

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

**Zwei neuartige Aspartylproteasen BACE-1 und BACE-2:
Charakterisierung und Vergleich der katalytischen
Spezifitäten bei der Proteolyse des
Alzheimer β -Amyloid Vorläufer Proteins**

Regina Fluhner

aus

München

2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Rudolf Grosschedl betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 05.07.2003

.....
(Regina Fluhrer)

Dissertation eingereicht am 24.07.2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Grosschedl

2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Haass

Mündliche Prüfung am 21.10.2003

Meinen Eltern -
die mir meine Ausbildung ermöglicht haben
und mich immer mit aller Kraft unterstützt haben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden bereits teilweise in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Phosphorylation Regulates Intracellular Trafficking of beta-Secretase

J. Walter, R. Fluhner, B. Hartung, M. Willem, C. Kaether, A. Capell, S. Lammich, G. Multhaup and C. Haass

J Biol Chem. 2001 May 4; 276 (18): 14634-41

A Non-Amyloidogenic Function of BACE-2 in the Secretory Pathway

R. Fluhner, A. Capell, G. Westmeyer, M. Willem, B. Hartung, MM. Condron, DB. Teplow, C. Haass and J. Walter

J Neurochem. 2002 Jun; 81(5):1011-20.

Identification of a beta-Secretase Activity, Which Truncates Amyloid beta-Peptide after Its Presenilin-dependent Generation.

R. Fluhner, G. Multhaup, A. Schlicksupp, M. Okochi, M. Takeda, S. Lammich, M. Willem, G. Westmeyer, W. Bode, J. Walter and C. Haass.

J Biol Chem. 2003 Feb 21; 278(8):5531-5538

Die Publikationen befinden sich im Anhang.

Abkürzungsverzeichnis

β APP _x	β-Alzheimer Precursor Protein <i>β-Alzheimer Vorläufer Protein; x bezeichnet die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Isoform</i>
β APP _x sw	β APP _x mit der Doppelmutation K595N/M596L (bezogen auf β APP ₆₉₅), die in einer schwedischen Familie gefunden wurde.
β APP CTF α_x	C-Terminales β APP Fragment entstanden durch α -Sekretase Spaltung beginnend mit Aminosäure x Die Nummerierung der Aminosäuren ist bezogen auf die allgemein gebräuchliche Nummerierung der A β -Domäne, wobei D597, bezogen auf β APP ₆₉₅ , Aminosäure 1 entspricht.
β APP CTF β_x	C-Terminales β APP Fragment entstanden durch β -Sekretase Spaltung beginnend mit Aminosäure x Die Nummerierung der Aminosäuren ist bezogen auf die allgemein gebräuchliche Nummerierung der A β -Domäne, wobei D597, bezogen auf β APP ₆₉₅ , Aminosäure 1 entspricht.
β APPs β	Lösliches β APP entstanden durch β -Sekretase Spaltung
β APPs α/α'	Lösliches β APP entstanden durch α -Sekretase oder durch α -Sekretase-ähnliche Spaltung
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease <i>Disintegrin Metalloprotease</i>
AICD	βAPP Intracellular Domain <i>Intrazelluläre Domäne des βAPP</i>
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
A β x-y	Amyloid β-Peptid , beginnend mit Aminosäure x und endend mit Aminosäure y. Die Nummerierung der Aminosäuren ist bezogen auf die allgemein gebräuchliche Nummerierung der A β -Domäne, wobei D597, bezogen auf β APP ₆₉₅ , Aminosäure 1 entspricht.
ATP	Adenosyltriphosphat
BACE	β-site APP Cleaving Enzyme <i>β-Secretase</i>
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovine Serum Albumine <i>Rinderserumalbumin</i>
Ci	Curie
CK	Casein Kinase
cpm	Counts per minute <i>Zerfälle pro Minute</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins oder Peptids
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleicacid <i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DRB	5,6-Dichlorobenzimidazol-1- β -D-ribofuranosid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EndoH	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	Familial Alzheimers Disease <i>Erbliche Form der Alzheimer Krankheit</i>
FCS	Fetal calf serum <i>Fötale Kälberserum</i>
GSK 3 β	Glutathion Synthase Kinase 3β
GTP	Guanidyltriphosphat
HD	Hymenialdesin
HEK	Human Embryonic Kidney <i>Menschliche embryonale Nierenzellen</i>
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry
mRNA	messenger-Ribonucleicacid <i>Boten-Ribonukleinsäure</i>
NICD	Notch Intracellular Domain <i>Intrazelluläre Domäne des Notch-1 Rezeptors</i>
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins oder Peptids
OA	Oxaloacetic Acid <i>Okadasäure</i>
p3	Spaltprodukt des βAPP nach α- und γ-Sekretase Spaltung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline <i>Phosphat gepufferte Kochsalzlösung</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction <i>Polymerasekettenreaktion</i>
PDBu	Phorbol-12,13-dibutyrate
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PNGase F	Peptid-PNGase F
PS	Presenilin
PS CTF	C-terminales Fragment des Presenilin
PS NTF	N-terminales Fragment des Presenilin
PVDF	Poly(vinylidene difluoride)
RNA	Ribonucleicacid <i>Ribonukleinsäure</i>
RT	Raumtemperatur
sBACE	lösliche Form der β-Sekretase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBST	Tris Buffered Saline containing Tween 20 <i>Tris gepufferte Kochsalzlösung supplementiert mit Tween 20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	trans Golgi Netzwerk
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
wt	Wild Typ Form eines Proteins

<i>Bezeichnung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Einbuchstabencode</i>
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

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Inhaltsverzeichnis	8
1. Einleitung	13
<i>1.1 Histopathologie der Alzheimer Krankheit</i>	<i>13</i>
<i>1.2 Aspartylproteasen – Struktur und Eigenschaften</i>	<i>16</i>
<i>1.3 Molekulare und genetische Grundlagen der Alzheimer Krankheit</i>	<i>20</i>
1.3.1 Das β -Amyloid Vorläufer Protein – Struktur und Eigenschaften	23
1.3.2 Proteolytische Prozessierung des β -Amyloid Vorläufer Proteins	25
1.3.3 Die α -Sekretase	27
1.3.4 Die β -Sekretase	28
1.3.4.1 Eigenschaften der β -Sekretase	28
1.3.4.2 BACE-1	29
1.3.4.3 BACE-2	30
1.3.5 Die γ -Sekretase	32
1.3.5.1 Struktur und Charakteristika der Preseniline	32
1.3.5.2 Der γ -Sekretase-Komplex	35
1.3.5.3 Einfluss der γ -Sekretase auf die Notch-Signaltransduktion	36
<i>1.4 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit</i>	<i>39</i>
2. Material und Methoden	41
<i>2.1 Rekombinante DNA Techniken</i>	<i>41</i>
2.1.1 Geräte und Materialien	41
2.1.2 Konstrukte und Klonierungen	41
2.1.2.1 Vektoren	41
2.1.2.2 DNA-Konstrukte	42
2.1.2.3 PCR	42
2.1.3 Reinigung und Analyse der DNA	44
2.1.3.1 Agarose-Gelelektrophorese	44
2.1.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	44

2.1.3.3	Reinigung von DNA-Fragmenten	44
2.1.3.4	Sequenzierung der DNA-Konstrukte	44
2.1.4	Enzymatische Modifikation der DNA	45
2.1.4.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	45
2.1.4.2	Dephosphorylierung von DNA	45
2.1.4.3	Ligation von DNA	46
2.1.5	Transformation von E. coli und Plasmidpräparation	46
2.1.5.1	Herstellung kompetenter E. coli Zellen	46
2.1.5.2	Transformation von DNA-Konstrukten in kompetente E. coli	47
2.1.5.3	Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Mini-Präp)	47
2.1.5.4	Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxi-Präp)	48
2.2	<i>Zellkultur und Zelllinien</i>	48
2.2.1	Geräte und Materialien	48
2.2.2	Beschichtung der Kulturschalen und Deckgläschen mit Poly-L-Lysin	49
2.2.3	Kultivierung der HEK293 Zellen	49
2.2.3.1	Medien und Lösungen	49
2.2.3.2	Durchführung	49
2.2.4	Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)	50
2.2.5	Transfektion von HEK293 Zellen mit rekombinanter DNA	50
2.2.6	Nachweis der exogenen Proteinexpression in transfizierten Zellen	51
2.2.7	Übersicht über die verwendeten genetisch veränderten Zelllinien	51
2.3	<i>Antikörper</i>	52
2.3.1	Herstellung polyklonaler Antikörper	52
2.3.2	Übersicht über die primären Antikörper	52
2.3.2.1	Monoklonale Antikörper	53
2.3.2.2	Polyklonale Antikörper	53
2.3.3	Übersicht über die sekundären Antikörper	54
2.4	<i>Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie</i>	54
2.4.1	Geräte und Materialien	54
2.4.2	Herstellung eines Immunfluoreszenzpräparates	55
2.5	<i>Proteinbiochemie</i>	56
2.5.1	Geräte und Materialien	56
2.5.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	57

2.5.3 BACE-1 <i>in vitro</i> Aktivitätsassays	58
2.5.3.1 Aktivitätsnachweis durch Bestimmung der A β -Peptide mittels Gelelektrophorese	58
2.5.3.2 Aktivitätsnachweis durch Bestimmung der A β -Peptide mittels Massenspektrometrie	58
2.5.3.3 Fluorimetrische Aktivitätsbestimmung von BACE-1	59
2.5.4 Gewinnung von Proteinextrakten	60
2.5.4.1 Gesamtproteinextrakt	60
2.5.4.2 Membranproteinextrakt	60
2.5.5 Ermittlung der Proteinkonzentration	61
2.5.5.1 Messung der UV-Absorption	61
2.5.5.2 Methode nach Bradford	61
2.5.6 <i>In vitro</i> Phosphorylierung	61
2.5.6.1 Phosphorylierung der GST-Fusionsproteine mittels rekombinanter Kinasen	61
2.5.6.2 Phosphorylierung der GST-Fusionsproteine in Gegenwart von Zelllysaten	62
2.5.7 Metabolische Markierung von Proteinen	63
2.5.7.1 Markierung mit [35 S]-Methionin/Cystein	63
2.5.7.2 Pulse Chase Experimente	64
2.5.7.3 Markierung mit [32 P]-ortho-Phosphat	64
2.5.7.4 Markierung mit [35 S]-Sulfat	65
2.5.7.5 Markierung mit [3 H]-Aminosäuren und Radiosequenzierung	65
2.5.8 Analyse der Glykosylierung von Proteinen	66
2.5.8.1 N-Glykosidase F-Verdau	66
2.5.8.2 Endo-Glykosidase H Verdau	67
2.5.8.3 Tunikamyzin - Behandlung	67
2.5.9 Immunpräzipitation von Proteinen	68
2.5.10 Nachweis von Proteinen	69
2.5.10.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung	69
2.5.10.2 Besondere Gelsysteme zur Trennung von Peptiden mit geringem Molekulargewicht	71
2.5.10.3 Transfer und immunochemischer Nachweis von Proteinen	73

2.5.10.4 „Strippen“ von Western Blot Membranen	74
2.5.11 Massenspektrometrische Analyse von A β -Spezies	75
2.5.12 Analyse zellulärer Transport Mechanismen	75
2.5.12.1 Behandlung von HEK293 Zellen mit Brefeldin A oder Monensin	75
2.5.12.2 Biotinylierung von Oberflächenproteinen und Reinternalisierung biotinylierter Proteine	76
3. Ergebnisse	78
3.1 <i>Expression und Nachweis von BACE-1 und BACE-2</i>	78
3.1.1 Expression von BACE-1 und BACE-2 in HEK293 Zellen	79
3.1.2 Antikörper zum Nachweis von BACE-1 und BACE-2	80
3.1.3 Spezifität der Antiseren und Nachweis von BACE-1 und BACE-2 im Western Blot	81
3.2 <i>Posttranslationale Modifikationen von BACE-1 und BACE-2</i>	84
3.2.1 Glykosylierung	84
3.2.1.1 Kinetik der Maturierung von BACE-1 und BACE-2	85
3.2.1.2 Glykosylierung von BACE-1 und BACE-2 im ER und Golgi-Apparat	87
3.2.2 Phosphorylierung	91
3.2.2.1 Matures BACE-1 wird an S498 in der zytoplasmatischen Domäne phosphoryliert	91
3.2.2.2 BACE-1 wird durch CK-1 an S498 phosphoryliert	93
3.2.2.3 BACE-2 wird <i>in vitro</i> von CK1 an S511 phosphoryliert	95
3.2.3 Sulfatierung	97
3.3 <i>Subzelluläre Lokalisierung von BACE-1 und BACE-2</i>	100
3.3.1 Oberflächenlokalisierung von BACE-1 und BACE-2 und Reinternalisierung in endosomale Kompartimente	100
3.3.2 Die Phosphorylierung des BACE-1 beeinflusst die subzelluläre Lokalisierung	102
3.4 <i>Einfluss von BACE-1 und BACE-2 auf die Prozessierung von βAPP und auf die Folgeprozessierung der Aβ-Spezies</i>	104
3.4.1 Antikörper zum Nachweis von β APP und seinen Prozessierungsprodukten	104
3.4.2 Prozessierung von β APP durch BACE-1 und BACE-2	107
3.4.2.1 BACE-1 schneidet β APP an Position 1 und 11 der A β -Domäne	107

3.4.2.2 BACE-2 schneidet β APP an Position 20 der A β -Domäne	109
3.4.2.3 BACE-2 reduziert die Mengen an A β 11-40/42	117
3.4.3 BACE-1 und BACE-2 sind in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten aktiv	118
3.4.4 Prozessierung von A β -Spezies durch BACE-1 und BACE-2	124
3.4.4.1 BACE-1 schneidet A β nach Aminosäure 34	124
3.4.4.2 BACE-2 schneidet A β nach Aminosäure 34	136
4. Diskussion	139
<i>4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	<i>139</i>
<i>4.2 HEK293 Zellen als Modellsystem und transgene Überexpression von BACE-1 und BACE-2</i>	<i>140</i>
<i>4.3 Posttranslationale Modifikationen von BACE-1 und BACE-2 im Vergleich</i>	<i>142</i>
4.3.1 Glykosylierung	142
4.3.2 Phosphorylierung und ihr Einfluss auf Transport und Lokalisierung	145
4.3.3 Sulfatierung	149
<i>4.4 Einflüsse von BACE-1 und BACE-2 auf die Prozessierung von βAPP und auf die Folgeprozessierung der Aβ-Spezies</i>	<i>150</i>
4.4.1 BACE-1 und BACE-2 verhalten sich unterschiedlich bezüglich der Prozessierung membrangebundener β APP Substrate	150
4.4.2 Entstehung der verschiedenen β APP CTF Spezies in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten	152
4.4.3 Sekundäre Prozessierung der A β -Spezies durch BACE-1 und BACE-2	155
<i>4.5 Relevanz der Ergebnisse bezüglich der Alzheimer Krankheit und Ausblick</i>	<i>161</i>
5. Zusammenfassung	164
6. Literatur	166
Danksagung	191
Lebenslauf	192
Anhang: Publikationen	194

1. Einleitung

1.1 Histopathologie der Alzheimer Krankheit

Die Alzheimer Krankheit ist heute weltweit die häufigste Form von Demenz (Selkoe, 2001).

Nach dem bisherigen Stand der Erkenntnis sind nur 5-10 % aller Alzheimer Fälle auf bekannte genetische Ursachen zurückzuführen (Haass and Steiner, 2002), die übrigen Fälle treten sporadisch auf und können bislang nicht mit einer konkreten Ursache in Zusammenhang gebracht werden.

1907 brachte Alois Alzheimer erstmalig die klinischen Symptome der Krankheit, wie z.B. Gedächtnisausfälle, Störungen der räumlichen und zeitlichen Orientierung, Wahrnehmungsschwierigkeiten und Halluzinationen, mit neurofibrillärer Pathologie im Gehirn seiner 51-jährigen Patientin, Auguste D, in Verbindung (Alzheimer, 1907).

