

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Duale Modulation der proteolytischen Spaltung
des Amyloid-Vorläufer-Proteins
durch den Wirkstoff Bepriidil**

Stefan Mitterreiter

aus

Berchtesgaden

2008

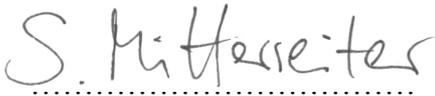
Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Christian Haass betreut und von Herrn Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfsmittel, erarbeitet.

München, am 29. August 2008


.....
(Stefan Mitterreiter)

Dissertation eingereicht am	1. September 2008
1. Gutachter	Prof. Dr. Christian Haass
2. Gutachter	Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen
Mündliche Prüfung am	7. Oktober 2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1 Die Alzheimer Krankheit	9
1.2 Molekulare und genetische Grundlagen der Alzheimer Krankheit	11
1.2.1 Das Amyloid-Vorläufer-Protein („Amyloid Precursor Protein“, APP)	12
1.2.1.1 Allgemeine Beschreibung von APP	13
1.2.1.2 Funktion von APP	14
1.2.1.3 Proteolytische Prozessierung von APP	15
1.3 Die Sekretasen	16
1.3.1 Die α -Sekretase	16
1.3.2 Die β -Sekretase	17
1.3.3 Die γ -Sekretase	19
1.4 Formen der Alzheimer Krankheit	21
1.4.1 Die sporadische Form der Alzheimer Krankheit	21
1.4.2 Die familiäre Form der Alzheimer Krankheit	22
1.4.2.1 Mutationen im Gen für APP	22
1.4.2.2 Mutationen in den Genen für Presenilin 1 und 2	23
1.5 Behandlung der Alzheimer Krankheit	23
1.5.1 Vakzinierung	23
1.5.2 Inhibition der amyloidogenen Prozessierung von APP	24
1.6 Ziel der Arbeit	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
2.1.1.1 Allgemein	27
2.1.1.2 Molekularbiologische Methoden	28
2.1.1.3 Zellkultur	28
2.1.1.4 Zelluläre Assays	28
2.1.1.5 Proteinbiochemische Methoden	29
2.1.1.6 BACE1 <i>in vitro</i> Test	29
2.1.1.7 Calcium-Imaging	29

2.1.1.8	NMR-Analyse	30
2.1.2	Enzyme, Versuchssysteme (Kits), Chemikalien	30
2.1.2.1	Allgemein	30
2.1.2.2	Molekularbiologische Methoden	30
2.1.2.3	Zellkultur	30
2.1.2.4	Zelluläre Assays	31
2.1.2.5	Proteinbiochemische Methoden	31
2.1.2.6	BACE1 <i>in vitro</i> Test	32
2.1.2.7	Calcium-Imaging	32
2.1.2.8	NMR-Analyse	32
2.1.3	Puffer und Medien	33
2.1.4	Antikörper	36
2.1.5	Chemische Substanzen	37
2.1.6	Plasmide und Oligonukleotide	38
2.2	Methoden	40
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	40
2.2.1.1	Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase chain reaction“, PCR)	40
2.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.1.3	Aufreinigung/Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	41
2.2.1.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)	41
2.2.1.5	Dephosphorylierung von DNA	41
2.2.1.6	Ligation von DNA	41
2.2.1.7	Herstellung des kompetenten <i>E. coli</i> -Stammes DH5 α	42
2.2.1.8	Transformation von DNA-Konstrukten in <i>E. coli</i> DH5 α	42
2.2.1.9	Präparation von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi-Präp)	42
2.2.1.10	Sequenzierung der DNA-Konstrukte	43
2.2.2	Zellkultur	43
2.2.2.1	Verwendete Zelllinien	43
2.2.2.2	Kultivierung von Zellen	44
2.2.2.3	Beschichtung von Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin	44
2.2.2.4	Aussäen von Zellen	44
2.2.2.5	Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)	45

2.2.3 Zelluläre Assays	45
2.2.3.1 Hitze-Inaktivierung von Serum (FCS) für den Screen	45
2.2.3.2 Screen nach Substanzen, welche die Ektodomänenspaltung von APP modulieren	45
2.2.3.3 Behandlung von Zellen mit chemischen Substanzen	46
2.2.3.4 Transiente Transfektion mit rekombinanter DNA	47
2.2.3.5 Herstellung stabil exprimierender Zelllinien	47
2.2.3.6 Transienter „knock-down“ von Calmodulin mittels siRNA-Oligos	47
2.2.3.7 Toxizitätsbestimmung mittels Laktat-Dehydrogenase-Test (LDH-Assay)	48
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	49
2.2.4.1 Herstellung von Zelllysaten	49
2.2.4.2 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mittels des Bicinchonic Acid-Verfahrens (BCA-Assay)	49
2.2.4.3 Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität	49
2.2.4.4 Immunpräzipitation von Proteinen	50
2.2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.2.4.6 Tris-Tricin Gele	52
2.2.4.7 Harnstoff-Gele nach Wiltfang	53
2.2.4.8 Western Blot	53
2.2.4.9 Western Blot-Protokoll zum Nachweis von A β	55
2.2.4.10 Western Blot-Protokoll zum Nachweis von Calmodulin	55
2.2.4.11 „Strippen“ von Western Blot-Membranen	55
2.2.4.12 „Sandwich-Immunoassay“ zum Nachweis der verschiedenen A β -Spezies	56
2.2.5 BACE1 <i>in vitro</i> Test	57
2.2.6 Fluoreszenz-basierte Bestimmung der intrazellulären Calcium- Konzentration (Calcium-Imaging)	58
2.2.7 NMR-Analyse	59
2.2.7.1 Präparation der Lipidmembranen	59
2.2.7.2 ² H-NMR-Spektroskopie	60

3. Ergebnisse	61
3.1 Screen nach chemischen Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP	61
3.1.1 Test der Reporterzelllinie (AP-APP Zellen)	62
3.1.2 Modulator-Screen	63
3.1.3 Verifizierung des Effektes von Bepridil auf die APP-Ektodomänenspaltung in AP-APP Zellen	65
3.2 Bepridil inhibiert spezifisch die β -Spaltung von APP	66
3.3 Die Inhibition der β -Spaltung durch Bepridil ist nicht zelltypspezifisch	69
3.4 Analyse der Toxizität von Bepridil	70
3.5 Bepridil inhibiert auch die BACE1-Spaltung von Neuregulin 1	71
3.6 Bepridil inhibiert die enzymatische Aktivität von BACE1 auf indirekte Weise	73
3.7 Analyse des zugrundeliegenden Mechanismus	74
3.7.1 Der Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung ist Calcium-unabhängig	74
3.7.1.1 Analyse des Effektes des Calcium-Kanalblockers Nimodipine auf die β -Spaltung von APP	75
3.7.1.2 Untersuchung des Einflusses der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration auf die β -Spaltung von APP	75
3.7.1.3 Analyse des Effektes von Bepridil auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration in HEK293E-APP695 Zellen	76
3.7.2 Calmodulin als verantwortliches Zielmolekül?	78
3.7.2.1 Analyse des Effektes eines Calmodulin-„knock-down“ auf die Prozessierung von APP	78
3.7.2.2 Bepridil inhibiert die β -Spaltung von APP auch in CaM- „knock-down“ Zellen	79
3.7.2.3 Inhibition von Calmodulin mittels eines Calmodulin- bindenden Peptids	80
3.7.3 Der Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung ist unabhängig von der zytoplasmatischen Domäne von BACE1	82
3.7.4 Bepridil inhibiert die β -Spaltung von APP durch die Alkalisierung saurer intrazellulärer Kompartimente	83
3.7.4.1 Die Alkalisierung von sauren intrazellulären Kompartimenten inhibiert die β -Spaltung von APP	84
3.7.4.2 Amiodarone zeigt die gleichen Effekte auf die β -Spaltung von APP wie Bepridil	85

3.7.4.3 Das protonierbare tertiäre Amin ist essentiell für den inhibitorischen Effekt auf die β -Spaltung von APP	87
3.8 Bepridil kann die Blut-Hirn-Schranke passieren	88
3.9 Bepridil ist ein dualer Modulator	89
3.9.1 Bepridil ist ein inverser γ -Sekretase-Modulator (iGSM)	90
3.9.2 Bepridil bewirkt Veränderungen in der Struktur von Membranen	91
3.9.3 Umwandlung eines inversen γ -Sekretase-Modulators in einen direkten γ -Sekretase-Modulator	93
4. Diskussion	95
4.1 Bepridil als neuer Inhibitor der β -Spaltung von APP	97
4.1.1 Analyse des zugrundeliegenden Mechanismus	98
4.1.1.1 Der Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung von APP ist nicht substratspezifisch und unabhängig vom „Trafficking“ von BACE1	99
4.1.1.2 Die Inhibition der β -Spaltung durch Bepridil ist Calcium-unabhängig und wird nicht über die Inhibition von Calmodulin vermittelt	100
4.1.1.3 Bepridil inhibiert die β -Spaltung von APP durch die Alkalisierung saurer intrazellulärer Kompartimente	102
4.1.2 Therapeutisches Potential alkalisierender Substanzen	105
4.1.3 Modell für den Wirkmechanismus von Bepridil auf die β -Spaltung	107
4.2 Bepridil ist ein dualer Modulator	108
4.2.1 Schematische Darstellung der dualen Modulatoraktivität von Bepridil	110
5. Zusammenfassung	112
6. Abkürzungsverzeichnis	114
7. Literaturverzeichnis	117
Danksagung	138
Lebenslauf	139

1. Einleitung

1.1 Die Alzheimer Krankheit

Vor 100 Jahren beschrieb der Neurologe und Psychiater Alois Alzheimer als Erster die heute nach ihm benannte Alzheimer Krankheit (Alzheimer, 1907). Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung des Gehirns, die mit Gedächtnisausfällen, Störungen der räumlichen und zeitlichen Orientierung, Wahrnehmungsschwierigkeiten und Halluzinationen einhergeht. Die Alzheimer Krankheit ist die häufigste Form von Demenz (Selkoe, 2001). Zum heutigen Zeitpunkt leiden alleine in Deutschland ca. 1,2 Millionen Menschen an der Alzheimer Krankheit (Quelle: <http://www.neuro24.de/alzhei.htm>, Stand 2006). Weltweit beläuft sich die Zahl auf ungefähr 27 Millionen Patienten (Quelle: <http://www.alzheimersanddementia.org/article/PIIS155252600700475X>, Stand 2006). Da der größte Risikofaktor für diese Erkrankung das Altern ist, muss aufgrund der steigenden Lebenserwartung sowie der zunehmenden Alterung der Gesellschaft mit einem dramatischen Anstieg der Patientenzahlen in den nächsten Jahren gerechnet werden.

Histopathologische Kennzeichen der Alzheimer Krankheit sind das Auftreten von amyloiden Ablagerungen („Plaques“) und neurofibrillären Bündeln („neurofibrillary tangles“), die vorwiegend in den Gehirnregionen Neokortex und Hippokampus sowie im limbischen System nachweisbar sind (Braak et al., 1996). Diese beiden Merkmale werden auch zur endgültigen Diagnose der Krankheit herangezogen, die bisher nur *post mortem* möglich ist (Thorsett and Latimer, 2000).

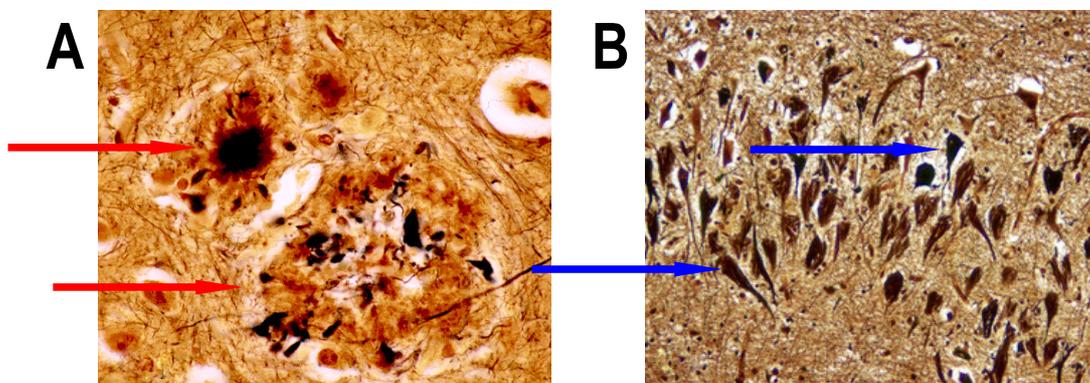


Abbildung 1: Histopathologische Kennzeichen der Alzheimer Krankheit

Mikroskopische Aufnahmen von Silberfärbungen von A) neuritischen Plaques (rote Pfeile) und B) neurofibrillären Bündeln (blaue Pfeile)

(Quelle: <http://www.neuropathologyweb.org/chapter9/chapter9bAD.html>)

Bei den neurofibrillären Bündeln oder „tangles“ handelt es sich um intraneuronale Aggregate von gepaarten helikalen Filamenten (Terry et al., 1964). Diese bestehen überwiegend aus einer hyperphosphorylierten Form des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau (Grundke-Iqbal et al., 1986), dessen physiologische Funktion die Stabilisierung der axonalen Mikrotubuli (Friedhoff et al., 2000) ist. Unter pathologischen Bedingungen kommt es zur Hyperphosphorylierung des Proteins, was durch eine Störung des Gleichgewichts verschiedener Kinasen und Phosphatasen bedingt ist (Mandelkow and Mandelkow, 1998).

Neurofibrilläre Bündel treten, im Gegensatz zu den Amyloid-Plaques, auch im Zusammenhang mit anderen Demenz-Erkrankungen auf und sind somit nicht spezifisch für die Alzheimer Krankheit. Ein Beispiel hierfür ist die sogenannte Frontal Lobe Demenz (FLD) (Morris et al., 2001).

Die Amyloid-Plaques bestehen vor allem aus dem Amyloid- β -Peptid ($A\beta$) das durch proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins („Amyloid Precursor Protein“, APP) entsteht (siehe 1.2.1.3). Den Hauptbestandteil der Plaques bildet dabei eine leicht aggregierende 42 Aminosäuren lange Form des Peptids ($A\beta_{42}$) (Jarrett et al., 1993; Lansbury, 1997), während ein kleinerer Teil aus einer 40 Aminosäuren langen Form ($A\beta_{40}$) besteht. Darüber hinaus sind weitere N- und C-terminal verkürzte oder verlängerte Formen des $A\beta$ -Peptids nachweisbar (Glennner et al., 1984; Masters et al., 1985). Die Plaques sind fast ausschließlich im extrazellulären Raum des Gehirns und im zerebralen Blutgefäßsystem zu finden (Selkoe, 1999). Es lassen sich, je nach Aggregationsform, sogenannte neuritische und diffuse Plaques mikroskopisch unterscheiden. Neuritische Plaques besitzen einen dichten Amyloid-Kern, der von degenerierten Axonen und Dendriten (Braak et al., 1996) sowie aktivierten Mikrogliazellen und Astrozyten umgeben ist (Pike et al., 1994). Diese Form der Plaques ist spezifisch für die Alzheimer Krankheit. Die diffusen Plaques hingegen können auch im Gehirn von nicht-dementen, älteren Menschen auftreten (Hardy and Selkoe, 2002). Man geht nach heutigem Wissensstand davon aus, dass die diffusen Plaques eine Vorstufe der neuritischen Plaques sind (Giaccone et al., 1989; Tagliavini et al., 1988).

1.2 Molekulare und genetische Grundlagen der Alzheimer Krankheit

Die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins und die damit verbundene Entstehung von neurofibrillären Bündeln sind nicht spezifisch für die Alzheimer Krankheit (Joachim and Selkoe, 1992; Morris et al., 2001). Des Weiteren sind keine Mutationen im Tau kodierenden Gen bekannt, die zur Entstehung der Alzheimer Krankheit führen. Die Bildung von neurofibrillären Bündeln führt zu Neurodegeneration, kann jedoch nicht die Entstehung von Amyloid-Plaques bewirken (Hardy et al., 1998; Lewis et al., 2000). Umgekehrt können Amyloid-Ablagerungen die Bildung neurofibrillärer Bündel induzieren (Gotz et al., 2001).

Obwohl der direkte Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Amyloid-Plaques, der Pathologie der Alzheimer Krankheit und der neuronalen Degeneration im Zentralnervensystem bisher nicht endgültig geklärt werden konnte, kommt der Bildung der Plaques eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit zu (Hardy and Selkoe, 2002; Huse and Doms, 2001; Selkoe, 1999). Man geht heutzutage jedoch davon aus, dass nicht die Plaques selbst neurotoxisch sind, sondern dass die Toxizität von löslichen A β -Oligomeren ausgeht, während die Plaques lediglich ein Reservoir für diese Spezies bilden (Haass and Selkoe, 2007; Hardy and Selkoe, 2002; Kawasumi et al., 2002; Walsh et al., 2002). In Abbildung 2 ist die sogenannte Amyloid-Kaskade dargestellt, in der anfängliche Veränderungen im A β -Stoffwechsel, wie vermehrte A β -Bildung, verringerter A β -Abbau oder Verschiebung des A β -Gleichgewichts zugunsten von A β 42, letztlich zur Schädigung von Neuronen führen (Hardy and Selkoe, 2002). A β 42 ist widerstandsfähiger gegenüber enzymatischem Abbau als die übrigen A β -Spezies (Glabe, 2001). Außerdem ist A β 42 durch die zusätzlichen Aminosäuren Isoleuzin und Alanin am C-Terminus des Peptids stärker hydrophob als A β 40 und aggregiert deshalb leichter (Selkoe, 1999). Die Aggregation der A β -Peptide führt direkt oder indirekt zu einer zunehmenden Schädigung der Neuronen und zu Veränderungen im intrazellulären Milieu der Zellen. Dadurch ausgelöste Veränderungen von Kinase- und Phosphatase-Aktivitäten führen unter anderem zur Entstehung von gepaarten helikalen Filamenten und somit zu Funktionsverlust und Absterben von Neuronen, was als unmittelbare Ursache für die Demenz angesehen wird (Hardy and Selkoe, 2002; Selkoe, 2001; Sisodia and St George-Hyslop, 2002).

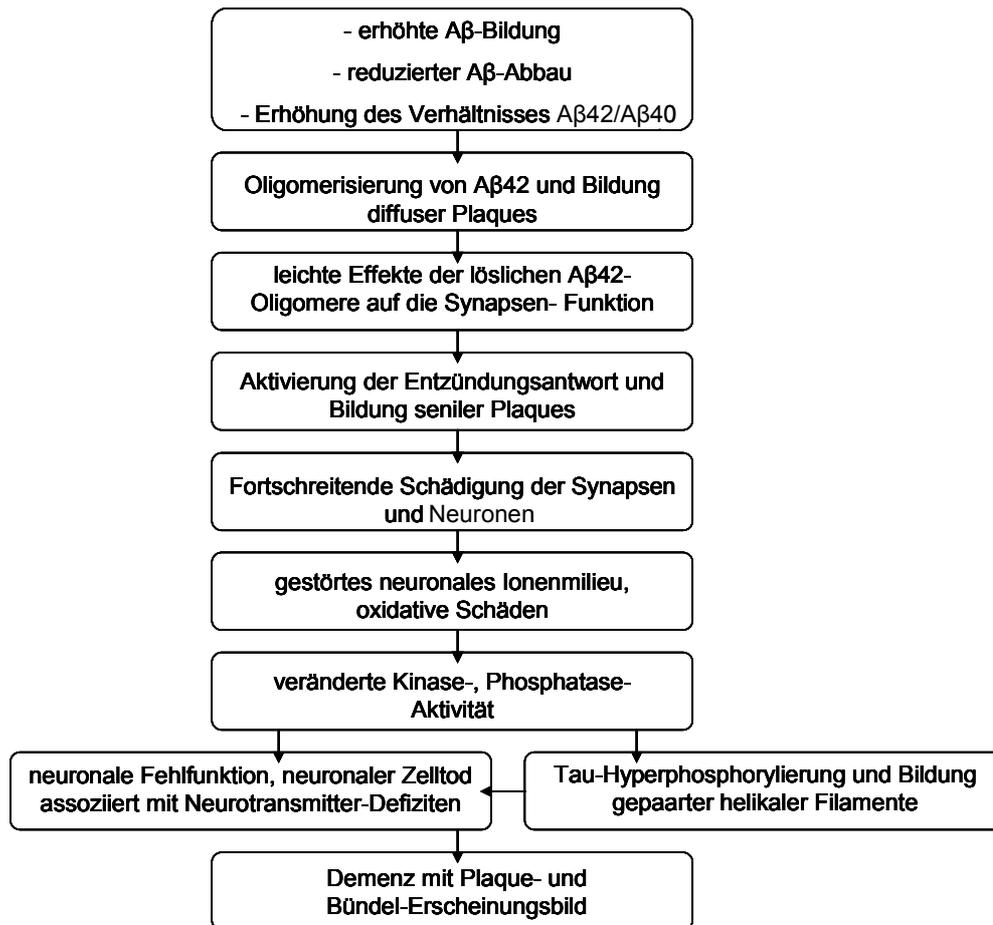


Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung der Amyloid-Kaskade
 Auslösendes Moment für die Kaskade ist die vermehrte Entstehung von Aβ42.
 (Modifiziert nach (Hardy and Selkoe, 2002))

1.2.1 Das Amyloid-Vorläufer-Protein („Amyloid Precursor Protein“, APP)

Die Identifizierung des Aβ-Peptids als Bestandteil der Amyloid-Plaques stellt einen Meilenstein in der Erforschung der Alzheimer Krankheit dar (Glennner et al., 1984; Gorevic et al., 1986; Masters et al., 1985; Selkoe et al., 1986). Basierend auf der Peptid-Sequenz konnte das Gen für das Amyloid-Vorläufer-Protein („Amyloid Precursor Protein“, APP) kloniert werden (Kang et al., 1987), aus dessen Genprodukt das Aβ-Peptid durch proteolytische Spaltung freigesetzt wird.

1.2.1.1 Allgemeine Beschreibung von APP

Das Gen für humanes APP ist auf Chromosom 21 lokalisiert. Mit 19 Exons umspannt es einen Bereich von ca. 3600 Basenpaaren. Durch alternatives Spleißen von drei dieser Exons entstehen hauptsächlich drei verschiedene mRNAs, die für Proteine von 695 (APP695), 751 (APP751) oder 770 (APP770) Aminosäuren Länge kodieren (Sandbrink et al., 1994; Selkoe, 1994). APP695 wird vor allem in neuronalem Gewebe exprimiert, während APP751 die Hauptisoform in nicht-neuronalem Gewebe darstellt (Wertkin et al., 1993). APP ist ein Typ-I-Transmembranprotein mit einer großen N-terminalen Ektodomäne, einem Transmembranbereich und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (Abbildung 3) (Dyrks et al., 1988; Kang et al., 1987).

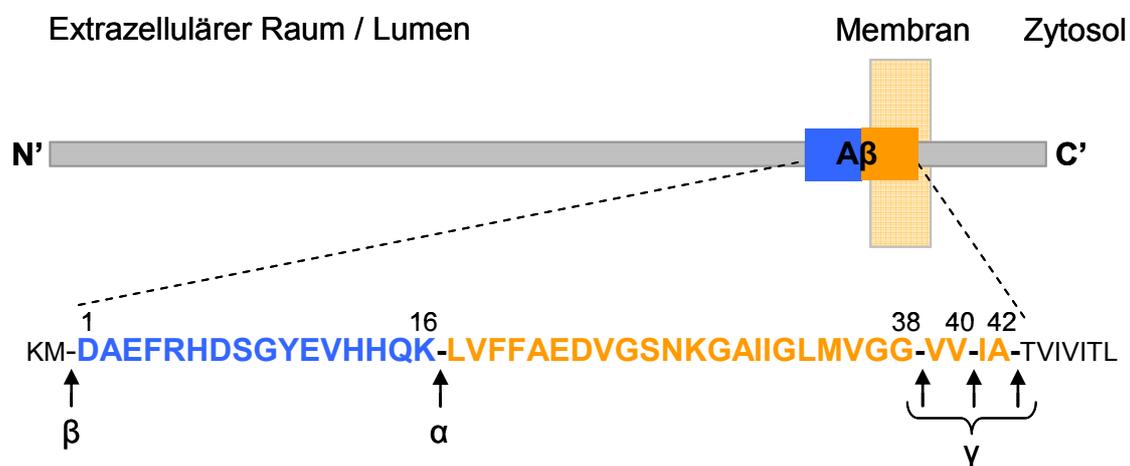


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur von APP

Die Aminosäuresequenz des A β -Peptids ist vergrößert im Einbuchstaben-Code dargestellt. Außerdem sind die wichtigsten Schnittstellen der Sekretasen angegeben.

Eine 17 Aminosäuren lange N-terminale Signalsequenz ist für die Translation des Proteins am endoplasmatischen Retikulum (ER) verantwortlich (Kang et al., 1987). APP wird über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche transportiert, wobei es durch N²- und O²-Glykosylierung, Phosphorylierung und Sulfatierung modifiziert wird (Oltsdorf et al., 1990; Perez et al., 1999). Von der Zelloberfläche kann APP durch Clathrin-vermittelte Endozytose in Endosomen aufgenommen werden und entweder dem lysosomalen Abbau zugeführt werden (Golde et al., 1992; Haass et al., 1992) oder über endosomales Recycling wieder an die Zelloberfläche zurückgelangen (Koo and Squazzo, 1994; Koo et al., 1996). APP kann zudem von verschiedenen Proteasen, den sogenannten Sekretasen, proteolytisch gespalten werden (Abbildung 4 und 1.2.1.3). Dies ist für die Entstehung der Alzheimer Krankheit von entscheidender Bedeutung.

APP bildet mit den beiden APP-ähnlichen Proteinen APLP-1 und -2 („APP-like protein“) eine Proteinfamilie (Sprecher et al., 1993; Wasco et al., 1992; Wasco et al., 1993), deren Gene in der Evolution hoch konserviert sind.

1.2.1.2 Funktion von APP

Während die Rolle der APP-Prozessierung bei der Alzheimer Krankheit immer klarer wird (siehe 1.2.1.3), gestaltet sich die Suche nach der physiologischen Funktion von APP um einiges schwieriger (De Strooper and Annaert, 2000).

Aufgrund der Domänenstruktur von APP sowie der auffallenden Ähnlichkeit der proteolytischen Prozessierung von APP und des Notch-Rezeptors wird eine Rezeptorfunktion für APP postuliert (Annaert and De Strooper, 1999; Kang et al., 1987; Selkoe and Kopan, 2003). Die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) könnte dabei, analog zur intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors an der Regulation der Transkription bestimmter Zielgene beteiligt sein (Cao and Sudhof, 2001), was jedoch kontrovers diskutiert wird (Hebert et al., 2006).

Die Fähigkeit von APP an Proteine der extrazellulären Matrix wie Heparin und Kollagen zu binden (Behr et al., 1996; Multhaup, 1994) und die Bildung von Homo- und Heterodimeren zwischen den APP-Familienmitgliedern in benachbarten Zellen (Soba et al., 2005) deuten auf eine Rolle von APP bei der Zelladhäsion hin.

Weitere wichtige Hinweise auf mögliche Funktionen von APP stammen aus „knockout“ Experimenten in verschiedenen Organismen. Untersuchungen des APP-Homologen APL-1 in *C. elegans* lassen auf eine Rolle von APP in der Entwicklung schließen (Hornsten et al., 2007). Studien in *D. melanogaster* zeigen, dass eine Deletion oder Mutation des APP-ähnlichen Proteins APPL Auswirkungen auf den Kinesin-vermittelten axonalen Transport und die Lebensfähigkeit von Neuronen hat (Gunawardena and Goldstein, 2001). *app*^{-/-}, *aplp1*- oder *aplp2*-defiziente Mäuse sind lebensfähig und zeigen nur geringe neurologische Abnormalitäten gegenüber Kontrolltieren, dies gilt ebenso für *app*^{-/-}*aplp1*^{-/-} „Doppel-Knockout“ Mäuse (Heber et al., 2000). *app/aplp-2* und *aplp-1/aplp-2* „Doppel-Knockout“ und *app/aplp-1/aplp-2* „Trippel-Knockout“ Mäuse sind hingegen nicht lebensfähig und sterben kurz nach der Geburt. *app*^{-/-}/*aplp-2*^{-/-} Mäuse weisen Defekte der neuromuskulären Verbindungen auf (Wang et al., 2005), während *app*^{-/-}/*aplp-2*^{-/-}/*aplp-2*^{-/-} Mäuse kortikale Fehlbildungen, darunter Lissenzephalie und neuronale Migrationsdefizite, zeigen (Herms et al., 2004). Diese Befunde lassen auf eine essentielle Funktion von APP und seinen Homologen in der frühen Entwicklung schließen.

1.2.1.3 Proteolytische Prozessierung von APP

Ein entscheidender Prozess bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit ist die proteolytische Prozessierung von APP. APP kann dabei von drei unterschiedlichen Proteasen, den sogenannten Sekretasen, gespalten werden.

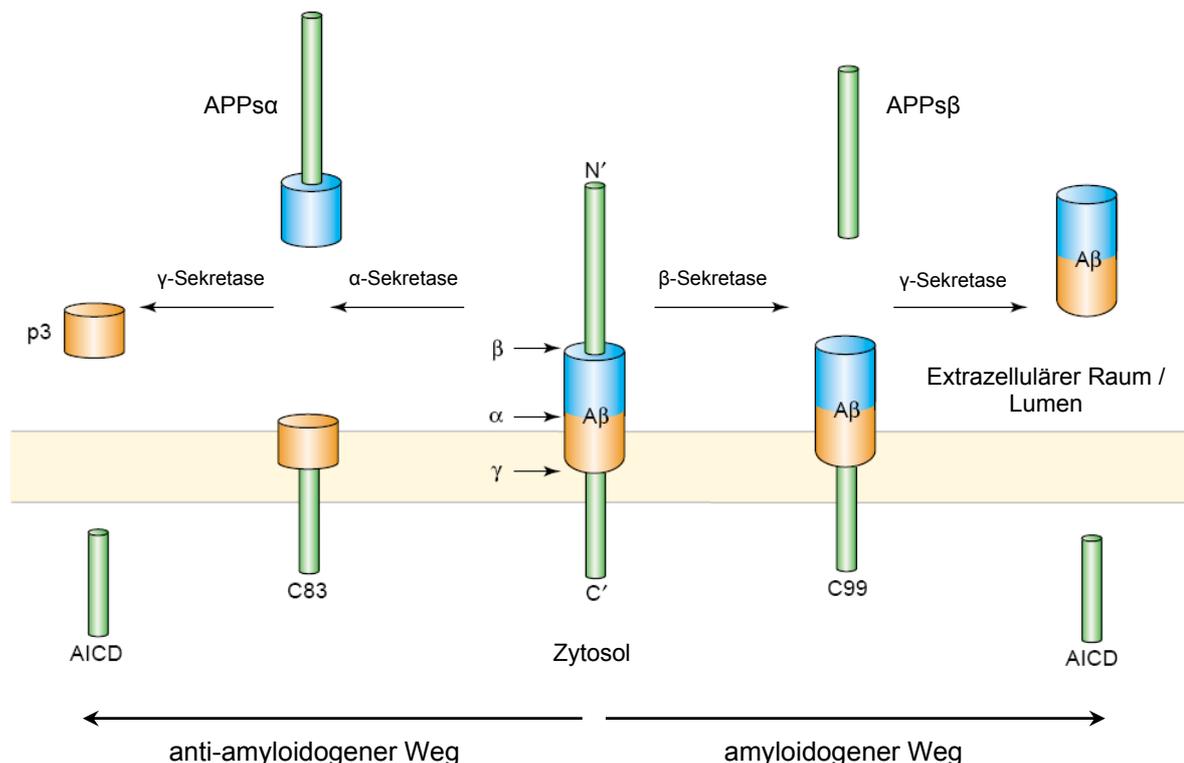


Abbildung 4: Schematische Darstellung der proteolytischen Prozessierung von APP

Dargestellt sind der amyloide und der anti-amyloide Prozessierungsweg von APP. (Modifiziert nach (Haass and Steiner, 2002))

Im ersten Prozessierungsschritt wird die Ektodomäne des Proteins abgespalten. Dieser Vorgang wird auch als „ectodomain shedding“ bezeichnet und kann von der α - oder der β -Sekretase durchgeführt werden. Der überwiegende Teil der APP-Moleküle wird dabei durch die α -Sekretase prozessiert, wobei ein großes lösliches Ektodomänenfragment (APPs α) und ein membranständiges 83 Aminosäuren langes C-terminales Fragment (CTF α , C83) entstehen (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1990). Durch die anschließende Spaltung von C83 durch die γ -Sekretase entstehen das lösliche p3-Peptid (Haass et al., 1993) sowie eine intrazelluläre Domäne (AICD) (Sastre et al., 2001). Da der α -Sekretase-Schnitt innerhalb der A β -Domäne von APP stattfindet, verhindert er die Entstehung von A β . Man spricht deshalb auch vom anti-amyloiden Weg.

Alternativ können APP-Moleküle, die nicht durch die α -Sekretase geschnitten wurden, im amyloidogenen Weg durch die β -Sekretase prozessiert werden, wodurch ein etwas kürzeres lösliches Ektodomänenfragment (APPs β) und ein 99 Aminosäuren langes C-terminales Fragment (CTF β , C99) entstehen (Seubert et al., 1993). Die Spaltung von C99 durch die γ -Sekretase führt dann zur Freisetzung von A β anstelle von p3, wobei vorzugsweise die Peptide A β 40 und A β 42 gebildet werden (Haass and Steiner, 2002).

1.3 Die Sekretasen

1.3.1 Die α -Sekretase

Die α -Sekretase katalysiert den ersten Schritt des anti-amyloidogenen Wegs der APP-Prozessierung. Sie spaltet die APP-Ektodomäne zwischen den Aminosäuren Lysin16 und Leucin17 der A β -Domäne und verhindert dadurch die A β -Bildung (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1990). Die Prozessierung durch die α -Sekretase erfolgt vor allem an der Plasmamembran und ist in der Regel konstitutiv. Aktivierung der Proteinkinase C, z.B. durch Stimulierung mit Phorbolestern (PDBu, PMA), führt zu einer Erhöhung der Aktivität der α -Sekretase (Felsenstein et al., 1994; Hung et al., 1993; Jacobsen et al., 1994).

Als α -Sekretasen wurden drei Mitglieder der ADAM-Genfamilie („A disintegrin and metalloprotease“) identifiziert (Allinson et al., 2003). α -Sekretaseaktivität konnte für die ADAM-Proteasen ADAM10 (Lammich et al., 1999), ADAM17/TACE (Buxbaum et al., 1998) und ADAM9 (Koiike et al., 1999) nachgewiesen werden, wobei noch unklar ist, welche dieser Proteasen die physiologisch relevante α -Sekretase ist. Die α -Sekretasen spalten ihr Substrat scheinbar unabhängig von einer bestimmten Konsensussequenz in einem Abstand von 12-13 Aminosäuren von der Membran. Eine wichtige Voraussetzung ist dabei eine α -helikale Konformation des Substrats an der Spaltstelle (Sisodia, 1992). Aufgrund dieser relativ geringen Substratspezifität katalysieren ADAM10 und ADAM17 auch die Ektodomänenspaltung weiterer Typ-I-Transmembranproteine, darunter TNF α , Notch 1-4 und L-Selectin (Seals and Courtneidge, 2003).

ADAM10 „knockout“ Mäuse sterben bereits vor der Geburt aufgrund eines Defektes der Notch-Signaltransduktion (Hartmann et al., 2002). Auch ADAM17/TACE „knockout“ Mäuse sind nicht lebensfähig und sterben zwischen Tag 17,5 der Embryonalentwicklung und Tag 17 nach der Geburt aufgrund gestörter Signaltransduktion (Peschon et al., 1998).

Da die α -Sekretase-Spaltung von APP die Bildung von A β verhindert (Buxbaum et al., 1993; Hung et al., 1993), stellt die Stimulierung der α -Sekretaseaktivität eine therapeutische Möglichkeit für die Alzheimer Krankheit dar (Lichtenthaler and Haass, 2004).

1.3.2 Die β -Sekretase

Als Gegenspieler der α -Sekretase leitet die β -Sekretase durch Spaltung von APP am N-Terminus der A β -Domäne den amyloidogenen Weg ein (siehe auch Abbildung 3 und 4). Frühe zellbiologische und pharmakologische Studien konnten zeigen, dass die β -Sekretase nicht mit der α - oder γ -Sekretase identisch ist, ein saures Milieu benötigt und in Kompartimenten des sekretorischen Weges und in Endosomen lokalisiert ist (Haass et al., 1995b; Koo and Squazzo, 1994). Im Jahr 1999 gelang es Vassar et al. die Aspartylprotease BACE1 („ β -site APP-cleaving enzyme“) als β -Sekretase zu identifizieren (Vassar et al., 1999). Dieser Befund wurde anschließend durch mehrere Arbeitsgruppen mithilfe verschiedener experimenteller Ansätze bestätigt (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Yan et al., 1999).

BACE1 ist ein Typ-I-Membranprotein mit einer Länge von 501 Aminosäuren, dessen Gen auf Chromosom 11 lokalisiert ist. Eine Signalsequenz am N-Terminus ist für die Translation des Proteins am ER verantwortlich. Daran anschließend folgen eine Prodomäne, die katalytische Domäne, der Transmembranbereich sowie eine kurze zytoplasmatische Domäne (Abbildung 5). Die katalytische Domäne enthält zwei charakteristische Aminosäuremotive, **DTGS** (Aminosäuren 93-96) und **DSGT** (Aminosäuren 289-292), welche dem katalytisch aktiven Zentrum einer Aspartylprotease entsprechen (Hussain et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Die Mutation eines der beiden Aspartylsäure-Reste führt zu einem vollständigen Verlust der Aktivität von BACE1 (Bennett et al., 2000b; Hussain et al., 1999). BACE1 ist somit die erste bekannte membranverankerte, Pepsin-ähnliche Aspartylprotease.

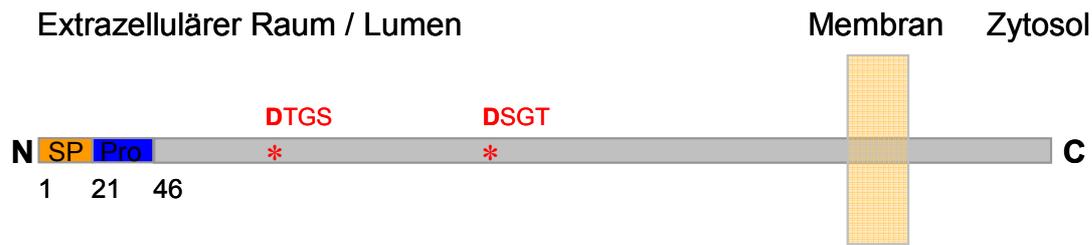


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Struktur von BACE1

Dargestellt ist der schematische Aufbau von BACE1. Hervorgehoben sind das Signalpeptid (SP) in orange, das Propeptid (Pro) in blau, sowie die beiden katalytischen Aspartylmotive (roter Stern).

Nach der kotranslationalen Insertion des Proteins in die Membran wird im Laufe der Maturierung die Prodomäne durch Furin oder Furin-ähnliche Proteasen abgespalten (Bennett et al., 2000b; Capell et al., 2000; Creemers et al., 2001). Außerdem wird die extrazelluläre Domäne von BACE1 an drei von vier N-Glykosylierungsstellen glykosyliert und kann drei intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden (Capell et al., 2000; Charlwood et al., 2001; Fischer et al., 2002; Haniu et al., 2000).

BACE1 ist im Golgi-Apparat, im trans-Golgi Netzwerk (TGN) und in den Endosomen lokalisiert (Capell et al., 2000; Vassar et al., 1999). Die Lokalisierung in schwach sauren Kompartimenten der Zelle stimmt mit dem ermittelten pH-Optimum von BACE1 überein, das bei pH 4,5 liegt (Vassar et al., 1999).

Die β -Sekretase besitzt, im Gegensatz zur α -Sekretase, eine hohe Sequenzspezifität (Citron et al., 1995). APP weist an der β -Sekretase-Schnittstelle die Aminosäuresequenz Lysin-Methionin (KM) auf (siehe Abbildung 3). Die Substitution von Methionin durch einen großen hydrophoben Rest wie z.B. Leucin erhöht die Affinität der β -Sekretase zum Substrat dramatisch. Umgekehrt bedingt die Einführung kleiner hydrophober Reste an dieser Stelle (z.B. Valin) eine Verringerung der Affinität bzw. eine Inhibition der Spaltung (Citron et al., 1995).

