

Aus dem Adolf Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie

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

**Funktionelle Charakterisierung der γ -Sekretasekomponente
PEN-2**

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

vorgelegt von

Stefan Prokop

aus

Starnberg

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. rer nat. Harald Steiner

2. Berichterstatter Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.A. Kretzschmar

PD Dr. M. Dichgans

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: -

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2006

*Ihr die Ihr hier eintretet
lasst alle Hoffnung fahren.*

(Dante Alghieri: Die göttliche Kommödie, Hölle)

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- Prokop S., Shirotani K., Edbauer D., Haass C. and Steiner H.,
**Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal
fragment heterodimer within the γ -secretase complex,**
J Biol Chem,2004,278(22):p 23255-61.
- Prokop S., Haass C. and Steiner H.,
**Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain deter-
mines its function in the stabilization of presenilin fragments,**
J Neurochem,2005,94(1):p 57-62.

Diese Publikationen sind der vorliegenden Arbeit im Anhang beigelegt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Alzheimersche Erkrankung	1
1.2	Molekularbiologie des Morbus Alzheimer	3
1.2.1	Hypothese der Amyloidkaskade der Alzheimer-Pathogenese	3
1.2.2	β APP und seine Prozessierung durch Sekretasen	5
1.2.3	Der Presenilin/ γ -Sekretasekomplex	12
1.3	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Molekularbiologische Arbeitstechniken	20
2.1.1	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain reaction, PCR)	20
2.1.2	Subklonierung von PEN-2 und -Varianten in pcDNA Säugerzellexpressionsvektoren	23
2.1.3	Vermehrung von Plasmidvektoren in <i>E. coli</i>	25
2.1.4	Klonierung von PEN-2 siRNA in den pSUPER RNAi-Expressionsvektor	28
2.2	Zellkultur	30
2.2.1	Zelllinien und Kulturmedien	30
2.2.2	Zellkultivierung	31
2.2.3	Transfektion von DNA und Selektion von stabiler Transfektanten	33
2.2.4	Behandlung von Zellen mit Inhibitoren	34
2.2.5	Gewinnung von konditioniertem Medium zur A β -Bestimmung	34
2.3	Biochemische Arbeitstechniken	35
2.3.1	Zellyse und Immunpräzipitation	35
2.3.2	Membranpräparation und Membranlyse	36
2.3.3	Co-Immunpräzipitation	37
2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blotting	38
3	Ergebnisse	42
3.1	Stabiler RNAi-Knockdown von PEN-2 und RNAi-Reversion	42
3.1.1	Stabiler PEN-2 RNAi-Knockdown	42
3.1.2	Reversion des PEN-2 RNAi-Knockdown	44
3.2	Der C-Terminus von PEN-2 ist für die Stabilisierung der Presenilin Fragmente wichtig	46

3.2.1	Der C-Terminus wird für die Funktion von PEN-2 benötigt . .	46
3.2.2	Der PEN-2 C-Terminus ist für die Stabilisierung der Presenilin Fragmente wichtig	51
3.2.3	PEN-2 Δ C und die Presenilin Fragmente werden vom Pro- teasom abgebaut	53
3.2.4	PEN-2 Δ C kann keinen stabilen γ -Sekretasekomplex bilden . .	56
3.2.5	PEN-2 ist auch in Abwesenheit der Presenilin Endoproteolyse für die Reifung und Aktivität des γ -Sekretasekomplexes wichtig	57
3.3	Länge und gesamter Sequenzkontext des PEN-2 C-Terminus sind für eine geregelte Funktion wichtig	60
3.3.1	Die Länge des PEN-2 C-Terminus ist für die PEN-2 Funktion wichtig	61
3.3.2	Der Gesamtsequenzkontext des C-Terminus ist für die PEN-2 Funktion wichtig	62
3.3.3	Gestörte γ -Sekretasekomplex Bildung der C-terminalen PEN- 2 Mutanten	64
3.3.4	Länge und Sequenz des PEN-2 C-Terminus sind für die Stabi- lisierung der PS1 Fragmente wichtig	66
3.3.5	PEN-2 Mutanten und Presenilin Fragmente bilden einen in- stabilen γ -Sekretasekomplex	67
3.3.6	Prämature γ -Sekretasekomplexe sind noch nicht aktiv	68
4	Diskussion	71
4.1	PEN-2 ist für die Endoproteolyse von PS1 und die Reifung des γ - Sekretasekomplexes wichtig	71
4.2	Der C-Terminus von PEN-2 ist für die Stabilisierung des PS-NTF/- CTF Heterodimers nach der Endoproteolyse wichtig	73
4.3	PEN-2 spielt eine generelle Rolle bei der Reifung und Aktivität des γ -Sekretasekomplexes, unabhängig von der PS Endoproteolyse	74
4.4	Länge und Sequenzkontext des PEN-2 C-Terminus sind für die Stabi- lisierung der PS Fragmente und von PEN-2 selbst wichtig	75
4.5	Prämature γ -Sekretasekomplexe sind nicht aktiv	76
4.6	Modell der Assemblierung des γ -Sekretasekomplexes mit der PEN- 2 Δ C-Mutante	77
4.7	Ausblick	78
5	Zusammenfassung	79
	Literaturverzeichnis	81
	Anhang	98
	Abbildungsverzeichnis	98
	Tabellenverzeichnis	100
	Abkürzungsverzeichnis	101

Verzeichnis der Firmen	103
Einbuchstabencode für Aminosäuren	104
rpm / x g -Umrechnungstabelle für Zentrifugen	105
Lebenslauf	106
Schriftenverzeichnis	107
Danksagung	108
Publikation I	109
Publikation II	117

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimersche Erkrankung

Die Alzheimersche Erkrankung (Alzheimers disease, AD) ist die häufigste Ursache für fortschreitende Neurodegeneration in den Industrienationen und die vierthäufigste Todesursache in den Vereinigten Staaten von Amerika [83]. Schätzungen gehen davon aus, daß im Jahre 2000 in den Vereinigten Staaten von Amerika 4,5 Millionen Menschen betroffen waren [57], in Deutschland sollen es 650.000 gewesen sein [8]. Der Prozentsatz an Alzheimerpatienten verdoppelt sich ab dem 60. Lebensjahr etwa alle 5 Jahre, was bedeutet, daß bei einem Prozent betroffener 60-jähriger, ca. 30% der 85-jährigen erkrankt sind [64]. Wachsende Lebenserwartung und die Zunahme der Anzahl alter Menschen macht damit die Alzheimersche Erkrankung zu einem immer dringlicheren medizinischen Problem. Basierend auf gegenwärtigen Entwicklungen rechnet man in Deutschland mit über 2 Millionen Betroffenen im Jahre 2050 [9]. Dies zeigt auf, wie wichtig es ist, effektive Therapiemöglichkeiten oder besser Präventionsstrategien zu entwickeln.

Die Alzheimersche Erkrankung, nach dem Erstbeschreiber, dem Neurologen und Psychiater Alois Alzheimer [3] benannt, ist klinisch vor allem durch amnestische Gedächtnisverluste, Sprachstörungen und visuospatielle Defizite gekennzeichnet [29]. Die Symptome entwickeln sich meist langsam progressiv, beginnend mit einer schleichend zunehmenden Vergeßlichkeit und Verlust von höheren geistigen Fähigkeiten, bis hin zu Problemen bei einfachsten täglichen Aufgaben (Kämmen, Essen, Toilettenbenutzung) in späteren Krankheitsphasen. Während dieser Entwicklung kommen auch noch Stimmungsschwankungen und Apathie hinzu, die sich zur Psychose und Agitation in fortgeschrittenen Krankheitsphasen auswachsen können [162]. Die Komplexität der Krankheit stellt hohe Anforderungen an Angehörige, Pflegekräfte und medizinisches Personal.

Schon Alois Alzheimer verknüpfte seine klinischen Untersuchungsergebnisse mit den Befunden der Autopsie. Neuropathologische Kennzeichen der Alzheimer Demenz sind Amyloid-Plaques, extrazelluläre Aggregate von Amyloid β -Peptid ($A\beta$, Abb. 1.1) und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (Abb. 1.2, "Tangles"), Aggregate des

Mikrotubulus-assoziierten Proteins Tau [11].

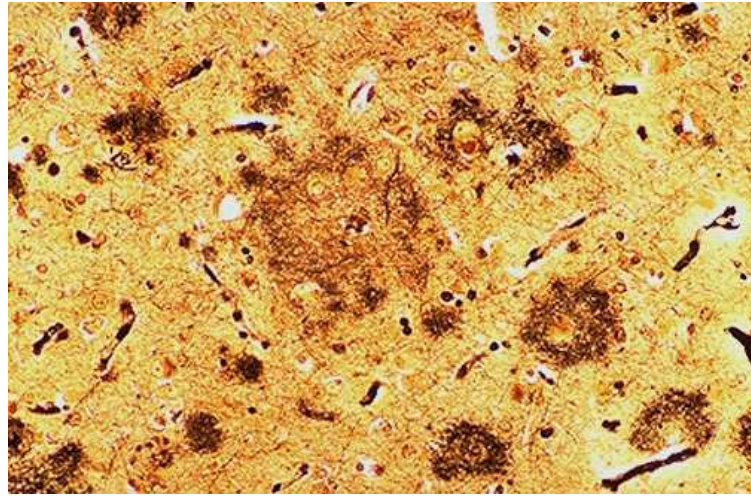


Abbildung 1.1: **Amyloid-Plaques** Mehrere Plaques, umgeben von degenerativ veränderten präsynaptischen Endigungen (Abbildung aus Webpath).

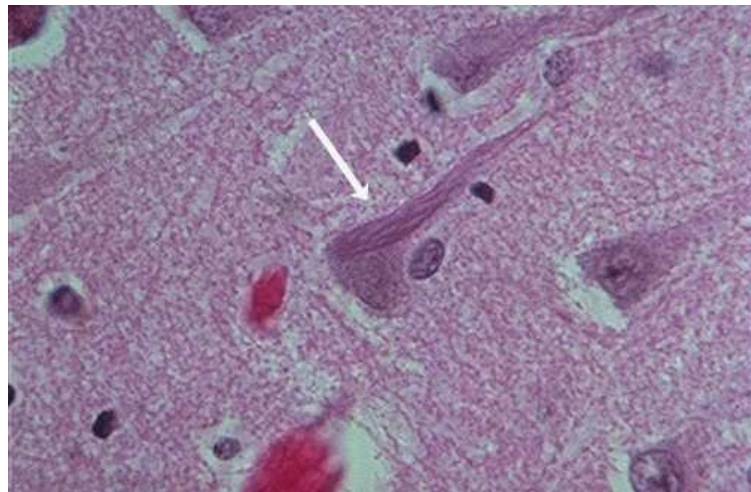


Abbildung 1.2: **Neurofibrilläre Bündel** (“**Tangles**“) Hier als lange Filamente (Pfeil) im Zytoplasma zu sehen (Abbildung aus Webpath).

Erst Anfang der 80er Jahre des 20 Jhdts. kam mit der Aufklärung der Sequenz des Amyloid β -Peptides ($A\beta$) [46][91] eine Welle von genetischen und molekularbiologischen Entdeckungen ins Rollen, die das Verständnis der Alzheimerschen Erkrankung drastisch verändert haben und Hoffnung auf baldige therapeutische Optionen geweckt haben.

1.2 Molekularbiologie des Morbus Alzheimer

1.2.1 Hypothese der Amyloidkaskade der Alzheimer-Pathogenese

Bei der biochemischen Analyse von $A\beta$ stellte man fest, daß zwei wesentliche Formen vorliegen, das 40 Aminosäuren (As) lange $A\beta_{40}$ und das zwei As längere $A\beta_{42}$ [115] [97]. Die längere $A\beta_{42}$ -Form neigt hierbei stärker zur Aggregation und kann als Aggregationskeim die Ablagerung von $A\beta$ begünstigen [63] [145]. Tatsächlich wurde auch in Gehirnen von AD-Patienten, im Vergleich zu den Gehirnen von gesunden Kontrollpersonen, vermehrt $A\beta_{42}$ nachgewiesen, wobei sich das Verhältnis von $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ zur längeren Isoform hin verschoben hatte [146].

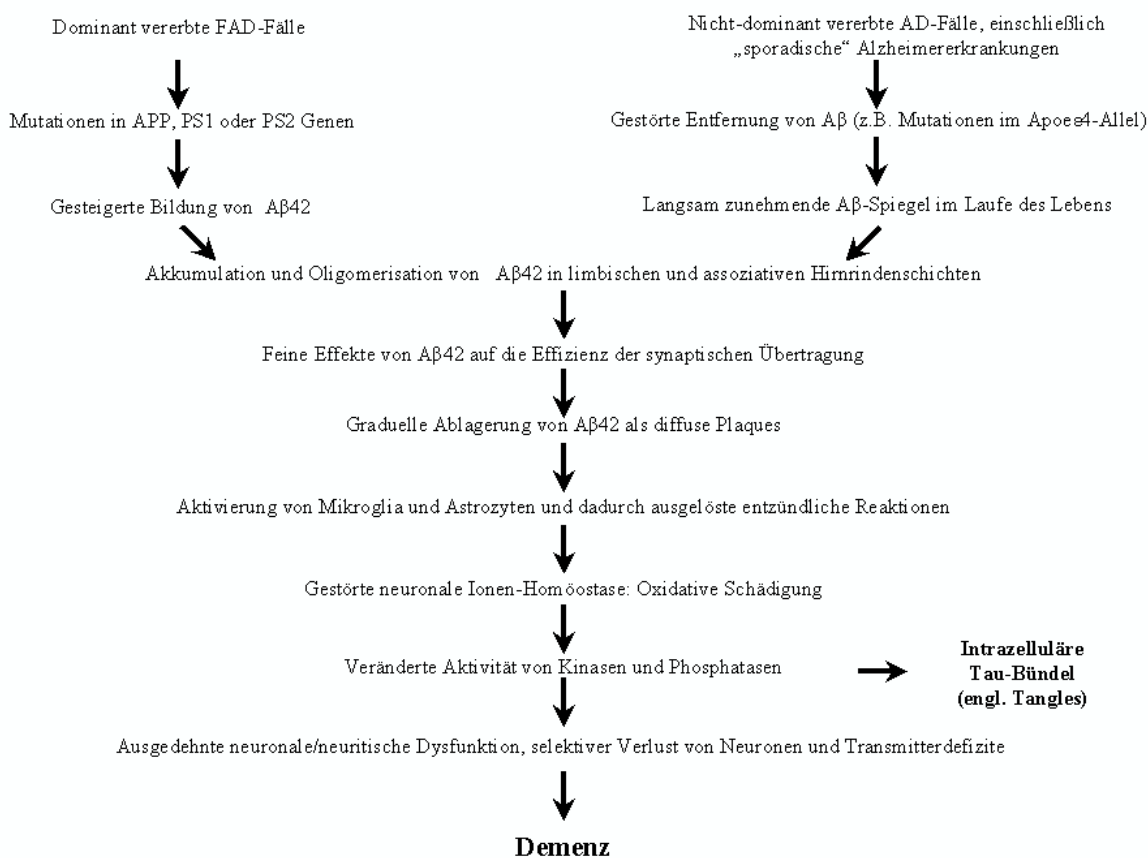


Abbildung 1.3: **Hypothese der Amyloidkaskade der Alzheimer-Pathogenese.** Die Akkumulation von $A\beta$ steht als primäre Ursache im Zentrum der Alzheimer-Pathogenese, sowohl bei FAD-Fällen (“familial Alzheimer’s disease“, siehe unten), als auch bei sporadischen AD Erkrankungen. Vor allem oligomere Aggregationszwischenstufen stören die synaptische Übertragung, lösen entzündliche Begleitreaktionen aus und führen zur Aggregation von Tau. Am Ende steht der Verlust von Neuronen und Transmitterdefizite, die zu den Symptomen der Demenz führen (Schema modifiziert nach [121]).

Die Identifizierung von $A\beta$ als Hauptkomponente der senilen Plaques führte, zusammen mit der Analyse von Familien mit einem gehäuften Auftreten von präseniler Demenz (familial Alzheimers disease, FAD) zur Entwicklung der Amyloidkaskadenhypothese [121] [55] (Abb. 1.3), wonach die Akkumulation von $A\beta$, sei es durch vermehrte Bildung und / oder durch verzögerten Abbau, als primäre Ursache der pathologischen Veränderungen der Alzheimerschen Erkrankung anzusehen ist. Diese führt, vor allem über oligomere Zwischenstufen der $A\beta$ -Aggregation, zu Störungen der synaptischen Übertragung und zur Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten. Im weiteren Verlauf werden Synapsen und Neuriten zerstört, eine gestörte Ionen-Homöostase der Neurone führt zu oxidativen Schädigungen und die dadurch veränderte Aktivität von Kinasen und Phosphatasen bedingt die Bildung intrazellulärer Tau-Bündel (siehe Abb. 1.2). Schließlich führen die neuronale und neuritische Dysfunktion, zusammen mit dadurch bewirkten Transmitterdefiziten zu den klinischen Symptomen der Demenz (vgl. Abb 1.3).

Die Untersuchung von FAD-assoziierten Mutationen führte zur Entdeckung von drei Alzheimer-assoziierten Genen. Zunächst das β -Amyloid Precursor Protein (β APP) Gen auf Chromosom 21 [66], was die Hypothese der Amyloidkaskade weiter bestätigte, dann die beiden Presenilin (PS) Gene auf den Chromosomen 14 (Presenilin1, PS1) [114] [125] [26] und 1 (Presenilin2, PS2) [85]. Sie stellen echte krankheitsauslösende Gene dar (nur weniger als 5% aller AD-Fälle, aber hier 100% penetrant), die zu einem frühen Auftreten der Erkrankung noch vor dem 60. Lebensjahr führen (sog. early-onset AD). Mutationen in diesen drei Genen führen alle zu erhöhten Spiegeln an $A\beta_{42}$ und somit zu einer rasch voranschreitenden Amyloid-Plaques Pathologie. Außerdem wurde das ApoE ϵ 4-Allel als wichtiger Suszeptibilitätsfaktor identifiziert [25] [116] [138], der mit AD-Fällen assoziiert ist, die nach dem 60. Lebensjahr auftreten (sog. late-onset AD) [131]. In Übereinstimmung mit der Amyloidkaskadenhypothese beschleunigt das ApoE ϵ 4 die Aggregation von $A\beta$ [95] und führt so vermutlich langsam progredient zu AD.

Die Bildung von $A\beta$ aus β APP findet aber nicht nur in krankhaft veränderten Zellen statt, sondern es entsteht auch während des zellulären Metabolismus gesunder Zellen [51]. Extensive Untersuchungen in Modellorganismen und Zellkultur konnten schließlich den Mechanismus der APP-Prozessierung aufklären und zum Verständnis der pathogenetischen Wirkung der FAD-assoziierten Mutationen beitragen. Die

Analyse der FAD-assoziierten Mutationen ermöglichte aber auch genauere Einblicke in Pathogenese sporadischer Fälle von AD.

1.2.2 β APP und seine Prozessierung durch Sekretasen

Das β APP ist ein Typ I Transmembranprotein, das während seines Transports vom Endoplasmatischen Retikulum zur Zelloberfläche eine Reifung durch N- und O-Glykosylierung, Sulfatierung und Phosphorylierung erfährt [62] [156] [129]. Es wird durch drei Proteasen prozessiert, die wegen ihrer Funktion in sekretorischen Zellkompartimenten auch als Sekretasen bezeichnet werden [52]. Die β - und γ -Sekretase erzeugen das krankheitsauslösende $A\beta$, wohingegen die α -Sekretase die Bildung von $A\beta$ verhindert [130] (vgl. Abb. 1.4).

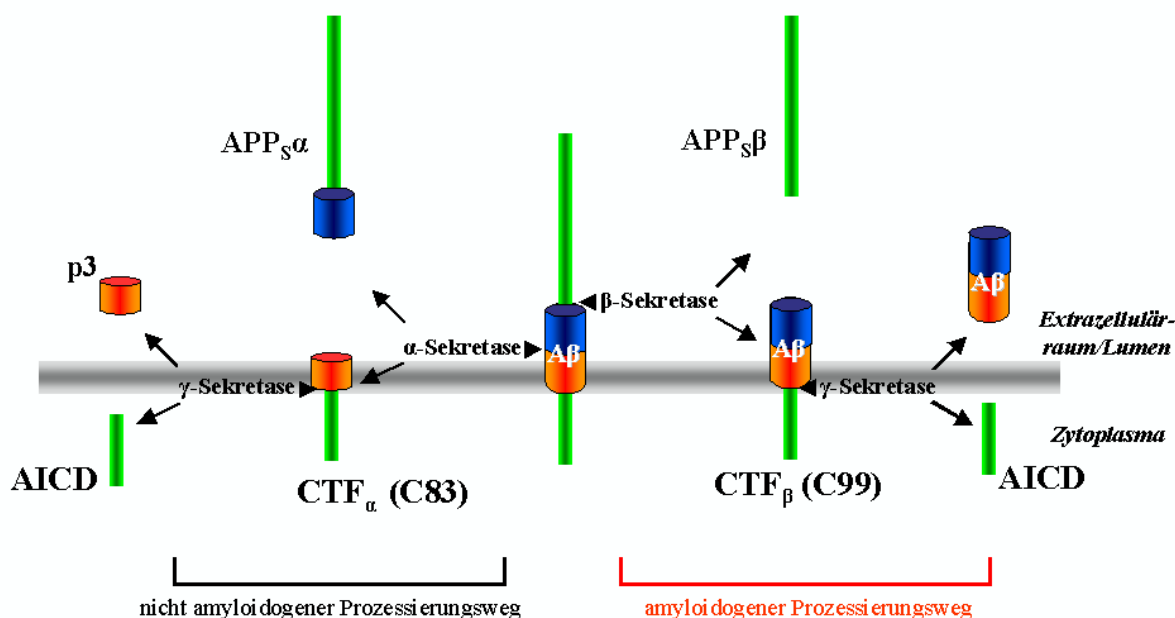


Abbildung 1.4: **APP-Prozessierung durch Sekretasen.** Man unterscheidet den amyloidogenen Prozessierungsweg und den nicht amyloidogenen Prozessierungsweg. Der Schnitt der α -Sekretase erfolgt in der Mitte der $A\beta$ -Domäne und verhindert so die Entstehung von $A\beta$ (linker Teil). Es wird ein lösliches APP-Buchstück extrazellulär freigesetzt ($APP_s\alpha$) und ein C-terminales Fragment (CTF_α , C83) bleibt in der Membran zurück. Dieses kann von der γ -Sekretase weiterprozessiert werden, wodurch ein lösliches Peptid (p3) extrazellulär und ein korrespondierendes AICD (APP intracellular domain) intrazellulär freigesetzt wird. Nach dem Schnitt der β -Sekretase wird im amyloidogenen Weg $APP_s\beta$ extrazellulär freigesetzt und CTF_β bleibt in der Membran zurück. Aus diesem kann durch die γ -Sekretase $A\beta$ extrazellulär und AICD intrazellulär freigesetzt werden (rechter Teil). Schema modifiziert nach [52]).

Abbildung 1.5 gibt einen Überblick über die Lage einiger FAD-assoziiierter Mutationen im APP-Protein. Die Mutation an der Schnittstelle der β -Sekretase ([98], vgl. unten) erhöht den, im amyloidogenen Weg prozessierten Anteil von APP und führt so zu vermehrter Sekretion von $A\beta$. Die Mutationen in der Nähe der α -Sekretaseschnittstelle ([59] [49] [149] [105]) führen zur Entstehung von mutierten $A\beta$ -Peptiden mit veränderten Aggregationseigenschaften. Diese aggregieren vor allem in Gefäßen und führen so zum Krankheitsbild der cerebralen Amyloid Angiopathie (CAA), mit oder ohne zusätzlichen dementiellen Symptomen. FAD-assoziierte Mutationen im APP Protein, die an der Schnittstelle der γ -Sekretase liegen ([75] [4] [36] [100] [101] [21] [47]) verschieben alle das Verhältnis von $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ hin zur längeren stärker aggregierenden Isoform.

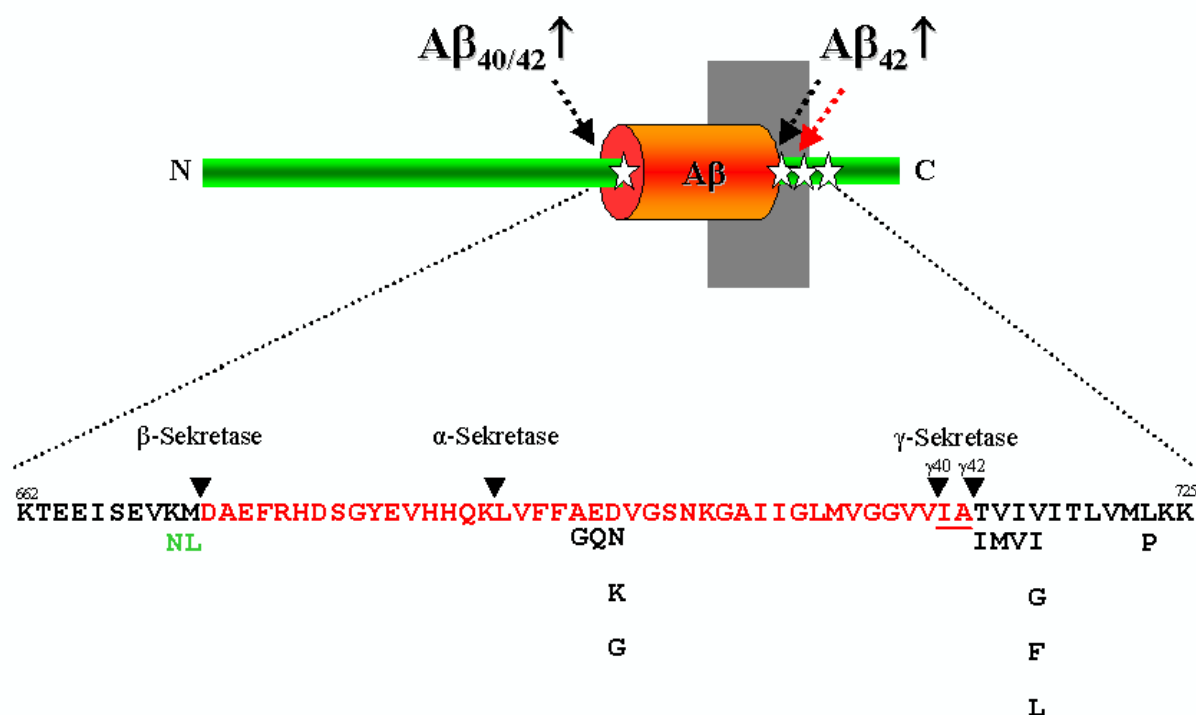


Abbildung 1.5: **Sekretase-Schnittstellen im APP und FAD-assoziierte Mutationen.** Schematische Darstellung der Lage von FAD-assoziierten Mutationen im APP Protein, sowie deren Effekt auf entstehende $A\beta$ -Spezies (oben). Die Lage der Sekretase-Schnittstellen (Pfeile) bezogen auf die Aminosäuresequenz des APP (unten, vgl. hierzu auch Einbuchstabenkode für As im Anhang, S.104). Die Sequenz von $A\beta$ ist rot gekennzeichnet. Einige FAD-assoziierte Mutationen sind angegeben, die unten erwähnte "Swedish"-Doppelmutation (SwAPP) ist grün hervorgehoben. (vgl. zu FAD-Mutationen in APP auch: "www.alzforum.org/res/com/mut/app/table1.asp").

Diese enge Verbindung der FAD-assoziierten Mutationen mit der Prozessierung von APP durch Sekretasen führte in der Folge zu extensiver Forschungsarbeit, um die molekularen Vorgänge bei der Prozessierung von APP genauer zu verstehen und damit ein besseres Verständnis für die Pathogenese von AD zu gewinnen.

α -Sekretase:

Die Prozessierung von APP an der α -Schnittstelle erfolgt durch eine membrangebundene Zink-Metalloproteinase [112]. Mehrere Proteasen der ADAM-Familie [118] (“a disintegrin and metalloproteinase“), integrale Typ-1 Membranproteine, sind als Proteasen mit α -Sekretase Funktion identifiziert worden. Unter anderen wurde für ADAM 9 [74], ADAM 10 [76] und ADAM 17 [14] [93], nachgewiesen, daß sie als α -Sekretase in der Mitte der A β -Domäne schneiden und die A β -Entstehung verhindern können (vgl. Abb 1.5). Auch BACE2 (β APP cleaving enzyme 2, Memapsin 1) hat α -Sekretase-ähnliche Aktivität und kann so die Amyloidentstehung verhindern [163]. Nach dem α -Sekretase-Schnitt wird ein lösliches APP-Bruchstück freigesetzt (APP_s α) und ein C-terminales β APP-Fragment bleibt in der Membran zurück (C83, CTF α) das von der γ -Sekretase weiter prozessiert werden kann [112] [2]. Hierbei entsteht ein lösliches Peptid, p3 genannt, das in den extrazellulären Raum abgegeben wird, sowie ein APP-Fragment, das in das Zytosol abgegeben wird (vgl. Abb. 1.4 und [52]). Für dieses intrazelluläre Fragment von β APP (CTF γ , bzw. APP intracellular domain, AICD) wurde eine nukleäre Signalfunktion vorgeschlagen [15].

β -Sekretase:

Die Prozessierung an der β -Schnittstelle (vgl. Abb. 1.5) wird durch BACE1 (β APP cleaving enzyme 1, Memapsin 2) vermittelt, einer membrangebundenen Aspartyl-Protease [151] [150]. Nach dem enzymatischen Schnitt wird ein lösliches Bruchstück freigesetzt (APP_s β) und ein längeres β APP C-terminales Fragment (C99, CTF β) bleibt in der Membran zurück [130]. Durch nachfolgenden γ -Sekretase-Schnitt kann A β extrazellulär und AICD intrazellulär freigesetzt werden (vgl. Abb. 1.4 und [52]).

In kultivierten humanen Zellen wird β APP hauptsächlich durch die α -Sekretase geschnitten [39] und nur ein geringer Anteil wird durch die β -Sekretase und damit zu A β -Peptid prozessiert [167]. Allerdings ist die Aktivität von BACE1 in neuronalen

Zelllinien deutlich höher, so daß hier mehr A β entsteht [122]. Eine Doppelmutation im APP Gen, die mit dem familiären Auftreten der Alzheimerschen Erkrankung in einer schwedischen Familie assoziiert ist (APP-“Swedish“ oder SwAPP: Lysin595 \rightarrow Asparagin und Methionin596 \rightarrow Leucin, vgl. Abb. 1.5) [98] und die genau an der BACE-Schnittstelle liegt (vgl. Abb. 1.5), erhöht die Affinität von BACE zu APP und damit auch den, durch BACE prozessierten APP-Anteil auf das 6- bis 8-fache [22].

γ -Sekretase:

Die γ -Sekretase, welche biochemisch, wegen ihrer Empfindlichkeit gegen Aspartylproteaseinhibitoren, als Aspartylprotease charakterisiert wurde [159], vermittelt den letzten Schnitt, direkt in der Membran. Dabei entsteht bei der Prozessierung von β APP nicht nur das A β -Peptid, sondern auch ein korrespondierendes CTF $_{\gamma}$ (auch AICD, APP intracellular domain genannt) Fragment [52]. Entscheidend für die γ -Sekretaseaktivität, sind PS1 und PS2. Ein erster Hinweis hierfür ist die genetische Verbindung der PS Gene mit FAD-Fällen. Bis heute wurden über 100 autosomal dominante Punktmutationen in den PS Genen beschrieben. Alle bisher untersuchten PS FAD-Mutationen verschieben den C-terminalen γ -Sekretaseschnitt um zwei As [52] (vgl. Abb. 1.6) und führen damit zu einer Erhöhung des längeren, stärker aggregierenden A β 42.

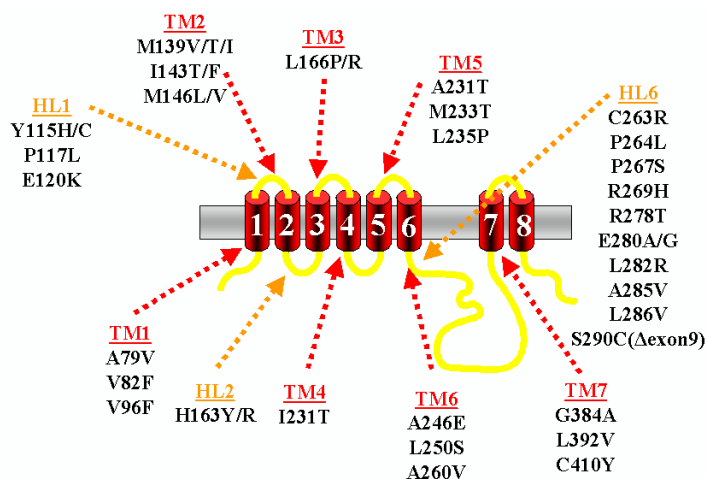


Abbildung 1.6: **Lage einiger FAD-assoziiierter Mutationen im PS1 Protein.** Einige der FAD-assoziierten Mutationen in PS1 sind dargestellt. Sie sind über das gesamte Protein verteilt, ohne, wie bei APP (vgl. Abb. 1.5) an bestimmten Stellen gehäuft aufzutreten.

Die starke Verbindung von PS mit der γ -Sekretaseaktivität und deren mögliche Identität wird durch die Ausschaltung des PS1 Gens (PS1-“Knockout“) in der Maus unterstrichen [33], welche die A β -Produktion stark reduzierte. Der zusätzliche Knockout von PS2 [60][166] erlaubte keinerlei A β -Produktion mehr.

Direkte Hinweise dafür, daß die PS das aktive Zentrum der γ -Sekretase darstellen lieferten Experimente, die zwei hochkonservierte Aspartate in den Transmembrandomänen (TMD) 6 und 7 als essentiell für die Aktivität der γ -Sekretase herausstellten [160] [133]. Die Mutation von einem der beiden Aspartate reichte aus, um die A β -Produktion vollständig zu blockieren. In der Folge konnte gezeigt werden, daß spezielle Varianten von γ -Sekretase-Inhibitoren, die Analoga des Übergangszustandes der Aspartylprotease darstellen, direkt mit PS1 quervernetzt werden konnten [40] [87].

PS enthält aber nicht wie konventionelle Aspartylproteasen oder BACE1 ein D(T/S)G(T/S) Motiv im aktiven Zentrum, sondern hat ein GxGD Motiv um das kritische Aspartat in TMD 7 [134], welches zwischen PS, Typ-4 Prepilin-Peptidase [134] und der Signalpeptidpeptidase [157] konserviert ist (Abb. 1.7).

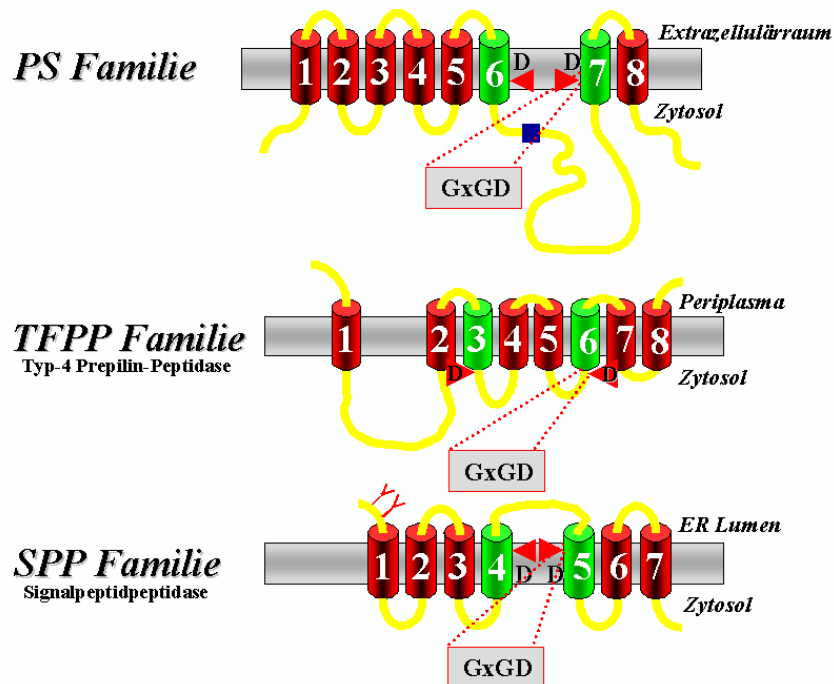


Abbildung 1.7: **Schematische Darstellung der Mitglieder der GxGD Proteasefamilie.** Die Abbildung zeigt schematische Darstellungen der PS, Typ-4 Prepilin-Peptidase (TFPP) und der Signalpeptidpeptidase (SPP) Proteasefamilie. Die Aspartate des aktiven Zentrums sind durch ein “D“ gekennzeichnet, die roten Dreiecke symbolisieren den Schnitt der Protease. Modifiziert nach [134] und [157].

Ein weiteres wichtiges Substrat der γ -Sekretase, neben β APP ist Notch. In Bezug auf den Notch-Rezeptor ist die physiologische Funktion der Intramembranproteolyse gut verstanden. Hier wird sie benötigt, um nach Ligandenbindung und Abspaltung der Ektodomäne die intrazelluläre Domäne (Notch intracellular domain, NICD) freizusetzen und damit ein nukleäres Signal einzuleiten [120]. Dieser Signaltransduktionsweg hat entscheidende Bedeutung während der Embryonalentwicklung mehrzelliger Organismen, um die Differenzierung verschiedenener Zelllinien durch lokale Zell-Zell-Interaktionen zu regulieren [5]. Der Phänotyp des Notch-Knockout [142] [24] ist vor allem durch einen letalen, posterior betonten embryonalen Wachstumsstopp mit nachfolgender Zelldegeneration und einer gestörten Abgrenzung der Somiten [142] [24] gekennzeichnet. Eine weitere wichtige Funktion des Notch-Signaltransduktionsweges ist die Regulation der Neurogenese, die im Notch-Knockout beschleunigt abläuft [30] und durch Expression einer dominant aktiven Notch Variante *in vitro* gehemmt wird [106]. Aber auch im adulten Organismus ist Notch für die Bestimmung des Schicksals von Zellen wichtig [5], zum Beispiel bei der Selbsterneuerung und Differenzierung von hämatopoietischen Vorläuferzellen [94] [53] [10] oder bei Entwicklung von T Zellen im Thymus [110] [109].

Die enge Verbindung zwischen der γ -Sekretase und dem Notch-Signaltransduktionsweg wurde angedeutet, als sich ein *Caenorhabditis elegans* PS Homolog (sel-12) als ein Notch-Interaktor herausstellte [84]. Mit Experimenten in *Drosophila melanogaster* und Maus-Embryonen konnte in der Folge gezeigt werden, daß die PS-abhängige γ -Sekretaseaktivität essentiell für die Freisetzung von NICD und die Aktivität von Notch ist [140] [141] [32]. Schließlich zeigte der PS Doppelknockout [60][166] einen sehr ähnlichen Phänotyp zum Notch-Knockout (vgl. oben,[142] [24]).

Neben Notch und β APP wurden viele weitere Substrate der PS/ γ -Sekretase identifiziert, u.a. APLP-1 und -2 [152], ErbB-4 [82] [103], E-Cadherin [89], N-Cadherin [90], LRP [92], Nectin-1 α [67], die Notch Liganden Delta und Jagged [81] sowie CD44 [77] [99]. Die wichtige Rolle bei der Signaltransduktion scheint eine physiologische Hauptfunktion der γ -Sekretase zu sein. Eine noch allgemeinere Rolle ist die proteolytische Spaltung von Transmembranfragmenten, die nach Abspaltung der Ektodomäne eines größeren Vorläuferproteins in der Membran zurückbleiben.

Die vielen unterschiedlichen Substrate und daraus resultierende potentiell schwerwiegende Nebenwirkungen der Hemmung der γ -Sekretase *in vivo*, sind auch der Grund warum γ -Sekretase-Inhibitoren bislang noch nicht therapeutisch eingesetzt werden, da sie nicht selektiv nur die A β -Produktion blockieren können. So wurde

zum Beispiel *in vitro* die Notch-abhängige Differenzierung von T Zellen in Thymozytenkulturen durch Behandlung mit γ -Sekretaseinhibitoren gehemmt [54]. *In vivo* zeigten Zebrafischembryonen (*Danio rerio*), die mit einem γ -Sekretase-Inhibitor behandelt wurden, einen schweren Notch-Phänotyp mit gestörter Somitenabgrenzung und einer beschleunigten primären Neurogenese [45] (vgl. oben). Aber auch bei der Behandlung adulter Mäuse mit einem γ -Sekretase-Inhibitor konnte eine gestörte Differenzierung von T Zellen im Thymus und eine veränderte Gewebsarchitektur im Darmtrakt beobachtet werden [161].

Einen Ausweg könnten Substanzen darstellen, welche die Aktivität der γ -Sekretase modulieren (im Sinne einer reduzierten Produktion des krankheitsauslösenden $A\beta$), ohne die anderen Substratschnitte negativ zu beeinflussen. Ein aussichtsreicher Kandidat sind nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente ("NSAIDs"), die in Zellkultur die Menge an sezerniertem $A\beta_{42}$ senken konnten, ohne die γ -Sekretase abhängige Freisetzung von NICD negativ zu beeinflussen [155].

1.2.3 Der Presenilin/ γ -Sekretasekomplex

Presenilin:

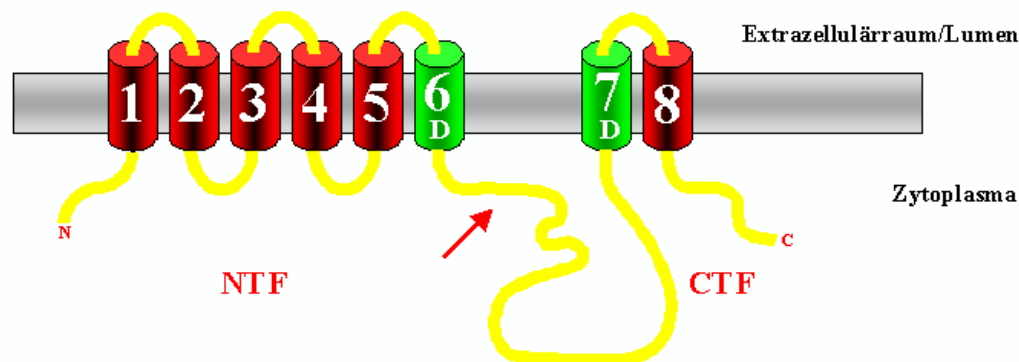


Abbildung 1.8: **Schematische Darstellung von Presenilin.** Die TMD sind durch rote Röhren dargestellt, die beiden grünen Röhren kennzeichnen die funktionell wichtigen TMD 6 und 7, mit den Transmembran-Aspartaten ("D"). Der rote Pfeil kennzeichnet die Schnittstelle für die Endoproteolyse, mit daraus resultierenden Fragmenten.

PS sind mehrfach die Membran spannende Proteine mit wahrscheinlich acht Transmembrandomänen (TMD) [35][86][102], wobei allerdings neuere Studien eine Topologie mit neun TMD vorschlagen [65][79]. Die für die Aktivität der γ -Sekretase entscheidenden Transmembran-Aspartate befinden sich in TMD 6 und 7 (vgl. Abb. 1.8). Die beiden PS Proteine, PS1 und PS2, werden in vielen Geweben exprimiert [114] [125], wobei allerdings PS2 im Gehirn niedriger exprimiert wird [114]. Die pathogenetische Bedeutung von PS wurde intensiv an PS1 untersucht (vgl. obiges Schema der FAD-Mutationen in PS1, Abb. 1.6), weshalb auch in der vorliegenden Arbeit PS1 stellvertretend für beide Formen untersucht wurde.