A



B

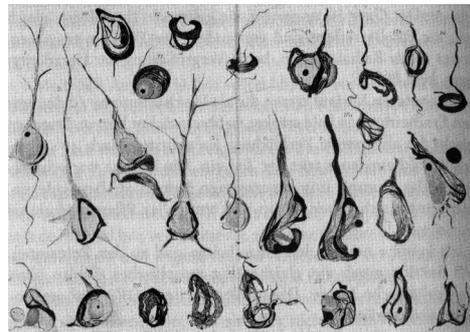


Abbildung 1: Dokumentation der neurofibrillären Pathologie nach Alois Alzheimer.

A) Fotografie der ersten dokumentierten Alzheimer Patientin, Auguste D. B) Lichtmikroskopische Aufnahme neurofibrillärer Bündel, gezeichnet von Alois Alzheimer [Quelle: (Maurer and Maurer, 1998)].

Diese beiden charakteristischen neuropathologischen Merkmale der Alzheimer Krankheit bilden auch heute noch die Grundlage für die endgültige Diagnose der Krankheit *post mortem* (Thorsett and Latimer, 2000). Amyloidablagerungen und neurofibrilläre Bündel sind vorwiegend in den Gehirnregionen Neocortex und Hippokampus, sowie im limbischen System nachweisbar (Braak et al., 1996).

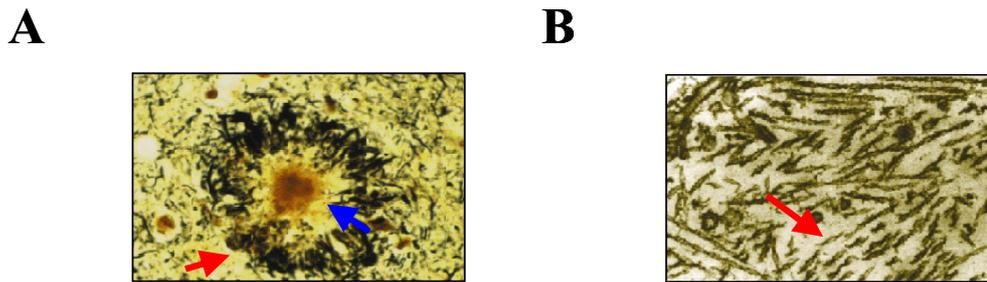


Abbildung 2: Histopathologische Charakteristika der Alzheimer Krankheit.

(A) Hochauflösende mikroskopische Aufnahme eines Amyloidplaques (blauer Pfeil), umgeben von dystrophen Neuriten (roter Pfeil). (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines neurofibrillären Bündels, das aus gepaarten helikalen Filamenten (roter Pfeil) besteht [Quelle: (Sisodia and St George-Hyslop, 2002)].

Neurofibrilläre Bündel („tangles“) entstehen ausschließlich intrazellulär im somato-dendritischen Kompartiment, aber auch in Axonen von Neuronen durch Aggregation von gepaarten helikalen Filamenten (Terry et al., 1964). Diese Filamente bestehen überwiegend aus hyperphosphorylierten Formen des mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau (Grundke-Iqbal et al., 1986), das unter physiologischen Bedingungen für die Stabilisierung der axonalen Mikrotubuli verantwortlich ist (Friedhoff et al., 2000). Die nicht physiologische Hyperphosphorylierung des Tau Proteins ist auf ein Ungleichgewicht verschiedener Kinasen und Phosphatasen zurückzuführen, dessen Ursache bisher nicht vollständig erklärt werden kann (Mandelkow and Mandelkow, 1998). Die durch die filamentöse Degeneration angegriffenen Axone und Dendriten werden als „dystrophe Neuriten“ bezeichnet (Crowther and Goedert, 2000). Nach dem Absterben der betroffenen Neuronen erscheinen die neurofibrillären Bündel auch als extrazelluläre Ablagerungen (Bondareff et al., 1994). Neurofibrilläre Bündel treten im Gegensatz zu Amyloidplaques auch im Zusammenhang mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Frontal Lobe Demenz, auf (Morris et al., 2001).

Das zweite charakteristische pathologische Merkmal der Alzheimer Krankheit, die sog. Amyloidablagerungen („Plaques“), sind fast ausschließlich im extrazellulären Raum des Gehirns sowie im zerebralen Blutgefäßsystem nachweisbar (Selkoe, 1999). Mikroskopisch unterscheidet man zwei Subklassen von Amyloidplaques, die neuritischen und die diffusen Plaques. Die neuritischen Plaques sind gekennzeichnet durch einen dichten Amyloidkern („amyloid-core“), der von degenerierten Axonen und Dendriten (Braak et al., 1996), sowie aktivierten Mikrogliazellen und Astrocyten umgeben ist (Pike et al., 1994). Diese kompakten neuritischen Amyloidplaques sind spezifisch für die Alzheimer Krankheit, während die sog. diffusen Amyloidplaques auch in Gehirnen nicht dementer, alter Menschen nachweisbar sind (Hardy and Selkoe, 2002). Diffuse Amyloidplaques sind hauptsächlich im Cerebellum nachweisbar und bedingen in der Regel keine bis wenige zelluläre Veränderung (Yamaguchi et al., 1989). Derzeit wird davon ausgegangen, dass diffuse Plaques die Vorstufe der neuritischen Plaques darstellen und somit am Beginn der Krankheit stehen (Giaccone et al., 1989; Tagliavini et al., 1988).

1.2 Aspartylproteasen – Struktur und Eigenschaften

Aspartylproteasen spielen im Rahmen der Alzheimer Krankheit vor allem im Zusammenhang mit der Entstehung der pathogenen Amyloid-Spezies eine wichtige Rolle. Deshalb werden im folgenden die wichtigsten Charakteristika dieser Proteaseklasse beschrieben.

Die Klasse der Aspartylproteasen umfasst mehr als 150 bekannte Einzelvertreter, die wie folgt in Gruppen und Familien eingeteilt werden:

Gruppe	A) Pepsin- ähnliche	B) Nodavirus- endopeptidase- ähnliche	C) Signal Peptidasen Typ II	D) Presenilin- ähnliche
Charakteristika der Gruppe	<i>Zwei Aspartylreste im aktiven Zentrum</i>	<i>Ein Aspartylrest in Verbindung mit einem Asparagylrest im aktiven Zentrum</i>	<i>Polytopische Transmembranproteine, deren katalytische Aspartylreste am Rand der Membran extrazellulär bzw. luminal orientiert sind</i>	<i>Polytopische Transmembranproteine, deren katalytische Aspartylreste innerhalb der Membran, tendenziell zytosolisch lokalisiert sind</i>
Familien*	1) Pepsin (BACE) 2) HIV-1 Retropepsin 3) Cauliflower Mosaic Virus 4) Spumapepsin 5) Copia Transposon	1) Nodavirus Endopeptidase 2) Tetravirus Endopeptidase	Signal Peptidase Typ II	1) Presenilin 2) Signalpeptid- peptidasen 3) Typ IV Prepilin Peptidase 4) Preflagellin- peptidasen

* angegeben ist jeweils der namensgebende Vertreter der Familie

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten Gruppen und Familien in der Klasse der Aspartylproteasen.

Abgebildet sind die vier größten Gruppen der Aspartylproteasen und die namensgebenden Vertreter der wichtigsten Familien. [Quelle: www.Merops.co.uk; 14.02.03]

Die größte und am besten charakterisierte Familie ist die der Pepsin-ähnlichen Proteasen (vgl. Tabelle 1 A1). Alle Vertreter dieser Familie besitzen im katalytisch aktiven Zentrum zwei hoch konservierte Aspartylmotive der Sequenz –D-T/S-G-. Für eine funktionierende Katalyse muss eine der beiden Carboxylgruppen in undissoziierter Form und die andere in ionisierter Form vorliegen. Nachfolgend ist der für die Katalyse postulierte Mechanismus beschrieben.

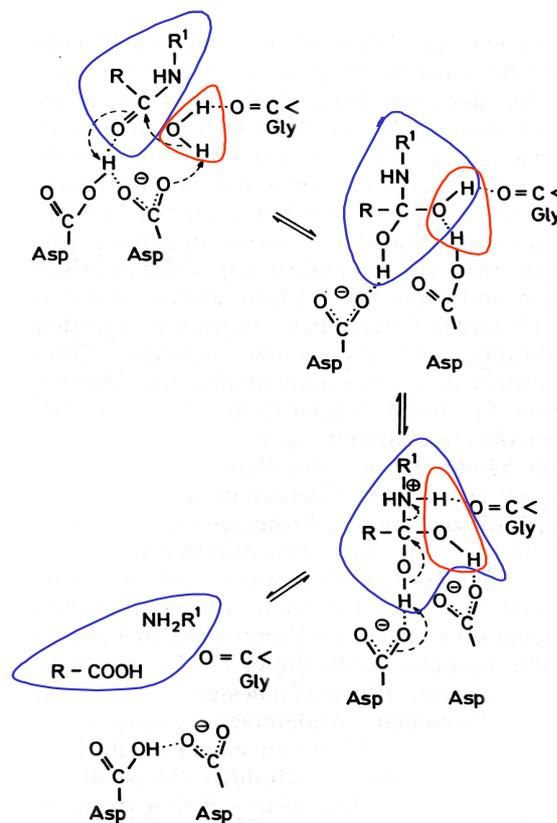


Abbildung 3: Mechanismus der Peptidspaltung durch Aspartylproteasen.

Dargestellt sind die essentiellen Strukturelemente der Aminosäuren des aktiven Zentrums einer Aspartylprotease und die katalytische Spaltung einer Peptidbindung. [Quelle: (Belitz and Grosch, 1992)]

Die beiden Aspartylreste im aktiven Zentrum der Protease aktivieren einerseits das für die Spaltung der Peptidbindung nötige Wassermolekül und agieren zum anderen als Protonenakzeptoren und -donatoren. Auf diese Weise wird die für den Ablauf der chemischen Reaktion benötigte Aktivierungsenergie herabgesetzt und der energiereiche Übergangszustand stabilisiert.

Pepsin, das Leitenzym der Familie, liegt als Monomer vor und besteht aus zwei strukturell ähnlichen Domänen, die vermutlich durch Genduplikation und anschließende Verschmelzung entstanden sind. Jede der beiden Domänen liefert einen der beiden funktionell wichtigen Aspartylreste. Dennoch können beide Domänen auch als unabhängige Einheiten fungieren (Sali et al., 1992).

Die räumliche Struktur der Domänen besteht aus einer wechselnden Abfolge von α -Helizes und β -Faltblattstrukturen, die innerhalb der Familien unterschiedlich stark konserviert ist und die endgültige Gesamtstruktur des Proteins bestimmt. N- und C-terminale Domäne verhalten sich dabei meist spiegelbildlich (Dunn, 2002).

In unmittelbarer Nachbarschaft zum aktiven Zentrum befindet sich die Deckelregion („flap-region“), eine nahezu ausschließlich aus β -Faltblattstrukturen bestehenden Domäne, die meist von Glycin-Resten umrahmt wird und somit beweglich ist. Die Deckelregion schließt nach Substratbindung und öffnet sich nach erfolgter Katalyse. Das Substrat selbst interagiert dabei häufig über Wasserstoffbrückenbindungen mit der Deckelregion. Blockade durch irreversibel bindende Inhibitoren führt deshalb in der Regel zur vollständigen Unterdrückung der Enzymaktivität (Andreeva et al., 1995; Okoniewska et al., 1999; Okoniewska et al., 2000).

Einige Aspartylproteasen, wie beispielsweise Cathepsin E, bilden im aktiven Zustand Dimere aus, die durch Disulfidbrücken kovalent verknüpft sind. In diesem speziellen Fall besteht die Möglichkeit, dass die beiden kritischen Aspartylreste aus getrennten Untereinheiten stammen (Tatnell et al., 1998).

Proteasen werden in der Regel in Form einer proteolytisch inaktiven Vorstufe, dem sog. Zymogen synthetisiert. Die Aktivierung des Enzyms erfolgt meist durch Abspaltung eines Propeptids am N-Terminus des Enzyms. Diese erfolgt entweder durch intra- oder intermolekulare Autokatalyse oder aber mittels proteolytischer Spaltung durch andere Proteasen.

Pepsinogen, die inaktive Vorstufe des Pepsins, wird beispielweise bei niedrigem pH-Wert durch intramolekular Abspaltung des Prosegments aktiviert. Das Prosegment selbst, dessen Sekundärstruktur aus einem β -Faltblatt und drei α -Helizes besteht, interagiert im Falle des Pepsinogens direkt mit dem katalytisch aktiven Zentrum und verhindert somit die Ausbildung eines Enzym-Substrat Komplexes (Koelsch et al., 1994; Sielecki et al., 1990).

Das Propeptid des Plasmeppsin II, einer Aspartylprotease aus *Plasmodium falciparum*, die im Rahmen der Malaria-Erkrankung eine wichtige Rolle spielt, interagiert hingegen mit der C-terminalen Domäne des Enzyms und bewirkt dabei eine strukturelle Veränderung des aktiven Zentrums (Bernstein et al., 1999; Francis et al., 1997).

Neben der Regulation der Enzymaktivität erfüllen Propeptide häufig wichtige Funktionen im Zusammenhang mit der korrekten Faltung des Proteins und mit dem Transport in entsprechende Zielkompartimente (Baxter et al., 1991; Harrison et al., 1989; Norman et al., 1992).

Zur Gruppe der Pepsin-ähnlichen Enzyme gehört weiterhin die Familie der HIV-1 Retropepsin ähnlichen Enzyme. Die virale Protease HIV-1 Retropepsin ist für die Replikation des menschlichen Immunschwächevirus (HIV) verantwortlich. Die HIV-1 Protease ist mit 11 kDa im Vergleich zu eukaryotischen Proteasen sehr klein und wird autokatalytisch aus einem Vorläufer Protein freigesetzt, das zusätzlich zur Protease weitere virale Proteine enthält. Strukturell ist auch die HIV-1 Protease, besonders in der Umgebung des aktiven Zentrums dem Pepsin sehr ähnlich (Lapatto et al., 1989; Mager, 2001; Seelmeier et al., 1988).

Eine völlig neuartige Form der Proteolyse wird durch die Gruppe der Presenilin ähnlichen Enzyme (vgl. Tabelle 1 D) definiert. Es handelt sich hierbei um polytopische Transmembranproteine, deren katalytisch aktives Zentrum von zwei Aspartylresten gebildet wird, von denen einer in das Aminosäuremotiv –G-x-G-D- eingebettet ist, wobei x für eine beliebige, vorzugsweise hydrophobe Aminosäure steht (Steiner et al., 2000).

Die beiden kritischen Aspartylreste befinden sich innerhalb oder am Rande zweier unabhängiger Transmembrandomänen und katalysieren die Spaltung membrangebundener Proteine innerhalb ihrer Transmembrandomäne [I-CLIPs; Intramembrane-cleaving proteases (Weihofen and Martoglio, 2003)]. Die beiden wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind die Preseniline [(Haass and Steiner, 2002) und vgl. auch 1.3.5.1.] und die Signalpeptidpeptidasen (Weihofen et al., 2002).

Fast alle Aspartylproteasen werden durch Pepstatin, ein Peptidgemisch aus verschiedenen Streptomyceten, sehr effizient gehemmt. Pepstatin fungiert dabei aufgrund einer tetraedrischen Hydroxymethylengruppe als Übergangszustandsanalogon (Bott et al., 1982; James et al., 1982; Rich et al., 1985). Eine verglichen mit den Statininhibitoren deutlich wirksamere Inhibitoroklasse wird durch die Difluorstatinverbindungen definiert, die in der Lage ist, deutlich stabilere Wasserstoffbrücken-Bindungen mit den Aspartylresten des aktiven Zentrums auszubilden (Fearon et al., 1987; Gelb et al., 1985).