Die Tatsache, dass BACE1 „Knockout“ Mäuse in Gegenwart von humanem APP keine nachweisbare A β -Bildung in Neuronen aufweisen (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001), zeigt, dass BACE1 die einzige β -Sekretase in Neuronen ist (Vassar, 2002). Die Aktivität von BACE1 ist im Gehirn von Patienten mit sporadischer Alzheimer Krankheit signifikant erhöht (Fukumoto et al., 2002; Holsinger et al., 2002; Yang et al., 2003), was die Relevanz der Protease für die Alzheimer Krankheit bestätigt. Zahlreiche Studien belegen, dass die Expression von BACE1 sowohl auf transkriptioneller, als auch auf translationeller Ebene reguliert wird (Lammich et al., 2004; Rogers et al., 2004; Rossner et al., 2006; Sastre et al., 2006).

Die physiologische Funktion von BACE1 ist noch nicht endgültig geklärt. BACE1 „Knockout“ Mäuse sind lebensfähig und zeigen keinen auffälligen Phänotyp (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001). Neben APP konnten einige weitere Substrate identifiziert werden, darunter die Sialyl-Transferase ST6 GalI (Kitazume et al., 2001), der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) (Lichtenthaler et al., 2003) und APLP-1 und -2 (Li and Sudhof, 2004). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass BACE1 auch für die Prozessierung von Neuregulin und infolgedessen für die regulierte Myelinisierung des peripheren Nervensystems verantwortlich ist (Hu et al., 2006; Willem et al., 2006). In diesen Studien konnte unter anderem gezeigt werden, dass BACE1 „Knockout“ Mäuse eine Hypomyelinisierung des peripheren Nervensystems aufweisen.

Neben BACE1 konnte eine zweite membrangebundene Aspartylprotease, BACE2, identifiziert werden (Lin et al., 2000; Solans et al., 2000; Yan et al., 1999). Die Aminosäuresequenzen von BACE1 und BACE2 sind zu 64% homolog und die beschriebenen strukturellen Eigenschaften sind identisch (Vassar, 2002). Im Gegensatz zu BACE1 wird BACE2 aber vor allem in peripherem Gewebe exprimiert (Bennett et al., 2000a; Vassar et al., 1999). BACE2 zeigt keine β -Sekretaseaktivität, sondern prozessiert APP an alternativen Schnittstellen (Farzan et al., 2000; Fluhner et al., 2002; Yan et al., 2001).

1.3.3 Die γ -Sekretase

Die γ -Sekretase ist für die Prozessierung der, durch das „ectodomain shedding“ entstandenen, C-terminalen APP-Fragmente C83 und C99 verantwortlich (vgl. 1.2.1.3). Der Schnitt kann dabei an verschiedenen Positionen durchgeführt werden, wodurch, ausgehend von C99, verschieden lange A β -Peptide gebildet werden (vgl. Abbildung 3). Überwiegend entsteht A β 40, während die weitaus pathogenere Form A β 42 nur einen Anteil von ca. 5-10 % ausmacht (Selkoe, 1999). Die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) wird durch einen weiteren γ -Sekretase-vermittelten Schnitt weiter C-terminal in der APP-Transmembrandomäne freigesetzt (ϵ -Schnitt) (Sastre et al., 2001).

Das Besondere an der γ -Sekretase-vermittelten Proteolyse ist, dass diese nicht in wässriger Umgebung, sondern innerhalb Membran erfolgt (Wolfe et al., 1999), weshalb man auch von Intramembranproteolyse spricht. Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass der γ -Sekretase-Schnitt nicht sequenzspezifisch ist, sondern Länge und Struktur der Transmembrandomäne des Substrats entscheidend sind (Esler and Wolfe, 2001; Lichtenthaler et al., 2002).

Die Rolle der anderen Komplex-Untereinheiten ist noch weitgehend unklar. Nicastrin, ein Typ-I-Transmembranprotein mit großer Ektodomäne, könnte eine Funktion als Substrat-Rezeptor besitzen (Shah et al., 2005), wobei dieser Befund durch eine kürzlich erschienene Publikation infrage gestellt wurde (Chavez-Gutierrez et al., 2008). Das polytope Protein Pen-2 spielt möglicherweise eine Rolle bei der Endoproteolyse von Presenilin, indem es die entstehenden N- und C-terminalen Presenilin-Fragmente (PS-NTF/-CTF) stabilisiert (Prokop et al., 2005; Prokop et al., 2004).

Das Substratspektrum der γ -Sekretase umfasst neben APP viele weitere Typ-I-Transmembranproteine wie die Notch-Rezeptoren 1-4 (Mizutani et al., 2001; Okochi et al., 2002; Saxena et al., 2001), ErbB-4 (Lee et al., 2002), E-Cadherin (Marambaud et al., 2002), CD44 (Lammich et al., 2002) und IL1R-2 (Kuhn et al., 2007). Grundsätzlich erscheint es möglich, dass alle Typ-I-Transmembranproteine, deren Ektodomäne eine bestimmte Länge nicht überschreitet, Substrate für die γ -Sekretase sind (Struhl and Adachi, 2000).

1.4 Formen der Alzheimer Krankheit

Bei der Alzheimer Krankheit unterscheidet man zwischen der senilen, sporadischen Form und der präsenilen, autosomal-dominant vererbten familiären Form („Familial Alzheimer’s Disease“, FAD). Das Alter des Patienten, in dem sich die Krankheit manifestiert, dient als weiteres Unterscheidungsmerkmal. Können typische Krankheitssymptome vor dem Erreichen des 65. Lebensjahres diagnostiziert werden, spricht man von „early onset“ (früher Ausbruch), wohingegen die Krankheit beim „late onset“ erst nach dem 65. Lebensjahr ausbricht (Jellinger, 2005).

1.4.1 Die sporadische Form der Alzheimer Krankheit

Beim weitaus größten Anteil (95 %) der Alzheimer-Patienten entsteht die Krankheit sporadisch. Die ersten klinischen Symptome treten dabei meist erst nach dem 65. Lebensjahr auf, es handelt sich also um einen „late onset“ der Alzheimer Krankheit (Breitner and Folstein, 1984; Nee et al., 1983; Reisberg et al., 1983). Die Entstehung der sporadischen Form der Alzheimer Krankheit ist multifaktoriell bedingt. Umweltfaktoren und genetische Prädisposition sind dabei nicht die Ursache der Krankheit, können aber den Ausbruch beschleunigen und den Krankheitsverlauf beeinflussen. Der größte Risikofaktor für die

sporadische Form der Alzheimer Krankheit ist das Altern, gefolgt von kardiovaskulären Erkrankungen, Adipositas, Typ2-Diabetes und Artherosklerose (Mayeux et al., 2003).

Der wichtigste genetische Risikofaktor ist das Auftreten des $\epsilon 4$ -Allels des Gens für das Apolipoprotein-E (ApoE). Es existieren drei verschiedene ApoE Allele, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$, wobei in der Gesamtpopulation überwiegend das Allel $\epsilon 3$ vertreten ist, während $\epsilon 2$ und $\epsilon 4$ weniger häufig sind. ApoE spielt eine regulierende Rolle im Lipidmetabolismus und der Aufnahme und intrazellulären Freisetzung von Cholesterin. Es konnte gezeigt werden, dass das $\epsilon 4$ Allel bei „late onset“ Patienten überrepräsentiert ist (Saunders et al., 1993; Strittmatter et al., 1993) und zu erhöhter Amyloid-Ablagerung im zerebralen Cortex führt (Rebeck et al., 1993; Schmechel et al., 1993).

1.4.2 Die familiäre Form der Alzheimer Krankheit

Mutationen in drei Genen können zur Entstehung der familiären Alzheimer Krankheit (FAD) führen (Hardy, 1997; Tilley et al., 1998). Diese Mutationen sind meistens mit einem „early onset“ der Krankheit verbunden. Die Pathologie der FAD unterscheidet sich nicht von der sporadischen „late onset“ Form der Alzheimer Krankheit (Selkoe, 1999). Mutationen im APP-Gen sind dabei nur für 2-3 % der Fälle verantwortlich (Goate et al., 1991), während Mutationen in den Genen für Presenilin1 (PS1) (Sherrington et al., 1995) und Presenilin2 (PS2) (Levy-Lahad et al., 1995a; Levy-Lahad et al., 1995b; Li et al., 1995; Rogaev et al., 1995) 70-80 % bzw. 20 % aller Fälle von FAD verursachen (Hyman and Tanzi, 1995).

1.4.2.1 Mutationen im Gen für APP

Alle bisher identifizierten FAD-verursachenden Mutationen im Gen für APP treten entweder innerhalb oder in der Nähe der A β -Region von APP auf. So bewirkt beispielsweise eine Mutation der beiden ersten Aminosäuren der A β -Sequenz von KM zu NL eine starke Erhöhung der Affinität von APP zur β -Sekretase und somit eine vermehrte Bildung von A β . Diese Mutation wurde bei zwei schwedischen Familien entdeckt, weshalb sie auch als „schwedische Mutation“ bezeichnet wird (Mullan et al., 1992). Mutationen im Bereich der γ -Sekretase-Schnittstellen können zu einer Verschiebung des Schnittes von A $\beta 40$ zu A $\beta 42$ führen, welches stärker aggregiert und somit leichter zur Plaque-Bildung führt (Ancolio et al., 1999; Makarova et al., 2004). Des Weiteren sind Mutationen innerhalb der A β -Sequenz beschrieben, die zu verstärkter Aggregation von A $\beta 40$ führen (Irie et al., 2005).

1.4.2.2 Mutationen in den Genen für Presenilin 1 und 2

Neben Mutationen im APP-Gen konnten zahlreiche Missense-Mutationen in den Genen für Presenilin 1 und 2 mit dem Auftreten von FAD in Verbindung gebracht werden (Levy-Lahad et al., 1995b; Sherrington et al., 1995). In zahlreichen Zellkultur- und Tiermodellen sowie in Patienten konnte gezeigt werden, dass alle diese Mutationen zu einer vermehrten Generierung des pathogeneren A β 42-Peptids führen (Borchelt et al., 1996; Citron et al., 1997; Haass, 1997; Haass and Steiner, 2002; Scheuner et al., 1996), was zu einem „early onset“ der Alzheimer Krankheit spätestens im fünften oder sechsten Lebensjahrzehnt führt. Der Mechanismus, der der Verschiebung der Schnittspezifität der γ -Sekretase zu A β 42 zugrundeliegt, ist noch unklar.

1.5 Behandlung der Alzheimer Krankheit

Obwohl mittlerweile viel über die molekularen Ursachen der Alzheimer Krankheit bekannt ist, ist bis heute lediglich eine symptomatische Behandlung der Krankheit möglich. Allerdings gibt es einige vielversprechende Ansätze, die zur Entwicklung einer wirksamen kausalen Therapie führen könnten.

1.5.1 Vakzinierung

Große Hoffnungen werden in die Behandlung der Alzheimer Krankheit durch Vakzinierung gesetzt.

Diese gründen sich unter anderem auf dem Befund, dass die aktive Immunisierung mit präaggregiertem A β 42 die Plaque-Formation im transgenen Tiermodell hemmen kann (Schenk et al., 1999). In weiteren Versuchen an Mäusen konnte im „radial arm water-maze performance“-Test gezeigt werden, dass auch Gedächtnisleistungen bzw. das Verhalten der Tiere durch aktive Immunisierung beeinflussbar sind (Morgan et al., 2000). Die immunisierten Tiere bildeten dabei fast keine Plaques mehr. Auch die passive Immunisierung mit Antikörpern gegen A β führte zu vergleichbaren Ergebnissen (Bard et al., 2000; DeMattos et al., 2001). Eine erste groß angelegte klinische Studie musste allerdings aufgrund des Auftretens von z.T. drastischen Nebenwirkungen abgebrochen werden (Schenk, 2002). Trotz dieses Rückschlages stellt die Vakzinierung weiterhin einen vielversprechenden Ansatz zur Prävention und Behandlung der Alzheimer Krankheit dar.

1.5.2 Inhibition der amyloidogenen Prozessierung von APP

Eine weitere Möglichkeit zur Therapie der Alzheimer Krankheit besteht in der Unterbindung der amyloidogenen Prozessierung von APP.

Ein Ansatz hierfür besteht in der Aktivierung des anti-amyloidogenen Wegs. Die Spaltung von APP durch α -Sekretasen innerhalb der A β -Sequenz verhindert die Entstehung von A β (siehe 1.2.1.3). Postina und Kollegen konnten zeigen, dass eine moderate Überexpression der α -Sekretase ADAM10 die Plaque-Bildung in transgenen Mäusen verhindern kann (Postina et al., 2004). Dieser Befund zeigt, dass die Aktivierung der α -Sekretasespaltung von APP eine vielversprechende therapeutische Möglichkeit zur Behandlung der Alzheimer Krankheit darstellt (Lichtenthaler and Haass, 2004).

Eine weitere Möglichkeit ist die Inhibition der amyloidogenen Sekretasen, der β - und der γ -Sekretase. Es konnten bereits einige Substanzen identifiziert werden, welche die γ -Sekretase sehr effizient blockieren (Behr and Graham, 2005; Wolfe, 2002). Ein bedeutendes Problem hierbei stellt allerdings das breite Substratspektrum der γ -Sekretase dar (siehe 1.3.3). Dieses umfasst neben APP noch viele weitere Typ-I-Transmembranproteine, darunter die Notch-Rezeptoren 1-4. Eine Inhibition der γ -Sekretase führt infolgedessen neben der Unterbindung der A β -Bildung auch zur Blockade wichtiger Signaltransduktionswege, was zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann (Behr and Graham, 2005). Aus diesem Grund wird heutzutage zunehmend an Substanzen geforscht, welche die γ -Sekretase nicht inhibieren, sondern deren Schnittspezifität modulieren. Ein solch modulierender Effekt konnte für eine Untergruppe von entzündungshemmenden Medikamenten, den sogenannten „Nonsteroidal antiinflammatory drugs“ (NSAIDs) nachgewiesen werden (Weggen et al., 2001). Die NSAIDs führen zu einer Verschiebung der Schnittspezifität von A β 42 zu A β 38, welches wesentlich weniger hydrophob und damit weniger pathogen ist. In Studien an transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese NSAIDs auch *in vivo* zu einer Reduktion der A β 42-Bildung führen können (Eriksen et al., 2003; Weggen et al., 2001). Die Substanz (R)-Flurbiprofen wird derzeit in klinischen Studien der Phase III getestet (Imbimbo, 2008; Kukar and Golde, 2008). Der Wirkmechanismus dieser Substanzen auf die Schnittspezifität der γ -Sekretase ist noch weitgehend ungeklärt, wobei eine kürzlich veröffentlichte Studie eine Bindung an APP postuliert (Kukar et al., 2008).

Der Befund, dass BACE1 „Knockout“ Mäuse lebensfähig sind und keinen offensichtlichen Phänotyp aufweisen (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001), zeigt, dass dieses Enzym ein attraktives Zielmolekül für die Therapie der Alzheimer Krankheit darstellt

(Vassar, 2002). Auch die kürzlich publizierte Involvierung von BACE1 in die Prozessierung von Neuregulin und dadurch in die Myelinisierung des peripheren Nervensystems (Willem et al., 2006) steht dieser Sichtweise nicht entgegen, da die Myelinisierung ein Prozess ist, der bereits früh in der Entwicklung stattfindet, während eine Behandlung der Alzheimer Krankheit mit BACE1-Inhibitoren erst in fortgeschrittenem Alter erfolgen würde. Es konnten bereits einige hocheffiziente Inhibitoren identifiziert werden, welche auf peptidischen Strukturen beruhen (Ghosh et al., 2001; Sinha et al., 1999). Diese Art von Molekülen ist jedoch zu groß, um die Bluthirnschranke zu passieren, was eine therapeutische Anwendung ausschließt. Sie dienen aber als Ausgangsmoleküle für die Entwicklung von weiteren Inhibitoren (Vassar, 2002). Ein Problem hierbei stellt das relativ große aktive Zentrum von BACE1 dar (Hong et al., 2000), was eine Inhibition mit niedrig-molekularen Substanzen („low molecular weight compounds“) erschwert. Aus diesem Grund ist es von entscheidender Bedeutung, mehr über die Regulation der Ektodomänenspaltung von APP zu lernen, um auf diesem Weg alternative Ansätze zur Inhibition der A β -Bildung zu identifizieren.

1.6 Ziel der Arbeit

Die Identifizierung geeigneter BACE1-Inhibitoren zur Therapie der Alzheimer Krankheit gestaltet sich sehr schwierig (siehe 1.5.2). Darüber hinaus ist die Blockade der γ -Sekretasespaltung zur Hemmung der amyloidogenen Prozessierung von APP aufgrund des großen Substratspektrums des Enzyms therapeutisch nicht einsetzbar (siehe 1.3.3 und 1.5.2), während die bisher bekannten γ -Sekretasemodulatoren nur bei sehr hohen, therapeutisch wenig relevanten Konzentrationen wirksam sind.

Das Ziel dieser Arbeit war deshalb neue Wege zur Inhibition der amyloidogenen Prozessierung von APP zu identifizieren. Zu diesem Zweck sollte zu Beginn ein Screen nach chemischen Modulatoren der APP-Ektodomänenspaltung durchgeführt werden. Hierfür sollte eine Substanzbibliothek verwendet werden, die 480 Substanzen mit weitestgehend bekannten Effekten enthält (ICCB Known Bioactives Library, Biomol). Als Reporterzelllinie sollten klonale HEK293-EBNA Zellen, die ein Fusionsprotein aus sekretorischer alkalischer Phosphatase und APP (AP-APP) exprimieren, verwendet werden (AP-APP Zellen), in welchen die Menge an abgespaltener APP-Ektodomäne im konditionierten Medium mittels einer alkalischen Phosphatase-Reaktion bestimmt werden kann (Lichtenthaler et al., 2003; Schobel et al., 2006). Anschließend sollten die Effekte der im Screen gefundenen „Hits“ in verschiedenen Zelllinien verifiziert und mithilfe biochemischer und zellbiologischer Methoden, sowie zellfreier Testsysteme der zugrundeliegende Mechanismus aufgeklärt werden. Darüber hinaus sollte ein möglicher Effekt der im Screen gefundenen Substanzen auf die Schnittspezifität der γ -Sekretase untersucht werden. Hierfür sollten ein sogenannter „Sandwich-Immunoassay“, sowie die Harnstoff-Gelelektrophorese nach Wiltfang (Wiltfang et al., 1997) zur Bestimmung der verschiedenen A β -Spezies eingesetzt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1.1 Allgemein

Material	Hersteller
Analysenwaage (Analytical+ 200 g - 0,0001 g)	Ohaus
Autoklav (Tuttnauer 3850 EL)	Systec
Einwegauslaufpipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml)	Sarstedt
Feinwaage (Standard 2000 g - 0,01 g)	Ohaus
Gefrierschrank (Arktis)	AEG
-80°C-Gefrierschrank	Heraeus
Heizblöcke	Stuart Scientific, NeoLab
Kolbenhubpipetten (1 ml, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Gilson
Kühlschrank (Santo)	AEG
Kühlzentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus
Magnetrührer (IKAMAG RCT basic)	IKA Labortechnik
Mikrotiterplatten (96-well, transparent)	Nunc
Mikrowelle	Alaska
pH-Elektrode	Schott
pH-Meter (Inolab pH Level 1)	WTW
Pipettenspitzen (1 ml, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Sarstedt
Pipettierhilfe (Accu-Jet)	Brand
Plattenspektrometer	Tecan
Scanner	Hewlett Packard
Spannungsquelle	Bio-Rad
Thermomixer kompakt	Eppendorf
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus
Überkopfschüttler (Reax2)	Heidolph
Vortex VF2	IKA-Labortechnik

Material und Methoden

Wärmeschrank 37°C (Function line)	Heraeus
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore
Wasserbad	GFL
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann

2.1.1.2 Molekularbiologische Methoden

Material	Hersteller
Dokumentation (Quickstore plus II)	MS Laborgeräte
Drucker Geldokumentationsanlage	Mitsubishi
Elektrophoresekammern	Peqlab
Kamera (CCD Video Camera Module)	MS Laborgeräte
PCR-Maschine (PTC-200)	MJ Research
Schüttelinkubator Certomat BS-1	B. Braun Biotech International
UV-Schirm	Intas

2.1.1.3 Zellkultur

Material	Hersteller
Bunsenbrenner	Heraeus
Einfriergefäße (Qualifreeze)	Qualilab
Einwegpipetten, steril (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Einweg-PP-Röhrchen, steril (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Mikroskop (Wiloverts 10x 4/10/20)	Hund
N ₂ -Tank (Chronos)	Messer Griesheim
Pasteurpipetten	Sarstedt
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments
Zählkammer (Neubauer)	Optik Labor
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm, 24-well, 12-well, 6-well)	Nunc
Zell-Inkubator	Heraeus, Kendro Laboratories
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Instruments Products

2.1.1.4 Zelluläre Assays

Material	Hersteller
Multidrop	Thermolabs
Pipettier-Roboter (BiomekFX)	Beckmann Coulter

Plattenspektrometer (Victor2)	Perkin Elmer
Poly-D-Lysin-beschichtete Zellkulturgefäße (384-well, 96-well, 24-well)	BD Biosciences
Mikrotiterplatten (384-well, transparent)	Nunc

2.1.1.5 Proteinbiochemische Methoden

Material	Hersteller
Elektrophoresekammern	
Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad
Hofer Mighty Small Gelsystem	Amersham Biosciences
Filmentwicklungsgerät (Curix 60)	Agfa
Fluorchem 8900	Biozym
Röntgenfilme (SuperRX)	Fujifilm
Streptavidin-beschichtete Standard MA2400 Messplatten (96-well)	Meso Scale Discovery (MSD)
Sektor Imager	Meso Scale Discovery (MSD)
Transferkammer: Mini Trans-Blot Transfer Cell	Bio-Rad
Gel Transfer Filterpapier	Schleicher & Schuell
PVDF Membran (Immobilon-P)	Millipore
Nitrozellulose Membran (Protran)	Schleicher & Schuell
Wasserbad mit Schüttelvorrichtung (1083)	GFL

2.1.1.6 BACE1 *in vitro* Test

Material	Hersteller
Fluorimeter (Fluoroscan Ascent FL)	
Filtersystem: Excitation 530 nm / Emission 590 nm	Labsystems
Mikrotiterplatten (96-well, schwarz)	Nunc

2.1.1.7 Calcium-Imaging

Material	Hersteller
Glasplättchen (Ø 12 mm)	Marienfeld
Fluoreszenz-Mikroskop (BX50WI)	Olympus

2.1.1.8 NMR-Analyse

Material	Hersteller
Varian VXR-400 Spektrometer	Varian

2.1.2 Enzyme, Versuchssysteme (Kits), Chemikalien

2.1.2.1 Allgemein

Nicht spezifisch aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, Serva oder Sigma bezogen. Sind keine anderen Angaben gemacht, so wurden die Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p.a. eingesetzt.

2.1.2.2 Molekularbiologische Methoden

Material	Hersteller
NucleoBond AX500 Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Agarose NA	Amersham Biosciences
Ampizillin	Roth
dNTP (10 mM)	Roche
HEPES	Biomol
1 kb-DNA-Leiter	Gibco Invitrogen Corporation
Pwo-Polymerase (1 U/ μ l)	Peqlab
10x Pwo Polymerase Reaktionspuffer	Peqlab
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas / New England Biolabs
SAP (1 U/ μ l)	Roche
T4 DNA-Ligase (5 U/ μ l)	Roche
T4 DNA-Ligase-Puffer	Roche

2.1.2.3 Zellkultur

Material	Hersteller
DMEM	Invitrogen
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco
G418	Invitrogen

Hygromyzin	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma
Puromycin	Sigma
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco
Zeocin	Invitrogen

2.1.2.4 Zelluläre Assays

Material	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Substanzbibliothek (ICCB Known Bioactives Library)	Biomol
Toxizitätsbestimmungs-Kit (CytoTox 96 [®])	Promega
Triton X-100	Merck

2.1.2.5 Proteinbiochemische Methoden

Material	Hersteller
4-Nitrophenyl-Phosphat Dinatriumsalz Hexahydrat (AP-Substrat)	Fluka
Acrylamid	
Acrylamid - Bis Lösung (Tris-Glycine-Gele) (37,5:1 / 40 % (w/v))	Serva
Acrylamid (Tris-Tricine-Gele)	Biomol
N-N'-Methylen-Bisacrylamid (Tris-Tricine-Gele)	Serva
Acrylamid – Bis Lösung (Harnstoff-Gele) (19:1 / 40 % (w/v))	Bio-Rad
Alkalische Phosphatase gekoppelte Sekundärantikörper	Tropix
Ammonium-Persulfat (APS)	Roche
BCA-Assay Kit	Uptima, Interchim
Bicin	Sigma
Bis-Tris	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Uptima, Interchim
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
ECLplus Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences

Material und Methoden

Glutaraldehyd	Sigma
Glycin	Biomol
Harnstoff	Serva
I-Block	Tropix
Magermilchpulver (instant)	Frema
β -Mercaptoethanol	Merck
Molekulargewichtsstandard Marker (See Blue Plus 2)	Invitrogen
MSD Read-Puffer	Meso Scale Discovery (MSD)
NP-40	Sigma
Protein-A-Sepharose (PAS)	Sigma
Peroxidase-gekoppelte anti-Kaninchen IgG (1mg/ml)	Promega
Peroxidase-gekoppelte anti-Maus IgG (1mg/ml)	Promega
Protease-Inhibitor-Mix (PI-Mix)	Sigma
SDS („sodium-dodecyl-sulfate“; Natrium-Dodecyl-Sulfat)	Calbiochem
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck
Tricin	Biomol
Tris	Biomol
Tween-20	Merck
Western Star Kit	Tropix

2.1.2.6 BACE1 *in vitro* Test

Material	Hersteller
Natrium-Acetat Trihydrat	Roth
Substratpeptid	Amersham Biosciences

2.1.2.7 Calcium-Imaging

Material	Hersteller
Fura-2/AM	Molecular Probes

2.1.2.8 NMR-Analyse

Material	Hersteller
Lipide (POPC, PSM)	Avanti Polar Lipids
Cholesterin	Sigma

2.1.3 Puffer und Medien

Alle Lösungen wurden mit voll entsalztem H₂O angesetzt, das mit einer Milli-Q Anlage zur bidest. Qualität aufgereinigt wurde und einen elektrischen Widerstand >18.2 MΩ cm bei 25°C hat. Bei Prozentangaben handelt es sich um Volumenprozent, soweit keine anderen Angaben gemacht wurden.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
4x DNA-Probenpuffer	30 % Glycerin 10 mM EDTA 0,05 % Orange G
4x SDS-Probenpuffer	4 ml 20 % Glycerin 4 ml 20 % (w/v) SDS 1 ml β-Mercaptoethanol 1,25 ml 1 M Tris pH 6,8 10 µl 10 % Bromphenolblau
2x Wiltfang-Probenpuffer	0,72 M Bis-Tris 0,32 M Bicine 2 % SDS 5 % β-Mercaptoethanol 30 % Sucrose Bromphenolblau
Ampizillin-Stammlösung (1000x)	100 mg/ml Ampizillin in 70 % Ethanol
Anoden-Puffer (Harnstoff-Gele)	0,2 M Tris-HCl 50 mM H ₂ SO ₄
Anoden-Puffer (Tris-Tricin-Gele)	0,2 M Tris-HCl pH 8,9
AP-Puffer	0,1 M Glycin 1 mM MgCl ₂ 1 mM ZnCl ₂ pH 10,4 (mit NaOH einstellen)
Blockierlösung für Western Blot	5 % Magermilchpulver in PBST oder 0,8 g I-Block in 400 ml PBS + 400 µl Tween-20
ECL-Blockierpuffer	PBS 0,5 % BSA 0,05 % Tween-20
Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris 0,2 M Glycin 0,1 % SDS
Einfriermedium	FCS mit 10 % DMSO

Material und Methoden

HBSS-Puffer (Ca ²⁺ -frei)	145 mM NaCl 2,5 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 20 mM HEPES 10 mM Glucose 50 µM EGTA pH 7,2
HBSS-Puffer (Ca ²⁺ -haltig)	145 mM NaCl 2,5 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 20 mM HEPES 10 mM Glucose 1,8 mM CaCl ₂ pH 7,2
Gelpuffer (Tris-Tricin-Gele)	3 M Tris-HCl pH 8,45 0,3 % (w/v) SDS
Kathoden-Puffer (Harnstoff-Gele)	0,2 M Bicin 0,1 M NaOH 0,25 % SDS
Kathoden-Puffer (Tris-Tricin-Gele)	0,1 M Tris-HCl 0,1 M Tricin 0,1 % SDS
LB-Medium	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl pH 7,0 (autoklavieren)
Lysispuffer	50 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 1 % NP-40 2 mM EDTA PI-Mix
Natrium-Acetat-Puffer	50 mM Natrium-Acetat pH 4,5
PBS	140 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,75 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 (autoklaviert)
PBS/EDTA	PBS 25 mM EDTA
PBST	PBS 0,05 % Tween-20
Protein-A-Sepharose	2 mg PAS in 1 ml 20 % Ethanol vor Gebrauch 3x mit PBS gewaschen
Primärantikörper	Antikörper in entsprechender Konzentration (siehe 2.1.4) 0,25 % (w/v) BSA 0,05 % (w/v) Natriumazid in PBST
Poly-L-Lysin-Lösung	100 µg/ml Poly-L-Lysin in dH ₂ O (steril)
Sammelgelpuffer (Harnstoff-Gele)	0,72 M Bis-Tris 0,32 M Bicin

Sammelgelpuffer (Tris-Glycin-Gele)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
Sekundärantikörper	Antikörper in entsprechender Konzentration (siehe 2.1.4) 0,25 % BSA in PBST
SOB-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 2,5 mM KCl ad 1 l mit dH ₂ O (autoklavieren)
Spacergelpuffer (Harnstoff-Gele)	0,8 M Bis-Tris 0,2 M H ₂ SO ₄
STEN-Puffer	0,05 M Tris-HCl pH 7,6 0,15 M NaCl 2 mM EDTA 0,2 % NP-40
STEN-NaCl	STEN-Puffer mit 175 mM NaCl
STEN-SDS	STEN-Puffer mit 0,1 % SDS
Stripping-Puffer	67,5 mM Tris pH 6,8 2 % SDS
TAE-Puffer (50x Stammlösung)	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA
TB-Puffer	10 mM HEPES 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl 55 mM MnCl ₂ pH 6,7 (mit KOH einstellen) steril filtrieren
Transferpuffer	25 mM Tris 0,2 M Glycin
Trenngelpuffer (Harnstoff-Gele)	1,6 M Tris 0,4 M H ₂ SO ₄
Trenngelpuffer (Tris-Glycin-Gele)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
Waschpuffer I	PBS 0,05 % Tween-20
Waschpuffer II	PBS

2.1.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden im Laufe dieser Doktorarbeit verwendet.

Tabelle 2: Übersicht über die für den Western Blot verwendeten Primärantikörper

Name	Zielprotein / Epitop	Spezies	Verdünnung	Quelle
6E10	A β 1-16	Maus, monoklonal	1:2000	Senetek Inc.
4G8	A β 17-24	Maus, monoklonal	1:1000	Senetek Inc.
3552	A β 1-40	Hase, polyklonal	1:1000	Eurogentec
22C11	APP (AS 66-81)	Maus, monoklonal	1:5000	Dr. K. Beyreuther
W02	APP α	Maus, monoklonal	1 μ g / ml	Dr. K. Beyreuther
192wt	APP β (wt)	Hase, polyklonal	1:100	Elan Pharmaceuticals
192swe	APP β (swe)	Hase, polyklonal	1:800	Elan Pharmaceuticals
6687	APP, C-Terminus	Hase, polyklonal	1:1000	Eurogentec
EE-17	BACE1 Ektodomäne	Hase, polyklonal	1:4000	Sigma
α -Calmodulin	Bovines Calmodulin (AS 128-148)	Maus, monoklonal	0,5 μ g / ml	Upstate
mono-GFP	GFP	Maus, monoklonal	1:2000	Clontech
α - β -Aktin	Humanes β -Aktin	Maus, monoklonal	1:1000	Sigma

Tabelle 3: Übersicht über die für den Western Blot verwendeten Sekundärantikörper

Name	Zielprotein / Epitop	Spezies	Verdünnung	Quelle
α -mouse-HRP	Maus IgG	Ziege	1:10000	Promega
α -rabbit-HRP	Hase IgG	Ziege	1:10000	Promega
AP-gekoppelter Sekundärantikörper	Maus IgG	Ziege	1:5000	Tropix

HRP: Meerrettich-Peroxidase; AP: alkalische Phosphatase

Tabelle 4: Übersicht über die für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörper

Name	Zielprotein / Epitop	Spezies	Verdünnung	Quelle
3552	A β 1-40	Hase, polyklonal	1:400	Eurogentec
4G8	A β 17-24	Maus, monoklonal	1:100	Senetek Inc.

Tabelle 5: Übersicht über die für den „Sandwich-Immunoassay“ verwendeten Antikörper

Name	Zielprotein / Epitop	Spezies	Verdünnung	Quelle
α -A β 38 MSD-TAG	A β 38	Maus, monoklonal	1:1000	MSD
α -A β 40 BAP24-TAG	A β 40	Maus, monoklonal	1:1000	Roche
α -A β 42 BAP24-TAG	A β 42	Maus, monoklonal	1:1000	Roche

2.1.5 Chemische Substanzen

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten chemischen Substanzen aufgeführt. Angegeben sind jeweils der Name der Substanz sowie das Lösungsmittel und die Bezugsquelle.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten chemischen Substanzen

Name	Lösungsmittel	Bezugsquelle
Amiodarone Hydrochlorid	DMSO	Sigma
Amiodarone-Derivate	DMSO	Dr. H.-R. Ha
β -Sekretase Inhibitor IV (C3)	DMSO	Calbiochem
Bepidil Hydrochlorid	DMSO	Sigma
Chloroquine	dH ₂ O	Sigma
Fenofibrate	DMSO	Sigma
GL-189 (BACE1-Inhibitor)	DMSO	K. Maskos / W. Bode
ICCB Known Bioactives Library	DMSO	Biomol
NH ₄ Cl	dH ₂ O	Merck
Nimodipine	DMSO	Sigma
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Ethanol / DMSO	Calbiochem
Sulindac Sulfid	DMSO	Sigma
Tamoxifen	Ethanol	Sigma
TAPI-1	DMSO	Peptides International

2.1.6 Plasmide und Oligonukleotide

Folgende Plasmide und Oligonukleotide wurden verwendet.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Name	Vektor	cDNA	Klonierungs-Enzyme	Bezugsquelle
p12-GFP-CaMbp	peak12	GFP-CaMbp (CaM-bindende Sequenz aus CaMKII fusioniert an GFP)	HindIII / NotI	Im Rahmen dieser Doktorarbeit hergestellt
pcDNA3.1-BACE1wt	pcDNA3.1/Zeo (+)	BACE1wt	EcoRI / XhoI	Dr. M. Willem
pcDNA3.1-BACE1-GPI	pcDNA3.1/Zeo (+)	BACE1-GPI	HindIII / NotI	Dr. M. Willem (Westmeyer et al., 2004)
pcDNA3.1-AP-APP	pcDNA3.1/Zeo (+)	AP-APP	HindIII / NotI	Umkloniert aus p12-SEAP-APP
pCEP4-SP-C99	pCEP4	SP-C99	KpnI / NotI	Dr. S. Lichtenthaler
pNRG1- β 1-APTag5	pAPtag-5	NRG1- β 1 (partielle Sequenz)	XbaI / XhoI	Dr. M. Willem (Zhou et al., 2004)

GFP: green-fluorescent protein; CaMbp: Calmodulin-bindendes Peptid; CaMKII: Calmodulin-abhängige Kinase II; GPI: Glycosylphosphatidylinositol-Anker; SEAP=AP: sekretorische alkalische Phosphatase; NRG: Neuregulin

In Tabelle 8 sind die verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Angegeben sind der Name des hergestellten Plasmids, die verwendeten Oligonukleotide und die für die PCR-Reaktion verwendete Template-DNA.

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Plasmid-name	Oligonukleotide	Template-DNA
p12-GFP-CaMbp	<p>PCR 1</p> <p><u>fw: p12-Hind</u> 5'-CATTCTCAAGCCTCAGACAGTGG-3'</p> <p><u>rev: CaMbp_CaMKII_rev</u> 5'- GGCACCCCTTCAATTTCCGTCGAGCATTAATTTCTTCAACC CGCCACCGCCCTCTAGACCTCCGCCCTTG-3'</p> <p>bzw.</p> <p><u>fw: CaMbp_CaMKII_fw</u> 5'- CGGAAATTGAAGGGTGCCATCTTGACAACCTATGCTGGCTT GAGCGGCCGCAGGTAAG-3'</p> <p><u>rev: pAnNT</u> 5'- GTGCCTGAAGCGGATCCAGAC-3'</p> <p>PCR 2</p> <p><u>fw: p12-Hind</u> <u>rev: pAnNT</u></p>	<p>p12-GFP</p> <p>Produkte aus PCR1</p>

fw: Vorwärts-Primer (forward); rev: Rückwärts-Primer (reverse)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien ist in Tabelle 1 (2.1.3) aufgeführt.

2.2.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase chain reaction“, PCR)

Für die Amplifikation von DNA mittels PCR wurden folgende Reaktionsansätze hergestellt:

5 µl Pwo-Reaktionspuffer (komplett)
1 µl Template-cDNA (200 ng/µl)
4 µl entsprechendes Vorwärts-Nukleotid („forward primer“, 10 µM)
4 µl entsprechendes Rückwärts-Nukleotid („reverse primer“, 10 µM)
1 µl dNTP-Mix (10 mM)
1 µl Pwo-Polymerase (1 U/µl)
34 µl dH₂O
Gesamtvolumen: 50 µl

Die Reaktionsansätze wurden gemischt und die Amplifikation mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

Schritt 1:	94°C, 3 Min.	} 30 Zyklen
Schritt 2:	94°C, 30 Sek.	
Schritt 3:	52°C, 30 Sek.	
Schritt 4:	72°C, 1-2 Min.	
Schritt 5:	72°C, 10 Min.	

Nach Beendigung der Amplifikation wurde die DNA auf einem Agarosegel analysiert (siehe 2.2.1.2), aufgereinigt (siehe 2.2.1.3) und für die weitere Klonierung verwendet (siehe 2.2.1.4 ff).

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung und Analyse von linearen DNA-Fragmenten, superhelikaler Plasmid-DNA und zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurden 1-2 %ige Agarosegele in TAE-Puffer und 0,2 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 1/4 Volumen 4x DNA-Probenpuffer versetzt. Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V in TAE-Puffer in Agarose-Gelkammern.

2.2.1.3 Aufreinigung/Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpellens aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mithilfe des Nucleospin Extract Kit nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

2.2.1.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)

Für analytische Ansätze wurden ca. 500 ng Plasmid-DNA für 1-2 h bei 37°C mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (10 U) und dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer in 20 µl Endvolumen inkubiert. Die Analyse der Restriktion erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.2).

Für präparative Ansätze im Rahmen der Klonierung wurden 1 µg Plasmid-DNA oder 5-10 µg des entsprechenden PCR-Produktes in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (10 U) in einem Endvolumen von 30 µl für 3-4 h bzw. über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Analyse und Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.2) und anschließender Isolierung der DNA aus dem Gel (siehe 2.2.1.3).

2.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA

Vor einer Ligation (siehe 2.2.1.6) wurden die 5'-Phosphatgruppen der Plasmid-DNA-Moleküle mithilfe einer alkalischen Phosphatase („shrimp alkaline phosphatase“, SAP) abgespalten, um eine intramolekulare Religation zu vermeiden. Dazu wurden dem präparativen Restriktionsverdau der Plasmid-DNA nach Ende der Spaltungsreaktion 1 µl SAP zugefügt und der Ansatz für weitere 30 Min. bei 37°C inkubiert.

2.2.1.6 Ligation von DNA

Die Insertion des mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragmentes (siehe 2.2.1.4) in das restringierte und dephosphorylierte Plasmid (siehe 2.2.1.5) erfolgte unter der Verwendung der T4 DNA-Ligase. Dafür wurden ca. 200 ng Plasmid-DNA und ca. 1 µg DNA-Fragment mit 5 U T4 DNA-Ligase und T4 DNA-Ligase-Puffer in einem 20 µl Ligationsansatz gemischt und für 2-3 Stunden bei RT inkubiert. 10-15 µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen verwendet.