PS wird in der Zelle endoproteolytisch in der großen zytosolischen Schleife zwischen TMD 6 und TMD 7 prozessiert, woraus ein N-terminales (NTF) und C-terminales (CTF)-Fragment resultieren [147], die aneinander gebunden [17] in einem hochmolekularen Proteinkomplex in der Zelle vorliegen [31]. Die endoproteolytische Spaltung von PS wird durch γ -Sekretase-Inhibitoren [6] oder Mutation der TMD-Aspartate [160][133] verhindert, wodurch das Vollängenprotein (PS Holoprotein, PS_{holo}) in der Zelle akkumuliert und weniger PS Fragmente entstehen. Neuere Ergebnisse legen hierfür einen autoproteolytischen, intramolekularen Mechanismus nahe [13]. Dies unterstützt die Vorstellung, daß sich die PS Proteine als Zymogen durch Autoproteolyse selbst aktivieren. Allerdings sind auch PS Mutanten bekannt,

endoproteolytische Spaltung als Vollängen-Protein aktiv sind, wie zum Beispiel die FAD-assoziierte Mutante PS1 Δ Exon9 [135] oder die Mutation von Methionin an Pos. 292 von PS1 zu Aspartat (M292D) [136], die an der Endoproteolyse-Spaltstelle von PS1 liegt.

Die Menge an PS Fragmenten wird in Säugetierzellen stark reguliert. Bei der Überexpression von PS werden endogene PS Fragmente, durch das exogene PS verdrängt (sogenanntes "Replacement-Phänomen") [147], so daß die PS Fragmentenspiegel stabil bleiben. Dies legte nahe, daß die Menge an PS Fragmenten, durch Kompetition um limitierende zelluläre Faktoren reguliert wird [148]. Die PS Fragmente können in einem heterodimeren Komplex isoliert werden [17]. Komplexierte PS Fragmente werden stabilisiert und überschüssiges PS_{holo}, sowie PS Fragmente, die nicht in einen heterodimeren Komplex inkorporiert sind, werden rasch vom Proteasom abgebaut [132]. In weiterführenden Experimenten konnte gezeigt werden, daß PS und die γ -Sekretaseaktivität, zusammen als hochmolekularer Komplex vorliegen [87]. Diese Ergebnisse, sowie die Tatsache, daß weder die alleinige Überexpression von PS in Säugetierzellen zu einer gesteigerten γ -Sekretaseaktivität führte [23], noch die gleichzeitige Expression von PS und APP in Insektenzellen, in welchen keine endogene γ -Sekretaseaktivität nachweisbar ist, zur Rekonstitution der Produktion von A β ausreichte [144], machten die Existenz von weiteren essentiellen Komponenten sehr wahrscheinlich.

Auf der Suche nach Kofaktoren für die PS-/ γ -Sekretaseaktivität wurde zunächst durch biochemische Aufreinigung Nicastrin (NCT) identifiziert [164]. In dem Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* wurde das Genom nach verstärkenden genetischen Faktoren eines unvollständigen Defekts des PS abhängigen Notch-Signaltransduktionsweges durchgemustert (genetischer "Screen"). Auf diese Weise wurden APH-1 (anterior-pharynx-defective phenotype 1) [48][44] und PEN-2 (Presenilin enhancer 2)[44][31] als weitere Kofaktoren identifiziert. Zusammen mit PS waren diese drei Proteine ausreichend, um in *Saccharomyces cerevisiae*, einem eukaryontischen Organismus, der keine endogene γ -Sekretaseaktivität aufweist, eine voll aktive γ -Sekretase zu rekonstituieren [38]. PS, NCT, APH-1 und PEN-2 sind also die minimale Grundzusammensetzung eines aktiven γ -Sekretasekomplexes.

Erst die gemeinsame Überexpression der vier notwendigen Komplexkomponenten steigerte die Mengen an PS Fragmenten und die Proteaseaktivität [73] [143] [68] in kultivierten Zellen. Diese Ergebnisse zeigten erneut, das PS alleine nicht ausreichend ist für die Aktivität der γ -Sekretase, sondern diese nur im geregelten Zusammenspiel

der vier essentiellen Komponenten funktioniert.

Obwohl die Zusammensetzung des γ -Sekretasekomplexes weitgehend aufgeklärt ist und das PS als aktives Zentrum identifiziert ist, ist noch sehr wenig über die Funktion der anderen Komplexkomponenten und die Struktur des aktiven Komplexes bekannt.

Nicastrin:

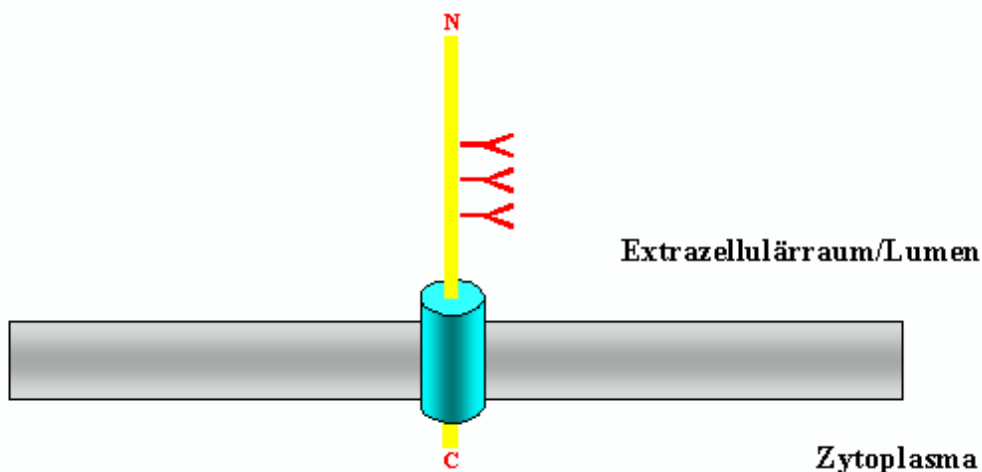


Abbildung 1.9: **Schematische Darstellung von Nicastrin** . Es handelt sich um ein Typ I Transmembranprotein mit einer großen N-terminalen Ektodomäne, die in den extrazellulären Raum ragt, einer TMD und einer kurzen zytoplasmischen C-terminalen Untereinheit. Die komplexe Glykosylierung der Ektodomäne ist rot gekennzeichnet.

Nicastrin (NCT, Abb. 1.9) ist ein Typ I Transmembranprotein mit einer sehr großen luminalen Ektodomäne. Diese ist, wie in Experimenten mit unterschiedlichen Deletionskonstrukten gezeigt werden konnte, als Ganzes entscheidend für die Aktivität der γ -Sekretase [126]. Vor allem die Anteile der Ektodomäne, die unmittelbar an die TMD anschließen sind entscheidend für die Interaktion von NCT mit den anderen Komplexkomponenten [96] [18]. Während der Reifung des γ -Sekretasekomplexes in sekretorischen Zellkompartimenten, wird die Ektodomäne von NCT durch komplexe Glykosylierung posttranslational modifiziert [37] [72] und erfährt dabei auch eine Umfaltung [126]. Diese komplex glykosylierte, reife (mature) Form von NCT ist mit der γ -Sekretaseaktivität verknüpft [72] und ist somit als ein Indikator für die vollständige Reifung des γ -Sekretasekomplexes anzusehen. Es wird spekuliert, daß diese globuläre, stark gefaltete Ektodomäne für die Längenmessung des Substrates verantwortlich ist, da Substrate nur erkannt und prozessiert werden, wenn zuvor deren Ektodomäne abgespalten worden ist [139]. Neue Daten weisen darauf

hin, daß NCT mit seiner Ektodomäne C-terminale Fragmente, die durch Abspaltung der Ektodomäne von Typ I Transmembranproteinen entstanden sind, erkennt und dem γ -Sekretasekomplex zur weiteren Prozessierung präsentieren kann [123]. NCT kann nach diesen Befunden als möglicher Substratazeptor der γ -Sekretase aufgefaßt werden [123].

APH-1:

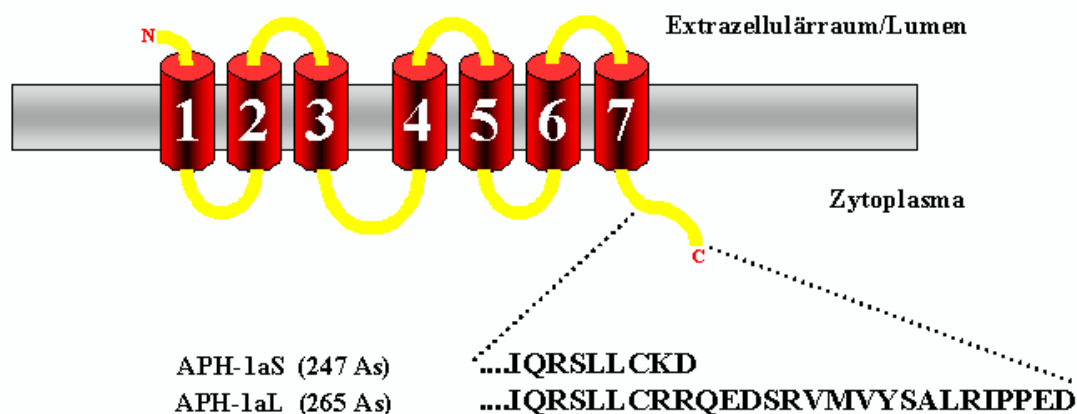


Abbildung 1.10: **Schematische Darstellung von APH-1.** Es handelt sich um ein Membranprotein mit sieben TMD die durch kurze extramembranäre Schleifen verbunden sind (oben). Von APH-1a sind zwei Splicevarianten entdeckt worden [128] [58], die sich im zytosolischen C-Terminus unterscheiden (unten).

APH-1 (Abb. 1.9) ist ein hydrophobes Protein mit sieben TMD und kaum extramembranären Strukturen [42]. Es bindet an NCT ziemlich früh während der Assemblierung des γ -Sekretasekomplexes und bildet mit diesem eine Art Prä-Komplex [96][80]. Bindung von PS_{holo} an diesen Komplex führt dann zur Bildung eines trimeren Komplexes [143], der das PS_{holo} stabilisieren kann. Es wurden zwei APH-1 Homologe, APH1a und APH-1b identifiziert [44] [48], von APH-1a wurden außerdem in Säugetierzellen zwei verschiedene Splicevarianten entdeckt [128][58], APH-1aL (APH-1a Long form), APH-1aS (APH-1a Short form) (siehe Abb. 1.10, unten). Diese verschiedenen APH-1 Varianten bilden separate γ -Sekretasekomplexe, so daß wenigstens sechs verschiedene Komplexe (je drei mit PS1 bzw. PS2) denkbar sind [128][58] (Abb 1.11).

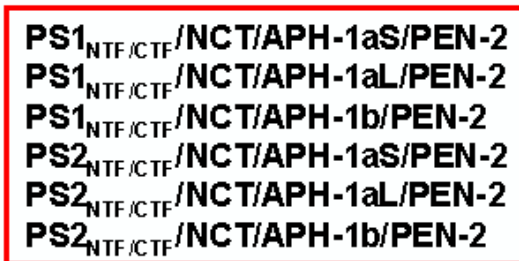


Abbildung 1.11: Übersicht über mögliche γ -Sekretasekomplexe mit den verschiedenen APH-1 Varianten.

PEN-2:

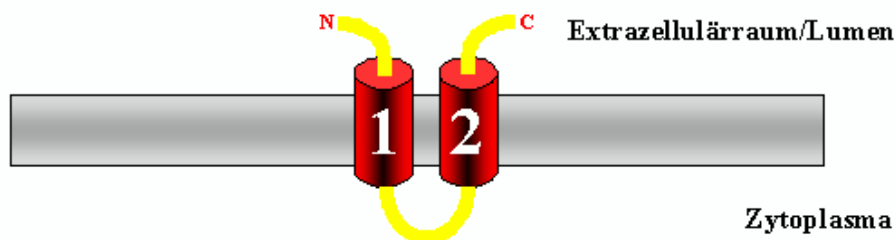


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung von PEN-2. Es handelt sich um ein integrales Membranprotein mit zwei TMD, die durch eine kurze zytoplasmatische Schleife verbunden sind. Das N- und C-terminale Ende zeigen in den Extrazellulärraum.

PEN-2 (Abb. 1.12) ist ein 101 Aa großes integrales Membranprotein [44]. Die Membrantopologie von PEN-2 wurde in zwei ähnlichen Studien [28][7], durch Einführung von Glykosylierungsmotiven in verschiedene Domänen, sowie durch Protease-Resistenz Versuche aufgeklärt. Es nimmt mit zwei TMD eine Haarnadel-Orientierung in der Membran ein, wobei das C- und N-terminale Ende zur luminalen Seite zeigen und die beiden TMD durch ein kurze zytoplasmatische Schleife verbunden sind [28][7]. PEN-2 ist, wie durch Co-Immünpräzipitation gezeigt werden konnte, eine integrale Komponente des γ -Sekretasekomplexes [137], in dessen Abwesenheit PS_{holo}, APH-1 und NCT einen stabilen trimere Komplex bilden können [143]. Das Hinzutreten von PEN-2 initiiert die Endoproteolyse von PS [143][61][88] und die Reifung zum aktiven γ -Sekretasekomplex. In Abwesenheit von PS wird PEN-2 rasch durch das Ubiquitin/Proteasom-System abgebaut [28][7].

Modell des γ -Sekretasekomplexes:

Abb. 1.13 zeigt ein schematisches Modell des γ -Sekretasekomplexes und der Prozessierung von APP (nach[52]). Nach Abspaltung der Ektodomäne durch den Schnitt der β -Sekretase, bleibt ein 99 As langer Rest (C99, CTF $_{\beta}$) in der Membran zurück, der nach Interaktion mit dem γ -Sekretasekomplex (bestehend aus mindestens PS, NCT, APH-1 und PEN-2) an bislang unbekannter Stelle in das aktive Zentrum (zwischen TMD 6 und 7 von PS) transloziert wird. Hier findet dann der intramembranöse Schnitt der γ -Sekretase statt, wodurch das A β -Peptid extrazellulär und das korrespondierende AICD (CTF $_{\gamma}$) intrazellulär freigesetzt werden.

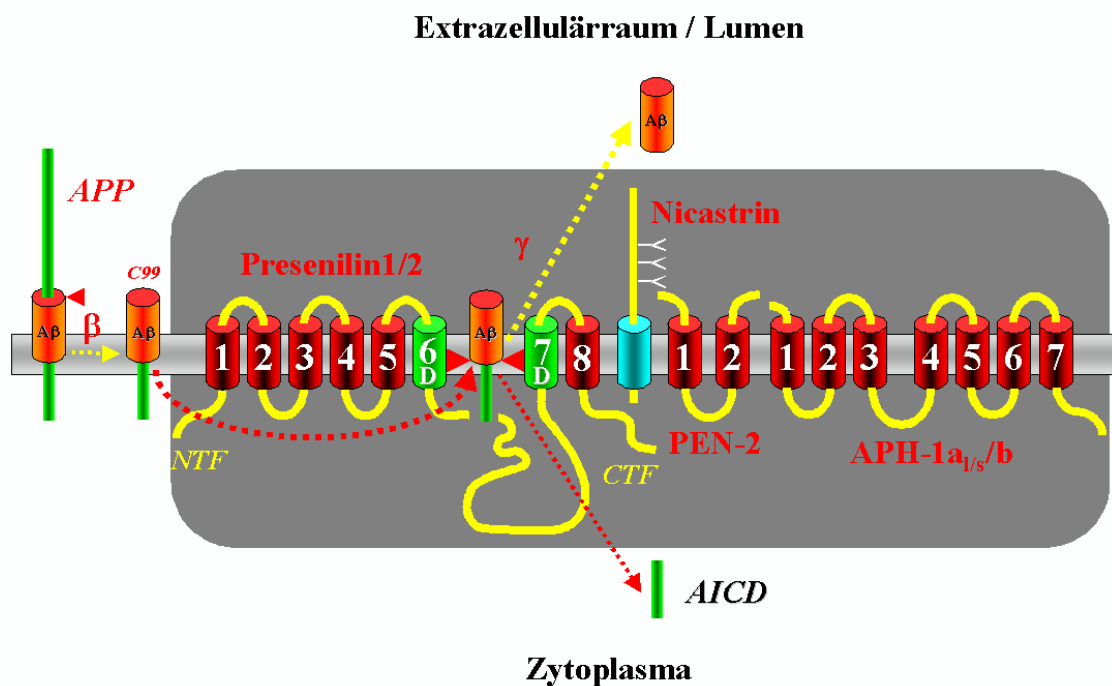


Abbildung 1.13: **Schematische Zeichnung des γ -Sekretasekomplexes und der proteolytischen Spaltung von APP (modifiziert nach [52]).** Das, nach der Prozessierung von APP durch BACE in der Membran verbleibende 99 As lange CTF $_{\beta}$ (C99) wird nach initialer Interaktion mit einer bislang unbekannter Substrataktzeptorstelle in das aktive Zentrum der γ -Sekretase verlagert. Durch den intramembranösen Schnitt der γ -Sekretase entstehen A β , welches extrazellulär und das korrespondierende AICD, welches intrazellulär freigesetzt wird. Das aktive Zentrum der γ -Sekretase zwischen TMD 6 und 7 von PS ist durch zwei grüne Röhren gekennzeichnet ("D" bezeichnet die Transmembran-Aspartate). Die roten Dreiecke bezeichnen den γ -Sekretaseschnitt.

Modelle über die Reihenfolge des Zusammenbaus und der Reifung des Kom-

plexes, sowie der Funktion einzelner Komponenten hierbei, sind noch weitgehend spekulativ, da sie als dynamische Vorgänge nur sehr schwer *in vivo* zu untersuchen sind. Abb 1.14 zeigt das gegenwärtige Arbeitsmodell:

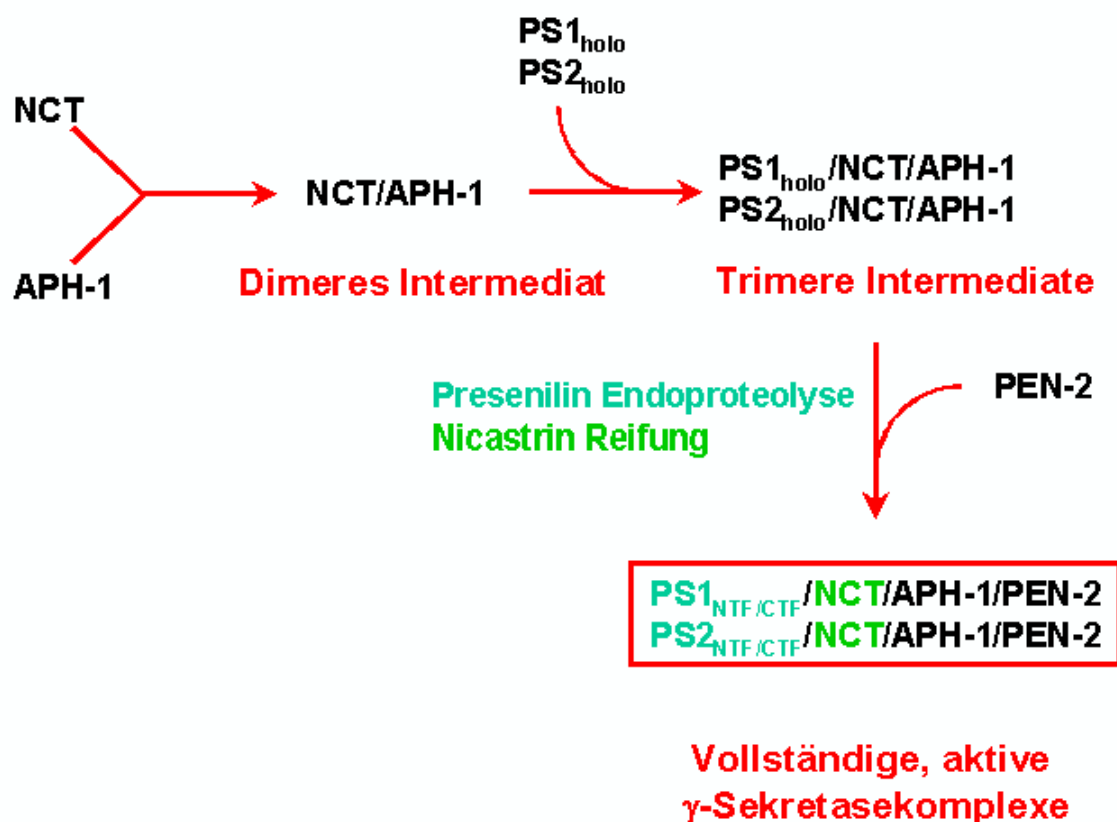


Abbildung 1.14: **Modell der Vorgänge bei der Assemblierung der γ -Sekretasekomplexe.** Nach initialer Interaktion von NCT und APH-1 entstehen durch Bindung von PS_{holo} stabile trimere Intermediate. Erst nach der Integration von PEN-2 wird die Endoproteolyse von PS und die weitere Reifung des Komplexes eingeleitet. Modifiziert nach [128].

Zu Beginn bilden NCT und APH-1 ein stabiles dimeres Intermediat. An diese kann entweder PS1 oder PS2 binden, wodurch stabile trimere Intermediate entstehen. Kommt nun PEN-2 zu diesen trimeren Vorstufen hinzu, wird die Endoproteolyse von PS und die Reifung von NCT eingeleitet, wodurch aktive γ -Sekretasekomplexe entstehen (vgl.[128]).

Eine endgültige Aufklärung über das genaue funktionelle Zusammenspiel der einzelnen Komplexkomponenten im γ -Sekretasekomplex wird möglicherweise nur über die Analyse der Gesamtstruktur des Komplexes (evtl. mit Substrat) zu erreichen sein.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In einem genetischen Screen in *Caenorhabditis elegans* wurden mit APH-1 und PEN-2 zwei potentielle neue Komponenten des γ -Sekretasekomplexes identifiziert [44]. In ersten Experimenten konnte mittels Co-Immunpräzipitation gezeigt werden, daß PEN-2 eine integrale Komponente des γ -Sekretasekomplexes ist [137]. Die transiente Herunterregulierung der Expression von PEN-2, durch kleine doppelsträngige RNS-Moleküle zur RNA-Interferenz (“RNAi-Knockdown“, [165] [41]), deutete auf eine Bedeutung von PEN-2 für die koordinierte Expression von PS und NCT hin [137].

Um nun genauere Hinweise auf die Funktion von PEN-2 bei der Reifung des γ -Sekretasekomplexes, die Rolle von PEN-2 im Komplex selbst und für die γ -Sekretaseaktivität zu erhalten, sollte eine stabile PEN-2 RNAi-Knockdown-Zelllinie (PEN-2KD) hergestellt und biochemisch analysiert werden. Da der Knockdown der Genexpression durch RNAi sehr stark sequenzspezifisch ist [78], war es zu erwarten, daß der Phänotyp des PEN-2KD durch Überexpression eines, in der RNAi-Zielsequenz modifizierten PEN-2 Konstrukts revertierbar ist. Diese Methodik sollte dann für eine Struktur-/Funktionsanalyse von PEN-2 verwendet werden. Dabei sollten RNAi-resistente PEN-2 Konstrukte auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, den Defekt des PEN-2KD funktionell aufzuheben, um dadurch wichtige Domänen des PEN-2 Proteins für eine geregelte Funktion im aktiven γ -Sekretasekomplex zu identifizieren. Insbesondere sollte das C-terminale Ende des PEN-2 Proteins durch Deletionen, Punktmutationen und Verlängerung durch Eptitop-“tags“ auf seine funktionelle Bedeutung hin untersucht werden, da sich schon bei der initialen Charakterisierung in *Caenorhabditis elegans* ein am C-Terminus durch GFP (“green fluorescent protein“) verlängertes PEN-2 Protein als nicht funktionell erwiesen hatte [44].

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.1.1 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain reaction, PCR)

Verwendete PCR-Oligonukleotide:

Alle in dieser Arbeit verwendeten PCR Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Bezeichnung	Sequenz
PEN-2-F	5'-cgc gaattc agc gca gct atg aac ctg gag cga gtg-3'
PEN-2-R	5'-cgc ctc gag tca ggg ggt gcc cag ggg-3'
PEN-2-Start-F	5'-cgc gaattc atg aac ctg gag cga gtg-3'
PEN-2-Δ-Stop-R	5'-cgc ctc gag ggg ggt gcc cag ggg-3'
PEN-2-151*-F	5'-agc caa atc aag gga tac gtg tgg cga tct gct gtg ggc-3'
PEN-2-190*-R	5'-gcc cac agc aga tcg cca cac gta tcc ctt gat ttg gct c-3'
PEN-2-450-R	5'-cgc ctc gag tca gcg ggg ccg gta gat c-3'
PEN-2-Δ3-R	5'-cgc ctc gag tca cag ggg tat ggt gaa gga g-3'
PEN-2-Δ5-R	5'-cgc ctc gag tca tat ggt gaa gga gag gta g-3'
PEN-2-Δ8-R	5'-cgc ctc gag tca gga gag gta gtc ccc aag ggc-3'
PEN-2-idel5vec-R	5'-gga gag gta gtc gcg ggg ccg gta gat ctg g-3'
PEN-2-idel5-F	5'-ggc ccc gcg act acc tct cct tca cca tac ccc tg-3'
PEN-2-idel5-R	5'-ccc tct ctc gag tca ggg ggt gcc cag ggg gta gtc ccc aag ggc acc cca gcg-3'
PEN-2-D90A-R	5'-cgc ctc gag tca ggg ggt gcc cag ggg tat ggt gaa gga gag gta ggc ccc-3'
PEN-2-F94Along-R	5'-cgc ctc gag tca ggg ggt gcc cag ggg tat ggt ctc gcg gag agg tag-3'
PEN-2-P97A-R	5'-cgc ctc gag tca ggg ggt gcc cag ggc tat g-3'
PEN-2-G99A-R	5'-cgc ctc gag tca ggg ggt gcc cag ggg tat g-3'
PEN-2-99/97/94A-R	5'-cgc ctc gag tca ggg ggt gcc cag ggc tat ggt cgc gga gag gta g-3'

Tabelle 2.1: Übersicht über verwendete PCR-Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden in Aqua bidest (ddH₂O, gewonnen in der Filteranlage MilliQ plus von Millipore) mit einer Konzentration von 250 ng DNA/ μ l gelöst und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

PCR-Ansatz:

Substanz	Menge
Matrize (100 ng DNA/ μ l)	1 μ l
Oligonukleotide (je 1 μ l mit 250 ng DNA/ μ l)	2 μ l
dNTP (Roche)	1 μ l
<i>Pwo</i> -Polymerase (PEQLAB)	1 μ l
10-fach <i>Pwo</i> -Reaktionspuffer (PEQLAB)	5 μ l
ddH ₂ O	40 μ l
Σ =	50 μ l

PCR-Profil:

Die angegebenen PCR-Reaktionen wurden in einer Perkin-Elmer PCR-Maschine in Sarstedt PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt.

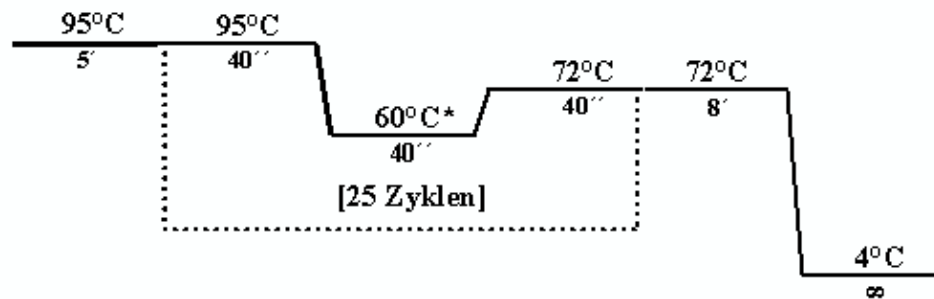


Abbildung 2.1: **Typisches PCR-Profil.** Der Stern kennzeichnet die Hybridisierungstemperatur.

Die Hybridisierungstemperatur (T_a) wurde an die vom Hersteller angegebene Schmelztemperatur (T_m) der PCR-Oligonukleotide angepasst ($T_a = T_m - 2$ °C). Bei Zweischrittklonierungen (PEN-2-163* und PEN-2-idel5, siehe unten) dienten im zweiten Schritt PCR-Fragmente als Matrize. Um vollständige Matrizen für die eigentliche PCR-Reaktion zu schaffen, wurde hier den 25 Zyklen eine Prä-PCR mit

zusätzlich 4 Minuten (Min) bei T_a und 8 Min bei 72 °C vorgeschaltet.

PCR-Reaktionen:

Bezeichnung	Oligonukleotide	Matrize
PEN-2-163*-F	PEN-2-F/PEN-2-191*-R	PEN-2-wt
PEN-2-163*-R	PEN-2-151*-R/PEN-2-R	PEN-2-wt
PEN-2-163*	PEN-2-F/PEN-2-R	PEN-2-163*-F/PEN-2-163*-R
PEN-2-H ₆ X	PEN-2-Start-F/PEN-2-R	PEN-2-163*
PEN-2-myc	PEN-2-F/PEN-2-Delta-Stop-R	PEN-2-163*
PEN-2-DeltaC	PEN-2-F/PEN-2-450-R	PEN-2-163*
PEN-2-Delta3	PEN-2-F/PEN-2-Delta3-R	PEN-2-163*
PEN-2-Delta5	PEN-2-F/PEN-2-Delta5-R	PEN-2-163*
PEN-2-Delta8	PEN-2-F/PEN-2-Delta8-R	PEN-2-163*
PEN-2-idel5-F	PEN-2-idel5-F/PEN-2-idel5vec-R	PEN-2-163*
PEN-2-idel5-R	PEN-2-F/PEN-2-idel5-R	PEN-2-163*
PEN-2-idel5	PEN-2-F/PEN-2-idel5vec-R	PEN-2-idel5-F/PEN-2-idel5-R
PEN-2-D90A	PEN-2-F/PEN-2-D90A-R	PEN-2-163*
PEN-2-F94A	PEN-2-F/PEN-2-F94Along-R	PEN-2-163*
PEN-2-P97A	PEN-2-F/PEN-2-P97A-R	PEN-2-163*
PEN-2-G99A	PEN-2-F/PEN-2-G99A-R	PEN-2-163*
PEN-2-4A	PEN-2-F/PEN-2-99-97-94-A-R	PEN-2-D90A

Tabelle 2.2: **Durch PCR hergestellte Konstrukte**

Auftrennung und Aufreinigung der PCR-Fragmente

TBE-Puffer: 90 mM Tris Base (Biomol), 90 mM Borsäure (Roth), 2 mM EDTA (Merck), pH 8,0 in dH₂O
Agarose (Invitrogen), 2 % gelöst in TBE-Puffer (zur Detektion der DNA wurden jedem Gel 0,5 µg/µl Ethidiumbromid (Sigma) beigegeben).
DNA-Auftragspuffer(6-fach): 50 % Glycerin (Merck), 10 mM EDTA pH 8,0, 0,05 % Bromphenolblau (Merck)
DNA-Marker (Invitrogen), gelöst in DNA-Auftragspuffer.
Agarose-Gel-Kammer (Easy Cast B1A von Owl Separation Systems)

Die PCR-Fragmente wurden in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels des Nucleospin-Kits (Macherey Nagel) nach Angaben des Herstellers. Aufgereinigte PCR-Fragmente wurden in ddH₂O gelöst und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.1.2 Subklonierung von PEN-2 und -Varianten in pcDNA Säugerzellexpressionsvektoren

Verwendete Plasmidvektoren:

- pcDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen)
- pcDNA4/HisC (Invitrogen)
- pcDNA4/myc-HisC (Invitrogen)

Konstrukte:

Bezeichnung	PCR-Fragment	Klonierungsstellen	Plasmidvektor
wt	PEN-2-163*	<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>	pcDNA3.1/zeo(+)
H ₆ X-PEN-2	PEN-2-H ₆ X	<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>	pcDNA4/HisC
PEN-2-mycHisC	PEN-2-mycHisC	<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>	pcDNA4/mycHisC
Δ C	PEN-2-DeltaC	<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>	pcDNA3.1/zeo(+)
Δ 3	PEN-2-Delta3	<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>	pcDNA3.1/zeo(+)
Δ 5	PEN-2-Delta5	<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>	pcDNA3.1/zeo(+)
Δ 8	PEN-2-Delta8	<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>	pcDNA3.1/zeo(+)
Δ 90-94	PEN-2-idel5	<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>	pcDNA3.1/zeo(+)
D90A	PEN-2-D90A	<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>	pcDNA3.1/zeo(+)
F94A	PEN-2-F94A	<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>	pcDNA3.1/zeo(+)
P97A	PEN-2-P97A	<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>	pcDNA3.1/zeo(+)
G99A	PEN-2-G99A	<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>	pcDNA3.1/zeo(+)
4A	PEN-2-4A	<i>EcoRI</i> , <i>XhoI</i>	pcDNA3.1/zeo(+)

Tabelle 2.3: Übersicht über hergestellte Plasmidvektor-Konstrukte

Verdau der Vektoren und PCR-Fragmente mit Restriktionsenzymen:

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden zusammen mit den benötigten Puffern von New England Biolabs (NEB) bezogen.

Ansatz (Vektor bzw. PCR-Fragment:)

Substanz	Menge
Vektor { <i>PCR – Fragment</i> }	2 μ l { 20 μ l }
NEB Puffer 2 (10-fach)	6 μ l
BSA (100-fach, NEB)	0,6 μ l
<i>Eco</i> RI	2 μ l
<i>Xho</i> I	5 μ l
ddH ₂ O	44,4 μ l { 24,4 μ l }
$\Sigma =$	50 μ l

Die Inkubation des Verdau erfolgte bei 37 °C für zwei Stunden. Nach Hitzeinaktivierung der zugegebenen Restriktionsenzyme für 20 Min bei 65 °C erfolgte die Zugabe von 2 μ l alkalischer Phosphatase aus Krabben (“ Shrimp alkaline phosphatase“,SAP, Roche), 8 μ l SAP-Puffer (10-fach, Roche) und 10 μ l ddH₂O, zur Dephosphorylierung der freien Plasmidenden. Nach Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C und Hitzeinaktivierung der SAP bei 65 °C für 20 Min wurden die Plasmidpräparationen im 0,8 % Agarosegel aufgetrennt und nach Ausschneiden unter UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) mit dem Nucleospin-Kit (Macherey Nagel), nach Angaben des Herstellers gereinigt. Fertige Plasmidpräparationen wurden in ddH₂O gelöst und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die PCR-Fragmente wurden lediglich zwei Stunden bei 37 °C verdaut und nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme (20 Min, 65 °C) im 2 % Agarosegel aufgetrennt. Die Aufreinigung und Lagerung erfolgte wie oben beschrieben.

Ligation von PCR-Fragmenten und Vektoren:

Zur Ligation von PCR-Fragmenten mit verdauten Vektoren wurde folgender Ansatz verwendet:

Substanz	Menge
Vektor (verdaut und dephosphoryliert)	2 μ l
PCR-Fragment (verdaut)	6 μ l
T4-DNA Ligase (Fermentas)	1 μ l
Puffer für T4 Ligase (Fermentas)	2 μ l
ddH ₂ O	9 μ l
$\Sigma =$	20 μ l

Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für 3 Stunden erfolgte die Transformation von *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α (siehe unten).

2.1.3 Vermehrung von Plasmidvektoren in E.coli

Herstellung von kompetenten *E. coli*:

LB-Medium (Low Salt Luria-Bertani Medium): 1 % Trypton (BD), 0,5 % Yeast Extract (BD) und 0,5 % NaCl (Roth) in dH₂O. pH 7,0 mit NaOH einstellen und bei 120 °C/1,2 bar für 20 Min autoklavieren. Ggf. nach dem Abkühlen die entsprechenden Selektionsantibiotika zusetzen.

Transformationspuffer: 50 mM CaCl₂(Applichem), 15 % Glycerol (Roth), 10 mM PIPES Puffer (Sigma), pH 6,6.

OD₆₀₀-Bestimmung: SmartSpec 3000 Spectrophotometer (Biorad) nach Angaben des Herstellers.

Eine *E. coli* DH5 α -Übernachtskultur wurde 1:100 in 100 ml LB-Medium verdünnt und im Schüttelinkubator bei 200 upm/37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in der Megafuge 1,0 R (Heraeus) 5 Min bei 1500 xg / 4 °C pelletiert (siehe auch rpm / xg -Umrechnungstabelle im Anhang S.105) und in 17,5 ml eiskaltem CaCl₂ Puffer resuspendiert. Nach 30 Min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut wie oben beschrieben, pelletiert und in 1 ml eiskaltem CaCl₂ Puffer resuspendiert. Die so gewonnenen kompetenten Zellen wurden entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -80 °C konserviert.

Transformation kompetenter *E. coli*:

Ampicillin-LB-Agarplatten: 1 % Trypton (BD), 0,5 % Yeast Extract (BD) und 0,5 % NaCl (Roth) in dH₂O. pH 7,0 wurde mit NaOH (Merck) eingestellt, 15 g/l Agar (BD) zugesetzt und die Lösung bei 120 °C/1,2 bar für 20 Min autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C, wurde Ampicillin (Sigma) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt und Agarplatten gegossen.

Ampicillin-Stocklösung: Ampicillin (Sigma) wurde in einer Konzentration von 100 mg/ml in ddH₂O gelöst. Nach Sterilfiltration mit einem 0,22 µm Filter (Qualilab) wurde die Lösung aliquotiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zu einem Ligationsansatz (20 µl, siehe oben) wurden 100 µl kompetenter *E. coli* DH5α (Herstellung siehe oben) gegeben. Nach einer Inkubation auf Eis von 30 Min erfolgte eine 1-minütige Induktion bei 42 °C. Danach ruhte der Ansatz für 5 Min auf Eis. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml LB-Medium und eine Inkubation für 30 Min bei 37 °C / 200 upm. Dieser Ansatz wurde auf Ampicillin-LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Präparation von Plasmidvektoren im kleinen Maßstab (Mini-Präp:)

Puffer1: 50 mM Tris (Biomol) pH 8,0, 10 mM EDTA (Merck) (vor Gebrauch frisch 100 µg/ml RNaseA (Sigma) zugeben)

Puffer2: 200 mM NaOH (Merck), 1 % SDS (1 g / 100 ml, Calbiochem)

Puffer3: 3,0 M Kaliumacetat (Roth), pH = 5,5 mit Essigsäure (Roth) einstellen

RNaseA, (DNase-frei): RNaseA (Sigma) wurde in einer Konzentration von 10 mg / ml in ddH₂O gelöst. Nach vorsichtigem Erhitzen im 95 °C Wasserbad für 10 Min und Abkühlen, wurde die Lösung aliquotiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Nach Übernachtinkubation der mit transformierten *E. coli* DH5α beimpften Ampicillin-LB-Agar-Platten wurden positive Klone mit einer Pipettenspitze gepickt und in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg / ml) transferiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C / 200 upm, wurden die Bakterien bei 16.000 xg / 10 Min, 4 °C in der Kühlzentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus) pelletiert. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer1 resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer2 erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für genau 5 Min. Danach Zugabe von 300 µl Puffer3 und Inkubation auf Eis für 15 Min. Zellbestandteile und einsträngige DNS wurden durch Zentrifugation (16.000 xg / 15 Min, 4 °C, Biofuge fresco) pelletiert. 800 µl des Überstandes wurden mit 560 µl Isopropanol (ROTH) gemischt und die DNA wurde bei 16.000 xg / 15 Min, 4 °C pelletiert. Es folgte ein Waschschriff mit 70 % Ethanol

(ROTH). Nachdem in einem Trockenschritt das gesamte Ethanol verdampft war, wurde das Pellet in 20 μ l ddH₂O resuspendiert und entweder weiterverarbeitet oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Kontrollverdau von Plasmidvektoren:

Durch Mini-Präp gereinigte Plasmidvektoren wurden wie oben beschrieben mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und im 2 % Agarose-Gel auf das Vorhandensein eines Inserts der gewünschten Größe untersucht.

Präparation von Plasmiden im großen Maßstab (Maxi-Präp)

Durch Kontrollverdau als Insert-positiv identifizierte Klone wurden in 200 ml LB-Medium bei 37 °C / 200 upm über Nacht vermehrt. Die Bakterien wurden bei 1000 xg / 30 Min, 4 °C pelletiert und die DNA anschließend mit Hilfe des Nucleobond-Kit (Macherey Nagel) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in ddH₂O gelöst und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Alle verwendeten Konstrukte wurden durch Sequenzierung bei der Firma GATC (Konstanz) verifiziert.

2.1.4 Klonierung von PEN-2 siRNA in den pSUPER RNAi-Expressionsvektor

Der pSUPER Vektor zur stabilen Expression von siRNA-Oligonukleotiden [12] wurde freundlicherweise von Dr. Agami (NKI, www.nki.nl) zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma bezogen.

Sequenz der Oligonukleotide und Funktionsweise des pSUPER Vektors (Abb. 2.2):

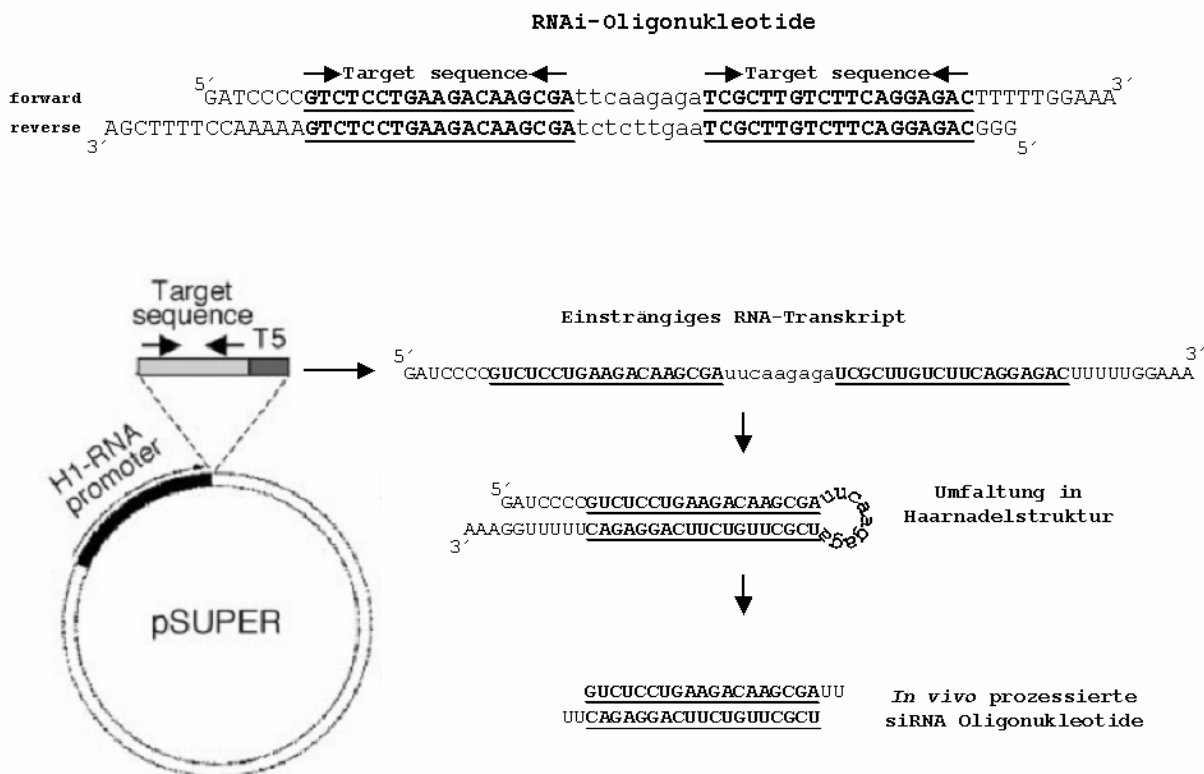


Abbildung 2.2: **Sequenz der verwendeten RNAi Oligonukleotide und Schema der Funktionsweise des pSUPER Vektors.** Die Pfeile kennzeichnen die Zielsequenz der PEN-2 cDNA. (Modifiziert nach Brummelkamp et al., [12]).