Darüber hinaus sind zahlreiche weitere Protein- und Peptidinhibitoren bekannt, die bestimmte Aspartylproteasen teilweise hochspezifisch inhibieren. Die Inhibition erfolgt in diesem Fall beispielsweise durch die Ausbildung charakteristischer Sekundärstrukturen, die das aktive Zentrum räumlich blockieren, dabei jedoch selbst nicht proteolytisch gespalten werden (Fraser et al., 1992; Li et al., 2000a; Phylip et al., 2001). Durch Wechselwirkung des Inhibitors mit Domänen, die dem aktiven Zentrum benachbart sind, die aber innerhalb der Familien weniger gut konserviert sind, wird die Spezifität weiter erhöht (Ng et al., 2000). So wird die Kreuzreaktivität mit anderen homologen Proteasen reduziert.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Inhibition von Aspartylproteasen ist die Synthese substratähnlicher Inhibitoren. Es handelt sich hierbei um synthetische Verbindungen, deren Stereochemie der des Substrates entspricht und die an das aktive Zentrum des Enzyms binden (Bursavich et al., 2001).

1.3 Molekulare und genetische Grundlagen der Alzheimer Krankheit

Aspartylproteasen katalysieren die Bildung amyloidogener Peptide, die eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit spielen. Amyloidplaques bestehen überwiegend aus den Amyloid β -Peptiden, beginnend mit D597, bezogen auf β APP₆₉₅, und endend mit V636 (A β 1-40) bzw. mit A638 (A β 1-42) [(Haass and Steiner, 2002; Sisodia and St George-Hyslop, 2002) vgl. auch 1.3.2]. Daneben sind auch verschiedene N- und C-terminal verkürzte und verlängerte Formen des A β -Peptids (Glenner et al., 1984; Masters et al., 1985b; Wang et al., 1996) sowie andere Proteinkomponenten, wie z.B. die Apolipoproteine E und J, α 1-Antichymotrypsin, und Proteoglykane in Plaques nachweisbar [Zur Übersicht: (Dickson, 1997)].

Obwohl sich die Länge der beiden Hauptkomponenten der Amyloidplaques nur um zwei Aminosäuren (AS) unterscheidet, sind die chemischen Eigenschaften der beiden Peptide grundlegend verschieden. Die Hydrophobizität des A β 1-42 ist durch die beiden zusätzlichen AS Ile und Ala stark erhöht und A β 1-42 zeigt *in vitro* eine deutlich höhere Aggregationsbereitschaft als A β 1-40 (Selkoe, 1999).

Zudem ist das in senilen Plaques konzentrierte A β 1-42 widerstandsfähiger gegen abbauende Enzyme als die übrigen A β -Spezies (Glabe, 2001).

Autosomal-dominant vererbte Formen der Alzheimer Krankheit (FAD) sind durch einen Krankheitsausbruch im mittleren (40 - 50 Jahre) oder frühen (20 - 30 Jahre) Lebensalter gekennzeichnet (Selkoe, 1999), können aber histopathologisch nicht von den sporadisch auftretenden Fällen der Alzheimer Krankheit unterschieden werden (Selkoe, 2001). Auffällig ist, dass alle bisher bekannten Mutationen in den Genen für das β -Amyloid Vorläufer Protein (β APP), Presenilin 1 (PS1) und Presenilin 2 (PS2) (<http://molgen-www.uia.ac.be/ADMutations>), die als Ursache für FAD angesehen werden, entweder zu einer Erhöhung der A β -Sekernierung insgesamt oder aber meist spezifisch zu einer verstärkten Sekretion des A β 1-42 führen (Haass and Steiner, 2002). Ein weiteres Indiz für die Schlüsselrolle des A β 1-42 Peptids bei der Bildung der Amyloidplaques.

Derzeit wird davon ausgegangen, dass weder monomere Formen des A β -Peptids, noch unlösliche fibrilläre Aggregate die eigentliche Zytotoxizität bedingen, sondern vielmehr lösliche oligomere Formen, für die Fehlfunktion der Synapsen und die Neurotoxizität verantwortlich sind (Walsh et al., 2002).

Der für die Neuronen toxische Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Zahlreiche experimentelle Befunde unterstützen jedoch die sog. Amyloidhypothese, wonach die extrazelluläre Aggregation der A β -Peptide am Anfang einer Kaskade steht, die letztlich zum Tod der Neurone führt (Hardy and Selkoe, 2002).

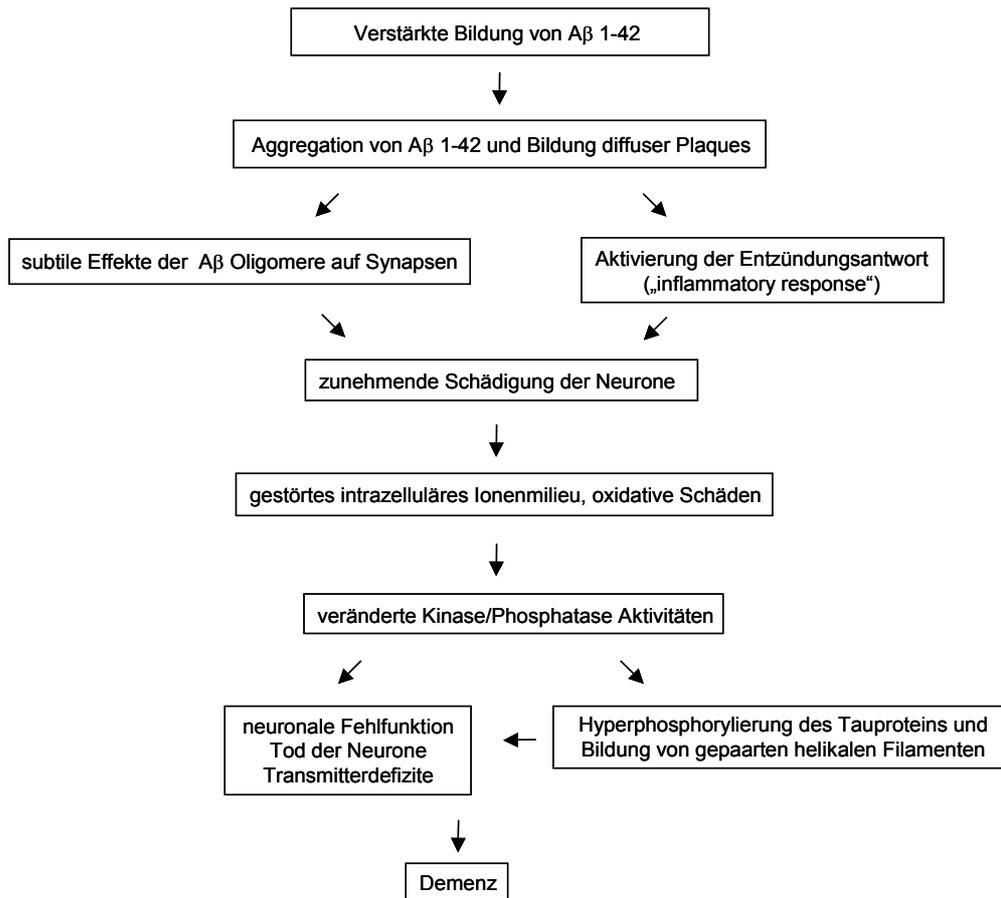


Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung der Amyloidkaskade.

[Quelle: (Hardy and Selkoe, 2002)]

Die Aggregation der Aβ-Peptide, führt direkt bzw. indirekt zu einer zunehmenden Schädigung der Neurone und bedingt eine Änderung des intrazellulären Milieus. Die dabei veränderten Kinase- und Phosphataseaktivitäten führen unter anderem zur Entstehung von gepaarten helikalen Tau Filamenten und somit zu Funktionsverlust und Tod von Neuronen, die als unmittelbare Ursache für die Demenz angesehen werden (Hardy and Selkoe, 2002; Selkoe, 2001; Sisodia and St George-Hyslop, 2002).

1.3.1 Das β -Amyloid Vorläufer Protein – Struktur und Eigenschaften

$A\beta$ entsteht durch die proteolytische Prozessierung des β -Amyloid Vorläufer Proteins (Haass, 2002).

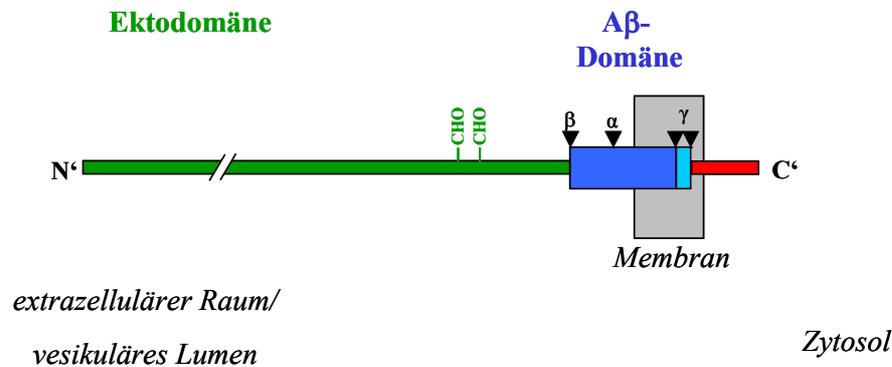


Abbildung 5: Schematische Darstellung des β -Amyloid Vorläufer Proteins.

Die zelluläre Membran wird durch einen grauen Kasten symbolisiert. Die Ektodomäne des Proteins ist grün, die intrazelluläre Domäne (β APP intracellular domain; AICD) rot und die A β -Domäne vergrößert in blau dargestellt. Die ungefähren Schnittstellen der jeweiligen Sekretasen und die Glykosylierungsstellen sind gekennzeichnet.

β APP ist ein glykosyliertes Typ I Transmembranprotein und ähnelt in seinem strukturellen Aufbau einem Zelloberflächenrezeptor. Es besitzt eine große N-terminale Ektodomäne, eine Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne. Am N-Terminus des Proteins befindet sich eine 17 AS lange Signalsequenz, die für die Translation des Proteins am endoplasmatischen Retikulum (ER) verantwortlich ist (Kang et al., 1987).

β APP wird in nahezu allen Zelltypen und Geweben exprimiert (Selkoe et al., 1988). Es werden hauptsächlich drei verschiedene Isoformen des Proteins, die aus 695, 751 oder 770 AS bestehen und durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen, gebildet (Sandbrink et al., 1994; Selkoe, 1994). β APP₆₉₅ wird nahezu ausschließlich in neuronalen Zellen exprimiert, während β APP₇₅₁ die häufigste Isoform in nicht neuronalem Gewebe ist (Wertkin et al., 1993). Neben β APP sind zwei weitere homologe Proteine APLP (Amyloid Precursor like Protein)-1 und APLP-2 bekannt (Sprecher et al., 1993; Wasco et al., 1992; Wasco et al., 1993). Obwohl die Gene der APP-Familie in der Evolution hoch konserviert sind, ist die genaue Funktion dieser Proteinfamilie nicht bekannt.

Es werden Funktionen im Zusammenhang mit Zelladhäsion, Blutgerinnung, Neuritenwachstum (Milward et al., 1992; Saitoh et al., 1989), und Signaltransduktion (Nishimoto et al., 1993) diskutiert. Darüber hinaus gibt es Anhaltspunkte, dass β APP sowohl als Rezeptor für Kinesin-1 fungiert und somit am vesikulären Transport beteiligt ist (Kamal et al., 2001), als auch vergleichbar dem Notchrezeptor (vgl. 1.3.5.3) in die Transkriptionsregulation eingebunden ist (Cao and Südhof, 2001). β APP/APLP-2 oder APLP-1/APLP-2 doppel „knockout“ Mäuse sind pränatal letal, wohingegen Mäuse, die nur bezüglich eines der beiden Gene defizient sind, keine auffälligen Phänotypen zeigen (Müller et al., 1998).

β APP wird nach seiner Synthese am ER durch den sekretorischen Transportweg zur Zelloberfläche transportiert und dabei durch N'- und O'-Glykosylierung, Sulfatierung und Phosphorylierung modifiziert (Selkoe, 1999; Weidemann et al., 1989).

An der Zelloberfläche durchläuft das gereifte β APP ein endosomales Recycling, d.h. es wird in endozytotische Vesikel aufgenommen und gelangt im Folgenden wieder an die Plasmamembran zurück (Koo and Squazzo, 1994; Koo et al., 1996).

1.3.2 Proteolytische Prozessierung des β -Amyloid Vorläufer Proteins

β APP kann auf seinem Weg durch den sekretorischen Prozessierungsweg von verschiedenen Proteasen, den α -, β - und γ -Sekretasen proteolytisch gespalten werden (Haass and Steiner, 2002).

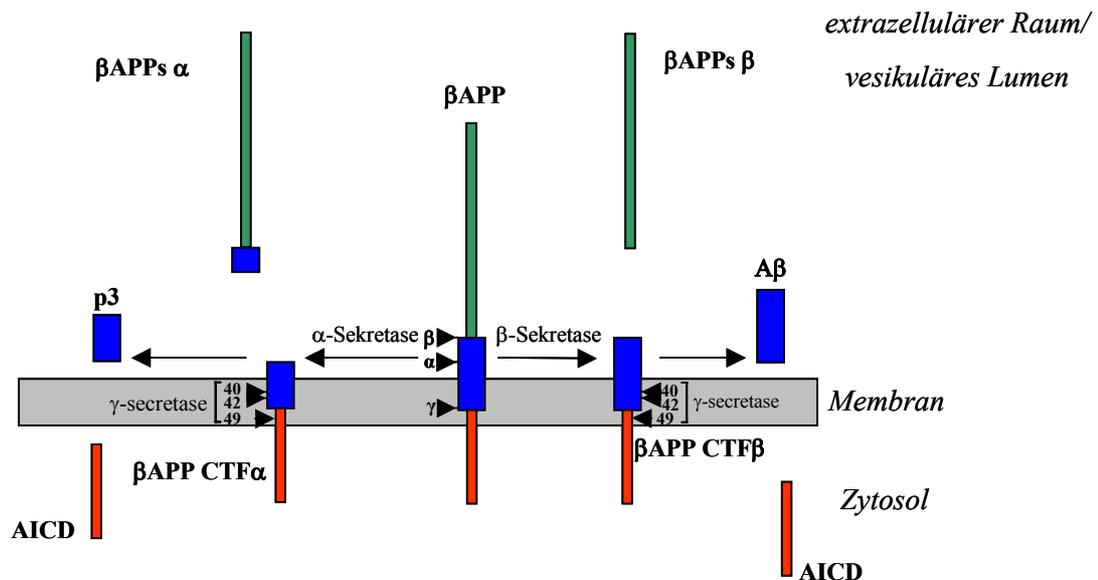


Abbildung 6: Proteolytische Prozessierung von β APP durch α -, β - und γ -Sekretase.

Dargestellt ist die β APP-Ektodomäne (grün), die intrazelluläre Domäne (rot) und die A β -Domäne (vergrößert, blau), sowie die nach der Prozessierung durch die gekennzeichneten Sekretasen entstehenden Produkte. [Modifiziert nach (Haass and Selkoe, 1993)]

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

Wird β APP hingegen zuerst durch die β -Sekretase und anschließend durch die γ -Sekretase geschnitten, so entstehen aus dem zunächst generierten C-terminalen Rest (β APP CTF β), anstelle von p3, vorzugsweise die Amyloid β -Peptide A β 1-40/42 (Haass and Steiner, 2002).

Die A β -Entstehung allein ist jedoch noch kein pathologischer Vorgang. Auch bei gesunden Menschen jeden Lebensalters ist A β in der zerebrospinalen Flüssigkeit und im Plasma nachweisbar. Die konstitutive Sekretion von A β ist Teil des normalen β APP Metabolismus (Haass et al., 1992b; Seubert et al., 1993; Shoji et al., 1992).

Interessanterweise liegen alle bisher bekannten FAD Mutationen im β APP Gen in der Nähe der Schnittstellen der α -, β - oder γ -Sekretase.

