleaved Notch1 (Val1744) antibody was obtained from Cell Signaling Technology. Rabbit polyclonal antibody to calnexin (SPA-860) was obtained from Stressgen.

Cell lines, cDNA transfections, and cell culture

HEK293 cells stably expressing Swedish mutant APP (HEK293/sw) and cell lines derived thereof stably expressing individual combinations of PS and APH-1 were generated and cultured as described (8). HEK293 cells stably co-expressing C99-6myc (10) and F-NEXT (containing the M1727V mutation) (11) γ -secretase substrates were generated by sequential stable transfection of the respective cDNA expression constructs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cleveland, OH) according to the manufacturer's instructions. Stable cells were first selected for hygromycin resistance (HEK293/F-NEXT) and then following co-transfection of C99-6myc and pcDNA3.1/zeo(+) vector (10:1) for zeocin resistance (HEK293/F-NEXT/C99-6myc). To generate primary cortical neurons, rat embryos were recovered from 17 days old pregnant Wistar rats. The cortical leaves were collected into CSS buffer (120 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.2, 15 mM glucose, 0.8 mM MgCl₂) and carefully dispersed with dispase II (Roche Applied Science, cat. no. 295825). After removing the dispase, the cells were plated into 48-well poly-D-

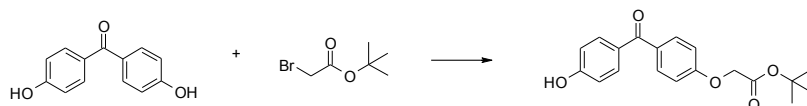
lysine-pretreated microtiter plates at a density of 1×10^5 cells per well and cultured in Neurobasal medium (supplemented with B27, Glutamax I, human recombinant bFGF, penicillin/streptomycin, fungizon; all from Invitrogen) for 1 to 2 weeks (37°C , 5% CO_2) prior to drug treatment.

Aminopyrimidine-derived GSMs

Synthesis of 2-{6-(4-chloro-benzyl)-2-[3-methoxy-4-(4-methyl-imidazol-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-propan-2-ol (RO-02); 2-[2-[3-methoxy-4-(4-methyl-imidazol-1-yl)-phenylamino]-6-(4-trifluoromethyl-phenyl)-pyrimidin-4-yl]-propan-2-ol (RO-03), and of [3-methoxy-4-(4-methyl-imidazol-1-yl)-phenyl]-[4-methoxy-6-methyl-pyrimidin-2-yl]-amine (RO-57) was as described in patent WO2009103652.

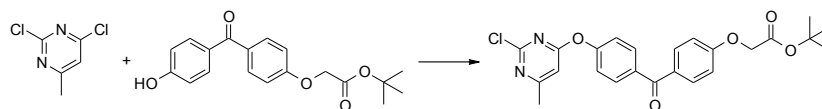
Synthesis of RO-57-BpB

Preparation of [4-(4-hydroxy-benzoyl)-phenoxy]-acetic acid *tert.*-butyl ester



4,4-Dihydroxybenzophenon (1.07 g, 5 mmol) and 2-bromo-acetic acid *tert.*-butyl ester (975 mg, 5 mmol) were dissolved in acetonitrile (10 mL) and potassium carbonate (1.38 g, 10 mmol) was added. The suspension was stirred at room temperature over night. The solids were filtered off, washed with acetone and the solvent was removed under reduced pressure. On standing the residue crystallized. It was suspended with methylene chloride and mainly the starting material was filtered off and washed with methylene chloride. The filtrate was purified by column chromatography on silica gel using diethyl ether and heptane (v/v = 1:1) as eluent. The title compound was obtained as a white solid (340 mg, 21 %). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) = 7.76 (t, 4H), 6.95 (d, 2H), 6.90 (d, 2H), 5.28 (s, 1H), 4.60 (s, 2H), 1.50 (s, 9H).