2.2.1.7 Herstellung des kompetenten *E. coli*-Stammes DH5 α

100 ml SOB-Medium wurden mit einer *Escherichia coli* DH5 α -Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C/200 upm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakterienkultur mit SOB-Medium in einem Volumen von 250 ml auf eine OD₆₀₅ von 0,1 verdünnt und bei 18°C/250 upm für 20-24 h inkubiert. Inoue et al. konnten zeigen, dass die Kompetenz der Zellen sich erhöht, wenn das Wachstum bei 18°C stattfindet (Inoue et al., 1990). Nach dem Erreichen einer OD₆₀₅ von 0,6-0,8 wurde die Kultur auf fünf 50 ml-Falkon-Gefäße aufgeteilt und 10 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C/3500 upm für 20 Min. Das Bakteriensediment wurde anschließend in 80 ml TB-Puffer resuspendiert (4°C) und 10 Min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C/3500 upm für 20 Min. wurde das Sediment in 20 ml TB-Puffer (4°C) gelöst und 1,5 ml DMSO (Endkonzentration: 7 %) zugegeben. Nach einer weiteren 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Aliquotierung der Bakteriensuspension in 200 μ l-Aliquots bei 4°C. Die Bakterienaliquots wurden umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.1.8 Transformation von DNA-Konstrukten in *E. coli* DH5 α

Zur Transformation der hergestellten DNA-Konstrukte in *E. coli* DH5 α wurden 10-15 μ l Ligationsansatz mit 80 μ l Bakteriensuspension vermischt und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Um eine Aufnahme der DNA in die Bakterienzellen zu ermöglichen wurden die Ansätze für 2 Min. bei 42°C inkubiert und dann für weitere 2 Min. auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 800 μ l LB-Medium zugesetzt und die Ansätze für 30 Min. bei 37°C auf dem Schüttler (200 upm) inkubiert. Danach wurden die Bakterienzellen bei 6000 upm für 1 Min. pelletiert, in 100 μ l LB-Medium resuspendiert und auf Ampizillin-haltige LB-Platten (100 μ g/ml Ampizillin) ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden auf der Platte gewachsene Einzelkolonien zum Animpfen von Übernachtskulturen für die Plasmidpräparation nach der Mini-Präp-Methode (siehe 2.2.1.9) verwendet.

2.2.1.9 Präparation von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi-Präp)

Für eine Mini-Präp wurden 5 ml Ampizillin-haltiges LB-Medium (100 μ g/ml Ampizillin) mit einer Einzelkolonie von transformierten *E. coli* DH5 α (siehe 2.2.1.8) angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler (200 upm) inkubiert. Die DNA wurde mithilfe des Nucleospin Plasmid Kits nach Vorschrift des Herstellers aus den Bakterienzellen präpariert und aufgereinigt. Nach Verifizierung des DNA-Konstruktes mittels Restriktionsverdau (siehe 2.2.1.4) wurden mit dem Rest der für die Mini-Präp verwendeten Übernachtskultur 250 ml

Ampizillin-haltiges LB-Medium (100 µg/ml Ampizillin) angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler (200 upm) inkubiert. Die DNA wurde mithilfe des Nucleobond AX500 Kits nach Vorschrift des Herstellers aus den Bakterienzellen präpariert und aufgereinigt (Maxi-Präp). Die erhaltene DNA wurde erneut mittels Restriktionsverdau und anschließender Sequenzierung (siehe 2.2.1.10) überprüft.

2.2.1.10 Sequenzierung der DNA-Konstrukte

Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte wurde von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Verwendete Zelllinien

HEK293-EBNA Zellen wurden in „Dulbecco’s modified eagles medium“ (DMEM), dem 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden, kultiviert und werden als HEK293Ewt Zellen bezeichnet.

Klonale HEK293-EBNA Zellen, die ein Fusionsprotein aus sekretorischer alkalischer Phosphatase und APP (AP-APP) sowie Bcl-X_L/CrmA exprimieren (Klon Sabc70), wurden wie beschrieben hergestellt und kultiviert (Schobel et al., 2006) und werden als AP-APP Zellen bezeichnet.

Stabil mit dem Konstrukt pCEP4/APP695 bzw. pCEP4/SP-C99 transfizierte HEK293-EBNA Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 100 µg/ml Hygromycin kultiviert und werden als HEK293E-APP695 bzw. HEK293E-SP-C99 Zellen bezeichnet.

Klonale HEK293 Zellen, die humanes APP695 exprimieren, welches die schwedische Mutation an der Schnittstelle der β-Sekretase aufweist (Citron et al., 1992), wurden in DMEM mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 200 µg/ml G418 kultiviert und werden als HEK293-APP695swe Zellen bezeichnet.

Stabil mit dem Konstrukt pcDNA3.1-BACE1wt bzw. pcDNA3.1-BACE1-GPI transfizierte HEK293-EBNA Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 200 µg/ml G418 kultiviert und werden als HEK293E-BACE1wt bzw. HEK293E-BACE1-GPI Zellen bezeichnet.

Stabil mit dem Konstrukt peak12/APP695 transfizierte COS7 Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 3,0 µg/ml Puromycin kultiviert und werden als COS7-APP695 Zellen bezeichnet.

Klonale H4 Zellen, die humanes APP751 exprimieren, wurden in DMEM mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 200 µg/ml G418 kultiviert und werden als H4-APP751 Zellen bezeichnet.

Klonale U373 Zellen, die humanes APP751 exprimieren, wurden in DMEM mit 15 % FCS kultiviert und werden als U373-APP751 Zellen bezeichnet.

2.2.2.2 Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Dazu wurden die Zellen in 10 cm-Schalen in den entsprechenden Medien (siehe 2.2.2.1) ausgesät und im Inkubator gezüchtet. Bei Erreichen von ca. 70-80 % Konfluenz wurden die Zellen mit 2 ml sterilem PBS gewaschen und mit 1,5 ml steriler PBS/EDTA-Lösung von der Schale abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit 3,5 ml Medium resuspendiert und auf Schalen mit frischem Medium verteilt. Zum Ablösen einiger Zelllinien wurde statt PBS/EDTA eine 0,05 %ige Trypsin-EDTA-Lösung verwendet. Die Zellen wurden nach dem Resuspendieren für 5 Min. bei 1000 upm pelletiert, in 5 ml Medium aufgenommen und auf Schalen mit frischem Medium verteilt.

2.2.2.3 Beschichtung von Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin

Die Zellkulturschalen wurden vollständig mit steriler Poly-L-Lysin-Lösung bedeckt (3 ml einer 1:1000-Lösung in sterilem dH₂O) und mindestens 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abnahme der Poly-L-Lysin-Lösung wurden die Schalen zweimal mit je 5 ml dH₂O (steril) gewaschen und anschließend getrocknet.

2.2.2.4 Aussäen von Zellen

Zum Aussäen wurden die Zellen wie unter 2.2.2.2 beschrieben abgelöst, mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, auf die gewünschte Zelldichte verdünnt und auf die jeweiligen Zellkulturgefäße verteilt. Bis zum Versuchsstart wurden die Zellen dann bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.2.5 Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden die Zellen nach Erreichen von 70-80 % Konfluenz mit 2 ml sterilem PBS gewaschen und mithilfe von 1,5 ml PBS/EDTA bzw. Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, mit 3,5 ml Medium resuspendiert und für 5 Min. bei 1000 upm pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 2 ml Einfriermedium aufgenommen und zu gleichen Teilen auf zwei Kryoröhrchen verteilt. Die Kulturen wurden bei -80°C eingefroren und für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.3 Zelluläre Assays

2.2.3.1 Hitze-Inaktivierung von Serum (FCS) für den Screen

Das dem für den Screen verwendeten Zellkulturmedium zugesetzte Serum (FCS) wurde für 1 Stunde bei 60°C inkubiert, um darin enthaltene Phosphatasen zu inaktivieren.

2.2.3.2 Screen nach Substanzen, welche die Ektodomänenspaltung von APP modulieren

AP-APP Zellen (Lichtenthaler et al., 2003; Schobel et al., 2006) wurden in Poly-D-Lysin-beschichteten 384-well Platten in einer Dichte von $2,75 \times 10^4$ Zellen pro well in Medium mit nicht-inaktiviertem Serum mit dem sogenannten Multidrop ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium durch frisches Medium mit inaktiviertem Serum ersetzt und mithilfe des Pintools des BiomekFX die Substanzen, gelöst in DMSO, aus den Platten der Substanzbibliothek (Biomol) transferiert. Die Eintauchtiefe und -geschwindigkeit wurden dabei so gewählt, dass je ca. 150 nl Substanz transferiert wurden. Die Zellen wurden daraufhin wiederum bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 4 und 8 Stunden wurden jeweils 10 µl Überstand abgenommen und in unbeschichtete 384-well Platten transferiert, in die bereits 70 µl AP-Reaktionslösung (AP-Puffer + AP-Substrat) mit dem Multidrop vorgelegt worden waren. Die Ansätze wurden durch kurze Zentrifugation der Platten gemischt und bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde stündlich die Extinktion bei 405 nm in einem Plattenspektrometer bestimmt, welche proportional zur Menge an umgesetztem AP-Substrat ist. Für die nach 4 Stunden genommenen Proben wurden 5 Messwerte (1-5 Stunden), für die nach 8 Stunden genommenen Proben 3 Messwerte (1-3 Stunden) bestimmt. Jede Substanz wurde im Duplikat getestet. Als Negativkontrolle diente DMSO, als Positivkontrolle wurde PMA eingesetzt. Alle Pipettierschritte wurden mithilfe des Pipettier-Roboters BiomekFX durchgeführt.

2.2.3.3 Behandlung von Zellen mit chemischen Substanzen

AP-APP Zellen wurden in Poly-D-Lysin-beschichtete 24-well Platten in einer Dichte von $3,25-4 \times 10^5$ Zellen/well ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und durch frisches Medium, welches die jeweilige chemische Substanz bzw. das Lösungsmittel alleine enthielt, ausgetauscht. Nach einer Inkubation für 4 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 wurde das konditionierte Medium abgenommen und die Zellen in Lysispuffer lysiert (siehe 2.2.4.1). Bei Behandlung mit TAPI-1 wurde vor der vierstündigen Hauptinkubation eine 45-minütige Präinkubation durchgeführt. In den Medium-Proben wurde anschließend die Aktivität der alkalischen Phosphatase, wie unter 2.2.4.3 beschrieben, bestimmt.

Alternativ wurden HEK293Ewt, HEK293E-APP695, HEK293E-SP-C99, HEK293-APP695swe und COS7-APP695 Zellen in Poly-L-Lysin-beschichtete 6 cm-Schalen in einer Dichte von $0,75-3,5 \times 10^6$ Zellen/Schale bzw. HEK293E-APP695, HEK293-APP695swe HEK293E-APP Δ C, HEK293E-BACE1wt und HEK293E-BACE1-GPI Zellen in Poly-D-beschichtete 24-well Platten in einer Dichte von $2-3,5 \times 10^5$ /well (Dichte jeweils abhängig vom Zelltyp) ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt. Am zweiten Tag nach dem Aussäen wurde das Medium abgenommen und durch frisches Medium, welches die chemischen Substanzen bzw. das Lösungsmittel alleine enthielt, ersetzt. Nach einer Präinkubation für 45 Min. wurde das Medium erneut gewechselt und die Zellen für weitere 4-24 Stunden in Substanz- bzw. Lösungsmittel-haltigem Medium inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das konditionierte Medium abgenommen und die Zellen in Lysispuffer lysiert (siehe 2.2.4.1).

H4-APP751 und U373-APP751 Zellen wurden in 24-well Platten in einer Dichte von $2,25 \times 10^5$ Zellen/well ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und durch frisches Medium, welches die chemischen Substanzen bzw. das Lösungsmittel alleine enthielt, ersetzt. Nach einer Präinkubation für 45 Min. wurde das Medium erneut gewechselt und die Zellen für weitere 4 Stunden in Substanz- bzw. Lösungsmittel-haltigem Medium inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das konditionierte Medium abgenommen und die Zellen in Lysispuffer lysiert (siehe 2.2.4.1). Für die Bestimmung von A β wurden H4-APP751 Zellen in Poly-L-Lysin-beschichtete 10 cm-Schalen in einer Dichte von 6×10^6 Zellen/Schale ausgesät. Die Schalen wurden wie für die 24-well Platten beschrieben behandelt.

Die verwendeten chemischen Substanzen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

2.2.3.4 Transiente Transfektion mit rekombinanter DNA

Die entsprechenden Zellen wurden in Poly-D-Lysin-beschichteten 24-well Platten in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/well ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mittels Lipofectamine2000 transfiziert. Dazu wurden pro Ansatz 2 μ l Lipofectamine mit 50 μ l DMEM (Lipo-Mix) und die gewünschte DNA-Menge ebenfalls mit 50 μ l DMEM (DNA-Mix) gemischt. Lipo-Mix und DNA-Mix wurden vereinigt und für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Mischung auf die Zellen pipettiert. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurde das konditionierte Medium abgenommen und die Zellen lysiert (siehe 2.2.4.1). Alternativ wurde vor der Verarbeitung der Zellen eine Behandlung mit chemischen Substanzen mit 45 Min. Präinkubation und 4 Stunden Hauptinkubation durchgeführt (siehe auch 2.2.3.3).

2.2.3.5 Herstellung stabil exprimierender Zelllinien

Zur Herstellung von Zelllinien, die ein bestimmtes Protein stabil exprimieren, wurden die entsprechenden Zielzellen, wie unter 2.2.2.4 beschrieben, in unbeschichtete 24-well Platten in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/well ausgesät. Die Zellen wurden am folgenden Tag, wie unter 2.2.3.4 beschrieben, mit dem gewünschten Konstrukt transfiziert. Einen weiteren Tag später wurde das Medium gewechselt. Am zweiten Tag nach Transfektion wurden die Zellen in 6-well Platten umgesetzt und die Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum gestartet. Den Selektionsprozess können nur Zellen überleben, die das transfizierte Konstrukt stabil tragen, da auf diesem die Antibiotikums-Resistenz kodiert ist. Von den selektionierten Zell-Pools wurden, wie unter 2.2.4.1 beschrieben, Zelllysate hergestellt und in diesen mittels SDS-PAGE und Western Blot (siehe 2.2.4.5 und 2.2.4.8) die Expression des gewünschten Proteins nachgewiesen. In manchen Fällen wurden die Zell-Pools anschließend vereinzelt, um klonale Zelllinien zu erhalten.

2.2.3.6 Transienter „knock-down“ von Calmodulin mittels siRNA-Oligos

Für den transienten „knock-down“ von Calmodulin wurde ein Ansatz gewählt, der auf der Transfektion von siRNA („small interfering RNA“)-Oligonukleotiden basiert. Da Calmodulin von drei verschiedenen Genen codiert wird (*calm1-3*), wurden siRNA-Oligonukleotide gegen die Genprodukte von *calm1* und *calm3* verwendet. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Dharmacon in Form von „Pools“ (smart pools) zur Verfügung gestellt, welche jeweils vier verschiedene Oligonukleotide enthalten. Als Kontrolle wurde ein Pool von sogenannten

„non-targeting siRNAs“ verwendet, der gegen keine bestimmte Sequenz gerichtet ist. Die Pools hatten eine Konzentration von 20 µM.

HEK293E-APP695 Zellen wurden in Poly-D-beschichtete 24-well Platten in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/well ausgesät. 4 Stunden später wurden die Zellen mit den Oligonukleotid-Pools mittels Lipofectamine2000 transfiziert. Dazu wurden pro Ansatz Gemische aus 2 µl Lipofectamine und 50 µl DMEM (Lipo-Mix) sowie aus 4 µl Kontroll- bzw. je 2 µl *calm1* und *calm3*-Oligonukleotiden und 50 µl DMEM (Oligo-Mix) hergestellt. Lipo- und Oligo-Mix wurden vereinigt und für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde die Mischung auf die Zellen pipettiert. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Einen weiteren Tag später wurde das konditionierte Medium abgenommen und die Zellen lysiert (siehe 2.2.4.1). Alternativ wurde vor der Verarbeitung der Zellen eine Behandlung mit chemischen Substanzen mit 45 Min. Präinkubation und 4 Stunden Hauptinkubation durchgeführt (siehe auch 2.2.3.3).

2.2.3.7 Toxizitätsbestimmung mittels Laktat-Dehydrogenase-Test (LDH-Assay)

HEK293E-APP695 Zellen wurden in Poly-D-Lysin beschichtete 96-well Platten in Medium mit Hitze-inaktiviertem Serum in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/well ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und durch frisches Medium, welches unterschiedliche Konzentrationen von Bepridil Hydrochlorid bzw. das Lösungsmittel DMSO alleine enthielt, ersetzt (je 8 wells/Konzentration). Als Positivkontrolle wurde Tamoxifen mit Ethanol als Lösungsmittelkontrolle verwendet. Die Zellen wurden für weitere 24 Stunden inkubiert. 45 Min. vor Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen von je 3 wells jeder Bedingung durch Zugabe von 9 % Triton X-100 lysiert, um die maximal mögliche LDH-Ausschüttung für jede Bedingung zu bestimmen (LDH_{max}). Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Platte für 5 Min. bei 250 g zentrifugiert, Proben von den Überständen der Zellen genommen und diese 1:5 mit frischem Medium verdünnt. Anschließend wurde die LDH-Aktivität in den Proben mittels des CytoTox[®]-Kits, nach den Angaben des Herstellers, bestimmt. Das Ausmaß der Toxizität wurde wie folgt für jede Bedingung berechnet:

$$\text{Toxizität} = \frac{\sum LDH_{\text{nicht-lysierte Proben}}}{\sum LDH_{\text{Max}}}$$

Die Ergebnisse sind als Toxizitäts-Werte relativ zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle angegeben.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, in 300 µl (24-well Platten), 800 µl (6 cm-Schalen) bzw. 1 ml (10 cm-Schalen) Lysispuffer abgelöst, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 20 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C/13000 upm für 5 Min.. Anschließend wurde der erhaltene Proteinextrakt abgenommen und in ein frisches Eppendorfggefäß pipettiert. Das Pellet wurde verworfen. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. In den so hergestellten Zelllysaten erfolgte eine Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Proben mittels des BCA-Assays (2.2.4.2). Die Zelllysate wurden entweder umgehend weiter verarbeitet oder bei -20°C gelagert.

2.2.4.2 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mittels des Bicinchonic Acid-Verfahrens (BCA-Assay)

Je 10 µl der Zelllysate wurden in Doppelwerten in eine 96-well Platte pipettiert. Die BCA-Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 1:50 gemischt und je 200 µl/well zu den vorgelegten Lysaten pipettiert. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden zusätzlich Verdünnungen einer BSA-Standardlösung zwischen 0 µg/ml und 2 µg/ml in einer Einfachbestimmung angesetzt und ebenfalls mit der BCA-Reagenz-Mischung versetzt. Die 96-well Platte wurde anschließend 30 Min. bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte photometrisch bei 562 nm. Mithilfe der Eichgeraden konnte aus den erhaltenen Werten die Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.2.4.3 Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität

Zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität im konditionierten Medium von AP-APP Zellen bzw. Zellen, die mit AP-Fusionsproteinen transient transfiziert wurden, wurden Aliquots der konditionierten Medien für 30 Min. bei 65°C inkubiert. Dieser Schritt führt zur Hitzeinaktivierung der endogenen alkalischen Phosphatase, während die exogen exprimierte alkalische Phosphatase hitzestabil ist. Anschließend wurden je 20 µl der Proben in Doppelwerten in eine 96-well Platte pipettiert und mit 200 µl AP-Reaktionslösung (AP-Puffer + AP-Substrat) versetzt. Die Platte wurde bei 37°C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Absorption bei 405 nm bestimmt. Diese ist ein Maß für die Menge an

umgesetztem Substrat. Als Referenz wurde Hitze-inaktiviertes Medium von nicht-transfizierten HEK293Ewt Zellen verwendet.

Die erhaltenen Werte wurden auf die Proteinkonzentration der entsprechenden Zellysate normiert.

2.2.4.4 Immunpräzipitation von Proteinen

Zum Nachweis von A β wurde eine Immunpräzipitation im konditionierten Medium zur Anreicherung der Peptide durchgeführt.

Dabei wurden Aliquots der konditionierten Medien (Volumina normiert auf die Proteinkonzentrationen der entsprechenden Zellysate) mit der in Tabelle 4 (2.1.4) angegebenen Menge des entsprechenden Antikörpers und 30 μ l Protein-A-Sepharose versetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Überkopf-Schüttler inkubiert. Das Immunpräzipitat wurde durch Zentrifugation (6000 upm/5 Min./4°C) pelletiert und nacheinander je 10 Min. mit je 1000 μ l STEN-NaCl Puffer, STEN-SDS Puffer und STEN Puffer gewaschen.

Die Pellets wurden anschließend mit 15 μ l 4x SDS-Probenpuffer bzw. 1x Wiltfang-Probenpuffer (für Analyse von A β auf Harnstoff-Gelen) versetzt, 5 Min. bei 95°C gekocht und mittels SDS-PAGE und Western Blot (siehe 2.2.4.6, 2.2.4.7 und 2.2.4.8) analysiert.

2.2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die eindimensionale Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem (Laemmli, 1970).

Zur Herstellung der Gele sowie zur Trennung der Proteine wurden Minigelsysteme (Bio-Rad) verwendet.

Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Gele für SDS-PAGE (Tris-Glycin-Gele; die angegebenen Mengen reichen für 2 Gele mit einer Dicke von 1,5 mm)

Trenngel	8 % Gel	12 % Gel
dH₂O	7,8 ml	6 ml
30 % Acrylamid-Bis Lösung	4,2 ml	6 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS in dH ₂ O)	4 ml	4 ml
10 % APS	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl
Sammelgel		
dH₂O	6,5 ml	6,5 ml
30 % Acrylamid-Bis Lösung	1,2 ml	1,2 ml
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS in dH ₂ O)	2,5 ml	2,5 ml
10 % APS	30 µl	30 µl
TEMED	30 µl	30 µl

Vor Verwendung wurden die Glasplatten mit Isopropanol von Rückständen befreit, das Trenngel bis zu einer Höhe von ca. 2 cm unterhalb des oberen Randes gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisieren wurde der über dem Trenngel befindliche Raum mit saugfähigem Papier getrocknet, mit Sammelgel gefüllt und ein Kamm eingefügt. Nach dem vollständigen Aushärten des Sammelgels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammer wurde sowohl auf der Seite der Anode, als auch auf der Seite der Kathode mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Taschen mehrmals damit gespült. Die Proben (Aliquots der konditionierten Medien bzw. Zelllysate) wurden vor dem Auftragen mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt (Endkonzentration 1x) und für 5 Min. bei 95°C inkubiert. Als Molekulargewichtsstandard wurden 7 µl See Blue Plus 2-Marker (Invitrogen) geladen. Anode und Kathode wurden mit der Spannungsquelle verbunden. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 90 V und nach Eintritt der Proteine in das Trenngel bei 140 V.

2.2.4.6 Tris-Tricin Gele

Zur Auftrennung von niedermolekularen Peptiden und Proteinen wurde das Gelsystem nach Schagger und Jagow (Schagger and von Jagow, 1987) unter Verwendung des Bio-Rad Minigelsystems eingesetzt.

Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Zusammensetzung der Tris-Tricin-Gele (die angegebenen Mengen reichen für 2 Gele mit einer Dicke von 1,5 mm)

	Trenngel (16,5 %)	Spacergel (10 %)	Sammelgel (4 %)
dH₂O	---	3,5 ml	4,2 ml
Acrylamid-Lösung (48 g Acrylamid und 1,5 g Bisacrylamid ad 100 ml mit dH ₂ O)	3,5 ml	1,5 ml	0,5 ml
Gelpuffer (3 M Tris-HCl pH 8,45 und 0,3 % (w/v) SDS in dH ₂ O)	3,5 ml	2,5 ml	1,55 ml
Glycerol (32 % in dH ₂ O)	3,5 ml	---	---
10 % APS	32,5 µl	35 µl	50 µl
TEMED	4 µl	4 µl	5 µl

Mit der Ausnahme, dass das Trenngel noch vor dem Aushärten mit dem Spacergel überschichtet wurde, wurden die Gele, wie unter 2.2.4.5 beschrieben, gegossen. Die Elektrophoreskammer wurde auf der Seite der Anode mit Anodenpuffer und auf der Seite der Kathode mit Kathodenpuffer gefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich beide Puffer-Lösungen nicht mischen. Die Proben wurden, wie unter 2.2.4.4 bzw. 2.2.4.5 beschrieben, vorbereitet und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte zu Beginn bei 80 V und nach Eintreten der Proben in das Spacergel bei 120 V.

2.2.4.7 Harnstoff-Gele nach Wiltfang

Zur Unterscheidung der einzelnen Amyloid-Spezies wurden Harnstoff-Gele nach Wiltfang (Wiltfang et al., 1997), unter Verwendung des Hoefer Mighty Small Gelsystems, eingesetzt.

Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Harnstoff-Gele (die angegebenen Mengen reichen für 2 Gele mit einer Dicke von 1 mm)

	Trenngel (11 %)	Spacergel	Sammelgel
Harnstoff	4,8 g	---	---
dH₂O	1 ml	680 µl	740 µl
40 % Acrylamid-Bis-Lösung	2,75 ml	300 µl	675 µl
Trenngelpuffer	2,5 ml	---	---
Spacergelpuffer	---	1 ml	---
Sammelgelpuffer	---	---	1,5 ml
20 % SDS (w/v in dH₂O)	50 µl	10 µl	15 µl
10 % APS	40 µl	8 µl	18 µl
TEMED	5 µl	2 µl	6 µl

Alle drei Gelschichten wurden nach vollständigem Auspolymerisieren der vorherigen, wie unter 2.2.4.5 beschrieben, gegossen. Die Elektrophoresekammer wurde auf der Seite der Anode mit Anodenpuffer und auf der Seite der Kathode mit Kathodenpuffer gefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich beide Puffer-Lösungen nicht mischen. Die Taschen wurden mehrmals mit Puffer gespült. Die Proben wurden, wie unter 2.2.4.4 beschrieben, vorbereitet und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte zu Beginn bei 95 V und nach Eintreten der Proben in das Trenngel bei 125 V.

2.2.4.8 Western Blot

Nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.4.5, 2.2.4.6 und 2.2.4.7) wurden die Proteine in einer Transferkammer auf eine PVDF-Membran übertragen. Vor dem Transfer ist eine Aktivierung der Membran durch kurze Inkubation in Isopropanol notwendig. Nach der Aktivierung wurde die Membran kurz mit VE-Wasser gespült und in Transferpuffer äquilibriert. Alternativ wurde eine Nitrozellulose-Membran verwendet. Bei dieser ist keine

Aktivierung mit Isopropanol notwendig. Für den Transfer wurde das Mini-Gel-Transfersystem von Bio-Rad verwendet.

Transferaufbau:

- Anodenplatte
- poröser Schwamm in Transferpuffer äquilibriert
- zwei Lagen Gel Transfer Filterpapier (Whatman; Schleicher & Schuell) in Transfer-Puffer äquilibriert
- Membran
- SDS-Polyacrylamid-Gel
- zwei Lagen Gel Transfer Filterpapier (Whatman; Schleicher & Schuell) in Transfer-Puffer äquilibriert
- poröser Schwamm in Transferpuffer äquilibriert
- Kathodenplatte

Die Transferkammer wurde komplett mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte bei konstantem Stromfluss von 400 mA für 65 Min.. Zur Kühlung des Systems wurde ein Kühlakku in die Transferkammer eingesetzt. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen 30 Min. bei RT in Blockierlösung geschüttelt. Die so vorbehandelte Membran wurde zweimal mit PBST gewaschen und 2 x 5 Min. mit PBST auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 2; 2.1.4) für bis zu 1 Stunde bei RT, bzw. über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte ein Waschen der Membran für 3 x 10 Min. mit PBST. Der entsprechende Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3; 2.1.4) wurde anschließend für bis zu 45 Min. bei RT auf die Membran gegeben. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde viermal je 5 Min. mit PBST-Puffer gewaschen. Die Detektion der mit den Antikörpern markierten Proteine erfolgte mittels der sogenannten „enhanced chemoluminescence“ (ECL)-Technik („ECLTM Western Blotting Detection Reagents“; Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers. Die Signale wurden durch Schwärzung von Röntgenfilmen (Super RX, Fuji) sichtbar gemacht. Zum Nachweis schwacher Signale wurde das „ECLplus Western Blotting Detection System“ (Amersham Biosciences) verwendet. Zur Quantifizierung der Intensitäten wurden die Signale mit dem Flurochem 8900 eingescannt und mittels des Fluorchem-Analyse-Programms ausgewertet.

2.2.4.9 Western Blot-Protokoll zum Nachweis von A β

Zum Nachweis von A β nach Auftrennung auf Tris-Tricin- oder Harnstoff-Gelen wurde ein leicht modifiziertes Western Blot-Protokoll verwendet. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde diese für 5 Min. in PBS-Puffer gekocht. Anschließend wurden die unspezifischen Bindestellen auf der Membran mit I-Block-Lösung abgesättigt. Die Membran wurde dann über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde 3 x 5 Min. mit PBST gewaschen und ein an alkalische Phosphatase gekoppelter Sekundärantikörper (Tropix) für 60 Min. auf die Membran gegeben. Danach wurde 3 x 10 Min. mit PBST und 2 x 5 Min. mit Assay-Puffer (Western Star Kit) gewaschen. Zur Detektion wurde in diesem Fall das Western Star Kit (Tropix) eingesetzt.

2.2.4.10 Western Blot-Protokoll zum Nachweis von Calmodulin

Zum Nachweis von Calmodulin nach Auftrennung auf Tris-Tricin-Gelen wurde ebenfalls ein etwas verändertes Protokoll verwendet. In diesem Fall wurde die Nitrocellulose-Membran, nach erfolgtem Transfer, für 45 Min. in 0,2 %iger Glutaraldehyd-Lösung in PBS inkubiert, um Calmodulin auf der Membran zu fixieren (Van Eldik and Wolchok, 1984). Dies ist nötig, da das Protein sonst bei den nachfolgenden Waschschritten von der Membran gewaschen wird. Die Inkubation erfolgte dabei in abgedichteten Schalen unter dem Abzug, da Glutaraldehyd sehr giftig ist. Nach dem Fixierschritt wurde die Membran mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend in Blockierlösung zur Absättigung der freien Bindungsstellen inkubiert. Ab diesem Schritt wurde, wie unter 2.2.4.8 beschrieben, weiter verfahren.

2.2.4.11 „Strippen“ von Western Blot-Membranen

Um eine Western Blot-Membran nacheinander mit verschiedenen Antikörpern analysieren zu können, wurden die gebundenen Antikörper nach dem ersten Proteinnachweis durch 2-stündige Inkubation der Membran in „Stripping“-Puffer entfernt. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 50°C unter konstantem Schütteln. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen, in Blockierlösung inkubiert und erneut zum immunchemischen Nachweis der Proteine (siehe 2.2.4.8) verwendet.

2.2.4.12 „Sandwich-Immunoassay“ zum Nachweis der verschiedenen A β -Spezies

Zum Nachweis und zur Quantifizierung der verschiedenen A β -Spezies im konditionierten Medium wurde ein sogenannter „Sandwich-Immunoassay“ der Firma Meso Scale Discovery (MSD) eingesetzt.

Vor Beginn der Messungen wurden die 96-well Messplatten (Streptavidin-beschichtete Standard MA2400 Platten, MSD) für 30 Min. mit ECL-Blockierpuffer bei RT geblockt, um eine unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper zu verhindern. Anschließend wurden die Platten für 60 Min. bei RT oder über Nacht bei 4°C mit biotinyliertem Antikörper 2D8 (1:1000 verdünnt in ECL-Blockierpuffer; Endkonzentration 2,4 μ g/ml) beschichtet. Nach der Beschichtung wurde zweimal mit Wasch-Puffer I gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die so vorbereiteten Platten wurden sofort für die Messungen eingesetzt. Es wurde pro Experiment jeweils eine Platte für die A β 38-, A β 40- und A β 42-Messung vorbereitet. Für alle Inkubations- bzw. Waschschrte wurden 100 μ l pro well eingesetzt.

Für die Messung wurden 75 μ l der konditionierten Medien in die vorbereiteten Messplatten pipettiert. Die Bestimmung erfolgte in Doppelwerten. Zusätzlich wurden auf die Platten verschiedene Verdünnungen von Standardlösungen, die definierte Konzentrationen von A β 38, A β 40 bzw. A β 42 enthalten, aufgetragen, um eine Standardkurve zur Konzentrationsbestimmung zu erhalten. Zur Detektion der verschiedenen A β -Spezies wurden Antikörper eingesetzt, die den C-Terminus von A β 38, A β 40 bzw. A β 42 spezifisch erkennen (siehe Tabelle 5; 2.1.4). Die Antikörper wurden jeweils 1:1000 in ECL-Blockierpuffer verdünnt und 25 μ l pro well zu den vorgelegten Proben pipettiert. Die Platten wurden daraufhin für 2 Stunden auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Platten je zweimal mit Wasch-Puffer I und II gewaschen und 100 μ l pro well 1x „MSD Read-Puffer“ zugegeben. Die Platten wurden anschließend mittels des Sektor Imagers (MSD) gemessen. Die Messungen wurden von Dr. Richard Page in unserem Labor durchgeführt.

2.2.5 BACE1 *in vitro* Test

Zur *in vitro* Bestimmung der BACE1 Aktivität und eventueller Einflüsse der untersuchten chemischen Substanzen auf diese Aktivität wurde ein BACE1 *in vitro* Test eingesetzt (Capell et al., 2002).

Die Reaktionen wurden in 100 μ l Ansätzen durchgeführt, die nach dem in Tabelle 12 dargestellten Schema angesetzt wurden.

Tabelle 12: Pipettierschema des BACE1 *in vitro* Test

aufgereinigte BACE1-Ektodomäne (BACE1-NT)	1 μ l
chemische Substanz (50-fach konzentriert in DMSO)	2 μ l
Natrium-Acetat-Puffer (50 mM Natrium-Acetat pH 4,5)	80 μ l
Substratpeptid (Endkonzentration 1 μ M)	0,1 μ l
dH₂O	17 μ l

Es wurden zuerst Mischungen von BACE1-NT, chemischer Substanz und dH₂O (Mastermix 1), sowie von Substratpeptid und Natrium-Acetat-Puffer (Mastermix 2) angesetzt. Mastermix 1 wurde in die 96-well Messplatten pipettiert und für 30 Min. bei RT inkubiert. Mastermix 2 wurde während dieser Zeit auf Eis gelagert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Mastermix 2 zu den wells mit vorgelegtem Mastermix 1 gestartet. Anschließend wurde alle 30 Sekunden über einen Zeitraum von 2 Stunden die Fluoreszenz bestimmt (Fluoroskan Ascent, Anregung bei 530 nm, Bestimmung der Emission bei 590 nm). Als Positivkontrolle für BACE1-Inhibition wurde der bekannte BACE1-Inhibitor GL-189 (Capell et al., 2002) in einer Endkonzentration von 1 μ M eingesetzt. Als weitere Kontrollen wurden Experimente ohne BACE1-NT bzw. ohne Substratpeptid durchgeführt, um sicherzustellen, dass die gemessene Fluoreszenz auf der Spaltung des Substratpeptids durch BACE1-NT beruht.

2.2.6 Fluoreszenz-basierte Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentration (Calcium-Imaging)

Zur Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentration und eventueller Änderungen durch Behandlung mit verschiedenen chemischen Substanzen wurden HEK293E-APP695 Zellen in 12-well Platten auf Glasplättchen ausgesät und bei 37°C und 5 % CO₂ bis zu einer Konfluenz von ca. 75 % inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 5 µM Fura-2-Acetoxymethyl-Ester (Fura-2/AM), einem Calcium-sensitiven Farbstoff, in Calcium-haltigem HBSS-Puffer, welcher zusätzlich 1 % BSA und 0,08 % Pluronsäure enthielt, für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Der Farbstoff kann dabei durch die Plasmamembran der Zellen diffundieren. Im Zytoplasma der Zelle wird durch die unspezifische Aktivität von Esterasen der Ester-Rest des Moleküls abgespalten. Auf diese Weise modifizierter Farbstoff ist nicht mehr membrangängig und reichert sich deshalb innerhalb der Zelle an. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen 2 x mit HBSS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (BX50WI, Olympus), unter Verwendung eines Wasser-Immersion-Objektivs mit 20-facher Vergrößerung, analysiert. Der Calcium-sensitive Farbstoff Fura-2 weist zwei verschiedene Anregungsmaxima auf, abhängig davon, ob Calcium gebunden ist oder nicht. Das Maximum für die Calcium-gebundene Form liegt bei 340 nm, während der Calcium-freie Farbstoff bei 380 nm maximal angeregt werden kann. Aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten nach Anregung bei 340 bzw. 380 nm lässt sich mittels folgender Gleichung die Calcium-Konzentration bestimmen (Grynkiewicz et al., 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \cdot \beta \cdot [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)]$$

K_d ist die Dissoziationskonstante von Fura-2 für Calcium ($K_d = 224$ nM), β beschreibt das Verhältnis der Fluoreszenzintensität bei Anregung bei 380 nm in Abwesenheit von Calcium zur Intensität in Anwesenheit einer sättigenden Calcium-Konzentration, R_{\min} und R_{\max} geben das Minimum bzw. Maximum dieses Verhältnisses an. R_{\min} und R_{\max} wurden mithilfe des "calcium calibration kit" (Molecular Probes) ermittelt. Die Zellen wurden während der Experimente mit Calcium-haltigem bzw. Calcium-freiem HBSS-Puffer perfundiert. Die chemischen Substanzen wurden durch Perfusion zugegeben. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.7 NMR-Analyse

2.2.7.1 Präparation der Lipidmembranen

Die Lipide mit einer Gesamtmasse (Lipide und Cholesterin) von 40-50 mg, mit einem Anteil von mindestens 20 mg an deuteriertem Material, wurden zusammen mit der entsprechenden Menge an Bepidil in 2,5 ml *tert*-Butanol (*t*-BuOH) gelöst und anschließend lyophilisiert. Die lyophilisierte Lipidmischung wurde in ein an einer Seite abgeschmolzenes Glasrohr mit einem inneren Durchmesser von 10 mm eingewogen und 50 wt% isotoopenreines $^1\text{H}_2\text{O}$ zugegeben. Die Probe wurde an den Boden des halboffenen Glasrohrs zentrifugiert und unter Erhitzung mittels eines Sauerstoffbrenners unter Argon oberhalb der Probe eine Verengung in das Glas gezogen. Direkt danach wurde das offene Ende des Glasrohrs unter Vakuum abgeschmolzen und dadurch versiegelt. Während der gesamten Erhitzung wurde der Boden des Glasrohrs mit der Probe in flüssigem Stickstoff gekühlt. Das Probengefäß wurde ca. 6-8 mal bei 5000 g oberhalb der Phasenübergangstemperatur zentrifugiert, wobei nach jedem Zentrifugationsschritt das Gefäß invertiert wurde. Durch das mehrfache Passieren der Lipidmischung durch die Verengung wurde die komplette Durchmischung und gleichmässige Hydratation der Probe sichergestellt. Das Glasrohr wurde nun an einer Seite mit Hilfe eines Glasschneiders geöffnet und die Probe in eine runde Polykarbonat-Hülse mit einem äußeren Durchmesser von 5 mm überführt, indem leichter Druck mit Hilfe eines Pipettenhütchens appliziert wurde. Die Hülse wurde beidseitig mit Hilfe von maschinell gefertigten Teflon-Stöpseln verschlossen. Vor der Messung wurde die Probe mindestens 6 Stunden bei 50°C äquilibriert. Der Hydratationsstatus konnte aufgrund der Verwendung von isotoopenreinem $^1\text{H}_2\text{O}$ nur über das Aussehen des ^2H -NMR-Spektrums oberhalb des Phasenübergangs bestimmt werden. Die Reinheit der Lipide wurde zu Beginn und am Ende der NMR-Messreihen mittels Dünnschichtchromatographie geprüft.

2.2.7.2 ^2H -NMR-Spektroskopie

Alle ^2H -NMR Spektren wurden mit einem Varian VXR-400 Spektrometer mit einer magnetischen Flussdichte von 9.4 Tesla (^2H Frequenz von 61.4 MHz) betrieben. Die Proben wurden in einer 5 mm Spule gemessen und mittels schneller Dekonvolution durch gewichtete Fourier-Transformation de-Paked (McCabe and Wassall, 1997). Zur Anregung des Signals wurde die quadrupolare Echo-Pulssequenz mit einer 90° Pulsbreite von 3 μs benutzt. Der Pulsabstand betrug 20 μs mit einer Recyclezeit, die der jeweiligen Probe angepasst wurde, um Sättigung zu vermeiden. Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurde nur der Realteil der Datenpunkte prozessiert und die Spektren symmetrisiert. Die Signale wurden normalerweise unter dem Gesichtspunkt zugeordnet, dass die quadrupolare Aufspaltung von dem C3 zu dem Methylende abnimmt und die Fläche unter jedem Signal proportional zur Anzahl der enthaltenen Deuteronen ist. Eine teilweise präzisere Zuordnung wurde, wenn möglich, auf Grund bereits publizierter Daten angewendet (Guo et al., 2002; Mehnert et al., 2006). Die vollständige Hydratation wurde durch die Zugabe von 50 wt% Deuterium-depletiertem Wasser sichergestellt. Zur Prozessierung der Daten wurde das First-Order-Mean-Torque Modell benutzt (Petrache et al., 2000; Petrache et al., 1999). Die NMR-Analyse wurde von Tim Bartels im Labor von Prof. Dr. Klaus Beyer durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Screen nach chemischen Modulatoren der Ektodomänen-spaltung von APP

Um die Regulation der Ektodomänenspaltung (im Folgenden auch als „Shedding“ bezeichnet) von APP besser zu verstehen und dadurch neue Wege zur Inhibition der amyloidogenen Prozessierung zu identifizieren, wurde ein Screen nach chemischen Substanzen, welche diese Spaltung beeinflussen, durchgeführt. Hierfür wurde eine Substanzbibliothek (Biomol) verwendet, die 480 chemische Substanzen enthält, deren Wirkungen weitestgehend bekannt sind.