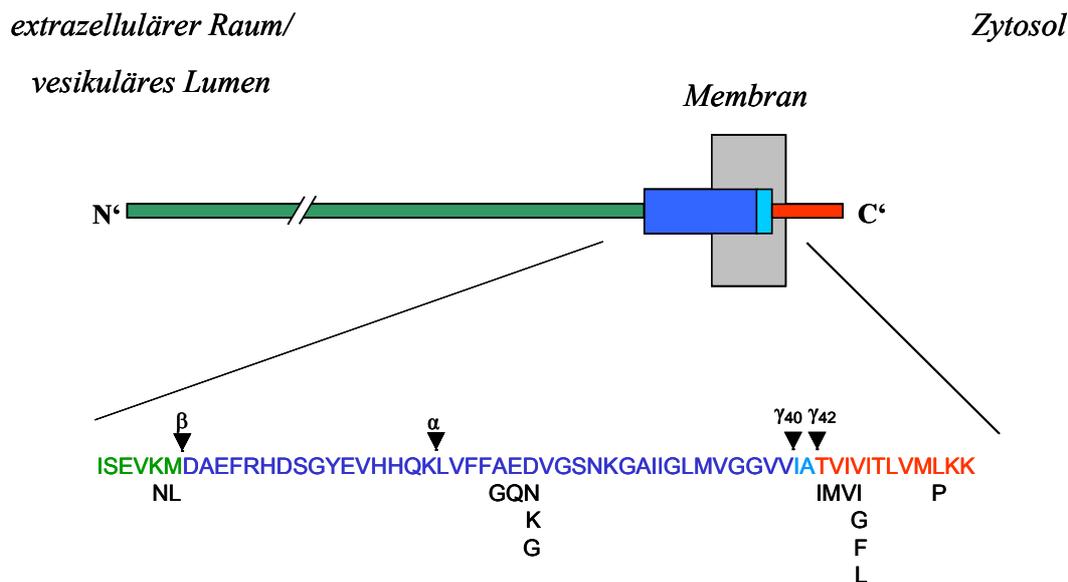


Abbildung 7: Übersicht über die FAD-Mutationen im β APP Gen.

β APP ist schematisch dargestellt: Zelluläre Membran (grau), Ektodomäne (grün), intrazelluläre Domäne (rot) und die A β -Domäne vergrößert in blau. Die Aminosäuresequenz des relevanten Bereichs ist im Einbuchstabencode angegeben, wobei die Farben den entsprechenden Bereich des β APP kennzeichnen. Die schwarzen Buchstaben unterhalb der Sequenz stellen die wichtigsten Aminosäuresubstitutionen dar, die infolge von FAD Mutationen entstehen.

Die angegebenen Mutationen bedingen entweder eine Erhöhung der Gesamtseznernierung an A β -Peptiden oder erhöhen spezifisch die Produktion des A β 1-42 (Selkoe, 1996). Besonders erwähnt seien in diesem Zusammenhang die sog. schwedische Doppelmutation K595N/M596L [bezogen auf APP₆₉₅; (Mullan et al., 1992)], die in einer schwedischen Familie mit FAD nachgewiesen wurde (β APP_{sw}) und die beiden Mutationen A617G (Hendriks et al., 1992) und E618Q (Levy et al., 1990) in der Nähe der α -Sekretase Schnittstelle.

Die schwedische Mutation (β APP^{sw}) in β APP erhöht die Affinität der β -Sekretase zu ihrem Substrat und es entsteht vermehrt A β (Cai et al., 1993; Citron et al., 1992; Vassar et al., 1999). Patienten, deren β APP Gen im Bereich der α -Sekretase Schnittstelle mutiert ist, zeigen ebenfalls eine erhöhte Gesamtsekretion an A β -Peptiden, da die Affinität der α -Sekretase zu derartig mutiertem β APP vermindert ist (Vassar, 2002).

1.3.3 Die α -Sekretase

α -Sekretasen besitzen die Eigenschaft, β APP innerhalb der A β -Domäne zwischen den AS-Resten Lys16 und Leu17 zu spalten und verhindern so die Bildung der A β -Peptide (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1990) Die proteolytische Aktivität der α -Sekretasen ist in der Regel konstitutiv, wird aber unter anderem in Gegenwart von Phorbolestern (PDBu, TPA), direkten Aktivatoren der Proteinkinase C (PKC), erhöht (Felsenstein et al., 1994; Hung et al., 1993; Jacobsen et al., 1994). Darüber hinaus kann die Prozessierung des β APP durch die α -Sekretase auch durch die Stimulation von Rezeptoren, die ihrerseits PKC aktivierten (z.B. muskarinerge Rezeptoren), gesteigert werden (Esler and Wolfe, 2001). Eine verstärkte α -Sekretase Prozessierung des β APP erfolgt zu Lasten des β -Sekretase Prozessierungsweges und führt deshalb zu einer verminderten A β Produktion (Buxbaum et al., 1993; Hung et al., 1993).

α -Sekretasen katalysieren die Spaltung ihrer Substrate scheinbar unabhängig von einer bestimmten AS-Konsensussequenz, sie spalten vielmehr 12-13 AS-Reste von der Membran entfernt. Eine weitere Voraussetzung für die Spaltung eines Substrates durch α -Sekretasen ist eine α -helikale Konformation des Substrates im Bereich der Spaltstelle (Sisodia, 1992).

Bisher identifizierte Enzyme, die die charakteristischen Eigenschaften einer α -Sekretase aufweisen, sind Vertreter der sog. ADAM (a disintegrin and metalloprotease)-Familie. Es handelt sich hierbei um Metalloproteasen, in deren aktivem Zentrum sich ein Zink-Ion befindet und die unter anderem durch Hydroxamatpeptide inhibiert werden können (Seals and Courtneidge, 2003). Zwei Enzyme der ADAM-Familie, für die eine α -Sekretase Aktivität bezüglich β APP nachgewiesen werden konnte, sind ADAM10 (Lammich et al., 1999) und ADAM17 (auch TACE – tumor necrosis factor- α -converting enzyme) (Buxbaum et al., 1998).

Weiterhin wird für ADAM 9 eine geringe α -Sekretase Aktivität diskutiert, die sich jedoch bisher im „knockout“ Mausmodell nicht bestätigen ließ (Koike et al., 1999; Weskamp et al., 2002). Vermutlich verhalten sich die verschiedenen ADAM-Proteasen bezüglich der β APP-Prozessierung redundant.

Aufgrund der relativ geringen Spezifität bezüglich ihres Substrates, katalysieren ADAM10 und ADAM17 auch die Ektodomänenspaltung anderer Typ I Transmembranproteine, wie z.B. $\text{TNF}\alpha$, Notch 1-4, p75 $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptor, L-selectin usw. (Seals and Courtneidge, 2003).

Mäuse, die defizient im Bezug auf ADAM10 sind, sterben pränatal aufgrund gestörter Notch-Signaltransduktion [(Hartmann et al., 2002) und vgl. auch 1.3.5.3.]. ADAM17/TACE “knockout” Mäuse sterben zwischen Tag 17,5 des embryonal Stadiums und Tag 17 nach der Geburt, ebenfalls aufgrund gestörter Signalkaskaden (Peschon et al., 1998).

1.3.4 Die β -Sekretase

1.3.4.1 Eigenschaften der β -Sekretase

Bereits vor der endgültigen Klonierung der β -Sekretase waren die enzymatischen Eigenschaften anhand der Proteolyseprodukte des β APP gut untersucht. β -Sekretase ist in nahezu allen Zell- und Gewebetypen aktiv (Haass et al., 1992b). Die höchste Aktivität ist jedoch in neuronalen Zellen und Geweben nachweisbar (Haass et al., 1992b; Seubert et al., 1993). Im Zellkulturmodell sind die β -Sekretase Spaltprodukte des β APP nur nachweisbar, wenn das Substrat in membrangebundener Form vorliegt. Wird die Transmembrandomäne von β APP entfernt, so findet keine Prozessierung des Substrates statt (Citron et al., 1995). Die proteolytische Aktivität der β -Sekretase erreicht in den sauren Kompartimenten der Zelle, wie z.B. Golgi-Apparat und Endosomen, ihr Maximum (Haass et al., 1995a; Koo and Squazzo, 1994). Im Gegensatz zur α -Sekretase ist die β -Sekretase durch eine ausgeprägte Sequenzspezifität gekennzeichnet (Citron et al., 1995). Die Substitution des Met-Restes an Position -1 der A β -Domäne durch eine AS mit großem hydrophobem Rest, wie z.B. Leu in der schwedischen Mutante (vgl. 1.3.2), erhöht die Affinität der β -Sekretase zu ihrem Substrat. Umgekehrt bedingt die Einführung kleiner hydrophober Reste, wie z.B. Val, eine Verringerung der Affinität bzw. eine Inhibition der Spaltung (Citron et al., 1995).

Neben A β -Spezies beginnend mit Asp1 wird auch die Entstehung einer weiteren dominanten A β -Spezies, A β 11-40/42 durch die β -Sekretase katalysiert (Gouras et al., 1998; Haass et al., 1992b).

1.3.4.2 BACE-1

Die Aspartylprotease BACE-1 (β -site APP cleaving enzyme; auch Asp-2 oder Memapsin-2) besitzt alle Eigenschaften der β -Sekretase (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). BACE-1 „knockout“ Mäuse, zeigen in Gegenwart von humanem β APP keine nachweisbare Synthese von A β in Neuronen (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001). Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass BACE-1 wahrscheinlich die einzige β -Sekretase in Neuronen ist (Vassar, 2002).

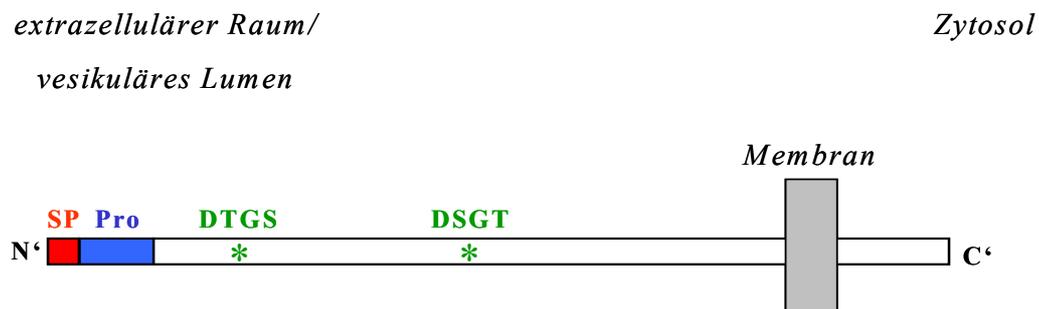


Abbildung 8: Schema der BACE-1 Protease.

Dargestellt ist eine Schemazeichnung der BACE-1 Protease. Die zelluläre Membran wird durch einen grauen Kasten symbolisiert. Gekennzeichnet sind das Signalpeptid (rot), die Prodomäne (blau) und die beiden kritischen Aspartylmotive (grüner Stern).

BACE-1 weist in seiner Ektodomäne zwei für das aktive Zentrum einer Aspartylprotease charakteristische AS-Motive auf (vgl. 1.2): DTGS (AS 93-96) und DSGT (AS 289 – 292) (Hussain et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Die Mutation eines dieser beiden in der Evolution hoch konservierten Motive unterbindet die Proteaseaktivität vollständig (Bennett et al., 2000b; Hussain et al., 1999).

Im Gegensatz zu den bisher bekannten Aspartylproteasen (vgl. 1.2) wird BACE-1 jedoch über eine Transmembrandomäne (AS 455-480), im Membransystem der Zelle verankert (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Am N-Terminus des Proteins befindet sich ein Signalpeptid (AS 1-21), das für die cotranslationale Membraninsertion verantwortlich ist, sowie ein Propeptid (AS 22-45), das während der Maturierung des Proteins durch Furin oder eine furin-ähnliche Protease abgespalten wird (Bennett et al., 2000b; Capell et al., 2000; Creemers et al., 2001). Desweiteren finden sich in der Ektodomäne vier N-Glykosylierungsstellen sowie sechs Cystein-Reste, die drei intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden (Capell et al., 2000; Charlwood et al., 2001; Fischer et al., 2002; Haniu et al., 2000). Das Disulfidbrücken-Muster von BACE-1 und BACE-2 weicht stark von dem für Aspartylproteasen typischen Muster ab (Dunn, 2002).

1.3.4.3 BACE-2

Neben BACE-1 ist eine zweite membrangebundene Aspartylprotease, BACE-2, bekannt (Lin et al., 2000; Saunders et al., 1999; Solans et al., 2000; Yan et al., 1999). Die AS-Sequenzen von BACE-1 und BACE-2 sind zu ca. 64 % homolog und die unter 1.3.4.2. beschriebenen strukturellen Eigenschaften sind identisch (Vassar, 2002).

Aufgrund der Verankerung der beiden Enzyme im Membransystem der Zelle und der relativ geringen Homologie zu anderen bekannten Aspartylproteasen, wie Renin oder Pepsin, definieren BACE-1 und BACE-2 eine neue Unterfamilie der Pepsin-Familie, die nicht durch Pepstatin, den gängigen Inhibitor für Aspartylproteasen gehemmt wird (Citron et al., 1996).

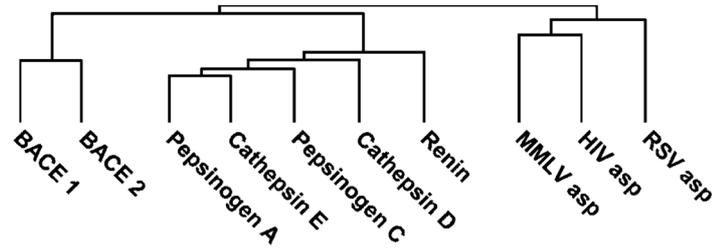


Abbildung 9: Stammbaum der Gruppe der Pepsin-ähnlichen Proteasen.

Veranschaulicht ist der Grad der Homologie von BACE-1 und BACE-2 zu den anderen Familien dieser Gruppe (vgl. 1.2). Die größte Homologie besteht zur Pepsin-Familie, während nur eine geringe Homologie zur Retropepsin-Familie besteht. [Quelle: (Citron, 2002)].

BACE-2 wird im Gegensatz zu BACE-1 verstärkt in peripherem Gewebe exprimiert und weniger stark in neuronalen Geweben (Bennett et al., 2000a; Vassar et al., 1999). Dennoch gibt die ausgeprägte Homologie zwischen den beiden Enzymen Grund zu der Annahme, dass auch BACE-2 die charakteristischen Eigenschaften einer β -Sekretase aufweisen könnte. Unterstrichen wird diese Vermutung dadurch, dass das BACE-2 Gen wie auch das Gen für β APP, in einer bei Down Syndrom Patienten verdreifachten Region des Chromosom 21 lokalisiert ist (Saunders et al., 1999). Down Syndrom Patienten zeigen aufgrund der höheren β APP Expression und evtl. auch verstärkter BACE-2 Expression bereits sehr früh klassische Symptome der Alzheimer Krankheit (Acquati et al., 2000; Odetti et al., 1998; Schupf et al., 2001). Folglich könnte auch BACE-2 unmittelbar zur A β -Bildung beitragen.

1.3.5 Die γ -Sekretase

Die γ -Sekretase prozessiert die proteolytische Spaltung der durch die α - und β -Sekretase entstehenden β APP CTF (vgl. 1.3.2). Auffällig dabei ist, dass die Spaltung nicht wie für Proteasen üblich, in wässriger Umgebung erfolgt, sondern innerhalb der Transmembrandomäne des Substrats (Wolfe et al., 1999a). Für die Position des γ -Sekretaseschnittes sind dabei offenbar Länge und Struktur der Transmembrandomäne entscheidender als die genaue Aminosäuresequenz (Esler and Wolfe, 2001; Lichtenthaler et al., 2002). Wie die β -Sekretase ist auch die γ -Sekretase eine Aspartylprotease (Wolfe et al., 1999a). Durch γ -Sekretase Spaltung der β APP CTF entstehen A β - bzw. p3-Spezies, sowie ein lösliches zytosolisches Fragment des β APP [AICD; (Sastre et al., 2001)]. AICD (β APP intracellular domain) wird in Analogie zu NICD (Notch intracellular domain; vgl. 1.3.5.3) im Zusammenhang mit der Transkription bisher unbekannter Zielgene diskutiert (Cao and Südhof, 2001).