Hybridisierung der Oligonukleotide:

Die Oligonukleotide wurden in 50 μl ddH₂O gelöst ($c = 10 \text{ nmol}/\mu\text{l}$). Danach wurde je 1 μl "forward"- und "reverse"-Oligonukleotid (vgl. Abb 2.2) mit 48 μl Hybridisierungspuffer (NEB Puffer 4) gemischt und 4 Min bei 95 °C inkubiert. Nach

einer weiteren Inkubation für 10 Min bei 70 °C wurden die Oligonukleotide langsam auf 4 °C abgekühlt. Lagerung der hybridisierten Oligonukleotide erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

Phosphorylierung der Oligonukleotide:

2 μl der hybridisierten Oligonukleotide wurden mit 1 μl T4 Polynukleotidkinase Puffer (Fermentas), 1 μl ATP (1 mM, Sigma), 1 μl T4 Polynukleotidkinase (PNK, Fermentas) und 5 μl ddH₂O gemischt. Inkubation bei 37 °C für 30 Min. Danach erfolgte bei 70 °C für 10 Min eine Hitzeinaktivierung der PNK.

Ligation in den pSUPER Vektor:

2 μl der hybridisierten und phosphorylierten Oligonukleotide wurden mit 1 μl T4-Ligase Puffer, 1 μl T4-Ligase, 5 μl ddH₂O und 1 μl pSuper (wie oben beschrieben verdaut mit *Bgl*III und *Hind*III und dephosphoryliert) gemischt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Transformation von *E. coli*, Kontrolle der Ligation:

Der Ligationsansatz wurde wie oben beschrieben in *E. coli* DH5 α transformiert. Es wurden Mini-Präps angefertigt und diese zur Kontrolle der Ligation mit *Eco*RI und *Hind*III verdaut (die *Bgl*III Schnittstelle wurde durch die Ligation zerstört). Ein leerer Vektor enthielt ein Insert von 300 kb, ein positiver Vektor eines von 360 kb, die in 2 % Agarosegelen aufgetrennt werden konnten.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien und Kulturmedien

Basiszelllinien

- HEK 293 SwAPP (Sw) [22]
- SwAPP/PS1 Δ Exon9 [135]

Die Zelllinie HEK 293 SwAPP wurde von C. Haass bezogen. In diesen Zellen ist APP mit der "Swedish"-Doppelmutante (APP-Swedish oder SwAPP: Lysin 595 \rightarrow Asparagin und Methionin 596 \rightarrow Leucin) überexprimiert, welches ein besseres Substrat für die β -Sekretase darstellt [22]. Somit ist die APP-Prozessierung durch BACE ca. 6-8-fach gegenüber wtAPP-Zellen gesteigert, was die Untersuchung von sezerniertem A β -Peptid in diesen Zellen erleichtert und die deshalb als Zellkulturmodell zur Untersuchung der γ -Sekretase Aktivität eingesetzt werden können(vgl.[22]).

Die SwAPP/ PS1 Δ Exon9 Zelllinie (Klon 8) wurde von H. Steiner bezogen (vgl. [135]).

Zellkulturmedien:

Als Basismedium diente Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco), supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS,Gibco), 1 % L-Glutamine (Gibco) und 1 % PEN/Strep (Gibco). Zur Selektion stabiler Transfektanten wurden folgende Antibiotika zugesetzt:

Hygromycin (Invitrogen) 150 μ g/ml

Zeocin (Invitrogen) 200 μ g/ml

Geneticin(G 418, Roche) 200 μ g/ml

Das Medium für die HEK 293/SwAPP-Zelllinie wurde zur Aufrechterhaltung der SwAPP-Expression mit Geneticin (G418, 200 μ g/ml) supplementiert. Die SwAPP/PS1 Δ Exon9-Zelllinie wurde zusätzlich mit Zeocin (200 μ g/ml) supplementiert, um die PS1 Δ Exon9-Expression aufrecht zu erhalten.

Hergestellte Zelllinien:

Zelllinie	Konstrukt	Ausgangszelllinie	Selektion mit
PEN-2KD	pSuper-PEN-2-163	HEK 293/SwAPP	Hygromycin 150 $\mu\text{g/ml}$
Wt	PEN-2-163*	PEN-2KD	Zeocin 200 $\mu\text{g/ml}$
H ₆ X-PEN-2	H ₆ X-PEN-2	PEN-2KD	Zeocin 200 $\mu\text{g/ml}$
PEN-2-mycHisC	PEN-2-mycHisC	PEN-2KD	Zeocin 200 $\mu\text{g/ml}$
ΔC	Delta C	PEN-2KD	Zeocin 200 $\mu\text{g/ml}$
Δ3	Delta 3	PEN-2KD	Zeocin 200 $\mu\text{g/ml}$
Δ5	Delta 5	PEN-2KD	Zeocin 200 $\mu\text{g/ml}$
Δ8	Delta 8	PEN-2KD	Zeocin 200 $\mu\text{g/ml}$
$\Delta\text{90-94}$	Delta 90-94	PEN-2KD	Zeocin 200 $\mu\text{g/ml}$
D90A	D90A	PEN-2KD	Zeocin 200 $\mu\text{g/ml}$
F94A	F94A	PEN-2KD	Zeocin 200 $\mu\text{g/ml}$
P97A	P97A	PEN-2KD	Zeocin 200 $\mu\text{g/ml}$
G99A	G99A	PEN-2KD	Zeocin 200 $\mu\text{g/ml}$
4A	4A	PEN-2KD	Zeocin 200 $\mu\text{g/ml}$
$\Delta\text{Exon9KD}$	pSuper-PEN-2-163	Sw/PS-1 ΔExon9	Hygromycin 150 $\mu\text{g/ml}$

Tabelle 2.4: Übersicht über hergestellte Zelllinien

Da der pSUPER Vektor keine zur Transfektion nutzbare Antibiotika-Resistenz aufweist, wurde dessen Transfektion als Co-Transfektion zusammen mit dem leeren pcDNA 3.1/Hygro(+)-Vektor (Invitrogen, Verhältnis pSuper/pcDNA3.1/Hygro(+)= 10:1) zur Selektion stabiler Transfektanten durchgeführt. Auch die Transfektion im SwAPP/PS1 $\Delta\text{Exon 9}$ Hintergrund erfolgte als Co-Transfektion mit dem leeren pcDNA 3.1/Hygro(+)-Vektor (Invitrogen).

2.2.2 Zellkultivierung

Die Zellen wurden in 10cm Kulturschalen (Nunc) in 8 ml Kulturmedium (siehe oben) im Zellkulturinkubator (Hera cell, Heraeus) kultiviert. Umsetzen der Zellen und alle Manipulationen erfolgten unter einer Sterilbank (Hera safe, Heraeus). Die Konfluenz der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop (Hundt, Wetzlar) überprüft.

Zellpassage:

Das Medium von vollständig konfluenten Zellschalen wurde abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin (Gibco) von der Kulturschale abgelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation in Reaktionsröhrchen ("Falcon tubes", Sarstedt) bei 1000 xg / 5 Min, RT pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und in entsprechender Verdünnung auf neue Kulturschalen mit frischem Medium verteilt.

Zellernte:

Das Medium von vollständig konfluenten Zellschalen wurde abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Es wurde nun 1 ml eiskaltes PBS zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber (Costar, Corning) von der Kulturschale abgelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (1000 xg / 5 Min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die PBS-Zellpellets wurden entweder sofort weiterverarbeitet (siehe oben) oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Gefrierkonservierung von Zelllinien:

Einfriermedium: 95 % foetales Kälberserum (FCS, Gibco), 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck).

Das Zellpellet einer 10 cm Kulturschale (siehe Zellpassage) wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Einfriergefäße (Sarstedt) transferiert. Nach langsamem Herunterkühlen in Einfrierboxen (Sarstedt) wurden die Zellstocks in flüssigem Stickstoff (langfristige Konservierung) oder bei -80 °C (kurzfristige Konservierung) bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur erneuten Inkulturnahme wurden die Stocks schnell im 37 °C Wasserbad aufgetaut und in 3 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (siehe oben) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in

frischem Kulturmedium resuspendiert und auf neue Kulturschalen verteilt. Das Anwachsen der Zellen wurde nach 8 Stunden unter dem Lichtmikroskop kontrolliert.

2.2.3 Transfektion von DNA und Selektion von stabiler Transfektanten

Zur Transfektion von DNA wurden die Zellen so in Zellkulturschalen verteilt, daß sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 60-80 % aufwiesen. Das Kulturmedium wurde abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

12 μ l des Transfektionsreagenz Fugene 6 (Boehringer Mannheim) wurden mit 84 μ l Optimem (Gibco) gemischt und 5 Min bei RT inkubiert. Danach wurden 4 μ g der zu transfizierenden DNA (auf 4 μ l Volumen mit Optimem verdünnt) zugegeben und die Lösungen vorsichtig mit der Pipette vermischt. Nach einer Inkubation bei RT für 20 Min wurde das Fugene/DNA-Gemisch vorsichtig in die Kulturschale mit den zu transfizierenden Zellen geträufelt. Nun wurden die Zellen bis zur vollständigen Konfluenz (in der Regel 1 Tag) kultiviert und anschließend in verschiedenen Verdünnungen (1:30, 1:60, 1:120, 1:240) auf 10 cm Schalen verteilt, die Kulturmedium mit dem Selektionsantibiotikum (siehe oben) enthielten.

Nachdem eine ausreichende Anzahl Einzelzellklone hochgewachsen war (ca. 2-3 Wochen, eventuell Mediumswechsel dazwischen), wurden diese mit Hilfe einer 20 μ l Pipette einzeln auf Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ("24-well") übertragen. Diese Einzelzellklone wurden kultiviert und in größere Kulturschalen transferiert (12-well, 6-well, 6cm Schalen). Bei ausreichender Zellmenge (konfluente 6 cm Kulturschale) wurde im Westernblot die Expression des gewünschten Proteins untersucht.

2.2.4 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren

Folgende Inhibitoren wurden in dieser Arbeit verwendet:

Inhibitor	Quelle	Lösungsmittel	Konzentration
<i>clasto</i> -Lactacystin- β -lacton	Calbiochem	DMSO	10 μ M
MG-132	Calbiochem	DMSO	5 μ M
Cycloheximid	Sigma	DMSO	100 μ g/ml

Tabelle 2.5: Übersicht über verwendete Inhibitoren

Zur Behandlung mit Inhibitoren wurde das Medium von konfluenten 10 cm Kulturschalen abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und 5 ml Basiskulturmedium (siehe oben) zugegeben. Anschließend wurde der Inhibitor in entsprechender Konzentration (siehe Tabelle) zugegeben und die Zellen im Zellkulturschrank weiterkultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und die PBS-Zellpellets wie oben beschrieben biochemisch analysiert.

2.2.5 Gewinnung von konditioniertem Medium zur A β -Bestimmung

Um konditioniertes Medium zur Bestimmung von sezerniertem A β zu gewinnen, wurde das Medium von konfluenten 10 cm Kulturschalen abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden erneut 4 ml Basiskulturmedium (siehe oben) zugegeben und die Zellen für vier Stunden im Zellkulturschrank weiterkultiviert. Das auf diese Weise konditionierte Kulturmedium wurde vorsichtig abgenommen und durch Zentrifugation (1000 xg / 5 Min) vorgereinigt. Der Überstand wurde entweder gleich zur Immunpräzipitation (vgl. oben) weiterverwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.3 Biochemische Arbeitstechniken

2.3.1 Zellyse und Immunpräzipitation

STEN-Lyse Puffer: 50 mM Tris (Biomol) pH 7,6, 150 mM NaCl (Roth), 2 mM EDTA (Merck), 1 % Igepal C-630 (Sigma), in dH₂O

STEN-Puffer: 50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,7 % Igepal C-630 (Sigma), in dH₂O

STEN-NaCl Puffer: 50 mM Tris pH 7,6, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,7 % Igepal C-630 (Sigma), in dH₂O

STEN-SDS Puffer: 50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 % SDS, 0,7 % Igepal C-630 (Sigma), in dH₂O

PAS (Protein-A-Sepharose): Protein-A-Sepharose (Invitrogen) wurde mit einer Konzentration von 0,1 g/ml in STEN gelöst, mit 2 mg/ml BSA (NEB) versetzt und 1 Stunde bei 4 °C geschüttelt. Nach Aliquotierung erfolgt die Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

PI-Mix (Sigma): eingesetzt nach Angaben des Herstellers (2 µl PI-Mix (Sigma) auf 1 ml Reaktionslösung, 1:500).

Das PBS-Zellpellet einer 10 cm Zellkulturschale (siehe oben, Zellernte) wurde in 300 µl eiskaltem STEN-Lyse Puffer (+PI-Mix Sigma) resuspendiert und 20 Min auf Eis inkubiert. Nach einem reinigenden Zentrifugationsschritt bei 16.000 xg / 10 Min (4 °C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Die Proteinkonzentration des Lysates wurde mit dem BRADFORD-Reagenz (Biorad) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Vor dem Ansetzen der Immunpräzipitation wurde das Lysat mit 30 µl PAS vorgereinigt (30 Min bei 4 °C / 200 upm), danach Abzentrifugieren der "Beads" (Protein-A immobilisiert an Sepharose-Kügelchen) bei 3600 xg / 5 Min, 4 °C.

Ansatz zur Immunpräzipitation:

Substanz	Menge
Zellysat	500 µg Protein
PAS	30 µl
Antikörper	1-2 µl
STEN-Lyse Puffer (+PI-Mix)	ad 500 µl

Dieser Ansatz wurde zwei Stunden bei 4 °C / 200 upm inkubiert. Danach wurden die Beads bei 3600 xg / 5 Min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Beads wurden in 500 µl STEN-NaCl Puffer resuspendiert und 15 Min bei 4 °C / 200 upm inkubiert. Analog erfolgten weitere Waschschrte mit STEN-SDS Puffer und STEN-Puffer. Nach diesen Waschschrten wurden die abzentrifugierten Beads mit 3X Laemmli-Puffer (siehe unten) versetzt und die Proteine bei 65 °C von den

Beads abgelöst und denaturiert. Dieser Ansatz wurde entweder direkt auf SDS-Gele (siehe unten) aufgetragen oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Immunpräzipitation verwendete Antikörper :

Antikörper	Epitop	Verdünnung	Quelle
1638	PEN-2 N-Terminus (As 4-15)	1:250	Kaninchen, polyklonal ([137])
3027	PS-1 loop (As 263-407)	1:250	Kaninchen, polyklonal ([19])
2953	PS-1 N-Terminus (As 2-81)	1:250	Kaninchen, polyklonal ([19])
3926	A β 42 (As 1-42)	1:100	Kaninchen, polyklonal ([158])
N1660	NCT C-Terminus (As 693-709)	1:500	Kaninchen, polyklonal ([37])

Tabelle 2.6: Übersicht über Antikörper, die zur Immunpräzipitation verwendet wurden.

2.3.2 Membranpräparation und Membranlyse

MOPS-Puffer: 10 mM MOPS (Sigma) pH 7,0, 10 mM KCl in dH₂O

Das PBS-Zellpellet einer 10 cm Zellkulturschale (siehe oben, Zellernte) wurde in 1 ml eiskaltem MOPS-Puffer und PI-Mix (Sigma) resuspendiert und 10 Min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen homogenisiert, entweder durch 10-maliges Pressen durch eine Spritze mit einer 23G (0,6 * 30 mm) Nadel oder durch die “freeze-thaw“ Methode (Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und langsames Wiederauftauen). Durch Zentrifugation bei 1000 *xg* / 15 Min (4 °C) wurden Kerne und andere unerwünschte Zellbestandteile pelletiert und der postnukleäre Überstand (“postnuclear supernatant“, PNS) gewonnen. Dieser wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß transferiert. In dem folgenden Zentrifugationsschritt (16.000 *xg* / 40 Min, 4 °C) wurde die Gesamtmembranfraktion pelletiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 100 μ l STEN-Lyse Puffer (+PI-Mix (Sigma)) resuspendiert und 20 Min auf Eis inkubiert. Nach einem reinigenden Zentrifugationsschritt (16.000 *xg* / 10 Min, 4 °C) wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und das Pellet verworfen. Die Proteinkonzentration des Membran-Lysates wurde mit Hilfe des BRADFORD-Reagenz (Biorad) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Lagerung des Lysates bis zur

weiteren Verwendung erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.3 Co-Immunpräzipitation

CHAPSO-Lysepuffer: 1 % CHAPSO (Biomol), 150 mM Natriumcitrat (Merck) pH 6,4, PI-Mix complete (Roche), in ddH₂O

CHAPSO-Waschpuffer: 0,5 % CHAPSO (Biomol), 150 mM Natriumcitrat pH 6,4, PI-Mix complete (Roche), in ddH₂O

PI-Mix complete (Roche): Eine Tablette wurde in 400 μl ddH₂O gelöst. Diese Stocklösung (25-fach) wurde der Reaktionslösung im Verhältnis 1:25 zugesetzt.

Die Präparation der Membranfraktion erfolgte wie oben beschrieben, nur wurden die Membranen bei 100.000 xg / 40 Min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ultrazentrifuge Optima Max-E von Beckman-Coulter) pelletiert. Das Pellet wurde in 300 μl CHAPSO-Lysepuffer (pro 10 cm Zellkulturschale) resuspendiert und für 20 Min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein reinigender Zentrifugationsschritt (100.000 xg / 30 Min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und die Bestimmung der Protein-Konzentration mit dem BRADFORD-Reagenz. Das Membranlysate wurde mit 30 μl PAS für 30 Min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 200 upm vorinkubiert. Die Beads wurden abzentrifugiert (1000 xg / 5 Min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und der Überstand für die Co-Immunpräzipitation eingesetzt.

Pro Ansatz wurden 500 μg der Membranpräparation eingesetzt. Es wurden 30 μl PAS-Beads und 1-2 μl Antikörper (Verdünnung siehe Tabelle 2.3) zugesetzt. Der Ansatz wurde mit CHAPSO-Puffer auf 500 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Präzipitation wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 200 upm für zwei Stunden inkubiert. Danach wurden die Beads pelletiert (1000 xg / 5 Min, Kühlzentrifuge) und der Überstand verworfen. Die Beads wurden in 500 μl CHAPSO-Waschpuffer resuspendiert und 10 Min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 200 upm inkubiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt.

Die gewaschenen Beads wurden in 30 μl 3X Laemmli-Puffer (siehe unten) resuspendiert und die Proteine bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 Min von den Beads abgelöst und denaturiert. Nach Abkühlung wurden entsprechende Mengen auf SDS-Gele aufgetragen und aufgetrennt (siehe unten).

2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blotting

SDS-Gele:

3X Laemmli-Puffer: 0,1875 M Tris (Biomol) pH 6,8, 6 % SDS (Calbiochem), 30 % Glycerol (Roth), 7,5 % β -Mercaptoethanol (Roth), 6 M Harnstoff (Serva), 1 Spatelspitze Bromphenolblau (Sigma), in dH₂O.

4X Laemmli-Puffer: 0,25 M Tris pH 6,8, 8 % SDS, 40 % Glycerin, 10 % β -Mercaptoethanol, 1 Spatelspitze Bromphenolblau, in dH₂O.

4X Lower Tris: 1,5 M Tris pH 8,8, 0,4 % SDS, in dH₂O.

4X Upper Tris: 0,5 M Tris pH 6,8, 0,4 % SDS, in dH₂O.

10X Tris-Glycine: 0,24 M Tris Base, 0,2 M Glycine (Roth), dH₂O ad 5 L (für **10X Tris-Glycine/SDS**, zusätzlich 0,1% SDS)

Ammoniumpersulfat (APS, Sigma): 10 % gelöst in dH₂O.

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Roth)

	7% Gel	10% Harnstoffgel	12% Harnstoffgel
Trenngel			
Acrylamid 40 % (SERVA)	2,625 ml	3,75 ml	4,5 ml
Aqua bidest	8,625 ml	2,25 ml	1,5 ml
4X Lower Tris	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
8 M Harnstoff	-	5,25 ml	5,25 ml
APS	30 μ l	30 μ l	30 μ l
TEMED	30 μ l	30 μ l	30 μ l
$\Sigma =$	15 ml	15 ml	15 ml
Sammelgel			
Acrylamid 40 % (SERVA)	0,925 ml	0,975 ml	0,975 ml
Aqua bidest	6,825 ml	1,825 ml	1,825 ml
4X Upper Tris	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
8M Harnstoff	-	5 ml	5 ml
APS	30 μ l	30 μ l	30 μ l
TEMED	30 μ l	30 μ l	30 μ l
$\Sigma =$	10,3 ml	10,3 ml	10,3 ml

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele

Die in der Tabelle 2.5 angegebenen Mengen sind ausreichend für je zwei Gele von 1,5 mm Dicke (ca. 6 ml Trenngel, nach dem Aushärten überschichtet mit ca. 3 ml Sammelgel). Gelplatten, Gießständer und Gelkammern wurden von der Firma Biorad bezogen (Miniprotean System).

Als Gel-Laufpuffer diente Tris-Glycine/SDS. Das Einlaufen der Gele erfolgte bei 80 mV, die Auftrennung danach erfolgte bei 120 mV (Biorad, Powerpac 3).

Zur Auftrennung von NCT wurden ca. 20 μ g des Membran-Lysates (siehe oben)

mit der entsprechenden Menge 3X Laemmli-Puffer versetzt und nach Erhitzen für 10 Min bei 65 °C auf ein 7 % Gel aufgetragen. Zum Nachweis von PS1 wurde diese Proteinpräparation auf einem 10 % Harnstoffgel aufgetrennt. Für APH-1 wurden 30 μg der Proteinpräparation auf einem 12 % Harnstoff-Gel aufgetrennt. Als Proteinstandard wurde See blue (Invitrogen) verwendet.

Auftrennung von Proteinen mit kleinem Molekulargewicht:

Acrylamid-Lösung: 49,5 % Acrylamid (total, SERVA), 3 % Bis-Acrylamid (SERVA) in dH₂O.

Gelpuffer: 3 M Tris-HCl, 0,3 % SDS

Glycerol: 32 % Glycerin in dH₂O (v/v)

Anodenpuffer: 1 M Tris-HCl pH 8,9

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris-Hcl, 1 M Tricine (Biomol), 0,1 % SDS

Zur Auftrennung von Proteinen mit kleinem Molekulargewicht (PEN-2, A β , ...) wurde das Zweistufen-Gelsystem nach Schagger [117] verwendet.

Substanz	Trenngel (2. Stufe)	Trenngel (1. Stufe)	Sammelgel
Acrylamid-Lösung	3,5 ml	1,5 ml	0,5 ml
Gelpuffer	3,5 ml	2,5 ml	1,55 ml
Aqua bidest	-	3,5 ml	4,2 ml
Glycerin	3,5 ml	-	-
10 % APS (Sigma)	32,5 μl	35 μl	25 μl
TEMED (Roth)	3,25 μl	4 μl	5 μl
$\Sigma =$	10,5 ml	7,5 ml	6,7 ml

Tabelle 2.8: **Zusammensetzung des Schagger-Gels**

Die angegebenen Mengen sind ausreichend für 2 Gele von 1,5 mm Dicke. Pro Gel wurden verwendet: 5 ml Trenngel (2. Stufe), vorsichtig überschichtet mit 0,5 ml Trenngel (1. Stufe). Nach dem Aushärten wurden ca. 3 ml Sammelgel zugegeben. Die Auftrennung erfolgte in der Miniprotean-Kammer (Biorad, siehe oben) mit getrenntem Anoden- und Kathodenpuffer (siehe oben). Einlaufen bei 80 mV, Auftrennung bei 120 mV.

Western Blotting:

TBS-Tween: 0,1 M Tris pH 7,6, 0,3 M NaCl, 1% Tween-20 (Merck)

Block-Milch: 5% Magermilchpulver (Töpfer), 1 Spatelspitze Natriumazid (Sigma), gelöst in TBS-Tween.

PBS: 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄*2H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, dH₂O ad 5l.

I-Block: 1 g I-Block Pulver (Tropix), 500 μ l Tween-20, PBS ad 500ml mischen, kurz in der Mikrowelle aufkochen, nach vollständigem Lösen des Pulvers unter Rühren und Abkühlen erfolgte die Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C.

Nach Auftrennung der Proteine wurden die SDS-Gele zusammen mit je drei Lagen Filterpapier (Whatman®), Schleicher und Schuell) und einer Transfermembran (Immobilion P, Millipore) in eine MINI-Trans-Blot Kammer (Biorad) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei 400 mV für 1 Stunde, als Transferpuffer diente Tris-Glycine Puffer (siehe oben). Nach erfolgtem Transfer wurden die Transfermembranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 Stunde in Block-Milch (oder I-Block) bei Raumtemperatur inkubiert (200 upm). Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4 °C / 200 upm. Nach 5 Waschschritten mit TBS-Tween (je ca. 10 Min, RT, 200 upm) wurden die Blotmembranen mit dem Zweitantikörper (siehe unten) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach weiteren 5 Waschschritten mit TBS-Tween (siehe oben), erfolgte die Detektion der Proteine mit dem ECL-System (Amersham-Bioscience) nach Angaben des Herstellers. Die Blots wurden auf Super Rx (Fuji X-ray medical) Filmen im Crurix 60 (Agfa) Entwickler laut Herstellerangabe entwickelt.

Zur besseren Detektion von A β , wurde anstatt der Millipore Transfermembran eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell) verwendet. Nach dem Blotvorgang wurde diese für 5 Min mit der Proteinseite nach unten in PBS gekocht, unspezifische Bindungsstellen mit I-Block für 1 Stunde (RT, 200 upm) abgesättigt und die weiteren Schritte wie oben beschrieben durchgeführt.

Zum Western Blotting verwendete Antikörper :

Antikörper	Epitop	Verdünnung	Quelle
1638	PEN-2 N-Terminus(As 4-15)	1:1000 (I-Block)	Kaninchen, polyklonal ([137])
3027	PS-1 loop (As 263-407)	1:1000 (Block-Milch)	Kaninchen, polyklonal ([19])
PS-1 N	PS-1 N-Terminus (As 2-81)	1:4000 (I-Block)	Maus, monoklonal ([19])
433G/434G	APH-1 C-Terminus (As245-265 ^a)	1:1000 (I-Block)	Kaninchen, polyklonal ([127])
N1660	NCT C-Terminus (As 693-709)	1:4000 (I-Block)	Kaninchen, polyklonal ([37])
6687	APP-C-Terminus ^b	1:5000 (Block-Milch)	Kaninchen, polyklonal ([134])
9E10	myc-Epitop	1:10.000 (I-Block)	Maus, monoklonal (Santa Cruz)
6E10	A β (As 1-17)	1:10.000 (I-Block)	Maus, monoklonal (Signet)
Xpress	Xpress-Epitop	1:10.000 (I-Block)	Maus, monoklonal (Invitrogen)
β -Catenin	β -Catenin	1:10.000 (I-Block)	Maus, monoklonal (BD,Trans Lab)
β -Actin	β -Actin	1:10.000 (I-Block)	Maus, monoklonal (Sigma)

Tabelle 2.9: **Übersicht über Antikörper, die zum Western Blotting verwendet wurden.**

^a Diese beiden Antikörper wurden vor Verwendung mit Hilfe eines GST-APH-1aL-Fusionsproteins (As 207-265) Affinitätsgereinigt. ^b Antikörper 6687 ist ein Peptidantikörper gegen die letzten 20 C-terminalen As von APP.

Die Zweitantikörper Anti-Kaninchen-IgG, gekoppelt mit HRP (“horseraddish-peroxidase“, Mehrrettichperoxidase) und Anti-Maus-IgG, gekoppelt mit HRP wurden von Promega bezogen und in einer Verdünnung von 1:5000 in Block-Milch oder I-Block (ohne Zugabe von Natriumazid) eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Stabiler RNAi-Knockdown von PEN-2 und RNAi-Reversion

3.1.1 Stabiler PEN-2 RNAi-Knockdown

Um Hinweise auf die Funktion von PEN-2 bei der Reifung des γ -Sekretasekomplexes zu erhalten, wurde mit Hilfe des pSUPER Vektors [12] eine stabile PEN-2 RNAi-Knockdown Zelllinie (PEN-2KD) etabliert. Als Ausgangszelllinie dienten HEK 293 SwAPP Zellen [22] ("Sw", siehe Material und Methoden S.30). Die in diesem Zellkulturmodell überexprimierte FAD-assoziierte APP-Mutante erleichtert, durch gesteigerte Produktion von $A\beta$ die Untersuchung der γ -Sekretaseaktivität. Membranfraktionen dieser Zellen wurden zunächst auf PS1 Fragmentmenge und NCT-Reifung, als Indikatoren für die Reifung des γ -Sekretasekomplexes, untersucht.

Der PEN-2 RNAi-Knockdown ist, wie in Abb. 3.1 zu sehen, mit einer Reduktion der PS1 Fragmente bei gleichzeitiger Akkumulation des PS1 Vollängenproteins ($PS1_{holo}$) verbunden. Die in dieser und den folgenden Abbildungen zu sehende Doppelbande für $PS1_{holo}$ ist ein Laufartefakt wegen des, zur Vermeidung der Aggregation der hydrophoben Membranproteine, dem Gel zugesetzten Harnstoff. Zusätzlich zeigt sich eine Verschiebung im Verhältnis von reifem, komplex glykosyliertem (NCT_m) und unreifem (NCT_{im}) NCT zugunsten der immatures Form. Dies legt zum einen eine wichtige Rolle von PEN-2 bei der Endoproteolyse von PS nahe [143][80], zum anderen deutet die gestörte Reifung von NCT auf eine weiterreichende Funktion bei der Reifung des γ -Sekretase-Komplexes hin.

Auch auf funktioneller Ebene, zeigte sich ein Defekt der γ -Sekretase-Aktivität nach RNAi-Knockdown von PEN-2, abzulesen an einer Akkumulation der C-terminalen Fragmente von APP (APP-CTFs), die direkte Substrate der γ -Sekretase darstellen (vgl. Abb 3.2).

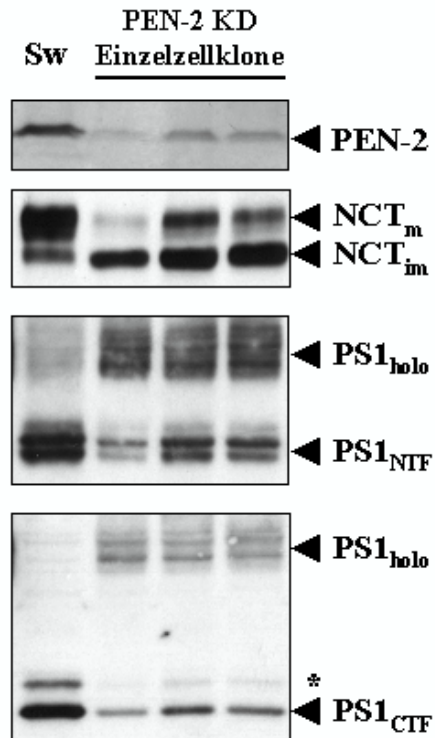


Abbildung 3.1: **Verschiedene stabile PEN-2 RNAi-Knockdown Einzelzellklone.** Membranpräparationen von Kontrollzellen (Sw) und drei verschiedenen PEN-2KD Einzelzellklonen wurden mit den Antikörpern 1638 für PEN-2, PS1-N und 3027 für PS1-NTF bzw.-CTF und N1660 für NCT auf Expression untersucht. Der Stern kennzeichnet phosphoryliertes PS1-CTF [153].

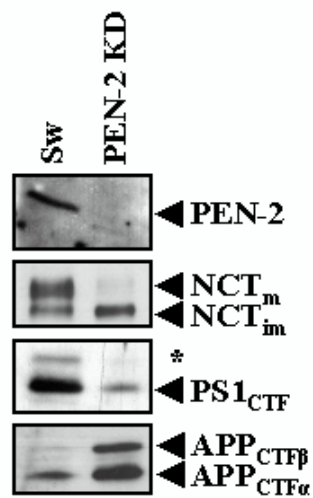


Abbildung 3.2: **Akkumulation von APP-CTFs im PEN-2KD.** Membranfraktionen von Kontrollzellen (Sw) und PEN-2KD wurden auf APP-CTFs mit Antikörper 6687 und auf PEN-2, NCT und PS1-CTF wie in 3.1 untersucht. Der Stern kennzeichnet phosphoryliertes PS1-CTF [153].

3.1.2 Reversion des PEN-2 RNAi-Knockdown

Nachdem durch Analyse der PEN-2KD Zellen eindeutige Hinweise auf die Rolle von PEN-2 bei der Reifung des γ -Sekretasekomplexes gewonnen werden konnten, sollte untersucht werden, ob dieses System für die Durchführung einer Struktur-/Funktionsanalyse geeignet ist. Hierzu wurde die Tatsache ausgenutzt, daß der RNAi-Knockdown stark sequenzspezifisch ist. Es wurden in der RNAi-Zielregion der PEN-2 cDNA sechs Punktmutationen eingeführt, die die translatierte Aminosäuresequenz nicht verändern (Abb. 3.3).

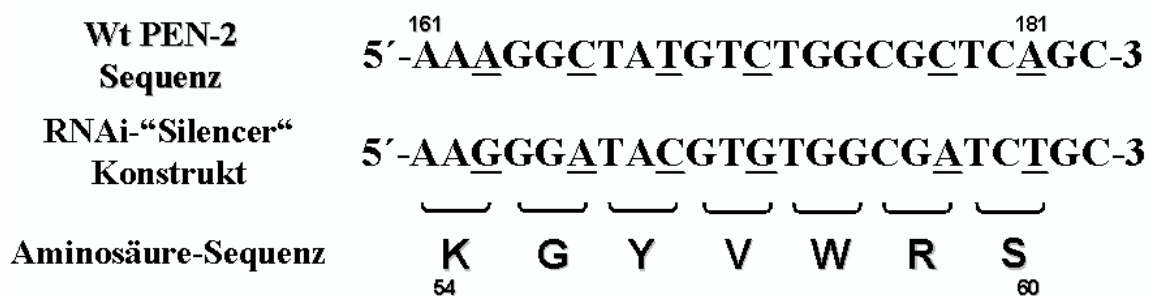


Abbildung 3.3: Sequenz des RNAi-“Silencer“ Konstrukts (PEN-2-163*) mit sechs Punktmutationen verglichen mit der Zielregion in der PEN-2 cDNA. Die Aminosäure-Sequenz des Konstruktes wurde dadurch nicht verändert .

Hiermit wurde ein RNAi-resistentes PEN-2 Konstrukt erzeugt, mit dem der Defekt des PEN-2KD revertiert werden konnte. Expression eines RNAi-resistenten wt-PEN-2 Konstruktes im PEN-2KD ermöglichte eine robuste Expression von PEN-2 (Abb. 3.4). Diese revertierte den Defekt der PS1 Endoproteolyse im PEN-2KD, abzulesen an der fehlenden Akkumulation von PS1_{holo} und der gleichzeitigen Rückkehr der PS1 Fragmente. Auch die defekte Reifung von NCT wurde wiederhergestellt.

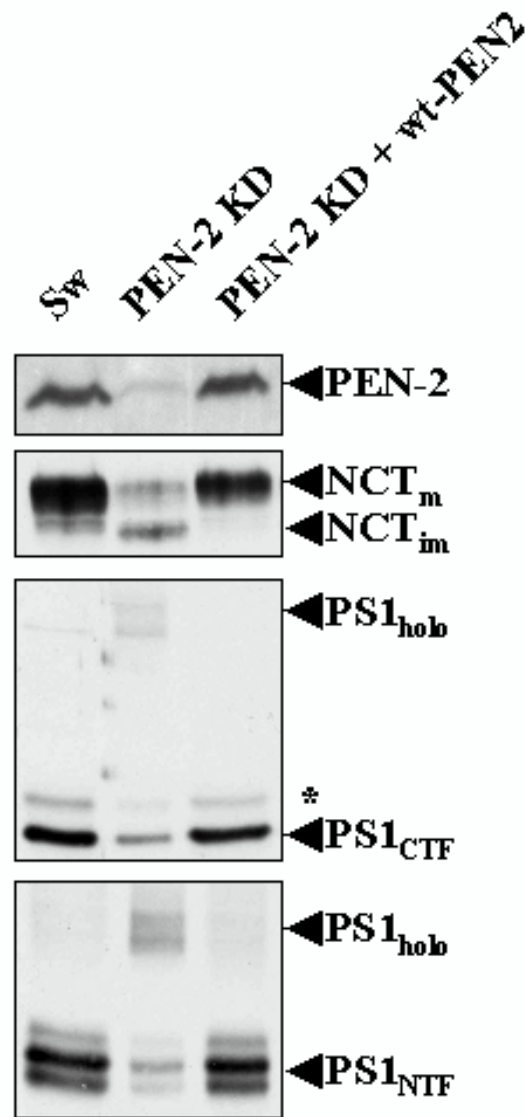


Abbildung 3.4: **Reversion des PEN-2KD Phänotyps mit einem RNAi-resistentem wt-PEN-2 Konstrukt.** Membranfraktionen von Kontrollzellen (Sw), PEN-2KD und PEN-2KD transfiziert mit RNAi-resistentem wt-PEN-2 wurden auf PEN-2, NCT und PS1 Expression wie in 3.1 untersucht. Der Stern kennzeichnet phosphoryliertes PS1-CTF [153].

Auch auf Ebene der γ -Sekretase-Aktivität konnte der Defekt des PEN-2KD, die Akkumulation der APP-CTFs, durch Transfektion eines RNAi-resistenten wt-PEN-2 revertiert werden (Abb.3.5).

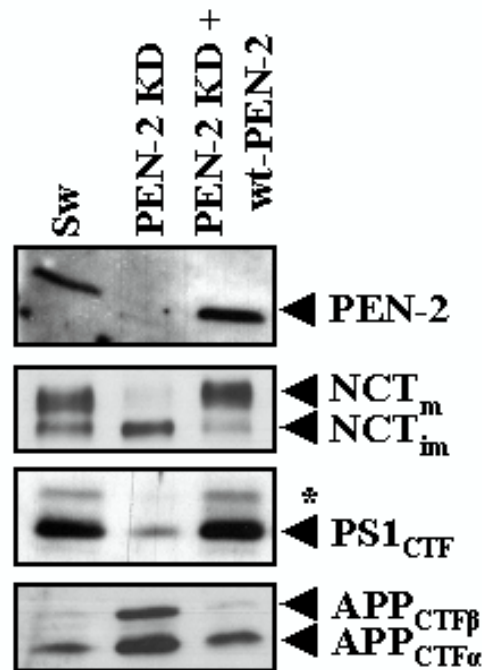


Abbildung 3.5: **Reversion des γ -Sekretasedefekts des PEN-2KD.** Membranfraktionen von Kontrollzellen (Sw), PEN-2KD und PEN-2KD transfiziert mit RNAi-resistentem wt-PEN-2 wurden auf PEN-2, PS1-CTF und APP-CTFs wie in Abb. 3.2 untersucht. Der Stern kennzeichnet phosphoryliertes PS1-CTF [153].

Alle in der Folge beschriebenen PEN-2 Varianten, die im PEN-2KD exprimiert wurden, sind durch die oben eingeführten Punktmutationen resistent gegen den RNAi-Knockdown von PEN-2 gemacht worden.

3.2 Der C-Terminus von PEN-2 ist für die Stabilisierung der Presenilin Fragmente wichtig

3.2.1 Der C-Terminus wird für die Funktion von PEN-2 benötigt

Das oben beschriebene System des PEN-2KD und dessen Reversion mit Hilfe RNAi-resistenter wt-PEN-2 Varianten wurde nun benutzt um das PEN-2 Molekül auf funktionell wichtige Domänen zu untersuchen. Zunächst wurde überprüft, ob PEN-2 Varianten, die entweder am N-Terminus durch ein XPress-His₆-Epitop (Epitop-“tag“) (H₆X-PEN-2) oder am C-Terminus mit einem myc/His-Epitop (PEN-2-*m*H₆) verlängert worden waren, den γ -Sekretasedefekt des PEN-2KD revertieren können.

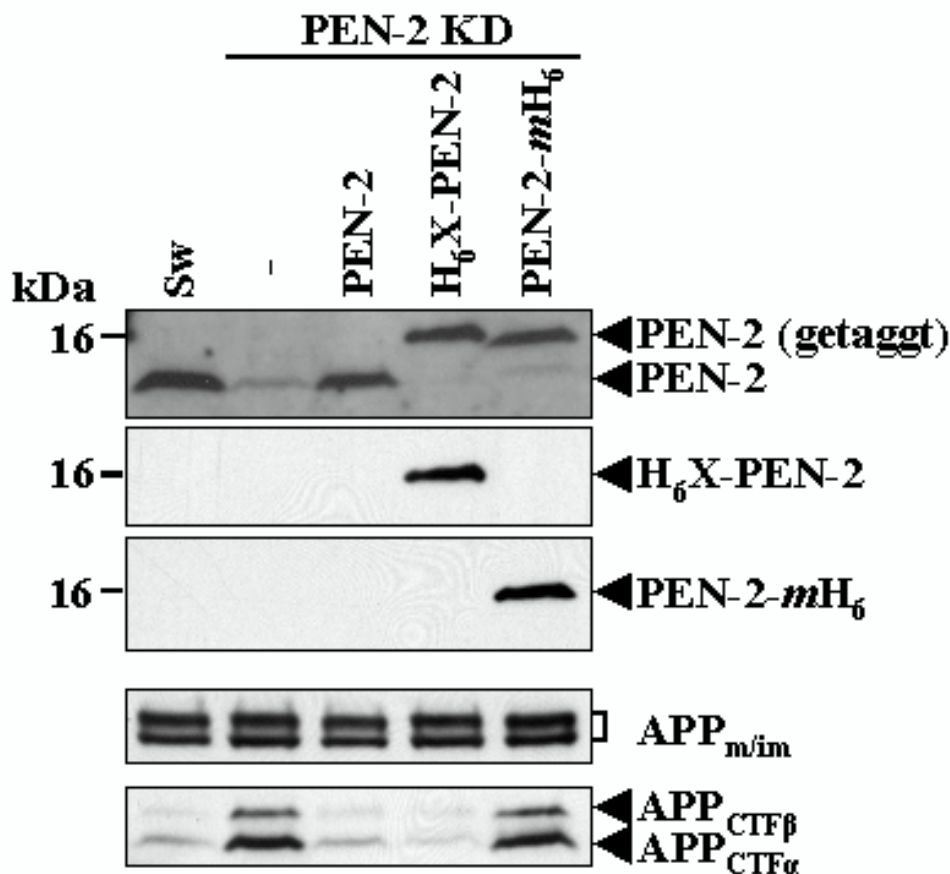


Abbildung 3.6: **Reversionsvermögen von H₆X-PEN-2 und PEN-2-*mH*₆.** Membranfraktionen von Kontrollzellen (Sw), PEN-2KD und PEN-2KD transfiziert mit RNAi-resistentem wt-PEN-2, H₆X-PEN-2 und PEN-2-*mH*₆ wurden auf APP-CTFs und APPs mit Antikörper 6687, auf PEN-2 mit Antikörper 1638 und auf die Epitop-tags mit Xpress-Antikörper (gegen das XPress-His₆-Epitop) und 9E10 (gegen das myc-Epitop) untersucht.