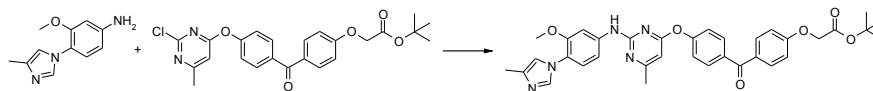
Preparation of {4-[4-(2-chloro-6-methyl-pyrimidin-4-yloxy)-benzoyl]-phenoxy}-acetic acid *tert.*-butyl ester



2,4-Dichloro-6-methyl-pyrimidine (163 mg, 1.0mmol), [4-(4-hydroxy-benzoyl)-phenoxy]-acetic acid *tert.*-butyl ester (340 mg, 1.05 mmol), potassium carbonate (165 mg, 1.2 mmol) and sodium iodide (7.5 mg, 0.05 mmol) were stirred in acetone (3 mL)

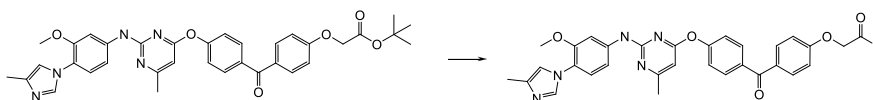
at room temperature over the weekend. The reaction was filtered and the solid was washed with acetone. The filtrate was concentrated and the residue was used directly in the next step.

Preparation of [4-(4-(2-[3-methoxy-4-(4-methyl-imidazol-1-yl)-phenylamino]-6-methyl-pyrimidin-4-yloxy)-benzoyl)-phenoxy]-acetic acid tert-butyl ester



To a solution of 3-methoxy-4-(4-methyl-imidazol-1-yl)-phenylamine (203 mg, 1.0 mmol), {4-[4-(2-chloro-6-methyl-pyrimidin-4-yloxy)-benzoyl]-phenoxy}-acetic acid *tert.*-butyl ester (454 mg, 1.0 mmol) and sodium *tert.*-butoxide (144 mg, 1.5 mmol) in dioxane (3 mL) was added under nitrogen a dark solution of palladium acetate (17.9 mg, 0.08 mmol) and 2-(dicyclohexylphosphino)biphenyl (56 mg, 0.16 mmol) in dioxane (1 mL). The reaction was heated to 150°C in a microwave oven for 1 hour. It was partitioned between ethyl acetate and water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated aqueous sodium chloride solution, dried over sodium sulfate, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using a mixture of methanol and methylene chloride (v/v = 1:19) as the eluent. The title compound was obtained as a white solid (50 mg, 20 %). MS ISP (m/e) = 622.4 (32) [(M+H)⁺], 566.4 (100) [(M-isobutene+H)⁺]. ¹H NMR (DMSO-D₆, 300 MHz): δ (ppm) = 9.90 (s, 1H), 8.17 (m, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.59 - 7.71 (m, 3H), 7.42 (t, 2H), 7.15 - 7.26 (m, 3H), 7.01 (s, 1H), 3.75 (s, 1H), 2.14 (s, 1H).

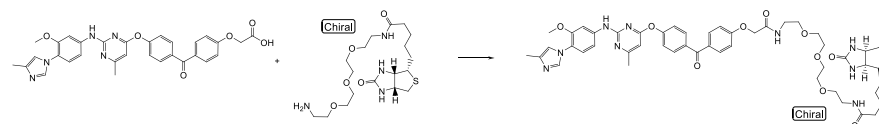
Preparation of 2-(4-(4-(2-(3-methoxy-4-(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)phenylamino)-6-methylpyrimidin-4-yloxy)benzoyl)phenoxy)acetic acid



A light yellow solution of *tert.*-butyl 2-(4-(4-(2-(3-methoxy-4-(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)phenylamino)-6-methylpyrimidin-4-yloxy)benzoyl)phenoxy)acetate (160 mg, 257 μmol) in formic acid (10 mL) was stirred at room temperature over night. The solvent was evaporated under reduced pressure to yield the title compound as a light yellow solid (140 mg, 96 %). MS ISP (m/e): 566.3 (100) [(M+H)⁺], 367.2 (91). ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) = 9.78 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.80 (d, 2H), 7.78 (d, 2H), 7.64 (s, 1H), 7.60 (m, 1H), 7.45 - 7.42 (m, 3H), 7.21 (d, 1H),

7.08 (d, 2H), 6.98 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 4.80 (s, 2H), 3.52 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.12 (s, 3H).