Als Reporterzelllinie für den Screen wurde eine klonale HEK293-EBNA-Zelllinie verwendet, die ein Fusionsprotein aus sekretorischer alkalischer Phosphatase und APP (AP-APP) exprimiert (siehe Abbildung 7). In dieser Zelllinie kann die Menge an abgespaltener APP-Ektodomäne mittels einer Phosphatase-Reaktion (siehe 2.2.4.3) im konditionierten Medium bestimmt werden. Die Menge an abgespaltener APP-Ektodomäne ist dabei proportional zur gemessenen Phosphatase-Aktivität (Lichtenthaler et al., 2003; Schobel et al., 2006).



Abbildung 7: Schematische Darstellung des Reporterproteins AP-APP

Das Reporterkonstrukt AP-APP kodiert für ein Fusionsprotein aus sekretorischer alkalischer Phosphatase (AP) und APP. Angegeben sind die Schnittstellen für α -Sekretase (ADAM) und β -Sekretase (BACE) sowie die Bindestellen der Antikörper 22C11 und W02. M = Membran

3.1.1 Test der Reporterzelllinie (AP-APP Zellen)

Die Reporterzelllinie AP-APP wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um in einem Expressionsklonierungs-Screen neue Proteine zu identifizieren, welche die Ektodomänenspaltung von APP regulieren (Schobel et al., 2006).

Um zu testen, ob das APP-Shedding in AP-APP Zellen auch durch Behandlung mit chemischen Substanzen moduliert werden kann und die Zelllinie somit für den im Rahmen dieser Arbeit geplanten Screen geeignet ist, wurden die Zellen für 4 Stunden mit dem Phorbolster PMA und dem Metalloproteaseinhibitor TAPI-1 behandelt. Diese beiden Substanzen sind bekannte chemische Modulatoren der APP-Ektodomänenspaltung (Slack et al., 2001; Slack et al., 1993). Nach Ende der Inkubation wurde die alkalische Phosphatase-Aktivität im konditionierten Medium bestimmt (Abbildung 8).

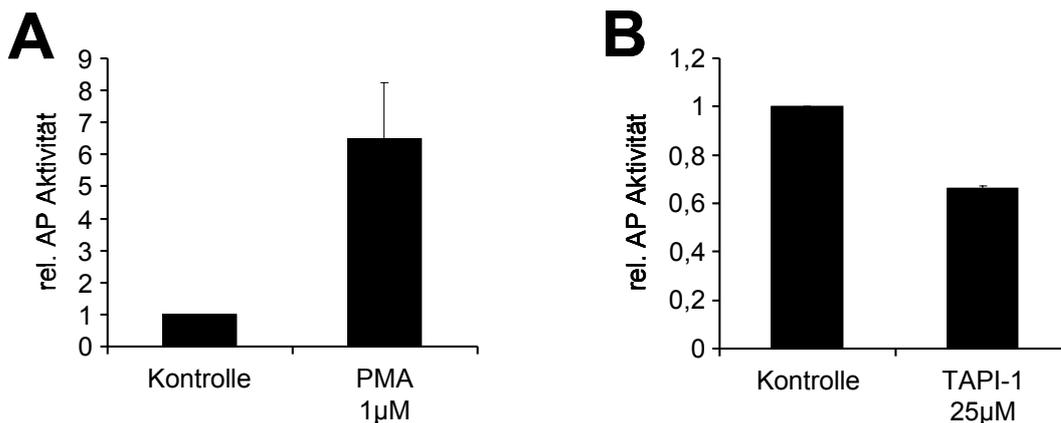


Abbildung 8: Test der Reporterzelllinie AP-APP

AP-APP Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von PMA (A) und TAPI-1 (B) für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde im konditionierten Medium die alkalische Phosphatase-Aktivität, welche proportional zur Menge an abgespaltenem AP-APP ist, bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von je zwei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, führte die Behandlung der Zellen mit PMA zu einer ca. 6,5-fachen Zunahme der APP-Ektodomänenspaltung während die Behandlung mit TAPI-1 eine Abnahme auf ca. 66 % zur Folge hatte. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen und zeigt, dass die Ektodomänenspaltung in AP-APP Zellen durch Behandlung mit chemischen Modulatoren beeinflusst werden kann und die Zellen somit für den Screen geeignet sind.

3.1.2 Modulator-Screen

Der Screen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Mayer und Stefan Hümmer vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Abbildung 9 zeigt eine schematische Übersicht des Screen-Ablaufs.

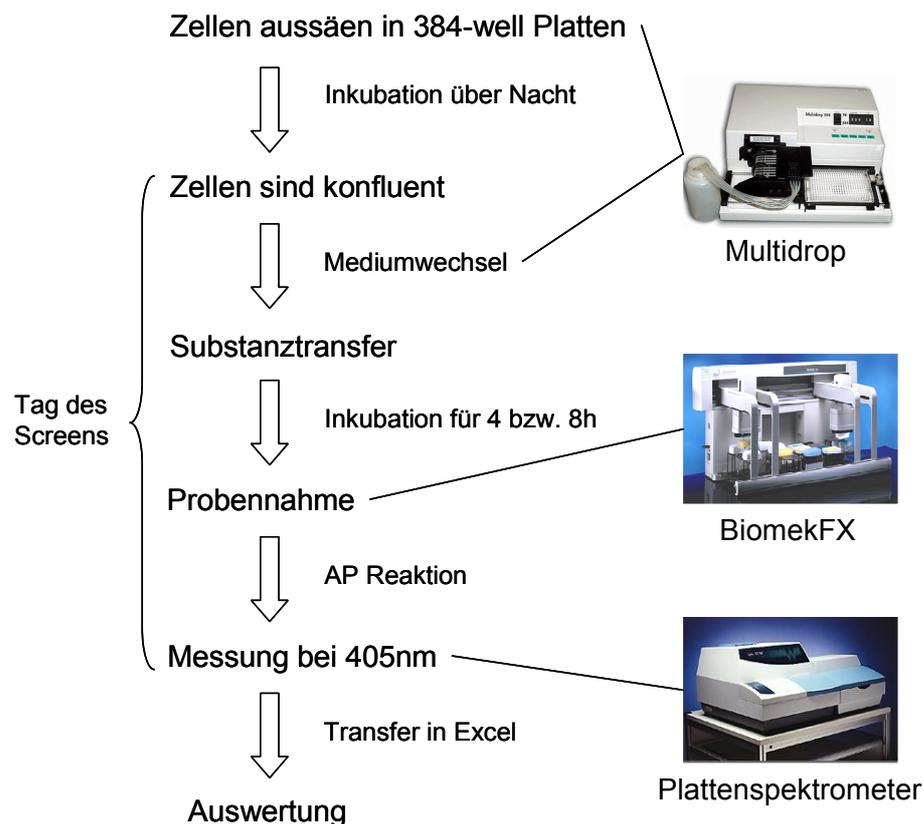


Abbildung 9: Schematische Übersicht des Screen-Ablaufs

AP-APP Zellen wurden in 384-well Platten ausgesät und am folgenden Tag für 4 bzw. 8 Stunden mit den Substanzen aus der Substanzbibliothek inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde im konditionierten Medium die alkalische Phosphatase-Aktivität bestimmt. Als Negativkontrolle diente DMSO (Lösungsmittel der Substanzen) und als Positivkontrolle wurde PMA verwendet. Die Bibliothek wurde im Duplikat gescreent.

Als „Hits“ wurden Substanzen definiert, die die Ektodomänenspaltung von APP auf mehr als das 1,5-fache des Kontrollwertes stimulierten bzw. auf weniger als das 0,5-fache des Kontrollwertes inhibierten. Die Effekte der identifizierten Inhibitoren des APP-Shedding waren nach acht Stunden am deutlichsten, während die Effekte der Aktivatoren bereits nach vier Stunden detektiert werden konnten. Tabelle 13 zeigt eine Auswahl der erhaltenen „Hits“.

Tabelle 13: Übersicht der „Hits“ des Modulator-Screens

Dargestellt ist eine Auswahl von Substanzen, welche die APP-Ektodomänenspaltung im Screen inhibierten (A) bzw. stimulierten (B). Angegeben sind der Name der Substanz, die Stärke des Effektes, die Wirkung der Substanz (Quelle: Biomol), sowie gegebenenfalls Referenzpublikationen zur Wirkung der Substanz auf das APP-Shedding.

A Inhibitoren

Name	Effekt (8 Std.) (Kontrolle=1)	Wirkung	Referenzen (Shedding-Modulation)
Brefeldin	0,4	ARF GEF Inhibitor	(Haass et al., 1993)
Monensin	0,4	Inhibitor der vakuolären ATPase	(Haass et al., 1993)

B Aktivatoren

Name	Effekt (4 Std.) (Kontrolle=1)	Wirkung	Referenzen (Shedding-Modulation)
PMA	4,5	PKC-Aktivator	(Slack et al., 1993)
Bafilomycin A1	6,3	Inhibitor der vakuolären ATPase	(Haass et al., 1995a; Schrader-Fischer and Paganetti, 1996)
Calyculin A	3,1	Phosphatase- Inhibitor (PP1&PP2A)	(da Cruz e Silva et al., 1995)
Okadaic acid	2,6	Phosphatase- Inhibitor (PP1&PP2A)	(da Cruz e Silva et al., 1995)
Bepridil	2,2	Calciumkanal- Blocker	bisher nicht beschrieben

Die Tatsache, dass viele Substanzen identifiziert werden konnten, deren stimulierender bzw. inhibierender Effekt auf die APP-Ektodomänenspaltung bereits beschrieben ist, validiert die Screening-Methode. Darüber hinaus konnte mit Bepridil ein bisher nicht beschriebener Modulator gefunden werden, der die Ektodomänenspaltung von APP stimuliert. Die Struktur der Substanz ist in Abbildung 10 dargestellt. Bepridil wird aufgrund seiner Aktivität als Calciumkanal-Blocker bereits als Medikament zur Behandlung von kardiovasulären Erkrankungen eingesetzt (Hollingshead et al., 1992), was zeigt, dass es eine therapeutische Verwendung dieser Substanz möglich ist. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit soll deshalb der Effekt von Bepridil auf die Spaltung von APP genauer untersucht werden.

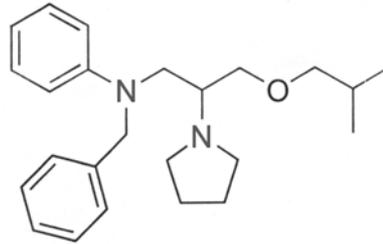


Abbildung 10: Struktur von Bepridil

Dargestellt ist die Struktur des im Screen identifizierten Shedding-Modulators Bepridil.

3.1.3 Verifizierung des Effektes von Bepridil auf die APP-Ektodomänen-spaltung in AP-APP Zellen

Um den im Screen beobachteten Effekt von Bepridil auf die Ektodomänenspaltung von AP-APP zu verifizieren, wurden AP-APP Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Substanz behandelt und anschließend die alkalische Phosphatase-Aktivität im konditionierten Medium bestimmt. Bepridil führte bei einer Konzentration von 50 μM zu einer signifikanten Zunahme des Shedding von APP, während bei 10 μM keine Veränderung zu beobachten war (Abbildung 11).

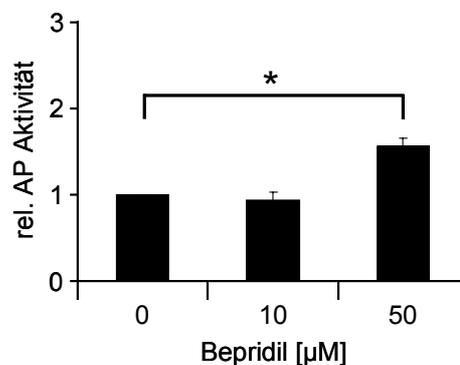


Abbildung 11: Verifizierung des Effektes von Bepridil auf das Shedding von AP-APP

AP-APP Zellen wurden für 4 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Bepridil inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase-Aktivität im konditionierten Medium bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mithilfe des Student-t-Tests bestimmt (* = $p < 0,05$).

Dieses Ergebnis bestätigt die im Screen beobachtete Shedding-stimulierende Aktivität von Bepridil.

3.2 Bepridil inhibiert spezifisch die β -Spaltung von APP

Mittels der unter Punkt 3.1 beschriebenen Experimente konnte Bepridil als neuer Modulator des APP-Sheddings identifiziert werden. Die Messung der alkalischen Phosphatase-Aktivität im konditionierten Medium erlaubt jedoch keine Differenzierung zwischen gebildetem APP α und APP β . Außerdem ist keine Aussage über die APP-Level im Zelllysate möglich. Um die Effekte von Bepridil auf die verschiedenen APP-Spezies (APP α , APP β und A β im konditionierten Medium und Gesamt-APP (full-length APP; fl.APP) im Zelllysate, siehe Abbildung 12A) detaillierter zu untersuchen, wurden HEK293E Zellen, die APP695 exogen exprimieren (HEK293E-APP695) sowie HEK293E Zellen, welche nur endogenes APP exprimieren (HEK293Ewt), für 4 bzw. 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bepridil behandelt und das konditionierte Medium sowie die Zelllysate mittels Western Blot analysiert. Zur Detektion der verschiedenen APP-Spezies wurden folgende Antikörper verwendet: 192wt (APP β), W02 (APP α), 6E10 (A β) und 6687 bzw. 22C11 (fl.APP). Die Bindestellen der verwendeten Antikörper in APP sind in Abbildung 12A dargestellt. Zum Nachweis von A β wurde dem Western Blot eine Immunpräzipitation mit dem Antikörper 3552 (generiert gegen A β 1-40) vorgeschaltet.

Die in Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse bestätigen die Shedding-stimulierende Aktivität von Bepridil bei hohen Konzentrationen, welche auf eine Zunahme der α -Sekretase-Aktivität zurückzuführen ist (siehe APP α -Blot in Abbildung 12B). Bei geringeren Konzentrationen (1-10 μ M), welche im therapeutisch relevanten Bereich der Substanz liegen (siehe unten), ist dieser Effekt allerdings nicht zu beobachten. Überraschenderweise ist jedoch bereits bei Konzentrationen ab 5 μ M eine spezifische Inhibition der von BACE1 vermittelten β -Spaltung von APP durch Bepridil zu erkennen (siehe APP β -Blots in Abbildung 12B und C und A β -Blots in Abbildung 12B), während die Mengen an APP α und fl.APP bei diesen Konzentrationen unverändert bleiben. Der Effekt ist sowohl für exogen exprimiertes APP695 als auch für endogenes APP zu sehen, was zeigt, dass er unabhängig vom Expressionslevel von APP ist. Die beiden im fl.APP-Blot im Zelllysate detektierten Banden, mit Pfeilen markiert, entsprechen dem immaturren APP (untere Bande, nur N-glykosyliert) und dem maturateden APP (obere Bande, N- und O-glykosyliert). Die Effekte der Substanz auf die A β -Bildung konnten auch bei Verwendung eines alternativen A β -Antikörpers (4G8), welcher gegen die Aminosäuren 17-24 des A β -Peptids gerichtet ist, bestätigt werden (Abbildung 12D). Dieser Antikörper erkennt, im Gegensatz zum Antikörper 6E10, auch N-terminal verkürzte A β -Peptide. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Abnahme der

Der inhibitorische Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung von APP wird durch die Quantifizierungen der Mengen von APPs β und A β verdeutlicht, die in Abbildung 13 gezeigt sind. Aus der Quantifizierung kann der IC₅₀-Wert (Konzentration, bei der 50 % der maximalen Inhibition erreicht werden) abgeschätzt werden. Dieser liegt bei 4-6 μ M und damit im Bereich der therapeutisch wirksamen Konzentration von Bepridil, die im Plasma von Patienten bis zu 10 μ M betragen kann (Hollingshead et al., 1992).

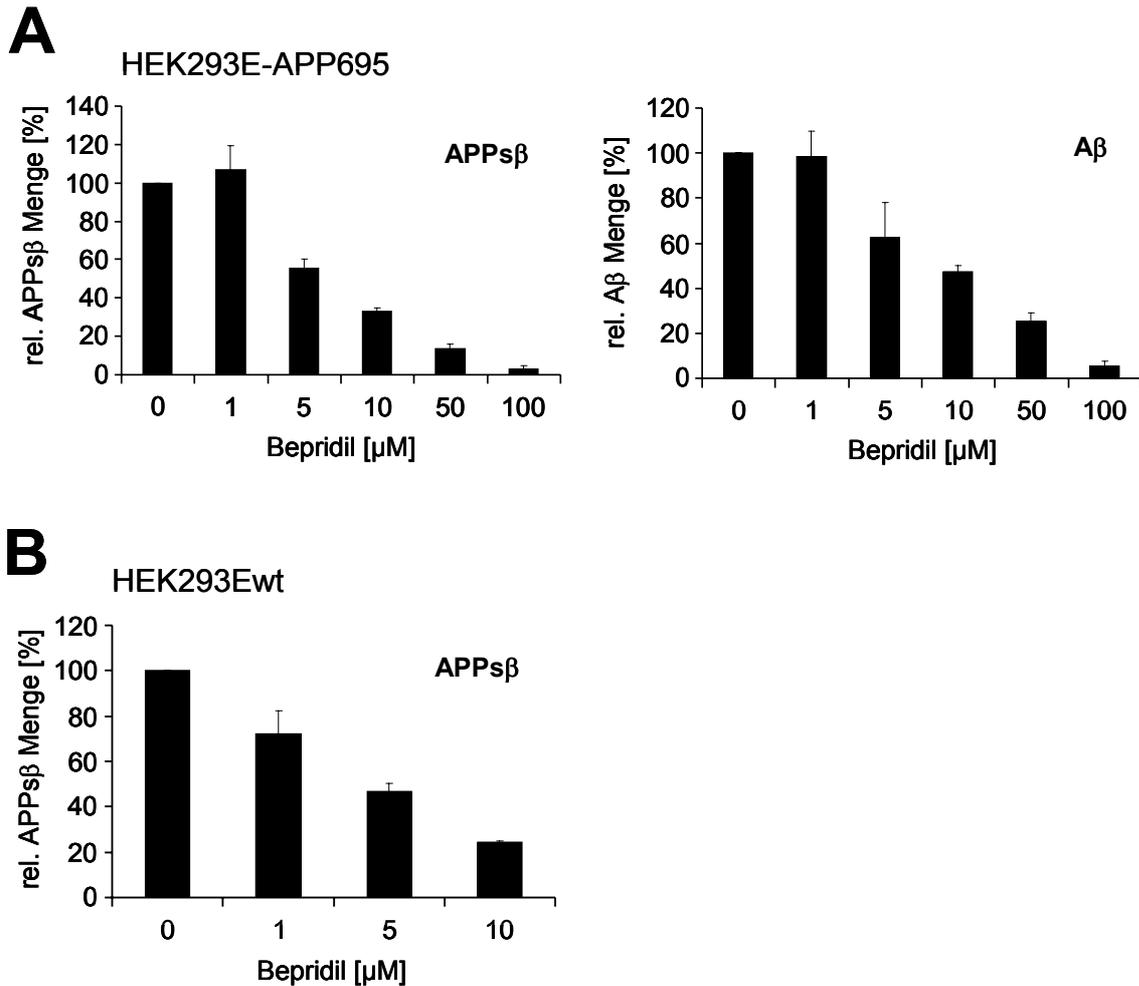


Abbildung 13: Quantifizierung der Mengen an APPs β und A β

Die Mengen an APPs β und A β aus Abbildung 12 wurden quantifiziert. Die Werte für kontrollbehandelte Zellen wurden jeweils gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei bis vier Experimenten. (A) HEK293E-APP695, (B) HEK293Ewt

3.3 Die Inhibition der β -Spaltung durch Bepridil ist nicht zelltypspezifisch

Um zu testen, ob die Inhibition der β -Spaltung durch Bepridil zelltypspezifisch ist, wurde der Effekt der Substanz auf die Prozessierung von APP in weiteren Zelllinien untersucht. Wie in Abbildung 14 und 15 zu erkennen ist, kann die β -Spaltung auch in den Neurogliom-Zelllinien H4-APP751, U373-APP751 und in COS7-APP695 Zellen durch Bepridil spezifisch inhibiert werden. Auch hier bleiben die Mengen an APPs α und fl.APP durch die Behandlung mit der Substanz unverändert.

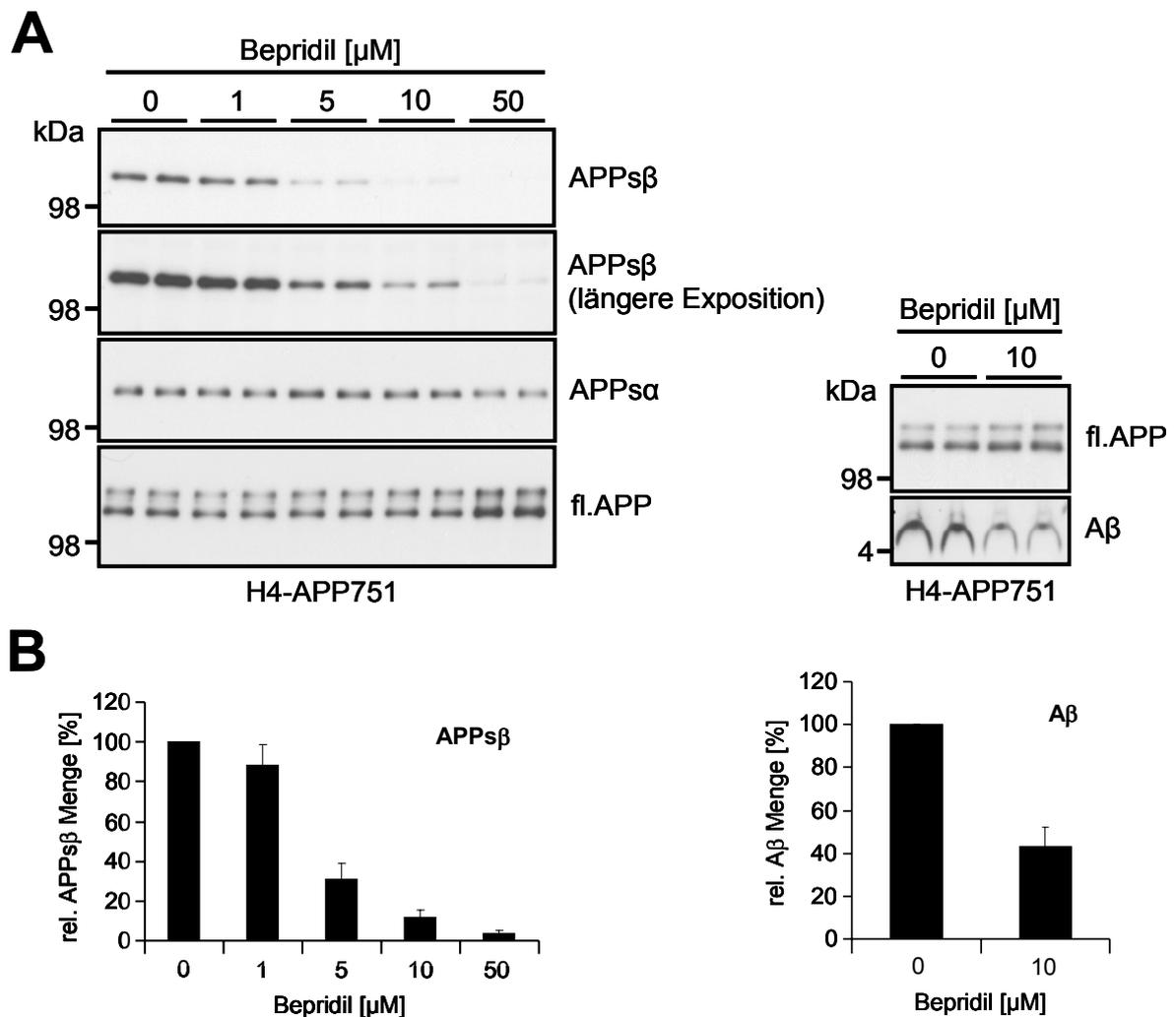


Abbildung 14: Die Inhibition der β -Spaltung durch Bepridil ist nicht zelltypspezifisch

(A) H4-APP751 Zellen wurden für 4 Stunden mit Bepridil in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Effekte auf die verschiedenen APP-Spezies wurden im Western Blot analysiert.

(B) Quantifizierung der Ergebnisse aus A. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei (A β) bzw. drei (APPs β) Experimenten. Die Werte für kontrollbehandelte Zellen wurden jeweils gleich 100 % gesetzt.

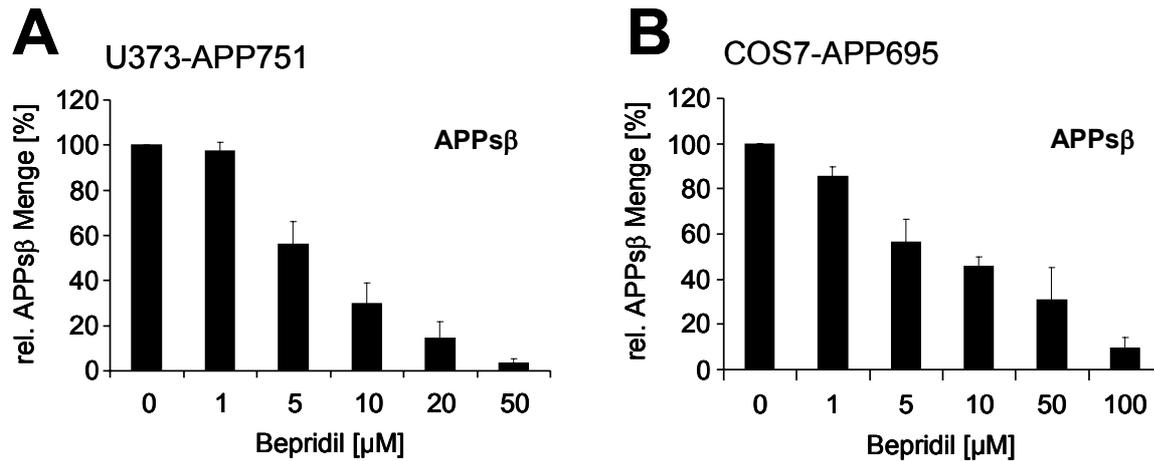


Abbildung 15: Bepridil inhibiert die β -Spaltung auch in U373 und COS7 Zellen

U373-APP751 (A) und COS7-APP695 (B) Zellen wurden für 4 Stunden mit den angegebenen Bepridil-Konzentrationen behandelt. Die Effekte auf die verschiedenen APP-Spezies wurden im Western Blot analysiert. Die Mengen an APPs β wurden quantifiziert und sind jeweils relativ zur Menge in kontrollbehandelten Zellen angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei (A) bzw. zwei (B) unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse belegen, dass es sich bei der Inhibition der β -Spaltung durch Bepridil um einen generellen, nicht zelltypspezifischen Effekt handelt.

3.4 Analyse der Toxizität von Bepridil

Um sicherzustellen, dass die Effekte von Bepridil auf die β -Spaltung von APP nicht auf einer eventuellen Toxizität der Substanz beruhen, wurde eine Toxizitätsbestimmung mit Hilfe des Laktat-Dehydrogenase-Tests (LDH-Assay) durchgeführt. Die Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisch lokalisiertes Enzym, das nur nach Schädigung der Zellmembran, z.B. durch toxische Substanzen, aus der Zelle ins Medium gelangt. Die Bestimmung der LDH-Aktivität im konditionierten Medium der Zellen kann deshalb als Indikator für zelluläre Toxizität verwendet werden. Die Bestimmung erfolgte mittels des CytoTox[®]-Kits von Promega. Die Ergebnisse des LDH-Assays für Bepridil sind in Abbildung 16 zusammengefasst.

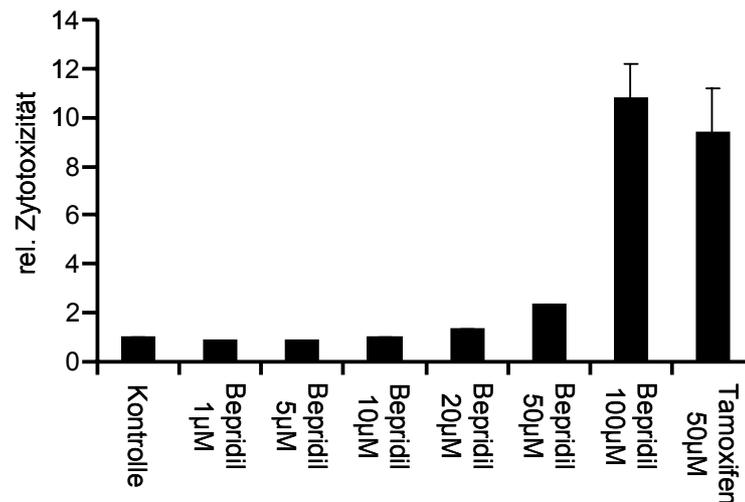


Abbildung 16: Analyse der Toxizität von Bepridil in HEK293E-APP695 Zellen

HEK293E-APP695 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Bepridil bzw. der Positivkontrolle Tamoxifen inkubiert. Nach 24 Stunden wurde in den konditionierten Medien die LDH-Aktivität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Der LDH-Assay zeigt, dass, bei für den Effekt auf die β -Spaltung relevanten Konzentrationen (1-20 μM), keine Toxizität zu erkennen ist. Erst bei einer Konzentration von 100 μM ist eine deutliche Zytotoxizität detektierbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, dass der inhibitorische Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung von APP durch toxische Effekte ausgelöst wird.

3.5 Bepridil inhibiert auch die BACE1-Spaltung von Neuregulin 1

Wie die vorangegangenen Abschnitte belegen, ist Bepridil ein neuer Shedding-Modulator, der spezifisch die β -Spaltung von APP hemmt. Um zu testen, ob dieser Effekt auf APP beschränkt ist oder auch die Prozessierung von weiteren BACE1-Substraten durch Bepridil inhibiert werden kann, wurde der Effekt der Substanz auf die β -Spaltung von Neuregulin 1 (NRG1) untersucht. Neuregulin 1 wurde kürzlich von Willem et al. als neues BACE1-Substrat identifiziert (Willem et al., 2006). Hierfür wurde ein Konstrukt verwendet, das für ein Fusionprotein aus sekretorischer alkalischer Phosphatase (AP) und eines Teils von NRG1- β 1, welcher u.a. die BACE1-Schnittstelle enthält, kodiert (AP-NRG). Analog dem in 3.1 verwendeten Konstrukt AP-APP kann auch hier die abgespaltene Ektodomäne des Proteins leicht im konditionierten Medium der Zellen nachgewiesen werden. Das Konstrukt wurde transient in HEK293E-BACE1wt Zellen transfiziert und die Zellen 48 Stunden nach

Transfektion für 4 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Bepridil bzw. dem spezifischen BACE1-Inhibitor C3 behandelt. Anschließend wurde die AP-Aktivität in den konditionierten Medien bestimmt. Zur Kontrolle wurde auch der Effekt von Bepridil auf die Prozessierung von AP-APP in HEK293E-BACE1wt Zellen analysiert.

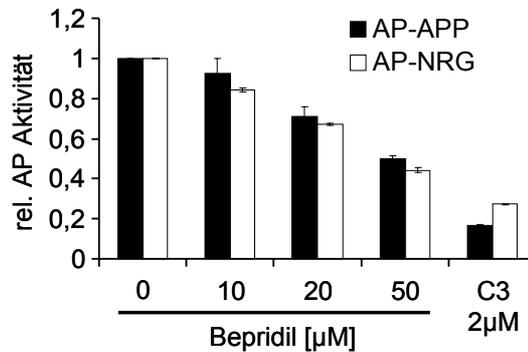


Abbildung 17: Bepridil inhibiert auch die β -Spaltung von Neuregulin 1

HEK293E-BACE1wt Zellen wurden transient mit den Konstrukten pcDNA3.1-AP-APP (AP-APP) bzw. pNRG1- β 1-APTtag5 (AP-NRG) transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen von Bepridil bzw. dem BACE1-Inhibitor C3 für 4 Stunden behandelt. Anschließend wurde die AP-Aktivität in den konditionierten Medien bestimmt und auf die Transfektionseffizienz und die Proteinkonzentration normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei (AP-NRG) bzw. drei (AP-APP) unabhängigen Experimenten.

Die in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass auch der BACE1-Schnitt von Neuregulin 1 durch Bepridil inhibiert werden kann. Dies bedeutet, dass Bepridil auf BACE1 wirken muss und die Inhibition nicht durch Beeinflussung des Substrats vermittelt werden kann. Die geringeren inhibitorischen Effekte (vgl. Abbildungen 12-15) beruhen auf der Tatsache, dass in diesem experimentellen Ansatz Zellen verwendet wurden, welche BACE1 exogen exprimieren (HEK293E-BACE1wt). Die Überexpression von BACE1 führt dazu, dass die β -Spaltung von APP bereits in frühen Kompartimenten des sekretorischen Weges stattfindet (Lee et al., 2005), wobei BACE1 unter diesen Bedingungen seine Substrate auch in Kompartimenten prozessieren kann, in denen der pH-Wert eigentlich nicht ausreichend sauer ist, wie dem ER (Fluhrer et al., 2002). In diesen pH-neutralen Kompartimenten kann Bepridil den BACE1-Schnitt nicht inhibieren (Erklärung siehe 3.7.4). Die exogene Expression von BACE1 bedingt außerdem, dass der β - über den α -Sekretaseschnitt dominiert, während dieser in Zellen, die nur endogenes BACE1 exprimieren, z.B. AP-APP Zellen, nur ca. 10 % ausmacht. Dies erklärt, weshalb in diesem Experiment bei Behandlung mit 50 μM Bepridil nicht die in Abbildung 11 dargestellte Zunahme der alkalischen Phosphatase-Aktivität in den AP-APP transfizierten Zellen detektiert wurde.

3.6 Bepridil inhibiert die enzymatische Aktivität von BACE1 auf indirekte Weise

Um zu überprüfen, ob die Inhibition der β -Spaltung von APP durch Bepridil auf einer direkten Blockade der enzymatischen Aktivität von BACE1 beruht, wurde ein BACE1 *in vitro* Test durchgeführt. Mit Hilfe dieses Tests ist es möglich, die Aktivität von BACE1 in einem zellfreien System zu analysieren (Capell et al., 2002). Für den Test wurde ein APP-Substratpeptid, das die BACE1-Schnittstelle und an einem Ende eine fluoreszierende Gruppe (Cy3) enthält, verwendet. Im ungeschnittenen Peptid ist dessen Fluoreszenz durch eine „quenchende“ Gruppe (Cy5Q) am gegenüberliegenden Ende unterdrückt. Um die Affinität des Peptids zu BACE1 zu erhöhen, wurde die schwedische Mutation eingefügt. Durch Spaltung des Peptids durch BACE1 kommt es zur Trennung von fluoreszierendem und „quenchem“ Anteil und die Cy3-Gruppe kann fluoreszieren (siehe Abbildung 18).

A



B

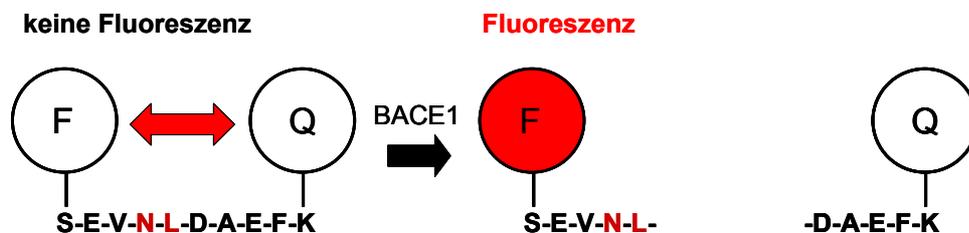


Abbildung 18: Schematische Darstellung des BACE1 *in vitro* Test

Dargestellt sind das verwendete Substratpeptid (A) sowie die durch BACE1 vermittelte Spaltung des Peptids, die zur Emission der Fluoreszenz führt (B). Die schwedische Mutation ist in rot hervorgehoben. F = fluoreszierende Gruppe (Cy3); Q = „quenchende“ Gruppe (Cy5Q)

Der Test wurde mit verschiedenen Bepridil-Konzentrationen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde der spezifische BACE1-Inhibitor GL-189 verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

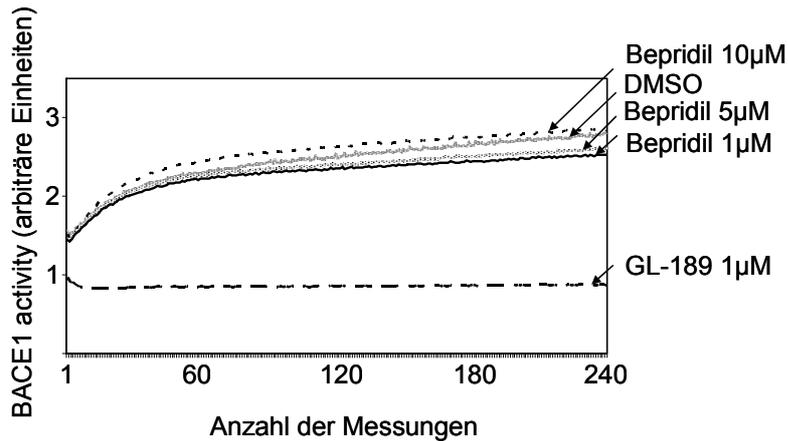


Abbildung 19: Bepridil inhibiert die enzymatische Aktivität von BACE1 nicht direkt

Aufgereinigte BACE1-Ektodomäne wurde mit dem APP-Substratpeptid und den angegebenen Substanzkonzentrationen in 50 mM Natrium-Acetat-Puffer inkubiert. Über einen Zeitraum von zwei Stunden wurde alle 30 Sek. die Fluoreszenz bestimmt. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments.

Das Ergebnis des BACE1 *in vitro* Tests zeigt, dass Bepridil, im Gegensatz zu GL-189, die enzymatische Aktivität von BACE1 nicht direkt hemmt.

3.7 Analyse des zugrundeliegenden Mechanismus

Da die Inhibition der β -Spaltung durch Bepridil nicht auf eine direkte Blockade der BACE1-Aktivität zurückzuführen ist, stellte sich die Frage nach dem zugrundeliegenden Mechanismus.

3.7.1 Der Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung ist Calcium-unabhängig

Bepridil ist in der Literatur als Calciumkanal-Blocker (Flaim et al., 1985; Massingham and Van Zwieten, 1989) beschrieben, weshalb es zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt wird (Hollingshead et al., 1992). Um zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt der Substanz auf die β -Spaltung mit der Blockade von Calciumkanälen und dadurch ausgelösten Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration in Zusammenhang steht, wurden die folgenden Testexperimente durchgeführt.

3.7.1.1 Analyse des Effektes des Calciumkanal-Blockers Nimodipine auf die β -Spaltung von APP

Falls der Effekt von Bepridil auf die Blockade von Calciumkanälen zurückzuführen ist, sollte auch der spezifische Calciumkanal-Blocker Nimodipine (Scriabine and van den Kerckhoff, 1988) eine ähnliche Wirkung haben. Um dies zu überprüfen, wurden HEK293E-APP695 Zellen mit verschiedenen Nimodipine-Konzentrationen behandelt und die konditionierten Medien und Zelllysate im Western Blot analysiert (Abbildung 20).

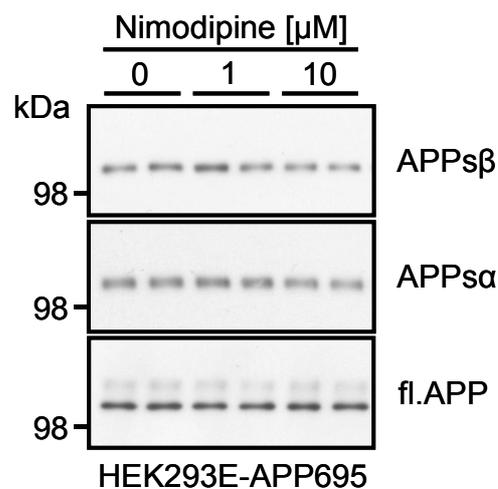


Abbildung 20: Der Calciumkanal-Blocker Nimodipine hat keinen Einfluss auf die β -Spaltung von APP

HEK293E-APP695 Zellen wurden für 4 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen des Calciumkanal-Blockers Nimodipine inkubiert. Die Effekte auf die verschiedenen APP-Spezies wurden im Western Blot untersucht.