Wie die Abb 3.6 zeigt, konnte die Akkumulation der APP-CTFs im PEN-2KD durch Transfektion mit wt-PEN-2 und H₆X-PEN-2 revertiert werden. PEN-2-*mH*₆ war aber, trotz nachgewiesener Expression dieser PEN-2-Variante nicht in der Lage, den γ -Sekretasedefekt des PEN-2KD zu revertieren, abzulesen an einer immer noch bestehenden Akkumulation der APP-CTFs. Die Reifung von APP war allerdings in den untersuchten Zelllinien nicht beeinträchtigt (Abb. 3.6), was unterstreicht, daß sowohl der PEN-2KD als auch PEN-2-*mH*₆ direkt die Aktivität der γ -Sekretase beeinträchtigen. Dies war ein erster Hinweis darauf, daß der C-Terminus von PEN-2 wichtig für die Funktion ist, was schon bei der ersten Beschreibung von PEN-2 [44] vermutet wurde, in dem sich ein C-terminal mit GFP (green fluorescent protein) verlängertes PEN-2 Molekül (PEN-2-GFP) als nicht funktionell erwies.

Tatsächlich zeigt die Aminosäuresequenz des PEN-2 Proteins (Abb.3.7) einen Sequenzblock von 17 As am C-Terminus, mit mehreren hochkonservierten As.

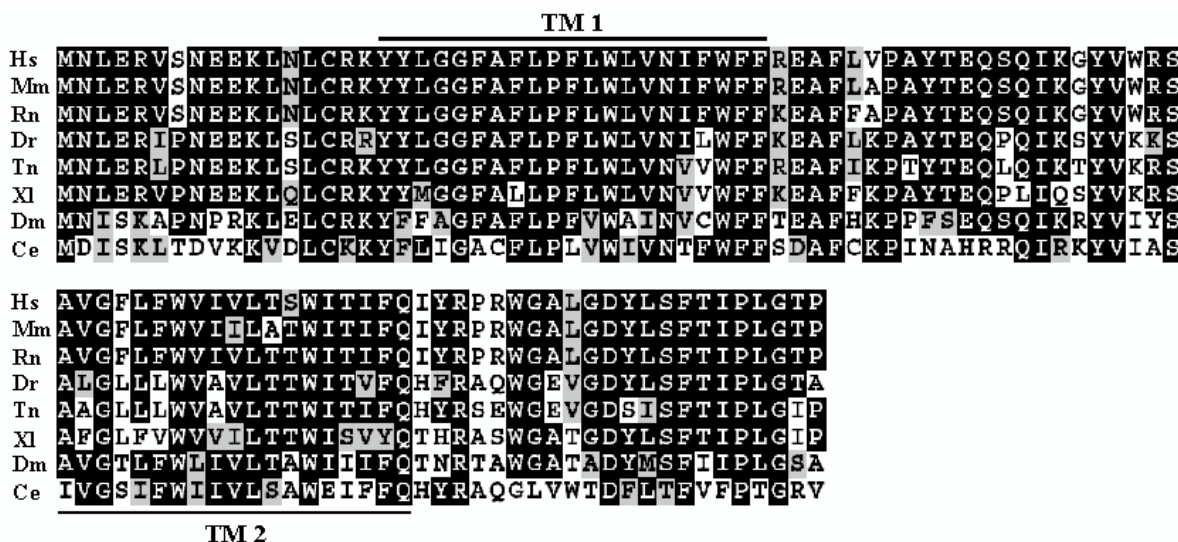


Abbildung 3.7: Sequenzvergleich des PEN-2 Proteins verschiedener Organismen. Siehe hierzu auch Einbuchstabenkode für As im Anhang, S. 104. Die Lage der Transmembrandomänen (TMD) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abkürzungen der Organismen: Hs (*Homo sapiens*), Mm (*Mus musculus*), Rn (*Rattus norvegicus*), Dr (*Danio rerio*), Tn (*Tetraodon nigroviridis*), Xl (*Xenopus laevis*), Dm (*Drosophila melanogaster*), Ce (*Caenorhabditis elegans*).

Eine Möglichkeit, warum die PEN-2-*mH₆* Variante einen Defekt in der γ -Sekretase Aktivität zeigte, war eine mangelhafte Reifung des γ -Sekretasekomplexes durch die Expression der Mutante. Um diesen Sachverhalt und die Wichtigkeit des C-terminus für die PEN-2 Funktion noch genauer zu untersuchen, wurde neben dem *mH₆*-tag am C-terminus auch noch der konservierte 17-Aminosäuren Block (vgl. Abb. 3.7) am C-Terminus deletiert (PEN-2 Δ C).

Zunächst wurde die Reifung von PS1 untersucht. Die Expression von wt-PEN-2 erlaubte, wie bereits beschrieben (Abb. 3.4) eine effiziente Wiederherstellung der PS1 Endoproteolyse mit PS1 Fragmentmengen wie in Kontrollzellen (Sw) (Abb. 3.8). Allerdings zeigten die beiden C-terminalen PEN-2 Mutanten, PEN-2-*mH₆* und PEN-2 Δ C, einen unerwarteten biochemischen Phänotyp (Abb. 3.8).

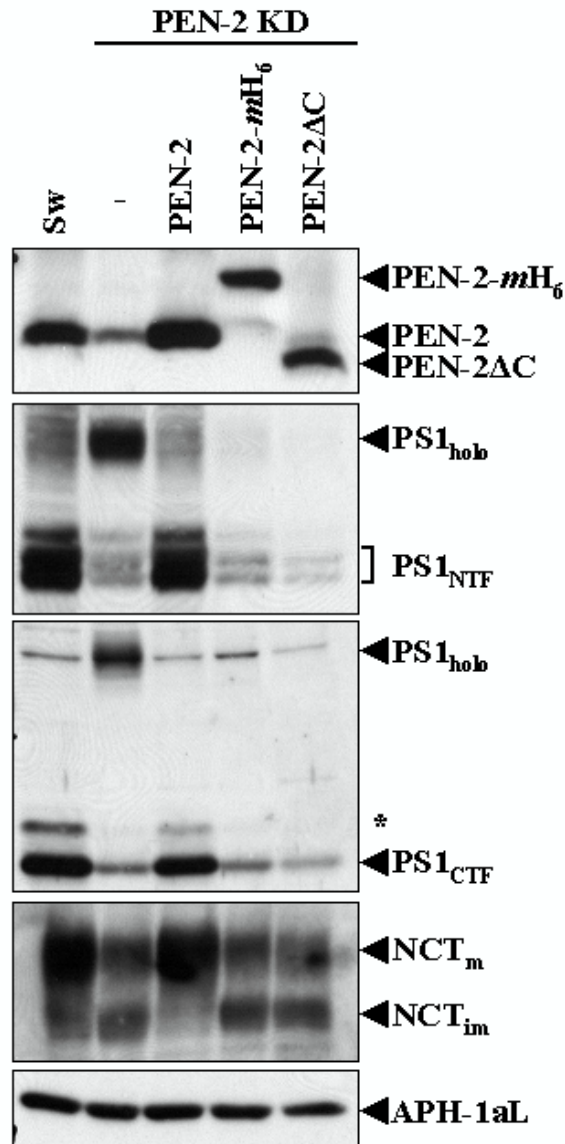


Abbildung 3.8: **Wichtigkeit des PEN-2 C-Terminus für die Reifung der γ -Sekretase.** Membranfraktionen von Kontrollzellen (Sw), PEN-2KD oder PEN-2KD transfiziert mit wt-PEN-2, PEN-2-*mH*₆ und PEN-2ΔC wurden auf PEN-2, NCT, PS1 wie in 3.1 untersucht. Die Detektion von APH-1aL erfolgte mit dem Antikörper 433G. Der Stern kennzeichnet phosphoryliertes PS1-CTF [153].

Es wird zwar, wie bei der Transfektion von wt-PEN-2 die PS1_{holo} Akkumulation aufgehoben, jedoch waren die Mengen an PS1 Fragmenten weiterhin deutlich reduziert, ähnlich wie in PEN-2KD Zellen. Auch die Reifung von NCT, die wie in vorhergehenden Studien beschrieben [137], im PEN-2KD gestört ist, konnte zwar durch Expression von wt-PEN-2 revertiert werden, war aber in den beiden C-terminalen Mutanten defekt. Die Spiegel von APH-1aL (diese Isoform wurde in der vorliegenden

Arbeit stellvertretend untersucht, da für die anderen Isoformen kein spezifischer Antikörper vorhanden war) waren sowohl im PEN-2KD, als auch in den C-terminalen Mutanten nicht wesentlich verändert. Auch im Hinblick auf die γ -Sekretasefunktion zeigte PEN-2 Δ C im Vergleich zu wt-PEN-2 einen funktionellen Defekt (Abb. 3.9).

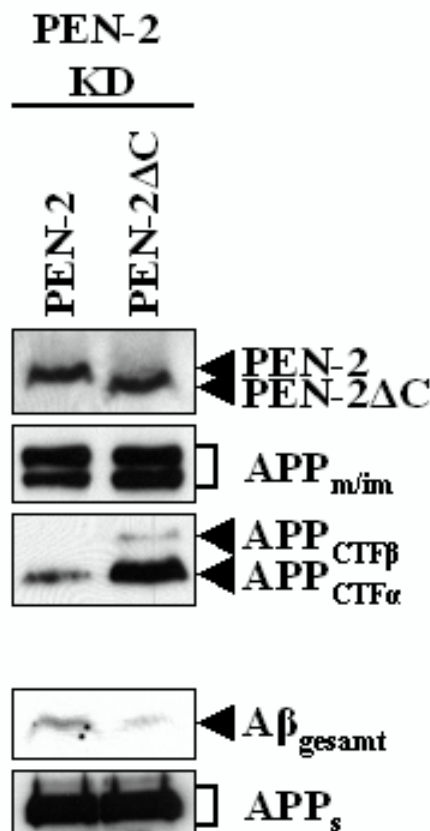


Abbildung 3.9: **Defekte γ -Sekretase in PEN-2 Δ C Zellen.** Membranfraktionen von PEN-2KD transfiziert mit wt-PEN-2 oder PEN-2 Δ C wurden auf PEN-2, APP und APP-CTFs wie in Abb. 3.2 untersucht. Konditioniertes Medium dieser Zellen wurde auf sezerniertes A β -Peptid durch Immunpräzipitation mit Antikörper 3926 und Immunoblot mit Antikörper 6E10 untersucht. APPs wurde direkt aus dem Medium mit Antikörper 6E10 nachgewiesen.

Es zeigte sich bei den PEN-2 Δ C transfizierten Zellen sowohl eine Akkumulation der APP-CTFs, bei unveränderter Reifung von APP (Abb. 3.9, oben), als auch eine Reduktion des sezernierten A β , bei unveränderter Sekretion von APP_s (Abb. 3.9, unten), was den γ -Sekretasedefekt der Mutante deutlich unterstreicht.

3.2.2 Der PEN-2 C-Terminus ist für die Stabilisierung der Presenilin Fragmente wichtig

Um den Defekt der PEN-2 Δ C Mutante genauer zu beschreiben, wurde der biochemische Phänotyp weiter untersucht. Da die γ -Sekretase als hochmolekularer Komplex vorliegt, in dem sich die Komplexpartner gegenseitig stabilisieren [31], wurde die Stabilität der einzelnen Partner in Kinetikexperimenten untersucht, in denen die *de novo* Proteinsynthese mit Cycloheximid inhibiert wurde.

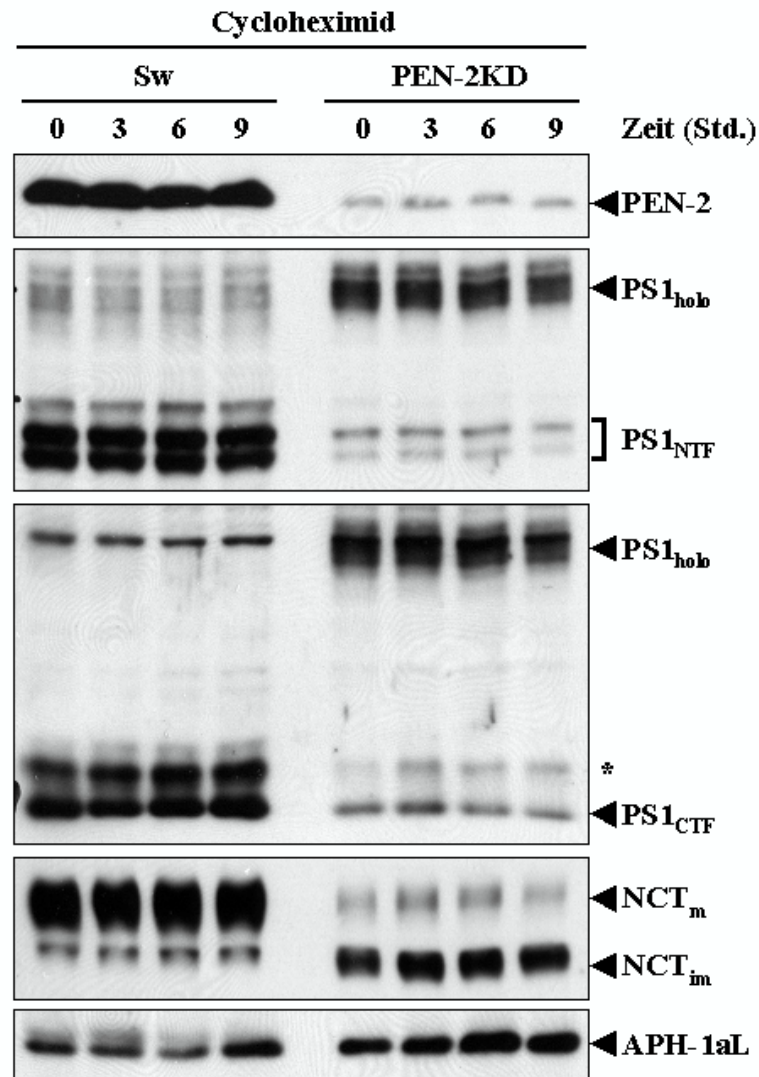


Abbildung 3.10: **Stabilität der Komplexpartner in Kontrollzellen.** Kontrollzellen (Sw) und PEN-2KD wurden für die angegebenen Zeiten mit Cycloheximid (100 μ g/ml) inkubiert. Anschließend wurden Membranfraktionen gewonnen und wie in Abb 3.8 analysiert. Der Stern kennzeichnet phosphoryliertes PS1-CTF [153].

Wie Abb. 3.10 zeigt, waren in Kontrollzellen (Sw) die endogenen Komplexkomponenten PEN-2, PS1-NTF und -CTF, NCT_m und APH-1aL über 9 Stunden stabil. In PEN-2KD Zellen waren PS1_{holo}, APH-1aL und NCT_{im} auch über 9 Stunden stabil, was mit Vorarbeiten übereinstimmte [143]. Der leichte Abfall PS1_{holo} bei 9 Stunden, deutet darauf hin, daß ein geringer Anteil nicht in einem Komplex stabilisiert werden konnte und als freies PS1_{holo} vom Proteasom abgebaut wurde [132]. Die im PEN-2KD zu beobachtenden geringen Mengen an NCT_m, PS1 Fragmenten und PEN-2 entsprechen residualem endogenem γ -Sekretasekomplex, der wegen unvollständigem Knockdown von PEN-2 in diesen Zellen noch vorhanden ist und wie in den Kontrollzellen (Sw) stabilisiert bleibt.

Der Vergleich von wt-PEN-2 mit PEN-2 Δ C im PEN-2KD Hintergrund brachte ein überraschendes Ergebnis.

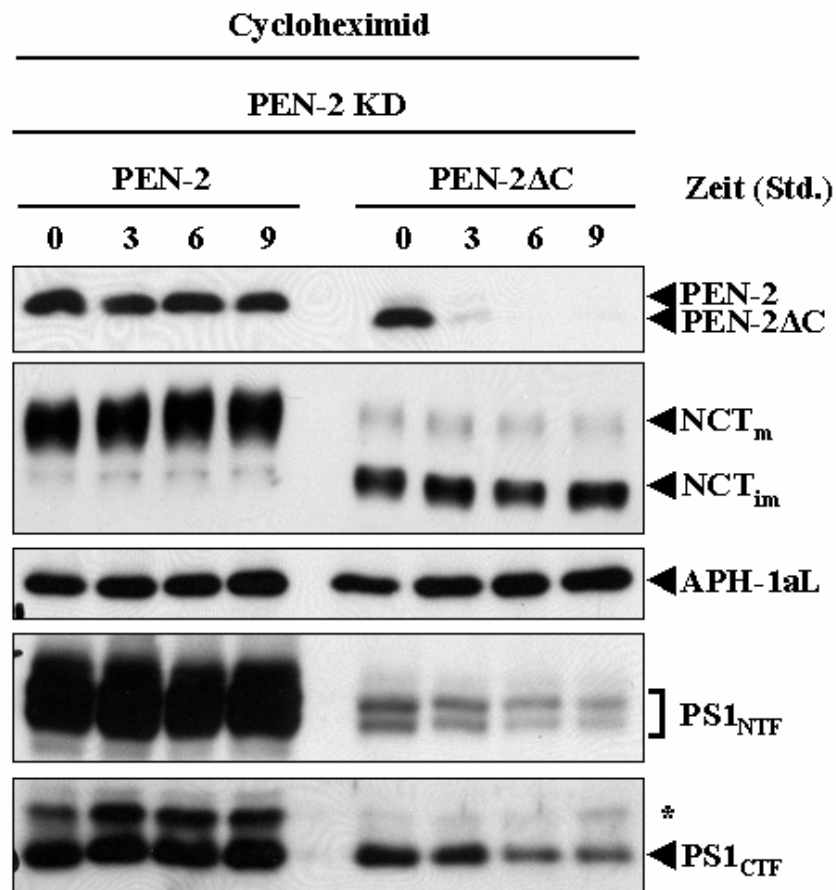


Abbildung 3.11: **Stabilität der Komplexpartner in Gegenwart von PEN-2 Δ C.** PEN-2KD transfiziert mit wt-PEN-2 oder PEN-2 Δ C wurden wie in Abb. 3.10 mit Cycloheximid behandelt und die Membranfraktionen wie in Abb. 3.10 analysiert. Der Stern kennzeichnet phosphoryliertes PS1-CTF [153].

In wt-PEN-2 transfizierten PEN-2KD-Zellen (Abb. 3.11) zeigte sich ein ähnliches Bild wie in Kontrollzellen (Sw). PS1-NTF und -CTF, NCT_m und APH-1aL waren über 9 Stunden stabil. Das überexprimierte wt-PEN-2 zeigte einen leichten Abfall nach drei Stunden, blieb aber danach über den untersuchten Zeitraum stabil. Dies deutet auf eine freie, nicht im Komplex stabilisierte Fraktion von wt-PEN-2 hin, die rasch abgebaut wird, wohingegen die überwiegende Menge an wt-PEN-2, welches einen Komplex integriert wurde, stabil bleibt. Bei PEN-2 Δ C transfizierten Zellen war das PEN-2 Δ C Molekül sehr instabil und schon nach drei Stunden fast vollständig abgebaut. Aber auch die PS1 Fragmente, die in diesen Zellen ohnehin schon stark reduziert sind, wurden destabilisiert und nahmen über 9 Stunden weiter ab. APH-1aL und NCT_{im}, wie auch die geringen Mengen an NCT_m (unvollständiger Knockdown) blieben über den untersuchten Zeitraum stabil, ein Hinweis dafür, daß sich diese beiden Proteine unabhängig von den anderen Komplexpartnern gegenseitig stabilisieren können [50][128][80][96].

PEN-2 Δ C ist also im γ -Sekretase Komplex instabil. Diese Instabilität destabilisiert offenbar selektiv auch PS1-NTF und -CTF, hat aber keinen Einfluss auf die Stabilität von NCT und APH-1aL.

3.2.3 PEN-2 Δ C und die Presenilin Fragmente werden vom Proteasom abgebaut

Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, welche proteolytische Aktivität für den Abbau von PEN-2 Δ C und der PS1 Fragmente verantwortlich ist. Ein aussichtsreicher Kandidat war das Proteasom, das für den Abbau von freiem PS1 verantwortlich ist, welches noch nicht in einen hochmolekularen Komplex integriert wurde [132]. Deshalb wurden die Zellen mit *clasto*-Lactacystin- β -lacton, einem potenten und spezifischen Proteasominhibitor [34], behandelt und biochemisch analysiert (Abb. 3.12).

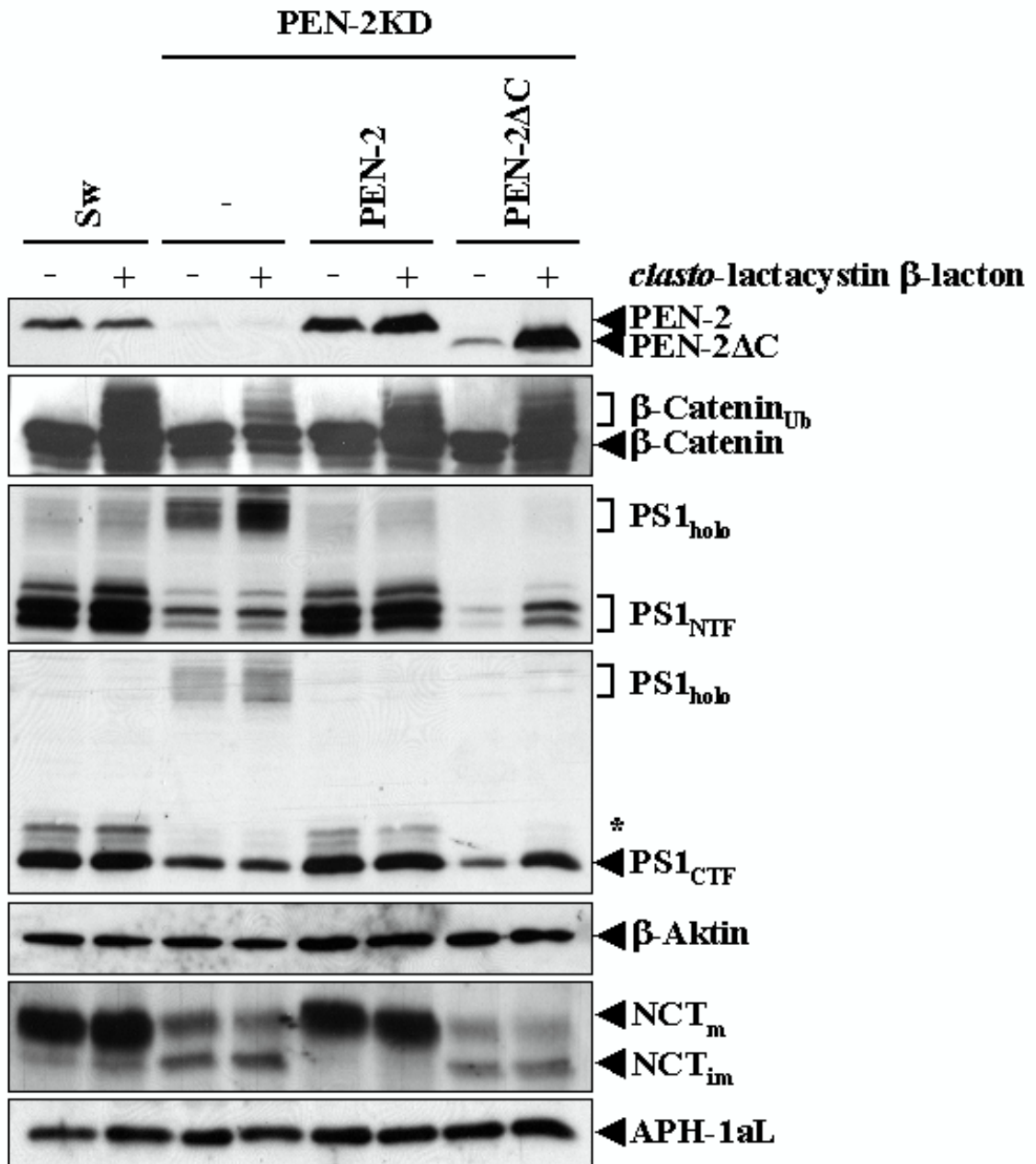


Abbildung 3.12: **Beteiligung des Proteasoms am Abbau von PEN-2ΔC und PS1 Fragmenten.** Kontrollzellen (Sw), PEN-2KD, PEN-2KD transfiziert mit wt-PEN-2 und PEN-2ΔC wurden wie angegeben mit *clasto*-Lactacystin β-lacton inkubiert. Anschließend wurden Membranfraktionen gewonnen und wie in Abb. 3.10 analysiert. Zur Kontrolle der Proteasomhemmung wurde polyubiquitiniertes β-Catenin mit dem anti-β-Catenin Antikörper untersucht. Als unabhängige Kontrolle für den Probenauftrag diente β-Aktin, das mit dem β-Aktin-Antikörper detektiert wurde. Der Stern kennzeichnet phosphoryliertes PS1-CTF [153].

Der Erfolg der Proteasomhemmung wurde durch die Detektion von polyubiquitierten β -Catenin-Spezies nachgewiesen [34][1]. Diese akkumulieren wegen der Hemmung ihres proteasomalen Abbaus in der Zelle und können als "Leiter" im Immunoblot nachgewiesen werden [1]. Weder für endogenes PEN-2 in Kontrollzellen (Sw) oder im PEN-2KD wurde, passend zu ihrem stabilen Verhalten im Cycloheximid-Experiment, ein Anstieg unter Proteasomhemmung beobachtet. Überexprimiertes wt-PEN-2 zeigte im PEN-2KD einen leichten Anstieg, was die Vermutung aus dem Cycloheximidexperiment unterstützt, daß hier ein geringer Anteil als freies, nicht komplexgebundenes Protein vorliegt, welches vom Proteasom abgebaut wird. Das als instabil identifizierte PEN-2 Δ C hingegen zeigte einen sehr starken Anstieg unter *clasto*-Lactacystin- β -lacton-Behandlung, was einen proteasomalen Abbau dieser PEN-2 Variante nahe legt. Auch bei den endogenen PS1 Fragmenten in Kontroll- und PEN-2KD Zellen zeigte sich kein Anstieg unter Proteasom-Hemmung, ebenso blieben die Spiegel auch in wt-"Rescue" Zellen konstant. Der leichte Anstieg von PS1_{holo} in PEN-2KD Zellen deutet auf freies, unkomplexiertes PS1_{holo} in diesen Zellen hin. Wie erwartet war aber in PEN-2 Δ C transfizierten PEN-2KD Zellen ein deutlicher Anstieg der PS1-Fragmente zu beobachten, was nahe legt, daß diese, nachdem sie durch Endoproteolyse entstanden sind, labilisiert werden und auch, wie das instabile PEN-2 Δ C vom Proteasom abgebaut werden. Desweiteren war in PEN-2 Δ C Zellen kein Anstieg von PS1_{holo} zu beobachten. Dies war ein wichtiger Hinweis darauf, daß wirklich die eingeleitete PS1 Endoproteolyse für die fehlende Akkumulation verantwortlich ist und nicht ein einfacher proteasomaler Abbau des PS1_{holo}. Die Spiegel der anderen stabilen Proteine, NCT_m, NCT_{im} und APH-1aL, zeigten in Kontrollzellen (Sw), wie auch in PEN-2 Δ C Zellen, keine Veränderung durch Hemmung des Proteasoms.

PEN-2 Δ C ist also sehr instabil, kann zwar die PS1 Endoproteolyse einleiten, labilisiert dann aber die entstandenen PS1 Fragmente, wodurch beide Proteine über das Proteasom abgebaut werden.

3.2.4 PEN-2 Δ C kann keinen stabilen γ -Sekretasekomplex bilden

Obige Ergebnisse zeigen, daß PEN-2 Δ C sehr instabil ist und deuten darauf hin, daß diese Instabilität durch die Unfähigkeit bedingt ist, einen stabilen γ -Sekretasekomplex auszubilden. Deshalb wurde in der Folge untersucht, ob diese PEN-2 Mutante ihre Fähigkeit verloren hat, stabil mit den anderen Komplexkomponenten zu interagieren. Hierzu wurden in CHAPSO solubilisierte Membranfraktionen von PEN-2KD Zellen, die stabil mit wt-PEN-2 oder PEN-2 Δ C transfiziert worden waren, einer Co-Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen NCT und PS1-NTF unterzogen (Abb 3.13).

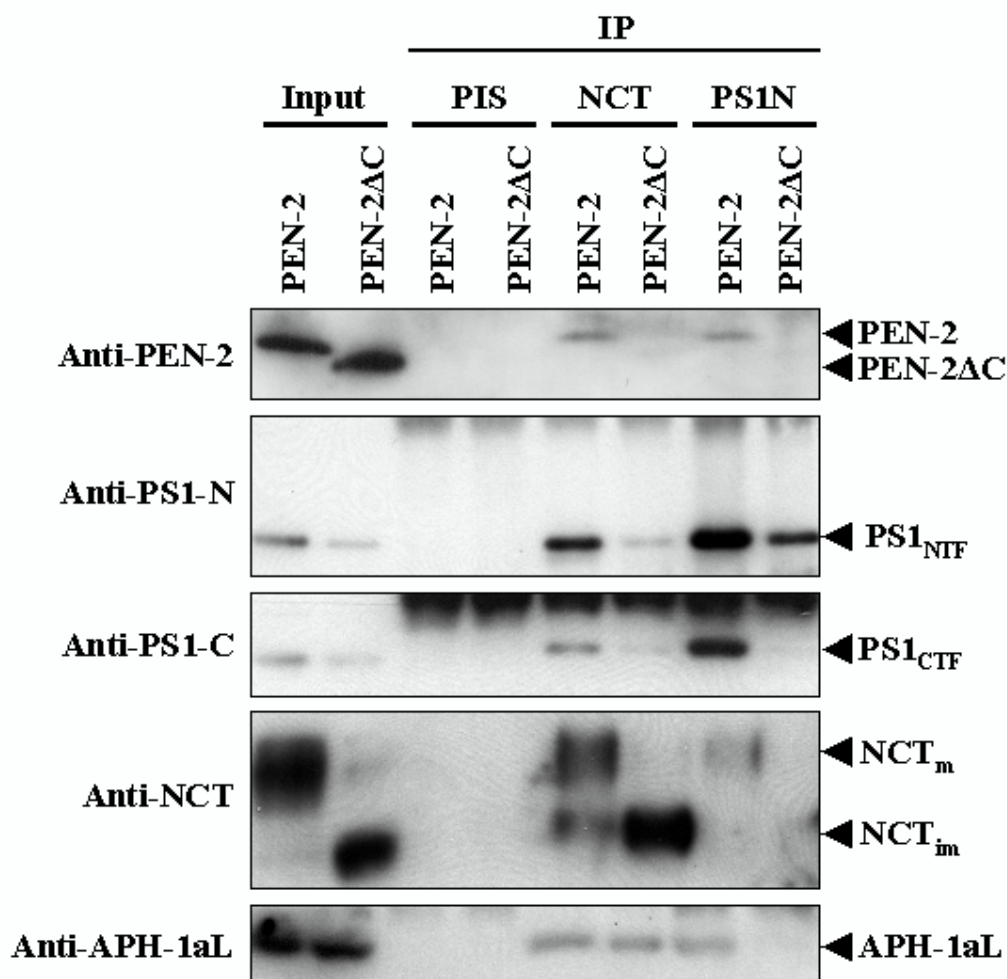


Abbildung 3.13: **PEN-2 Δ C kann keinen stabilen γ -Sekretasekomplex bilden.** CHAPSO-Membranlysate von PEN-2KD transfiziert mit wt-PEN-2 oder PEN-2 Δ C wurden durch Co-Immunpräzipitation mit den Antikörpern N1660 (gegen NCT) und 2953 (gegen den PS1 N-Terminus) und anschließenden Westernblot wie in 3.8 auf Komplexbildung untersucht. Der "Input" repräsentiert 25% des eingesetzten Materials.

In wt-PEN-2 transfizierten PEN-2KD Zellen konnten sowohl mit dem anti-NCT, als auch mit dem anti-PS1N Antikörper, wt-PEN-2, APH-1aL, NCT_m und PS1-NTF und -CTF co-immunpräzipitiert werden. In PEN-2ΔC Zellen konnten weder mit dem anti-NCT, noch mit dem anti-PS1N Antikörper signifikante Mengen an PEN-2ΔC co-immunpräzipitiert werden, was nahe legt, daß dieses Protein keinen stabilen Komplex mit den anderen Komplexkomponenten ausbilden kann. Allerdings konnte mit dem anti-NCT Antikörper in PEN-2ΔC transfizierten Zellen APH-1aL zusammen mit NCT_{im} co-immunpräzipitiert werden, was auf deren gegenseitige Stabilisierung, unabhängig von den anderen Komplexkomponenten hindeutet [50][128][80][96]. Mit dem anti-PS1N Antikörper (gegen ein Eptiop am PS1 N-Terminus (As 2-81) gerichtet, siehe Tabelle 2.6, S.36) konnte in PEN-2ΔC Zellen präferrentiell freies, labiles PS1-NTF präzipitiert werden, welches an keine der anderen Komplexkomponenten (auch nicht PS1-CTF) gebunden war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß der C-terminus von PEN-2 für die Stabilisierung von PEN-2 selbst und der PS1 Fragmente im γ -Sekretasekomplex wichtig ist. Allerdings ist der C-terminus nicht für die Endoproteolyse von PS1_{holo} notwendig, die auch noch in PEN-2ΔC Zellen stattfinden kann. Nach der PS1 Endoproteolyse wird der C-Terminus allerdings benötigt um die entstandenen PS1 Fragmente im Komplex zu stabilisieren.

3.2.5 PEN-2 ist auch in Abwesenheit der Presenilin Endoproteolyse für die Reifung und Aktivität des γ -Sekretasekomplexes wichtig

Obige Ergebnisse und die Beobachtungen anderer Gruppen [88][143][80] legen nahe, daß PEN-2 für die Endoproteolyse von PS1_{holo} notwendig ist. Allerdings können, wie oben beschrieben, C-terminale PEN-2 Mutanten die PS1 Endoproteolyse einleiten, aber die entstandenen PS1 Fragmente nicht mehr stabilisieren. Zusätzlich wurde gezeigt, daß PEN-2 auch nach der Endoproteolyse an den γ -Sekretasekomplex gebunden bleibt [137][143][73][68], was eine weitere Funktion, unabhängig von der PS1 Endoproteolyse im γ -Sekretasekomplex nahe legt. Um diesen Sachverhalt direkt zu untersuchen, wurde PEN-2 in SwAPP/PS1 ΔExon9 Zellen, einer FAD assoziierten

Mutante [107], die zwar einen aktiven γ -Sekretasekomplex ausbilden kann, aber wegen der Deletion der internen Schnittstelle keine endoproteolytische Spaltung erfährt [147][135], mittels RNAi-Knockdown herunterreguliert.

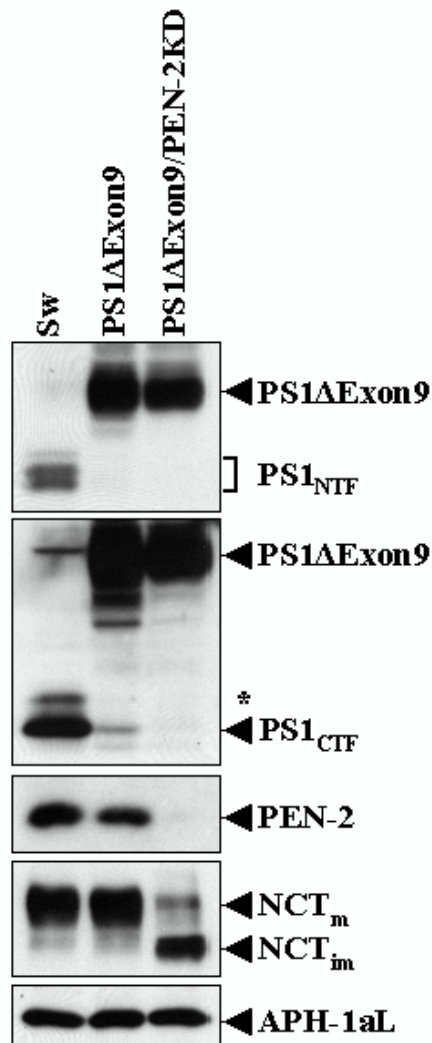


Abbildung 3.14: **PEN-2 ist generell für die Reifung des γ -Sekretasekomplexes notwendig.** Membranfraktionen von Kontrollzellen (Sw), SwAPP/PS1 Δ Exon9 und SwAPP/PS1 Δ Exon9-PEN-2 KD wurden wie in Abb. 3.4 analysiert.

Abb. 3.14 zeigt, daß auch in SwAPP/PS1 Δ Exon9, der Knockdown von PEN-2 mit einer gestörten Reifung von NCT verknüpft ist, wohingegen die Spiegel von APH-1aL weitgehend unverändert bleiben. Die PS1 Δ Exon9 Mutante liegt als ungespaltenes Vollängenprotein vor, die endogenen PS1 Fragmente werden durch die Überexpression der Mutante verdrängt („Replacement-Phänomen“, [148]).

Auch auf Ebene der γ -Sekretaseaktivität zeigte sich, abzulesen an einer Akkumulation der APP-CTFs in den PS1 Δ Exon9/PEN-2KD Zellen ein Defekt (Abb. 3.15).

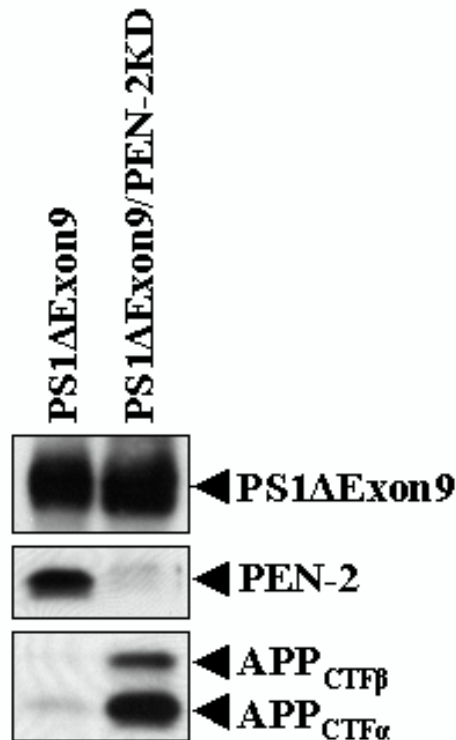


Abbildung 3.15: **PEN-2 ist generell für die Aktivität des γ -Sekretasekomplexes notwendig.** Membranfraktionen von SwAPP/PS1 Δ Exon9 und SwAPP/PS1 Δ Exon9-PEN-2 KD wurden auf Expression von PEN-2 mit Antikörper 1638, auf Expression von PS1 Δ Exon9 mit Antikörper PS1N und auf APP-CTFs mit Antikörper 6687 untersucht.

Diese Ergebnisse zeigen, daß PEN-2 auch in Abwesenheit der PS Endoproteolyse für die Reifung des γ -Sekretasekomplexes wichtig ist. Sie schlagen eine weitreichende Bedeutung von PEN-2 bei der Reifung des γ -Sekretasekomplexes vor, die unabhängig von der Funktion bei der Einleitung der PS1 Endoproteolyse ist. Zusätzlich ist PEN-2 auch in Abwesenheit der PS Endoproteolyse von entscheidender Wichtigkeit für die Aktivität der γ -Sekretase.

3.3 Länge und gesamter Sequenzkontext des PEN-2 C-Terminus sind für eine geregelte Funktion wichtig

Nachdem gezeigt werden konnte, daß der PEN-2 C-Terminus entscheidend für die Funktion dieses Proteins im γ -Sekretasekomplex ist (siehe oben und [108]), sollte nun genauer untersucht werden, worin die Bedeutung des PEN-2 C-Terminus liegt. Bei einer Datenbanksuche konnten keine Protein-Protein Interaktions-Motive gefunden werden, der PEN-2 C-Terminus enthält aber, wie Abb. 3.16 (oben) zeigt, mehrere hochkonservierte As, vor allem Aspartat an Pos. 90 (D90), Phenylalanin an Pos. 94 (F94), Prolin an Pos. 97 (P97) und Glycin an Pos. 99 (G99). Deshalb wurden in der Folge mehrerer Deletionskonstrukte und As-Austausche erzeugt (vgl. Abb 3.16 unten), um die Funktion dieser konservierten As bzw. Sequenzblöcke genauer zu untersuchen.

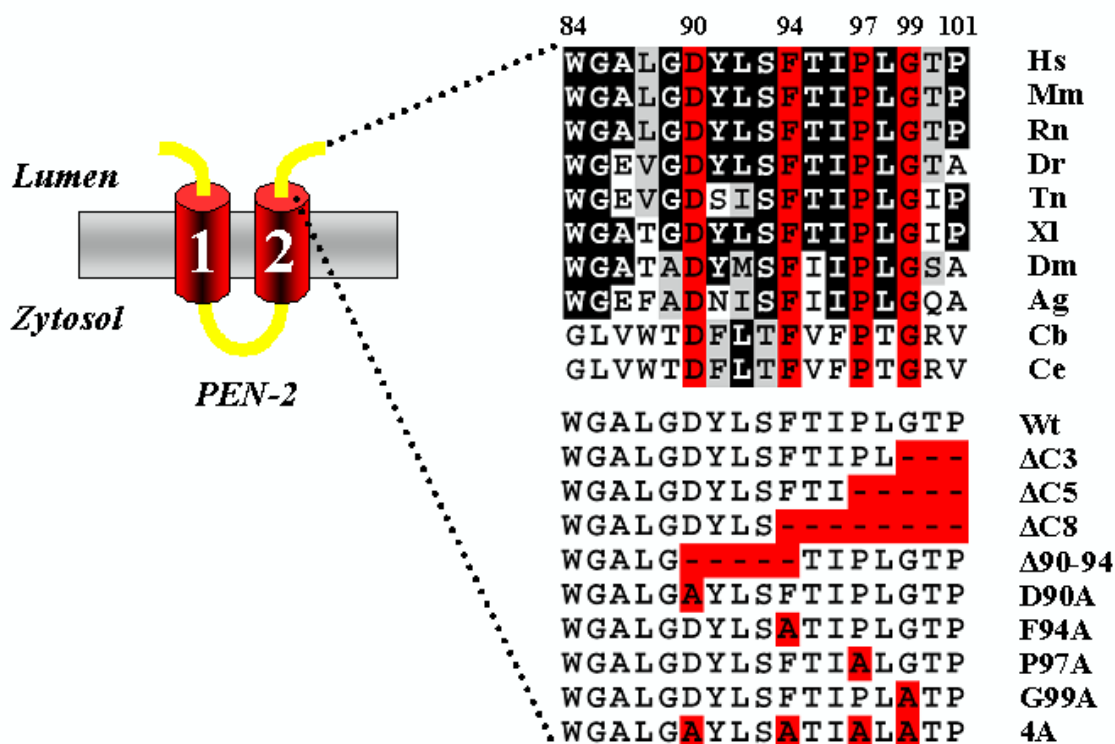


Abbildung 3.16: Sequenzvergleich des PEN-2 C-Terminus verschiedener Spezies. Hochkonservierte As sind rot gekennzeichnet. Der untere Teil der Abbildung zeigt PEN-2 Mutanten, die analysiert wurden. Veränderungen zur wt-Sequenz sind rot hervorgehoben. Siehe auch Einbuchstabenkode für As im Anhang, S. 104. Abkürzungen der Organismen: Hs (*Homo sapiens*), Mm (*Mus musculus*), Rn (*Rattus norvegicus*), Dr (*Danio rerio*), Tn (*Tetraodon nigroviridis*), Xl (*Xenopus laevis*), Dm (*Drosophila melanogaster*), Ag (*Anopheles gambiae*), Cb (*Caenorhabditis briggsae*) und Ce (*Caenorhabditis elegans*).

3.3.1 Die Länge des PEN-2 C-Terminus ist für die PEN-2 Funktion wichtig

Da die Vorergebnisse mit H₆X-PEN-2, PEN-2-*mH₆* und der Deletion (PEN-2ΔC) schon starke Hinweise lieferten, daß die Länge des C-Terminus entscheidend für die PEN-2 Funktion sein könnte, wurde zunächst dieser Aspekt genauer untersucht (Abb. 3.17).