Preparation of *N*-(1-(4-(4-(2-(3-methoxy-4-(4-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)phenylamino)-6-methylpyrimidin-4-yloxy)benzoyl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12-trioxo-3-azatetradecan-14-yl)-5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamide (RO-57-BpB)



To a solution of 2-(4-(4-(2-(3-methoxy-4-(4-methyl-1*H*-imidazol-1-yl)phenylamino)-6-methylpyrimidin-4-yloxy)benzoyl)phenoxy)acetic acid (20 mg, 35.4 μmol) in methylene chloride (2 mL) was added triethylamine (7.16 mg, 9.86 μL , 70.7 μmol) and stirred at ambient temperature for 10 minutes. 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (8.13 mg, 42.4 μmol) and 1-hydroxybenzotriazole hydrate (7.04 mg, 46.0 μmol) were added and the resulting solution was stirred at ambient temperature for 30 minutes until it became clear. A solution of *N*-(2-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamide (14.8 mg, 35.4 μmol) in methylene chloride was added followed by triethylamine (7.16 mg, 9.86 μL , 70.7 μmol) and stirred at ambient temperature over night. Several times another aliquot of 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (8.13 mg, 42.4 μmol) and triethylamine (7.16 mg, 9.86 μL , 70.7 μmol) had to be added until better conversion was observed monitored by MS. The reaction mixture was diluted with chloroform, washed with water, saturated aqueous sodium chloride solution, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and the solvent was evaporated in vacuo. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using a gradient from methylenechloride to methylene chloride/methanol/aqueous saturated ammonia solution (v/v = 9:1:0.1) as eluent to yield the title compound as a white solid (11.2 mg, 33 %). MS ISP (m/e): 484.2 (100), 966.5 (18) [(M+H)⁺]. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) = 7.85 (d, 4H), 7.61 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.48 (t, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.30 (m, 1H), 7.05 (d, 1H), 7.00 - 6.97 (m, 3H), 6.84 (s, 1H), 6.48 (m, 1H), 6.32 (s, 1H), 5.79 (s, 1H), 4.97 (s, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.48 (m, 1H), 4.31 (m, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.61- 3.42 (m, 16H), 3.12 (m, 1H), 2.89 (dd, 1H), 2.72 (d, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.18 (m, 2H), 1.66 (m, 2H), 1.40 (m, 2H).

Other compounds

Preparation of GSM-1 and of GSMs from Eisai has been described previously (see (12-14) and references to the relevant patent literature therein). Torrey Pines compounds were kindly provided by Guido Galley (Roche). Sulindac sulfide, sulindac sulfone and fenofibrate were obtained from Sigma, and TO-901317 from Biozol. LY-411,575 was synthesized as described in patent WO1998028268A3. Begacestat was synthesized as described elsewhere (15). L-685,458 was obtained from Calbiochem and DAPT a kind gift of the Boehringer Ingelheim Pharma KG.

Drug treatment and analysis of γ -secretase cleavage products in cell-based, cell-free and membrane-based γ -secretase assays

GSM treatment of HEK293/sw and derived stably transfected cell lines, and of rat primary cortical neurons, GSM dose-response analyses, and determination of IC_{50} values for $A\beta_{42}$ inhibition were carried out as described (14). Secreted $A\beta$ species of HEK293/sw cells were analyzed by sandwich immunoassay (Meso Scale Discovery) using C-terminal specific antibodies to $A\beta_{38}$, $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$, and of rat primary cortical neurons by ELISA kits from Wako (Cat. no. 294-64701 ($A\beta_{40}$) and 290-62601 ($A\beta_{42}$)) following the protocol of the manufacturer. 6myc-tagged AICD and NICD species were identified by immunoblotting of cell lysates using antibody 9E10 and for NICD additionally with Cleaved Notch1 (Val1744) antibody. 9E10-detected NICD and AICD were quantified by measuring their chemiluminescence signal intensities using the CCD camera-based FluorChem 8900 detection system (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). Cell-free γ -secretase assays were carried out as described using γ -secretase purified from HEK293 cells grown in suspension (HEK293S) and recombinant C100-His₆ substrate purified from *E. coli* (16). $A\beta$ and AICD species generated in these assays were analysed as described by Tris-Bicine urea SDS-PAGE and immunoblotting using antibody 2D8, and by immunoblotting using anti-Penta-His antibody, respectively (16). Mass-spectrometry of in vitro generated AICD species was carried out as described (16) except that AICD was immunoprecipitated with antibody 6687 prior to analysis. To analyse the production of $A\beta$ species in membrane-based in vitro γ -secretase assays, membrane fractions were prepared from HEK293/sw cells as outlined previously (Winkler et al, 2009), except that the Brij-35/Lubrol WX extraction step was omitted. Membranes equivalent to one and a half 10-cm dishes (75 μ l) were incubated with RO-57-BpB or vehicle for 16 h at 4 or 37 °C, then samples were solubilized by adding SDS to a final concentration of 1% and incubation for 30 min at RT. Following dilution of SDS to a