1.3.5.1 Struktur und Charakteristika der Preseniline

Die Preseniline (PS)-1 und PS-2 wurden mit der Alzheimer Krankheit bzw. der γ -Sekretase Aktivität in Verbindung gebracht, da zum einen zahlreiche FAD-Mutationen innerhalb der PS-Gene bekannt sind, die die Bildung des A β 1-42 Peptids stimulieren (Haass and Steiner, 2002), und zum anderen ist in murinen PS1 und PS2 doppel „knockout“ Zellen keine A β -Produktion nachweisbar (De Strooper et al., 1998; Herreman et al., 2000; Naruse et al., 1998; Zhang et al., 2000).

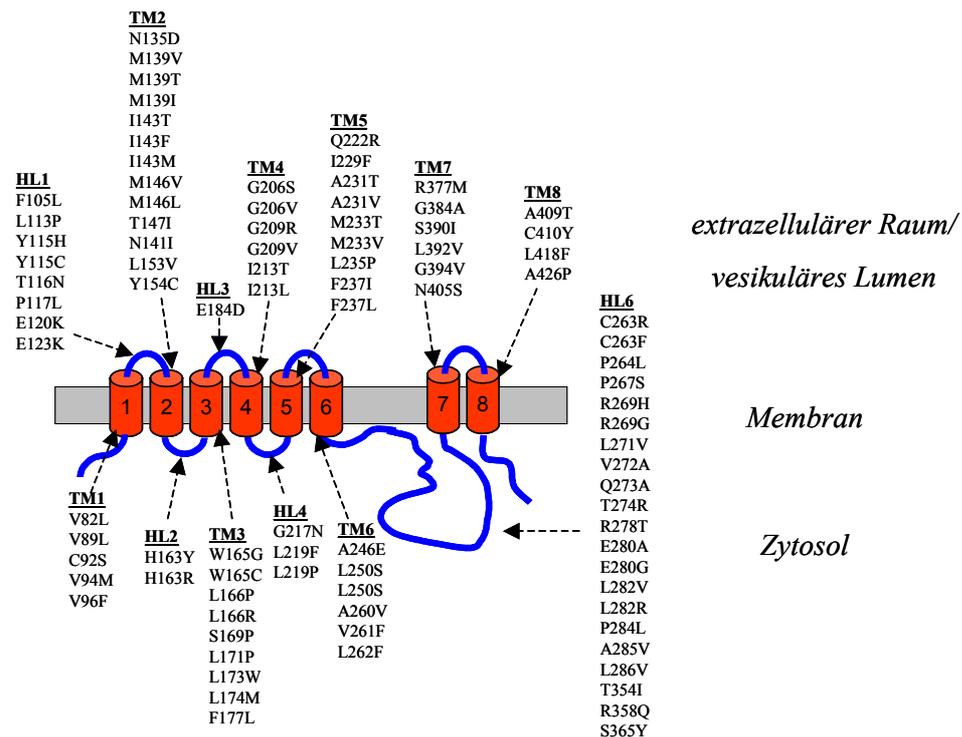


Abbildung 10: Struktur des PS1-Proteins und Lokalisation der FAD-Mutationen innerhalb des PS1-Proteins.

Die Abbildung veranschaulicht die Struktur der Preseniline. Gezeigt ist das gängigste Topologiemodell, wonach die Preseniline 8 Transmembrandomänen haben. Die Pfeile kennzeichnen die Bereiche der FAD Mutationen. Einige der FAD assoziierten Mutationen sind angegeben.

TM: Transmembrandomäne; HL: Hydrophiler Loop. (Quelle: [http://molgen-www.uia.ac.be/ ADMutations](http://molgen-www.uia.ac.be/ADMutations))

PS1 und PS2 sind homologe, polytope Transmembranproteine (Levy-Lahad et al., 1995; Sherrington et al., 1995), die nach der Translation des Holoproteins innerhalb der zytoplasmatischen Domäne zwischen Transmembrandomäne 6 (TM6) und TM7 endoproteolytisch gespalten werden. Die daraus resultierenden N- und C-terminalen Fragmente [NTF/ CTF; (Thinakaran et al., 1996)] assoziieren zu einem Heterodimer und stellen die in der Zelle stabilisierte aktive Form der Preseniline dar (Ratovitski et al., 1997; Thinakaran et al., 1997).

Das für die Endoproteolyse verantwortliche Enzym ist bisher unbekannt. Auffällig ist jedoch, dass die Mutagenese der beiden hoch konservierten Aspartylreste in TM 6 und TM7 nicht nur zu einer stark reduzierten A β Bildung und der Akkumulation der γ -Sekretasesubstrate β APP CTF führt, sondern auch die Endoproteolyse der Preseniline verhindert (Kimberly et al., 2000; Steiner et al., 1999a; Wolfe et al., 1999b). Der Aspartylrest in TM7 liegt innerhalb eines im Laufe der Evolution hoch konservierten

Motivs [GxGD; (Haass and Steiner, 2002)], das für eine klassische Aspartylprotease zwar untypisch ist, aber in andern polytopen Aspartylproteasen, wie z.B. den Typ 4 Prepilin Peptidasen (TFPPs) in Prokaryonten (LaPointe and Taylor, 2000) oder den Signalpeptid Peptidasen (SPPs) in höheren Lebewesen (Ponting et al., 2002; Weihofen et al., 2002), hoch konserviert ist. Zusätzlich markieren alle bisher bekannten γ -Sekretase spezifischen Inhibitoren unmittelbar die PS-Heterodimere (Esler et al., 2000; Li et al., 2000b; Seiffert et al., 2000).

Trotz dieser starken Hinweise auf eine proteolytische Eigenschaft der Preseniline, galt eine direkte Verbindung der Preseniline mit der γ -Sekretase bis vor kurzem als strittig, da eine Überexpression der Presenilin-Proteine im Zellkulturmodell kaum eine erhöhte A β -Sekernierung bewirkt (Thinakaran et al., 1997). Gleichzeitig führt eine Überexpression der PS kaum zu einer Erhöhung der entsprechenden NTF und CTF, sondern in erster Linie zu einer Akkumulation des Holoproteins und gleichzeitig zu einer Verdrängung der endogenen Presenilin Proteine, einem Phänomen, das als „Replacement“ bezeichnet wird (Capell et al., 1997; Thinakaran et al., 1997).

1.3.5.2 Der γ -Sekretase-Komplex

Das „Replacement-Phänomen“, sowie die Regulation der PS NTF und PS CTF können durch die Einbettung der PS Heterodimere in hochmolekulare Proteinkomplexe erklärt werden (Capell et al., 1998; Yu et al., 1998).

Die weiteren Komponenten dieser Proteinkomplexe sind Nicastrin (Edbauer et al., 2002; Kopan and Goate, 2002; Lai, 2002; Yu et al., 2000), PEN-2 [presenilin enhancer protein 2; (Francis et al., 2002; Luo et al., 2003; Steiner et al., 2002)] und APH-1 [anterior pharynx defective 1; (Francis et al., 2002; Goutte et al., 2002; Lee et al., 2002c; Luo et al., 2003)].

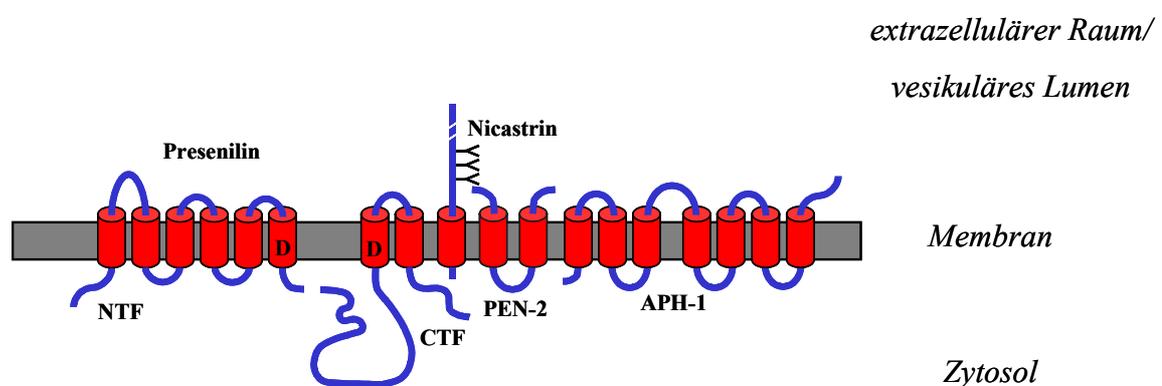


Abbildung 11: Schematische Darstellung des γ -Sekretase-Komplexes.

Gezeigt sind die Modellzeichnungen der einzelnen Proteine des γ -Sekretase Komplexes und ihre Orientierung in der zellulären Membran (grauer Kasten). [Modifiziert nach (Haass and Steiner, 2002)].

Nicastrin ist ein glykosyliertes Typ I Transmembranprotein (Yu et al., 2000), während es sich bei den übrigen Proteinen um polytopische Transmembranproteine handelt (Cruts et al., 1995; Francis et al., 2002; Rogaev et al., 1995). Die einzelnen Komplexkomponenten beeinflussen sich gegenseitig in ihrer zellulären Expression. So führt beispielsweise eine reduzierte Nicastrin Expression zu einer verminderten Proteinmenge an PEN-2 (Steiner et al., 2002). Außerdem beeinflusst die PS1-Expression das Maturierungsverhalten des Nicastrin-Proteins (Edbauer et al., 2002; Leem et al., 2002). Für die γ -Sekretase Aktivität sind alle vier Komponenten notwendig (Francis et al., 2002) und auch gleichzeitig ausreichend (Edbauer et al., 2003; Kimberly et al., 2003). Folglich sind mit den vier beschriebenen Komponenten aller Wahrscheinlichkeit nach die

Bestandteile des γ -Sekretase Komplexes bekannt und die Preseniline bilden das proteolytische Zentrum der γ -Sekretase.

1.3.5.3 Einfluss der γ -Sekretase auf die Notch-Signaltransduktion

Neben der Spaltung des β APP CTF katalysiert die γ -Sekretase auch die Spaltung weiterer Substrate innerhalb der Membran, wie z.B. APLP1 (Naruse et al., 1998), Notch 1-4 Rezeptor (Mizutani et al., 2001; Okochi et al., 2002; Saxena et al., 2001), ErbB-4 (Lee et al., 2002b; Ni et al., 2001), E-cadherin (Marambaud et al., 2002) und CD44 (Lammich et al., 2002) und viele mehr. Generell muss davon ausgegangen werden, dass alle Typ I Transmembranproteine, deren extrazelluläre Domäne eine bestimmte Länge nicht überschreitet, Substrate für die γ -Sekretase sind (Struhl and Adachi, 2000).

Besonders erwähnt sei in diesem Zusammenhang die Prozessierung der Notch-Rezeptoren. Der Notch Signaltransduktionsweg ist im Laufe der Evolution hoch konserviert geblieben und spielt v.a. in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung (Mumm and Kopan, 2000). Aber auch im erwachsenen Menschen erfüllt die Notch Signaltransduktion noch wichtige Funktionen, u.a. bei der Differenzierung der T-Lymphozyten (Hadland et al., 2001).

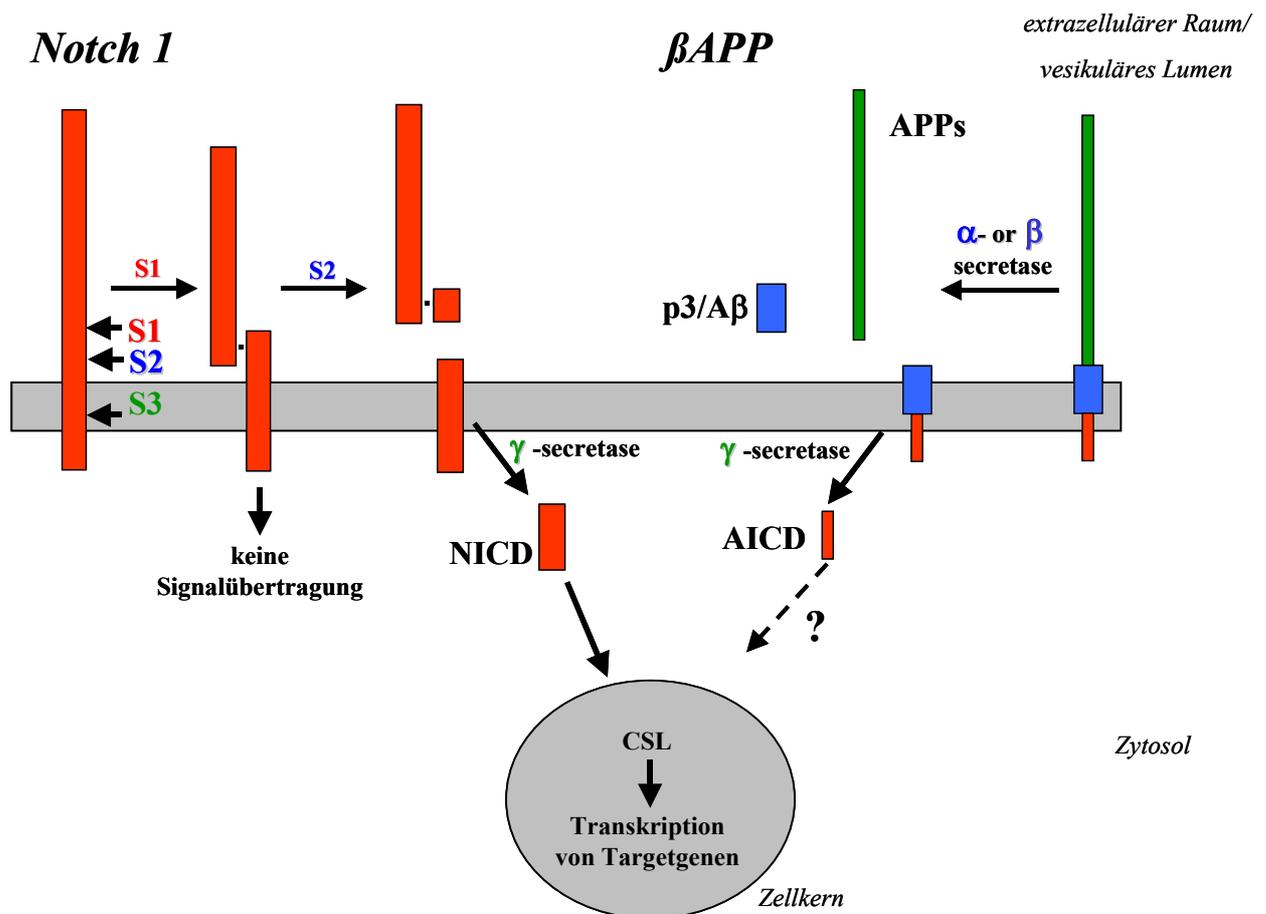


Abbildung 12: Prozessierung des Notch 1 Rezeptors im Vergleich zur Prozessierung des betaAPP.

Dargestellt ist die Prozessierung des Notch 1 Rezeptors (großer roter Kasten) durch S1-, S2- und S3-Proteasen im Vergleich zur Prozessierung des betaAPP (Ektodomäne (grün), Aβ-Domäne (blau), intrazelluläre Domäne (rot)). Notch 1 wird nach Abspaltung der Ektodomäne innerhalb der Membran PS1 abhängig gespalten. Dabei wird eine intrazelluläre Domäne (NICD) freigesetzt, die in den Zellkern gelangt und dort die Transkription bestimmter Zielgene reguliert. Analog dazu erfolgt auch die Freisetzung der intrazellulären Domäne des betaAPP (AICD), deren Funktion bisher weitgehend ungeklärt ist. [Modifiziert nach: (Walter et al., 2001b)].

Der Notch 1 Rezeptor selbst ist ein Typ I Transmembranprotein und wird nach der Translation am ER über den sekretorischen Prozessierungsweg an die Zelloberfläche transportiert. Im *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) erfolgt eine proteolytische Spaltung des Rezeptors durch eine Furin-ähnliche Protease. Die beiden Spaltprodukte bleiben anschließend zu einem Heterodimer assoziiert. An der Zelloberfläche fungiert das Notch Heterodimer als Rezeptor für Liganden wie Delta und Serrate (Mumm and Kopan, 2000). Nach der Bindung eines Notch Liganden wird die Ektodomäne des Notch-Moleküls durch Metalloproteasen, wie z.B. ADAM17/TACE oder ADAM10 abgespalten (Fortini, 2002).