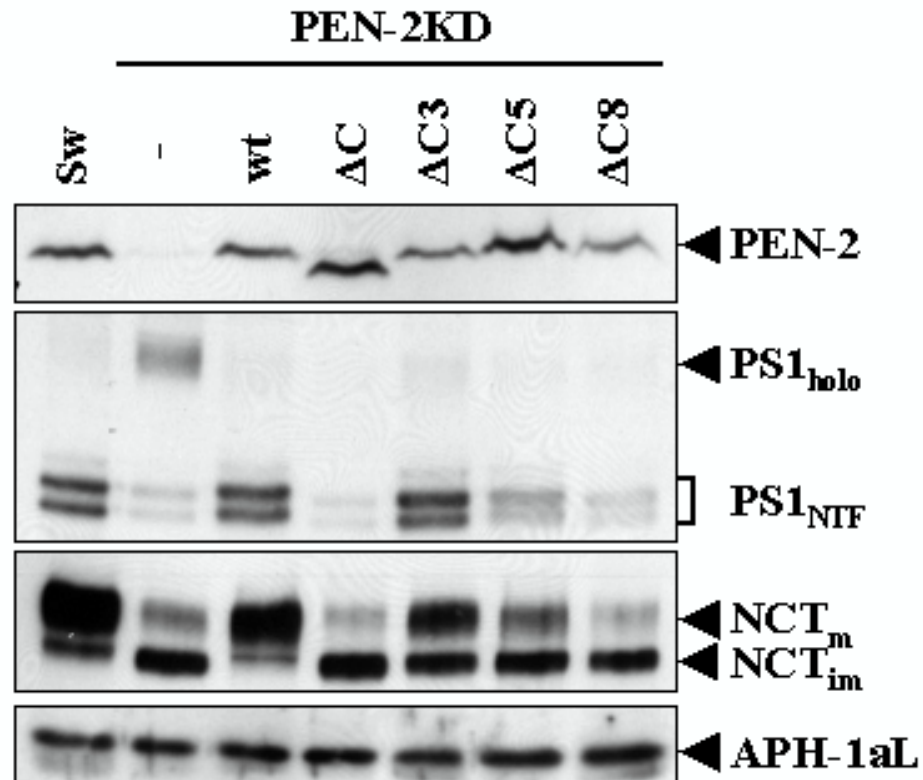


Abbildung 3.17: **Schrittweise Verkürzung des C-Terminus führt zu graduelltem Funktionsverlust.** Membranfraktionen von Kontrollzellen (Sw), PEN-2KD und PEN-2KD transfiziert mit wt-PEN-2, PEN-2ΔC, PEN-2Δ3, PEN-2Δ5 und PEN-2Δ8 wurden auf PEN-2 mit Antikörper 1638, auf NCT mit Antikörper N1660, auf PS1_{holo} und -NTF mit Antikörper PS1N und auf APH-1aL mit Antikörper 433G analysiert.

Während die Deletion der letzten drei As (PEN-2Δ3) noch eine Rettung der PS1 Endoproteolyse, mit annähernd wt-PEN-2 ähnlichen Mengen an PS1 Fragmenten, und eine deutliche NCT Reifung erlaubte, sind diese beiden Aspekte der PEN-2 Funktion bei der PEN-2Δ5 Mutante schon deutlich eingeschränkt. Der Phänotyp der PEN-2Δ8 Mutante war schließlich nicht mehr von dem der PEN-2ΔC Mutante zu unterscheiden, die beide zwar den Endoproteolyse-Defekt des PEN-2KD retten, aber die PS1 Fragmente nicht stabilisieren und auch die NCT Reifung nicht ein-

leiten konnten. Dies zeigt, daß die progressive Verkürzung des PEN-2 C-Terminus mit einem schrittweisen Verlust der Funktion verbunden ist. Den gleichen Funktionsverlust zeigte die PEN-2 Δ 90-94 Mutante (Abb. 3.18), bei der der konservierte Sequenzblock von D90 bis F94 [56] deletiert wurde, die endständigen As aber intakt belassen wurden. Auch die bereits vorher beschriebene PEN-2-*mH₆* Variante, bei der die Länge des C-terminus durch den tag in etwa verdoppelt wurde, konnte den Defekt des PEN-2KD nicht revertieren.

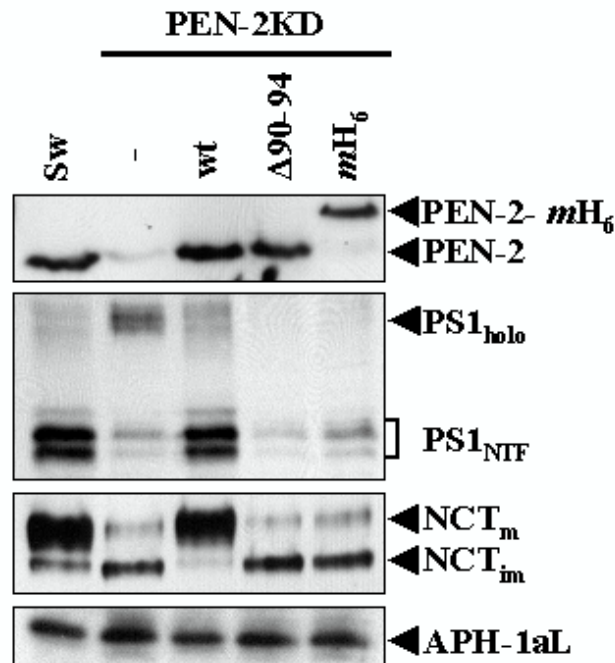


Abbildung 3.18: **Die Länge des PEN-2 C-Terminus ist für die PEN-2 Funktion wichtig.** Membranfraktionen von Kontrollzellen (Sw), PEN-2KD und PEN-2KD transfiziert mit wt-PEN-2, PEN-2 Δ 90-94 und PEN-2-*mH₆* wurden wie in Abb 3.17 analysiert.

Dies bedeutet, daß die Veränderung der Länge des PEN-2 C-Terminus durch progressive Verkürzung oder interne Deletion, sowie die Verlängerung durch Anhängen eines Epitop-tag die PEN-2 Funktion stören.

3.3.2 Der Gesamtsequenzkontext des C-Terminus ist für die PEN-2 Funktion wichtig

Die Effekte dieser progressiven Verkürzung können aber auch darauf beruhen, daß hierbei schrittweise die hochkonservierten As G99, P97 und F94 entfernt wurden (vgl

Abb. 3.16). Um diesen Aspekt genauer zu beleuchten wurden die am stärksten konservierten As des PEN-2 C-terminus (vgl. Abb 3.16) zu Alanin (A) mutiert (D90→A (D90A), F94→A (F94A), P97→A (P97A) und G99→A (G99A)). Zusätzlich wurde auch noch eine korrespondierende D90/F94/P97/G99→A, Vierfach-Alanin-Mutante (4A) untersucht.

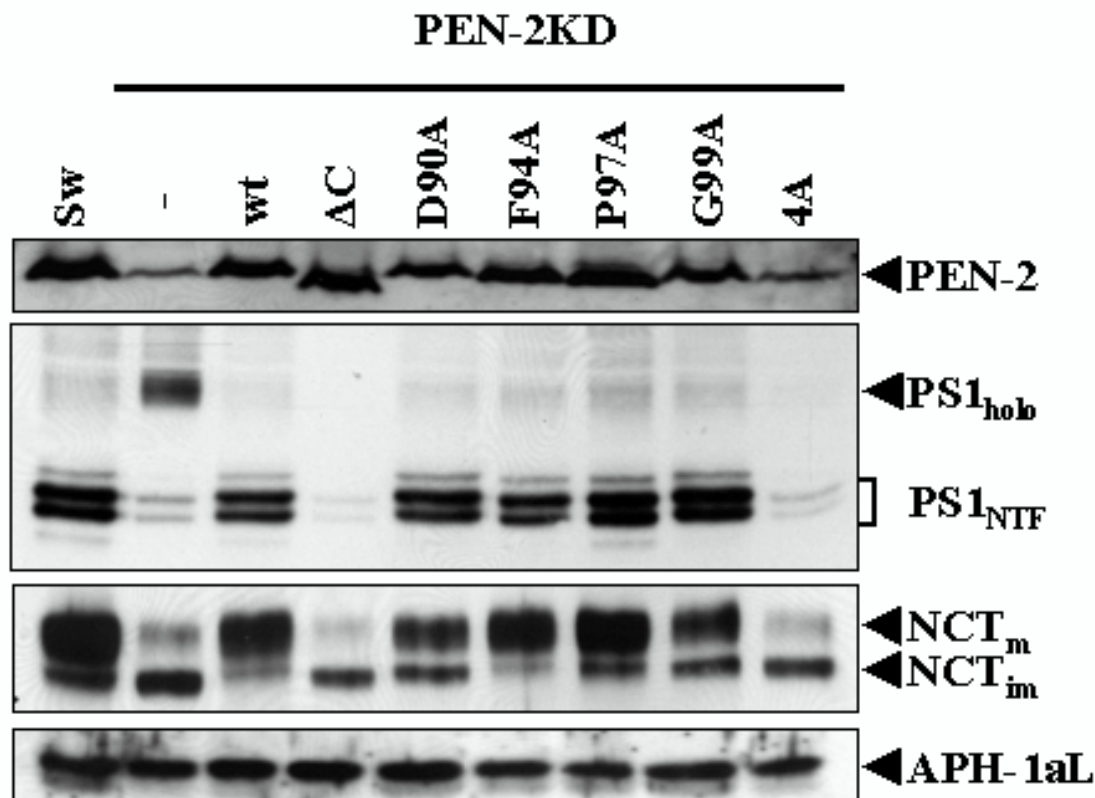


Abbildung 3.19: **Der Gesamtsequenzkontext ist für die Funktion des PEN-2 C-Terminus wichtig.** Membranfraktionen von Kontrollzellen (Sw), PEN-2KD, PEN-2KD transfiziert mit PEN-2 Δ C, PEN-2D90A, PEN-2F94A, PEN-2P97A, PEN-2G99A und PEN-24A wurden wie in Abb. 3.17 analysiert.

Die Punktmutation der einzelnen konservierten As (D90A, F94A, P97A und G99A) erlaubte eine Reversion wie wt-PEN-2 (Abb. 3.19), gemessen an der Rückkehr der PS1 Fragmente. Auch die Reifung von NCT konnte, trotz unterschiedlicher Mengen an NCT_{im}, gemessen an einer deutlichen Umkehr des Verhältnisses von NCT_{im} und NCT_m zugunsten der reifen Variante, wiederhergestellt werden. Allerdings führte die gemeinsame Mutation aller vier konservierten As zu Alanin (4A Mutante) zu einem Phänotyp der nicht von der Δ C Mutante zu unterscheiden war.

Es werden also einzelne Mutationen der konservierten As zu Alanin toleriert, eine zu starke Änderung im Gesamtkontext dieses konservierten C-terminalen Sequenzblocks, wie bei der 4A Mutante, führt dagegen zu einem Verlust der Funktion.

3.3.3 Gestörte γ -Sekretasekomplex Bildung der C-terminalen PEN-2 Mutanten

Um den Effekt der C-terminalen PEN-2 Mutanten, die alle denselben Funktionsverlust zeigen, noch genauer zu analysieren wurden die jeweils stärksten Mutanten (ΔC , $\Delta 8$, $\Delta 90-94$ und 4A) auf die Fähigkeit hin untersucht, einen stabilen Komplex mit den anderen γ -Sekretasekomponenten zu bilden.

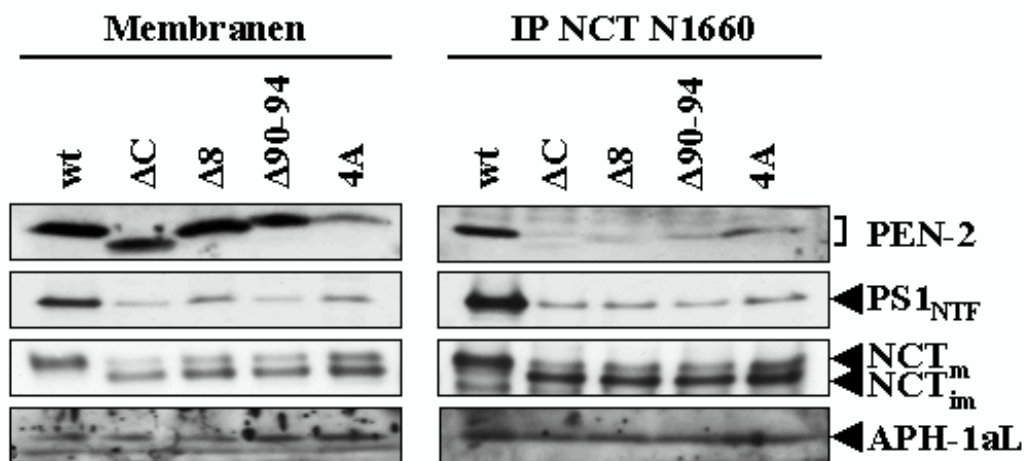


Abbildung 3.20: **C-terminale PEN-2 Mutanten können keinen γ -Sekretasekomplex bilden.** Membranfraktionen von PEN-2KD und PEN-2KD transfiziert mit PEN-2 ΔC , PEN-2 $\Delta 8$, PEN-2 $\Delta 90-94$ und PEN-24A wurden wie in Abb 3.16 analysiert. Co-Immunpräzipitationen mit dem NCT N1660 Antikörper aus diesen Membranfraktionen wurden ebenfalls wie in Abb 3.16 analysiert.

Membranfraktionen der untersuchten starken Mutanten zeigen alle einen ähnlichen Phänotyp wie PEN-2 ΔC (Abb. 3.20 linker Teil). Während in wt PEN-2 Zellen robuste Mengen an PS1 Fragmenten (hier PS1-NTF), vor allem NCT_m und APH-1aL vorliegen, sind in den analysierten C-terminalen Mutanten die Spiegel von PS1 Fragmenten deutlich reduziert. Auch die Reifung von NCT ist hier gestört (es liegt vor allem NCT_{im} vor), wohingegen die APH-1aL Spiegel weitgehend unbeeinflusst bleiben. Die in diesem Experiment etwas größeren Mengen an APH-1aL in PEN-2 $\Delta 90-94$ und PEN-24A (Abb. 3.20 linker Teil), sind sehr wahrscheinlich funktionell

unbedeutend, da mit einem anti-NCT Antikörper aus allen untersuchten Zelllinien gleiche Mengen an komplexgebundenem APH-1aL co-immunpräzipitiert werden konnten (Abb. 3.20 rechter Teil). Mit dem anti-NCT Antikörper konnten aus diesen CHAPSO-Membranlysaten (Abb. 3.20 rechter Teil) zwar robuste Mengen an wt-PEN-2 isoliert werden, wie in Vorergebnissen (siehe oben und [108]) bereits beschrieben, allerdings nur sehr geringe Mengen an PEN-2 Δ C. Ebenso konnten von den anderen analysierten C-terminalen Mutanten nur sehr geringe Mengen präzipitiert werden (die etwas bessere Präzipitation der 4A Mutante spricht für schwache residuale Bindungseigenschaften). Verglichen mit wt-Zellen konnten in den Mutanten nur geringe Mengen an PS1-NTF und vor allem NCT_{im} co-immunpräzipitiert werden, wohingegen aus allen Zelllinien gleiche Mengen von APH-1aL co-isoliert werden konnten. Alle untersuchten C-terminalen Mutanten verhielten sich also erneut so, wie die prototypische PEN-2 Δ C Mutante.

3.3.4 Länge und Sequenz des PEN-2 C-Terminus sind für die Stabilisierung der PS1 Fragmente wichtig

Da die C-terminalen PEN-2 Mutanten keinen stabilen γ -Sekretasekomplex ausbilden können, war nach den Ergebnissen von eigenen Vorarbeiten mit PEN-2 Δ C [108] und den Ergebnissen anderer Gruppen [56] anzunehmen, daß alle den gleichen Effekt auf die Stabilität von PEN-2 und in der Folge auch auf die Stabilität der PS1 Fragmente haben.

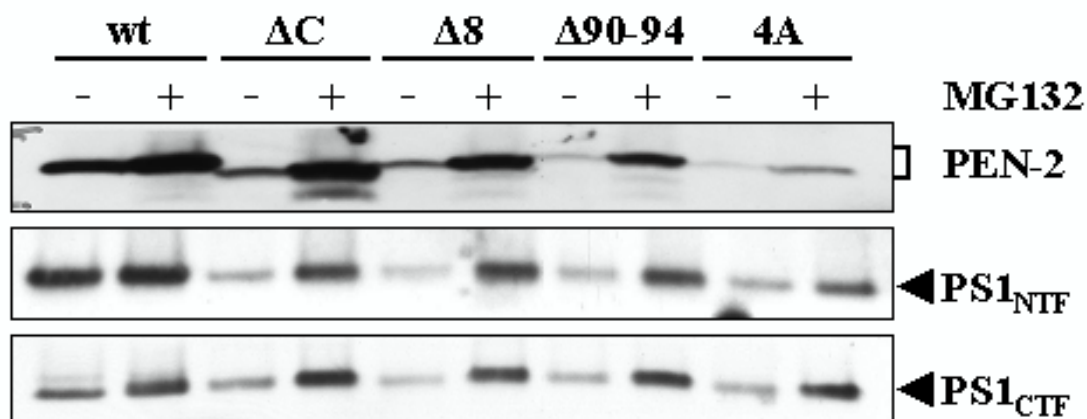


Abbildung 3.21: **Abbau der PEN-2 Mutanten und der PS1 Fragmente durch das Proteasom.** PEN-2KD Zellen und PEN-2KD transfiziert mit PEN-2 Δ C, PEN-2 Δ 8, PEN-2 Δ 90-94 und PEN-24A wurden für 12 Stunden mit MG-132 (+) oder DMSO (-) behandelt und Membranfraktionen anschließend auf PEN-2 und PS1 Fragmente wie in Abb. 3.4 analysiert

Behandlung von wt-Zellen mit Proteasominhibitor (MG-132, [113], hier und in der Folge aus Kostengründen an Stelle von *clasto*-Lactacystin- β -lacton eingesetzt) zeigte keinen Effekt PS1 Fragmente und einen geringen Effekt auf PEN-2 (Abb. 3.21, freier Anteil von wt-PEN-2 vgl. Abb. 3.12). In den Zellen mit C-terminalen PEN-2 Mutanten akkumulierte das PEN-2 Molekül deutlich unter Proteasomhemmung. Ebenso akkumulierten die PS1 Fragmente, was in Verbindung mit Vorarbeiten [108] nahe legt, daß alle C-terminalen Mutanten instabil sind und deshalb über das Proteasom abgebaut werden. Deren Instabilität labilisiert in der Folge auch die PS1 Fragmente, welche ebenfalls durch das Proteasom abgebaut werden. Die Instabilität wird durch die mangelnde Fähigkeit einen stabilen γ -Sekretasekomplex zu bilden bedingt (Abb 3.20 und [108]). Allerdings lassen sich die PS1 Fragmente und PEN-2 Mutanten durch Hemmung ihres proteasomalen Abbaus stabilisieren.

3.3.5 PEN-2 Mutanten und Presenilin Fragmente bilden einen instabilen γ -Sekretasekomplex

Die Tatsache, daß die C-terminalen PEN-2 Mutanten die PS1 Endoproteolyse einleiten können, legt eine zumindest transiente Interaktion zwischen PEN-2 und PS1 nahe. Deshalb wurde zusätzlich untersucht, ob die instabilen PEN-2 Mutanten und PS1 Fragmente nach Hemmung ihres proteasomalen Abbaus co-isoliert werden können.

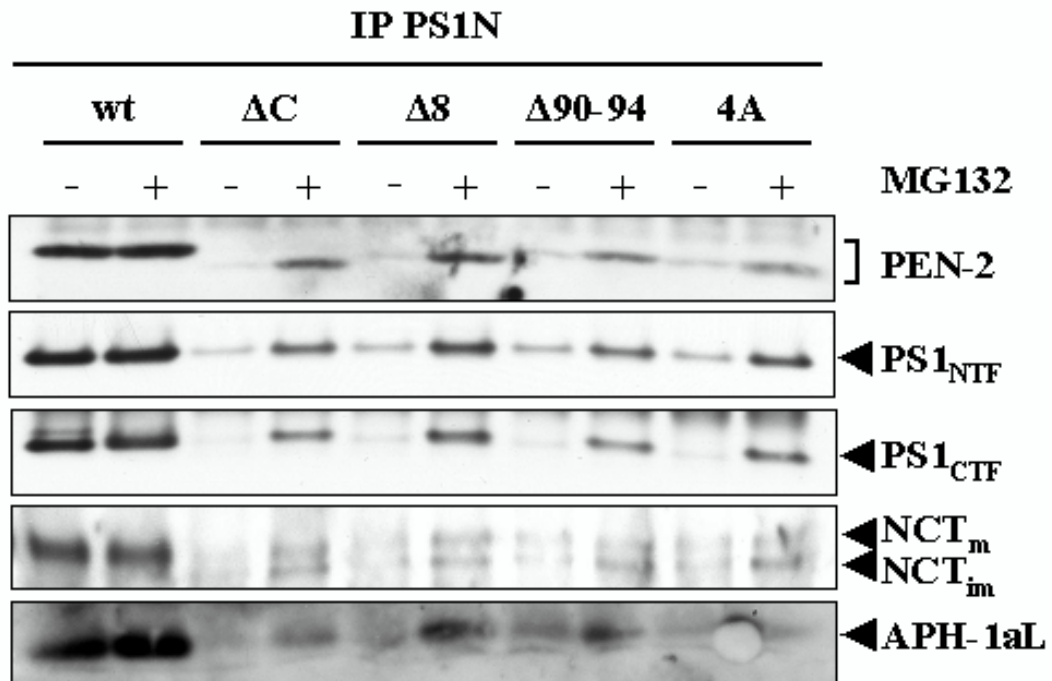


Abbildung 3.22: **Interaktion von PEN-2 Mutanten und PS1 Fragmenten unter Proteasomhemmung.** PEN-2KD Zellen und PEN-2KD transfiziert mit PEN-2 ΔC , PEN-2 $\Delta 8$, PEN-2 $\Delta 90-94$ und PEN-24A wurden für 12 Stunden mit MG-132 oder DMSO behandelt. Co-Immunpräzipitationen der entsprechenden Membranfraktionen wurden wie in Abb.3.19 analysiert.

Tatsächlich konnten unter Bedingungen, die ihren Abbau verhindern die instabilen PEN-2 Mutanten, durch Co-immunpräzipitation mit einem anti-PS1N Antikörper, in einem Komplex mit PS1 Fragmenten isoliert werden (Abb. 3.22). Dieser Komplex enthielt zusätzlich noch geringe Mengen an NCT (vor allem NCT_{im}) und APH-1aL. Es handelt sich also um einen Komplex aus allen vier essentiellen γ -Sekretasekomponenten, in dem das PS1 bereits in Fragmente gespalten vorliegt, der jedoch noch nicht vollständig gereift (NCT liegt immer noch als NCT_{im} vor) und

instabil ist. Dieser prämaturre Komplex kann unter Bedingungen, die seinen proteasomalen Abbau verhindern in geringen Mengen co-isoliert werden.

3.3.6 Prämaturre γ -Sekretasekomplexe sind noch nicht aktiv

Es stellte sich die Frage ob dieser prämaturre Komplex schon γ -Sekretaseaktivität besitzt. Um dies zu klären, wurde ein *in vitro* γ -Sekretaseaktivitätstest [38][16] (vgl. Abb. 3.23) eingesetzt.

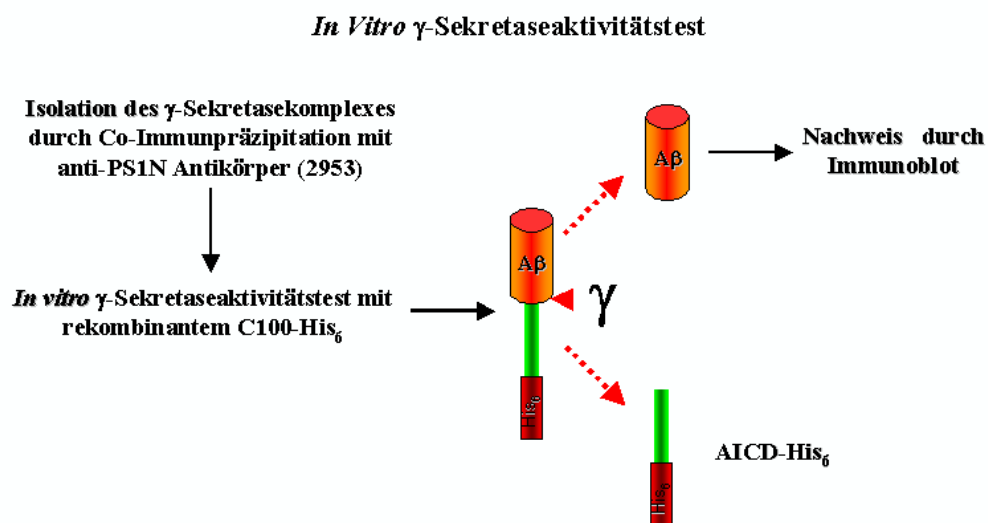


Abbildung 3.23: *In vitro* γ -Sekretaseaktivitätstest nach Co-Immupräzipitation

Durch Co-Immupräzipitation mit einem anti-PS1N Antikörper wurde aus PEN-2KD Zellen, transfiziert mit wt-PEN-2 oder PEN-2 Δ C, die mit MG-132 oder DMSO behandelt worden waren, der γ -Sekretasekomplex isoliert und als Ausgangsmaterial in den *in vitro* γ -Sekretaseaktivitätstest (Abb. 3.23) eingesetzt. So konnte die γ -Sekretaseaktivität der isolierten Komplexe analysiert werden.

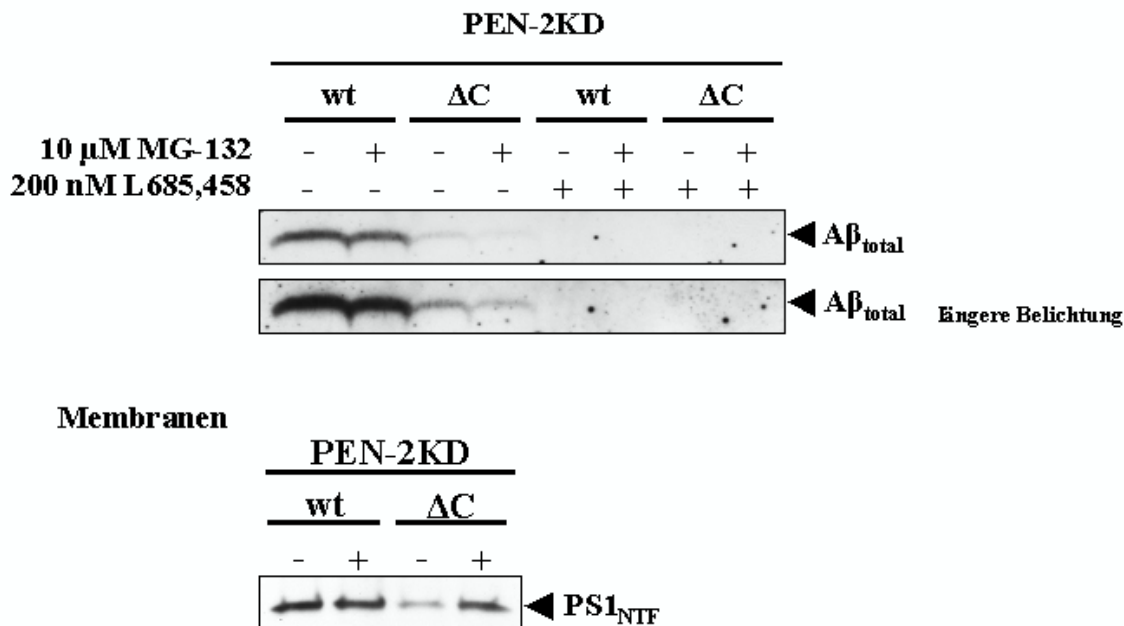


Abbildung 3.24: **Stabilisierter prämatuurer Komplex ist nicht aktiv.** Co-Immunpräzipitate (mit dem anti-PS1N-Antikörper 2953) von PEN-2KD Zellen, transfiziert mit wt-PEN-2 oder PEN-2 ΔC , die mit MG-132 (+) oder DMSO (-) behandelt worden waren, wurden als Ausgangsmaterial in den *in vitro* γ -Sekretaseaktivitätstest (Abb. 3.23) eingesetzt und die Produktion von $A\beta$ wie in Abb. 3.9 untersucht. Die Abhängigkeit der $A\beta$ -Produktion von der γ -Sekretase wurde durch Zugabe von L685,458 überprüft. Zur Kontrolle des Effektes der Proteasomhemmung wurden die eingesetzten Membranfraktionen auf PS1-NTF untersucht.

Im Immunoblot von Membranfraktionen der behandelten Zellen (Abb. 3.24) ist zu sehen, daß die Proteasomhemmung, wie bereits beschrieben, keinen Einfluß auf die PS1-NTF Mengen in wt-Zellen hatte, in ΔC -Zellen allerdings zu einem deutlichen Anstieg an PS1 Fragmenten führte. In wt-Zellen konnte durch Co-Immunpräzipitation mit anti-PS1N Antikörper ein γ -Sekretasekomplex isoliert werden, der im *in vitro* Aktivitätstest eine robuste Produktion von $A\beta$ erlaubte. Die Hemmung des Proteasoms hatte darauf keinen Einfluß, da in diesen Zellen die Komplexkomponenten stabil miteinander interagieren können (vgl. Abb.3.22). Aus PEN-2KD Zellen, die mit PEN-2 ΔC transfiziert worden waren, konnte unter Kontrollbedingungen nur eine geringe residuale γ -Sekretaseaktivität isoliert werden (vgl. Abb. 3.9). Zwar können in diesen Zellen durch Proteasomhemmung geringe Mengen eines prämatuuren γ -Sekretasekomplexes stabilisiert und isoliert werden (vgl. Abb. 3.22 und 3.24, unten). Diese haben allerdings noch keine γ -Sekretaseaktivität, da die geringe residuale $A\beta$ -Produktion in den Zellen mit der PEN-2 ΔC Mutante durch Hemmung des Proteasoms nicht steigerbar war. Die Abhängigkeit der, im *in vitro* Aktivitätstest ge-

messenen A β -Produktion von der γ -Sekretase wurde durch Zugabe des γ -Sekretase Inhibitors L685,458 [124] überprüft. Nach Zugabe von L685,458 war keinerlei A β -Produktion mehr nachweisbar (Abb. 3.24, oben, rechter Teil).

Dieses Ergebnis zeigt, daß der unter Proteasomhemmung isolierbare prämaturre, vollständige PEN-2 Δ C Komplex noch keine γ -Sekretaseaktivität aufweist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, das die analysierten C-terminalen PEN-2 Mutanten alle mit PS_{holo} interagieren und die Endoproteolyse einleiten können. Der resultierende Komplex ist aber instabil und PEN-2 Δ C und die entstandenen PS1 Fragmente werden durch das Proteasom abgebaut, wohingegen NCT und APH-1aL weiterhin als dimerer Subkomplex stabil bleiben. Durch Hemmung des proteasomalen Abbaus kann zwar ein Komplex aus allen vier Komponenten stabilisiert werden, dieser hat aber die Reifung noch nicht vollständig abgeschlossen und weist deshalb noch keine γ -Sekretaseaktivität auf.

4 Diskussion

Auf der Suche nach modifizierenden Faktoren der γ -Sekretaseaktivität wurden 2002 in einem genetischen Screen, zusätzlich zu den beiden bereits bekannten Komplexkomponenten PS und NCT, APH-1 und PEN-2 als weitere essentielle Co-Faktoren identifiziert [44]. In der Folge konnte durch Rekonstitution der γ -Sekretaseaktivität in Hefe mittels Expression dieser vier Komponenten [38], sowie durch gleichzeitige Expression in Zellkulturmodellen [143] [73] gezeigt werden, daß diese vier Proteine die minimale Voraussetzung für die Aktivität der γ -Sekretase darstellen.

Allerdings gibt es bislang nur wenig funktionelle Informationen über die kleinste der vier essentiellen γ -Sekretasekomponenten, das PEN-2 Protein. In der vorliegenden Arbeit wurde eine stabile PEN-2-RNAi Knockdown-Zelllinie hergestellt, um mit deren Hilfe Hinweise auf die Funktion von PEN-2 für die Assemblierung und Reifung des γ -Sekretasekomplexes, die Rolle von PEN-2 im Komplex selbst und für die γ -Sekretaseaktivität zu erhalten. Außerdem wurde eine Struktur-/Funktionsanalyse durchgeführt, um Domänen im PEN-2 Protein zu identifizieren, die für eine geregelte Funktion von PEN-2 im aktiven γ -Sekretasekomplex notwendig sind.

4.1 PEN-2 ist für die Endoproteolyse von PS1 und die Reifung des γ -Sekretasekomplexes wichtig

Der PEN-2KD war mit einer gestörten Reifung von NCT und reduzierten Spiegeln an PS1 Fragmenten, bei gleichzeitiger Akkumulation von PS1_{holo} assoziiert. Dies stimmte mit den Ergebnissen ähnlicher PEN-2-RNAi-Knockdown-Experimente in *Drosophila*- und Säugetierzellen [44][137][88][143] überein. Zusätzlich war bekannt, dass PEN-2 neben der Fähigkeit mit den PS1 Fragmenten einen Komplex zu bilden [137][88], auch mit PS1_{holo} interagieren kann [88]. Dies legt nahe, daß PEN-2, durch Einleitung der Endoproteolyse von PS1_{holo} in die beiden PS1 Fragmente, entscheidend für die Reifung des γ -Sekretasekomplexes ist. Die gestörte komplexe Glykosylierung von NCT, sowie die verminderte γ -Sekretaseaktivität im PEN-2KD unterstützen diese These.

In Abwesenheit von PEN-2 kann das akkumulierte $PS1_{holo}$ stabilisiert werden, was auf eine Komplexbildung hindeutet, da freies, nicht komplexgebundenes $PS1_{holo}$ rasch durch das Proteasom abgebaut wird [132]. Ausserdem wird $PS1_{holo}$ durch Komplexbildung stabilisiert, wenn PEN-2 die Endoproteolyse nicht einleiten kann [143]. Da neben $PS1_{holo}$ auch NCT_{im} und APH-1 stabilisiert werden und gezeigt werden konnte, daß diese Proteine miteinander interagieren können, ist ein trimeres Zwischenprodukt der γ -Sekretasereifung, bestehend aus PS_{holo} , NCT_{im} , APH-1 wahrscheinlich [143][96][80][68] (vgl. Abb. 4.1).

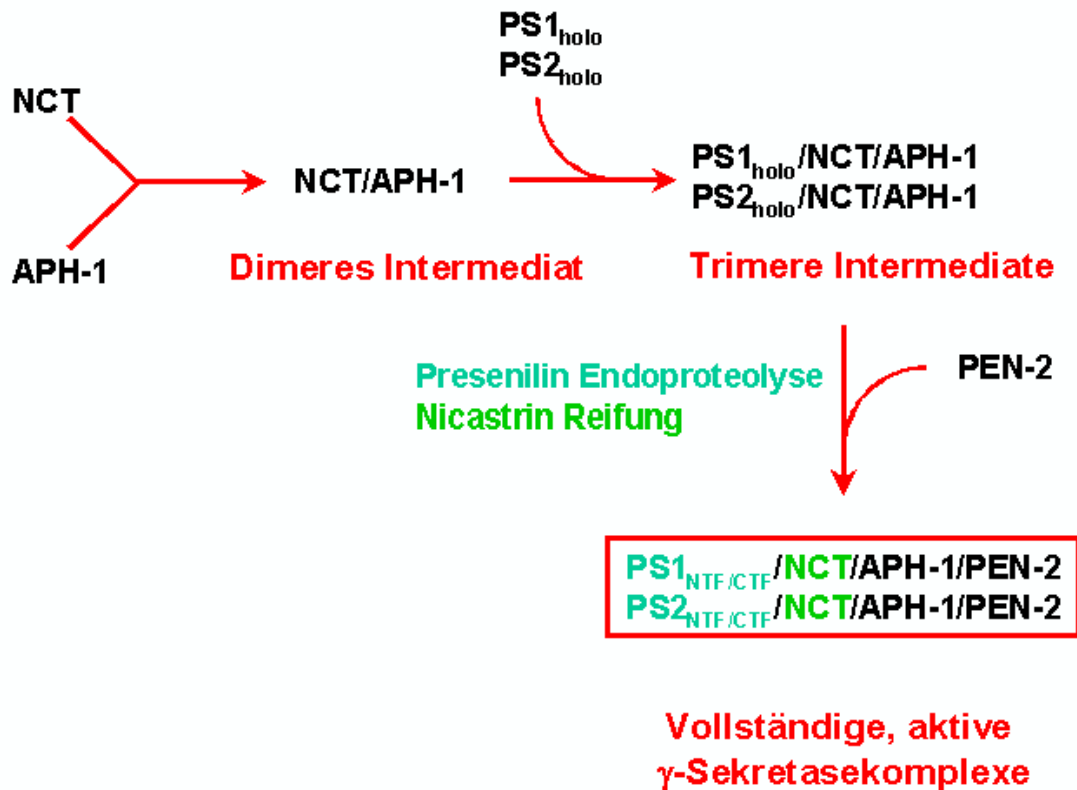


Abbildung 4.1: **Modell der Vorgänge bei der Assemblierung der γ -Sekretasekomplexe.** Nach initialer Interaktion von NCT und APH-1 entstehen durch Bindung von PS_{holo} stabile trimere Intermediate. Erst nach der Integration von PEN-2 wird die Endoproteolyse von PS und die weitere Reifung des Komplexes eingeleitet. Modifiziert nach [128].

4.2 Der C-Terminus von PEN-2 ist für die Stabilisierung des PS-NTF/-CTF Heterodimers nach der Endoproteolyse wichtig

Der Defekt des PEN-2-KD in PS1 Endoproteolyse und NCT Reifung konnte effektiv durch Transfektion von RNAi-resistentem wt-PEN-2 und H₆X-PEN-2 (tag am N-Terminus) revertiert werden, nicht allerdings mit PEN-2-mH₆ (tag am C-Terminus). Schon bei der initialen Charakterisierung von PEN-2 [44] erwies sich C-terminal mit GFP verlängertes PEN-2 (PEN-2-GFP) in *Caenorhabditis elegans* als nicht funktionell, im Gegensatz zu PEN-2 Varianten mit GFP am N-Terminus oder in der zytoplasmatischen Schleife zwischen den beiden Transmembrandomänen. Neben dem C-terminal verlängerten PEN-2 Protein, zeigte vor allem die C-terminal deletierte Mutante (PEN-2 Δ C) einen ungewöhnlichen Phänotyp. Obwohl die Akkumulation von PS1_{holo} effektiv revertiert werden konnte, wurden die resultierenden PS1 Fragmente nicht in wt-ähnlichen Mengen stabilisiert. Ausserdem war in diesen Zellen die Reifung von NCT gestört. Die Spiegel von APH-1aL waren allerdings nicht verändert.

PEN-2 Δ C erwies sich als sehr instabiles Protein und wurde rasch vom Proteasom abgebaut. Der überwiegend proteasomale Abbau von freiem, nicht komplexgebundenen PEN-2 konnte in der Folge durch andere Arbeitsgruppen reproduziert werden [7][56][27]. Interessanterweise bewirkte diese Instabilität des mutierten PEN-2 Proteins auch eine selektive Labilisierung der PS1 Fragmente, die ebenfalls über das Proteasom abgebaut wurden. APH-1 und NCT waren von dieser Labilisierung nicht beeinflusst und blieben stabil. Dies stimmt mit Berichten überein, wonach diese beiden Proteine unabhängig von PS1 und PEN-2 stabil miteinander interagieren können [128][80][96].

γ -Sekretasekomponenten, die korrekt in einen Komplex integriert wurden sind stabil und haben eine lange Halbwertszeit [37][143][132][111]. Die fehlende Fähigkeit von PEN-2 Δ C stabil mit PS1, NCT und APH-1 zu interagieren erklärt seine Instabilität und die daraus resultierende Labilisierung der PS1 Fragmente. Dadurch wird angedeutet, daß PEN-2 nach Einleitung der Endoproteolyse von PS1_{holo} als eine Art molekulare "Klammer" fungiert, welche die resultierenden PS1 Fragmente und sich selbst im Komplex stabilisiert. Für diese letztere Funktion ist ein intakter C-Terminus von PEN-2 notwendig. Vor diesem Hintergrund konnten allerdings NCT und APH-1, trotz der Instabilität und des proteasomalen Abbaus von PS1 und PEN-

2, weiterhin miteinander interagieren und sich gegenseitig stabilisieren. Dies macht einen dimeren Subkomplex aus APH-1 und NCT sehr wahrscheinlich.

PEN-2 erfüllt demnach sehr wahrscheinlich eine zweifache Funktion bei der Reifung des γ -Sekretasekomplexes. Zunächst kann es, durch Interaktion mit PS_{holo} eine Konformation induzieren, die die Endoproteolyse in PS Fragmente erlaubt. Für diese Funktion ist der PEN-2 C-Terminus nicht notwendig. Danach stabilisiert es sich selbst und die entstandenen PS Fragmente im Komplex, wofür ein intakter C-Terminus essentiell ist.

4.3 PEN-2 spielt eine generelle Rolle bei der Reifung und Aktivität des γ -Sekretasekomplexes, unabhängig von der PS Endoproteolyse

Die Ergebnisse im PEN-2KD zeigen, daß PEN-2 für die Einleitung der PS Endoproteolyse, als ersten Schritt der Reifung des γ -Sekretasekomplexes wichtig ist. Ein intakter C-Terminus von PEN-2 ist notwendig, um nach erfolgter PS Endoproteolyse die entstandenen PS Fragmente und PEN-2 selbst im Komplex zu stabilisieren. Um diese beiden Funktionen von PEN-2 differenziert zu untersuchen, wurde der Effekt des PEN-2 Knockdown in SwAPP/PS1 Δ Exon9 Zellen untersucht. In diesen Zellen ist die PS1 Mutante auch ohne Endoproteolyse aktiv [135]. Allerdings bewirkt der Knockdown von PEN-2 in in diesen Zellen eine gestörte Reifung von NCT. Dies deutet auf eine weiterreichende Rolle von PEN-2 bei der Reifung des γ -Sekretasekomplexes hin, die unabhängig von der Endoproteolyse von PS ist. Darüber hinaus bewirkte der Knockdown von PEN-2 in PS1 Δ Exon9 Zellen einen Defekt der γ -Sekretaseaktivität, was deutlich unterstreicht, daß PEN-2 auch nach der vollständigen Assemblierung des γ -Sekretasekomplexes für eine geregelte Funktion dieser Protease wichtig ist.

4.4 Länge und Sequenzkontext des PEN-2 C-Terminus sind für die Stabilisierung der PS Fragmente und von PEN-2 selbst wichtig

Nachdem der PEN-2 C-Terminus als funktionell wichtige Domäne herausgestellt werden konnte, wurde dieser Bereich des PEN-2 Proteins detaillierter untersucht. Der funktionelle Defekt von PEN-2-*mH*₆, als auch die PEN-2 Δ C Mutante, sowie Vorergebnisse mit PEN-2-GFP [44] deuteten auf die Wichtigkeit der korrekten Länge dieser Domäne hin. In der Tat führte die schrittweise Verkürzung des PEN-2 C-Terminus (PEN-2- Δ 3,- Δ 5 und - Δ 8) zu einem progressiven Funktionsverlust des PEN-2 Moleküls im Hinblick auf die Reifung von NCT und die Stabilisierung der PS1 Fragmente, wohingegen alle Mutanten den PS1 Endoproteolysedefekt des PEN-2KD aufheben konnten. Auch eine interne Deletion von fünf As (Δ 90-94) zeigte einen Phänotyp, der nicht von dem des PEN-2 Δ C zu unterscheiden war. Wegen der vermutlich engen räumlichen Anordnung der Komplexkomponenten, werden nur sehr geringe Abweichungen in der Länge des PEN-2 C-Terminus toleriert, wohingegen stärkere Abweichungen das feine Gefüge der molekularen Interaktionen stören können und somit eine Destabilisierung von PEN-2 und PS1 Fragmenten bewirken. Weiterhin unterstützt wird dieses Modell durch eine ähnliche, zeitgleich durchgeführte Mutagenese-Studie [56].