Die Behandlung mit Nimodipine hatte keinen Einfluss auf die β -Spaltung von APP (siehe APPs β -Blot in Abbildung 20). Dieser Befund zeigt, dass der Effekt von Bepridil unabhängig von seiner Aktivität als Calciumkanal-Blocker sein muss.

3.7.1.2 Untersuchung des Einflusses der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration auf die β -Spaltung von APP

Um zu überprüfen, ob eine Veränderung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration den für Bepridil gezeigten Effekt auf die β -Spaltung von APP auslösen könnte, wurden HEK293E-APP695 Zellen mit Thapsigargin bzw. BAPTA-AM behandelt und im Western Blot analysiert (Abbildung 21). Thapsigargin ist ein Inhibitor der Calcium-ATPase im endoplasmatischen Retikulum und führt dadurch zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration (Treiman et al., 1998). BAPTA-AM ist ein zellgängiger Calcium-

Chelator, der freies Calcium im Zytoplasma der Zelle bindet und so die zytoplasmatische Calcium-Konzentration senkt (Smith et al., 1992).

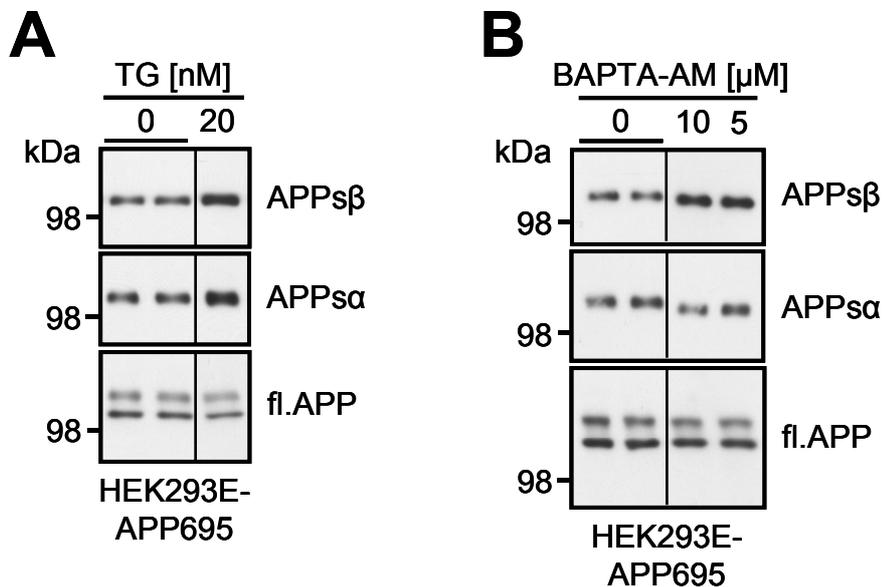


Abbildung 21: Analyse des Einflusses der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration auf die β -Spaltung von APP

HEK293E-APP695 Zellen wurden für 4 Stunden mit Thapsigargin (A) bzw. BAPTA-AM (B) in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Effekte auf die verschiedenen APP-Spezies wurden im Western Blot analysiert. Die vertikalen Linien zeigen an, dass die Proben auf dem gleichen Gel, allerdings nicht in angrenzenden Spuren analysiert wurden. TG = Thapsigargin

Sowohl die Erhöhung, als auch die Senkung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration führte zu einer Zunahme der β -Spaltung von APP (siehe APPs β -Blot in A und B). Die Behandlung mit Thapsigargin führte darüber hinaus zu einer Zunahme der α -Sekretase-Aktivität, während BAPTA-AM hier keine Veränderung bewirkte (siehe APPs α -Blots in A und B). Beide Substanzen hatten keinen Effekt auf fl.APP. Veränderungen der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration sind somit nicht in der Lage, die für Bepridil beobachteten Effekte hervorzurufen.

3.7.1.3 Analyse des Effektes von Bepridil auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration in HEK293E-APP695 Zellen

Da für Bepridil auch beschrieben war, dass es in bestimmten Zellen zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration führen kann (Chen and Jan, 2001; Jan and Tseng, 2000), wurde der Effekt der Substanz auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration in HEK293E-APP695 Zellen mittels des Calcium-Sensors Fura-2/AM analysiert.

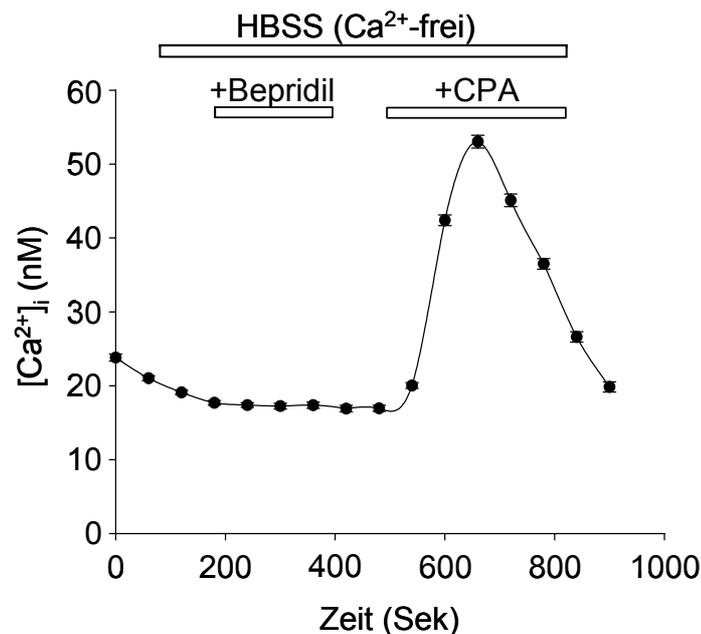


Abbildung 22: Bepridil hat keinen Einfluss auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration in HEK293E-APP695 Zellen

In HEK293E-APP695 Zellen wurde mittels Fura-2/AM der Effekt von Bepridil auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) analysiert. Als Positivkontrolle wurde der reversible Ca^{2+} -ATPase-Inhibitor Cyclopropionsäure (CPA) verwendet. Die Inkubation mit den Substanzen erfolgte in Ca^{2+} -freiem HBSS-Puffer, weshalb alle Änderungen von $[Ca^{2+}]_i$ auf die Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher zurückzuführen sind.

Die Ergebnisse in Abbildung 22 zeigen, dass Bepridil zu keiner Veränderung der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) führt. Die als Positivkontrolle verwendete Cyclopropionsäure löste, wie erwartet, einen deutlichen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ aus. Da das Experiment in diesem Fall in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium durchgeführt wurde, sind alle Änderungen von $[Ca^{2+}]_i$ auf die Entleerung von intrazellulären Calcium-Speichern zurückzuführen. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei Messungen in Gegenwart von extrazellulärem Calcium erhalten (Daten nicht gezeigt). Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Runa Hamid im Labor von Prof. Dr. Jochen Herms durchgeführt.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse aus 3.7.1.1 bis 3.7.1.3, dass der Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung von APP Calcium-unabhängig ist.

3.7.2 Calmodulin als verantwortliches Zielmolekül?

Für Bepridil wurde neben seines Effektes als Calciumkanal-Blocker auch ein inhibitorischer Effekt auf intrazelluläre Calmodulin-abhängige Prozesse beschrieben (Gleason et al., 1986; Itoh et al., 1986; Winslow et al., 1989). Aus diesem Grund wurde getestet, ob Calmodulin das für den Effekt auf die β -Spaltung von APP verantwortliche Zielmolekül sein könnte.

3.7.2.1 Analyse des Effektes eines Calmodulin-„knock-down“ auf die Prozessierung von APP

Wenn Calmodulin das für den Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung verantwortliche Zielmolekül ist, sollte der „knock-down“ des Proteins eine ähnliche Wirkung wie die Behandlung mit der Substanz haben. Um dies zu überprüfen, wurde der Expressionslevel des Proteins mittels siRNA-Oligos reduziert („knock-down“) und der Effekt auf die verschiedenen APP-Spezies im Western Blot analysiert. Calmodulin wird in eukaryotischen Zellen von drei verschiedenen Genen kodiert (Toutenhoofd and Strehler, 2000). Es genügt allerdings der Einsatz von siRNA-Oligos gegen die Gene *calm1* und *calm3* um einen effizienten „knock-down“ zu erzielen.

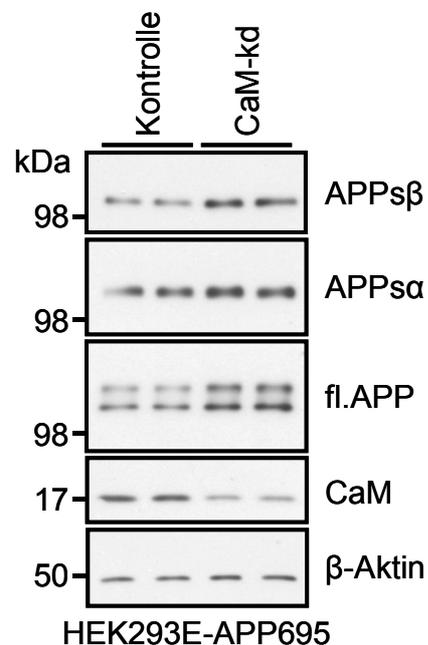


Abbildung 23: Analyse des Effektes des „knock-down“ von Calmodulin auf die APP-Prozessierung

HEK293E-APP695 Zellen wurden transient mit siRNA-Oligonukleotiden gegen die Gene *calm1* und *calm3* bzw. mit Kontroll-Oligos transfiziert. Nach 48 Stunden wurde der Effekt des „knock-down“ auf die verschiedenen APP-Spezies im Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. CaM = Calmodulin, kd = „knock-down“

Die Calmodulin-Menge konnte auf ca. 30 % Restprotein reduziert werden (siehe CaM-Blot in Abbildung 23). Die Ladekontrolle β -Aktin zeigt, dass gleiche Proteinmengen geladen wurden. Der „knock-down“ von Calmodulin bewirkte nicht die bei Bepridil-Behandlung beobachtete Inhibition der β -Spaltung von APP, sondern führte zu einer Zunahme aller APP-Spezies sowohl im konditionierten Medium, als auch im Zelllysate (vgl. Kontrolle und CaM-kd in Abbildung 23).

3.7.2.2 Bepridil inhibiert die β -Spaltung von APP auch in CaM-„knock-down“ Zellen

Falls Calmodulin das verantwortliche Zielmolekül für den β -Effekt von Bepridil ist, sollte der „knock-down“ die Wirkung der Substanz beeinflussen. Deshalb wurde als nächstes analysiert, ob Bepridil auch in Zellen mit reduziertem CaM-Level noch in der Lage ist, die β -Spaltung von APP zu inhibieren. Hierzu wurde in HEK293E-APP695 Zellen zuerst mittels siRNA-Transfektion die Calmodulin-Menge reduziert („knock-down“) und die Zellen anschließend mit Bepridil behandelt. Der Effekt von Bepridil in diesen Zellen (CaM-kd Zellen) wurde mit dem Effekt in kontroll-transfizierten Zellen verglichen.

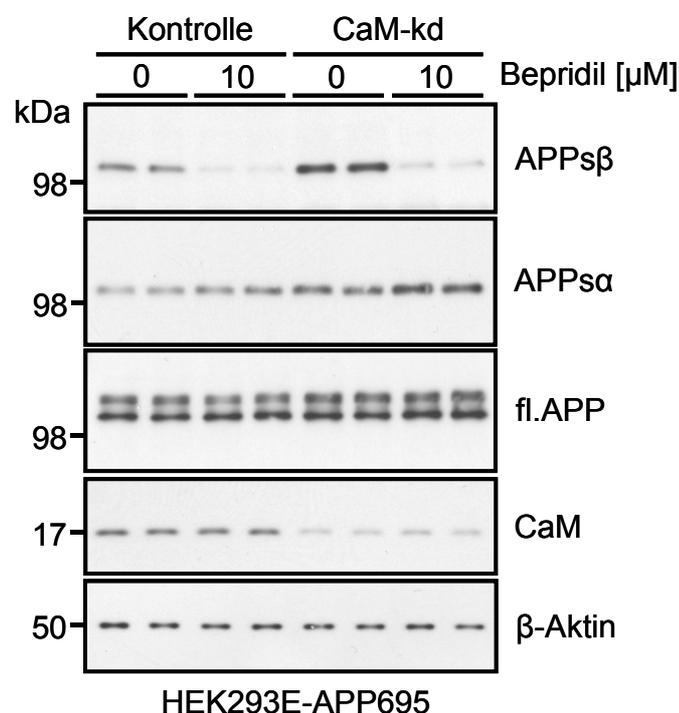


Abbildung 24: Bepridil inhibiert die β -Spaltung von APP auch in CaM-„knock-down“ Zellen

HEK293E-APP695 Zellen wurden transient mit siRNA-Oligonukleotiden gegen die Gene *calm1* und *calm3* bzw. mit Kontroll-Oligos transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen jeweils für 4 Stunden mit Bepridil behandelt und anschließend mittels Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. CaM = Calmodulin, kd = „knock-down“

Die in Abbildung 24 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Bepridil auch unter CaM-„knock-down“-Bedingungen in der Lage ist, die β -Spaltung von APP zu inhibieren und der „knock-down“ von Calmodulin somit keinen Einfluss auf den Effekt der Substanz hat (vgl. Kontrolle und CaM-kd). Auch bei diesem Experiment war wieder die durch den „knock-down“ ausgelöste Zunahme der verschiedenen APP-Spezies zu erkennen (vgl. APP-Blots von Kontrolle und CaM-kd).

3.7.2.3 Inhibition von Calmodulin mittels eines Calmodulin-bindenden Peptids

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung des Effektes von Calmodulin auf die Prozessierung von APP stellt die Inhibition des Proteins mit Hilfe eines Calmodulin-bindenden Peptids dar (Payne et al., 1988). Das verwendete Peptid umspannt die Aminosäuren 290-309 der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II, ein Bereich, der die Calmodulin-Bindestelle der Kinase enthält, und ist ein äußerst wirksamer Calmodulin-Antagonist (Payne et al., 1988). Das Peptid kann an Calmodulin binden und verhindert dadurch die Bindung des Proteins an seine Zielmoleküle. Um das Peptid in den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien exprimieren zu können, wurde es über einen Poly-Glycin-Linker an GFP gekoppelt (siehe Abbildung 25A). Das Fusionskonstrukt wurde transient in HEK293E-APP695 Zellen transfiziert und der Effekt auf die verschiedenen APP-Spezies im Western Blot analysiert (Abbildung 25B). Als Kontrolle wurden die Zellen mit GFP transfiziert.

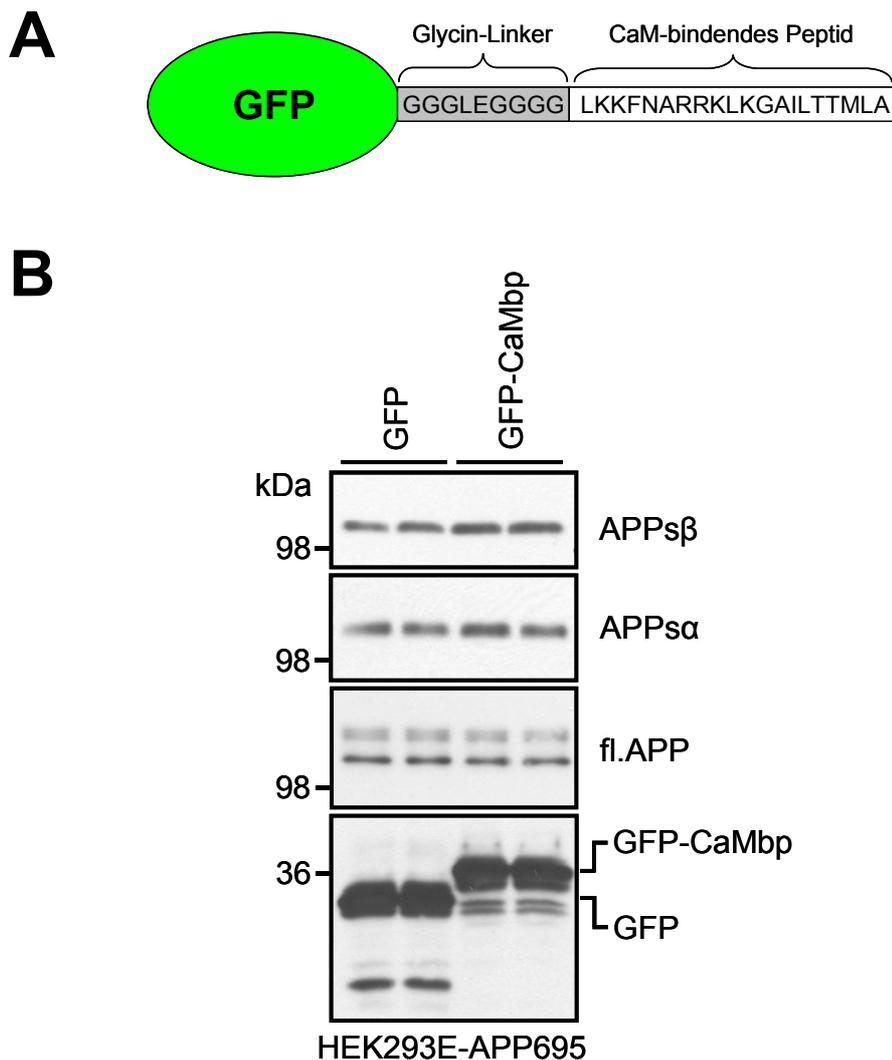


Abbildung 25: Analyse des Effektes der Inhibition von Calmodulin auf die APP-Prozessierung

(A) Schematische Darstellung des Fusionsproteins aus GFP und dem CaM-bindenden Peptid. Die beiden Teile des Proteins sind über einen Glycin-Linker verbunden. Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Code dargestellt.

(B) Das Fusionsprotein aus A wurde transient in HEK293E-APP695 Zellen exprimiert und der Effekt auf die APP-Prozessierung im Western Blot analysiert. Als Kontrolle dienten GFP-transfizierte Zellen. GFP und GFP-CaMbp wurden mit dem GFP-Antikörper detektiert.

CaMbp = Calmodulin-bindendes Peptid

Die Inhibition von Calmodulin mittels des Calmodulin-bindenden Peptids führte, ähnlich dem „knock-down“ des Proteins, zu einer Zunahme von APPs β und APPs α im konditionierten Medium, während kein Effekt auf fl.APP zu detektieren war (Abbildung 25). Das Ergebnis zeigt, dass die Inhibition von Calmodulin nicht den für Bepridil gezeigten inhibitorischen Effekt auf die β -Spaltung von APP auslösen kann.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse aus 3.7.2.1 bis 3.7.2.3, dass Calmodulin nicht das für die Bepridil-vermittelte Inhibition der β -Spaltung verantwortliche Zielmolekül ist.

3.7.3 Der Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung ist unabhängig von der zytoplasmatischen Domäne von BACE1

In den Kapiteln 3.7.1 und 3.7.2 konnte gezeigt werden, dass weder Calcium noch Calmodulin eine Rolle für den inhibitorischen Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung von APP spielen. Die Ergebnisse in Kapitel 3.5 machen zudem deutlich, dass die Inhibition nicht substratspezifisch ist und somit auf Seiten von BACE1 geschehen muss. Um den Mechanismus weiter einzugrenzen, wurde getestet, welche Domänen von BACE1 eine Rolle für den Effekt von Bepridil spielen. Hierfür wurden HEK293E Zellen, die stabil entweder BACE1wt oder eine GPI-verankerte BACE1-Variante, welche keine zytoplasmatische Domäne mehr aufweist (Westmeyer et al., 2004), exprimieren, mit Bepridil behandelt und die Effekte auf die APP-Prozessierung im Western Blot analysiert. Die zytoplasmatische Domäne von BACE1 enthält unter anderem das Aminosäuremotiv DISLL, welches das „Trafficking“ von BACE1 reguliert (siehe 4.1.1.1).

Die Ergebnisse in Abbildung 26 zeigen, dass Bepridil die β -Spaltung von APP sowohl in HEK293E-BACE1wt Zellen, als auch in HEK293E-BACE1-GPI Zellen spezifisch inhibieren kann (siehe APPs β -Blots in Abbildung 26A und B). Es ist zudem eine konzentrationsabhängige Zunahme von APPs α nach Bepridil-Behandlung zu erkennen, während kein Effekt auf fl.APP zu detektieren ist. Die Mengen an BACE1wt bzw. BACE1-GPI im Zelllysate bleiben unverändert (siehe BACE1-Blots in Abbildung 26A und B).

Diese Daten belegen zum einen, dass die Inhibition der β -Spaltung durch Bepridil nicht durch eine Veränderung der BACE1-Proteinmenge ausgelöst wird. Zum anderen zeigen sie, dass die zytoplasmatische Domäne von BACE1 keine Rolle für den Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung von APP spielt. Dies bedeutet, dass der Effekt unabhängig vom „Trafficking“ von BACE1 ist und die Substanz auf die Ektodomäne von BACE1 wirken muss.

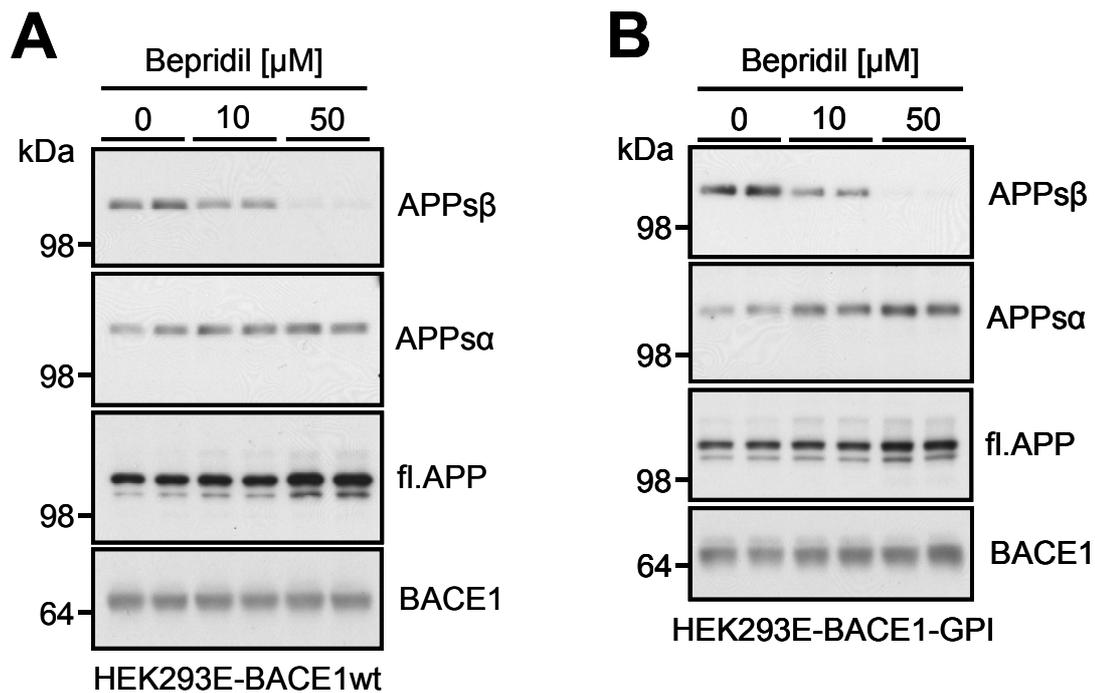


Abbildung 26: Die Deletion der zytoplasmatischen Domäne von BACE1 hat keinen Einfluss auf die Inhibition der β -Spaltung von APP durch Bepridil

HEK293E-BACE1wt Zellen (A) bzw. HEK293E-BACE1-GPI Zellen (B) wurden für 4 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Bepridil behandelt. Anschließend wurde der Effekt auf die verschiedenen APP-Spezies im Western Blot analysiert.

GPI = Glycosylphosphatidylinositol-Anker

3.7.4 Bepridil inhibiert die β -Spaltung von APP durch die Alkalisierung saurer intrazellulärer Kompartimente

Sanchez et al. konnten kürzlich zeigen, dass Bepridil den Eintritt des Anthrax-Toxins in das Zytoplasma von betroffenen Zellen verhindern kann (Sanchez et al., 2007). Für den Übertritt des Toxins aus den frühen Endosomen in das Zytoplasma der Zellen ist eine Ansäuerung der Endosomen nötig. Diese Ansäuerung wird durch Bepridil und eine weitere Substanz, Amiodarone, blockiert (Sanchez et al., 2007).

Ein Vergleich der Strukturen von Bepridil und Amiodarone lässt erkennen, dass beide einen stark hydrophoben Anteil sowie ein protonierbares tertiäres Amin aufweisen (Abbildung 27). Diese Gruppe verleiht Bepridil und Amiodarone eine leichte Basizität und ist charakteristisch für eine Reihe von Substanzen, die eine Alkalisierung von sauren intrazellulären Kompartimenten bewirken können (Poole and Ohkuma, 1981). Diese Substanzen diffundieren im ungeladenen, deprotonierten Zustand in die Zelle. In sauren Zellkompartimenten, wie z.B. den Endosomen, wird das tertiäre Amin protoniert, wodurch

der pH-Wert in diesen Kompartimenten ansteigt. Ein Beispiel hierfür ist Chloroquine, das zur Behandlung von Malaria eingesetzt wird (White, 1996).

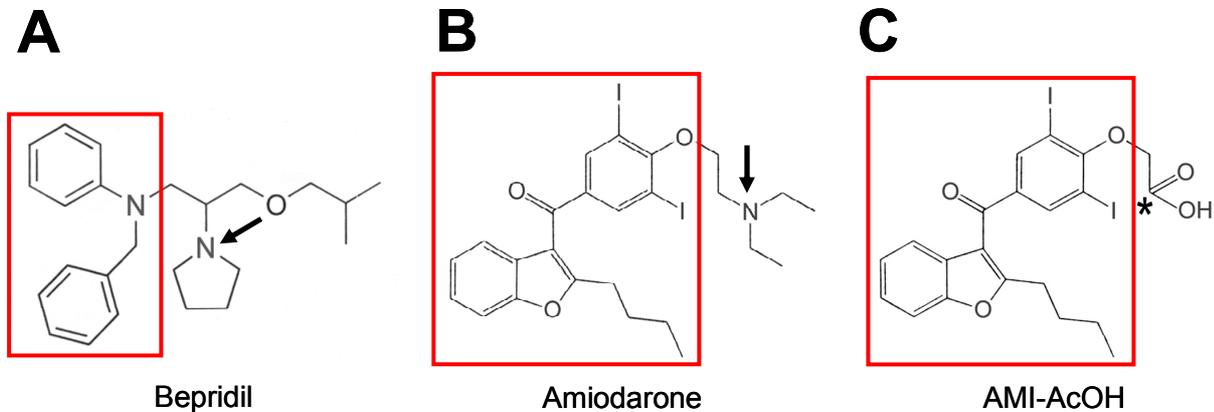


Abbildung 27: Vergleich der Strukturen von Bepridil, Amiodarone und AMI-AcOH

Dargestellt sind die Strukturen von Bepridil (A), Amiodarone (B) und dem Amiodarone-Derivat AMI-AcOH (C). Das protonierbare tertiäre Amin ist jeweils durch einen Pfeil markiert. Der hydrophobe Teil der Moleküle ist rot hervorgehoben. In AMI-AcOH wurde das tertiäre Amin durch eine Säurefunktion (*) ersetzt.

In der Literatur ist vielfach beschrieben, dass die Prozessierung von APP durch BACE1 durch die Alkalisierung von sauren Kompartimenten inhibiert werden kann (Haass et al., 1993; Schrader-Fischer and Paganetti, 1996).

Um zu analysieren, ob die Bepridil-vermittelte Inhibition der β -Spaltung von APP durch die Alkalisierung von sauren intrazellulären Kompartimenten vermittelt wird, wurden die folgenden Testexperimente durchgeführt.

3.7.4.1 Die Alkalisierung von sauren intrazellulären Kompartimenten inhibiert die β -Spaltung von APP

Um zu testen, ob die in der Literatur beschriebene Inhibition der β -Spaltung von APP durch alkalisierende Substanzen auch in dem in dieser Doktorarbeit verwendeten System beobachtet werden kann, wurden HEK293E-APP695 Zellen für 4 Stunden mit den schwachen Basen Chloroquine und Ammoniumchlorid (NH_4Cl) behandelt und die Effekte auf die APP-Prozessierung analysiert.

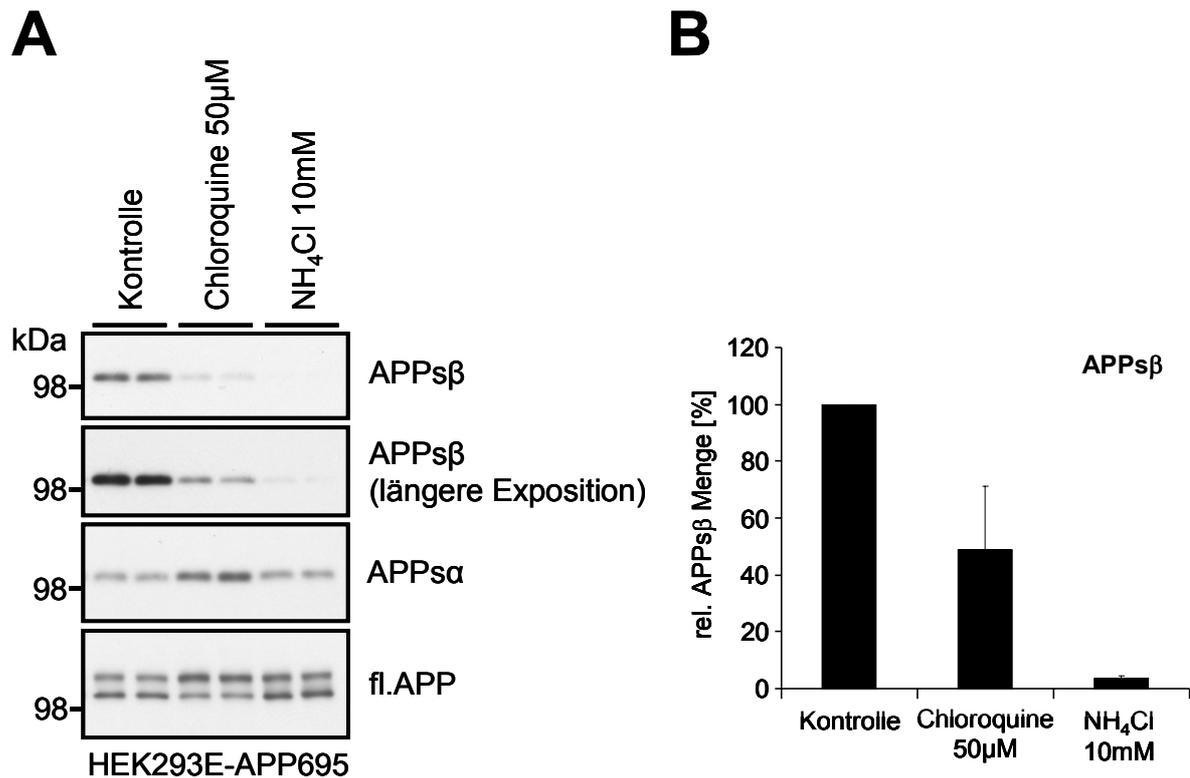


Abbildung 28: Die alkalisierenden Substanzen Chloroquine und Ammoniumchlorid inhibieren spezifisch die β -Spaltung von APP

(A) HEK293E-APP695 Zellen wurden für 4 Stunden mit Chloroquine bzw. Ammoniumchlorid behandelt. Anschließend wurden die Effekte auf die APP-Prozessierung mittels Western Blot analysiert. (B) Quantifizierung der Mengen an APPs β aus A. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, inhibiert sowohl die Behandlung mit Chloroquine, als auch mit Ammoniumchlorid spezifisch die β -Spaltung von APP. Für Chloroquine sind darüber hinaus eine Zunahme von APPs α und eine Stabilisierung von maturem fl.APP im Zelllysate (obere Bande im fl.APP-Blot) zu erkennen. Die Quantifizierung der Mengen an APPs β (Abbildung 28B) verdeutlicht die Inhibition der β -Spaltung durch die beiden Substanzen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die in der Literatur beschriebene Inhibition der β -Spaltung von APP durch alkalisierende Substanzen auch im hier verwendeten System möglich ist. Die Effekte der beiden hier verwendeten Substanzen auf die APP-Prozessierung gleichen den für Bepridil beobachteten Effekten (vgl. Abbildungen 12-15).

3.7.4.2 Amiodarone zeigt die gleichen Effekte auf die β -Spaltung von APP wie Bepridil

Wenn die Inhibition der β -Spaltung von APP durch Bepridil auf der von Sanchez et al. beschriebenen Alkalisierung der Endosomen beruht, sollte die zweite in dieser Publikation beschriebene Substanz, Amiodarone, den gleichen Effekt auf die APP-Prozessierung zeigen wie Bepridil. Um dies zu untersuchen, wurden HEK293E-APP695 Zellen für 4 Stunden mit

verschiedenen Konzentrationen von Amiodarone behandelt und die Effekte auf die APP-Prozessierung analysiert.

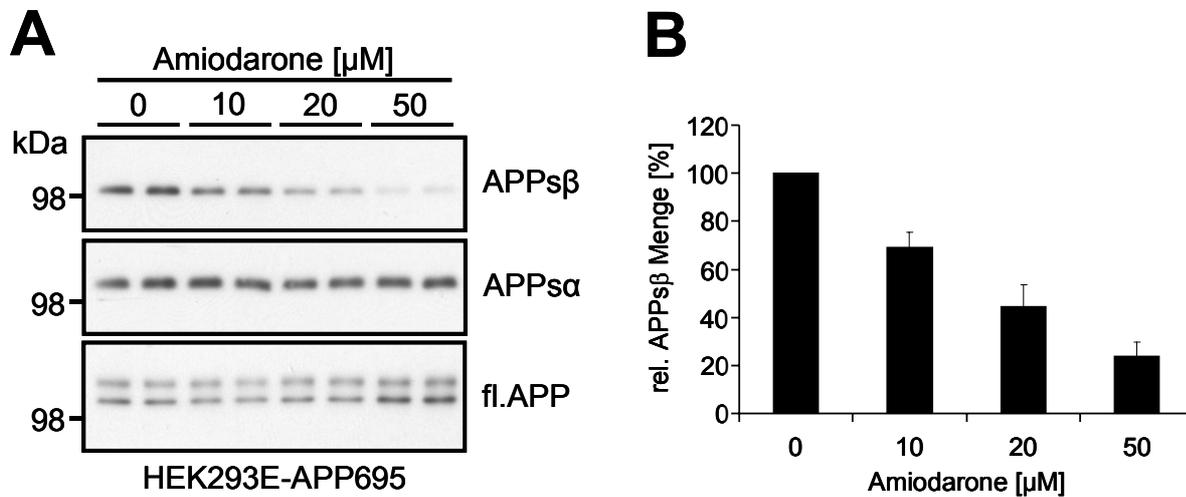


Abbildung 29: Amiodarone inhibiert ebenfalls spezifisch die β -Spaltung von APP

(A) HEK293E-APP695 Zellen wurden für 4 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Amiodarone behandelt. Anschließend wurden das konditionierte Medium und die Zelllysate mittels Western Blot-Analyse analysiert.

(B) Quantifizierung der APPs β -Mengen aus A. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten.

Wie die in Abbildung 29 dargestellten Ergebnisse belegen, führt Amiodarone ebenfalls zu einer spezifischen Inhibition der β -Spaltung von APP (siehe APPs β -Blots in A), während kein Effekt auf APPs α und fl.APP zu detektieren ist. Der Effekt ist etwas schwächer als für Bepridil (IC₅₀-Wert ca. 15 μ M). Dies könnte an einer geringeren Stabilität von Amiodarone und/oder der höheren Hydrophobizität der Substanz im Vergleich zu Bepridil liegen. Die höhere Hydrophobizität könnte eine Aggregation der Substanz bedingen, was ebenso wie eine geringere Stabilität zu einer Verringerung der effektiven Konzentration der Substanz im Experiment führen kann.

Ein Vergleich der in Abbildung 27 dargestellten Strukturen der beiden Substanzen zeigt, dass beide grundsätzlich sehr verschieden sind. Die einzigen Gemeinsamkeiten sind die hohe Lipophilität, wodurch die Substanzen leicht durch die Plasmamembran ins Innere der Zelle diffundieren können, und das protonierbare tertiäre Amin, das den Substanzen ihre Basizität verleiht.

Diese Befunde stimmen mit der Annahme überein, dass der Effekt von Amiodarone und Bepridil höchstwahrscheinlich über die Alkalisierung von sauren intrazellulären Kompartimenten vermittelt wird.

3.7.4.3 Das protonierbare tertiäre Amin ist essentiell für den inhibitorischen Effekt auf die β -Spaltung von APP

Die bisher gezeigten Ergebnisse deuten sehr stark darauf hin, dass die Inhibition der β -Spaltung durch Bepridil und Amiodarone auf einer Alkalisierung der Endosomen beruht. Wenn diese Hypothese zutrifft, sollte die Anwesenheit des tertiärenamins essentiell für den Effekt sein und Derivate, denen diese Gruppe fehlt, sollten keine Inhibition mehr bewirken. Dies wurde mithilfe des Amiodarone-Derivats AMI-AcOH überprüft, in dem das tertiäre Amin durch eine Säurefunktion ausgetauscht wurde (siehe Abbildung 27). HEK293E-APP695 Zellen wurden für 4 Stunden mit AMI-AcOH behandelt. Es wurden die gleichen Konzentrationen eingesetzt wie für die Amiodarone-Behandlung in 3.7.4.2. Die Effekte auf das APP-Shedding sind in Abbildung 30 dargestellt.

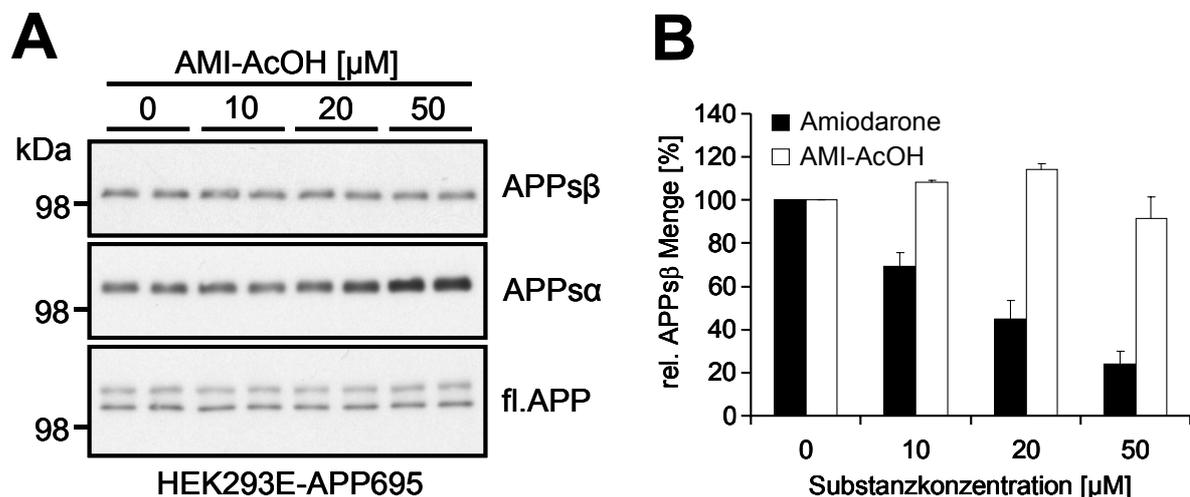


Abbildung 30: Das protonierbare tertiäre Amin ist essentiell für den inhibitorischen Effekt auf die β -Spaltung von APP

(A) HEK293E-APP695 Zellen wurden für 4 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von AMI-AcOH behandelt. Die Effekte auf das Shedding von APP wurden mittels Western Blot-Analyse untersucht.

(B) Die Mengen an APPs β aus A wurden quantifiziert (weiße Balken) und sind im Vergleich zu den nach Amiodarone-Behandlung gemessenen APPs β -Mengen aus Abbildung 29 (schwarze Balken) dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier (Amiodarone) bzw. zwei (AMI-AcOH) unabhängigen Experimenten.

Abbildung 30 zeigt, dass AMI-AcOH, im Gegensatz zu Amiodarone, keinen Effekt auf die β -Spaltung von APP hat (siehe APPs β -Blot). Bei hohen Konzentrationen (50 μ M) ist eine Zunahme von APPs α zu erkennen, während keine der verwendeten Konzentrationen zu einer Veränderung der Mengen an fl. APP führt.