Das nach diesem sog. S2 Schnitt in der Membran verbleibende Fragment wird γ -Sekretase abhängig weiter prozessiert, wobei schließlich die intrazelluläre Domäne (NICD = Notch intracellular domain) freigesetzt und in den Nukleus transportiert wird, um dort über Bindung an Transkriptionsfaktoren der CLS Familie die Transkription von bestimmten Zielgenen zu steuern (Mumm and Kopan, 2000).

1.4 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Nach dem bisherigen Stand der Erkenntnis ist die Inhibition der β -Sekretase ein vielversprechender Ansatz für die Therapie der Alzheimer Krankheit, da sowohl die Stimulation der α -Sekretase als auch die Inhibition der γ -Sekretase insbesondere durch die gleichzeitige Beeinflussung des Notch Signalübertragungsweges zu Nebenwirkungen führen würden [(Haass, 2002) und vgl. 1.3.5.3]. Zudem wird davon ausgegangen, dass γ -Sekretase Inhibitoren auch mit anderen Vertretern dieser neuartigen Protease-Familie, wie beispielsweise den Signalpeptidpeptidasen (SPPs), kreuzreagieren (Weihofen et al., 2003). BACE-1 „knockout“ Mäuse zeigen hingegen keinen auffälligen Phänotyp, so dass anzunehmen ist, dass die Inhibition der Protease keine drastischen Nebenwirkungen mit sich bringt (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001).

Um wirksame Inhibitoren für BACE-1 entwickeln zu können, gilt es die Eigenschaften dieser neuartigen Protease genauer zu verstehen.

Da zu BACE-1 eine weitere homologe Protease, BACE-2, bekannt ist (vgl. 1.3.4.3), ist es wahrscheinlich, dass wirksame Inhibitoren mit beiden Enzymen Wechselwirken. Für BACE-2 ist bisher im Gegensatz zu BACE-1 kein „knockout“ Mausmodell bekannt, das Vorhersagen über die Auswirkungen einer Inhibition zulässt.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb erstens, die beiden Proteasen hinsichtlich ihrer posttranslationalen Modifikationen, insbesondere Glykosylierung, Phosphorylierung und Sulfatierung, sowie ihrer subzellulären Lokalisation bzw. des Transportes innerhalb der Zelle zu analysieren und zu vergleichen. Eventuelle Unterschiede könnten Ansatzpunkte für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren sein, die beispielsweise den Transport von BACE-1 in Kompartimente hoher amyloidogener Aktivität blockieren, umgekehrt BACE-2 jedoch nicht.

Zweitens wurden die katalytischen Spezifitäten der beiden Enzyme bezüglich β APP genauer untersucht. Für BACE-2 war vor Beginn der Arbeit, aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten mit BACE-1 angenommen worden, dass ebenfalls eine β -Sekretase Aktivität nachweisbar ist (Acquati et al., 2000).

Gegen diese Vermutung spricht, dass die höchste β -Sekretase Aktivität in neuronalen Geweben nachweisbar ist, dort aber die Menge der transkribierten BACE-2 mRNA vergleichsweise gering ist (Bennett et al., 2000a; Marcinkiewicz and Seidah, 2000). Deshalb wurde überprüft, ob BACE-2 bezüglich β APP tatsächlich die gleiche katalytische Spezifität besitzt wie BACE-1.

Ein in der Literatur auffallendes Paradoxon ist, dass in BACE-1 überexprimierenden Zellen zwar die Menge der unmittelbaren β -Sekretase Spaltprodukte, nämlich β APPs β und β APP CTF β dramatisch ansteigen (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999), die Menge der A β -Sezernierung selbst sich jedoch nur wenig verändert (Vassar et al., 1999). Werden BACE-1 und β APPsw exogen coexprimiert, bleibt die A β -Sezernierung häufig sogar vollständig aus, obwohl gerade in diesem Fall, eine verstärkte Generierung der A β -Peptide zu erwarten ist (Citron et al., 1992; Vassar et al., 1999).

Deshalb wurden drittens mögliche Gründe für das Auftreten dieses Phänomens untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Rekombinante DNA Techniken

2.1.1 Geräte und Materialien

PCR-Maschine (Mastercycler personal)	Eppendorf
37°C Schrank (Function line)	Haereus
Schüttelinkubator (Certomat BS-1)	B. Braun Biotech International
Elektrophoresekammern (Modell: B1; Modell: B2)	Owl Separation Systems, Inc.
Gel-Analyse :	
UV-Lampe (White/ Ultraviolet Transilluminator)	UVP
Kamera (CCD Video Camera Module)	
Dokumentation (Quickstore plus II)	MS Laborgeräte
Drucker (p91)	Mitsubishi

2.1.2 Konstrukte und Klonierungen

2.1.2.1 Vektoren

Bezeichnung	Firma	Zielorganismus
pcDNA 3.1. Zeo (+)	Invitrogen	Säugerzellen
pcDNA 3.1. Hygro (+)	Invitrogen	Säugerzellen
pcDNA 3.1. Hygro (-)	Invitrogen	Säugerzellen
pGex 5X.1	Amersham Biosciences	E. coli

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Vektorsysteme.

Angegeben ist die Bezeichnung der verwendeten Vektoren, sowie die Herstellerfirma und der Zielorganismus für die Proteinexpression.

2.1.2.2 DNA-Konstrukte

Bezeichnung	Vektor	Klonierungsenzyme
BACE-1	pcDNA 3.1. Zeo (+)	EcoRI; XhoI
BACE-1	pcDNA 3.1. Hygro (+)	EcoRI; XhoI
BACE-1 S498A	pcDNA 3.1. Zeo (+)	EcoRI; XhoI
BACE-1 S498D	pcDNA 3.1. Zeo (+)	EcoRI; XhoI
BACE-2	pcDNA 3.1. Hygro (-)	ApaI; HindIII
BACE-1 CT wt + GST	pGex 5X.1	EcoRI; XhoI
BACE-1 CT S498A + GST	pGex 5X.1	EcoRI; XhoI
BACE-1 CT S498D + GST	pGex 5X.1	EcoRI; XhoI
BACE-2 CT wt + GST	pGex 5X.1	EcoRI; XhoI
BACE-2 CT S510A + GST	pGex 5X.1	EcoRI; XhoI
BACE-2 CT S511A + GST	pGex 5X.1	EcoRI; XhoI
BACE-2 CT S510/511A + GST	pGex 5X.1	EcoRI; XhoI

Tabelle 3: Zusammenstellung der hergestellten DNA-Konstrukte.

Angegeben ist die Bezeichnung des Konstruktes, der Zielvektor und die Restriktionsenzyme mittels derer die gewünschte DNA-Sequenz in den Vektor eingefügt wurde.

2.1.2.3 PCR

Reaktionsansatz:

- 0,5 µl der entsprechenden cDNA (ca. 1 µg/µl)
- 1 µl des entsprechenden vorwärts Oligonukleotids (vw; 100 µM)
- 1 µl des entsprechenden rückwärts Oligonukleotids (rw; 100 µM)
- 2 µl dNTP-Mix (10 mM, Roche)
- 1 µl Pwo DNA Polymerase (1U/µl, Peq Lab)
- 10 µl Reaktionspuffer komplett (10 fach, Peq Lab)
- mit H₂O bidest. auf 100 µl Endvolumen

Konstrukt	Oligonukleotide (Invitrogen)	cDNA
BACE-1	vw: 5'-cgc-gaa-ttc-ggg-ccc-acc-atg-gcc-caa-gcc-ctg-ccc-tgg-3' rw: 5'-cgc-ctc-gag-tca-ctt-cag-cag-gga-gat-gtc-3'	von Herrn Dr. Michael Willem zur Verfügung gestellt
BACE-1 S498A	vw: 5'-cgc-gaa-ttc-ggg-ccc-acc-atg-gcc-caa-gcc-ctg-ccc-tgg-3' rw: 5'-cgc-ctc-gag-tca-ctt-cag-cag-ggc-gat-gtc-atc-agc-3'	BACE-1
BACE-1 S498D	vw: 5'-cgc-gaa-ttc-ggg-ccc-acc-atg-gcc-caa-gcc-ctg-ccc-tgg-3' rw: 5'-cgc-ctc-gag-tca-ctt-cag-cag-gtc-gat-gtc-atc-agc-3'	BACE-1
BACE-2	Die cDNA wurde freundlicherweise von Dr. A. Tamarelli zur Verfügung gestellt und lediglich mit den unter 2.1.2.2. beschriebenen Enzymen in den Zielvektor umklontiert	
BACE-1 CT wt + GST	vw: 5'-cgc-gaattc-tgt-cag-tgg-cgc-tgc-ctc-cgc-3' rw: 5'-cgc-ctc-gag-tca-ctt-cag-cag-gga-gat-gtc-3'	BACE-1
BACE-1 CT S498A + GST	vw: 5'-cgc-gaattc-tgt-cag-tgg-cgc-tgc-ctc-cgc-3' rw: 5'-cgc-ctc-gag-tca-ctt-cag-cag-ggc-gat-gtc-atc-agc-3'	BACE-1

Konstrukt	Oligonukleotide (Invitrogen)	cDNA
BACE-1 CT S498D + GST	vw: 5'-cgc-gaattc-tgt-cag-tgg-cgc-tgc-ctc-cgc-3' rw: 5'-cgc-ctc-gag-tca-ctt-cag-cag-gtc-gat-gtc-ctc-3'	BACE-1
BACE-2 CT wt + GST	vw: 5'-cgg-aat-tcc-gcc-gtt-ccg-gtg-tca-g-3' rw: 5'-cgc-ctc-gag-tca-ttt-cca-gcg-atg-tct-gac-c-3'	BACE-2
BACE-2 CT S510A + GST	vw: 5'-cgg-aat-tcc-gcc-gtt-ccg-gtg-tca-g-3' rw: 5'-ccg-ctc-gag-cgg-tca-ttt-cca-gcg-atg-tct-gac-cag-aga-ggc-ctc-ctc-att-g-3'	BACE-2
BACE-2 CT S511A + GST	vw: 5'-cgg-aat-tcc-gcc-gtt-ccg-gtg-tca-g-3' rw: 5'-ccg-ctc-gag-cgg-tca-ttt-cca-gcg-atg-tct-gac-cag-agg-gga-ctc-ctc-att-g-3'	BACE-2
BACE-2 CT S510/511A + GST	vw: 5'-cgg-aat-tcc-gcc-gtt-ccg-gtg-tca-g-3' rw: 5'-cg-ctc-gag-cgg-tca-ttt-cca-gcg-atg-tct-gac-cag-agg-ggc-ctc-ctc-att-gac-gac-ctc-3'	BACE-2

Tabelle 4: PCR-Oligonukleotide und cDNA.

Aufgeführt sind die für die PCR-Ansätze der verschiedenen DNA-Konstrukte verwendeten Oligonukleotide und die entsprechende cDNA. Jeweils für die Synthese des DNA-Stranges vom 5'- zum 3'-Ende (vw) und vom 3'- zum 5'-Ende (rw). Die DNA-Sequenzen der Oligonukleotide sind vom 5'- zum 3'-Ende angegeben.

Die entsprechenden Reaktionsansätze wurden gemischt und in der PCR-Maschine mit folgendem Programm prozessiert:

94 °C, 5 min

30 Zyklen:

94 °C, 30 sec

60 °C, 1 min

72 °C, 1 min 30 sec

72 °C, 5 min

Die Produkte der jeweiligen PCR wurden mittels 1 % bzw. im Falle der GST-Fusionsproteine mittels 2 % Agarosegelen aufgetrennt (vgl. 2.1.3.1) und anschließend aus den ausgeschnittenen Gelfragmenten isoliert (vgl. 2.1.3.2). Die so erhaltene DNA wurde zur weiteren Klonierung verwendet (vgl. 2.1.4).

2.1.3 Reinigung und Analyse der DNA

2.1.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

TBE-Puffer

9 mM Tris-borat und 2 mM EDTA in dH₂O

Agarose:

Agarose NA (Amersham Biosciences)

6 fach DNA-Ladepuffer:

30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau und 0,25 % Xylencyanol FF in dH₂O

Zur elektrophoretischen Trennung und Analyse von linearen DNA-Fragmenten, superhelikaler Plasmid-DNA sowie zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurden 1-2 %ige Agarosegele in TBE-Puffer und 0,2 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen 6 fach DNA-Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard diente eine 1 Kb DNA Leiter (Gibco Invitrogen Corporation). Die Elektrophorese wurde bei 100 – 120 V (je nach Größe des Gels) mit TBE-Puffer in Agarosegelkammern durchgeführt.

2.1.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

2.1.3.3 Reinigung von DNA-Fragmenten

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

2.1.3.4 Sequenzierung der DNA-Konstrukte

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

2.1.4 Enzymatische Modifikation der DNA

2.1.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Verwendete Enzyme:

Eco RI (MBI Fermentas): 10 U/ μ l

Xho I (MBI Fermentas): 10 U/ μ l

Apa I (Roche): 10 U/ μ l

Hind III (MBI Fermentas): 10 U/ μ l

Für analytische Ansätze nach Plasmidpräparationen wurden 1-2 μ g Plasmid-DNA in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer mit 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme (vgl. 2.1.2.2) in einem Endvolumen von 20 μ l für 3-4 h bei 37 °C inkubiert. Die Analyse der Restriktion erfolgte mittels Agarosegeltrennung (vgl. 2.1.3.1).

Für präparative Ansätze im Rahmen der Klonierung wurden 10 - 15 μ g Plasmid-DNA oder 5 - 10 μ g des entsprechenden PCR-Produktes in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer mit 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme (vgl. 2.1.2.2) in einem Endvolumen von 30 μ l für 6 - 8 h bei 37 °C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter Verwendung des Nucleo Spin Extract Kits (Macherey-Nagel) gereinigt (vgl. 2.1.3.3).

2.1.4.2 Dephosphorylierung von DNA

Vor einer Ligation (vgl. 2.1.4.3) wurden die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Plasmidmoleküle (vgl. 2.1.4.1) mit Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP; 1 U/ μ l, Roche) entfernt, um intramolekulare Selbstligation zu verhindern (Sambrook and Russel, 2001). Dazu wurden 10 - 15 μ g linearisierte Plasmid-DNA mit 1 U SAP und Reaktionspuffer des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 200 μ l über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend unter Verwendung des Nucleo Spin Extract Kits (Macherey-Nagel) gereinigt (vgl. 2.1.3.3).

2.1.4.3 Ligation von DNA

Die Insertion des, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauten, DNA-Fragments in das zuvor linearisierte und dephosphorylierte Plasmid, erfolgte mit Hilfe der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (T4 Ligase; 5 U/ μ l, Roche). 200 - 300 ng Plasmid, 0,5 - 1 μ g des entsprechenden DNA-Fragmentes, 5 U T4 Ligase und Ligationspuffer des Herstellers wurden in einem Endvolumen von 20 μ l 1 h bei RT inkubiert.

10 – 15 μ l des Ligationsansatzes wurden zur Transformation in kompetente *E. coli* verwendet (vgl. 2.1.5.2).

2.1.5 Transformation von *E. coli* und Plasmidpräparation

2.1.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

LB-Medium (Low Salt Luria-Bertani Medium):

1 % Tryptone, 0,5 % Yeast Extract und 0,5 % NaCl in dH₂O.

pH 7,0 mit NaOH einstellen und bei 120 °C und 1,2 bar für 20 min autoklavieren. Ggf. nach dem Abkühlen die entsprechenden Selektionsantibiotika zusetzen.

CaCl₂-Puffer:

50 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 8,0 in dH₂O

***E. coli* - Stamm: DH5 α**

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

2.1.5.2 Transformation von DNA-Konstrukten in kompetente E. coli

LB-Agar-Platten:

1 % Tryptone, 0,5 % Yeast Extract und 0,5 % NaCl in dH₂O.

pH 7,0 mit NaOH einstellen, 15 g/l Agar zusetzen und bei 120 °C und 1,2 bar für 20 min autoklavieren. Auf ca. 50 °C Abkühlen, die entsprechenden Selektionsantibiotika zusetzen und Platten gießen.