final concentration of 0.1% with immunoprecipitation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% NP-40) and a clarifying spin for 30 min at 16.000 x g at 4 °C, the in vitro generated A β species were immunoprecipitated with antibody 3552, separated by Tris-Bicine urea SDS-PAGE and analysed by immunoblotting using antibody 2D8. The levels of A β ₃₈, A β ₄₀ and A β _{42/43} were quantified by measuring their chemiluminescence signal intensities using the CCD camera-based FluorChem 8900 detection system.

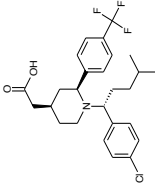
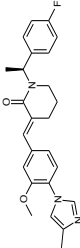
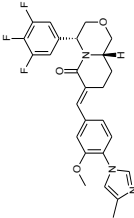
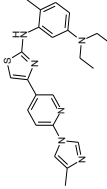
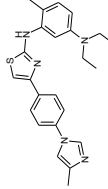
Photoaffinity-labeling

Membrane fractions were prepared from HEK293S or HEK293/sw cells as described (16), except that the Brij-35/Lubrol WX extraction step was omitted. Membranes equivalent to one 10-cm dish (50 μ l) were diluted tenfold with resuspension buffer (50 mM BisTris-HCl, pH 7.0, 66.7 mM ϵ -aminocaproic acid, 1 mM EDTA and 10 mM DTT) containing 1x protease inhibitors (PI) (Complete, Roche). RO-57-BpB (1 μ M) and where indicated, competition compounds were added at 100 μ M for GSMs or 1 μ M for GSIs, and samples were preincubated for 2 h at 4 °C with agitation in the dark. Photoactivation of RO-57-BpB was performed for 10 min on ice with a 3UV (8 W, 230 V, 50 Hz) UV lamp (UVP, Cambridge, UK) at 365 nm and a distance to the samples of 1.5 cm. Membranes were pelleted by centrifugation for 30 min at 16.000 x g and 4 °C and solubilized in 0.5 ml solubilization buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% NP-40, 1% SDS) containing 1x PI for 30 min at RT. Following a clarifying spin for 30 min at 16.000 x g at RT, pulldown of covalently crosslinked proteins was performed with 15 μ l of Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) slurry equilibrated in solubilization buffer in batch mode for 1 h at RT. Beads were washed three times with 0.5 ml solubilization buffer, captured proteins were eluted with SDS sample buffer containing 5 M urea and 2 mM biotin for 10 min at 65 °C, separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting. Levels of immunoblotted RO-57-BpB-labeled PS NTFs were quantified by measuring their chemiluminescence signal intensities using the CCD camera-based FluorChem 8900 detection system.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

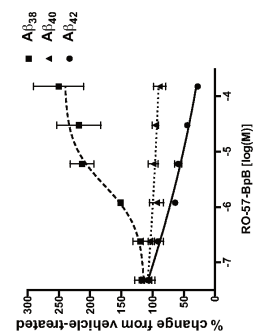
1. Capell, A., Saffrich, R., Olivo, J. C., Meyn, L., Walter, J., Grunberg, J., Mathews, P., Nixon, R., Dotti, C., and Haass, C. (1997) *J. Neurochem.* **69**, 2432-2440
2. Tomita, T., Maruyama, K., Saido, T. C., Kume, H., Shinozaki, K., Tokuhira, S., Capell, A., Walter, J., Grunberg, J., Haass, C., Iwatsubo, T., and Obata, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 2025-2030
3. Steiner, H., Romig, H., Grim, M. G., Philipp, U., Pesold, B., Citron, M., Baumeister, R., and Haass, C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7615-7618

4. Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., and Haass, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 39062-39065
5. Shirotani, K., Edbauer, D., Prokop, S., Haass, C., and Steiner, H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 41340-41345
6. Walter, J., Grunberg, J., Schindzielorz, A., and Haass, C. (1998) *Biochemistry* **37**, 5961-5967
7. Yamasaki, A., Eimer, S., Okochi, M., Smialowska, A., Kaether, C., Baumeister, R., Haass, C., and Steiner, H. (2006) *J. Neurosci.* **26**, 3821-3828
8. Shirotani, K., Tomioka, M., Kremmer, E., Haass, C., and Steiner, H. (2007) *Neurobiol. Dis.* **27**, 102-107
9. Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. G., Baumeister, R., Fichteler, K., and Haass, C. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 848-851
10. Wang, J., Brunkan, A. L., Hecimovic, S., Walker, E., and Goate, A. (2004) *Neurobiol. Dis.* **15**, 654-666
11. Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M., and Haass, C. (2002) *EMBO J.* **21**, 5408-5416
12. Page, R. M., Baumann, K., Tomioka, M., Perez-Revuelta, B. I., Fukumori, A., Jacobsen, H., Flohr, A., Luebbers, T., Ozmen, L., Steiner, H., and Haass, C. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 677-683
13. Portelius, E., Van Broeck, B., Andreasson, U., Gustavsson, M. K., Mercken, M., Zetterberg, H., Borghys, H., and Blennow, K. (2010) *J. Alzheimers Dis.* **21**, 1005-1012
14. Kretner, B., Fukumori, A., Gutschiedl, A., Page, R. M., Luebbers, T., Galley, G., Baumann, K., Haass, C., and Steiner, H. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 15240-15251
15. Mayer, S. C., Kreft, A. F., Harrison, B., Abou-Gharbia, M., Antane, M., Aschmies, S., Atchison, K., Chlenov, M., Cole, D. C., Comery, T., Diamantidis, G., Ellingboe, J., Fan, K., Galante, R., Gonzales, C., Ho, D. M., Hoke, M. E., Hu, Y., Huryn, D., Jain, U., Jin, M., Kremer, K., Kubrak, D., Lin, M., Lu, P., Magolda, R., Martone, R., Moore, W., Oganessian, A., Pangalos, M. N., Porte, A., Reinhart, P., Resnick, L., Riddell, D. R., Sonnenberg-Reines, J., Stock, J. R., Sun, S. C., Wagner, E., Wang, T., Woller, K., Xu, Z., Zaleska, M. M., Zeldis, J., Zhang, M., Zhou, H., and Jacobsen, J. S. (2008) *J. Med. Chem.* **51**, 7348-7351
16. Winkler, E., Hobson, S., Fukumori, A., Dumpelfeld, B., Luebbers, T., Baumann, K., Haass, C., Hopf, C., and Steiner, H. (2009) *Biochemistry* **48**, 1183-1197

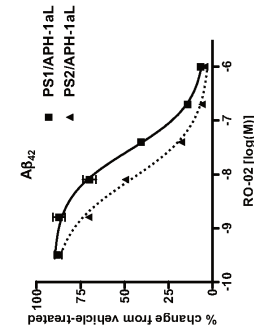
compound	structure	IC ₅₀ (Aβ ₄₂) (HEK293/sw cells)
GSM-1		180 nM (log IC ₅₀ = -6.75 ± 0.16) (Kretner et al, 2011)
Eisai 1 (ES 1, E2012)		75 nM (log IC ₅₀ = -7.12 ± 0.04) (this study)
Eisai 2 (ES 2)		40 nM (log IC ₅₀ = -7.39 ± 0.12) (Kretner et al, 2011)
TorreyPines 1 (TP 1)		43 nM (log IC ₅₀ = -7.36 ± 0.05) (this study)
TorreyPines 2 (TP 2)		45 nM (log IC ₅₀ = -7.34 ± 0.10) (Kretner et al, 2011)

SUPPLEMENTARY TABLE 1. Structures and IC₅₀ values for inhibition of Aβ₄₂ generation of acidic and non-acidic second generation GSMs. Shown are GSM-1, an acidic GSM from Merck, and bridged aromatic compounds from Eisai and TorreyPines Therapeutics, respectively.