Dieses Ergebnis bestätigt die essentielle Funktion des tertiären Amins für die Inhibition der β -Spaltung und ist ein weiterer Hinweis dafür, dass diese durch die Alkalisierung von sauren intrazellulären Kompartimenten vermittelt wird.

Zusammengefasst konnte in den Kapiteln 3.7.4.1 bis 3.7.4.3 gezeigt werden, dass die Alkalisierung von sauren intrazellulären Kompartimenten die β -Spaltung von APP durch BACE1 inhibieren kann und dass dies sehr wahrscheinlich der zugrundeliegende Mechanismus für die Inhibition der β -Spaltung durch Bepridil und Amiodarone ist.

3.8 Bepridil kann die Blut-Hirn-Schranke passieren

Die in den Kapiteln 3.2 bis 3.7 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Bepridil ein neuartiger Inhibitor der β -Sekretasespaltung ist. Der IC_{50} -Wert der Inhibition liegt mit 4-6 μ M im Bereich der im Patienten gemessenen therapeutischen Plasmakonzentration, die bis zu 10 μ M betragen kann (Hollingshead et al., 1992). Da die Alzheimer Krankheit eine Erkrankung des Gehirns ist, stellt sich die Frage der „Hirngängigkeit“ der Substanz. Diese ist bisher eines der größten Probleme bei der Entwicklung von BACE1-Inhibitoren. Die beschriebenen Substanzen sind oft peptidischen Ursprungs und somit zu groß, um die Blut-Hirn-Schranke zu passieren (Ghosh et al., 2001; Sinha et al., 1999). Um zu untersuchen, ob Bepridil diese Barriere überwinden kann, wurde Mäusen 10 mg Bepridil pro kg Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) injiziert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten (0,5, 1, 2 und 4 Stunden) die Konzentration (ng/g) der Substanz im Hirn und Plasma der Tiere mittels HPLC und anschließender Massenspektrometrie (LC/MS) bestimmt. Pro Zeitpunkt wurden jeweils drei Tiere analysiert. Aus diesen Werten wurde das Verhältnis der Konzentration von Bepridil im Hirn zu Bepridil im Plasma berechnet. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Steffen Rossner und der Firma Probiodrug AG durchgeführt.

Tabelle 14: Analyse der Hirngängigkeit von Bepridil

Angegeben sind der Zeitpunkt der Analyse in Stunden nach Substanzinjektion, das Verhältnis der Bepridil-Konzentration in Hirn und Blut sowie der daraus errechnete logBB.

Zeitpunkt (Stunden)	[Hirn]/[Blut]	logBB
0,5	2,4	0,4
1	3,3	0,5
2	1,7	0,2
4	1,4	0,2

Die Ergebnisse zeigen, dass Bepridil die Blut-Hirn-Schranke sehr effektiv überwinden kann. Die Bepridil-Konzentration im Hirn ist zu allen gemessenen Zeitpunkten sogar höher als im Blut.

3.9 Bepridil ist ein dualer Modulator

Im bisherigen Verlauf dieser Doktorarbeit wurde vor allem der Effekt von Bepridil auf die Ektodomänenspaltung von APP untersucht. Um zu testen, ob Bepridil auch die APP-Prozessierung durch die γ -Sekretase beeinflusst, wurden HEK293-APP695swe Zellen für 16 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Substanz behandelt und mithilfe eines „Sandwich-Immunoassays“ die Effekte von Bepridil auf die verschiedenen A β -Spezies, A β 38, 40 und 42, analysiert. Wenn die Substanz keinen Effekt auf die γ -Sekretase hat, wäre aufgrund der Inhibition der β -Spaltung durch Bepridil eine gleichmäßige Abnahme aller A β -Spezies zu erwarten.

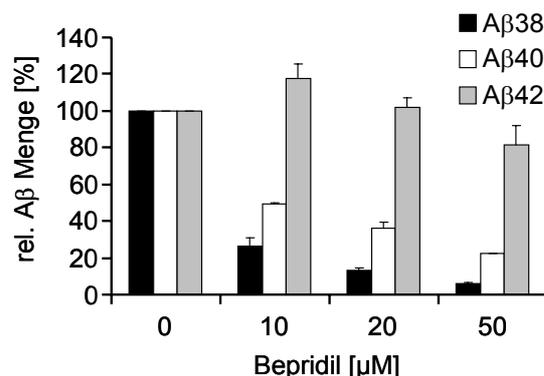


Abbildung 31: Analyse des Effektes von Bepridil auf die verschiedenen A β -Spezies

HEK293-APPswe Zellen wurden für 16 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Bepridil inkubiert. Anschließend wurden im konditionierten Medium mittels „Sandwich-Immunoassay“ die Mengen von A β 38, 40 und 42 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Behandlung mit Bepridil bewirkte für A β 38 und A β 40 die aufgrund der Inhibition der β -Spaltung erwartete konzentrationsabhängige Abnahme, wobei der Effekt für A β 38 besonders stark war. Im Gegensatz hierzu konnte für A β 42 keine deutliche Veränderung festgestellt werden (Abbildung 31). Dieses Ergebnis deutet auf eine Modulation der γ -Sekretase durch Bepridil hin. Die Substanz scheint eine Verschiebung der Schnittspezifität des Enzyms von A β 38 zu A β 42 zu bewirken, wodurch zum einen der durch die Inhibition der β -Spaltung vermittelte Effekt auf A β 38 verstärkt und zum anderen der Effekt auf A β 42 aufgehoben wird.

3.9.1 Bepridil ist ein inverser γ -Sekretase-Modulator (iGSM)

Um den Effekt von Bepridil auf die γ -Sekretase detaillierter zu untersuchen, wurde die Wirkung der Substanz auf HEK293E-SP-C99 Zellen analysiert. Diese Zellen exprimieren eine N-terminal verkürzte Form von APP, die dem β -geschnittenen C-terminalen Fragment (CTF β , C99) entspricht. Da dieses Konstrukt nicht mehr von der β -Sekretase geschnitten werden kann, ermöglicht es eine isolierte Analyse des Effektes von Bepridil auf die Schnittspezifität der γ -Sekretase. HEK293E-SP-C99 Zellen wurden für 16 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Bepridil behandelt und die Effekte auf die verschiedenen A β -Spezies analysiert. Für die elektrophoretische Auftrennung der A β -Spezies wurde ein Harnstoff-Gel (siehe 2.2.4.7) verwendet.

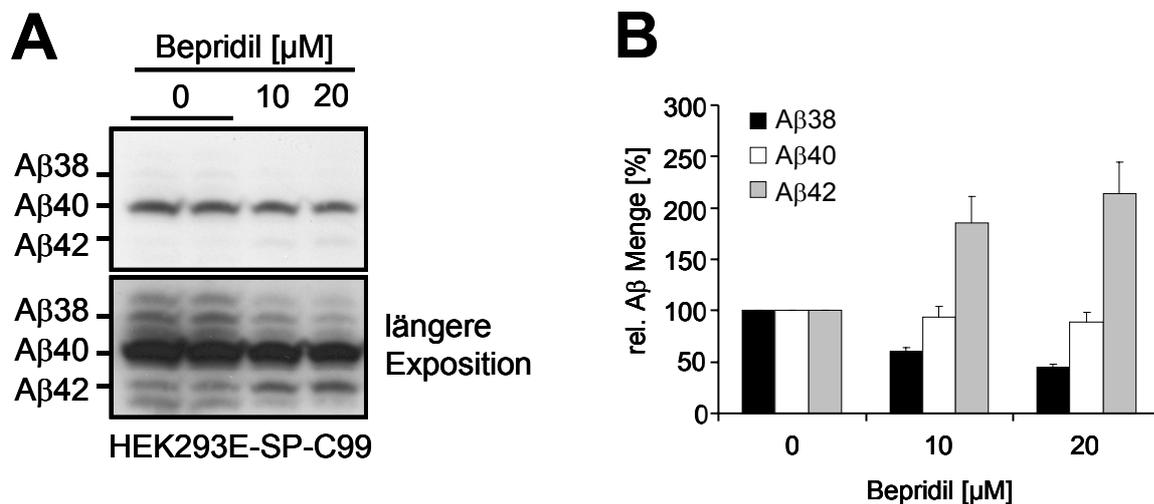


Abbildung 32: Bepridil ist ein inverser γ -Sekretase-Modulator (iGSM)

(A) HEK293E-SP-C99 Zellen wurden für 16 Stunden mit den angegebenen Bepridil-Konzentrationen behandelt. Anschließend wurden die Effekte auf die verschiedenen A β -Spezies im konditionierten Medium analysiert.

(B) Quantifizierung der Ergebnisse aus A. Die A β -Werte der kontrollbehandelten Zellen wurden jeweils gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse in Abbildung 32 zeigen, dass Bepridil in HEK293E-SP-C99 Zellen zu einer Abnahme von A β 38 und einer Zunahme von A β 42 führt, während A β 40 unverändert bleibt. Die Gesamtmenge von A β ändert sich somit nicht, was zeigt, dass Bepridil keinen inhibitorischen Effekt auf die γ -Spaltung hat. Eine vergleichbare Wirkung auf die Schnittspezifität der γ -Sekretase ist für eine Reihe von weiteren Substanzen bekannt, darunter einige Vertreter aus der Gruppe der NSAIDs („Nonsteroidal antiinflammatory drugs“) (Kukar et al., 2005). Diese werden auch als inverse γ -Sekretase-Modulatoren (iGSM) bezeichnet.

Bepridil besitzt somit zusätzlich zum inhibitorischen Effekt auf die β -Spaltung von APP eine iGSM-Aktivität und ist der erste beschriebene duale Modulator der APP-Spaltung. Für eine therapeutische Anwendung ist Bepridil allerdings aufgrund dieser Effektkombination nicht geeignet.

3.9.2 Bepridil bewirkt Veränderungen in der Struktur von Membranen

Bepridil weist neben dem protonierbaren tertiären Amin einen stark hydrophoben Anteil auf (siehe Abbildung 27). Aufgrund dieser Eigenschaft kann Bepridil der Gruppe der sogenannten amphiphilen Substanzen („amphiphilic drugs“) zugeordnet werden. Für einige dieser Substanzen konnte gezeigt werden, dass sie mit biologischen Membranen interagieren und deren Eigenschaften verändern können (Herbette et al., 1983; Zachowski and Durand, 1988). Um zu testen, ob Bepridil ebenfalls Membranveränderungen bewirken kann, wurde der Effekt der Substanz auf Membranen, bestehend aus komplexen Lipidmischungen, mittels Deuterium-NMR-Analyse untersucht. Bei dieser Analyseverfahren können durch die Verwendung von deuterierten Lipiden bestimmte Membranparameter, wie Ordnung und Dicke der Membran, bestimmt werden. Im vorliegenden Experiment wurde eine Mischung aus Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin (POPC), Palmitoyl-Sphingomyelin (PSM) und Cholesterin (Chol) im Verhältnis 1:1:1 verwendet, in der entweder POPC oder PSM deuteriert waren. POPC dient dabei als Marker für ungeordnete, „Raft“-freie Bereiche der Membran, während Sphingomyelin als Marker für geordnete Membranbereiche herangezogen werden kann. Den Lipidmischungen wurden verschiedene Bepridil-Konzentrationen (angegeben in mol% bezogen auf die Lipid-Gesamtkonzentration) zugesetzt. Anschließend wurden die Proben mittels NMR-Spektroskopie analysiert und aus den erhaltenen Spektren der Effekt von Bepridil auf die Dicke der Membran in der Umgebung von POPC (Proben mit deuteriertem POPC) bzw. PSM (Proben mit deuteriertem PSM) bestimmt (Abbildung 33). Die Messungen wurden von Tim Bartels im Labor von Prof. Dr. Klaus Beyer durchgeführt.

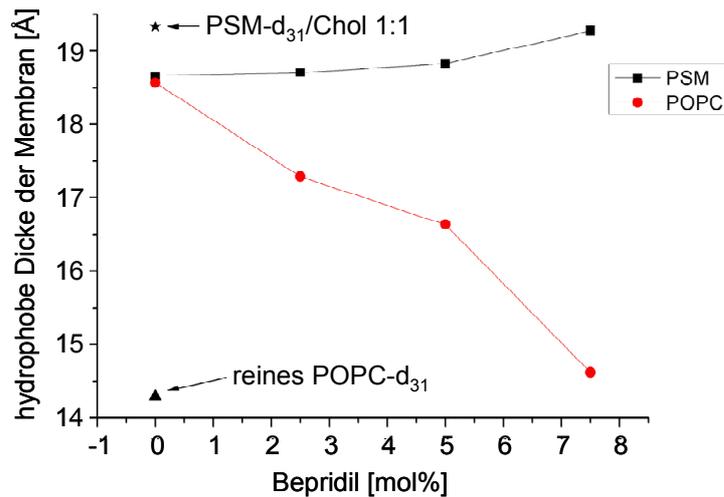


Abbildung 33: Bepridil beeinflusst die Struktur von Membranen

Dargestellt ist der Einfluss von Bepridil auf die aus den NMR-Daten berechnete hydrophobe Dicke einer Membran aus POPC/PSM/Cholesterin im Verhältnis 1:1:1. Die schwarze Kurve entspricht dabei der Dicke in der Umgebung von PSM, während die rote Kurve die Dicke in der Umgebung von POPC wiedergibt. Als Extremwerte sind die Dicke von Membranen aus reinem deuteriertem POPC (\blacktriangle ; POPC- d_{31}) und aus deuteriertem PSM in einer 1:1-Mischung mit Cholesterin (\blackstar ; PSM- d_{31} /Chol 1:1) angegeben. Alle Messungen wurden bei 35°C durchgeführt.

Das in Abbildung 33 dargestellte Ergebnis zeigt, dass sich die drei verwendeten Lipide bei 35°C und 0% Bepridil perfekt mischen, was an der identischen Dicke der Membran in der Umgebung von POPC und PSM zu erkennen ist. Mit zunehmender Bepridil-Konzentration nimmt die Dicke in der Umgebung von POPC stark ab, während sie für die Umgebung von PSM zunimmt. Bei 7,5% Bepridil entspricht sie für POPC schließlich der Dicke einer reinen POPC-Membran, für PSM dagegen der Dicke einer Membran aus PSM und Cholesterin im Verhältnis 1:1. Der beobachtete Effekt lässt sich nur durch eine Umverteilung des Cholesterins in der Membran erklären. Bepridil scheint das Cholesterin aus der POPC-Phase in die PSM-Phase zu verdrängen und dadurch eine Phasentrennung zu induzieren.

Zusammengefasst zeigt dieses Ergebnis, dass Bepridil in der Lage ist, starke Veränderungen in der Struktur von Membranen zu bewirken. Da die γ -Sekretase ein membranständiger Enzymkomplex ist und die Proteolyse innerhalb der Membran stattfindet, ist es gut vorstellbar, dass eine Veränderung der Membraneigenschaften eine Veränderung der Schnittspezifität der Sekretase auslöst.

3.9.3 Umwandlung eines inversen γ -Sekretase-Modulators in einen direkten γ -Sekretase-Modulator

Neben den in 3.9.1 erwähnten inversen γ -Sekretase-Modulatoren (iGSM) gibt es auch Substanzen, die eine direkte Modulation der Sekretase bewirken („straight γ -secretase modulator“, sGSM) (Weggen et al., 2001). Diese führen zu einer Verschiebung der Schnittspezifität von A β 42 zu A β 38 und somit zu einer Verringerung der Menge an A β 42. Für einige dieser Substanzen konnte in Tierexperimenten bereits gezeigt werden, dass sie ein großes therapeutisches Potential besitzen (Weggen et al., 2001). Der sGSM (R)-Flurbiprofen wird zudem derzeit in einer klinischen Studie der Phase III getestet (Imbimbo, 2008; Kukar and Golde, 2008). Narlawar und Kollegen konnten kürzlich zeigen, dass es möglich ist, einen iGSM durch chemische Modifikation in einen sGSM umzuwandeln (Narlawar et al., 2007). Der entscheidende Schritt war dabei das Hinzufügen einer Säurefunktion zur Struktur des iGSM. Um zu testen, ob es sich hierbei um ein generelles Prinzip handelt, das auch auf andere iGSM angewendet werden kann, wurden die Effekte von Amiodarone und AMI-AcOH auf die Schnittspezifität der γ -Sekretase verglichen. Dazu wurden HEK293-APP_{swe} Zellen für 16 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen der beiden Substanzen behandelt und anschließend die Effekte auf die verschiedenen A β -Spezies mittels „Sandwich-Immunoassay“ analysiert. Als Kontrollen wurden Fenofibrate (iGSM) (Kukar et al., 2005) und Sulindac Sulfid (sGSM) (Weggen et al., 2001) verwendet. Die mit Sulindac Sulfid behandelten Zellen wurden vor der Hauptinkubation für 24 Stunden mit der halben Substanzkonzentration (25 μ M) präinkubiert. Die in Abbildung 34 dargestellten Ergebnisse zeigen nur die Werte für A β 38 und A β 42, da diese entscheidend für den GSM-Effekt sind.

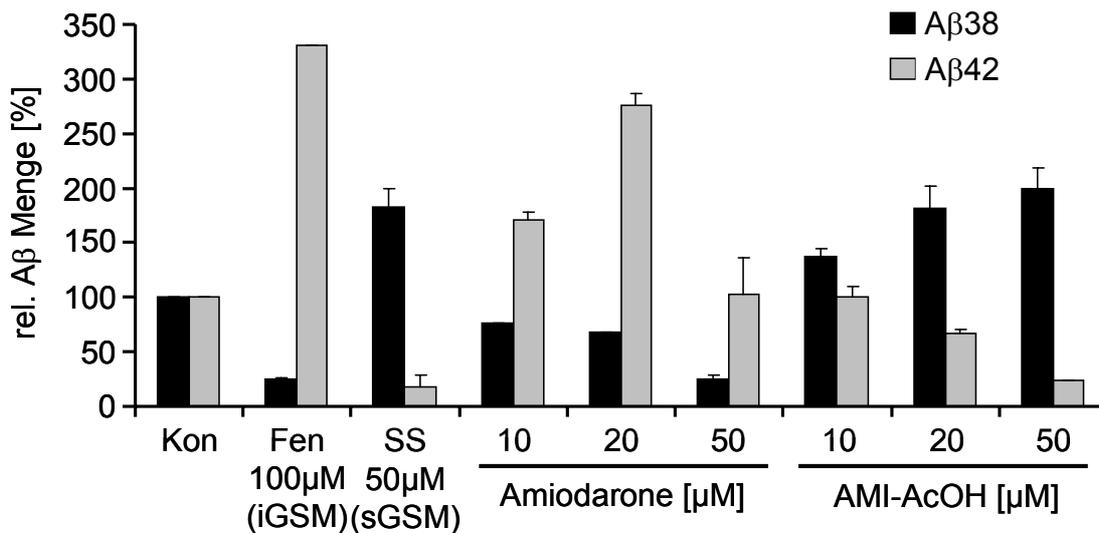


Abbildung 34: Umwandlung eines iGSM in einen sGSM durch Hinzufügen einer Säurefunktion
 HEK293-APP^{sw} Zellen wurden für 16 Stunden mit Fenofibrate (Fen), Sulindac Sulfid (SS), Amiodarone bzw. AMI-AcOH in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Anschließend wurden im konditionierten Medium die Mengen an Aβ₃₈ und 42 bestimmt und die jeweiligen Mengen der kontrollbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten. Kon = Kontrolle

Abbildung 34 zeigt, dass Amiodarone zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme von Aβ₄₂ bei gleichzeitiger Abnahme von Aβ₃₈ führt. Der Effekt ähnelt sehr stark dem Effekt des bekannten iGSM Fenofibrate. Amiodarone wirkt also, wie Bepridil, als iGSM. Die Abnahme beider Aβ-Spezies bei 50 μM ist wahrscheinlich auf eine beginnende Toxizität der Substanz bei dieser Konzentration zurückzuführen.

Bei Behandlung der Zellen mit AMI-AcOH kann hingegen der gegenteilige Effekt beobachtet werden. Hier nimmt Aβ₄₂ konzentrationsabhängig ab, während Aβ₃₈ zunimmt. AMI-AcOH ist somit ein sGSM. Dies wird durch einen Vergleich mit dem Effekt des bekannten sGSM Sulindac Sulfid verdeutlicht.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Umwandlung eines inversen γ -Sekretase-Modulators in einen direkten γ -Sekretase-Modulator durch das Hinzufügen einer Säurefunktion nicht auf die von Narlawar et al. beschriebene Substanz beschränkt ist. Es scheint sich dabei vielmehr um ein generelleres Prinzip zu handeln, dass auf andere iGSMs übertragbar ist. Es kann nun versucht werden, auch Bepridil auf diese Weise zu modifizieren, wodurch ein dualer Modulator entstehen könnte, der zum einen die β -Spaltung von APP hemmt und zum anderen die Menge des toxischen Aβ₄₂ durch einen sGSM-Effekt auf die γ -Sekretase weiter verringert. Eine solche Substanz könnte für die Behandlung der Alzheimer Krankheit getestet werden.

4. Diskussion

Die Alzheimer Krankheit ist die weltweit häufigste Form von Demenz (Selkoe, 2001). Derzeit sind alleine in Deutschland ca. 1,2 Millionen davon betroffen (Quelle: <http://www.neuro24.de/alzhei.htm>, Stand 2006), während sich die Zahl der Patienten weltweit auf ungefähr 27 Millionen beläuft (Quelle: <http://www.alzheimersanddementia.org/article/PIIS155252600700475X>, Stand 2006). Da der größte Risikofaktor für diese Erkrankung das Altern ist, muss aufgrund der steigenden Lebenserwartung und der zunehmenden Alterung der Gesellschaft mit einem starken Anstieg der Patientenzahlen in den nächsten Jahren gerechnet werden. Zu diesem Ergebnis kommt unter anderem eine an der Johns-Hopkins-Universität in Baltimore durchgeführte Studie, die eine Vervierfachung der Zahl der von Alzheimer betroffenen Menschen bis zum Jahr 2050 prognostiziert (Abbildung 35).

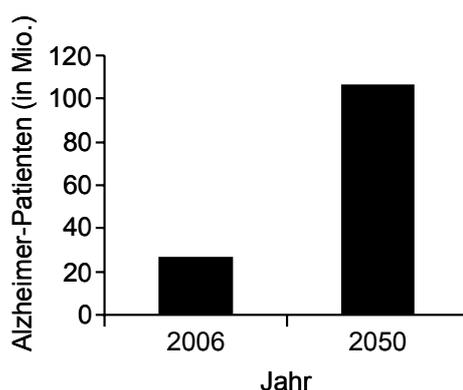


Abbildung 35: Prognose für die weltweite Entwicklung der Zahl der Alzheimer-Patienten

Dargestellt ist das Ergebnis einer Studie der Johns-Hopkins-Universität in Baltimore, welche eine Vervierfachung der Zahl der Alzheimer-Patienten weltweit bis zum Jahr 2050 prognostiziert. (Basierend auf: <http://www.alzheimersanddementia.org/article/PIIS155252600700475X>)

Das Ergebnis dieser Studie unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung einer wirksamen Therapie für die Krankheit.

Bisher ist zur Behandlung der Alzheimer Krankheit nur eine rein symptomatische Therapie möglich. So wird z.B. der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantine zur Regulierung des durch A β gestörten glutamatergen Neurotransmittersystems eingesetzt, wodurch bei mittlerer bis schwerer Erkrankung eine geringfügige Verbesserung der Krankheitssymptome erreicht werden kann (McShane et al., 2006). Ein weiterer symptomatischer Therapieansatz ist die Gabe von Acetylcholinesterase-Hemmern, wodurch der durch das Absterben von Neuronen ausgelösten Verringerung des Acetylcholin-Levels im Gehirn der Patienten entgegengewirkt

werden soll. Für diese Behandlungsmethode konnte eine Verbesserung der Symptome bei Patienten mit leichter bis mittelschwerer Erkrankung erreicht werden (Feldman and Lane, 2007; Rogers et al., 1998), wobei die Wirksamkeit dieser Methode nicht unumstritten ist (Kaduszkiewicz et al., 2005). Eine Heilung der Alzheimer Krankheit durch diese Behandlungsmethoden ist allerdings nicht möglich.

Dank intensiver Forschung ist mittlerweile sehr viel über die zellulären Prozesse, welche zur Entstehung der Alzheimer Krankheit führen, bekannt (Haass, 2004). Eine zentrale Rolle spielt hierbei die proteolytische Prozessierung von APP (siehe 1.2.1.3 und Abbildung 4). Der erste Schritt hierbei ist die Abspaltung der Ektodomäne von APP, das sogenannte APP-Shedding. Wird dieser Schritt von der β -Sekretase BACE1 durchgeführt, leitet dies den amyloidogenen Weg ein, der zur Bildung des neurotoxischen A β führt (siehe 1.2.1.3 und Abbildung 4). Die Bedeutung von BACE1 für die Alzheimer Krankheit wird dadurch unterstrichen, dass in BACE1 „knock-out“ Mäusen keine A β -Bildung mehr nachweisbar ist (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001) und durch die Tatsache, dass die Menge an BACE1-Protein sowie dessen enzymatische Aktivität im Gehirn von Alzheimer-Patienten erhöht ist (Fukumoto et al., 2002; Holsinger et al., 2002; Sun et al., 2002; Yang et al., 2003). Die Inhibition von BACE1 stellt deshalb einen interessanten Weg zur Blockade des amyloidogenen Wegs und somit zur Verhinderung der Entstehung der Alzheimer Krankheit dar (Vassar, 2002). Seit der Identifizierung von BACE1 als alleinige β -Sekretase (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Yan et al., 1999) konnten bereits einige sehr wirksame und spezifische Inhibitoren des Enzyms identifiziert werden (Ghosh et al., 2001; Sinha et al., 1999), die allerdings allesamt nicht die Blut-Hirnschranke passieren können und aufgrund ihrer meist peptidischen Grundstruktur zudem oft sehr instabil sind. Viele Pharmafirmen arbeiten derzeit an der Entwicklung von neuen BACE1-Inhibitoren, die diese Limitierungen nicht mehr aufweisen, wobei immer häufiger die Methode des sogenannten „structure-based design“ angewendet wird (Ghosh et al., 2001). Hierbei wird versucht, basierend auf der bekannten Struktur der Proteasedomäne von BACE1 (Abbildung 36) (Hong et al., 2000), Moleküle zu finden, die möglichst optimal in das aktive Zentrum passen. Ein entscheidendes Problem stellt dabei die Größe dieses aktiven Zentrums dar, was eine direkte Inhibition der Protease mit sogenannten „low molecular weight compounds“ erschwert.

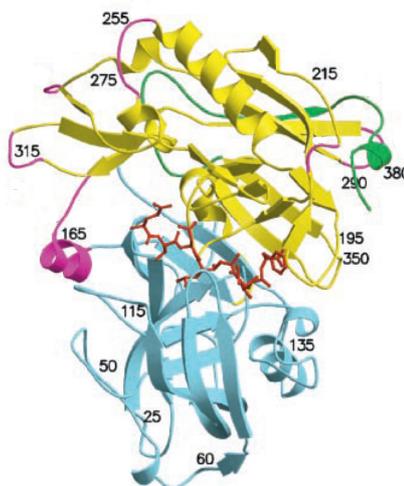


Abbildung 36: Struktur der Proteasedomäne von BACE1

Dargestellt ist die Struktur der Proteasedomäne von BACE1 im Komplex mit dem Inhibitor OM99-2 (rot), der im großen aktiven Zentrum von BACE1 sitzt (modifiziert nach (Hong et al., 2000)).

Auf diesem Weg konnten in den letzten Jahren einige neue, sehr wirksame und vor allem kleinere BACE1-Inhibitoren identifiziert werden (Ghosh et al., 2008). Allerdings bleibt das Problem der Hirngängigkeit weiterhin ungelöst, da der Transport dieser neuen Substanzen über die Blut-Hirn-Schranke meist von dem Efflux-Transporter P-Glykoprotein (PgP) unterbunden wird (Meredith et al., 2008), weshalb bis jetzt nur eine Substanz in klinischen Studien der Phase II getestet wird. Dies macht deutlich, wie schwierig es ist, geeignete BACE1-Inhibitoren zu finden, weshalb die Identifizierung von alternativen Wegen zur direkten oder indirekten Inhibition der β -Spaltung von APP von großer Bedeutung ist.

4.1 Bepridil als neuer Inhibitor der β -Spaltung von APP

In dieser Doktorarbeit konnte Bepridil als neuer Inhibitor der β -Spaltung von APP identifiziert werden. Die Substanz wurde in einem Shedding-Modulator-Screen (Abbildung 9) zunächst als Aktivator des APP-Shedding bei hohen Konzentrationen (50 μ M) gefunden (Tabelle 13 und Abbildung 11). In weiterführenden Experimenten zur detaillierteren Analyse des Effektes auf die Ektodomänenspaltung von APP konnte jedoch gezeigt werden, dass Bepridil bereits bei deutlich geringeren Konzentrationen (<5 μ M) zu einer spezifischen Inhibition der β -Spaltung von APP führt, während die Mengen an APP α und Gesamt-APP (fl.APP) bei diesen Konzentrationen unverändert bleiben (Abbildung 12 und 14). Der Effekt konnte in HEK293E Zellen, COS7 Zellen sowie in den Neurogliom-Zelllinien H4 und U373 nachgewiesen werden (Abbildung 12-15), was zeigt, dass es sich um einen generellen, nicht zelltypspezifischen Effekt handelt.

Bepridil ist in der Literatur als Calciumkanal-Blocker beschrieben (Flaim et al., 1985), wobei es im Gegensatz zu anderen Calciumkanal-Blockern auch intrazelluläre, Calmodulin-abhängige Prozesse inhibieren kann (Gleason et al., 1986; Itoh et al., 1986; Winslow et al., 1989). Zusätzlich kann Bepridil bei hohen Konzentrationen auch Natriumkanäle in erregbaren Geweben blockieren (Cosnier et al., 1977; Flaim et al., 1988). Aufgrund seiner Eigenschaft als Calciumkanal-Blocker wird die Substanz zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt, mit den Hauptindikationen stabile Angina Pectoris und Herzrhythmus-Störungen. Die relativ lange Halbwertszeit im Plasma von ein bis zwei Tagen erlaubt dabei eine einmalige Gabe von 300-400 mg des Medikaments pro Tag, wodurch Plasmakonzentrationen von bis zu 10 μM erreicht werden können, welche gut toleriert werden (Hollingshead et al., 1992). Durch die Entwicklung neuer, spezifischerer Calciumkanal-Blocker wurde Bepridil zunehmend vom Markt verdrängt und wird heute nur noch in Frankreich und Japan zur Behandlung von Patienten eingesetzt.

Der in dieser Arbeit ermittelte IC_{50} -Wert der Inhibition der β -Spaltung durch Bepridil liegt mit ca. 4-6 μM (Abbildung 13-15) genau im Bereich der Plasmakonzentration von Bepridil-behandelten Patienten. Die Analyse der Hirngängigkeit zeigte darüber hinaus, dass Bepridil die Blut-Hirn-Schranke sehr effizient passieren kann und somit auch im Gehirn von Patienten in für den β -Effekt ausreichenden Konzentrationen vorkommen sollte (Tabelle 14).

4.1.1 Analyse des zugrundeliegenden Mechanismus

Die Analyse des Effektes von Bepridil im BACE1 *in vitro* Test zeigte, dass die Inhibition nicht auf einer direkten Hemmung der enzymatischen Aktivität von BACE1 beruht (Abbildung 19) und somit über einen alternativen Mechanismus vermittelt werden muss.

Sennvik und Kollegen konnten zeigen, dass die Induktion der Apoptose mittels des Calcium-Ionophors A23187 zu einer selektiven Reduktion der Bildung von APPs β führen kann (Sennvik et al., 2001). Für Bepridil wurde darüber hinaus beschrieben, dass es in bestimmten Zelllinien, ähnlich wie A23187, eine Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration auslösen kann (Chen and Jan, 2001; Jan and Tseng, 2000). Die Möglichkeit, dass der hier beobachtete inhibitorische Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung von APP durch die Induktion eines Calcium-abhängigen Apoptoseweges vermittelt wird, kann jedoch ausgeschlossen werden, da Bepridil zum einen keine Toxizität bei den relevanten Konzentrationen zeigt (Abbildung 16) und zum anderen keinen Einfluss auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration hat (Abbildung 22).

4.1.1.1 Der Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung von APP ist nicht substratspezifisch und unabhängig vom „Trafficking“ von BACE1

Der Befund, dass Bepridil auch die Prozessierung des alternativen BACE1-Substrats Neuregulin inhibieren kann (Abbildung 17), zeigt, dass die Inhibition nicht substratspezifisch ist. Dieses Ergebnis schließt einen über direkte Bindung von Bepridil an APP vermittelten Mechanismus, wie er für eine Reihe anderer Substanzen gezeigt werden konnte (Espeseth et al., 2005), aus und zeigt, dass die Inhibition auf Seiten der Protease geschehen muss.

Die zytoplasmatische Domäne von BACE1 enthält ein charakteristisches Di-Leucin-Motiv (LL, Aminosäuren 499/500, Abbildung 37), das für die intrazelluläre Verteilung der Protease wichtig ist (Pastorino et al., 2002). Dieses Motiv ist ein Sortierungs-Signal, das sowohl die Endozytose von Proteinen von der Plasmamembran, als auch das „Trafficking“ vom trans-Golgi Netzwerk (TGN) zu den Endosomen reguliert (Kirchhausen, 2000; Le Borgne and Hoflack, 1998).

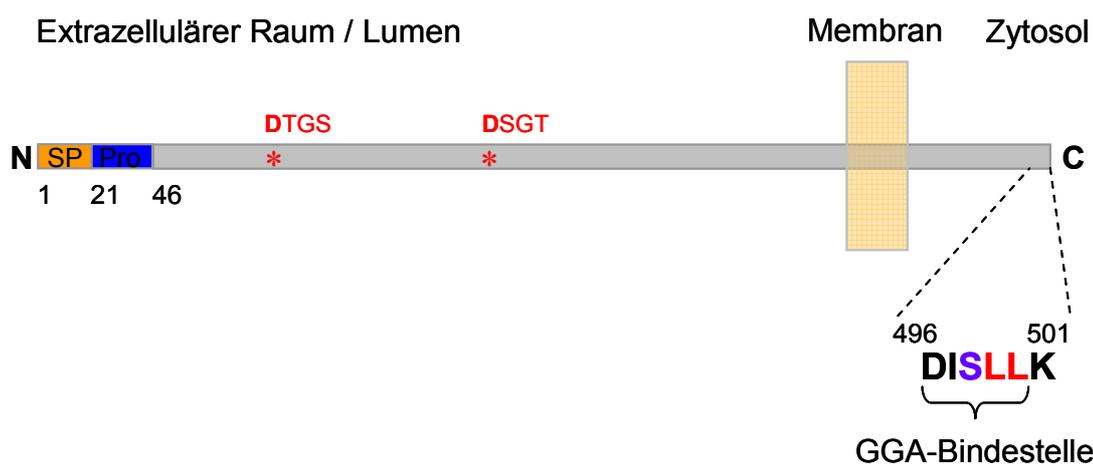


Abbildung 37: Die zytoplasmatische Domäne von BACE1 reguliert das „Trafficking“ von BACE1

Gezeigt ist der schematische Aufbau von BACE1 (vgl. Abbildung 5). Die Sequenz des C-terminalen Endes ist vergrößert dargestellt. Das Di-Leucin-Motiv (LL) ist rot, das phosphorylierbare Serin (S) ist blau dargestellt. Die GGA-Bindestelle ist angegeben.

Das Di-Leucin-Motiv ist Teil einer Bindesequenz (DISLL), an die sogenannte GGA-Proteine („Golgi-localized γ -ear-containing ARF-binding“-Protein) binden können (He et al., 2002; He et al., 2003). Für GGA-Proteine konnte gezeigt werden, dass sie eine Rolle im Transport zwischen dem trans-Golgi-Kompartiment und den frühen Endosomen spielen (Puertollano et al., 2001; Zhu et al., 2001), wobei sie auch die intrazelluläre Verteilung von BACE1 regulieren (He et al., 2005). Die Phosphorylierung des Serin-Rests (S) in diesem Motiv verstärkt die Bindung der GGA-Proteine an BACE1 (von Arnim et al., 2004) und beeinflusst

die intrazelluläre Lokalisation von BACE1 (Walter et al., 2001). Eine Beeinflussung des „Trafficking“ von BACE1 könnte den inhibitorischen Effekt der Substanz auf die β -Spaltung von APP erklären. So könnte beispielsweise eine Inhibition der BACE1-Endozytose durch Bepridil das Zusammentreffen der Protease mit APP in den Endosomen und somit die Spaltung von APP durch BACE1 verhindern. Die Analyse des Effektes von Bepridil auf die BACE1-Variante BACE1-GPI (Abbildung 26) zeigt allerdings, dass die Deletion der zytoplasmatischen Domäne von BACE1 und somit auch des DISLL-Motivs, keinen Einfluss auf den inhibitorischen Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung von APP hat. Dieses Ergebnis schließt eine Involvierung des BACE1-„Trafficking“ aus.

4.1.1.2 Die Inhibition der β -Spaltung durch Bepridil ist Calcium-unabhängig und wird nicht über die Inhibition von Calmodulin vermittelt

Eine weitere Möglichkeit für den Mechanismus der beobachteten Inhibition der β -Spaltung könnte die für Bepridil beschriebene Blockade von Calciumkanälen darstellen (Flaim et al., 1985). Störungen der Calciumhomöostase und damit des Calcium-vermittelten „Signaling“ spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Krankheit (LaFerla, 2002; Mattson and Chan, 2003; Stutzmann, 2005). Bereits in den frühen 90er Jahren konnte gezeigt werden, dass A β -Peptide in der Lage sind, die intrazelluläre Calcium-Konzentration zu erhöhen (Arispe et al., 1993; Kawahara and Kuroda, 2000), was zu metabolischem Stress und starken Beeinträchtigungen des Calcium-Signaling für die betroffenen Neuronen führt. Querfurth und Kollegen konnten zudem zeigen, dass eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration zu vermehrter A β -Bildung führen kann (Querfurth et al., 1997; Querfurth and Selkoe, 1994), was zeigt, dass die Störung der Calciumhomöostase nicht nur eine Folge vermehrter A β -Bildung ist, sondern diese auch auslösen kann. Aus diesem Grund wird der Einsatz von Medikamenten, die eine Stabilisierung der Calciumhomöostase bewirken könnten, als therapeutische Möglichkeit zur Behandlung der Alzheimer Krankheit diskutiert (LaFerla, 2002). In diesem Zusammenhang wurde für den hirngängigen Calciumkanal-Blocker Nimodipine eine therapeutische Wirkung für die Behandlung der Alzheimer Krankheit postuliert (Fritze and Walden, 1995; Wadworth and McTavish, 1992) und dieser bereits in einigen klinischen Studien zur Behandlung von Demenz getestet (Lopez-Arrieta and Birks, 2002; Lopez and Birks, 2001).

Die in den Abbildungen 20 bis 22 dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen allerdings, dass der inhibitorische Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung von APP Calcium-unabhängig sein muss. So hatte zum einen die Behandlung mit dem spezifischen Calciumkanal-Blocker

Nimodipine keinen Einfluss auf die β -Spaltung (Abbildung 20), obwohl die hier verwendete Nimodipine-Konzentration (10 μM) zu einer starken Inhibition der endogenen Calciumkanäle von HEK293 Zellen führt (Berjukow et al., 1996). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Inhibition von Calciumkanälen nicht für den hier beschriebenen Effekt von Bepridil verantwortlich sein kann. Zum anderen bewirkten weder eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) mittels des Ca^{2+} -ATPase-Inhibitors Thapsigargin, noch eine Verringerung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mithilfe des zellgängigen Calciumchelators BAPTA-AM, die für Bepridil beobachtete Inhibition der β -Sekretase-Spaltung von APP (Abbildung 21). Dieser Befund zeigt, dass Veränderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nicht in der Lage sind, die für Bepridil beobachteten Effekte auszulösen. Darüber hinaus zeigte die Analyse mithilfe des Calcium-Indikators Fura-2/AM, dass die Behandlung mit Bepridil keine Veränderung der intrazellulären Calcium-Konzentration auslöst (Abbildung 22).