100 µl kompetente E.coli (vgl. 2.1.5.1) wurden mit 10 - 15 µl Ligationsansatz (vgl. 2.1.4.3) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Um eine Aufnahme der DNA in die Zelle zu ermöglichen, wurden die Zellen für 2 min bei 42 °C und weitere 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei RT mit 1 ml LB- Medium versetzt und 1 h bei 37 °C/ 700 upm auf einem Thermoschüttler (vgl. 2.5.1) inkubiert. Die Zellen wurden in der Tischzentrifuge (vgl. 2.5.1) 1 min bei 16000 xg pelletiert, in 200 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampizillin (Roth) ausplattiert. Nach 16 - 24 h Inkubation bei 37 °C wurden Klone entsprechend der weiteren Verwendung (vgl. 2.1.5.3) gepickt.

2.1.5.3 Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Mini-Präp)

Lösung 1:

50 mM D-Glucose, 25 mM Tris pH 8,0 und 10 mM EDTA pH 8,0 in dH₂O

Lösung 2:

0,2 M NaOH und 1 % SDS in dH₂O

Lösung 3:

3 M Kaliumacetat in dH₂O; pH mit Eisessig auf 5,1 einstellen

RNase (DNase-frei):

10 mg/ml RibonukleaseA (RNase; Sigma) in einem Puffer aus 10 mM Tris pH 7,5 und 10 mM NaCl in dH₂O lösen. Lösung 15 min bei 100 °C erwärmen und langsam auf RT abkühlen lassen. Aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren.

Zur Identifizierung rekombinanter E. coli Klone (vgl. 2.1.5.2) wurden kleine Mengen Plasmid-DNA nach einer veränderten Version der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) isoliert. 1 ml einer 3 ml E. coli Übernachtskultur wurde in der Tischzentrifuge (vgl. 2.5.1) 1 min bei 16000 xg sedimentiert und der Überstand dekantiert. Das Sediment wurde in 100 µl Lösung 1 durch vortexen (vgl. 2.5.1) resuspendiert und mit 200 µl frisch zubereiteter Lösung 2 versetzt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde das Gemisch mit 150 µl eiskalter Lösung 3 neutralisiert und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (16000 xg/ 15 min/ 4 °C) abgetrennt und die

Plasmid-DNA mit 1 ml eiskaltem Ethanol (100 %) aus dem Überstand gefällt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Plasmid-DNA ebenfalls durch Zentrifugation abgetrennt (16000 xg/ 15 min/ 4 °C) und das erhaltene Sediment mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und das DNA-Pellet bei 37 °C bis zur Ethanolfreiheit getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde anschließend in 18 µl dH₂O resuspendiert, mit 2 µl RNase-Lösung versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde im analytischen Maßstab mit Restriktionsendonukleasen verdaut (vgl. 2.1.4.1).

2.1.5.4 Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxi-Präp)

Eine 200 ml Übernachtkultur eines E. coli Klons wurde sedimentiert (6500 xg/ 15 min/ 4 °C). Die Lyse des Bakterien-Pellets und die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Nucleobond AX 500 Kits (Macherey-Nagel) nach den Anweisungen des Herstellers. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde im analytischen Maßstab mit Restriktions-endonukleasen verdaut (vgl. 2.1.4.1).

2.2 Zellkultur und Zelllinien

2.2.1 Geräte und Materialien

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

2.2.2 Beschichtung der Kulturschalen und Deckgläschen mit Poly-L-Lysin

PBS-Puffer (steril):

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄, pH 7,4 mit HCl eingestellt in dH₂O
Die fertige Lösung wurde bei 120 °C und 1,2 bar für 20 min autoklaviert.

Poly-L-Lysin Lösung:

100 µg/ml steriles Poly-L-Lysin (Sigma) in sterilem PBS-Puffer

Kulturschalen oder sterilisierte Deckgläschen wurden vollständig mit Poly-L-Lysin Lösung bedeckt und 1 h bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend wurde 3 mal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und, falls Kulturschalen oder Deckgläschen nicht unmittelbar verwendet wurden, 1 mal mit dH₂O (steril) nachgewaschen.

2.2.3 Kultivierung der HEK293 Zellen

2.2.3.1 Medien und Lösungen

PBS-Puffer (steril):

vgl. 2.2.2.

Trypsin-EDTA-Lösung:

0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA*4Na in Hanks' B.S.S. (Gibco Invitrogen Corporation)

Grundmedium:

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) High Glucose (PAA) supplementiert mit 2 mM L-Glutamin (Invitrogen), 10 % fötales Kälberserum (FCS; PAA), 50 U/ml Penizillin (Invitrogen) und 50µg/ml Streptomycin (Invitrogen).

Selektionsmedien:

Grundmedium supplementiert mit den entsprechenden Antibiotika (Invitrogen Life Technologies) in folgenden Endkonzentrationen:

- Genetizin (G 418): 200 µg/ml
- Zeozin: 200 µg/ml
- Hygromycin: 150 µg/ml

2.2.3.2 Durchführung

Die Zelllinie HEK293 (human embryonic kidney 293) wurde von der Firma ATTC, Rockville (USA) bezogen.

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

2.2.4 Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)

Einfriermedium:

FCS (PAA) supplementiert mit 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Roth)

PBS-Puffer (steril):

vgl. 2.2.2.

Trypsin–EDTA-Lösung:

vgl. 2.2.3.1.

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden konfluent gewachsene Zellen einer 10 cm Schale mit sterilem PBS-Puffer gewaschen, in 3 ml Trypsin–EDTA-Lösung abgelöst und mit 3 ml Grundmedium (vgl. 2.2.3.1) versetzt. Die Zellen wurden in der Zentrifuge bei RT 5 min und 200 xg sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml frischem Einfriermedium resuspendiert und anschließend in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kulturen wurden in Einfriergefäßen über Nacht bei –80 °C gefroren und nach 1 Woche in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.5 Transfektion von HEK293 Zellen mit rekombinanter DNA

Die entsprechenden Zellen wurden in einer 6 cm Schale bis zu einer Konfluenz von etwa 50 % kultiviert und mittels FuGENE™ 6 Transfection Reagenz (Roche) gemäß den Anweisungen des Herstellers transfiziert. Im Falle einer transienten Transfektion wurden die Zellen nach 24 h analysiert. Zur Selektion stabiler Einzelzellklone wurden die Zellen 24 – 48 h nach Transfektion in verschiedenen Verdünnungen in das entsprechende Selektionsmedium (vgl. 2.2.3) umgesetzt. Stabile Klone wurden mit Trypsin–Lösung (vgl. 2.2.3) unter Verwendung steriler Klonierungszyylinder (8 x 8 mm; DUNN Labortechnik) abgelöst und in 24 well Platten transferiert. Die Zellen wurden anschließend weiter vermehrt und auf Expression des exogenen Proteins getestet (vgl. 2.2.6).

2.2.6 Nachweis der exogenen Proteinexpression in transfizierten Zellen

PBS-Puffer:

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄, pH 7,4 mit HCl eingestellt in dH₂O

Die nach Selektion erhaltenen Einzelzellklone wurden bis zur Konfluenz in einer 6 cm Schale kultiviert, mit PBS-Puffer gewaschen und mechanisch in 1 ml PBS-Puffer von der Schale abgelöst. Die so gewonnenen Zellen wurden in einer Tischzentrifuge (vgl. 2.5.1) bei RT 5 min/ 200 xg pelletiert. Die Membranproteine wurden isoliert (vgl. 2.5.4.2), in 60 µl 2-fach SDS-Probenpuffer (vgl. 2.5.10) resuspendiert und 5 min/ 95 °C/ 1400 upm auf einem Thermoschüttler (vgl. 2.5.1) inkubiert. 1/4 der Probe wurde auf einem SDS-Polyacrylamid Gel getrennt (vgl. 2.5.10.1) und die Proteine im Western Blot nachgewiesen (vgl. 2.5.10.3).

2.2.7 Übersicht über die verwendeten genetisch veränderten Zelllinien

Name	Mutterzelllinie	exogen exprimierte Proteine	Resistenz	Zitat (falls nicht selbst erstellt)
βAPPwt	HEK293	βAPP ₆₉₅ wt	G418	(Haass et al., 1992b)
βAPPsw	HEK293	βAPP ₆₉₅ sw	G418	(Citron et al., 1992)
BACE-1	βAPPwt	βAPP ₆₉₅ wt BACE-1	G418 Zeozin	
BACE-1 S498A	βAPPwt	βAPP ₆₉₅ wt BACE-1 S498A	G418 Zeozin	
BACE-1 S498D	βAPPwt	βAPP ₆₉₅ wt BACE-1 S498D	G418 Zeozin	
BACE-1 ΔC	βAPPwt	βAPP ₆₉₅ wt BACE-1 ΔC	G418 Zeozin	(Capell et al., 2000)
BACE-2	βAPPwt	βAPP ₆₉₅ wt BACE-2	G418 Hygromyzin	
BACE-1/ BACE-2	BACE-1	βAPP ₆₉₅ wt BACE-1 BACE-2	G418 Zeozin Hygromyzin	
βAPPsw/ BACE-1	βAPPsw	βAPP ₆₉₅ sw BACE-1	G418 Zeozin	
PS1wt	βAPPsw	βAPP ₆₉₅ sw PS1wt	G418 Zeozin	(Steiner et al., 1999c)
PS1 D385N	βAPPsw	βAPP ₆₉₅ sw PS1 D385N	G418 Zeozin	(Steiner et al., 1999c)

Name	Mutterzelllinie	exogen exprimierte Proteine	Resistenz	Zitat (falls nicht selbst erstellt)
PS1wt/ BACE-1	PS1wt	β APP _{695SW} PS1wt BACE-1	G418 Zeozin Hygromyzin	von Herrn Dr. Sven Lammich zur Verfügung gestellt
PS1 D385N/ BACE-1	PS1 D385N	β APP _{695SW} PS1 D385N BACE-1	G418 Zeozin Hygromyzin	von Herrn Dr. Sven Lammich zur Verfügung gestellt
sBACE-1	β APP _{sw}	β APP _{695SW} sBACE-1	G418 Zeozin	(Capell et al., 2000)

Tabelle 5: Zelllinien.

Aufgeführt sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten genetisch veränderten Zelllinien. Angegeben ist der Name der jeweiligen Mutterzelllinie, alle exogen exprimierten Proteine (vgl. 2.1.2.1) und die entsprechenden Resistenzen zur Selektion der Einzelzellklone. Falls Zelllinien nicht selbst erstellt wurden ist die entsprechende Referenz angegeben.

2.3 Antikörper

2.3.1 Herstellung polyklonaler Antikörper

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper wurden synthetische Peptide (Eurogentec), entsprechend der antigenen Region des potentiellen Antikörpers, an KLH (keyhole limpet hemocyanin) gebunden und das Produkt zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

Die Kopplung der Peptide, die Immunisierung der Kaninchen, sowie die Gewinnung der Antiseren wurde von der Firma Eurogentec durchgeführt.

2.3.2 Übersicht über die primären Antikörper

Alle im Folgenden beschriebenen monoklonalen Antikörper sind ausnahmslos Maus IgG-Antikörper, während es sich bei den die polyklonalen Antikörpern um Kaninchen IgG-Antikörper handelt.

2.3.2.1 Monoklonale Antikörper

Bezeichnung	Zielprotein	IP ¹	WB ²	IF ³	Bezugsquelle ⁴
anti-Giantin	human Giantin	---	---	1:5000	Dr. H.-P. Hauri, Basel (Linstedt and Hauri, 1993)
6E10	A β (AS 1-17)	---	1:5000	---	Senetek Inc.
4G8	A β (AS 17-24)	---	1:5000	---	Senetek Inc.
BI. 3D7	PS1 (AS 263-407)	---	1:750	---	Böhringer Ingelheim (Steiner et al., 1999b)

¹Angegeben ist die zur Immunpräzipitation von Proteinen (vgl. 2.5.9) verwendete Verdünnung.

²Angegeben ist die zum immunchemischen Nachweis von Proteinen nach Blotting (vgl. 2.5.10.3) verwendete Verdünnung.

³Angegeben ist die zum immunzytochemischen Nachweis von Proteinen (vgl. 2.4) verwendete Verdünnung.

⁴Angegeben ist die Vertreiberfirma oder Bezugsquelle des Antikörpers.

2.3.2.2 Polyklonale Antikörper

Bezeichnung	Zielprotein	IP ¹	WB ²	IF ³	Bezugsquelle ⁴
GM 190	BACE-1 (AS 22-45)	1:200	1:300	---	Dr. Gerd Multhaup, Berlin (Capell et al., 2000)
7523	BACE-1 (AS 46-60)	1:200	1:500	1:300	vgl. 2.3.1. (Capell et al., 2000)
7520	BACE-1 (AS 482-501)	1:200	1:1000	1:300	vgl. 2.3.1. (Capell et al., 2000)
680	BACE-2 (AS 21-60)	1:200	1:200	---	vgl. 2.3.1.
7524	BACE-2 (AS 493-518)	1:200	1:200	---	vgl. 2.3.1.
7525	BACE-2 (AS 493-518)	1:200	1:200	---	vgl. 2.3.1.
6687	β APP ₆₉₅ (AS 676-695)	1:500	1:600	---	vgl. 2.3.1. (Walter et al., 2000)
5313	β APP ₆₉₅ (AS 444-592)	1:500	1:600	---	vgl. 2.3.1. (Walter et al., 2000)
1736	β APP ₆₉₅ (AS 595-611)	1:500	---	---	Dr. D.J. Selkoe (Haass et al., 1992b)
192wt	β APP ₆₉₅ (AS 591-596)	---	1:100	---	Dr. D. Schenk (Seubert et al., 1993)
3926	A β (AS 1-40)	1:300	1:1000	---	vgl. 2.3.1. (Wild-Bode et al., 1997)
3027	PS1 (AS 263-407)	1:300	1:2000	---	vgl. 2.3.1. (Walter et al., 1996)

¹Angegeben ist die zur Immunpräzipitation von Proteinen (vgl. 2.5.9) verwendete Verdünnung.

²Angegeben ist die zum immunchemischen Nachweis von Proteinen nach Blotting (vgl. 2.5.10.3) verwendete Verdünnung.

³Angegeben ist die zum immunzytochemischen Nachweis von Proteinen (vgl. 2.4) verwendete Verdünnung.

⁴Angegeben ist die Vertreiberfirma oder Bezugsquelle des Antikörpers.

2.3.3 Übersicht über die sekundären Antikörper

Bezeichnung	Zielprotein	Wirtsspezies ¹	Applikation	Verdünnung	Firma ²
anti-rabbit-HRP	Kaninchen IgG	Ziege	WB ³	1:20000	Promega
anti-mouse-HRP	Maus IgG	Ziege	WB ³	1:10000	Promega
Alexa Fluor 488 (grün)	Kaninchen IgG	Ziege	IF ⁴	1:300	Molecular Probes
Alexa Fluor 594 (rot)	Kaninchen IgG	Ziege	IF ⁴	1:500	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 (grün)	Maus IgG	Ziege	IF ⁴	1:300	Molecular Probes
Alexa Fluor 594 (rot)	Maus IgG	Ziege	IF ⁴	1:500	Molecular Probes

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

²Angegeben ist die Vertreiberfirma des Antikörpers.

³Immunochemischer Nachweis von Proteinen nach Blotting (vgl. 2.5.10.3).

⁴Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen (vgl. 2.4).

2.4 Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie

2.4.1 Geräte und Materialien

Fluoreszenzmikroskop:

DMRB Mikroskop mit 100 fach/1.3 Ölobjektiv und Standard FITC und TRITC Fluoreszenzfilterset

Leica

Kamera:

RT Monochrome Spot Camera

Diagnostic Instruments

Software:

MetaView Imaging Software

Universal Imaging Corporation

Photoshop 5.5

Adobe

2.4.2 Herstellung eines Immunfluoreszenzpräparates

PBS-Puffer:

vgl. 2.2.6.