Neben der Länge ist aber auch der Gesamtsequenzkontext des PEN-2 C-Terminus entscheidend für die Funktion. Einzelmutation der vier hochkonservierten As (D90, F94, P97, G99) zu Alanin, können den Defekt des PEN-2KD effektiv revertieren. Dagegen zeigt die gleichzeitige Mutation dieser vier As (4A) einen Phänotyp, der nicht von PEN-2 Δ C zu unterscheiden ist.

Es liegt nahe, daß die Integrität und räumliche Zugänglichkeit des Sequenzsegmentes mit den vier hochkonservierten As D90, F94, P97 und G99 (speziell D90, F94, P97) für die stabilisierenden Interaktionen zwischen PEN-2 und den PS1 Fragmenten entscheidend ist. Diese Interaktionen werden durch einzelne Punktmutationen im betroffenen Sequenzabschnitt nicht beeinträchtigt, da die übrigen As weiterhin für stabilisierende Wechselwirkungen zur Verfügung stehen. Stärkere Veränderungen im Kontext dieses Sequenzabschnittes führen allerdings zu einer Aufhebung der Interaktionen und zu einer Labilisierung der Interaktionspartner. Offensichtlich führt eine bestimmte Aminosäureabfolge zu besonders stabilen Protein-Protein-Interaktionen, weshalb diese As besonders stark konserviert wurden. Der konservierte Sequenzab-

schnitt am PEN-2 C-terminus könnte eine bestimmte Struktur einnehmen, die für die stabilisierenden Interaktionen im γ -Sekretasekomplex notwendig ist, oder er liegt alternativ ungefaltet vor und erst die Bindung des Interaktionspartners induziert eine stabile räumliche Anordnung.

4.5 Prä-mature γ -Sekretasekomplexe sind nicht aktiv

Die C-terminalen PEN-2 Mutanten, welche den funktionellen Defekt des PEN-2KD nicht revertieren konnten, waren auch nicht in einem stabilen Komplex mit den anderen γ -Sekretasekomponenten zu isolieren. Wie bei der prototypischen PEN-2 Δ C Mutante wurden alle instabilen PEN-2 Mutanten und die labilisierten PS1 Fragmente rasch vom Proteasom abgebaut. Hemmung des proteasomalen Abbaus erlaubte allerdings eine Co-Isolation der am C-Terminus veränderten PEN-2 Moleküle zusammen mit den PS1 Fragmenten. Unter diesen Bedingungen konnten kleine Mengen eines Komplexes isoliert werden, der neben den PEN-2 Mutanten und PS1 Fragmenten auch APH-1 und vor allem NCT_{im} enthielt. Es handelte sich also um einen Komplex aus allen vier essentiellen γ -Sekretasekomponenten, der schon einen Schritt der Reifung, die PS Endoproteolyse durchschritten hat. Allerdings ist er, abzulesen an der fehlenden Reifung von NCT noch nicht vollständig gereift und deshalb noch nicht als γ -Sekretase aktiv. Neuere Studien schlagen zwar eine sehr frühe Assemblierung des γ -Sekretasekomplexes vor [16][71], allerdings scheint die Aktivierung erst im Golgi-Apparat oder späteren sekretorischen Kompartimenten stattzufinden [16].

Zusammenfassend unterstreichen diese Daten, daß der C-Terminus von PEN-2 nicht für die initiale Assemblierung des γ -Sekretasekomplexes und die Einleitung der PS Endoproteolyse notwendig ist. Danach aber wird die stabilisierende Funktion des PEN-2 C-Terminus für PEN-2 selbst und die PS Fragmente benötigt um eine weitere Reifung und Aktivierung zum aktiven γ -Sekretasekomplex zu ermöglichen. Die Ergebnisse in SwAPP/PS1 Δ Exon9 zeigen zusätzlich, daß PEN-2 generell für die Reifung und Funktion des γ -Sekretasekomplexes notwendig ist, unabhängig von der Einleitung der PS Endoproteolyse.

4.6 Modell der Assemblierung des γ -Sekretasekomplexes mit der PEN-2 Δ C-Mutante

Zu Beginn der Assemblierung des γ -Sekretasekomplexes bilden wahrscheinlich NCT und APH-1 ein dimeres Intermediat, für welches eine Gerüstfunktion vorgeschlagen wurde [104]. Nach Hinzukommen von PS1_{holo} entsteht ein stabiles trimeres Intermediat [143]. Die Interaktion von PEN-2 Δ C erlaubt möglicherweise eine Konformationsänderung des Komplexes oder von PS selbst, welche die Endoproteolyse von PS1_{holo} ermöglicht. Der daraus entstehende prämaturre Komplex kann allerdings die weiteren Reifungsschritte nicht durchlaufen, weil zunächst, wegen des fehlenden C-Terminus PEN-2 Δ C nicht im Komplex stabilisiert werden kann und vom Proteasom abgebaut wird. Im zurückbleibenden instabilen trimeren Intermediat können nun, wegen des Verlustes des PEN-2 Δ C auch die entstandenen PS1 Fragmente nicht mehr stabilisiert werden und werden vom Proteasom abgebaut. Übrig bleibt ein stabiler dimerer Subkomplex aus NCT_{im} und APH-1.

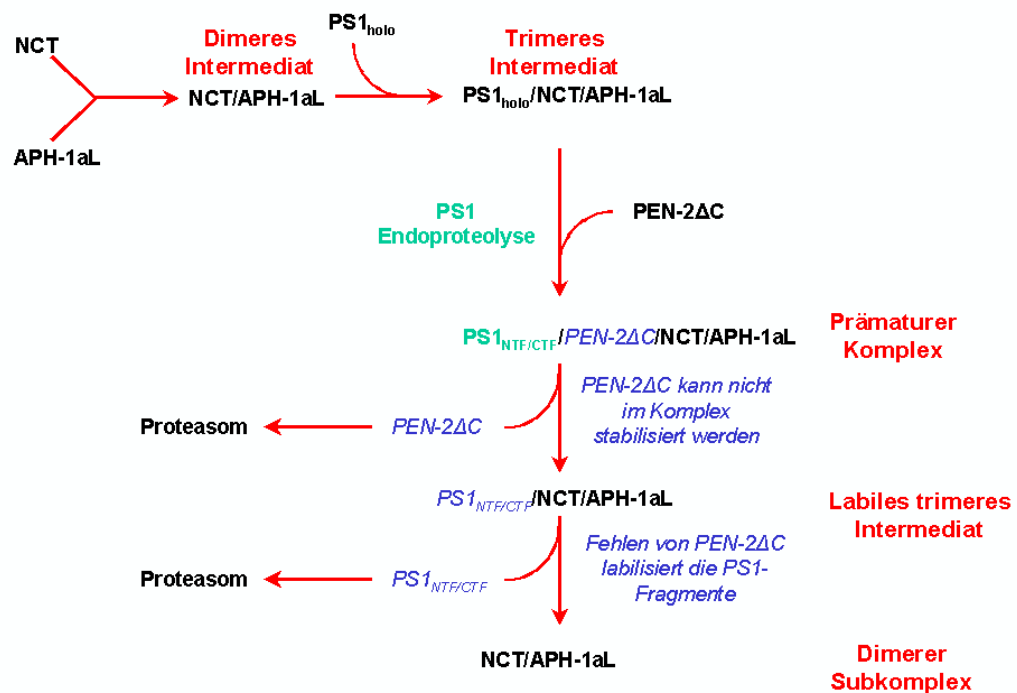


Abbildung 4.2: **Modell der γ -Sekretasekomplex-Assemblierung mit der PEN-2 Δ C Mutante.** Dieses Modell beschränkt sich auf den in dieser Arbeit untersuchten Komplex mit PS1 und APH-1aL, gilt aber in entsprechender Weise auch für die anderen möglichen Komplexe (Abb. 1.7).

4.7 Ausblick

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist zur Einleitung der PS1 Endoproteolyse eine Interaktion zwischen PS1 und PEN-2 notwendig. Es gibt Hinweise darauf, daß das PS1-NTF mit PEN-2 interagieren kann und daß für diese Wechselwirkung der N-Terminus von PEN-2 [43] oder die erste TMD [70] wichtig ist. Neuere Studien identifizierten die vierte TMD von PS1 als Bindungsdomäne für PEN-2 [69][154]. Mögliche Interaktionspartner des PEN-2 C-Terminus wurden noch nicht identifiziert. Es liegen Daten vor, die zeigen daß PS im Zentrum des aktiven γ -Sekretasekomplex als Dimer [119] [20] vorliegt. Vor diesem Hintergrund könnte man PEN-2 als Dimerisierungsfaktor eines solchen PS Dimers betrachten, wobei die C-Termini zweier PEN-2-Moleküle miteinander interagieren, während der jeweilige N-Terminus eine Interaktion mit dem PS-NTF eingeht. Eine genaue Analyse der Organisation der einzelnen Untereinheiten im γ -Sekretasekomplex wird wahrscheinlich nur über eine strukturelle Analyse des Gesamtkomplexes zu verwirklichen sein.

5 Zusammenfassung

Die γ -Sekretase ist ein Proteasekomplex, der aus vier Komponenten, Presenilin (PS), Nicastrin (NCT), APH-1 und PEN-2, besteht und der die intramembranöse Prozessierung verschiedener Typ I Transmembranproteine, einschließlich des Alzheimer-assoziierten β -Amyloid Vorläuferproteins, katalysiert. In der vorliegenden Arbeit wurden stabile PEN-2 RNAi-Knockdown Zellen (PEN-2KD) dazu verwendet, um Hinweise auf die Funktion von PEN-2 bei der Assemblierung und Reifung des γ -Sekretasekomplexes, die Rolle von PEN-2 im aktiven Komplex und für die γ -Sekretaseaktivität zu erhalten. Zusätzlich wurden, vor dem Hintergrund des PEN-2KD, RNAi-resistente PEN-2 Varianten analysiert, die in einer Struktur-/Funktionsanalyse auf ihre Fähigkeit hin untersucht wurden, den Defekt des PEN-2KD aufzuheben, um damit funktionell wichtige Domänen im PEN-2 Protein zu identifizieren.

Der Knockdown von PEN-2 war mit gestörter Reifung von NCT und blockierter PS Endoproteolyse assoziiert. PS akkumulierte als Vollängenprotein (PS_{holo}), das durch Komplexbildung mit NCT und APH-1 stabilisiert wurde. In Abwesenheit von PEN-2 können PS, NCT und APH-1 zu einem trimere Komplex assemblieren, PEN-2 ist danach allerdings notwendig, um die Reifung des γ -Sekretasekomplexes durch Initialisierung der PS Endoproteolyse einzuleiten.

Interessanterweise bewirkte der Knockdown von PEN-2 auch in Endoproteolyse-defizienten SwAPP/PS1 Δ Exon9 Zellen einen Defekt in der Reifung von NCT. Dies schlägt eine generelle Rolle von PEN-2 bei der Reifung und für die Aktivität der γ -Sekretase vor, die unabhängig von der PS Endoproteolyse ist.

Die Defekte des PEN-2KD konnten effektiv durch RNAi-resistentes wt-PEN-2 revertiert werden. In der folgenden Struktur-/Funktionsanalyse erwies sich am N-Terminus mit einem Epitop-tag verlängertes PEN-2 als voll funktionell, wohingegen sowohl die Verlängerung des C-Terminus mit einem tag, als auch eine Trunkierung des C-Terminus (PEN-2 Δ C) defekte PEN-2 Varianten hervorrief. Diese konnten zwar die Akkumulation von PS_{holo} , die mit dem Knockdown von PEN-2 assoziiert war ausgleichen, konnten aber weder normale Spiegel an PS-NTF und -CTF herstellen, noch für eine Reifung von NCT sorgen. PEN-2 Δ C war sehr instabil und wurde schnell vom

Proteasom abgebaut, was mit der Unfähigkeit einen stabilen γ -Sekretasekomplex zu bilden konsistent war. Zusätzlich verursachte die Expression von PEN-2 Δ C eine selektive Instabilität des PS-NTF/-CTF Heterodimers, das ebenfalls vom Proteasom abgebaut wurde, wohingegen NCT und APH-1 stabil blieben. Der C-Terminus von PEN-2 ist nicht für die Einleitung der PS Endoproteolyse notwendig. Danach wird er allerdings benötigt um die entstandenen PS Fragmente und PEN-2 selbst im Komplex zu stabilisieren.

Um den PEN-2 C-Terminus genauer zu untersuchen, wurden unterschiedliche Deletionen und Mutationen mehrerer konservierter Aminosäuren, im PEN-2KD auf funktionelle Aktivität hin analysiert. Progressive Verkürzung des C-Terminus bewirkte einen zunehmenden Funktionsverlust. Dieser wurde auch bei einer internen Deletion oder der groben Verdopplung der Länge durch einen Epitop-tag beobachtet. Interessanterweise störte nur die kombinierte, nicht aber die einzelne Mutation der konservierten Aminosäuren D90, F94, P97 und G99 die Funktion von PEN-2. Alle funktionslosen Mutanten erlaubten zwar die PS Endoproteolyse, die PS Fragmente und PEN-2 selbst waren aber instabil und wurden durch das Proteasom abgebaut. Länge und gesamter Sequenzkontext des PEN-2 C-Terminus sind also, in der engen räumlichen Anordnung der Komplexpartner, für die Stabilisierung des PS-NTF/-CTF Heterodimers und von PEN-2 selbst im γ -Sekretasekomplex notwendig.

Die Interaktion der C-terminalen PEN-2 Mutanten mit den PS Fragmenten und den anderen beiden Komplexpartnern konnte allerdings unter Bedingungen, wo der proteasomale Abbau blockiert war, wiederhergestellt werden. Somit wurde eine Komplex aus allen vier essentiellen γ -Sekretasekomponenten stabilisiert und isoliert, der zwar vollständig assembliert, aber noch nicht komplett gereift war. Dieser prämaturre Komplex zeigte noch keine γ -Sekretaseaktivität, für welche sowohl die vollständige Assemblierung der Komponenten, als auch deren komplette Reifung essentiell sind.

Zusammenfassend schlagen die vorliegenden Daten folgende Funktionen für PEN-2 im γ -Sekretasekomplex vor: PEN-2 wird für die Reifung des γ -Sekretasekomplexes und die Einleitung der PS Endoproteolyse benötigt. Darüber hinaus stabilisiert PEN-2 die, durch die Endoproteolyse entstandenen PS Fragmente im Komplex. Für letztere Funktion ist ein in Länge und Gesamtsequenzkontext intakter C-Terminus wichtig, der allerdings für die Einleitung der PS Endoproteolyse nicht benötigt wird. Unabhängig von der Rolle bei der PS Endoproteolyse ist PEN-2 aber generell für die Reifung und Aktivität des γ -Sekretasekomplexes wichtig.

Literaturverzeichnis

- [1] H. Aberle, A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, and R. Kemler. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J*, 16(13):3797–804, 1997.
- [2] T. M. Allinson, E. T. Parkin, A. J. Turner, and N. M. Hooper. Adams family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res*, 74(3):342–52, 2003.
- [3] A. Alzheimer. Über eine eigenartige erkrankung der hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtl. Med.*, 64:146–148, 1907.
- [4] K. Ancolio, C. Dumanchin, H. Barelli, J. M. Warter, A. Brice, D. Campion, T. Frebourg, and F. Checler. Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaapp) maturation by a new val-715 \rightarrow met betaapp-770 mutation responsible for probable early-onset alzheimer’s disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7):4119–24., 1999.
- [5] S. Artavanis-Tsakonas, M. D. Rand, and R. J. Lake. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284(5415):770–6., 1999.
- [6] 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 gamma -secretase inhibitor: implications for presenilin biology. *J Biol Chem*, 276(48):45394–402, 2001.
- [7] A. Bergman, E. M. Hansson, S. E. Pursglove, M. R. Farmery, L. Lannfelt, U. Lendahl, J. Lundkvist, and J. Naslund. 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.
- [8] H. Bickel. [dementia syndrome and alzheimer disease: an assessment of morbidity and annual incidence in germany]. *Gesundheitswesen*, 62(4):211–8, 2000.
- [9] H. Bickel. [dementia in advanced age: estimating incidence and health care costs]. *Z Gerontol Geriatr*, 34(2):108–15, 2001.
- [10] A. Bigas, D. I. Martin, and L. A. Milner. Notch1 and notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol*, 18(4):2324–33., 1998.
- [11] H. Braak and E. Braak. Neuropathological staging of alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)*, 82(4):239–59, 1991.

- [12] T. R. Brummelkamp, R. Bernards, and R. Agami. A system for stable expression of short interfering rnas in mammalian cells. *Science*, 296(5567):550–3, 2002.
- [13] A. L. Brunkan, M. Martinez, E. S. Walker, and A. M. Goate. Presenilin endoproteolysis is an intramolecular cleavage. *Mol Cell Neurosci*, 29(1):65–73, 2005.
- [14] 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 alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem*, 273(43):27765–7., 1998.
- [15] X. Cao and T. C. Sudhof. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of app with fe65 and histone acetyltransferase tip60. *Science*, 293(5527):115–20, 2001.
- [16] A. Capell, D. Beher, S. Prokop, H. Steiner, C. Kaether, M. S. Shearman, and C. Haass. Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway. *J Biol Chem*, 280(8):6471–8, 2005.
- [17] A. Capell, J. Grunberg, 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.
- [18] A. Capell, C. Kaether, D. Edbauer, K. Shirotani, S. Merkl, H. Steiner, and C. Haass. Nicastrin interacts with gamma-secretase complex components via the n-terminal part of its transmembrane domain. *J Biol Chem*, 278(52):52519–23, 2003.
- [19] A. Capell, R. Saffrich, J. C. Olivo, L. Meyn, J. Walter, J. Grunberg, 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.
- [20] S. Cervantes, C. A. Saura, E. Pomares, R. Gonzalez-Duarte, and G. Marfany. Functional implications of the presenilin dimerization: reconstitution of gamma-secretase activity by assembly of a catalytic site at the dimer interface of two catalytically inactive presenilins. *J Biol Chem*, 279(35):36519–29. Epub 2004 Jun 25., 2004.
- [21] M. C. Chartier-Harlin, F. Crawford, H. Houlden, A. Warren, D. Hughes, L. Fidani, A. Goate, M. Rossor, P. Roques, J. Hardy, and et al. Early-onset alzheimer’s disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature*, 353(6347):844–6., 1991.

- [22] 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 beta-amyloid precursor protein in familial alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*, 360(6405):672–4, 1992.
- [23] 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 beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med*, 3(1):67–72, 1997.
- [24] R. A. Conlon, A. G. Reaume, and J. Rossant. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development*, 121(5):1533–45., 1995.
- [25] 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.
- [26] M. Cruts, H. Backhovens, S. Y. Wang, G. Van Gassen, J. Theuns, C. D. De Jonghe, A. Wehnert, J. De Voecht, G. De Winter, P. Cras, and et al. Molecular genetic analysis of familial early-onset alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum Mol Genet*, 4(12):2363–71, 1995.
- [27] A. S. Crystal, V. A. Morais, R. R. Fortna, D. Carlin, T. C. Pierson, C. A. Wilson, V. M. Lee, and R. W. Doms. Presenilin modulates pen-2 levels post-translationally by protecting it from proteasomal degradation. *Biochemistry*, 43(12):3555–63, 2004.
- [28] A. S. Crystal, V. A. Morais, T. C. Pierson, D. S. Pijak, D. Carlin, V. M. Lee, and R. W. Doms. Membrane topology of gamma-secretase component pen-2. *J Biol Chem*, 278(22):20117–23, 2003.
- [29] J. L. Cummings. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 351(1):56–67, 2004.
- [30] J. L. de la Pompa, A. Wakeham, K. M. Correia, E. Samper, S. Brown, R. J. Aguilera, T. Nakano, T. Honjo, T. W. Mak, J. Rossant, and R. A. Conlon. Conservation of the notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development*, 124(6):1139–48., 1997.
- [31] B. De Strooper. Aph-1, pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active gamma-secretase complex. *Neuron*, 38(1):9–12, 2003.

- [32] 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 gamma-secretase-like protease mediates release of notch intracellular domain. *Nature*, 398(6727):518–22., 1999.
- [33] 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.
- [34] L. R. Dick, A. A. Cruikshank, A. T. Destree, L. Grenier, T. A. McCormack, F. D. Melandri, S. L. Nunes, V. J. Palombella, L. A. Parent, L. Plamondon, and R. L. Stein. Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin in cultured cells. *J Biol Chem*, 272(1):182–8, 1997.
- [35] A. Doan, G. Thinakaran, D. R. Borchelt, H. H. Slunt, T. Ratovitsky, M. Podlisny, D. J. Selkoe, M. Seeger, S. E. Gandy, D. L. Price, and S. S. Sisodia. Protein topology of presenilin 1. *Neuron*, 17(5):1023–30, 1996.
- [36] 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.
- [37] D. Edbauer, E. Winkler, C. Haass, and H. Steiner. Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(13):8666–71, 2002.
- [38] D. Edbauer, E. Winkler, J. T. Regula, B. Pesold, H. Steiner, and C. Haass. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol*, 5(5):486–8, 2003.
- [39] 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 beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*, 248(4959):1122–4, 1990.
- [40] 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 gamma-secretase bind directly to presenilin-1. *Nat Cell Biol*, 2(7):428–34, 2000.
- [41] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded rna in caenorhabditis elegans. *Nature*, 391(6669):806–11., 1998.
- [42] R. R. Fortna, A. S. Crystal, V. A. Morais, D. S. Pijak, V. M. Lee, and R. W. Doms. Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of aph-1,

- a component of the gamma-secretase complex. *J Biol Chem*, 279(5):3685–93, 2004.
- [43] P. C. Fraering, M. J. LaVoie, W. Ye, B. L. Ostaszewski, W. T. Kimberly, D. J. Selkoe, and M. S. Wolfe. Detergent-dependent dissociation of active gamma-secretase reveals an interaction between pen-2 and ps1-ntf and offers a model for subunit organization within the complex. *Biochemistry*, 43(2):323–33, 2004.
- [44] 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, gamma-secretase cleavage of betaapp, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell*, 3(1):85–97, 2002.
- [45] A. Geling, H. Steiner, M. Willem, L. Bally-Cuif, and C. Haass. A gamma-secretase inhibitor blocks notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep*, 3(7):688–94, 2002.
- [46] G. G. Glenner and C. W. Wong. Alzheimer’s disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 120(3):885–90, 1984.
- [47] A. Goate, M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, and et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial alzheimer’s disease. *Nature*, 349(6311):704–6., 1991.
- [48] 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.
- [49] T. J. Grabowski, H. S. Cho, J. P. Vonsattel, G. W. Rebeck, and S. M. Greenberg. Novel amyloid precursor protein mutation in an iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*, 49(6):697–705., 2001.
- [50] Y. Gu, F. Chen, N. Sanjo, T. Kawarai, H. Hasegawa, M. Duthie, W. Li, X. Ruan, A. Luthra, H. T. 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.
- [51] C. Haass, M. G. Schlossmacher, A. Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B. L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E. H. Koo, D. Schenk, D. B. Teplow, and et al. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359(6393):322–5, 1992.

- [52] C. Haass and H. Steiner. Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of gsgd-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol*, 12(12):556–62, 2002.
- [53] B. K. Hadland, S. S. Huppert, J. Kanungo, Y. Xue, R. Jiang, T. Gridley, R. A. Conlon, A. M. Cheng, R. Kopan, and G. D. Longmore. A requirement for notch1 distinguishes 2 phases of definitive hematopoiesis during development. *Blood*, 104(10):3097–105. Epub 2004 Jul 13., 2004.
- [54] B. K. Hadland, N. R. Manley, D. Su, G. D. Longmore, C. L. Moore, M. S. Wolfe, E. H. Schroeter, and R. Kopan. Gamma -secretase inhibitors repress thymocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13):7487–91., 2001.
- [55] 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.
- [56] 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.
- [57] L. E. Hebert, P. A. Scherr, J. L. Bienias, D. A. Bennett, and D. A. Evans. Alzheimer disease in the us population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol*, 60(8):1119–22, 2003.
- [58] S. S. Hebert, L. Serneels, T. Dejaegere, K. Horre, M. Dabrowski, V. Baert, W. Annaert, D. Hartmann, and B. De Strooper. Coordinated and widespread expression of gamma-secretase in vivo: evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiol Dis*, 17(2):260–72, 2004.
- [59] L. Hendriks, C. M. van Duijn, P. Cras, M. Cruts, W. Van Hul, F. van Harskamp, A. Warren, M. G. McInnis, S. E. Antonarakis, J. J. Martin, and et al. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet*, 1(3):218–21., 1992.
- [60] A. Herreman, L. Serneels, W. Annaert, D. Collen, L. Schoonjans, and B. De Strooper. Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2(7):461–2, 2000.
- [61] Y. Hu and M. E. Fortini. Different cofactor activities in gamma-secretase assembly: evidence for a nicastrin-aph-1 subcomplex. *J Cell Biol*, 161(4):685–90, 2003.
- [62] A. Y. Hung and D. J. Selkoe. Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J*, 13(3):534–42., 1994.

- [63] J. T. Jarrett, E. P. Berger, and Jr. Lansbury, P. T. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of alzheimer's disease. *Biochemistry*, 32(18):4693–7, 1993.
- [64] A. F. Jorm. Cross-national comparisons of the occurrence of alzheimer's and vascular dementias. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 240(4-5):218–22, 1991.
- [65] 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 gamma-secretase activity. *Embo J*, 23(24):4738–48, 2004.
- [66] J. Kang, H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, and B. Muller-Hill. The precursor of alzheimer's disease amyloid a4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106):733–6, 1987.
- [67] D. Y. Kim, L. A. Ingano, and D. M. Kovacs. Nectin-1alpha, an immunoglobulin-like receptor involved in the formation of synapses, is a substrate for presenilin/gamma-secretase-like cleavage. *J Biol Chem*, 277(51):49976–81. Epub 2002 Oct 9., 2002.
- [68] S. H. Kim, T. Ikeuchi, C. Yu, and S. S. Sisodia. Regulated hyperaccumulation of presenilin-1 and the “gamma-secretasecomplex. evidence for differential intramembranous processing of transmembrane substrates. *J Biol Chem*, 278(36):33992–4002, 2003.
- [69] S. H. Kim and S. S. Sisodia. Evidence that the nfmfmotif in transmembrane domain 4 of ps1 is critical for binding with pen-2. *J Biol Chem*, 2005.
- [70] 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.
- [71] S. H. Kim, Y. I. Yin, Y. M. Li, and S. S. Sisodia. Evidence that assembly of an active gamma-secretase complex occurs in the early compartments of the secretory pathway. *J Biol Chem*, 279(47):48615–9, 2004.
- [72] W. T. Kimberly, M. J. LaVoie, B. L. Ostaszewski, W. Ye, M. S. Wolfe, and D. J. Selkoe. Complex n-linked glycosylated nicastrin associates with active gamma-secretase and undergoes tight cellular regulation. *J Biol Chem*, 277(38):35113–7, 2002.
- [73] W. T. Kimberly, M. J. LaVoie, B. L. Ostaszewski, W. Ye, M. S. Wolfe, and D. J. Selkoe. Gamma-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.

- [74] 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 alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J*, 343(Pt 2):371–5., 1999.
- [75] S. Kumar-Singh, C. De Jonghe, M. Cruts, R. Kleinert, R. Wang, M. Mercken, B. De Strooper, H. Vanderstichele, A. Lofgren, I. Vanderhoeven, H. Backhovens, E. Vanmechelen, P. M. Kroisel, and C. Van Broeckhoven. Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a gamma(42)-secretase site mutation points to an essential role for n-truncated a beta(42) in alzheimer’s disease. *Hum Mol Genet*, 9(18):2589–98., 2000.
- [76] S. Lammich, E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass, and F. Fahrenholz. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of alzheimer’s amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7):3922–7., 1999.
- [77] 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 abeta-like peptide. *J Biol Chem*, 277(47):44754–9. Epub 2002 Sep 9., 2002.
- [78] P. Lassus, J. Rodriguez, and Y. Lazebnik. Confirming specificity of rnai in mammalian cells. *Sci STKE*, 2002(147):PL13., 2002.
- [79] H. Laudon, E. M. Hansson, K. Melen, A. Bergman, M. R. Farmery, B. Winblad, U. Lendahl, G. von Heijne, and J. Naslund. A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem*, 280(42):35352–60, 2005.
- [80] M. J. LaVoie, P. C. Fraering, B. L. Ostaszewski, W. Ye, W. T. Kimberly, M. S. Wolfe, and D. J. Selkoe. Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem*, 278(39):37213–22, 2003.
- [81] M. J. LaVoie and D. J. Selkoe. The notch ligands, jagged and delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J Biol Chem*, 278(36):34427–37. Epub 2003 Jun 25., 2003.
- [82] H. J. Lee, K. M. Jung, Y. Z. Huang, L. B. Bennett, J. S. Lee, L. Mei, and T. W. Kim. Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of erbb4. *J Biol Chem*, 277(8):6318–23. Epub 2001 Dec 10., 2002.
- [83] C. L. Lendon, F. Ashall, and A. M. Goate. Exploring the etiology of alzheimer disease using molecular genetics. *Jama*, 277(10):825–31, 1997.

- [84] 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.
- [85] E. Levy-Lahad, W. Wasco, P. Poorkaj, D. M. Romano, J. Oshima, W. H. Pettingell, C. E. Yu, P. D. Jondro, S. D. Schmidt, K. Wang, and et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial alzheimer's disease locus. *Science*, 269(5226):973–7, 1995.
- [86] X. Li and I. Greenwald. Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for caenorhabditis elegans and human presenilins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12):7109–14, 1998.
- [87] Y. M. Li, M. T. Lai, M. Xu, Q. Huang, J. DiMuzio-Mower, M. K. Sardana, X. P. Shi, K. C. Yin, J. A. Shafer, and S. J. Gardell. Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11):6138–43, 2000.
- [88] W. J. Luo, H. Wang, H. Li, B. 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.
- [89] P. Marambaud, J. Shioi, G. Serban, A. Georgakopoulos, S. Sarnier, V. Nagy, L. Baki, P. Wen, S. Efthimiopoulos, Z. Shao, T. Wisniewski, and N. K. Robakis. A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the e-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J*, 21(8):1948–56., 2002.
- [90] P. Marambaud, P. H. Wen, A. Dutt, J. Shioi, A. Takashima, R. Siman, and N. K. Robakis. A cbp binding transcriptional repressor produced by the ps1/epsilon-cleavage of n-cadherin is inhibited by ps1 fad mutations. *Cell*, 114(5):635–45., 2003.
- [91] C. L. Masters, G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald, and K. Beyreuther. Amyloid plaque core protein in alzheimer disease and down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(12):4245–9, 1985.
- [92] P. May, Y. K. Reddy, and J. Herz. Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J Biol Chem*, 277(21):18736–43. Epub 2002 Mar 20., 2002.
- [93] A. Merlos-Suarez, J. Fernandez-Larrea, P. Reddy, J. Baselga, and J. Arribas. Pro-tumor necrosis factor-alpha processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing. *J Biol Chem*, 273(38):24955–62., 1998.

- [94] L. A. Milner and A. Bigas. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood*, 93(8):2431–48., 1999.
- [95] R. D. Moir, C. S. Atwood, D. M. Romano, M. H. Laurans, X. Huang, A. I. Bush, J. D. Smith, and R. E. Tanzi. Differential effects of apolipoprotein e isoforms on metal-induced aggregation of a beta using physiological concentrations. *Biochemistry*, 38(14):4595–603, 1999.
- [96] V. A. Morais, A. S. Crystal, D. S. Pijak, D. Carlin, J. Costa, V. M. Lee, and R. W. Doms. The transmembrane domain region of nicastrin mediates direct interactions with aph-1 and the gamma-secretase complex. *J Biol Chem*, 278(44):43284–91, 2003.
- [97] H. Mori, K. Takio, M. Ogawara, and D. J. Selkoe. Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in alzheimer’s disease. *J Biol Chem*, 267(24):17082–6., 1992.
- [98] 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 beta-amyloid. *Nat Genet*, 1(5):345–7, 1992.
- [99] D. Murakami, I. Okamoto, O. Nagano, Y. Kawano, T. Tomita, T. Iwatsubo, B. De Strooper, E. Yumoto, and H. Saya. Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembranous cleavage of cd44. *Oncogene*, 22(10):1511–6., 2003.
- [100] J. Murrell, M. Farlow, B. Ghetti, and M. D. Benson. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary alzheimer’s disease. *Science*, 254(5028):97–9., 1991.
- [101] J. R. Murrell, A. M. Hake, K. A. Quaid, M. R. Farlow, and B. Ghetti. Early-onset alzheimer disease caused by a new mutation (v717l) in the amyloid precursor protein gene. *Arch Neurol*, 57(6):885–7., 2000.
- [102] T. Nakai, A. Yamasaki, M. Sakaguchi, K. Kosaka, K. Mihara, Y. Amaya, and S. Miura. Membrane topology of alzheimer’s disease-related presenilin 1. evidence for the existence of a molecular species with a seven membrane-spanning and one membrane-embedded structure. *J Biol Chem*, 274(33):23647–58, 1999.
- [103] C. Y. Ni, M. P. Murphy, T. E. Golde, and G. Carpenter. gamma -secretase cleavage and nuclear localization of erbb-4 receptor tyrosine kinase. *Science*, 294(5549):2179–81. Epub 2001 Oct 25., 2001.
- [104] M. Niimura, N. Isoo, N. Takasugi, M. Tsuruoka, K. Ui-Tei, K. Saigo, Y. Morohashi, T. Tomita, and T. Iwatsubo. Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions. *J Biol Chem*, 280(13):12967–75, 2005.

- [105] 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. Naslund, and L. Lannfelt. The 'arctic' app mutation (e693g) causes alzheimer's disease by enhanced abeta protofibril formation. *Nat Neurosci*, 4(9):887–93., 2001.
- [106] J. S. Nye, R. Kopan, and R. Axel. An activated notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development*, 120(9):2421–30., 1994.
- [107] J. Perez-Tur, S. Froelich, G. Prihar, R. Crook, M. Baker, K. Duff, M. Wragg, F. Busfield, C. Lendon, R. F. Clark, and et al. A mutation in alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene. *Neuroreport*, 7(1):297–301, 1995.
- [108] 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 gamma-secretase complex. *J Biol Chem*, 279(22):23255–61, 2004.
- [109] F. Radtke, I. Ferrero, A. Wilson, R. Lees, M. Aguet, and H. R. MacDonald. Notch1 deficiency dissociates the intrathymic development of dendritic cells and t cells. *J Exp Med*, 191(7):1085–94., 2000.
- [110] F. Radtke, A. Wilson, G. Stark, M. Bauer, J. van Meerwijk, H. R. MacDonald, and M. Aguet. Deficient t cell fate specification in mice with an induced inactivation of notch1. *Immunity*, 10(5):547–58., 1999.
- [111] 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.
- [112] S. B. Roberts, J. A. Ripellino, K. M. Ingalls, N. K. Robakis, and K. M. Felsenstein. Non-amyloidogenic cleavage of the beta-amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase. *J Biol Chem*, 269(4):3111–6., 1994.
- [113] K. L. Rock, C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A. L. Goldberg. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on mhc class i molecules. *Cell*, 78(5):761–71, 1994.
- [114] E. I. Rogaev, R. Sherrington, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda, and et al. 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.
- [115] A. E. Roher, J. D. Lowenson, S. Clarke, A. S. Woods, R. J. Cotter, E. Gowing, and M. J. Ball. beta-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.
- [116] A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. Schmechel, P. H. George-Hyslop, M. A. Pericak-Vance, S. H. Joo, B. L. Rosi, J. F. Gusella, D. R. Crapper-MacLachlan, M. J. Alberts, and et al. Association of apolipoprotein e allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic alzheimer’s disease. *Neurology*, 43(8):1467–72, 1993.
- [117] H. Schagger 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.
- [118] J. Schlondorff and C. P. Blobel. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci*, 112(Pt 21):3603–17., 1999.
- [119] E. H. Schroeter, M. X. Ilagan, A. L. Brunkan, S. Hecimovic, Y. M. Li, M. Xu, H. D. Lewis, M. T. Saxena, B. De Strooper, A. Coonrod, T. Tomita, T. Iwatsubo, C. L. Moore, A. Goate, M. S. Wolfe, M. Shearman, and R. Kopan. A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of notch 1 and app proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(22):13075–80, 2003.
- [120] E. H. Schroeter, J. A. Kisslinger, and R. Kopan. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature*, 393(6683):382–6., 1998.
- [121] D. J. Selkoe. Alzheimer’s disease is a synaptic failure. *Science*, 298(5594):789–91., 2002.
- [122] P. Seubert, T. Oltersdorf, M. G. Lee, R. Barbour, C. Blomquist, D. L. Davis, K. Bryant, L. C. Fritz, D. Galasko, L. J. Thal, and et al. Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature*, 361(6409):260–3., 1993.
- [123] S. Shah, S. F. Lee, K. Tabuchi, Y. H. Hao, C. Yu, Q. LaPlant, H. Ball, 3rd Dann, C. E., T. Sudhof, and G. Yu. Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell*, 122(3):435–47, 2005.
- [124] M. S. Shearman, D. Behr, 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 beta-protein precursor gamma-secretase activity. *Biochemistry*, 39(30):8698–704, 2000.
- [125] R. Sherrington, E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, and et al. Cloning of a gene bearing missense

- mutations in early-onset familial alzheimer's disease. *Nature*, 375(6534):754–60, 1995.
- [126] K. Shirotani, D. Edbauer, A. Capell, J. Schmitz, H. Steiner, and C. Haass. Gamma-secretase activity is associated with a conformational change of nicastrin. *J Biol Chem*, 278(19):16474–7, 2003.
- [127] K. Shirotani, 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.
- [128] K. Shirotani, D. Edbauer, S. Prokop, C. Haass, and H. Steiner. Identification of distinct gamma-secretase complexes with different aph-1 variants. *J Biol Chem*, 279(40):41340–5, 2004.
- [129] M. Shoji, T. E. Golde, J. Ghiso, T. T. Cheung, S. Estus, L. M. Shaffer, X. D. Cai, D. M. McKay, R. Tintner, B. Frangione, and et al. Production of the alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*, 258(5079):126–9., 1992.
- [130] S. Sinha and I. Lieberburg. Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(20):11049–53., 1999.
- [131] P. H. St George-Hyslop. Molecular genetics of alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 47(3):183–99, 2000.
- [132] 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.
- [133] 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 beta-peptide production and notch signaling. *J Biol Chem*, 274(40):28669–73, 1999.
- [134] H. Steiner, M. Kostka, H. Romig, G. Basset, B. Pesold, J. Hardy, A. Capell, L. Meyn, M. L. Grim, R. Baumeister, K. Fichteler, and C. Haass. Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat Cell Biol*, 2(11):848–51, 2000.
- [135] 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 deltaexon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J Biol Chem*, 274(12):7615–8, 1999.

- [136] 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.
- [137] 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 gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem*, 277(42):39062–5, 2002.
- [138] W. J. Strittmatter, A. M. Saunders, D. Schmechel, M. Pericak-Vance, J. Englund, G. S. Salvesen, and A. D. Roses. Apolipoprotein e: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(5):1977–81, 1993.
- [139] G. Struhl and A. Adachi. Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell*, 6(3):625–36, 2000.
- [140] G. Struhl and I. Greenwald. Presenilin is required for activity and nuclear access of notch in drosophila. *Nature*, 398(6727):522–5., 1999.
- [141] G. Struhl and I. Greenwald. Presenilin-mediated transmembrane cleavage is required for notch signal transduction in drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(1):229–34., 2001.
- [142] P. J. Swiatek, C. E. Lindsell, F. F. del Amo, G. Weinmaster, and T. Gridley. Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev*, 8(6):707–19., 1994.
- [143] N. Takasugi, T. Tomita, I. Hayashi, M. Tsuruoka, M. Niimura, Y. Takahashi, G. Thinakaran, and T. Iwatsubo. The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature*, 422(6930):438–41, 2003.
- [144] Nobumasa Takasugi, Yasuko Takahashi, Yuichi Morohashi, Taisuke Tomita, and Takeshi Iwatsubo. The mechanism of gamma -secretase activities through high molecular weight complex formation of presenilins is conserved in drosophila melanogaster and mammals. *J. Biol. Chem.*, 277(51):50198–50205, 2002.
- [145] A. Tamaoka, T. Kondo, A. Odaka, N. Sahara, N. Sawamura, K. Ozawa, N. Suzuki, S. Shoji, and H. Mori. Biochemical evidence for the long-tail form (a beta 1-42/43) of amyloid beta protein as a seed molecule in cerebral deposits of alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 205(1):834–42, 1994.
- [146] A. Tamaoka, A. Odaka, Y. Ishibashi, M. Usami, N. Sahara, N. Suzuki, N. Nukina, H. Mizusawa, S. Shoji, I. Kanazawa, and et al. App717 missense mutation affects the ratio of amyloid beta protein species (a beta 1-42/43 and a beta 1-40) in familial alzheimer's disease brain. *J Biol Chem*, 269(52):32721–4, 1994.

- [147] 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.
- [148] G. Thinakaran, C. L. Harris, T. Ratovitski, F. Davenport, H. H. Slunt, D. L. Price, D. R. Borchelt, and S. S. Sisodia. Evidence that levels of presenilins (ps1 and ps2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *J Biol Chem*, 272(45):28415–22, 1997.
- [149] C. Van Broeckhoven, J. Haan, E. Bakker, J. A. Hardy, W. Van Hul, A. Wehnert, M. Vegter-Van der Vlis, and R. A. Roos. Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (dutch). *Science*, 248(4959):1120–2., 1990.
- [150] R. Vassar. The beta-secretase, bace: a prime drug target for alzheimer’s disease. *J Mol Neurosci*, 17(2):157–70., 2001.
- [151] 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. Beta-secretase cleavage of alzheimer’s amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease bace. *Science*, 286(5440):735–41., 1999.
- [152] D. M. Walsh, J. V. Fadeeva, M. J. LaVoie, K. Paliga, S. Eggert, W. T. Kimberly, W. Wasco, and D. J. Selkoe. gamma-secretase cleavage and binding to fe65 regulate the nuclear translocation of the intracellular c-terminal domain (icd) of the app family of proteins. *Biochemistry*, 42(22):6664–73., 2003.
- [153] J. Walter, J. Grunberg, A. Capell, B. Pesold, A. Schindzielorz, M. Citron, K. Mendla, P. S. 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.
- [154] N. Watanabe, T. Tomita, C. Sato, T. Kitamura, Y. Morohashi, and T. Iwatsubo. Pen-2 is incorporated into the gamma -secretase complex through binding to transmembrane domain 4 of presenilin 1. *J Biol Chem*, 2005.
- [155] 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, D. E. Kang, N. Marquez-Sterling, T. E. Golde, and E. H. Koo. A subset of nsaids lower amyloidogenic abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature*, 414(6860):212–6, 2001.