Ein weiterer für Bepridil publizierter Effekt besteht in der Inhibition von Calmodulin-abhängigen Prozessen (Gleason et al., 1986; Itoh et al., 1986; Winslow et al., 1989). Bepridil wird deshalb auch als Calmodulin-Antagonist bezeichnet. Calmodulin (CaM) ist ein hochkonserviertes, ubiquitär exprimiertes Ca^{2+} -bindendes Protein, das eine wichtige Rolle bei der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse, u.a. Zell-Proliferation, Zell-Zell-Interaktion und Muskelkontraktion, spielt (Jurado et al., 1999). Die Effekte werden dabei meist über die Bindung von CaM an bestimmte Zielproteine, z.B. CaM-abhängige Kinasen, vermittelt. Eine Rolle von CaM bei der Alzheimer Krankheit ist bisher nicht beschrieben, allerdings konnten in einigen Alzheimer-relevanten Proteinen (u.a. BACE1 und APP) potentielle Bindestellen für CaM identifiziert werden (O'Day and Myre, 2004).

Wenn CaM das für den Effekt von Bepridil verantwortliche Zielmolekül ist, sollte der „knock-down“ des Proteins einen ähnlichen Effekt wie die Bepridil-Behandlung bewirken. Die in Abbildung 23 dargestellten Ergebnisse zeigen allerdings, dass der „knock-down“ von CaM zu einer Zunahme von APPs β führt und somit den entgegengesetzten Effekt von Bepridil hat. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von Bepridil in CaM-„knock-down“ Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen unverändert ist (Abbildung 24). Die Verringerung der CaM-Proteinmenge verschiebt das Verhältnis Bepridil:CaM zugunsten von Bepridil, wodurch bei gleicher Substanzkonzentration eine stärkere Inhibition erreicht werden sollte. Im Falle einer Involvierung von CaM wäre deshalb eine deutliche Verstärkung des Effektes von Bepridil in den CaM-„knock-down“ Zellen zu erwarten gewesen. Zu guter Letzt zeigte auch eine Inhibition von CaM mittels eines CaM-bindenden Peptids nicht die gleichen

Effekte wie Bepridil (Abbildung 25). Diese Ergebnisse belegen, dass der Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung von APP unabhängig von seiner Aktivität als CaM-Antagonist sein muss.

4.1.1.3 Bepridil inhibiert die β -Spaltung von APP durch die Alkalisierung saurer intrazellulärer Kompartimente

Bereits lange vor der Identifizierung von BACE1 als β -Sekretase im Jahre 1999 (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999) war bekannt, dass die β -Spaltung von APP in sauren Kompartimenten der Zelle ablaufen muss und die β -Sekretase somit eine Protease mit saurem pH-Optimum sein muss. Dies wurde durch die Behandlung von APP-exprimierenden Zellen mit alkalisierenden Agenzien, z.B. Ammoniumchlorid, gezeigt, die zu einer Inhibition der β -Spaltung von APP und dadurch zu verringerter A β -Bildung führten (Haass et al., 1993; Schrader-Fischer and Paganetti, 1996). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Doktorarbeit bestätigt werden. Die β -Spaltung von APP konnte dabei sowohl durch Ammoniumchlorid, als auch durch die amphiphile Substanz Chloroquine deutlich inhibiert werden (Abbildung 28).

BACE1 zeigt die höchste Aktivität zwischen pH 4 und 5 mit einem Optimum bei pH 4,5, während bei pH 6 nur noch ca. 10-20% Aktivität messbar sind (Vassar et al., 1999). Shimizu und Kollegen konnten kürzlich zeigen, dass BACE1 bei pH 4-5 und pH 7 in zwei verschiedenen Konformationen vorliegt, wobei die Konformation bei pH 4-5 der des aktiven Enzyms entspricht (Shimizu et al., 2008). Die Autoren der Studie fassen ihre Ergebnisse in einem Modell zusammen, das in modifizierter Form in Abbildung 38 dargestellt ist. Das Substrat kann, nur wenn BACE1 in der aktiven Form vorliegt (pH 4-5), an das aktive Zentrum der Protease binden und von dieser gespalten werden (Abbildung 38).

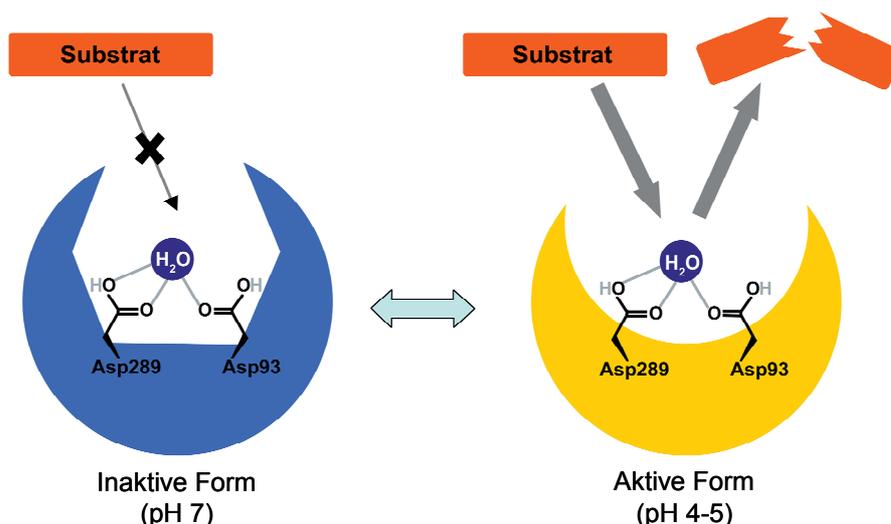


Abbildung 38: Schematische Darstellung der pH-Wert abhängigen Konformationsänderung von BACE1

Gezeigt ist eine schematische Darstellung des aktiven Zentrums von BACE1 mit den katalytisch aktiven Aspartatresten und dem für die Katalyse nötigen Wassermolekül (H₂O). Bei pH 7 liegt das Enzym in der inaktiven Konformation vor, weshalb das Substrat nicht prozessiert werden kann. Die Ansäuerung auf pH 4-5 bewirkt eine Änderung der Konformation in die aktive Form, welche in der Lage ist, die Spaltung des Substrats zu katalysieren (modifiziert nach (Shimizu et al., 2008)).

Das pH-Optimum von BACE1 liegt mit pH 4,5 im für lysosomale Kompartimente bestimmten pH-Bereich (pH 4,6-5) (Coffey and De Duve, 1968; Geisow et al., 1981; Ohkuma and Poole, 1978). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die β -Spaltung von APP in frühen endosomalen Kompartimenten stattfindet (Rajendran et al., 2006). Der für diese Kompartimente bestimmte pH-Bereich von pH 6-6,5 (Teter et al., 1998; Yamashiro and Maxfield, 1987) ist eigentlich noch nicht ausreichend sauer für eine effiziente Spaltung von APP durch BACE1. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass der pH-Wert in der Nähe von negativ geladenen Membranen, aufgrund der elektrostatischen Anziehung von Protonen, um ca. 1-2 Einheiten niedriger als in der umgebenden Flüssigkeit sein kann (Barber, 1980). Da die Zelloberfläche und somit auch die innere Oberfläche früher endosomaler Kompartimente eine negative Nettoladung aufweisen (Mehrishi and Bauer, 2002), ist davon auszugehen, dass auch im membranahen Bereich der frühen endosomalen Kompartimente ausreichend saure Bedingungen erreicht werden können.

Bepridil kann aufgrund seiner Struktur der Gruppe der amphiphilen, leicht basischen Substanzen zugeordnet werden (Abbildung 27). Charakteristisch für diese Substanzgruppe ist die Anwesenheit eines protonierbaren tertiärenamins in einer stark hydrophoben Grundstruktur. Die Substanzen können in deprotonierter und somit ungeladener Form leicht in die Zelle diffundieren. In sauren intrazellulären Kompartimenten kommt es zur Protonierung der Amin-Gruppe und dadurch zu einer Alkalisierung dieser Kompartimente

(Poole and Ohkuma, 1981). Sanchez und Kollegen konnten kürzlich zeigen, dass Bepridil in der Lage ist, den Eintritt des Anthrax-Toxins in das Zytoplasma der betroffenen Zellen verhindern kann (Sanchez et al., 2007). Für den Übertritt des Toxins aus den frühen Endosomen in das Zytoplasma der Zellen ist eine Ansäuerung der Endosomen nötig. Diese Ansäuerung wird durch Bepridil und eine weitere Substanz, Amiodarone, blockiert (Sanchez et al., 2007).

Die unter Punkt 3.7.4 dargestellten Ergebnisse deuten sehr stark darauf hin, dass die Alkalisierung von sauren intrazellulären Kompartimenten der zugrundeliegende Mechanismus des inhibitorischen Effektes von Bepridil auf die β -Spaltung von APP ist. Abbildung 29 zeigt, dass auch die Behandlung mit Amiodarone zu einer spezifischen Inhibition der β -Spaltung von APP führt, wobei der IC_{50} -Wert mit ca. 15 μ M nur geringfügig höher liegt als der für Bepridil ermittelte Wert (4-6 μ M). Dies könnte durch eine geringere Stabilität und/oder stärkere Aggregation des hydrophoberen Amiodarone bedingt sein. Ein Vergleich der Strukturen von Bepridil und Amiodarone (siehe Abbildung 27) zeigt, dass diese grundsätzlich sehr verschieden sind. Die einzigen Gemeinsamkeiten sind die hohe Lipophilie, wodurch die Substanzen leicht durch die Plasmamembran ins Innere der Zelle diffundieren können, und das protonierbare tertiäre Amin, das den Substanzen ihre Basizität und somit die Fähigkeit zur Alkalisierung saurer Kompartimente verleiht. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein Amiodarone-Derivat, dessen tertiäres Amin durch eine Säurefunktion ausgetauscht wurde, nicht mehr in der Lage ist, die β -Spaltung von APP zu inhibieren (Abbildung 30). Dieses Ergebnis belegt die essentielle Funktion der tertiären Amin-Gruppe für die Inhibition der β -Spaltung von APP. Zusammengefasst zeigen diese Resultate, dass die Inhibition der β -Spaltung von APP durch Bepridil und Amiodarone höchstwahrscheinlich durch die Alkalisierung von sauren intrazellulären Kompartimenten vermittelt wird.

Schrader-Fischer und Paganetti konnten zeigen, dass die durch alkalisierende Substanzen ausgelöste Abnahme von A β beginnend an Position 1 (siehe Abbildung 3) z.T. durch die Zunahme von A β -Peptiden mit alternativem N-Terminus kompensiert wird (Schrader-Fischer and Paganetti, 1996). Dies konnte für Bepridil durch die Verwendung des alternativen A β -Antikörpers 4G8, der gegen die Aminosäuren 17-24 von A β gerichtet ist und somit auch A β -Peptide mit alternativem N-Terminus erkennt, ausgeschlossen werden (Abbildung 12).

4.1.2 Therapeutisches Potential alkalisierender Substanzen

Die Inhibition der β -Spaltung von APP durch den Einsatz von alkalisierenden Substanzen ist nicht spezifisch, da mit der Hemmung der Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente ein grundlegender zellulärer Prozess beeinflusst wird. Das Beispiel der Hemmung der Cholesterinsynthese durch Statine zeigt allerdings, dass solche Ansätze durchaus erfolgreich sein können. Bei der Entwicklung von Cholesterin-senkenden Medikamenten wurde schnell deutlich, dass die beste Möglichkeit nicht in der spezifischen Inhibition eines der letzten Schritte der Cholesterin-Biosynthese, sondern in der Blockade der HMG-CoA-Reduktase durch Statine besteht. Die HMG-CoA-Reduktase katalysiert einen der ersten Schritte des Mevalonatbiosyntheseweges, dessen Endprodukte neben der Cholesterinsynthese auch für Prozesse wie die Prenylierung von Proteinen oder die N-Glykosylierung wichtig sind. Statine sind heutzutage die weltweit meistverkauften Medikamente.

Alkalisierende Substanzen haben ein großes therapeutisches Potential, was hier am Beispiel von Chloroquine verdeutlicht werden soll. Chloroquine ist eine amphiphile, leicht basische Substanz, die seit Jahrzehnten zur Behandlung von Malaria eingesetzt wird (White, 1996). Neuere Studien haben ergeben, dass die Substanz aufgrund ihrer alkalisierenden Wirkung auch zur Bekämpfung von Infektionen durch Viren, intrazellulären Bakterien oder Pilzen eingesetzt werden kann, die ein saures Milieu zur Vermehrung benötigen (Rolain et al., 2007). Ein Beispiel hierfür ist die Infektion durch *Coxiella burnetii*, dem Erreger des Q-Fiebers, der sich im sauren Milieu von Phagolysosomen vermehrt (Hackstadt and Williams, 1983; Mege et al., 1997). Hier konnte gezeigt werden, dass die Alkalisierung von sauren intrazellulären Kompartimenten durch alkalisierende Substanzen, darunter Chloroquine, zum einen die Vermehrung des Bakteriums direkt inhibiert (Hackstadt and Williams, 1981) und zum anderen die Wirksamkeit der Antibiotika Doxzyklin und Pefloxazin erhöht (Maurin et al., 1992; Raoult et al., 1990). Zur Behandlung von Q-Fieber wird deshalb heutzutage eine Kombination aus Doxzyklin und Hydroxy-Chloroquine (HCQ, hydroxyliertes Analog von Chloroquine) als Referenztherapie eingesetzt. Ein weiteres Beispiel ist die für Chloroquine gezeigte Aktivität gegen Infektionen mit dem Virus HIV-1 (Savarino et al., 2001). Hierbei verhindert die durch die Behandlung mit Chloroquine bzw. Hydroxychloroquine ausgelöste Alkalisierung des trans-Golgi Netzwerks (TGN) die komplexe Glykosylierung des Virus-Hüllproteins gp120, weshalb die entstehenden Viruspartikel nicht mehr infektiös sind (Chiang et al., 1996; Savarino et al., 2001; Tsai et al., 1990). Diese Beispiele verdeutlichen, dass der

Einsatz von alkalisierenden Substanzen ein großes therapeutisches Potenzial besitzt und z.T. bereits in der Praxis angewendet wird.

In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von alkalisierenden Substanzen einen alternativen Weg zur Inhibition der β -Spaltung von APP durch BACE1 darstellt. Für Bepridil liegen die dafür benötigten Konzentrationen im therapeutisch relevanten Bereich. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz alkalisierender Substanzen eine neue Strategie in der Therapie der Alzheimer Krankheit darstellen könnte. Der therapeutische Nutzen von Bepridil wird allerdings durch die zusätzliche Wirkung als iGSM geschmälert. Die Substanz könnte jedoch als sogenannte „Lead“-Substanz für die Entwicklung neuer Medikamente dienen (siehe auch 4.2.1).

4.1.3 Modell für den Wirkmechanismus von Bepridil auf die β -Spaltung

Abbildung 39 zeigt eine schematische Darstellung des wahrscheinlichen Wirkmechanismus von Bepridil und anderer alkalisierender Substanzen auf die β -Spaltung von APP.

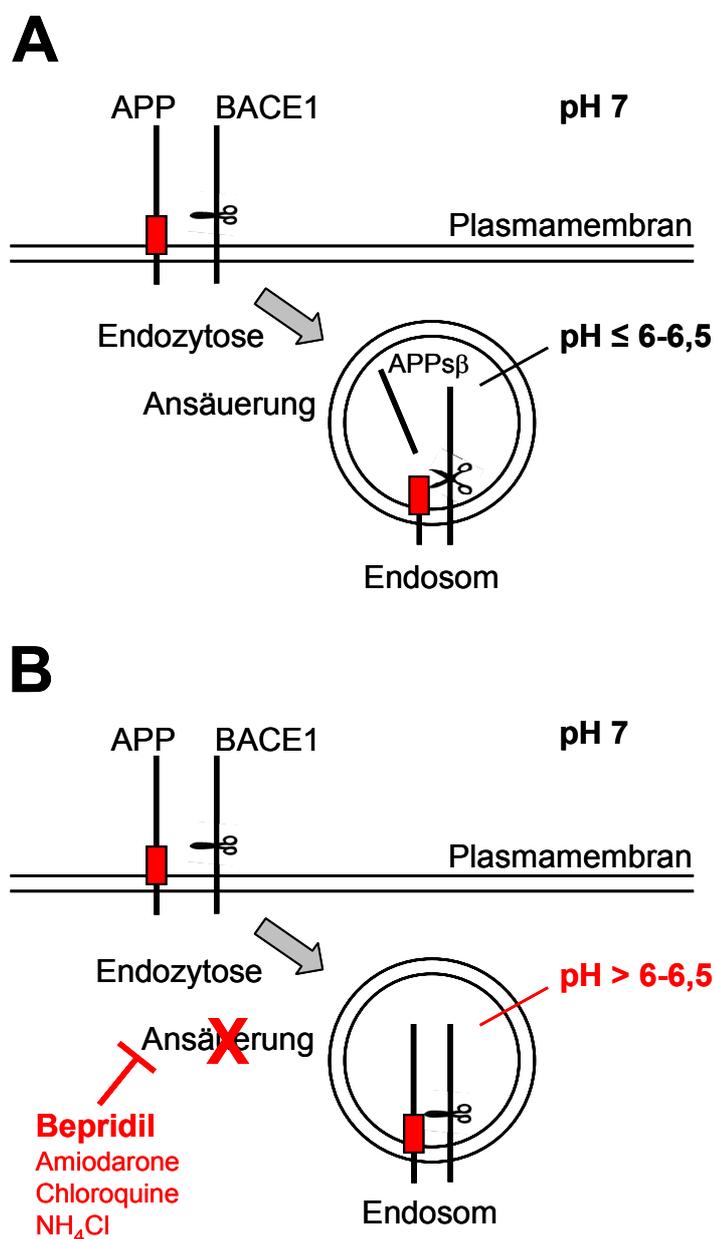


Abbildung 39: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Bepridil auf die β -Spaltung
 (A) In unbehandelten Zellen werden BACE1 und APP endozytiert und es kommt zur Ansäuerung der Endosomen. BACE1 liegt im sauren Milieu der Endosomen in der aktiven Form vor (offene Schere) und kann APP prozessieren.
 (B) Die Behandlung mit Bepridil oder anderen alkalisierenden Substanzen inhibiert die Ansäuerung der Endosomen. Durch den basischeren pH-Wert in den Endosomen liegt BACE1 in der inaktiven Form vor (geschlossene Schere) und kann APP nicht prozessieren.

An der Plasmamembran liegt BACE1 aufgrund des neutralen pH-Werts im inaktiven Zustand vor und kann APP nicht prozessieren. Nach der Endozytose der beiden Proteine kommt es zur Ansäuerung der Endosomen und damit zur Konformationsänderung von BACE1. Die Protease liegt jetzt in ihrer aktiven Konformation vor und kann APP prozessieren (Abbildung 39A).

Die Behandlung mit Bepridil oder anderen alkalisierenden Substanzen blockiert die Ansäuerung der Endosomen. Der daraus resultierende basischere pH-Wert im endosomalen Lumen verhindert die Aktivierung von BACE1. Die Protease bleibt in ihrer inaktiven Konformation und kann APP nicht prozessieren (Abbildung 39B).

4.2 Bepridil ist ein dualer Modulator

Neben der Hemmung der Prozessierung von APP durch BACE1, stellt die Inhibition der γ -Sekretase-Spaltung einen weiteren Ansatz zur Entwicklung einer wirksamen Therapie für die Alzheimer Krankheit dar (siehe auch 1.5.2). Eine vollständige Blockade der γ -Sekretase-Aktivität führt allerdings aufgrund des breiten Substratspektrums des Enzyms, das u.a. die Notch-Rezeptoren einschließt, zu unerwünschten Nebenwirkungen (Behr and Graham, 2005). Aus diesem Grund konzentriert sich die Forschung mittlerweile auf Substanzen, welche die γ -Sekretase nicht komplett inhibieren, sondern die Schnittspezifität modulieren. Diese Substanzen werden γ -Sekretase-Modulatoren (GSMs) genannt, wobei zwischen direkten GSMs („straight“ GSM, sGSM) und inversen GSMs (iGSM) unterschieden wird. sGSMs führen zu einer Verschiebung der Schnittspezifität von A β 42 zu weniger pathogenem A β 38, während iGSMs das Gegenteil bewirken und zur Entstehung von größeren Mengen des pathogenen A β 42 führen. sGSM-Aktivität konnte für einige NSAIDs („Nonsteroidal antiinflammatory drugs“) nachgewiesen werden (Weggen et al., 2001), während andere Vertreter dieser Gruppe als iGSMs wirken (Kukar et al., 2005). Der zugrundeliegende Mechanismus der Modulation konnte allerdings bis jetzt nicht geklärt werden.

Die in den Abbildungen 31 und 32 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Bepridil als iGSM wirkt. Bepridil ist somit der erste beschriebene duale Modulator, der sowohl die β -Sekretase-Spaltung inhibieren, als auch die Schnittspezifität der γ -Sekretase modulieren kann. Der dem iGSM-Effekt von Bepridil zugrundeliegende Mechanismus muss dabei unabhängig von der Alkalisierung intrazellulärer Kompartimente sein, da die Behandlung von Zellen mit Ammoniumchlorid keinen Einfluss auf das Verhältnis von A β 40 zu A β 42 hat (Vingtdeux et al., 2007).

Für einige Vertreter der Gruppe der amphiphilen Substanzen konnte gezeigt werden, dass diese an Membranen binden und deren strukturelle Eigenschaften verändern können (Herbette et al., 1983; Zachowski and Durand, 1988). Dies konnte mittels NMR-Analyse auch für Bepridil gezeigt werden (Abbildung 33). Bepridil führt dabei zu starken Veränderungen der Dicke der analysierten Membranen, was wahrscheinlich auf eine Umverteilung von Cholesterin zurückzuführen ist. Die γ -Sekretase ist ein membranständiger Enzymkomplex, dessen aktives Zentrum innerhalb der Membran liegt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der γ -Sekretase sehr stark durch die Lipidumgebung des Enzyms beeinflusst wird (Osenkowski et al., 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Schnittspezifitätsmodulierende Aktivität des bekannten sGSM Sulindac Sulfid durch Veränderung in der Struktur von Membranen vermittelt wird (Gamerdinger et al., 2008). Es ist somit gut möglich, dass die iGSM-Aktivität von Bepridil durch die in Abbildung 33 dargestellten strukturellen Veränderungen in der Membran vermittelt wird.

Ungünstigerweise hebt der iGSM-Effekt den durch die Blockade der β -Spaltung vermittelten inhibitorischen Effekt von Bepridil auf die A β -Bildung teilweise wieder auf. Während die Entstehung von A β 38 und A β 40 effizient gehemmt wird, kommt es zu keiner signifikanten Veränderung der Mengen des stärker pathogenen A β 42 (Abbildung 31). Narlawar und Kollegen konnten zeigen, dass es möglich ist, einen iGSM durch eine einfache chemische Modifikation in einen sGSM umzuwandeln. Hierfür war nur das Hinzufügen einer Säurefunktion zur Struktur des iGSM nötig (Narlawar et al., 2007). In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass dieses Prinzip auch auf andere Moleküle, in diesem Fall Amiodarone, angewendet werden kann und es sich somit um einen generelleren Mechanismus handelt (Abbildung 34). Es kann nun versucht werden, durch Hinzufügen einer Säurefunktion zur Struktur von Bepridil die beobachtete iGSM-Aktivität der Substanz, bei gleichzeitiger Beibehaltung des inhibitorischen Effektes auf die β -Spaltung, in eine sGSM-Aktivität umzuwandeln. Wenn diese Umwandlung gelingt, wäre das entstehende Bepridil-Derivat ein dualer Modulator mit großem therapeutischem Potential.

4.2.1 Schematische Darstellung der dualen Modulatoraktivität von Bepridil

Abbildung 40 zeigt eine schematische Zusammenfassung der dualen Modulatoraktivität von Bepridil. Die Alkalisierung saurer intrazellulärer Kompartimente inhibiert die β -Spaltung von APP, was zu einer Abnahme aller A β -Spezies führt. Der iGSM-Effekt der Substanz bewirkt eine Verschiebung des γ -Sekretase-Schnittes von A β 38 zu A β 42 (siehe Abbildung 32). Die Kombination beider Effekte bewirkt eine starke Abnahme von A β 38 und A β 40, während A β 42 unverändert bleibt (siehe Abbildung 31).

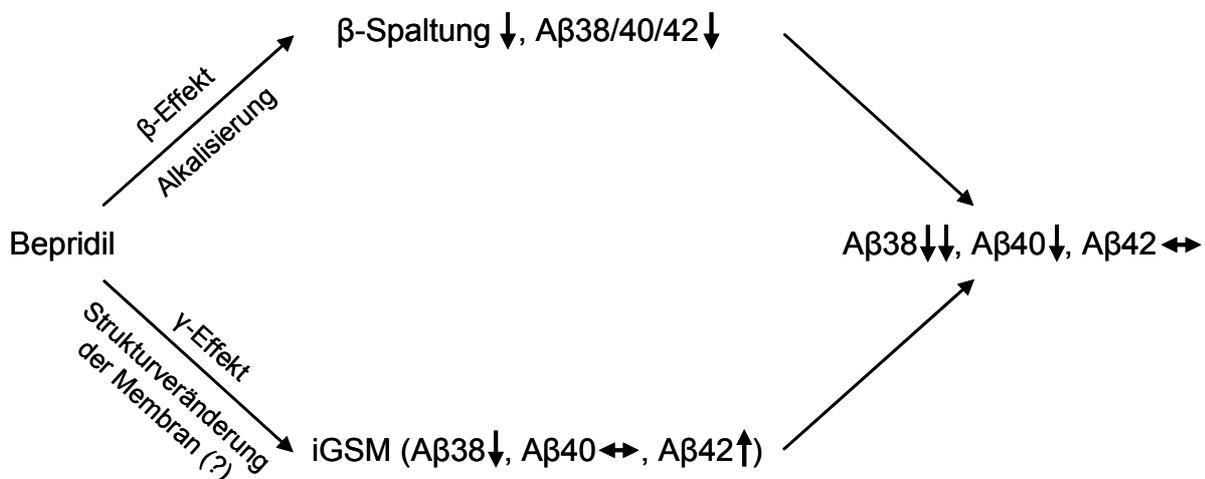


Abbildung 40: Schematische Darstellung der dualen Modulatoraktivität von Bepridil

Der Effekt von Bepridil auf die β -Spaltung von APP führt zu einer Abnahme aller A β -Spezies. Die iGSM-Aktivität der Substanz bewirkt eine Abnahme von A β 38, keine Veränderung von A β 40 und eine Zunahme von A β 42. Die Kombination beider Effekte schließlich führt zu einer starken Abnahme von A β 38 und A β 40, während A β 42 unverändert bleibt.

In Abbildung 41 ist der Effekt eines hypothetischen Bepridil-Derivats mit sGSM-Aktivität dargestellt, das über chemische Modifikation von Bepridil generiert werden könnte (siehe 4.2). Für ein solches Bepridil-Derivat wäre durch die Kombination von β - und γ -Effekt eine starke Abnahme von A β 40 und A β 42 zu erwarten, während A β 38 unverändert bleiben sollte. Eine solche Substanz wäre optimal für die Therapie der Alzheimer Krankheit geeignet.

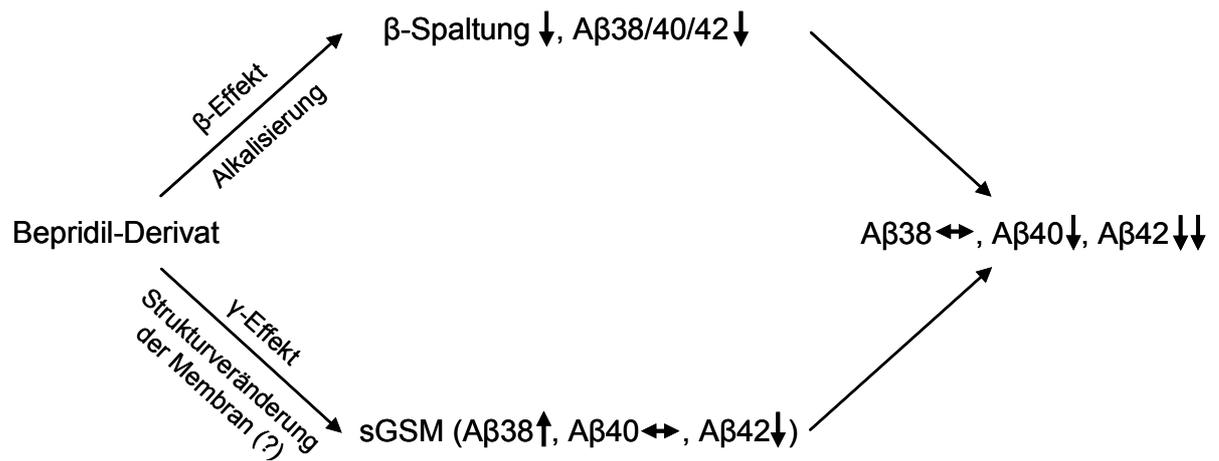


Abbildung 41: Schematische Darstellung der dualen Modulatoraktivität eines möglichen chemisch modifizierten Bepridil-Derivats

Ein durch chemische Modifikation von Bepridil generiertes Bepridil-Derivat mit sGSM-Aktivität würde durch Kombination des β - und γ -Effektes eine starke Abnahme von $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$ bewirken und wäre somit optimal für die Therapie der Alzheimer Krankheit geeignet.

5. Zusammenfassung

In dieser Doktorarbeit konnte Bepridil als neuer Inhibitor der β -Spaltung von APP identifiziert werden. Die Inhibition konnte auch für das alternative BACE1-Substrat Neuregulin 1 beobachtet werden und ist somit nicht substratspezifisch. Bepridil ist in der Literatur als Calciumkanal-Blocker und Calmodulin-Antagonist beschrieben und wird aufgrund dieser Eigenschaften zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt. Der für den inhibitorischen Effekt auf die β -Spaltung ermittelte IC_{50} -Wert liegt mit 4-6 μM im Bereich der therapeutischen Plasmakonzentration, die bis zu 10 μM betragen kann. In Mausexperimenten konnte demonstriert werden, dass die Substanz die Blut-Hirn-Schranke sehr effizient passieren kann und die Konzentration im Hirn zu allen gemessenen Zeitpunkten höher als im Plasma ist. Die Analyse des zugrundeliegenden Mechanismus zeigte, dass Bepridil die Aktivität von BACE1 nicht direkt inhibiert. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass der Effekt der Substanz auf die β -Spaltung von APP unabhängig von Calcium und Calmodulin ist und nicht durch eine Veränderung des „Trafficking“ von BACE1 ausgelöst wird. Der inhibitorische Effekt der Substanz wird höchstwahrscheinlich durch eine Alkalisierung von sauren intrazellulären Kompartimenten, u.a. den Endosomen, vermittelt, wie durch Strukturanalyse und Vergleich mit anderen alkalisierenden Substanzen, darunter Chloroquine und Amiodarone, demonstriert werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung der β -Spaltung von APP mittels alkalisierender Substanzen einen alternativen Weg zur Inhibition der A β -Bildung darstellt und dies im Falle von Bepridil bei therapeutisch relevanten Konzentrationen erreicht werden kann.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Bepridil zusätzlich zur Inhibition der β -Spaltung überraschenderweise auch die Schnittspezifität der γ -Sekretasespaltung von APP beeinflussen kann. Bepridil wirkt dabei als inverser γ -Sekretasemodulator (iGSM) und ist somit der erste beschriebene duale Modulator der APP-Spaltung. Mittels NMR-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass Bepridil starke Veränderungen in der Struktur von Membranen verursachen kann, was der Grund für die iGSM-Aktivität sein könnte.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass die in der Literatur beschriebene Umwandlung eines inversen γ -Sekretasemodulators in einen direkten γ -Sekretasemodulator durch chemische Modifikation ein generelleres Prinzip darzustellen scheint, das auch auf andere iGSMs angewendet werden kann. In weiterführenden Experimenten kann nun versucht werden, durch chemische Modifikation von Bepridil einen dualen Modulator zu generieren, der zum einen die β -Spaltung von APP inhibiert und zum anderen als direkter γ -

Sekretasemodulator wirkt. Ein solches Bepriidil-Derivat hätte ein großes therapeutisches Potential.

6. Abkürzungsverzeichnis

AMI-AcOH	Amiodarone-Derivat
AP	Alkalische Phosphatase
APL	APP-Homolog aus <i>C. elegans</i>
APLP	Amyloid Precursor-like Protein (APP-ähnliches Protein)
ApoE	Apolipoprotein-E
APPL	APP-ähnliches Protein aus <i>D. melanogaster</i>
APPx	Amyloid Precursor Protein (Amyloid-Vorläufer-Protein; x bezeichnet die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Isoform)
APPxsw	APP mit der Doppelmutation K595N/M596L (bezogen auf APP695), die in einer schwedischen Familie gefunden wurde
APPs β	Lösliche APP-Ektodomäne entstanden durch β -Sekretase Spaltung
APPs α	Lösliche APP-Ektodomäne entstanden durch α -Sekretase Spaltung
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
AICD	APP Intracellular Domain (intrazelluläre Domäne von APP)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
A β x	Amyloid β -Peptid (x bezeichnet die Anzahl der Aminosäuren des Peptids)
ATP	Adenosyltriphosphat
BACE	β -site APP-Cleaving Enzyme (β -Sekretase)
BCA	Bicinchonic Acid
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CaM	Calmodulin
CaMbp	Calmodulin-bindendes Peptid
CaMKII	Calmodulin-abhängige Kinase II
Chol	Cholesterin
CTF α /C83	C-Terminales APP-Fragment entstanden durch α -Sekretase Spaltung
CTF β /C99	C-Terminales APP-Fragment entstanden durch β -Sekretase Spaltung
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins oder Peptids
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleicacid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	Familial Alzheimer's Disease (erbliche Form der Alzheimer Krankheit)
FCS	Fetal calf serum (Fötale Kälberserum)
fl.	full-length
GFP	Green Fluorescent Protein (grünfluoreszierendes Protein)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanidyltriphosphat
HEK	Human Embryonic Kidney
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
iGSM	inverser γ -Sekretasemodulator

kb	Kilobase
kd	knock-down
kDa	Kilodalton
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LB	Lysogeny Broth (Nährlösung zur Anzucht von Bakterien)
mRNA	messenger-Ribonucleicacid (Boten-Ribonukleinsäure)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
NP-40	Nonidet P-40
NRG	Neuregulin
NSAID	Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug (entzündungshemmendes Medikament)
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins oder Peptids
p3	Spaltprodukt von APP entstehend durch α - und γ -Sekretase Spaltung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Protein-A-Sepharose
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDBu	Phorbol-12,13-dibutytrat
PI	Protease-Inhibitor
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
POPC	Palmitoyl-Oleyl-Phosphatidylcholin
PS	Presenilin
PS-CTF	C-terminales Fragment von Presenilin
PS-NTF	N-terminales Fragment von Presenilin
PSM	Palmitoyl-Sphingomyelin
PVDF	Polyvinylidenedifluorid
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase (Alkalische Phosphatase aus Krabben)
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
sGSM	straight (direkter) γ -Sekretasemodulator
siRNA	small interfering Ribonucleicacid
TACE	TNF α -cleaving enzyme (TNF α -spaltendes Enzym, ADAM17)
TAPI-1	Metalloproteaseinhibitor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	trans-Golgi Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
U	Unit
UV	Ultraviolett
w/v	weight/volume (Gewicht pro Volumen)
wt	Wildtyp-Form eines Proteins
wt%	Gewichtsprozent

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

7. Literaturverzeichnis

- Allinson, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *Journal of neuroscience research* 74, 342-352.
- Alzheimer (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin*, 146-148.
- Ancolio, K., Dumanchin, C., Barelli, H., Warter, J.M., Brice, A., Campion, D., Frebourg, T., and Checler, F. (1999). Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4119-4124.
- Annaert, W., and De Strooper, B. (1999). Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction. *Trends in neurosciences* 22, 439-443.
- Arispe, N., Rojas, E., and Pollard, H.B. (1993). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 567-571.
- Barber, J. (1980). Membrane surface charges and potentials in relation to photosynthesis. *Biochimica et biophysica acta* 594, 253-308.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., *et al.* (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature medicine* 6, 916-919.
- Behr, D., and Graham, S.L. (2005). Protease inhibitors as potential disease-modifying therapeutics for Alzheimer's disease. *Expert opinion on investigational drugs* 14, 1385-1409.
- Behr, D., Hesse, L., Masters, C.L., and Multhaup, G. (1996). Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *The Journal of biological chemistry* 271, 1613-1620.
- Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J.C., Curran, E., Citron, M., and Vassar, R. (2000a). Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *The Journal of biological chemistry* 275, 20647-20651.
- Bennett, B.D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D.B., Kahn, S., Louis, J.C., Citron, M., and Vassar, R. (2000b). A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *The Journal of biological chemistry* 275, 37712-37717.
- Berjukow, S., Doring, F., Froschmayr, M., Grabner, M., Glossmann, H., and Hering, S. (1996). Endogenous calcium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *British journal of pharmacology* 118, 748-754.

- Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., *et al.* (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* *17*, 1005-1013.
- Braak, H., Braak, E., Bohl, J., and Reintjes, R. (1996). Age, neurofibrillary changes, A beta-amyloid and the onset of Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* *210*, 87-90.
- Breitner, J.C., and Folstein, M.F. (1984). Familial Alzheimer Dementia: a prevalent disorder with specific clinical features. *Psychol Med* *14*, 63-80.
- Buxbaum, J.D., Koo, E.H., and Greengard, P. (1993). Protein phosphorylation inhibits production of Alzheimer amyloid beta/A4 peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 9195-9198.
- Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P., and Black, R.A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *The Journal of biological chemistry* *273*, 27765-27767.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D.R., Price, D.L., and Wong, P.C. (2001). BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nature neuroscience* *4*, 233-234.
- Cao, X., and Sudhof, T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science (New York, NY)* *293*, 115-120.
- Capell, A., Meyn, L., Fluhrer, R., Teplow, D.B., Walter, J., and Haass, C. (2002). Apical sorting of beta-secretase limits amyloid beta-peptide production. *The Journal of biological chemistry* *277*, 5637-5643.
- Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2000). Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *The Journal of biological chemistry* *275*, 30849-30854.
- Charlwood, J., Dingwall, C., Matico, R., Hussain, I., Johanson, K., Moore, S., Powell, D.J., Skehel, J.M., Ratcliffe, S., Clarke, B., *et al.* (2001). Characterization of the glycosylation profiles of Alzheimer's beta -secretase protein Asp-2 expressed in a variety of cell lines. *The Journal of biological chemistry* *276*, 16739-16748.
- Chavez-Gutierrez, L., Tolia, A., Maes, E., Li, T., Wong, P.C., and de Strooper, B. (2008). Glu332 in the Nicastrin Ectodomain Is Essential for {gamma}-Secretase Complex Maturation but Not for Its Activity. *The Journal of biological chemistry* *283*, 20096-20105.
- Chen, L.W., and Jan, C.R. (2001). Effect of the antianginal drug bepridil on intracellular Ca²⁺ release and extracellular Ca²⁺ influx in human neutrophils. *International immunopharmacology* *1*, 945-953.
- Chiang, G., Sassaroli, M., Louie, M., Chen, H., Stecher, V.J., and Sperber, K. (1996). Inhibition of HIV-1 replication by hydroxychloroquine: mechanism of action and comparison with zidovudine. *Clinical therapeutics* *18*, 1080-1092.

- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D.J. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-674.
- Citron, M., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1995). Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* 14, 661-670.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., *et al.* (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature medicine* 3, 67-72.
- Coffey, J.W., and De Duve, C. (1968). Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes. *The Journal of biological chemistry* 243, 3255-3263.
- Cosnier, D., Duchenne-Marullaz, P., Rispat, G., and Streichenberger, G. (1977). Cardiovascular pharmacology of bepridil (1[3 isobutoxy 2 (benzylphenyl) amino] propyl pyrrolidine hydrochloride) a new potential anti-anginal compound. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 225, 133-151.
- Creemers, J.W., Ines Dominguez, D., Plets, E., Serneels, L., Taylor, N.A., Multhaup, G., Craessaerts, K., Annaert, W., and De Strooper, B. (2001). Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *The Journal of biological chemistry* 276, 4211-4217.
- da Cruz e Silva, E.F., da Cruz e Silva, O.A., Zaia, C.T., and Greengard, P. (1995). Inhibition of protein phosphatase 1 stimulates secretion of Alzheimer amyloid precursor protein. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 1, 535-541.
- De Strooper, B., and Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *Journal of cell science* 113 (Pt 11), 1857-1870.
- DeMattos, R.B., Bales, K.R., Cummins, D.J., Dodart, J.C., Paul, S.M., and Holtzman, D.M. (2001). Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8850-8855.
- Dyrks, T., Weidemann, A., Multhaup, G., Salbaum, J.M., Lemaire, H.G., Kang, J., Muller-Hill, B., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1988). Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *The EMBO journal* 7, 949-957.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5, 486-488.
- Eriksen, J.L., Sagi, S.A., Smith, T.E., Weggen, S., Das, P., McLendon, D.C., Ozols, V.V., Jessing, K.W., Zavitz, K.H., Koo, E.H., *et al.* (2003). NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 in vivo. *The Journal of clinical investigation* 112, 440-449.

Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science (New York, NY)* *248*, 1122-1124.

Esler, W.P., and Wolfe, M.S. (2001). A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces. *Science (New York, NY)* *293*, 1449-1454.

Espeseth, A.S., Xu, M., Huang, Q., Coburn, C.A., Jones, K.L., Ferrer, M., Zuck, P.D., Strulovici, B., Price, E.A., Wu, G., *et al.* (2005). Compounds that bind APP and inhibit Abeta processing in vitro suggest a novel approach to Alzheimer disease therapeutics. *The Journal of biological chemistry* *280*, 17792-17797.

Farzan, M., Schnitzler, C.E., Vasilieva, N., Leung, D., and Choe, H. (2000). BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 9712-9717.

Feldman, H.H., and Lane, R. (2007). Rivastigmine: a placebo controlled trial of twice daily and three times daily regimens in patients with Alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* *78*, 1056-1063.

Felsenstein, K.M., Ingalls, K.M., Hunihan, L.W., and Roberts, S.B. (1994). Reversal of the Swedish familial Alzheimer's disease mutant phenotype in cultured cells treated with phorbol 12,13-dibutyrate. *Neuroscience letters* *174*, 173-176.

Fischer, F., Molinari, M., Bodendorf, U., and Paganetti, P. (2002). The disulphide bonds in the catalytic domain of BACE are critical but not essential for amyloid precursor protein processing activity. *Journal of neurochemistry* *80*, 1079-1088.

Flaim, S.F., Ratz, P.H., Swigart, S.C., and Gleason, M.M. (1985). Bepridil hydrochloride alters potential-dependent and receptor-operated calcium channels in vascular smooth muscle of rabbit aorta. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* *234*, 63-71.

Flaim, S.F., Stranieri, M.T., and Mathiasen, J.R. (1988). Effects of bepridil hydrochloride on cardiocirculatory dynamics, coronary vascular resistance, and cardiac output distribution in normal, conscious rats. *Journal of cardiovascular pharmacology* *11*, 363-372.

Fluhrer, R., Capell, A., Westmeyer, G., Willem, M., Hartung, B., Condrón, M.M., Teplow, D.B., Haass, C., and Walter, J. (2002). A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway. *Journal of neurochemistry* *81*, 1011-1020.

Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., *et al.* (2002). *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Developmental cell* *3*, 85-97.

Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2000). Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochimica et biophysica acta* *1502*, 122-132.

Fritze, J., and Walden, J. (1995). Clinical findings with nimodipine in dementia: test of the calcium hypothesis. *Journal of neural transmission* *46*, 439-453.

- Fukumoto, H., Cheung, B.S., Hyman, B.T., and Irizarry, M.C. (2002). Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Archives of neurology* 59, 1381-1389.
- Gamerding, M., Clement, A.B., and Behl, C. (2008). Effects of sulindac sulfide on the membrane architecture and the activity of gamma-secretase. *Neuropharmacology* 54, 998-1005.
- Geisow, M.J., D'Arcy Hart, P., and Young, M.R. (1981). Temporal changes of lysosome and phagosome pH during phagolysosome formation in macrophages: studies by fluorescence spectroscopy. *The Journal of cell biology* 89, 645-652.
- Ghosh, A.K., Bilcer, G., Harwood, C., Kawahama, R., Shin, D., Hussain, K.A., Hong, L., Loy, J.A., Nguyen, C., Koelsch, G., *et al.* (2001). Structure-based design: potent inhibitors of human brain memapsin 2 (beta-secretase). *Journal of medicinal chemistry* 44, 2865-2868.
- Ghosh, A.K., Kumaragurubaran, N., Hong, L., Kulkarni, S., Xu, X., Miller, H.B., Reddy, D.S., Weerasena, V., Turner, R., Chang, W., *et al.* (2008). Potent memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors: design, synthesis, protein-ligand X-ray structure, and in vivo evaluation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 18, 1031-1036.
- Giaccone, G., Tagliavini, F., Linoli, G., Bouras, C., Frigerio, L., Frangione, B., and Bugiani, O. (1989). Down patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neuroscience letters* 97, 232-238.
- Glabe, C. (2001). Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 17, 137-145.
- Gleason, M.M., Gill, A., Brannan, M.D., and Flaim, S.F. (1986). Effects of bepridil hydrochloride on calcium-induced responses in guinea pig Langendorff heart. *Pharmacology* 33, 76-85.
- Glenner, G.G., Wong, C.W., Quaranta, V., and Eanes, E.D. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol* 2, 357-369.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., *et al.* (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.
- Golde, T.E., Estus, S., Younkin, L.H., Selkoe, D.J., and Younkin, S.G. (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science (New York, NY)* 255, 728-730.
- Gorevic, P.D., Goni, F., Pons-Estel, B., Alvarez, F., Peress, N.S., and Frangione, B. (1986). Isolation and partial characterization of neurofibrillary tangles and amyloid plaque core in Alzheimer's disease: immunohistological studies. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 45, 647-664.
- Gotz, J., Chen, F., van Dorpe, J., and Nitsch, R.M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science (New York, NY)* 293, 1491-1495.

- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 4913-4917.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* 260, 3440-3450.
- Gunawardena, S., and Goldstein, L.S. (2001). Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron* 32, 389-401.
- Guo, W., Kurze, V., Huber, T., Afdhal, N.H., Beyer, K., and Hamilton, J.A. (2002). A solid-state NMR study of phospholipid-cholesterol interactions: sphingomyelin-cholesterol binary systems. *Biophysical journal* 83, 1465-1478.
- Haass, C. (1997). Presenilins: genes for life and death. *Neuron* 18, 687-690.
- Haass, C. (2004). Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *The EMBO journal* 23, 483-488.
- Haass, C., Capell, A., Citron, M., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1995a). The vacuolar H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 differentially affects proteolytic processing of mutant and wild-type beta-amyloid precursor protein. *The Journal of biological chemistry* 270, 6186-6192.
- Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 268, 3021-3024.
- Haass, C., Koo, E.H., Mellon, A., Hung, A.Y., and Selkoe, D.J. (1992). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357, 500-503.
- Haass, C., Lemere, C.A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., and Selkoe, D.J. (1995b). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature medicine* 1, 1291-1296.
- Haass, C., and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101-112.
- Haass, C., and Steiner, H. (2002). Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends in cell biology* 12, 556-562.
- Hackstadt, T., and Williams, J.C. (1981). Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 3240-3244.
- Hackstadt, T., and Williams, J.C. (1983). pH dependence of the *Coxiella burnetii* glutamate transport system. *Journal of bacteriology* 154, 598-603.

- Haniu, M., Denis, P., Young, Y., Mendiaz, E.A., Fuller, J., Hui, J.O., Bennett, B.D., Kahn, S., Ross, S., Burgess, T., *et al.* (2000). Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *The Journal of biological chemistry* 275, 21099-21106.
- Hardy, J. (1997). The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2095-2097.
- Hardy, J., Duff, K., Hardy, K.G., Perez-Tur, J., and Hutton, M. (1998). Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nature neuroscience* 1, 355-358.
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, NY)* 297, 353-356.
- Hartmann, D., de Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Lena Illert, A., von Figura, K., *et al.* (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Human molecular genetics* 11, 2615-2624.
- He, X., Chang, W.P., Koelsch, G., and Tang, J. (2002). Memapsin 2 (beta-secretase) cytosolic domain binds to the VHS domains of GGA1 and GGA2: implications on the endocytosis mechanism of memapsin 2. *FEBS letters* 524, 183-187.
- He, X., Li, F., Chang, W.P., and Tang, J. (2005). GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE). *The Journal of biological chemistry* 280, 11696-11703.
- He, X., Zhu, G., Koelsch, G., Rodgers, K.K., Zhang, X.C., and Tang, J. (2003). Biochemical and structural characterization of the interaction of memapsin 2 (beta-secretase) cytosolic domain with the VHS domain of GGA proteins. *Biochemistry* 42, 12174-12180.
- Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., *et al.* (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20, 7951-7963.
- Hebert, S.S., Serneels, L., Tolia, A., Craessaerts, K., Derks, C., Filippov, M.A., Muller, U., and De Strooper, B. (2006). Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO reports* 7, 739-745.
- Herbette, L., Katz, A.M., and Sturtevant, J.M. (1983). Comparisons of the interaction of propranolol and timolol with model and biological membrane systems. *Molecular pharmacology* 24, 259-269.
- Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretschmar, H., Sisodia, S., and Muller, U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *The EMBO journal* 23, 4106-4115.
- Hollingshead, L.M., Faulds, D., and Fitton, A. (1992). Bepidil. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in stable angina pectoris. *Drugs* 44, 835-857.

- Holsinger, R.M., McLean, C.A., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Evin, G. (2002). Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* *51*, 783-786.
- Hong, L., Koelsch, G., Lin, X., Wu, S., Terzyan, S., Ghosh, A.K., Zhang, X.C., and Tang, J. (2000). Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science (New York, NY)* *290*, 150-153.
- Hornsten, A., Lieberthal, J., Fadia, S., Malins, R., Ha, L., Xu, X., Daigle, I., Markowitz, M., O'Connor, G., Plasterk, R., *et al.* (2007). APL-1, a *Caenorhabditis elegans* protein related to the human beta-amyloid precursor protein, is essential for viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 1971-1976.
- Hu, X., Hicks, C.W., He, W., Wong, P., Macklin, W.B., Trapp, B.D., and Yan, R. (2006). Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nature neuroscience* *9*, 1520-1525.
- Hung, A.Y., Haass, C., Nitsch, R.M., Qiu, W.Q., Citron, M., Wurtman, R.J., Growdon, J.H., and Selkoe, D.J. (1993). Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *The Journal of biological chemistry* *268*, 22959-22962.
- Huse, J.T., and Doms, R.W. (2001). Neurotoxic traffic: uncovering the mechanics of amyloid production in Alzheimer's disease. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* *2*, 75-81.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., *et al.* (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Molecular and cellular neurosciences* *14*, 419-427.
- Hyman, B.T., and Tanzi, R. (1995). Molecular epidemiology of Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* *333*, 1283-1284.
- Imbimbo, B.P. (2008). Therapeutic potential of gamma-secretase inhibitors and modulators. *Current topics in medicinal chemistry* *8*, 54-61.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* *96*, 23-28.
- Irie, K., Murakami, K., Masuda, Y., Morimoto, A., Ohigashi, H., Ohashi, R., Takegoshi, K., Nagao, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. (2005). Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biosci Bioeng* *99*, 437-447.
- Itoh, H., Tanaka, T., Mitani, Y., and Hidaka, H. (1986). The binding of the calcium channel blocker, bepridil, to calmodulin. *Biochemical pharmacology* *35*, 217-220.
- Jacobsen, J.S., Spruyt, M.A., Brown, A.M., Sahasrabudhe, S.R., Blume, A.J., Vitek, M.P., Muenkel, H.A., and Sonnenberg-Reines, J. (1994). The release of Alzheimer's disease beta amyloid peptide is reduced by phorbol treatment. *The Journal of biological chemistry* *269*, 8376-8382.
- Jan, C.R., and Tseng, C.J. (2000). A novel action of the antianginal drug bepridil: induction of internal Ca(2+) release and external Ca(2+) influx in Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells. *Biochemical pharmacology* *59*, 639-646.

- Jarrett, J.T., Berger, E.P., and Lansbury, P.T., Jr. (1993). 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, 4693-4697.
- Jellinger, K.A. (2005). Understanding the pathology of vascular cognitive impairment. *J Neurol Sci* 229-230, 57-63.
- Joachim, C.L., and Selkoe, D.J. (1992). The seminal role of beta-amyloid in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders* 6, 7-34.
- Jurado, L.A., Chockalingam, P.S., and Jarrett, H.W. (1999). Apocalmodulin. *Physiological reviews* 79, 661-682.
- Kaduszkiewicz, H., Zimmermann, T., Beck-Bornholdt, H.P., and van den Bussche, H. (2005). Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised clinical trials. *BMJ (Clinical research ed)* 331, 321-327.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Kawahara, M., and Kuroda, Y. (2000). Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain research bulletin* 53, 389-397.
- Kawasumi, M., Hashimoto, Y., Chiba, T., Kanekura, K., Yamagishi, Y., Ishizaka, M., Tajima, H., Niikura, T., and Nishimoto, I. (2002). Molecular mechanisms for neuronal cell death by Alzheimer's amyloid precursor protein-relevant insults. *Neurosignals* 11, 236-250.
- Kirchhausen, T. (2000). Clathrin. *Annual review of biochemistry* 69, 699-727.
- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T.C., and Hashimoto, Y. (2001). Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 13554-13559.
- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T.C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., and Ishiura, S. (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *The Biochemical journal* 343 Pt 2, 371-375.
- Koo, E.H., and Squazzo, S.L. (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *The Journal of biological chemistry* 269, 17386-17389.
- Koo, E.H., Squazzo, S.L., Selkoe, D.J., and Koo, C.H. (1996). Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *Journal of cell science* 109 (Pt 5), 991-998.
- Kuhn, P.H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C., and Lichtenthaler, S.F. (2007). Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *The Journal of biological chemistry* 282, 11982-11995.

- Kukar, T., and Golde, T.E. (2008). Possible mechanisms of action of NSAIDs and related compounds that modulate gamma-secretase cleavage. *Current topics in medicinal chemistry* 8, 47-53.
- Kukar, T., Murphy, M.P., Eriksen, J.L., Sagi, S.A., Weggen, S., Smith, T.E., Ladd, T., Khan, M.A., Kache, R., Beard, J., *et al.* (2005). Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting Abeta42 production. *Nature medicine* 11, 545-550.
- Kukar, T.L., Ladd, T.B., Bann, M.A., Fraering, P.C., Narlawar, R., Maharvi, G.M., Healy, B., Chapman, R., Welzel, A.T., Price, R.W., *et al.* (2008). Substrate-targeting gamma-secretase modulators. *Nature* 453, 925-929.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LaFerla, F.M. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nature reviews* 3, 862-872.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3922-3927.
- Lammich, S., Okochi, M., Takeda, M., Kaether, C., Capell, A., Zimmer, A.K., Edbauer, D., Walter, J., Steiner, H., and Haass, C. (2002). Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide. *The Journal of biological chemistry* 277, 44754-44759.
- Lammich, S., Schobel, S., Zimmer, A.K., Lichtenthaler, S.F., and Haass, C. (2004). Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region. *EMBO reports* 5, 620-625.
- Lansbury, P.T., Jr. (1997). Inhibition of amyloid formation: a strategy to delay the onset of Alzheimer's disease. *Current opinion in chemical biology* 1, 260-267.
- LaPointe, C.F., and Taylor, R.K. (2000). The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. *The Journal of biological chemistry* 275, 1502-1510.
- Le Borgne, R., and Hoflack, B. (1998). Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta* 1404, 195-209.
- Lee, E.B., Zhang, B., Liu, K., Greenbaum, E.A., Doms, R.W., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2005). BACE overexpression alters the subcellular processing of APP and inhibits Abeta deposition in vivo. *The Journal of cell biology* 168, 291-302.
- Lee, H.J., Jung, K.M., Huang, Y.Z., Bennett, L.B., Lee, J.S., Mei, L., and Kim, T.W. (2002). Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. *The Journal of biological chemistry* 277, 6318-6323.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., *et al.* (1995a). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science (New York, NY)* 269, 973-977.

- Levy-Lahad, E., Wijsman, E.M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K.A., Weber, J.L., Bird, T.D., and Schellenberg, G.D. (1995b). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science (New York, NY)* 269, 970-973.
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X., *et al.* (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nature genetics* 25, 402-405.
- Li, J., Ma, J., and Potter, H. (1995). Identification and expression analysis of a potential familial Alzheimer disease gene on chromosome 1 related to AD3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 12180-12184.
- Li, Q., and Sudhof, T.C. (2004). Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *The Journal of biological chemistry* 279, 10542-10550.
- Lichtenthaler, S.F., Behr, D., Grimm, H.S., Wang, R., Shearman, M.S., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (2002). The intramembrane cleavage site of the amyloid precursor protein depends on the length of its transmembrane domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1365-1370.
- Lichtenthaler, S.F., Dominguez, D.I., Westmeyer, G.G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., and Seed, B. (2003). The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *The Journal of biological chemistry* 278, 48713-48719.
- Lichtenthaler, S.F., and Haass, C. (2004). Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model. *The Journal of clinical investigation* 113, 1384-1387.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1456-1460.
- Lopez-Arrieta, J.M., and Birks, J. (2002). Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*, CD000147.
- Lopez, A., and Birks, J. (2001). Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*, CD000147.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., *et al.* (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nature neuroscience* 4, 231-232.
- Makarova, A., Williams, S.E., and Strickland, D.K. (2004). Proteases and lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Cell Biochem Biophys* 41, 139-178.
- Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1998). Tau in Alzheimer's disease. *Trends in cell biology* 8, 425-427.

Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., *et al.* (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *The EMBO journal* 21, 1948-1956.

Massingham, R., and Van Zwieten, P.A. (1989). Bepridil: a pharmacological reappraisal of its potential beneficial effects in angina and tissue protection following ischemia. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 3, 731-742.

Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., and Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 4245-4249.

Mattson, M.P., and Chan, S.L. (2003). Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell calcium* 34, 385-397.

Maurin, M., Benoliel, A.M., Bongrand, P., and Raoult, D. (1992). Phagolysosomal alkalization and the bactericidal effect of antibiotics: the *Coxiella burnetii* paradigm. *The Journal of infectious diseases* 166, 1097-1102.

Mayeux, R., Honig, L.S., Tang, M.X., Manly, J., Stern, Y., Schupf, N., and Mehta, P.D. (2003). Plasma A[β]40 and A[β]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology* 61, 1185-1190.

McCabe, M.A., and Wassall, S.R. (1997). Rapid deconvolution of NMR powder spectra by weighted fast Fourier transformation. *Solid state nuclear magnetic resonance* 10, 53-61.

McShane, R., Areosa Sastre, A., and Minakaran, N. (2006). Memantine for dementia. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*, CD003154.

Mege, J.L., Maurin, M., Capo, C., and Raoult, D. (1997). *Coxiella burnetii*: the 'query' fever bacterium. A model of immune subversion by a strictly intracellular microorganism. *FEMS microbiology reviews* 19, 209-217.

Mehnert, T., Jacob, K., Bittman, R., and Beyer, K. (2006). Structure and lipid interaction of N-palmitoylsphingomyelin in bilayer membranes as revealed by 2H-NMR spectroscopy. *Biophysical journal* 90, 939-946.

Mehrishi, J.N., and Bauer, J. (2002). Electrophoresis of cells and the biological relevance of surface charge. *Electrophoresis* 23, 1984-1994.

Meredith, J., Thompson, L., Toyn, J., Marcin, L., Barten, D., Marcinkeviciene, J., Kopcha, L., Kim, Y., Lin, A., Guss, V., *et al.* (2008). P-glycoprotein efflux and other factors limit brain A{ β } reduction by BACE1 inhibitors in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*.

Mizutani, T., Taniguchi, Y., Aoki, T., Hashimoto, N., and Honjo, T. (2001). Conservation of the biochemical mechanisms of signal transduction among mammalian Notch family members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9026-9031.

- Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., *et al.* (2000). A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* *408*, 982-985.
- Morris, H.R., Khan, M.N., Janssen, J.C., Brown, J.M., Perez-Tur, J., Baker, M., Ozansoy, M., Hardy, J., Hutton, M., Wood, N.W., *et al.* (2001). The genetic and pathological classification of familial frontotemporal dementia. *Archives of neurology* *58*, 1813-1816.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., and Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nature genetics* *1*, 345-347.
- Multhaup, G. (1994). Identification and regulation of the high affinity binding site of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor (APP) to glycosaminoglycans. *Biochimie* *76*, 304-311.
- Narlawar, R., Baumann, K., Czech, C., and Schmidt, B. (2007). Conversion of the LXR-agonist TO-901317--from inverse to normal modulation of gamma-secretase by addition of a carboxylic acid and a lipophilic anchor. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* *17*, 5428-5431.
- Nee, L.E., Polinsky, R.J., Eldridge, R., Weingartner, H., Smallberg, S., and Ebert, M. (1983). A family with histologically confirmed Alzheimer's disease. *Archives of neurology* *40*, 203-208.
- O'Day, D.H., and Myre, M.A. (2004). Calmodulin-binding domains in Alzheimer's disease proteins: extending the calcium hypothesis. *Biochemical and biophysical research communications* *320*, 1051-1054.
- Ohkuma, S., and Poole, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *75*, 3327-3331.
- Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M., and Haass, C. (2002). Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *The EMBO journal* *21*, 5408-5416.
- Oltersdorf, T., Ward, P.J., Henriksson, T., Beattie, E.C., Neve, R., Lieberburg, I., and Fritz, L.C. (1990). The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *The Journal of biological chemistry* *265*, 4492-4497.
- Osenkowski, P., Ye, W., Wang, R., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. (2008). Direct and potent regulation of gamma -secretase by its lipid microenvironment. *The Journal of biological chemistry*.
- Pastorino, L., Ikin, A.F., Nairn, A.C., Pursnani, A., and Buxbaum, J.D. (2002). The carboxyl-terminus of BACE contains a sorting signal that regulates BACE trafficking but not the formation of total A(beta). *Molecular and cellular neurosciences* *19*, 175-185.
- Payne, M.E., Fong, Y.L., Ono, T., Colbran, R.J., Kemp, B.E., Soderling, T.R., and Means, A.R. (1988). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Characterization of distinct calmodulin binding and inhibitory domains. *The Journal of biological chemistry* *263*, 7190-7195.

- Perez, R.G., Soriano, S., Hayes, J.D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D.J., Chen, X., Stokin, G.B., and Koo, E.H. (1999). Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *The Journal of biological chemistry* 274, 18851-18856.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., *et al.* (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science (New York, NY)* 282, 1281-1284.
- Petrache, H.I., Dodd, S.W., and Brown, M.F. (2000). Area per lipid and acyl length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by (2)H NMR spectroscopy. *Biophysical journal* 79, 3172-3192.
- Petrache, H.I., Tu, K., and Nagle, J.F. (1999). Analysis of simulated NMR order parameters for lipid bilayer structure determination. *Biophysical journal* 76, 2479-2487.
- Pike, C.J., Cummings, B.J., Monzavi, R., and Cotman, C.W. (1994). Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 63, 517-531.
- Ponting, C.P., Hutton, M., Nyborg, A., Baker, M., Jansen, K., and Golde, T.E. (2002). Identification of a novel family of presenilin homologues. *Human molecular genetics* 11, 1037-1044.
- Poole, B., and Ohkuma, S. (1981). Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *The Journal of cell biology* 90, 665-669.
- Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., *et al.* (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *The Journal of clinical investigation* 113, 1456-1464.
- Prokop, S., Haass, C., and Steiner, H. (2005). Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain determines its function in the stabilization of presenilin fragments. *Journal of neurochemistry* 94, 57-62.
- Prokop, S., Shirotani, K., Edbauer, D., Haass, C., and Steiner, H. (2004). Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex. *The Journal of biological chemistry* 279, 23255-23261.
- Puertollano, R., Aguilar, R.C., Gorshkova, I., Crouch, R.J., and Bonifacino, J.S. (2001). Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science (New York, NY)* 292, 1712-1716.
- Querfurth, H.W., Jiang, J., Geiger, J.D., and Selkoe, D.J. (1997). Caffeine stimulates amyloid beta-peptide release from beta-amyloid precursor protein-transfected HEK293 cells. *Journal of neurochemistry* 69, 1580-1591.
- Querfurth, H.W., and Selkoe, D.J. (1994). Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells. *Biochemistry* 33, 4550-4561.

- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P., and Simons, K. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 11172-11177.
- Raoult, D., Drancourt, M., and Vestris, G. (1990). Bactericidal effect of doxycycline associated with lysosomotropic agents on *Coxiella burnetii* in P388D1 cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* *34*, 1512-1514.
- Ratovitski, T., Slunt, H.H., Thinakaran, G., Price, D.L., Sisodia, S.S., and Borchelt, D.R. (1997). Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin. *The Journal of biological chemistry* *272*, 24536-24541.
- Rebeck, G.W., Reiter, J.S., Strickland, D.K., and Hyman, B.T. (1993). Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* *11*, 575-580.
- Reisberg, B., Ferris, S.H., Anand, R., Mir, P., Geibel, V., De Leon, M.J., and Roberts, E. (1983). Effects of naloxone in senile dementia: a double-blind trial. *The New England journal of medicine* *308*, 721-722.
- Roberds, S.L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M.J., Branstetter, D.G., Chen, K.S., Freedman, S.B., Frigon, N.L., Games, D., Hu, K., *et al.* (2001). BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Human molecular genetics* *10*, 1317-1324.
- Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., *et al.* (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* *376*, 775-778.
- Rogers, G.W., Jr., Edelman, G.M., and Mauro, V.P. (2004). Differential utilization of upstream AUGs in the beta-secretase mRNA suggests that a shunting mechanism regulates translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 2794-2799.
- Rogers, S.L., Doody, R.S., Mohs, R.C., and Friedhoff, L.T. (1998). Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, double-blind, placebo-controlled study. Donepezil Study Group. *Archives of internal medicine* *158*, 1021-1031.
- Rolain, J.M., Colson, P., and Raoult, D. (2007). Recycling of chloroquine and its hydroxyl analogue to face bacterial, fungal and viral infections in the 21st century. *International journal of antimicrobial agents* *30*, 297-308.
- Rossner, S., Sastre, M., Bourne, K., and Lichtenthaler, S.F. (2006). Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression--implications for Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology* *79*, 95-111.
- Sanchez, A.M., Thomas, D., Gillespie, E.J., Damoiseaux, R., Rogers, J., Saxe, J.P., Huang, J., Manchester, M., and Bradley, K.A. (2007). Amiodarone and bepridil inhibit anthrax toxin entry into host cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* *51*, 2403-2411.

Sandbrink, R., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1994). Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4-amyloid protein precursor-like proteins. *The Journal of biological chemistry* 269, 14227-14234.

Sastre, M., Dewachter, I., Rossner, S., Bogdanovic, N., Rosen, E., Borghgraef, P., Evert, B.O., Dumitrescu-Ozimek, L., Thal, D.R., Landreth, G., *et al.* (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 443-448.

Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M.M., Teplow, D.B., and Haass, C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO reports* 2, 835-841.

Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, P.H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., Alberts, M.J., *et al.* (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1467-1472.

Savarino, A., Gennero, L., Sperber, K., and Boelaert, J.R. (2001). The anti-HIV-1 activity of chloroquine. *J Clin Virol* 20, 131-135.

Saxena, M.T., Schroeter, E.H., Mumm, J.S., and Kopan, R. (2001). Murine notch homologs (N1-4) undergo presenilin-dependent proteolysis. *The Journal of biological chemistry* 276, 40268-40273.

Schagger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* 166, 368-379.

Schenk, D. (2002). Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nature reviews* 3, 824-828.

Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., *et al.* (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173-177.

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., *et al.* (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature medicine* 2, 864-870.

Schmechel, D.E., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Crain, B.J., Hulette, C.M., Joo, S.H., Pericak-Vance, M.A., Goldgaber, D., and Roses, A.D. (1993). Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 9649-9653.

Schobel, S., Neumann, S., Seed, B., and Lichtenthaler, S.F. (2006). Expression cloning screen for modifiers of amyloid precursor protein shedding. *Int J Dev Neurosci* 24, 141-148.

- Schrader-Fischer, G., and Paganetti, P.A. (1996). Effect of alkalizing agents on the processing of the beta-amyloid precursor protein. *Brain research* 716, 91-100.
- Scriabine, A., and van den Kerckhoff, W. (1988). Pharmacology of nimodipine. A review. *Annals of the New York Academy of Sciences* 522, 698-706.
- Seals, D.F., and Courtneidge, S.A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & development* 17, 7-30.
- Selkoe, D., and Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annual review of neuroscience* 26, 565-597.
- Selkoe, D.J. (1994). Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annual review of cell biology* 10, 373-403.
- Selkoe, D.J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399, A23-31.
- Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews* 81, 741-766.
- Selkoe, D.J., Abraham, C.R., Podlisny, M.B., and Duffy, L.K. (1986). Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 46, 1820-1834.
- Sennvik, K., Benedikz, E., Fastbom, J., Sundstrom, E., Winblad, B., and Ankarcrone, M. (2001). Calcium ionophore A23187 specifically decreases the secretion of beta-secretase cleaved amyloid precursor protein during apoptosis in primary rat cortical cultures. *Journal of neuroscience research* 63, 429-437.
- Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M.G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D.L., Bryant, K., Fritz, L.C., Galasko, D., Thal, L.J., *et al.* (1993). Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* 361, 260-263.
- Shah, S., Lee, S.F., Tabuchi, K., Hao, Y.H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C.E., 3rd, Sudhof, T., and Yu, G. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122, 435-447.
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., *et al.* (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.
- Shimizu, H., Tosaki, A., Kaneko, K., Hisano, T., Sakurai, T., and Nukina, N. (2008). Crystal structure of an active form of BACE1, an enzyme responsible for amyloid beta protein production. *Molecular and cellular biology* 28, 3663-3671.
- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., *et al.* (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537-540.
- Sisodia, S.S. (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6075-6079.

Sisodia, S.S., Koo, E.H., Beyreuther, K., Unterbeck, A., and Price, D.L. (1990). Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* (New York, NY) *248*, 492-495.

Sisodia, S.S., and St George-Hyslop, P.H. (2002). gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nature reviews* *3*, 281-290.

Slack, B.E., Ma, L.K., and Seah, C.C. (2001). Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *The Biochemical journal* *357*, 787-794.

Slack, B.E., Nitsch, R.M., Livneh, E., Kunz, G.M., Jr., Breu, J., Eldar, H., and Wurtman, R.J. (1993). Regulation by phorbol esters of amyloid precursor protein release from Swiss 3T3 fibroblasts overexpressing protein kinase C alpha. *The Journal of biological chemistry* *268*, 21097-21101.

Smith, J.B., Selak, M.A., Dangelmaier, C., and Daniel, J.L. (1992). Cytosolic calcium as a second messenger for collagen-induced platelet responses. *The Biochemical journal* *288* (Pt 3), 925-929.

Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., *et al.* (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *The EMBO journal* *24*, 3624-3634.

Solans, A., Estivill, X., and de La Luna, S. (2000). A new aspartyl protease on 21q22.3, BACE2, is highly similar to Alzheimer's amyloid precursor protein beta-secretase. *Cytogenetics and cell genetics* *89*, 177-184.

Sprecher, C.A., Grant, F.J., Grimm, G., O'Hara, P.J., Norris, F., Norris, K., and Foster, D.C. (1993). Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry* *32*, 4481-4486.

Steiner, H., and Haass, C. (2000). Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nature reviews* *1*, 217-224.

Steiner, H., Than, M., Bode, W., and Haass, C. (2006). Pore-forming scissors? A first structural glimpse of gamma-secretase. *Trends in biochemical sciences* *31*, 491-493.

Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 1977-1981.

Struhl, G., and Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Molecular cell* *6*, 625-636.

Stutzmann, G.E. (2005). Calcium dysregulation, IP3 signaling, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist* *11*, 110-115.

Sun, A., Koelsch, G., Tang, J., and Bing, G. (2002). Localization of beta-secretase memapsin 2 in the brain of Alzheimer's patients and normal aged controls. *Experimental neurology* *175*, 10-22.

- Tagliavini, F., Giaccone, G., Frangione, B., and Bugiani, O. (1988). Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and nondemented individuals. *Neuroscience letters* 93, 191-196.
- Terry, R.D., Gonatas, N.K., and Weiss, M. (1964). Ultrastructural Studies in Alzheimer's Presenile Dementia. *The American journal of pathology* 44, 269-297.
- Teter, K., Chandy, G., Quinones, B., Pereyra, K., Machen, T., and Moore, H.P. (1998). Cellubrevin-targeted fluorescence uncovers heterogeneity in the recycling endosomes. *The Journal of biological chemistry* 273, 19625-19633.
- Thinakaran, G., Harris, C.L., Ratovitski, T., Davenport, F., Slunt, H.H., Price, D.L., Borchelt, D.R., and Sisodia, S.S. (1997). Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *The Journal of biological chemistry* 272, 28415-28422.
- Thorsett, E.D., and Latimer, L.H. (2000). Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Current opinion in chemical biology* 4, 377-382.
- Tilley, L., Morgan, K., and Kalsheker, N. (1998). Genetic risk factors in Alzheimer's disease. *Mol Pathol* 51, 293-304.
- Toutenhoofd, S.L., and Strehler, E.E. (2000). The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools? *Cell calcium* 28, 83-96.
- Treiman, M., Caspersen, C., and Christensen, S.B. (1998). A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases. *Trends in pharmacological sciences* 19, 131-135.
- Tsai, W.P., Nara, P.L., Kung, H.F., and Oroszlan, S. (1990). Inhibition of human immunodeficiency virus infectivity by chloroquine. *AIDS research and human retroviruses* 6, 481-489.
- Van Eldik, L.J., and Wolchok, S.R. (1984). Conditions for reproducible detection of calmodulin and S100 beta in immunoblots. *Biochemical and biophysical research communications* 124, 752-759.
- Vassar, R. (2002). Beta-secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease. *Advanced drug delivery reviews* 54, 1589-1602.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., *et al.* (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science (New York, NY)* 286, 735-741.
- Vingtdeux, V., Hamdane, M., Begard, S., Loyens, A., Delacourte, A., Beauvillain, J.C., Buee, L., Marambaud, P., and Sergeant, N. (2007). Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation. *Neurobiology of disease* 25, 686-696.

- von Arnim, C.A., Tangredi, M.M., Peltan, I.D., Lee, B.M., Irizarry, M.C., Kinoshita, A., and Hyman, B.T. (2004). Demonstration of BACE (beta-secretase) phosphorylation and its interaction with GGA1 in cells by fluorescence-lifetime imaging microscopy. *Journal of cell science* 117, 5437-5445.
- Wadworth, A.N., and McTavish, D. (1992). Nimodipine. A review of its pharmacological properties, and therapeutic efficacy in cerebral disorders. *Drugs & aging* 2, 262-286.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535-539.
- Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2001). Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *The Journal of biological chemistry* 276, 14634-14641.
- Wang, P., Yang, G., Mosier, D.R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y.D., Zhao, N.M., Dominguez, B., Lee, K.F., Gan, W.B., *et al.* (2005). Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci* 25, 1219-1225.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J.F., Tanzi, R.E., and Solomon, F. (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10758-10762.
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M.D., Romano, D.M., Sisodia, S.S., Hyman, B.T., Neve, R.L., and Tanzi, R.E. (1993). Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nature genetics* 5, 95-100.
- Weggen, S., Eriksen, J.L., Das, P., Sagi, S.A., Wang, R., Pietrzik, C.U., Findlay, K.A., Smith, T.E., Murphy, M.P., Bulter, T., *et al.* (2001). A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414, 212-216.
- Wertkin, A.M., Turner, R.S., Pleasure, S.J., Golde, T.E., Younkin, S.G., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1993). Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 9513-9517.
- Westmeyer, G.G., Willem, M., Lichtenthaler, S.F., Lurman, G., Multhaup, G., Assfalg-Machleidt, I., Reiss, K., Saftig, P., and Haass, C. (2004). Dimerization of beta-site beta-amyloid precursor protein-cleaving enzyme. *The Journal of biological chemistry* 279, 53205-53212.
- White, N.J. (1996). The treatment of malaria. *The New England journal of medicine* 335, 800-806.
- Willem, M., Garratt, A.N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., and Haass, C. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science (New York, NY)* 314, 664-666.

- Wiltfang, J., Smirnov, A., Schnierstein, B., Kelemen, G., Matthies, U., Klafki, H.W., Staufenbiel, M., Huther, G., Ruther, E., and Kornhuber, J. (1997). Improved electrophoretic separation and immunoblotting of beta-amyloid (A beta) peptides 1-40, 1-42, and 1-43. *Electrophoresis* 18, 527-532.
- Winslow, E., Wright, P., Campbell, J.K., and Marshall, R.J. (1989). Comparative effects of the isomers of bepridil on isolated coronary and aortic arteries. *European journal of pharmacology* 166, 241-249.
- Wolfe, M.S. (2002). Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nat Rev Drug Discov* 1, 859-866.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Moore, C.L., Leatherwood, D.D., Ostaszewski, B., Rahmati, T., Donkor, I.O., and Selkoe, D.J. (1999). Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry* 38, 4720-4727.
- Yamashiro, D.J., and Maxfield, F.R. (1987). Acidification of morphologically distinct endosomes in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells. *The Journal of cell biology* 105, 2723-2733.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., *et al.* (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533-537.
- Yan, R., Munzner, J.B., Shuck, M.E., and Bienkowski, M.J. (2001). BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 34019-34027.
- Yang, L.B., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X.L., Beach, T., Sue, L., Wong, P., Price, D., *et al.* (2003). Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nature medicine* 9, 3-4.
- Zachowski, A., and Durand, P. (1988). Biphasic nature of the binding of cationic amphipaths with artificial and biological membranes. *Biochimica et biophysica acta* 937, 411-416.
- Zhou, H.M., Weskamp, G., Chesneau, V., Sahin, U., Vortkamp, A., Horiuchi, K., Chiusaroli, R., Hahn, R., Wilkes, D., Fisher, P., *et al.* (2004). Essential role for ADAM19 in cardiovascular morphogenesis. *Molecular and cellular biology* 24, 96-104.
- Zhu, Y., Doray, B., Poussu, A., Lehto, V.P., and Kornfeld, S. (2001). Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor. *Science (New York, NY)* 292, 1716-1718.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christian Haass für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor durchzuführen, für viele wertvolle Anregungen und die Gelegenheit zur Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen für die Vertretung meiner Dissertation vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie bedanken.

In besonderem Maße danke ich Dr. Stefan Lichtenthaler für die exzellente Betreuung dieser Doktorarbeit, für viele interessante und lehrreiche Diskussionen und sein Vertrauen in meine wissenschaftlichen Fähigkeiten.

Meinen Kollegen aus der AG Lichtenthaler gilt mein Dank für eine tolle Arbeitsatmosphäre, für die Hilfe bei kleinen und größeren Problemen im Arbeitsalltag und für die vielen interessanten Gespräche über die Alzheimer Forschung und andere wichtige Dinge des Lebens.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern des Haass-Labors für die gute Stimmung im Labor, für die Hilfsbereitschaft und viele anregende Diskussionen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre Unterstützung und meiner Frau Claudia für ihre unermüdliche Geduld, wenn's mal wieder etwas später wurde...

Lebenslauf

Dipl.-Biol. Stefan Mitterreiter
Silberdistelstraße 43
80689 München
Email: s_mitterreiter@yahoo.de

Persönliche Daten

geboren am: 27.02.1977
in: Berchtesgaden
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, eine Tochter

Ausbildung

- seit 07/2004 Promotionsstudium am Adolf-Butenandt-Institut,
Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München,
Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie, Prof. Dr. Christian Haass
Thema: „Duale Modulation der proteolytischen Spaltung des
Amyloid-Vorläufer-Proteins durch den Wirkstoff Bepridil“
- 11/1998 – 01/2004 Studium der Biologie an der LMU München
Abschluss: Diplom, Abschlussnote: 1,0 „mit Auszeichnung
bestanden“
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Biochemie, Molekulare Zellbiologie (eingegliedert in
den Fachbereich Zoologie), Mikrobiologie
Diplomarbeit: „Live Cell Imaging von Prionproteinen und
Prionrezeptor-Molekülen“ unter der Leitung von
PD Dr. Stefan Weiss am Genzentrum München
- 11/1997 – 11/1998 Studium der Sonderpädagogik an der LMU München
- 10/1996 – 10/1997 Zivildienst an der Kinderpoliklinik München
- 09/1987 – 06/1996 Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Max-Planck-
Gymnasiums München, Leistungskurse: Mathematik, Geschichte
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Durchschnittsnote: 2,0

Berufserfahrung

- 01/2004 – 04/2004 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Genzentrum München in der Arbeitsgruppe für Prionenforschung (mittlerweile umbenannt in „Laminin Receptor Research Group“) unter der Leitung von PD Dr. Stefan Weiss
Thema: „Live Cell Imaging von Prionproteinen und Prionrezeptor-Molekülen“ (Fortführung des Diplomarbeit-Themas)
- 08/2001 – 10/2001 Praktikum am Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik der GSF in München/Großhadern unter der Leitung von Prof. Dr. Dirk Eick
Thema: „Analyse der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II“

Publikationen/Vorträge

eine Publikation als Erstautor über die Inhalte dieser Doktorarbeit in Vorbereitung

- 03/2006 Naus S, Reipschläger S, Wildeboer D, Lichtenthaler SF, **Mitterreiter S**, Guan Z, Moss ML, Bartsch JW (2006), Identification of candidate substrates for ectodomain shedding by the metalloprotease-disintegrin ADAM8, Biol Chem, 387 (3), 337-46
- 10/2003 Posterpräsentation auf der „International Prion Conference“ in München