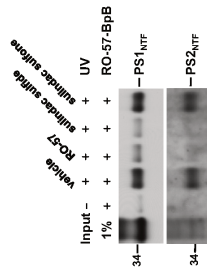
SUPPLEMENTARY FIGURE 2. RO-57-BpB modulates γ -secretase activity in a membrane-based assay. RO-57-BpB dose-response analysis in isolated HEK293/sw cell membranes. A β species were quantified following their separation by Tris-Bicine urea SDS-PAGE. Data are represented as mean \pm SEM (n = 3). IC₅₀ (A β ₄₂) = 1.8 μ M. Note that A β ₄₂ is not resolved from A β ₄₃ by Tris-Bicine urea SDS-PAGE under our conditions.



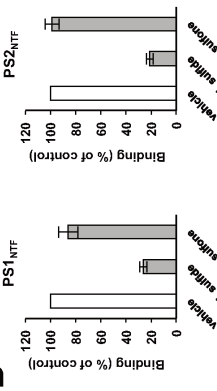
SUPPLEMENTARY FIGURE 1. RO-02 lowers A β ₄₂ generation of PS1 and PS2 containing γ -secretase complexes with differential potency. Dose-response analysis of γ -secretase activity modulation by RO-02 in HEK293/sw cells selectively expressing PS1/APH-1 α or PS2/APH-1 α by A β sandwich immunoassay. Data are represented as mean \pm SEM (n = 3). IC₅₀ (A β ₄₂) = 28 nM (log IC₅₀ = -7.55 \pm 0.06) (PS1/APH-1 α γ -secretase complex), IC₅₀ (A β ₄₂) = 8 nM (log IC₅₀ = -8.10 \pm 0.06) (PS2/APH-1 α γ -secretase complex), p < 0.001, z-test.



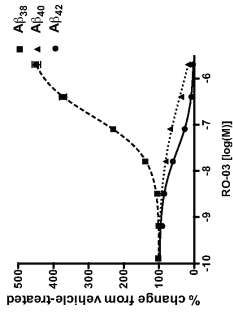
A



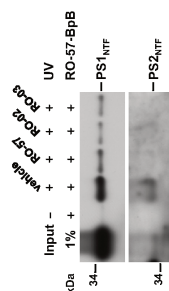
B



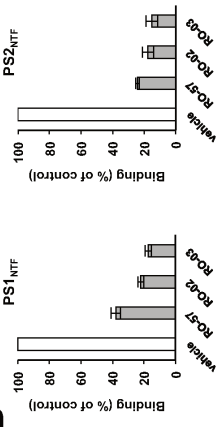
B



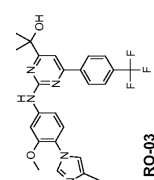
C



D



A



SUPPLEMENTARY FIGURE 4. Sulindac sulfone does not compete for PS NTF labeling by RO-57-BpB. A. Competition assay of PS NTF labeling by RO-57-BpB with sulindac sulfide and its inactive analogue sulindac sulfone. B. Quantitation of PS NTF binding. Data are represented as mean \pm SEM (n = 5).

SUPPLEMENTARY FIGURE 3. RO-03, another highly potent structural relative of RO-02 and RO-57 efficiently competes PS NTF labeling by RO-57-BpB. A. Structure of RO-03. B. Dose-response analysis of γ -secretase activity modulation by RO-03 by in HEK293/sw cells by A β sandwich immunoassay. Data are represented as mean \pm SEM (n = 3). Note that for most data points, error bars are too small to be displayed. IC₅₀ (A β ₄₂) = 26 nM (log IC₅₀ = -7.59 \pm 0.05). C. Labeling-competition of PS NTF binding by RO-57-BpB with RO-03 as compared with RO-02 and RO-57. D. Quantitation of PS NTF binding. Data are represented as mean \pm SEM (n = 5).