- [156] 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.
- [157] A. Weihofen and B. Martoglio. Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol*, 13(2):71–8, 2003.
- [158] Christine Wild-Bode, Tsuneo Yamazaki, Anja Capell, Uwe Leimer, Harald Steiner, Yasuo Ihara, and Christian Haass. Intracellular generation and accumulation of amyloid beta -peptide terminating at amino acid 42. *J. Biol. Chem.*, 272(26):16085–16088, 1997.
- [159] 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 gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry*, 38(15):4720–7, 1999.
- [160] 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 gamma-secretase activity. *Nature*, 398(6727):513–7, 1999.
- [161] G. T. Wong, D. Manfra, F. M. Poulet, Q. Zhang, H. Josien, T. Bara, L. Engstrom, M. Pinzon-Ortiz, J. S. Fine, H. J. Lee, L. Zhang, G. A. Higgins, and E. M. Parker. Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor ly-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem*, 279(13):12876–82. Epub 2004 Jan 6., 2004.
- [162] ed. World Health Organization (WHO). International statistical classification of diseases and related health problems, tenth revision (icd-10). *WHO, Genf*, 1992.
- [163] R. Yan, J. B. Munzner, M. E. Shuck, and M. J. Bienkowski. Bace2 functions as an alternative alpha-secretase in cells. *J Biol Chem*, 276(36):34019–27, 2001.
- [164] 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. Rogaev, M. Smith, C. Janus, Y. Zhang, R. Aebersold, L. S. Farrer, S. Sorbi, A. Bruni, P. Fraser, and P. St George-Hyslop. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaapp processing. *Nature*, 407(6800):48–54, 2000.
- [165] P. D. Zamore. Rna interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol*, 8(9):746–50., 2001.

-
- [166] Z. Zhang, P. Nadeau, W. Song, D. Donoviel, M. Yuan, A. Bernstein, and B. A. Yankner. Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-app and transmembrane cleavage of notch-1. *Nat Cell Biol*, 2(7):463–5, 2000.
- [167] Jun Zhao, Lisa Paganini, Lennart Mucke, Marissa Gordon, Larry Refolo, Mark Carman, Sukanto Sinha, Tilman Oltersdorf, Ivan Lieberburg, and Lisa McConlogue. beta -secretase processing of the beta -amyloid precursor protein in transgenic mice is efficient in neurons but inefficient in astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 271(49):31407–31411, 1996.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

1.1	Plaque	2
1.2	Tangles	2
1.3	Amyloidkaskade	3
1.4	APP-Prozessierung	5
1.5	Sekretase-Schnittstellen im APP und FAD-assoziierte Mutationen	6
1.6	PS1 FAD Mutationen	8
1.7	GxGD Proteasefamilie	9
1.8	Presenilin	12
1.9	Nicastrin	14
1.10	APH1	15
1.11	APH-1 Komplexe	16
1.12	PEN-2	16
1.13	γ -Sekretasekomplex	17
1.14	Komplex Assemblierung	18
2.1	PCR-Profil	21
2.2	RNAi Oligonukleotide und pSUPER Vektor	28
3.1	PEN-2 RNAi-Knockdown Einzelzellklone	43
3.2	Akkumulation von APP-CTFs im PEN-2KD	43
3.3	RNAi-“Silencer“ Konstrukt	44
3.4	Reversion des PEN-2KD Phänotyps	45
3.5	Reversion des γ -Sekretasedefekts des PEN-2KD	46
3.6	Reversionsvermögen von H ₆ X-PEN-2 und PEN-2- <i>mH₆</i>	47
3.7	Sequenzvergleich des PEN-2 Proteins verschiedener Organismen	48
3.8	Wichtigkeit des PEN-2 C-Terminus für die Reifung der γ -Sekretase	49
3.9	Defekte γ -Sekretase in PEN-2 Δ C Zellen	50
3.10	Stabilität der Komplexpartner in Kontrollzellen	51
3.11	Stabilität der Komplexpartner in Gegenwart von PEN-2 Δ C	52
3.12	Proteasomaler Abbau von PEN-2 Δ C und PS1 Fragmenten	54
3.13	PEN-2 Δ C γ -Sekretasekomplex-Bildung	56

3.14	PEN-2 und Reifung des γ -Sekretasekomplexes	58
3.15	PEN-2 und Aktivität des γ -Sekretasekomplexes	59
3.16	Sequenzvergleich des PEN-2 C-Terminus verschiedener Spezies	60
3.17	Schrittweise Verkürzung des PEN-2 C-Terminus	61
3.18	Die Länge des PEN-2 C-Terminus ist wichtig	62
3.19	Der Gesamtsequenzkontext des PEN-2 C-Terminus ist wichtig	63
3.20	γ -Sekretasekomplex-Bildung C-terminaler PEN-2 Mutanten	64
3.21	Proteasomaler Abbau der PEN-2 Mutanten und der PS1 Fragmente	66
3.22	Interaktion von PEN-2 Mutanten und PS1 Fragmenten	67
3.23	<i>In vitro</i> γ -Sekretaseaktivitätstest nach Co-Immünpräzipitation	68
3.24	Stabilisierter prämaturer Komplex ist nicht aktiv	69
4.1	Komplex Assemblierung	72
4.2	γ -Sekretasekomplex-Assemblierung mit PEN-2 Δ C	77

Tabellenverzeichnis

2.1	PCR-Oligonukleotide	20
2.2	PCR-Reaktionen	22
2.3	Plasmid-Konstrukte	23
2.4	Zelllinien	31
2.5	Inhibitoren	34
2.6	Antikörper zur Immunpräzipitation	36
2.7	SDS-Gele	38
2.8	Schägger Gel	39
2.9	Western Blotting Antikörper	41
5.1	rpm / x g -Umrechnungstabelle für Zentrifugen	105

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid- β -Peptid
β APP	β -Amyloid Precursor Protein
AD	Alzheimers disease
ADAM	a disintegrin metalloprotease family
AICD	APP intracellular domain
AK	Antikörper
APH-1	anterior pharynx defective phenotype
ApoE	ApolipoproteinE
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BACE 1 bzw. 2	β APP cleaving enzyme 1 bzw. 2
CHAPSO	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propan sulfonat
CTF	C-terminales Fragment
DMEM	Dulbeccos modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DH5 α	verwendeter Escherichia coli Stamm DH5 α
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	DesoxyNukleotidtriphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	familiar Alzheimers disease
FCS	foetal calf serum (foetales Kälberserum)
GFP	green flourescent protein
HRP	horseraddish peroxidase
LB-Medium	Low-salt Luria-Bertani Medium
min	Minute
MOPS	3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid
Nct	Nicastrin
NICD	Notch intracellular domain
NMDA	N-methyl-D-Aspartat (Subtyp des muskarinischen Acetylcholin-Rezeptors)
NTF	N-terminales Fragment
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei $\lambda=600\text{nm}$
PAS	Protein-A Sepharose
PBS	Phospate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEN-2	Presenilin enhancer 2
PEN-2KD	PEN-2-(RNAi)-Knockdown
PI	Protease-Inhibitor
PNK	Polynukleotid Kinase
PNS	postnuklear supernatant
PS	Presenilin

PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
PS _{holo}	Presenilin-Holoprotein
RNAi	RNA interference
RT	Raumtemperatur
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	<i>small</i> interfering RNA
Sw	HEK 293 SwAPP-Zellen
T _a	annealing Temperatur
T _m	Schmelztemperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
wt	Wildtyp

Verzeichnis der Firmen

Agfa	Köln (www.agfa.de)
Amersham-Bioscience	(www.amersham.com)
AppliChem	Darmstadt (www.applichem.de)
Baker	Phillipsburg, NJ, USA (www.jtbaker.com)
BD (Becton, Dickison and Company)	Heidelberg (www.bdeurope.com)
BD, Trans Lab (Transduction Laboratoires)	San Diego, Ca, USA (www.bdbiosciences.com)
Biomol	Hamburg (www.biomol.de)
Biorad	München (www.bio-rad.com)
Boehringer Ingelheim	Ingelheim (www.boehringer.com)
Corning	New York (www.corning.com)
Eppendorf	Hamburg (www.eppendorf.de)
Fermentas	(www.fermentas.com)
Fuji Film	Kiel (www.fujifilm.de)
GATC	Konstanz (www.GATC.de)
Gilson	Den Haag (www.gilson.com)
Heraeus	Hanau (www.heraeus.de)
Hundt-Wetzlar	Wetzlar
Invitrogen	Carlsbad, Ca, USA (www.invitrogen.com)
Merck	Darmstadt (www.merck.de)
Millipore	Schwalbach (www.millipore.com)
New England Biolabs (NEB)	Frankfurt a.M. (www.neb-online.de)
Nunc	Wiesbaden (www.nunc.de)
OHAUS	(www.ohaus.com)
PEQLAB	Erlangen (www.peqlab.de)
Perkin-Elmer	Wellesley, MA, USA (www.perkinelmer.com)
Promega	Mannheim (www.promega.com)
Roche	Grenzach, Basel (www.roche.de)
Roth	Karlsruhe (www.carl.roth.de)
Santa Cruz Biotechnology Inc.	Santa Cruz, Ca, USA (www.scbt.com)
Sarstedt	Nümbrecht (www.sarstedt.com)
Schleicher und Schuell	Dassel (www.schleicher-schuell.de)
SERVA	Heidelberg (www.serva.de)
Sigma (Sigma-Aldrich)	(www.sigmaaldrich.com)
Signet (Signet Laboratories)	Deadham, MA, USA (www.signetlabs.com)
Töpfer	Dietmannsried (www.toepfer-gmbh.de)
WTW	Weilheim (www.wtw.de)

Einbuchstabencode für 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

rpm / x g -Umrechnungstabelle für Zentrifugen

Megafuge 1,0 R (Heraeus):	
4500 rpm	1500 <i>x g</i>
Biofuge pico (Heraeus)	
3200 rpm	1000 <i>x g</i>
6000 rpm	3000 <i>x g</i>
13.000 rpm	16.000 <i>x g</i>
Biofuge fresco (Heraeus)	
3200 rpm	1000 <i>x g</i>
6000 rpm	3000 <i>x g</i>
13.000 rpm	16.000 <i>x g</i>
Ultrazentrifuge Optima Max-E (Beckman-Coulter)	
55.000 rpm	100.000 <i>x g</i>

Tabelle 5.1: rpm / *x g* -Umrechnungstabelle für Zentrifugen

Lebenslauf

Persönliche Daten

Stefan Prokop
geboren am 26.09.1978
in Starnberg

Ausbildung

1985-1989	Grundschule Hohenpeissenberg
1989-1998	Gymnasium Weilheim
1998	Abitur
Juli 1998 - April 1999	Grundwehrdienst in Kempten, Ulm und Murnau

Studium

Mai 1999	Beginn Studium der Humanmedizin an der LMU München
März 2001	Physikum
März 2002	Erstes Staatsexamen Medizin
September 2004	Zweites Staatsexamen Medizin
Oktober 2005	Drittes Staatsexamen Medizin
Oktober 2005	Approbation als Arzt

Stipendien

Mai 1999 bis Juni 2005	Stipendium nach dem Bayerischen Begabtenförderungsgesetz
April 2002 bis Oktober 2003	Stipendium des Promotionsstudiums Molekulare Medizin (Föfole der LMU)

Schriftenverzeichnis

- Steiner, H. and Winkler, E. and Edbauer, D. and Prokop, S. and Basset, G. and Yamasaki, A. and Kostka, M. and Haass, C.
PEN-2 is an integral component of the γ -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin,
J Biol Chem,2002,277(42):p39062-5
- Prokop S., Shirotani K., Edbauer D., Haass C. and Steiner H.,
Requirement of PEN-2 for stabilization of the Presenilin NTF/CTF heterodimer within the γ -secretase complex,
J Biol Chem,2004,278(22):p 23255-61.
- Shirotani, K. and Edbauer, D. and Prokop, S. and Haass, C. and Steiner, H.
Identification of distinct γ -secretase complexes with different APH-1 variants,
J Biol Chem,279(40):p41340-5
- Capell, A., Beher, D., Prokop, S., Steiner, H., Kaether, C., Shearman, M. S. and Haass, C.
 γ -Secretase complex assembly within the early secretory pathway,
J Biol Chem, 280(8),:p 6471-8
- Prokop S., Haass C. and Steiner H.,
Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain determines its function in the stabilization of presenilin fragments,
J Neurochem,2005,94(1):p57-62

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Christian Haass für die Überlassung dieses interessanten Themas und die stetige Unterstützung bei den ersten und weiterführenden Schritten in der Wissenschaft.

Einen immer zuverlässigen und engagierten Betreuer fand ich in Herrn PD Dr. Harald Steiner. Er war unermüdlich in endlosen Diskussionen und teilte bereitwillig sein unerschöpfliches Wissen an Methoden und Publikationen.

Bei vielen Problemen stand Dr. Dieter Edbauer immer hilfreich mit Tipps und Tricks zur Seite. Vor allem endlose Laborabende wurden durch musikalische Unterma- lung erträglich gestaltet.

Gabi Basset und Edith Winkler hatten immer ein offenes Ohr für kleinere und größere experimentelle Schwierigkeiten.

Dem gesamten Haass-Labor, vor allem Anja Capell, Sven Lammich und Philipp Kahle, danke ich für die herzliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit.

Diese Arbeit wurde durch ein Stipendium des Promotionsstudiums Molekulare Medizin, initiiert von Prof. Dr. Dr. Heesemann und Mitarbeitern unterstützt.

Ohne die stetige Unterstützung und Aufmunterung durch meine Eltern und Tanja wäre die Fertigstellung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Ihre Bereitschaft an vielen langen Abenden, Wochenenden und Feiertagen auf mich zu verzichten, erlaubte es mir meiner Leidenschaft nachzugehen.

Publikation I

**Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin
N-/C-terminal fragment heterodimer within the γ -secretase
complex**

Requirement of PEN-2 for Stabilization of the Presenilin N-/C-terminal Fragment Heterodimer within the γ -Secretase Complex*

Received for publication, February 18, 2004, and in revised form, March 22, 2004
Published, JBC Papers in Press, March 23, 2004, DOI 10.1074/jbc.M401789200

Stefan Prokop, Keiro Shirovani, Dieter Edbauer, Christian Haass[‡], and Harald Steiner[§]

From the Adolf-Butenandt-Institute, Department of Biochemistry, Laboratory for Alzheimer's and Parkinson's Disease Research, Schillerstrasse 44, Ludwig-Maximilians-University, 80336 Munich, Germany

γ -Secretase is a protease complex composed of presenilin (PS), nicastrin (NCT), APH-1, and PEN-2, which catalyzes intramembrane cleavage of several type I transmembrane proteins including the Alzheimer's disease-associated β -amyloid precursor protein. We generated stable RNA interference-mediated PEN-2 knockdown cells to probe mutant PEN-2 variants for functional activity. Knockdown of PEN-2 was associated with impaired NCT maturation and deficient PS1 endoproteolysis, which was efficiently rescued by wild type or N-terminally tagged PEN-2 but not by C-terminally tagged PEN-2 or by the C-terminally truncated PEN-2- Δ C mutant. Although the latter mutants rescued the PS1 holoprotein accumulation associated with the PEN-2 knockdown, they failed to restore normal levels of the PS1 N- and C-terminal fragments and to mature NCT. PEN-2- Δ C was highly unstable and rapidly turned over by proteasomal degradation consistent with its failure to become stably incorporated into the γ -secretase complex. In addition, expression of PEN-2- Δ C caused a selective instability of the PS1 N-/C-terminal fragment heterodimer that underwent proteasomal degradation, whereas NCT and APH-1 were stable. Interestingly, when we knocked down PEN-2 in the background of the endoproteolysis-deficient PS1 Δ exon9 mutant, immature NCT still accumulated, demonstrating that PEN-2 is also required for γ -secretase complex maturation when PS endoproteolysis cannot occur. Taken together, our data suggest that PEN-2 is required for the stabilization of the PS fragment heterodimer within the γ -secretase complex following PS endoproteolysis. This function critically depends on the PEN-2 C terminus. Moreover, our data show that PEN-2 is generally required for γ -secretase complex maturation independent of its activity in PS1 endoproteolysis.

The Alzheimer's disease (AD)¹-associated γ -secretase is a high molecular weight complex with an aspartyl protease ac-

tivity that catalyzes the second of two subsequent proteolytic cleavages of the β -amyloid precursor protein (APP) implicated in AD (1). This unusual, intramembranous cleavage liberates the neurotoxic amyloid- β peptide from the membrane. Amyloid- β peptide aggregates and is deposited in the brain of AD patients in amyloid plaques, an invariant pathological hallmark of AD (2). The γ -secretase complex is composed of either of the two presenilins (PS), PS1 and PS2, polytopic membrane proteins that are endoproteolytically cleaved into stable heterodimers consisting of an N- and C-terminal fragment (NTF and CTF) (3), the type I transmembrane glycoprotein nicastrin (NCT) (4, 5), and the polytopic membrane proteins PEN-2 (6), APH-1a, and/or APH-1b (6, 7). Expression of the γ -secretase complex components is coordinately regulated. RNA interference (RNAi)-mediated knockdown studies in cultured *Drosophila* and mammalian cells as well as studies with cells derived from PS1, PS1/2, or NCT knockout mice have shown that γ -secretase complex formation is coordinately regulated. Down-regulation or genetic ablation of a given component typically causes a decrease in the level of the other components and/or in the maturation and trafficking of the γ -secretase complex to its functional sites (6, 8–18). An exception is APH-1, which is stable in the absence of PS (13, 19, 20). Increased γ -secretase complex formation and activity have been observed when all four γ -secretase complex components are overexpressed in cultured *Drosophila* and mammalian cells (17, 21, 22). Moreover, reconstitution of γ -secretase complex formation and activity has recently been achieved in yeast, an organism that lacks any endogenous γ -secretase activity (23). This demonstrated that coexpression of all four components is necessary and sufficient for the reconstitution of γ -secretase activity (23).

Overexpression and RNAi-mediated knockdown studies with cultured *Drosophila* cells have provided a first model of how the γ -secretase complex assembles (17). These studies indicate that the PS holoprotein may assemble first with NCT and/or APH-1 to form a stable assembly intermediate (17). Subsequent assembly of PEN-2 with this intermediate drives the conversion of the PS holoprotein into the active heterodimer (17). Furthermore, a potential NCT/APH-1 assembly intermediate has been observed recently (24), and NCT has been shown to stably interact with APH-1 in the absence of PS (20, 25). Interestingly, γ -secretase complex assembly is associated with a conformational change of the NCT ectodomain, which adopts a protease-resistant conformation (26). At present, little is known about the subunit organization within the γ -secretase

pharynx defective; APP, β -amyloid precursor protein; NCT, nicastrin; PEN, presenilin enhancer; PS, presenilin; NTF, N-terminal fragment; CTF, C-terminal fragment; wt, wild type; swAPP, Swedish mutant APP; CHAPSO, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid; RNAi, RNA interference; HEK 293, human embryonic kidney 293.

* This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB 596 Molecular Mechanisms of Neurodegeneration (to C. H. and H. S.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[‡] To whom correspondence may be addressed: Adolf-Butenandt-Institute, Ludwig-Maximilians-University Munich, Dept. of Biochemistry, Schillerstr. 44, 80336 Munich, Germany. Tel.: 49-89-5996-471/472; Fax: 49-89-5996-415; E-mail: chaass@med.uni-muenchen.de.

[§] To whom correspondence may be addressed: Adolf-Butenandt-Institute, Ludwig-Maximilians-University Munich, Dept. of Biochemistry, Schillerstr. 44, 80336 Munich, Germany. Tel.: 49-89-5996-480; Fax: 49-89-5996-415; E-mail: hsteiner@med.uni-muenchen.de.

¹ The abbreviations used are: AD, Alzheimer's disease; APH, anterior

complex. However, recent studies (27, 28) suggest that PS is a dimer within the γ -secretase complex. In addition, an interaction of the PS1 NTF with PEN-2 has been reported (29).

A large body of evidence suggests that PS carries the catalytic site of the γ -secretase complex. Mutagenesis of conserved aspartates in transmembrane domains 6 and 7 of PS (30, 31) as well as aspartyl protease transition state analogues, which bind to the PS heterodimer (32, 33), inhibit γ -secretase activity. Moreover, PS belongs to a novel group of several polytopic aspartyl protease families (1, 34), which are defined by the presence of highly conserved, short GXGD active site motifs (35–37). Besides their requirement for γ -secretase complex assembly and maturation, the precise functional role of the other γ -secretase complex components is unclear. In particular, apart from its role in facilitation of PS endoproteolysis (14, 17), functional information about the smallest subunit, the ~10-kDa PEN-2 protein, is scarce. In order to gain further insight into its functional role, we thus initiated a structure-function analysis of this protein.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies—The polyclonal antibody 1638 raised to the N terminus of human PEN-2 (11), the polyclonal and monoclonal antibodies against the PS1 C terminus (3027 and BL3D7) (38), the N terminus (2953) (39), and PS1N (40), and the polyclonal antibody to the C terminus of APP (6687) (36) were described previously. The polyclonal antibodies 433 and 434 were generated against the APH-1 α L C terminus (residues 245–265) and affinity-purified using a GST-APH-1 α L (residues 207–265) fusion protein. The polyclonal antibody N1660 against the C terminus of NCT and the anti- β -actin antibody were obtained from Sigma, the anti-Xpress antibody was obtained from Invitrogen; the anti- β -catenin antibody was from Transduction Laboratories, and the anti-Myc antibody 9E10 was from Santa Cruz Biotechnology.

cDNA Constructs—To stably knock down endogenous PEN-2 expression by RNAi, short hairpin RNA oligonucleotides (PEN-2-163) corresponding to the PEN-2-160 target region (11) were cloned into the pSUPER vector (41). Silencer mutations that do not alter the encoded amino acid sequence (5'-AAGGGATACGTGTGGCGATCTGC-3', the mutations are underlined) were introduced in all PEN-2 constructs to escape RNAi. PCR-mediated mutagenesis was used to generate mutant PEN-2 variants. Wild type and mutant PEN-2 variants were cloned into the pcDNA3.1/Zeo(+) vector (Invitrogen). N-terminal hexahistidine-Xpress (H₆X) epitope-tagged and C-terminal myc-hexahistidine (mH₆) epitope-tagged PEN-2 wild type or mutant PEN-2 variants were generated by cloning the respective cDNAs into the pcDNA4/HisC (Invitrogen) or pcDNA4/myc-HisA (Invitrogen) expression vectors. All constructs were verified by DNA sequencing.

Cell Culture and Cell Lines—Stably transfected human embryonic kidney 293 (HEK 293) cells were cultured as described (9). A stable PEN-2 knockdown cell line was generated by cotransfection of HEK 293 cells stably expressing Swedish mutant APP (swAPP) (42) with pSUPER/PEN-2-163 and pcDNA3.1/Hygro(-) (Invitrogen) and selection for hygromycin (150 μ g/ml) resistance. The PEN-2 knockdown cell line was subsequently stably transfected with the indicated wt and mutant PEN-2 constructs. Likewise, PEN-2 was stably knocked down in HEK 293 cells stably coexpressing swAPP and PS1 Δ exon9 (38).

Protein Analysis—Membrane fractions of HEK 293 cells were obtained by ultracentrifugation of postnuclear supernatant fractions from cell homogenates that were prepared as described (43). For direct immunoblot analysis, membrane fractions were solubilized with STEN-lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, protease inhibitors (Sigma)). After a clarifying spin, lysates were analyzed for PEN-2 by immunoblotting with antibody 1638, for PS1 by immunoblotting with antibodies PS1N or 3027, for NCT with antibody N1660, for APH-1 α L by immunoblotting with antibody 433 or 434, and for APP and APP CTFs by immunoblotting with antibody 6687. For coimmunoprecipitation analysis, membrane fractions were solubilized in CHAPSO-lysis buffer (1% CHAPSO, 150 mM sodium citrate, pH 6.4, protease inhibitors (Sigma)), subjected to a clarifying spin by ultracentrifugation, and incubated with preimmune serum, N1660 or 2953 antibody, and protein G-Sepharose for 2 h at 4 °C. Following two washes with CHAPSO-wash buffer (0.5% CHAPSO, 150 mM sodium citrate, pH 6.4), the immunoprecipitates were subjected to immunoblot analysis as above.

RESULTS

In order to identify functional domains of PEN-2 required for γ -secretase complex formation, maturation, and activity, we generated a HEK 293 cell line stably overexpressing Swedish mutant APP (HEK 293/sw) in which PEN-2 expression is stably knocked down by RNAi (Fig. 1A). This PEN-2 knockdown cell line was stably transfected with cDNA constructs encoding RNAi-resistant wt and mutant PEN-2 variants to assess their capability to rescue PEN-2 deficiency. We first transfected the PEN-2 knockdown cells with cDNA constructs encoding untagged wt PEN-2 and N-terminal hexahistidine-Xpress (H₆X) epitope-tagged and C-terminal myc-hexahistidine (mH₆) epitope-tagged wt PEN-2. All three proteins were stably expressed at robust levels, and as expected, the tagged PEN-2 variants migrated at higher molecular weight than untagged PEN-2 (Fig. 1A). Consistent with previous results (6, 17, 24), the PEN-2 knockdown was associated with reduced γ -secretase activity as manifested by the accumulation of APP CTFs, which was rescued by the expression of wt PEN-2 and H₆X-PEN-2 (Fig. 1B). APP CTFs also accumulated when PEN-2-mH₆ was expressed indicating that the authentic C terminus of PEN-2 is critical for γ -secretase activity.

We next sought to investigate why expression of PEN-2-mH₆ caused a defect in γ -secretase activity, and we asked whether a defect in γ -secretase complex maturation was responsible for the observed loss of γ -secretase function. To confirm further the functional importance of the PEN-2 C terminus, we also constructed a PEN-2 variant with a C-terminal truncation of 17 amino acids (PEN-2- Δ C), and we expressed it stably in the PEN-2 knockdown cells (Fig. 1C). We first investigated the maturation of PS. Consistent with previous results (11, 14, 24), down-regulation of PEN-2 was associated with reduced levels of PS fragments and an accumulation of the PS1 holoprotein (Fig. 1D). Expression of untagged PEN-2 allowed efficient recovery of PS1 holoprotein endoproteolysis (Fig. 1D). In contrast, expression of PEN-2-mH₆ and of PEN-2- Δ C caused an intriguing, unexpected biochemical phenotype. Although the PS1 holoprotein did not accumulate anymore, the levels of the PS1 NTF and CTF were strongly reduced similar to those observed in the PEN-2 knockdown cells (Fig. 1D). Thus, although the PEN-2 C terminus appears to be dispensable for PS1 endoproteolysis, it is required for the maintenance of normal levels of the PS fragments. As reported previously (11, 24), the PEN-2 knockdown caused impaired NCT maturation, which was efficiently restored by the expression of untagged PEN-2 (Fig. 1E). Interestingly, the levels of APH-1 α L were largely unaffected by the knockdown of PEN-2 (Fig. 1E). Neither PEN-2-mH₆ nor PEN-2- Δ C rescued the maturation defect of NCT (Fig. 1D). Consequently, as observed for PEN-2-mH₆ (Fig. 1B), expression of PEN-2- Δ C was associated with impaired γ -secretase activity as judged from the accumulation of APP CTFs (Fig. 1F). Thus, either addition of an epitope tag to the C terminus or a large deletion of it abrogated PEN-2 function in γ -secretase complex formation, stability, maturation, and activity. Taken together, these data suggest that the C terminus is a functionally important domain of PEN-2 required for the stabilization of PS fragments.

We next asked why the C-terminal PEN-2 variants failed to stabilize PS1 fragments. To address this question we sought to investigate the stability of PEN-2- Δ C and treated cells with cycloheximide to block *de novo* protein synthesis. We first investigated the stability of the γ -secretase complex components in control and PEN-2 knockdown cells. As expected, endogenous PEN-2, PS1 fragments, NCT, and APH-1 α L were stable in control cells (Fig. 2A). Similarly, residual endogenous PEN-2 in the knockdown cells was stable as were the PS1 holoprotein,

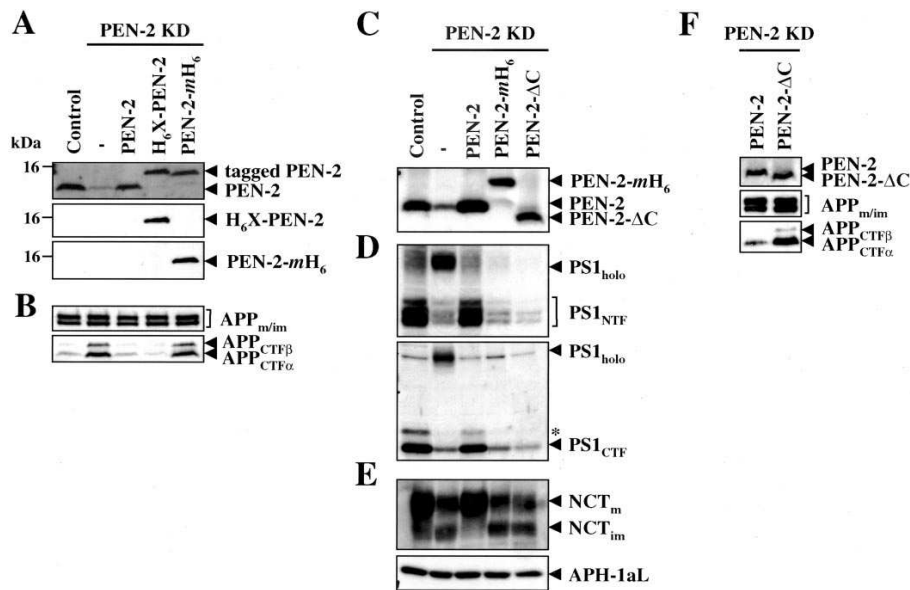


FIG. 1. Integrity of the C-terminal domain of PEN-2 is required for γ -secretase complex maturation. *A*, membrane fractions of HEK 293 cells stably overexpressing swAPP (HEK 293/sw, control), PEN-2 knockdown cells (HEK 293/sw cells in which PEN-2 expression is stably down-regulated by RNAi, PEN-2 KD), and PEN-2 knockdown cells stably transfected with RNAi-resistant cDNA constructs encoding wt PEN-2 and H₆X-PEN-2 and PEN-2-mH₆ were analyzed for PEN-2 by immunoblotting with antibodies 1638 (to the PEN-2 N terminus), anti-Xpress (to the Xpress epitope), and 9E10 (to the myc epitope). *B*, membrane fractions of cell lines described in *A* were analyzed for APP and APP CTFs generated by β - and α -secretase by immunoblotting with antibody 6687 (to the APP C terminus). *C*, membrane fractions from the indicated HEK 293/sw (control), PEN-2 knockdown, or PEN-2 knockdown cells stably transfected with cDNA constructs encoding RNAi-resistant wt PEN-2, PEN-2-mH₆, or PEN-2-ΔC were analyzed for PEN-2 as in *A*. *D*, membrane fractions of cell lines described in *C* were analyzed for PS1 holoprotein, NTF, and CTF by immunoblotting with antibodies PS1N (to the PS1 N terminus) and 3027 (to the PS1 loop). The asterisk indicates the phosphorylated form of the PS1 CTF (39). *E*, membrane fractions of cell lines described in *C* were analyzed for NCT and APH-1aL by immunoblotting with antibodies N1660 (to the NCT C terminus) and 433 (to the APH-1aL C terminus). *F*, membrane fractions of PEN-2 knockdown cells stably expressing RNAi-resistant wt PEN-2 or PEN-2-ΔC were analyzed for PEN-2 as in *A* and for APP and APP CTFs as in *B*.

NCT, and APH-1aL in these cells (Fig. 2A), consistent with previous results (17). We then analyzed the stability of PEN-2 or PEN-2-ΔC expressed in the background of PEN-2 knockdown cells. wt PEN-2 occurred as a stable protein (Fig. 2B). In contrast, cycloheximide treatment revealed that PEN-2-ΔC was highly unstable and almost completely turned over within 3 h (Fig. 2B). We next investigated the stability of PS1, NCT, and APH-1aL in the background of wt PEN-2 and PEN-2-ΔC expression. The PS1 fragments, NCT and APH-1aL, were stable in the PEN-2 knockdown cells stably expressing wt PEN-2. In contrast, in the PEN-2-ΔC-expressing knockdown cells, the already low levels of PS1 fragments dropped further during the time course of the cycloheximide treatment. This indicates that the PS1 fragments were not stabilized and thus turned over (Fig. 2B). Interestingly, immature NCT and APH-1aL as well as the low levels of residual mature NCT (because of the incomplete PEN-2 knockdown) remained stable (Fig. 2B), consistent with the observation that these two proteins can independently stabilize each other (13, 20, 24, 25). Taken together, these data demonstrate that PEN-2-ΔC is highly unstable. Furthermore, these data indicate that expression of PEN-2-ΔC might cause a selective destabilization of the PS1 NTF/CTF heterodimer within the γ -secretase complex.

We next asked which proteolytic pathway might be involved

in the degradation of PEN-2-ΔC and the destabilized PS1 fragments. Because we had shown previously that excess amounts of free PS proteins that have not undergone complex formation are rapidly turned over by proteasomal degradation (44), we treated the above-described cells with the highly potent and specific proteasome inhibitor *clasto*-lactacystin β -lactone (45). To control the inhibitor treatment, we monitored the appearance of polyubiquitinated β -catenin species (44, 46). As expected from their stable behavior shown above, *clasto*-lactacystin β -lactone treatment did not result in increased levels of endogenous PEN-2 in control cells or of the residual endogenous PEN-2 in the PEN-2 knockdown cells (Fig. 3A). The levels of wt PEN-2 expressed in the background of PEN-2 knockdown cells were slightly increased indicating degradation of excess free amounts (Fig. 3A). In contrast, *clasto*-lactacystin β -lactone treatment caused a very strong increase in the levels of PEN-2-ΔC (Fig. 3A) suggesting that the proteasome degrades this unstable protein. The levels of endogenous PS1 fragments in control or of residual endogenous PEN-2 in the knockdown cells were unchanged upon *clasto*-lactacystin β -lactone treatment (Fig. 3B). A slight increase in the levels of the PS1 holoprotein was observed in the PEN-2 knockdown cells suggesting proteasomal degradation of minor amounts of unstable free holoprotein (Fig. 3B). As expected, no increase in the levels of the PS1

23258

PEN-2-dependent Stabilization of PS NTF/CTF Heterodimer

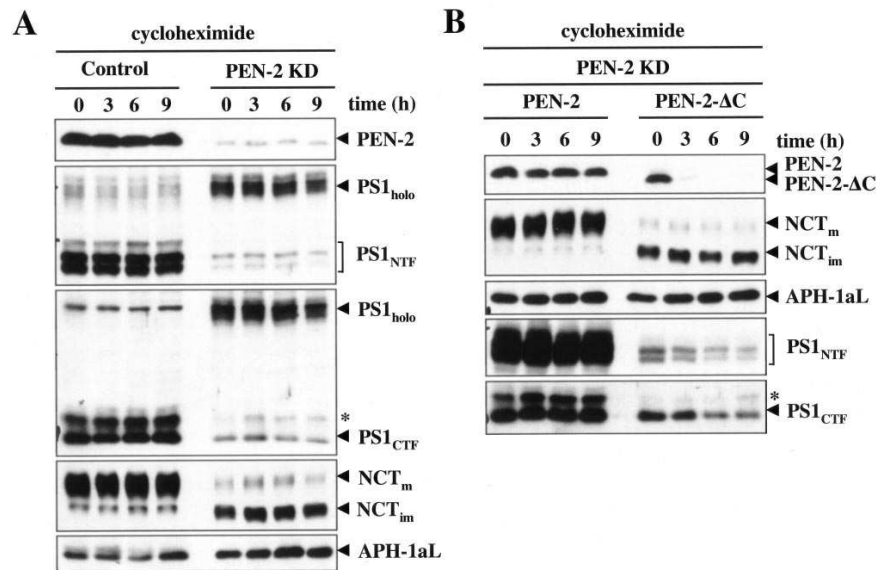


FIG. 2. **PEN-2-ΔC is unstable.** A, membrane fractions of HEK 293/sw cells (control) or PEN-2 knockdown cells were treated with cycloheximide (100 μ g/ml) for the indicated time to block *de novo* protein synthesis. Membrane fractions were prepared and analyzed for PEN-2, PS1, NCT, and APH-1aL as described in Fig. 1. The asterisk indicates the phosphorylated form of the PS1 CTF (39). B, PEN-2 knockdown or PEN-2 knockdown cells stably expressing RNAi-resistant wt PEN-2 or PEN-2-ΔC were treated with cycloheximide as in A and analyzed for PEN-2, PS1, NCT, and APH-1aL as in Fig. 1. The asterisk indicates the phosphorylated form of the PS1 CTF (39).

fragments was observed in PEN-2 knockdown cells expressing wt PEN-2 (Fig. 3B). In contrast, the levels of the PS1 fragments were markedly increased in PEN-2 knockdown cells expressing PEN-2-ΔC, suggesting that following their generation by endoproteolysis, the destabilized fragments were degraded by the proteasome (Fig. 3B). No increase in the levels of the PS1 holoprotein was observed, further supporting that the PS1 holoprotein had undergone endoproteolysis and not simply undergone proteasomal degradation. Consistent with their stable behavior shown above (Fig. 2, A and B), levels of immature and mature forms of NCT as well as of APH-1aL were unaffected upon proteasome inhibition (Fig. 3C). In summary, these results suggest that PEN-2-ΔC is capable of initiating PS1 endoproteolysis. However, the resulting PS1 NTF and CTF are not stabilized and like PEN-2-ΔC itself are degraded by the proteasome.

The results described above demonstrate that PEN-2-ΔC is highly unstable and indicate that the cause of its instability may be due to a defect in stable γ -secretase complex formation. We therefore next asked whether PEN-2-ΔC might have lost its capability to stably associate with the other γ -secretase complex components. Membrane fractions were isolated from PEN-2 knockdown cells stably transfected with wt PEN-2 or PEN-2-ΔC and were detergent-solubilized with CHAPSO. The CHAPSO-extracted membrane proteins were subjected to coimmunoprecipitation analysis with antibodies to NCT and PS1. Robust amounts of wt PEN-2, PS1 NTF, and CTF as well as APH-1aL and mature NCT were coimmunoprecipitated with both antibodies in the CHAPSO-solubilized membrane fractions derived from the wt PEN-2-expressing cells (Fig. 4). In

contrast, both antibodies failed to coimmunoprecipitate significant amounts of PEN-2-ΔC in the CHAPSO-solubilized membrane fractions derived from the PEN-2-ΔC-expressing cells, suggesting that PEN-2-ΔC failed to stably interact with the other γ -secretase complex components (Fig. 4). The anti-NCT antibody coimmunoprecipitated APH-1aL with immature NCT in the CHAPSO-solubilized membrane fractions from the PEN-2-ΔC-expressing cells, consistent with their independent stable interaction (13, 20, 24, 25). Thus, these data demonstrate that PEN-2-ΔC does not undergo stable γ -secretase complex formation. As a consequence, the protein becomes unstable and undergoes rapid proteasomal degradation.

The observation by others (14, 17, 24) and us (Fig. 1C) that a PEN-2 knockdown causes an accumulation of the PS holoprotein suggests that PEN-2 is required for PS endoproteolysis. However, as shown above, PEN-2-mH₆ and PEN-2-ΔC are defective in the stabilization of the PS1 NTF and CTF but not in endoproteolysis. This suggests that following endoproteolysis, PEN-2 also becomes necessary for stabilization of the active site PS heterodimer, and consequently for the further maturation of the γ -secretase complex. In addition, following PS endoproteolysis PEN-2 apparently remains bound to the γ -secretase complex (11, 17, 21, 22), further indicating that PEN-2 may have a function independent of PS endoproteolysis. To directly prove this, we investigated the consequences of PEN-2 down-regulation in the background of PS1 Δ exon9 (47), a FAD-associated PS1 variant that undergoes stable γ -secretase complex formation (48) but that does not undergo endoproteolysis because of a deletion of the cleavage site domain (3, 38). Indeed, when we stably knocked down PEN-2 expression by RNAi in

FIG. 3. Proteasomal degradation of PEN-2-ΔC and the PS1 NTF and CTF. A, HEK 293/sw (control), PEN-2 knockdown, and PEN-2 knockdown cells stably expressing RNAi-resistant wt PEN-2 or PEN-2-ΔC were treated with *clasto*-lactacystin β-lactone (10 μg/ml) for 24 h. Membrane fractions were prepared and analyzed for PEN-2 as in Fig. 1. To control the inhibitor treatment, we monitored the appearance of polyubiquitinated β-catenin species (44, 46) by immunoblotting with an anti-β-catenin antibody. B, membrane fractions of cell lines described in A were analyzed for PS1 holoprotein, NTF, and CTF by immunoblotting as described in Fig. 1E. To control for equal amounts of protein loaded, levels of β-actin were monitored by immunoblotting with an anti-β-actin antibody. The *asterisk* indicates the phosphorylated form of the PS1 CTF (39). C, membrane fractions of cell lines described in A were analyzed for NCT and APH-1aL by immunoblotting as described in Fig. 1E.

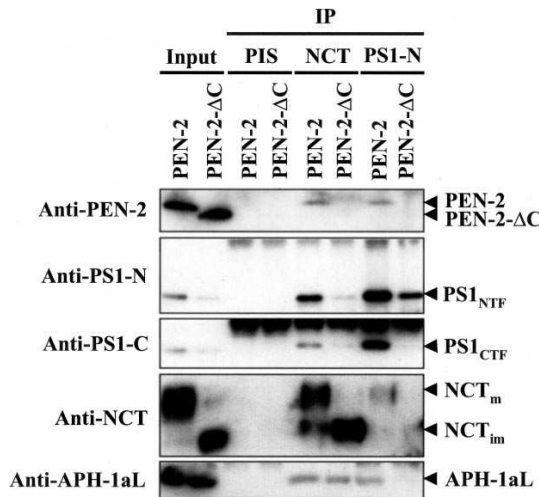
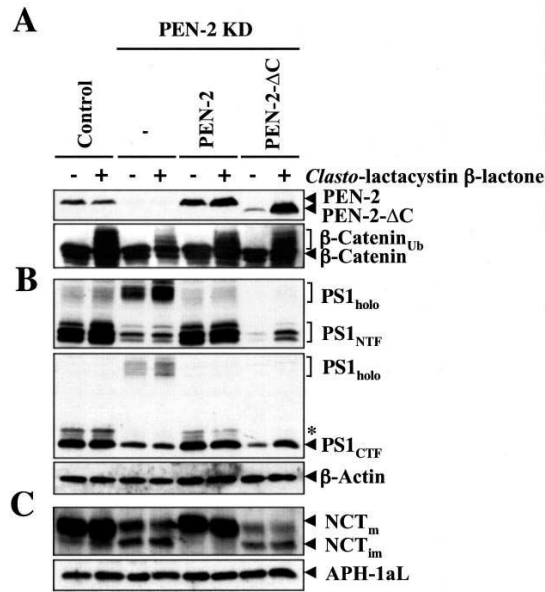


FIG. 4. PEN-2-ΔC fails to undergo stable γ-secretase complex formation. Membrane fractions of PEN-2 knockdown cells stably expressing RNAi-resistant wt PEN-2 and PEN-2ΔC were solubilized with CHAPSO and analyzed for γ-secretase complex formation by immunoprecipitation (IP) with antibodies 2953 and N1660 or preimmune serum (PIS) and immunoblotting with antibodies 1638, N1660, PS1N and BI.3D7, and 434 (to the APH-1aL C terminus) as in Fig. 1. The *input* lanes represent 25% of the material used for the immunoprecipitation.

HEK 293/sw cells stably expressing PS1 Δexon9 (38), NCT maturation was impaired (Fig. 5). Consistent with the results shown above, APH-1aL levels were largely unaffected by the knockdown of PEN-2 (Fig. 5). Thus, these data show that PEN-2 has a general function in the maturation of the γ-secretase complex, which is independent from its role in PS endoproteolysis.

DISCUSSION

Little functional information is available about PEN-2, the smallest of the four essential subunits of the γ-secretase complex. RNAi-mediated knockdown experiments in *Drosophila* and mammalian cells demonstrated that a knockdown of PEN-2 is associated with reduced PS fragment levels and ac-

23260

PEN-2-dependent Stabilization of PS NTF/CTF Heterodimer

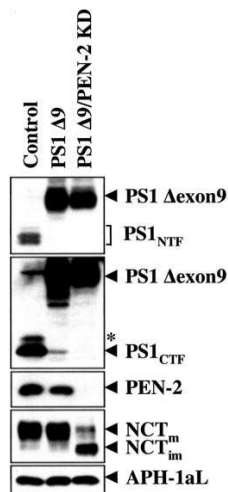


FIG. 5. PEN-2 is required for γ -secretase complex maturation independent of its role in PS endoproteolysis. Membrane fractions of HEK 293/sw cells (*control*), HEK 293/sw cells stably expressing PS1 Δ exon9, and HEK 293/sw cells stably coexpressing PS1 Δ exon9 and PEN-2 short interfering RNA were analyzed for PEN-2, PS1, NCT, and APH-1 α L as in Fig. 1. The asterisk indicates the phosphorylated form of the PS1 CTF (39).

accumulation of the PS holoprotein (6, 11, 14, 17). Moreover, it has been shown that PEN-2 not only forms stable associates with the PS fragments but can also associate with the PS holoprotein (14). Accordingly, PEN-2 has been suggested to play an important role in γ -secretase complex maturation by conversion of the PS holoprotein into the PS NTF/CTF heterodimer (14, 17). To better understand PEN-2 function and to define its functional domains, we initiated a structure-function analysis of PEN-2 using a stable knockdown cell line in which loss of PEN-2 function can be assayed by functional complementation. Consistent with previous findings, stable knockdown of PEN-2 was associated with impaired NCT maturation, reduced PS fragment levels, and an accumulation of the PS1 holoprotein. This defect in γ -secretase complex maturation was efficiently rescued by expression of untagged or N-terminal-tagged but not by C-terminal tagged PEN-2, suggesting that the C terminus of PEN-2 is a functionally critical domain, which is sensitive to steric alteration. Indeed, expression of the C-terminal truncated PEN-2- Δ C variant also caused loss of PEN-2 function. Both C-terminal loss of function mutants of PEN-2 showed very similar if not identical biochemical behavior. NCT maturation was impaired, and the defective PS1 holoprotein accumulation was rescued without stabilization of the PS1 fragments. Thus, these PEN-2 variants are apparently capable of initiating PS1 endoproteolysis but cannot stabilize the PS fragments generated. A possible reason for the failure of PEN-2 with a C-terminal alteration to stabilize the resulting PS1 NTF and CTF is its own instability within the γ -secretase complex. Indeed, PEN-2- Δ C failed to undergo stable γ -secretase complex formation. As a consequence, PEN-2- Δ C behaved as a highly unstable protein and was rapidly turned over by the proteasome. This is in contrast to correctly assembled γ -secretase complex components, which have been shown to be very

stable and have a long half-life time (9, 17, 44, 48). The failure of PEN-2- Δ C to stably assemble with PS, NCT, and APH-1 was associated with a marked selective instability of the PS1 NTF and CTF, which also underwent proteasomal degradation, whereas NCT and APH-1 were stable, consistent with previous findings that these proteins can stabilize each other independently (20, 24, 25). These data suggest that PEN-2 has a dual function as follows: a function in the initiation of PS endoproteolysis as a first maturation step during γ -secretase complex assembly, and a second function in the stabilization of the PS fragment heterodimer within the γ -secretase complex that is required for further maturation of the γ -secretase complex. Finally, when we knocked down PEN-2 in the background of the endoproteolysis-deficient PS1 Δ exon9 mutant, NCT accumulated as an immature protein demonstrating that PEN-2 is also required for γ -secretase complex maturation under conditions when PS endoproteolysis cannot occur. Thus, PEN-2 is generally required for γ -secretase complex maturation independent of its role in PS endoproteolysis.

Taken together, our data add important new functional information on PEN-2 in γ -secretase complex assembly, maturation, and activity. We suggest that during γ -secretase complex assembly, PEN-2 interacts with the PS holoprotein that is stabilized by immature NCT and APH-1. Upon interaction with PEN-2, the PS holoprotein may adopt a conformation that allows PS endoproteolysis. Following PS endoproteolysis, the PS NTF and CTF are stabilized by PEN-2 which itself has become stabilized within the complex. Whereas the C-terminal domain of PEN-2 is dispensable for the PS endoproteolysis, the stabilization of the NTF/CTF heterodimer and of PEN-2 itself is only possible when PEN-2 carries an intact and/or accessible C terminus. This strongly suggests that the C terminus carries important sequence information, which may be required to stably interact with other γ -secretase complex components. These stabilizing interactions are necessary for further maturation of the γ -secretase complex by trafficking through the secretory pathway. Future work will aim at elucidating the molecular basis for the critical requirement of the PEN-2 C terminus in γ -secretase complex assembly, maturation, and activity.

Acknowledgment—We thank Dr. Ralph Nixon for the kind gift of monoclonal antibody PSIN.

REFERENCES

- Haass, C., and Steiner, H. (2002) *Trends Cell Biol.* **12**, 556–562
- Selkoe, D. J. (2001) *Physiol. Rev.* **81**, 741–766
- Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, P., Nordstedt, C., Seeger, M., Hardy, J., Levey, A. I., Gandy, S. E., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L., and Sisodia, S. S. (1996) *Neuron* **17**, 181–190
- Goutte, C., Hepler, W., Mickey, K. M., and Priess, J. R. (2000) *Development* **127**, 2481–2492
- Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogava, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D. S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D. M., Xu, D. H., Sato, C., Rogava, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebersold, R., Farrer, L. S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., and St George-Hyslop, P. (2000) *Nature* **407**, 48–54
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M. C., Parks, A. L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R. L., Himes, C. S., Hiesch, R. D., Ruble, C., Nye, J. S., and Curtis, D. (2002) *Dev. Cell* **3**, 85–97
- Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V. A., and Priess, J. R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 775–779
- Hu, Y., Ye, Y., and Fortini, M. E. (2002) *Dev. Cell* **2**, 69–78
- Edbauer, D., Winkler, E., Haass, C., and Steiner, H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8666–8671
- Leem, J. Y., Vijayan, S., Han, P., Cai, D., Machura, M., Lopes, K. O., Veselits, M. L., Xu, H., and Thinakaran, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 19236–19240
- Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., and Haass, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 39062–39065
- Lee, S. F., Shah, S., Li, H., Yu, C., Han, W., and Yu, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 45013–45019
- Gu, Y., Chen, F., Sanjo, N., Kawarai, T., Hasegawa, H., Duthie, M., Li, W., Ruan, X., Luthra, A., Mount, H. T., Tandon, A., Fraser, P. E., and St. George-Hyslop, P. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 7374–7380

PEN-2-dependent Stabilization of PS NTF/CTF Heterodimer

23261

14. Luo, W. J., Wang, H., Li, H., Kim, B. S., Shah, S., Lee, H. J., Thinakaran, G., Kim, T. W., Yu, G., and Xu, H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 7850–7854
15. Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 35113–35117
16. Herreman, A., Van Gassen, G., Bentahir, M., Nyabi, O., Craessaerts, K., Mueller, U., Annaert, W., and De Strooper, B. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 1127–1136
17. Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., and Iwatsubo, T. (2003) *Nature* **422**, 438–441
18. Li, T., Ma, G., Cai, H., Price, D. L., and Wong, P. C. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 3272–3277
19. Nyabi, O., Bentahir, M., Horre, K., Herreman, A., Gottardi-Littell, N., Van Broeckhoven, C., Merchiers, P., Spittaels, K., Annaert, W., and De Strooper, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 43430–43435
20. Shirovani, K., Edbauer, D., Kostka, M., Steiner, H., and Haass, C. (2004) *J. Neurochem.*, in press
21. Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 6382–6387
22. Kim, S. H., Ikeuchi, T., Yu, C., and Sisodia, S. S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 33992–34002
23. Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003) *Nat. Cell Biol.* **5**, 486–488
24. LaVoie, M. J., Fraering, P. C., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Kimberly, W. T., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 37213–37222
25. Morais, V. A., Crystal, A. S., Pijak, D. S., Carlin, D., Costa, J., Lee, V. M., and Doms, R. W. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 43284–43291
26. Shirovani, K., Edbauer, D., Capell, A., Schmitz, J., Steiner, H., and Haass, C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 16474–16477
27. Cervantes, S., Gonzalez-Duarte, R., and Marfany, G. (2001) *FEBS Lett.* **505**, 81–86
28. Schroeter, E. H., Hagan, M. X., Brunkan, A. L., Hecimovic, S., Li, Y. M., Xu, M., Lewis, H. D., Saxena, M. T., De Strooper, B., Conrod, A., Tomita, T., Iwatsubo, T., Moore, C. L., Goate, A., Wolfe, M. S., Shearman, M., and Kopan, R. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13075–13080
29. Fraering, P. C., LaVoie, M. J., Ye, W., Ostaszewski, B. L., Kimberly, W. T., Selkoe, D. J., and Wolfe, M. S. (2004) *Biochemistry* **43**, 323–333
30. Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999) *Nature* **398**, 515–517
31. Steiner, H., Duff, K., Capell, A., Romig, H., Grim, M. G., Lincoln, S., Hardy, J., Yu, X., Picciano, M., Fichteler, K., Citron, M., Kopan, R., Pesold, B., Keck, S., Baader, M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Baumeister, R., and Haass, C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 28669–28673
32. Li, Y. M., Xu, M., Lai, M. T., Huang, Q., Castro, J. L., DiMuzio-Mower, J., Harrison, T., Lellis, C., Nadin, A., Neduvelli, J. G., Register, R. B., Sardana, M. K., Shearman, M. S., Smith, A. L., Shi, X. P., Yin, K. C., Shafer, J. A., and Gardell, S. J. (2000) *Nature* **405**, 689–694
33. Esler, W. P., Kimberly, W. T., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Moore, C. L., Tsai, J.-Y., Rahmati, T., Xia, W., Selkoe, D. J., and Wolfe, M. S. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 428–433
34. Wehlfen, A., and Martoglio, B. (2003) *Trends Cell Biol.* **13**, 71–78
35. LaPointe, C. F., and Taylor, R. K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 1502–1510
36. 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
37. Wehlfen, A., Binns, K., Lemberg, M. K., Ashman, K., and Martoglio, B. (2002) *Science* **296**, 2215–2218
38. 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
39. Walter, J., Grunberg, J., Capell, A., Pesold, B., Schindzielorz, A., Citron, M., Mendla, K., George-Hyslop, P. S., Multhaup, G., Selkoe, D. J., and Haass, C. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5349–5354
40. 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
41. Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002) *Science* **296**, 550–553
42. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D. J. (1992) *Nature* **360**, 672–674
43. Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condon, M. M., Teplow, D. B., and Haass, C. (2001) *EMBO Rep.* **2**, 835–841
44. Steiner, H., Capell, A., Pesold, B., Citron, M., Kloetzel, P. M., Selkoe, D. J., Romig, H., Mendla, K., and Haass, C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32322–32331
45. Dick, L. F., Cruikshank, A. A., Destree, A. T., Grenier, L., McCormack, T. A., Melandri, F. D., Nunes, S. L., Palombella, V. J., Parent, L. A., Plamondon, L., and Stein, R. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 182–188
46. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997) *EMBO J.* **16**, 3797–3804
47. Perez-Tur, J., Froelich, S., Prihar, G., Crook, R., Baker, M., Duff, K., Wragg, M., Busfield, F., Lendon, C., Clark, R. F., Roques, P., Fuldner, R. A., Johnston, J., Cowburn, R., Forsell, C., Axelman, K., Lilius, L., Houlden, H., Karran, E., Roberts, G. W., Rossor, M., Adams, M. D., Hardy, J., Goate, A., Lannfelt, L., and Hutton, M. (1995) *Neuroreport* **7**, 297–301
48. Ratovitski, T., Slunt, H. H., Thinakaran, G., Price, D. L., Sisodia, S. S., and Borchelt, D. R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 24536–24541

Publikation II

Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain determines its function in the stabilization of presenilin fragments

Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain determines its function in the stabilization of presenilin fragments

Stefan Prokop, Christian Haass and Harald Steiner

Adolf-Butenandt-Institute, Department of Biochemistry, Laboratory for Alzheimer's and Parkinson's Disease Research, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

Abstract

γ -Secretase is an aspartyl protease complex that catalyzes the intramembrane cleavage of a subset of type I transmembrane proteins including the β -amyloid precursor protein (APP) implicated in Alzheimer's disease. Presenilin (PS), nicastrin (NCT), anterior pharynx defective (APH-1) and presenilin enhancer-2 (PEN-2) constitute the active γ -secretase complex. PEN-2, the smallest subunit, is required for triggering PS endoproteolysis. Stabilization of the resultant N- and C-terminal fragments, which carry the catalytically active site aspartates, but not endoproteolysis itself, requires the C-terminal domain of PEN-2. To functionally dissect the C-terminal domain we created C-terminal deletion mutants and mutagenized several evolutionary highly conserved residues. The PEN-2 mutants were then probed for functional complementation of a PEN-2 knockdown, which displays deficient PS1 endoproteolysis and impaired NCT maturation. Progressive truncation of the C-terminus caused increasing

loss of function. This was also observed for an internal deletion mutant as well as for C-terminally tagged PEN-2 with a twofold elongated C-terminal domain. Interestingly, only simultaneous, but not individual substitution of the highly conserved D90, F94, P97 and G99 residues with alanine interfered with PEN-2 function. All loss of function mutants identified allowed PS1 endoproteolysis, but failed to stably associate with the resultant PS1 fragments, which like the PEN-2 loss of function mutants underwent proteasomal degradation. However, complex formation of the PEN-2 mutants with PS1 fragments could be recovered when proteasomal degradation was blocked. Taken together, our data suggest that the PS-subunit stabilizing function of PEN-2 depends on length and overall sequence of its C-terminal domain.

Keywords: Alzheimer's disease, anterior pharynx defective-1, γ -secretase, nicastrin, presenilin, presenilin enhancer-2. *J. Neurochem.* (2005) **94**, 57–62.

γ -Secretase is a multisubunit aspartyl protease complex, which catalyzes the regulated intramembrane proteolysis of the Alzheimer's disease-associated β -amyloid precursor protein (APP) and an increasing number of other type I transmembrane proteins (Haass 2004). Genetic and biochemical studies have identified four integral membrane proteins, presenilin (PS), nicastrin (NCT), anterior pharynx defective-1 (APH-1) and presenilin enhancer-2 (PEN-2), which are necessary and sufficient for γ -secretase activity (Francis *et al.* 2002; Edbauer *et al.* 2003; Kimberly *et al.* 2003; Takasugi *et al.* 2003; Hayashi *et al.* 2004). In human cells, two PS (PS1 and PS2) and two APH-1 [APH-1a (two splice variants) and APH-1b] homologues have been identified that are part of distinct γ -secretase complexes (Shiro-tani *et al.* 2004). Distinct γ -secretase complexes were also identified in mice (Hebert *et al.* 2004). A large body of evidence suggests that PS is the catalytic subunit of the complex harboring the two active site aspartates in trans-

membrane domains 6 and 7 (Wolfe *et al.* 1999; Esler *et al.* 2000; Li *et al.* 2000; Steiner *et al.* 2000). These aspartates are located in the N- and C-terminal fragment (NTF, CTF) of PS (Thinakaran *et al.* 1996), which are likely generated by autoproteolysis (Wolfe *et al.* 1999; Edbauer *et al.* 2003; Hayashi *et al.* 2004). Apart from their essential requirement

Received December 2, 2004; revised manuscript received February 17, 2005; accepted February 17, 2005.

Address correspondence and reprint requests to Harald Steiner or Christian Haass, Adolf-Butenandt-Institute, Ludwig-Maximilians-University Munich, Department of Biochemistry, Schillerstr. 44, 80336 Munich, Germany.

E-mail: hsteiner@med.uni-muenchen.de (HS)
or chaass@med.uni-muenchen.de (CH)

Abbreviations used: APH, anterior pharynx defective; APP, β -amyloid precursor protein; CTF, C-terminal fragment; mH₆, myc-hexahistidine; NCT, nicastrin; NTF, N-terminal fragment; PEN, presenilin enhancer; PS, presenilin; RNAi, RNA interference; wt, wild type.

58 S. Prokop *et al.*

during γ -secretase complex assembly and maturation (Haass 2004), the function of the other subunits is unclear.

The 101-amino acid protein PEN-2 is the smallest subunit of the γ -secretase complex (Francis *et al.* 2002; Steiner *et al.* 2002) and adopts a hairpin orientation in the membrane with its N- and C-terminal domains facing the luminal/extracellular space (Crystal *et al.* 2003; Bergman *et al.* 2004). PEN-2 assembles as the last component during γ -secretase complex assembly and initiates PS endoproteolysis (Kim *et al.* 2003; Kimberly *et al.* 2003; Luo *et al.* 2003; Takasugi *et al.* 2003; Prokop *et al.* 2004). Within the γ -secretase complex, PS appears to be an important binding partner of PEN-2, as in the absence of PS PEN-2 is unstable and degraded by the proteasome (Bergman *et al.* 2004; Crystal *et al.* 2004). Furthermore, we recently showed that PEN-2 is specifically required for the stabilization of the NTF/CTF heterodimer following PS endoproteolysis and that this function requires the C-terminal domain of PEN-2 (Prokop *et al.* 2004). Consistent with these results, PEN-2 has also recently been found in association with the PS1 NTF (Fraering *et al.* 2004). Finally, PEN-2 has recently been proposed to enhance the activity of γ -secretase after PS endoproteolysis (Shiraishi *et al.* 2004).

In this study, we have dissected the functionally critical C-terminal domain of PEN-2 by extensive mutagenesis to define the sequence requirements for its PS fragment-stabilizing function.

Materials and methods

Antibodies

The polyclonal antibody against the PEN-2 N-terminus (1638), the polyclonal antibodies against the APH-1aL C-terminus (433), against the PS1 N-terminus (2953) and PS1 C-terminus (3027), and the monoclonal antibody to the N-terminus (PS1N) were described previously (see Steiner *et al.* 2002; Prokop *et al.* 2004; Shirovani *et al.* 2004 and citations therein). The polyclonal antibody against the C-terminus of NCT (N1660) was obtained from Sigma (St Louis, MO, USA).

cDNA constructs

Mutant PEN-2 variants were generated by PCR-mediated mutagenesis and cloned into the pDNA3.1/Zeo(+) vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Silencer mutations that do not alter the encoded amino acid sequence were introduced in all PEN-2 constructs as described (Prokop *et al.* 2004) to escape RNA interference (RNAi). C-terminally *myc*-hexahistidine (*mH₆*)-epitope-tagged PEN-2 has been described before (Prokop *et al.* 2004). All constructs were verified by DNA sequencing.

Cell culture and cell lines

HEK 293 cells stably expressing Swedish mutant APP (HEK 293/sw) and the stable PEN-2 knockdown cell line have been described before (Prokop *et al.* 2004). This cell line was stably transfected

with the indicated wild type (wt) and mutant RNAi-resistant PEN-2 constructs as described (Prokop *et al.* 2004).

Protein analysis

Membrane fractions of HEK 293 cells were prepared and analyzed for the presence and interaction of the γ -secretase complex subunits by direct immunoblotting or coimmunoprecipitation as described (Prokop *et al.* 2004).

Results

As PEN-2 requires the C-terminus to stabilize the PS1 fragment heterodimer within the γ -secretase complex (Prokop *et al.* 2004), we sought to define the precise sequence requirements for this function by a mutagenesis analysis. Although no obvious protein-protein interaction motif(s) were found by database searches, the C-terminal domain contains several evolutionary highly conserved amino acids, in particular the D90, F94, P97 and G99 residues (Fig. 1a). We first constructed C-terminally truncated PEN-2 variants lacking the last three (PEN-2 Δ C3), five (PEN-2 Δ C5) or eight (PEN-2 Δ C8) amino acids thus stepwise removing highly conserved residues including the G99 and P97 or F94 (Fig. 1b). Throughout the study, the mutant PEN-2 cDNAs constructs created were stably transfected in our previously described PEN-2 knockdown cell line (HEK 293/sw cells in which PEN-2 expression is stably knocked down by RNAi)

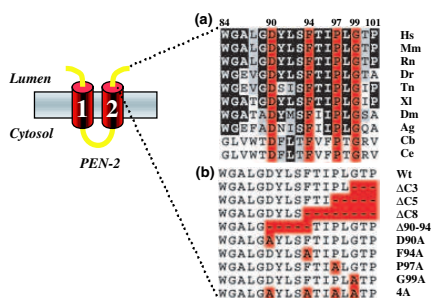


Fig. 1 Schematic depiction of PEN-2 and its C-terminal domain. (a) Sequence alignment of the C-terminal domain of human PEN-2 and its homologues. The last 17 amino acids of PEN-2 (residues 84–101) are shown, which are deleted in PEN-2 Δ C (Prokop *et al.* 2004). Residues 90, 94, 97 and 99 that are most highly conserved during evolution are boxed in red. Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Rn, *Rattus norvegicus*; Dr, *Danio rerio*; Tn, *Tetraodon nigroviridis*; XI, *Xenopus laevis*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Ag, *Anopheles gambiae*; Cb, *Caenorhabditis briggsae*; Ce, *Caenorhabditis elegans*. (b) Schematic representation of mutants generated in the C-terminal domain of human PEN-2. Deletions and substitutions are boxed in red.

and tested for functional complementation of the PEN-2 deficiency (Prokop *et al.* 2004). As controls, we analyzed PEN-2 knockdown cells stably expressing wt PEN-2 or the previously described PEN-2 Δ C construct, in which the last 17 amino acids (residues 84–101, Fig. 1a) are deleted (Prokop *et al.* 2004). As reported previously (Francis *et al.* 2002; Steiner *et al.* 2002; Luo *et al.* 2003; Hasegawa *et al.* 2004; Prokop *et al.* 2004), down-regulation of PEN-2 was associated with an accumulation of the PS1 holoprotein, reduced levels of PS1 fragments and impaired NCT maturation, whereas levels of APH-1aL were not affected (Fig. 2a). In agreement with our previous study (Prokop *et al.* 2004), expression of wt PEN-2 allowed efficient recovery of PS1 endoproteolysis and NCT maturation, whereas expression of PEN-2 Δ C abrogated PEN-2 function (Fig. 2a). Although expression of PEN-2 Δ C allowed PS1 endoproteolysis, the PS1 fragments were not recovered and NCT maturation was still impaired (Fig. 2a). PEN-2 Δ C3 rescued the defect of the PEN-2 knockdown in PS1 endoproteolysis and considerably recovered NCT maturation, whereas PEN-2 Δ C5 allowed only partial rescue of the PEN-2 knockdown defect and PEN-2 Δ C8 did not show rescuing activity. Similarly as observed for PEN-2 Δ C, PEN-2 Δ C5 and PEN-2 Δ C8 rescued the defect in PS1 endoproteolysis, but were defective in stabilizing the PS1 fragments and in NCT maturation. Thus, progressive truncation of the C-terminus was apparently associated with an increased loss of function. As shown in Fig. 2b, PEN-2 function was also abrogated in the same manner as observed for PEN-2 Δ C8 or PEN-2 Δ C when we investigated the deletion mutant PEN-2 Δ 90–94, which carries an internal deletion of the conserved sequence block from D90 to F94 (Hasegawa *et al.* 2004) while the terminal residues are left intact (Fig. 1b). The C-terminally *myc*-hexahistidine-tagged PEN-2 *mH₆* construct (Prokop *et al.* 2004), in which the length of the luminal C-terminal domain is roughly doubled by the tag, also did not display normal PEN-2 function and behaved similar as PEN-2 Δ C or PEN-2 Δ C8 or PEN-2 Δ 90–94 (Fig. 2b). Thus, shortening of the C-terminus by progressive truncation or by an internal deletion or elongation of the C-terminus by epitope-tagging interferes with PEN-2 function.

Although the above results indicate that proper length of the PEN-2 C-terminus is critical for PEN-2 function, the results obtained with the deletion mutants PEN-2 Δ C, PEN-2 Δ C5, PEN-2 Δ C8 or PEN-2 Δ 90–94 do not exclude the possibility that the observed loss of function of these mutants was due to the removal of one or more conserved residues. To address this possibility we investigated the functional importance of the most conserved C-terminal residues by site-directed mutagenesis and constructed the PEN-2 D90A, F94A, P97A, and G99A mutants (Fig. 1b). In addition, we created the corresponding D90A/F94A/P97A/G99A quadruple alanine mutant (PEN-2 4A) (Fig. 1b). Surprisingly, all of the individual PEN-2 mutants restored PEN-2 function

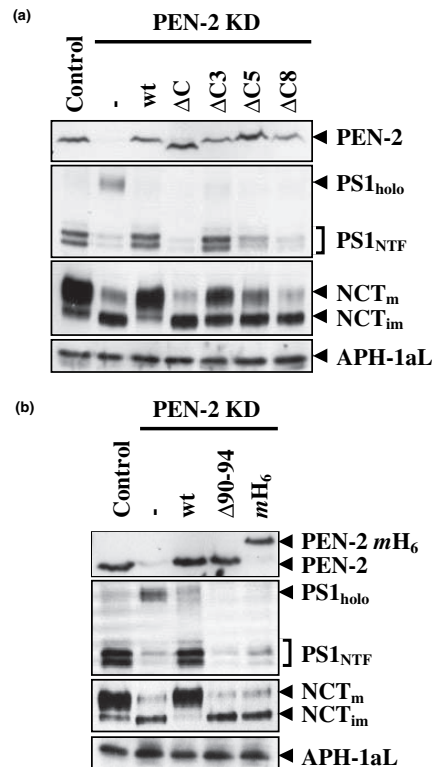


Fig. 2 Length of the C-terminus is crucial for PEN-2 function. (a) Membrane fractions of HEK 293/sw cells (control), PEN-2 knockdown cells (PEN-2 KD) and PEN-2 knockdown cells stably transfected with RNAi-resistant cDNA constructs encoding either wild type (wt) PEN-2 or the indicated C-terminal PEN-2 mutant variants were analyzed for PEN-2 by immunoblotting with antibody 1638 (to the PEN-2 N-terminus), for PS1 holoprotein and NTF by immunoblotting with antibody PS1N (to the PS1 N-terminus) and for NCT and APH-1aL by immunoblotting with antibodies N1660 (to the NCT C-terminus) and 433 (to the APH-1aL C-terminus). (b) Membrane fractions of HEK 293/sw cells, PEN-2 knockdown cells and PEN-2 knockdown cells stably transfected with RNAi-resistant cDNA constructs encoding wt PEN-2 or the PEN-2 Δ 90–94 or PEN-2 *mH₆* mutants were analyzed for PEN-2, PS1 holoprotein and NTF, NCT and APH-1aL as in (a).

(Fig. 3a) as judged by the recovery of normal PS1 fragment levels and by the substantial restoration of NCT maturation (Fig. 3a, see also individual PEN-2 G99A expressing cell

60 S. Prokop *et al.*

clones in Fig. 3b). In contrast, the PEN-2 4A mutant allowed PS1 endoproteolysis, but was still defective in stabilizing the PS1 fragments and in NCT maturation and thus caused a biochemical phenotype undistinguishable from that caused by PEN-2 Δ C (Fig. 3a). Although these data showed that the PEN-2 4A mutant is able to trigger PS1 endoproteolysis, it remained possible that the expression level of the PEN-2 4A mutant was too low to stabilize the PS1 fragments after PS1 cleavage (Fig. 3a). To address this concern we compared three independent PEN-2 4A expressing cell clones (#3, #6, #15) with selected independent cell clones expressing similar low amounts of the rescuing mutant PEN-2 G99A (in particular #4, #8). The independent PEN-2 4A and PEN-2

G99A expressing cell clones showed a different biochemical behavior (Fig. 3b). The PEN-2 G99A mutants (#4, #7, #8), but not the PEN-2 4A mutants (#3, #6, #15), stabilized the PS1 fragments (Fig. 3b) and restored NCT maturation. These data unambiguously show that the PEN-2 4A mutant is defective both in PS1 fragment stabilization and NCT maturation. Taken together, these data suggest that whereas individual mutations of the most highly conserved residues can be tolerated, simultaneous mutation of these residues is detrimental for PEN-2 function.

To address the question whether the C-terminal PEN-2 loss of function mutants PEN-2 Δ C8, PEN-2 Δ 90–94 and PEN-2 4A identified above associated stably with the γ -secretase complex, we subjected CHAPSO-solubilized membrane fractions to coimmunoprecipitation analysis with an antibody to NCT. As shown in Fig. 4(a), robust amounts of wt PEN-2 were coimmunoprecipitated, whereas consistent with previous results (Prokop *et al.* 2004) only very minor amounts of PEN-2 Δ C were coimmunoprecipitated. Similarly, only tiny amounts of PEN-2 Δ C8, PEN-2 Δ 90–94 and PEN-2 4A were coimmunoprecipitated with the NCT antibody (Fig. 4a). Compared to the deletion mutants, the PEN-2 4A mutant was somewhat better recovered, indicating very weak residual binding. As expected from our previous results (Prokop *et al.* 2004), compared to wt PEN-2 expressing cells, only very low levels of PS fragments, as exemplified by the PS1 NTF, and predominantly immature NCT were coimmunoprecipitated from the PEN-2 mutant cells, whereas similar amounts of APH-1aL were coimmunoprecipitated from wt and mutant PEN-2 expressing cells (Fig. 4a). Again, all C-terminal PEN-2 loss of function mutants behaved very similar to the prototypic PEN-2 Δ C. Since after PS1 endoproteolysis PEN-2 Δ C and the PS1 fragments fail to become stabilized within the γ -secretase complex and are therefore rapidly degraded by the proteasome (Prokop *et al.* 2004), we asked whether the C-terminal PEN-2 mutants could be found in association with the PS1 fragments when proteasomal degradation was inhibited. As expected, inhibition of proteasomal degradation by MG132 treatment caused a robust accumulation of PEN-2 Δ C (Fig. 4b). Similarly, the loss of function mutants PEN-2 Δ C8, PEN-2 Δ 90–94 and PEN-2 4A accumulated under these conditions. Furthermore, in cells expressing the C-terminal loss of function mutants, the PS1 NTF and CTF accumulated as well upon inhibition of proteasomal activity, whereas due to their independent stabilization with APH-1 (Prokop *et al.* 2004), levels of NCT were not affected by the inhibitor treatment (data not shown). Under these conditions, the stabilized PEN-2 mutants could be coimmunoprecipitated with the stabilized PS1 NTF and CTF (Fig. 4c). Thus, the PEN-2 loss of function mutants and the PS1 NTF/CTF can be coisolated within the γ -secretase complex when they are stabilized under conditions where their proteasomal degradation is blocked.

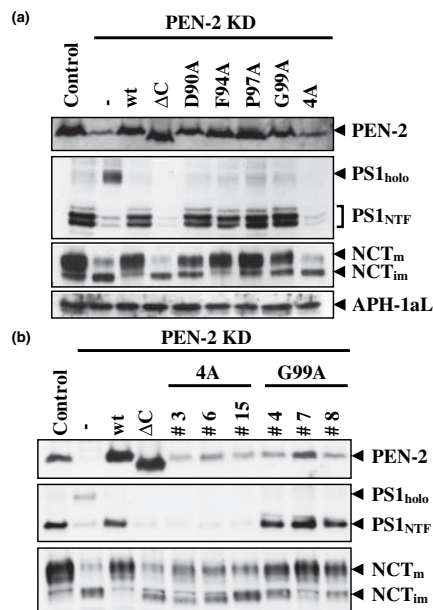
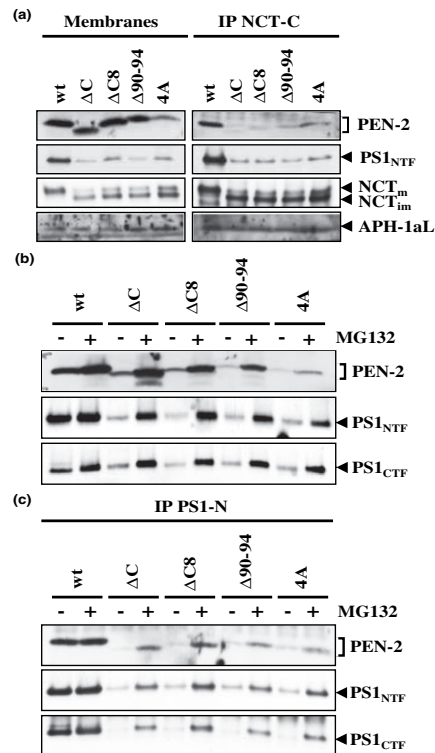


Fig. 3 Overall sequence of the C-terminal domain is crucial for PEN-2 function. (A) Membrane fractions of HEK 293/sw cells, PEN-2 knockdown cells and PEN-2 knockdown cells stably transfected with RNAi-resistant cDNA constructs encoding wt PEN-2 or the indicated mutant PEN-2 variants were analyzed for PEN-2, PS1 holoprotein and NTF, NCT and APH-1aL as in Fig. 2. (b) Membrane fractions of HEK 293/sw cells, PEN-2 knockdown cells and PEN-2 knockdown cells stably transfected with RNAi-resistant cDNA constructs encoding either wt PEN-2, PEN-2 Δ C, PEN-2 4A (independent single cell clones #3, #6, #15) or PEN-2 G99A (independent single cell clones #4, #7, #8) were analyzed for PEN-2, PS1 holoprotein and NTF and NCT as in (a).

Fig. 4 Complex formation of C-terminal PEN-2 loss of function mutants with the PS1 NTF/CTF heterodimer upon inhibition of proteasomal degradation. (a) Membrane fractions of PEN-2 knockdown cells stably expressing RNAi resistant wild type (wt) PEN-2 or the indicated PEN-2 variants were solubilized with CHAPSO and analyzed for γ -secretase complex formation by immunoprecipitation with an antibody N1660 to the NCT C-terminus. Membrane fractions (left panel) and immunoprecipitates thereof (right panel) were analyzed by immunoblotting as in Fig. 2. Minor amounts of the PS1 NTF (in C-terminal PEN-2 loss of function mutants, lanes 2–5, right panel) that are coimmunoprecipitated with the NCT antibody most likely represent residual endogenous PS1 fragments (due to the incomplete knockdown of PEN-2). (b) PEN-2 knockdown cells stably expressing RNAi-resistant wt PEN-2 or the indicated PEN-2 variants were treated with MG132 (5 μ M) for 12 h. Membrane fractions were prepared as in (a) and analyzed by immunoblotting with antibodies 1638, PS1N and antibody 3027 (to the PS1 loop). (c) PEN-2 knockdown cells stably expressing RNAi-resistant wt PEN-2 or the indicated PEN-2 variants were treated with MG132 as in (b). Membrane fractions were solubilized with CHAPSO and analyzed for γ -secretase complex formation by immunoprecipitation with antibody 2953 (to the PS1 NTF) and immunoblotting as in (b).

Discussion

To further define the sequence requirements for PEN-2 function, we have dissected its functionally critical C-terminal domain (Prokop *et al.* 2004) by probing a variety of diverse mutants for functional complementation of PEN-2 deficiency. We had previously shown that C-terminally epitope-tagged PEN-2 as well as C-terminally truncated PEN-2 (PEN-2 Δ C) rescued the defect of PEN-2 deficiency in PS1 endoproteolysis, but that these PEN-2 variants were still defective in stabilizing the PS1 fragments after endoproteolysis has occurred (Prokop *et al.* 2004). In extension of these results, we now demonstrate that both progressive C-terminal truncation as well as an internal deletion causes the loss of function phenotype described above. This suggests that proper length of the C-terminal domain is required for the PS fragment-stabilizing function of PEN-2. The critical dependence of PEN-2 function on the length of its C-terminus may suggest a tight spatial arrangement of the PEN-2 subunit within the γ -secretase complex and indicates a critical requirement for spatial accessibility of the C-terminal domain. This assumption is corroborated by the observation that C-terminally GFP-tagged PEN-2 is not functional (Francis *et al.* 2002) and by a mutagenesis study similar to ours by Hasegawa *et al.* (2004) while this work was in progress. Besides length, our mutagenesis study also suggests that the overall sequence rather than individual conserved residues of the C-terminus is a critical functional determinant of PEN-2. This is supported by the observation that individual substitutions of evolutionary highly conserved C-terminal residues (D90, F94, P97 and G99, Fig. 1) with



alanine are functionally tolerated, whereas multiple substitutions of the same residues with alanine are not. This observation suggests that the highly conserved D, F, P, G residues (in particular the D, F and P residues) constitute or are part of a functionally important sequence segment whose overall integrity and spatial accessibility is crucial for mediating PS fragment-stabilizing interactions of PEN-2 within the γ -secretase complex. Within such a sequence segment, a single point mutation may be tolerated because the remaining conserved residues are left intact and thus remain available for stabilizing interactions, whereas the stabilizing interactions are abrogated when several conserved residues are mutated. Apparently, during evolution key amino acid residues within this sequence segment were preserved, probably because the entire set of these conserved amino acid residues together allows optimal protein-protein interaction(s). This sequence segment in the PEN-2 C-terminal domain may adopt a certain structure

62 S. Prokop *et al.*

required for stabilizing protein–protein interaction(s) within the γ -secretase complex. Alternatively, the sequence segment in the PEN-2 C-terminal domain may be naturally unfolded and stabilized by appropriate protein–protein interaction(s) within the γ -secretase complex.

Consistent with their failure to undergo their characteristic PS fragment-stabilizing interactions, the PEN-2 C-terminal loss of function mutants failed to stably associate with the other γ -secretase complex subunits. However, under conditions when their proteasomal degradation and that of the PS1 fragments was blocked, the PEN-2 C-terminal loss of function mutants could be found in stable association with the PS1 fragments. Thus, the otherwise unstable interaction of the C-terminal PEN-2 mutants with the PS1 fragments can be recovered provided that degradation is blocked. These data may therefore suggest that, within the γ -secretase complex, PEN-2 acts as a molecular clamp that holds together the PS fragments (and thereby itself) in the complex.

Acknowledgements

We thank Dr Ralph Nixon for the kind gift of monoclonal antibody PS1N and Drs Keiro Shirovani, Christoph Kaether and Manuel Than for helpful discussion. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (CH and HS, SFB 596 Molecular Mechanisms of Neurodegeneration), the European Union (CH, APOPIs) and by a predoctoral fellowship (SP) from the Ludwig-Maximilians-University of Munich (F6FoLe).

References

- Bergman A., Hansson E. M., Pursglove S. E., Farmery M. R., Lannfelt L., Lendahl U., Lundkvist J. and Naslund J. (2004) Pen-2 is sequestered in the endoplasmic reticulum and subjected to ubiquitination and proteasome-mediated degradation in the absence of presenilin. *J. Biol. Chem.* **279**, 16 744–16 753.
- Crystal A. S., Morais V. A., Pierson T. C., Pijak D. S., Carlin D., Lee V. M. and Doms R. W. (2003) Membrane topology of γ -secretase component PEN-2. *J. Biol. Chem.* **278**, 20 117–20 123.
- Crystal A. S., Morais V. A., Fortna R. R., Carlin D., Pierson T. C., Wilson C. A., Lee V. M. and Doms R. W. (2004) Presenilin modulates Pen-2 levels posttranslationally by protecting it from proteasomal degradation. *Biochemistry* **43**, 3555–3563.
- Edbauer D., Winkler E., Regula J. T., Pesold B., Steiner H. and Haass C. (2003) Reconstitution of γ -secretase activity. *Nat. Cell Biol.* **5**, 486–488.
- Esler W. P., Kimberly W. T., Ostaszewski B. L., Diehl T. S., Moore C. L., Tsai J.-Y., Rahmati T., Xia W., Selkoe D. J. and Wolfe M. S. (2000) Transition-state analogue inhibitors of γ -secretase bind directly to presenilin-1. *Nat. Cell Biol.* **2**, 428–433.
- Fraering P. C., LaVoie M. J., Ye W., Ostaszewski B. L., Kimberly W. T., Selkoe D. J. and Wolfe M. S. (2004) Detergent-dependent dissociation of active γ -secretase reveals an interaction between Pen-2 and PS1-NTF and offers a model for subunit organization within the complex. *Biochemistry* **43**, 323–333.
- Francis R., McGrath G., Zhang J. *et al.* (2002) aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP, and presenilin protein accumulation. *Dev. Cell* **3**, 85–97.
- Haass C. (2004) Take five-BACE and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation. *EMBO J.* **23**, 483–488.
- Hasegawa H., Sanjo N., Chen F. *et al.* (2004) Both the sequence and length of the C terminus of PEN-2 are critical for intermolecular interactions and function of presenilin complexes. *J. Biol. Chem.* **279**, 46 455–46 463.
- Hayashi I., Urano Y., Fukuda R., Isoo N., Kodama T., Hamakubo T., Tomita T. and Iwatsubo T. (2004) Selective reconstitution and recovery of functional γ -secretase complex on budded baculovirus particles. *J. Biol. Chem.* **279**, 38 040–38 046.
- Hebert S. S., Serneels L., Dejaegere T., Horre K., Dabrowski M., Baert V., Annaert W., Hartmann D. and De Strooper B. (2004) Coordinated and widespread expression of γ -secretase in vivo: evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiol. Dis.* **17**, 260–272.
- Kim S. H., Ikeuchi T., Yu C. and Sisodia S. S. (2003) Regulated hyperaccumulation of presenilin-1 and the ' γ -secretase' complex. Evidence for differential intramembranous processing of transmembrane substrates. *J. Biol. Chem.* **278**, 33 992–34 002.
- Kimberly W. T., LaVoie M. J., Ostaszewski B. L., Ye W., Wolfe M. S. and Selkoe D. J. (2003) γ -Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6382–6387.
- Li Y. M., Xu M., Lai M. T. *et al.* (2000) Photoactivated γ -secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature* **405**, 689–694.
- Luo W. J., Wang H., Li H., Kim B. S., Shah S., Lee H. J., Thinakaran G., Kim T. W., Yu G. and Xu H. (2003) PEN-2 and APh-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J. Biol. Chem.* **278**, 7850–7854.
- Prokop S., Shirovani K., Edbauer D., Haass C. and Steiner H. (2004) Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin NTF/CTF heterodimer within the γ -secretase complex. *J. Biol. Chem.* **279**, 23 255–23 261.
- Shiraishi H., Sai X., Wang H. Q., Maeda Y., Kurono Y., Nishimura M., Yanagisawa K. and Komano H. (2004) PEN-2 enhances γ -cleavage after presenilin heterodimer formation. *J. Neurochem.* **90**, 1402–1413.
- Shirovani K., Edbauer D., Prokop S., Haass C. and Steiner H. (2004) Identification of distinct γ -secretase complexes with different APh-1 variants. *J. Biol. Chem.* **279**, 41 340–41 345.
- Steiner H., Kostka M., Romig H. *et al.* (2000) Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in polytopic bacterial aspartyl proteases. *Nat. Cell Biol.* **2**, 848–851.
- Steiner H., Winkler E., Edbauer D., Prokop S., Basset G., Yamasaki A., Kostka M. and Haass C. (2002) PEN-2 is an integral component of the γ -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J. Biol. Chem.* **277**, 39 062–39 065.
- Takasugi N., Tomita T., Hayashi I., Tsuruoka M., Niimura M., Takahashi Y., Thinakaran G. and Iwatsubo T. (2003) The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex. *Nature* **422**, 438–441.
- Thinakaran G., Borchelt D. R., Lee M. K. *et al.* (1996) Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* **17**, 181–190.
- Wolfe M. S., Xia W., Ostaszewski B. L., Diehl T. S., Kimberly W. T. and Selkoe D. J. (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature* **398**, 513–517.