Fixierlösung:

4 % Paraformaldehyd (J. T. Baker) und 4 % Saccharose (Merck) in PBS-Puffer

Triton-Lösung:

0,2 % Triton X 100 (Sigma) in PBS-Puffer

Blockierungslösung:

5 % BSA (Sigma) in PBS-Puffer

Verdünnungslösung:

1 % BSA (Sigma) in PBS-Puffer

Mowiol-Lösung:

15 % Mowiol (Hoechst) und 50 mg/ml DABCO (Sigma) in dH₂O

HEK293 Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern (vgl. 2.2.2) bis zu einer Konfluenz von 50 - 80 % kultiviert, einmal mit PBS-Puffer gewaschen und 20 min bei RT mit Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 15 min mit Triton-Lösung inkubiert. Zum Absättigen unspezifischer Proteinbindungen folgte ca. 1 h Inkubation mit Blockierungslösung. Monoklonaler und/oder polyklonaler primär Antikörper wurde in Verdünnungslösung entsprechend verdünnt (vgl. 2.3.2) und mindestens 45 min bei RT mit den vorbehandelten Zellen inkubiert. Die Zellen wurden sechsmal kurz mit PBS-Puffer gewaschen und mindestens 45 min bei RT mit den entsprechenden sekundären Antikörpern, die zuvor ebenfalls in Verdünnungslösung verdünnt wurden, inkubiert. Schließlich wurde erneut sechsmal kurz mit PBS-Puffer gewaschen, einmal mit dH₂O nachgespült und die Deckgläser mit Mowiol-Lösung auf einem Objektträger fixiert. Die so erhaltenen Präparate wurden nach dem Aushärten unter Verwendung von Immersionsöl N518 (Zeiss) im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Zur Blockade des Protein vorwärtstransportes wurden die Zellen vor Fixierung 30 min mit Grundmedium supplementiert mit 10 µg/ml Brefeldin A (vgl. 2.5.12.1) bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert.

2.5 Proteinbiochemie

2.5.1 Geräte und Materialien

Elektrophoresekammern:

Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell	BioRad
XCell SureLock™ Mini Cell	Invitrogen Life Technologies
Filmentwicklungsgerät (Curix 60)	Agfa
Fluorimeter (Fluoroscans Ascent FL)	Labsystems
Gefrierschrank	Elektrolux
Geltrockner (Slab Gel Dryer 2000)	Savant
Heizblöcke	Liebisch
Kolbenhubpipetten (20 ml, 200 ml, 1000 ml)	Gilson
Kühlschrank	Elektrolux
Kühlzentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus
Magnetrührer (RCT basic und KMO2 basic)	IKA Labortechnik
Megafuge 1,0 R	Heraeus
N ₂ -Tank (Chronos)	Messer
pH-Elektrode (Blueline 23 pH)	Schott
pH-Meter (Inolab pH Level 1)	Wissenschaftlich Technische Werkstätten Weilheim
Fotometer (SmartSpec™ 3000)	BioRad
Einwegküvetten	Sarstedt
Quarzküvetten (Quartz Spectrofotometer Cell)	Bio Rad
Pipetierhilfe (Accu-Jet)	Brand
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße	Sarstedt
<i>Scanner:</i>	
Astra 1220S	UMAX
Perfection 1650	Epson
Schüttler (KM2)	EB (Edmund Buhler)
Sonifier (Cell Disruptor B 15)	Branson
Spannungsquelle (PowerPac300)	BioRad
Thermoschüttler (Thermomixer compact)	Eppendorf
Tischzentrifuge (Biofuge – pico)	Heraeus
Transferkammer (Mini Trans-Blot Cell)	BioRad
Überkopfschüttler (Roto-shake Genie)	Scientific Industries, Inc.
Ultrazentrifuge (Optima Ultracentrifuge)	Beckmann
<i>Rotoren:</i> TLA-55, MLA-80, TLA-110	

Vakuumentrifuge (Speed Vac Concentrator)	Savant
Vortex (Vortex Genie 2)	NeoLab
Wasserbad mit Schüttelvorrichtung (1083)	GFL
Zentrifugen: (J2-MC Zentrifuge und J2-21M Induction Drive Zentrifuge)	Beckmann
<i>Rotoren: Type JA – 10, Type JA - 20</i>	

2.5.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

IPTG-Lösung:

0,1 M IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) dioxanfrei (Roth) in dH₂O; steril filtrieren

PBS-Puffer:

vgl. 2.2.6.

Äquilibrierungspuffer:

50 mM Tris-HCl pH 8,0 in dH₂O

Elutionspuffer:

50 mM Tris-HCl pH 8,0 und 10 mM reduziertes Glutathion in dH₂O

Eine 3 ml E. coli Übernachtskultur wurde in 400 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin (Roth) angeimpft und in einem Schüttelinkubator (vgl. 2.1.1) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 kultiviert. Anschließend wurde die Proteinexpression mit 400 μ l IPTG-Lösung induziert und die Bakterienkultur weitere 6 h inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (6500 xg/ 15 min/ 4 °C) pelletiert und in 10 ml PBS-Puffer supplementiert mit Lysozym (5 mg/ml, Merck) resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das Lysat 5 mal 30s auf Eis sonifiziert und anschließend die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (12500 xg/ 30 min/ 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde 1:10 mit PBS-Puffer verdünnt und 2 - 3 h mit 1 ml Glutathion Sepharose 4B (Amersham Biosciences) bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation (Megafuge 1,0 R: 2000 xg/ 5 min/ 4 °C) vom Überstand abgetrennt und 6 mal mit je 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Sepharose Pellet in 5 ml PBS-Puffer aufgenommen und auf eine Poly-Prep Chromatographie Säule (BioRad) gegeben. Die Säule wurde 2 mal mit je 5 ml Äquilibrierungspuffer gewaschen und das Fusionsprotein schließlich mit 10 ml Elutionspuffer fraktioniert eluiert.

Die Reinheit des Fusionsproteins wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung (vgl. 2.5.10.1) bestimmt. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde fotometrisch (vgl. 2.5.5.1) ermittelt.

2.5.3 BACE-1 *in vitro* Aktivitätsassays

Assay-Puffer:

50 mM Natriumacetat pH 4,5 in dH₂O; steril filtriert

2.5.3.1 Aktivitätsnachweis durch Bestimmung der A β -Peptide mittels Gelelektrophorese

Inhibitor-Lösung:

50 mM G189 in DMSO (erhalten von Dr. W. Bode)

HEK293 Zellen mit exogener Expression von sBACE-1 wurden 24 h mit Optimem 1 + Glutamax-I (Gibco Invitrogen Corporation) 37 °C in einem CO₂-Inkubator inkubiert. 30 ml des konditionierten Mediums wurden mittels Zentrifugalfiltration (Amicon Ultra 30.00 MWCO, Millipore) konzentriert.

1 μ l des so konzentrierten sBACE-1, 1 μ l Inhibitor-Lösung bzw. die gleiche Menge DMSO und 6 μ g synthetisches A β 1-40 wurden über Nacht bei 37 °C Assay-Puffer zu 30 μ l Gesamtvolumen inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einem Schüttelinkubator (vgl. 2.1.1) und wurde mit Zugabe des entsprechenden Probenpuffers (vgl. 2.5.10.1) beendet.

Die Proteinanalyse erfolgte mittels Tris Tricine Gel bzw. Urea Gel nach Wiltfang *et al* und anschließender Coomassie-Färbung (vgl. 2.5.10.1).

2.5.3.2 Aktivitätsnachweis durch Bestimmung der A β -Peptide mittels Massenspektrometrie

HEK293 Zellen mit exogener Expression von sBACE-1 wurden 24 h mit Optimem 1 + Glutamax-I (Gibco Invitrogen Corporation) bei 37°C in einem CO₂-Inkubator inkubiert. 400 ml des konditionierten Mediums wurden konzentriert und fraktioniert eluiert (Mono Q-Sepharose column; Amersham Biosciences). 20 μ l einer sBACE-1 enthaltenden Fraktion bzw. die gleiche Menge einer Kontrollfraktion, die kein

sBACE-1 enthält, wurden mit 50 µg synthetischem Aβ 1-40 bei 37 °C in Assay-Puffer für die entsprechenden Zeitintervalle inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden in einer Vakuumzentrifuge zur Trockene einrotiert und in Eisessig resuspendiert. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe von Zip-Tip Säulen (Amersham Biosciences) gereinigt und mittels MALDI-TOF MS (vgl. 2.5.11) analysiert.

2.5.3.3 Fluorimetrische Aktivitätsbestimmung von BACE-1

Fluoreszenz-Substrat:

Gequenchtetes fluorogenes Peptidsubstrat, das die schwedische Mutation des βAPP-Proteins trägt (vgl. 1.3.1), folgender Sequenz: Cy3-SEVNLDAEFK(Cy5Q)-NH₂ (Amersham Biosciences, Inc.). c = 25 mg/ml in DMSO.

HEK293 Zellen mit exogener Expression von sBACE-1 wurden 24 h mit Optimem 1 + Glutamax (Invitrogen Life Technologies) bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator inkubiert. 19 µl des konditionierten Mediums wurden mit 80 µl Assay-Puffer, 1 µl Inhibitor-Lösung bzw. der gleichen Menge DMSO und 0,2 µl des fluorogenen Substrates versetzt. Als Negativkontrolle diente Optimem, das mit HEK293 Zellen ohne exogene Proteinexpression inkubiert wurde.

Die Messung erfolgte mit Hilfe des Fluorometers unter folgenden Bedingungen:

Measurement + Method: Fluorimetric
Measurement + Type: Kinetic
Integration Time: 20
Lag Time: 00:00:00.0
Intervall: 00:00:30.0
Measurement: 120
Filter: 530 (Extinktion) 590 (Emission)

2.5.4 Gewinnung von Proteinextrakten

2.5.4.1 Gesamtproteinextrakt

PBS-Puffer:

vgl. 2.2.6.

STEN-Lysepuffer:

50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % (v/v) IGEPAL CA-630 (Sigma), 1 % (v/v) Triton X-100 und 2 % BSA (Sigma) in dH₂O

STEN-Lysepuffer ohne BSA:

50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % (v/v) IGEPAL CA-630 (Sigma) und 1 % (v/v) Triton X-100 in dH₂O

80 - 90 % konfluent kultivierte Zellen wurden auf Eis mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml PBS-Puffer abgeschabt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (400 xg/ 5 min) pelletiert und mit STEN-Lysepuffer oder STEN-Lyse Puffer ohne BSA (1000 µl pro 10 cm Schale und 500 µl pro 6 cm Schale) 30 min auf Eis inkubiert. Der unlösliche Rückstand wurde durch Zentrifugation (16000 xg/ 30 min/ 4 °C) abgetrennt und der Überstand entweder sofort weiter verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

2.5.4.2 Membranproteinextrakt

PBS-Puffer:

vgl. 2.2.6.

Hypoton-Puffer:

10 mM Tris pH 7,6, 1 mM EDTA und 1 mM EGTA in dH₂O

80 - 90 % konfluente Zellen wurden auf Eis mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml PBS-Puffer abgeschabt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (400 xg/ 5 min) pelletiert, in 750 µl kaltem Hypotonpuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch 15 maliges Aufziehen der Suspension mit einer 2 ml Spritze (Terumo) mit 0,6 mm Injektionskanüle (Braun) homogenisiert. Zellorganelle und Zytoskelett wurden durch Zentrifugation (3000 xg/ 5 min/ 4 °C) abgetrennt und die Membranen anschließend durch Ultrazentrifugation (100000 xg/ 1 h/ 4 °C) aus dem Überstand isoliert.

Das erhaltene Membranpellet wurde entweder in 60 µl SDS-Probenpuffer bei 95 °C gelöst und direkt mittels SDS-PAGE analysiert, oder in 100 µl STEN-Lyse-Puffer ohne BSA (vgl. 2.5.4.1) resuspendiert, erneut zentrifugiert (16000 xg/ 30 min/ 4 °C) und die Proteinkonzentration ermittelt (vgl. 2.5.5.2)

2.5.5 Ermittlung der Proteinkonzentration

2.5.5.1 Messung der UV-Absorption

Die UV-Absorption der unverdünnten Proteinlösung wurde mit Hilfe des Fotometers in einer Quarzküvette bei 280 nm gemessen.

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

2.5.5.2 Methode nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge aus 1-2 µl Zelllysat ohne Zusatz von BSA (vgl. 2.5.4.1) erfolgte fotometrisch unter Verwendung des Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad).

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

2.5.6 *In vitro* Phosphorylierung

2.5.6.1 Phosphorylierung der GST-Fusionsproteine mittels rekombinanter Kinasen

CK-1:

Rekombinante Ratten CK-1 δ-Untereinheit (New England Biolabs)

Spezifische Aktivität: 2000 U/µg

Konzentration: 1000 U/µl

CK-2:

Rekombinante menschliche CK-2 α-Untereinheit (New England Biolabs)

Spezifische Aktivität: 500 U/µg

Konzentration: 500 U/µl

PKA:

Katalytische Untereinheit der PKA, gereinigt aus Rinderherz
[erhalten von Dr. V. Kinzel; (Girod et al., 1996)]

PKC:

α -, β - und γ -Untereinheiten von PKC gereinigt aus Rattenhirn (Biomol)
Spezifische Aktivität: 1,5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$
Konzentration: 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$

CK-1-, CK-2- und PKA-Puffer:

20 mM Tris, pH 7,5, 5 mM Magnesiumacetat und 5 mM Dithiothreitol in dH_2O

PKC-Puffer:

20 mM Tris, pH 7,5, 5 mM Magnesiumacetat, 5 mM Dithiothreitol, 1 μM PDBu, 0,5 mM CaCl_2 und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L- α -Phosphatidyl-L-serine (Sigma) in dH_2O

10 μM γ -[^{32}P]-ATP (Perkin Elmer Life Sciences) und 1 – 5 μg der entsprechenden GST-Fusionsproteine (vgl. 2.5.2) als Substrat wurden in einem Endvolumen von 30 μl mit dem der Kinase entsprechenden Reaktionspuffer gemischt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl der entsprechenden Kinase gestartet und nach 10 min Inkubation bei 32 $^\circ\text{C}$ / 700 upm auf einem Thermoschüttler durch Zugabe von 5 fach SDS-Probenpuffer (vgl. 2.5.10.1) gestoppt. In den Positivkontrollen dienten Phosvitin (1 mg/ml; Sigma) oder Histon (0,5 mg/ml; Sigma) als Substrate. Für die Negativkontrolle wurden als Substrat 1 - 5 μg GST ohne weiteren Fusionsanteil benutzt.

Die Reaktionsansätze wurden nach Abschluss der Reaktion mittels SDS-PAGE getrennt und die Gesamtproteinmenge mittels Coomassie-Färbung (vgl. 2.5.10.1) nachgewiesen. Zum Nachweis der radioaktiv markierten Proteine wurden Röntgenfilme (Super RX, Fuji oder X-OMATTMLS, Kodak) verwendet.

2.5.6.2 Phosphorylierung der GST-Fusionsproteine in Gegenwart von Zelllysaten

PBS-Puffer:

vgl. 2.2.6.

Lysepuffer:

20 mM Tris, pH 7,5, 5 mM Magnesiumacetat, 5 mM Dithiothreitol und 0,5 % (v/v) Triton X-100 in dH_2O

Inhibitor-Stocklösungen:

- * **Hymenialdesin:** 10 μM Hymenialdesine (Firma) in DMSO (erhalten von Dr. L. Meijer)
- * **DRB:** 10 μM 5,6-Dichlorbenzimidazol-1 β -D-ribofuranosid in DMSO (Biomol)

HEK293 Zellen von 3 - 4 konfluenten 10 cm Schalen wurden mit PBS-Puffer gewaschen, abgelöst und anschließend pelletiert (400 xg/ 5 min). Das Zellpellet wurde in 300 µl Lysepuffer resuspendiert und 10 min auf Eis lysiert. 20 µl des nach Zentrifugation (1200 xg/ 5 min/ 4 °C) gewonnenen Überstandes wurden für die Reaktion eingesetzt. Nach Zugabe von 5 µg GST-Fusionsprotein (vgl. 2.5.2) und ggf. der entsprechenden Inhibitoren wurde die Reaktion mit 30 µM γ -[³²P]-ATP (Perkin Elmer Life Sciences) gestartet und nach 20 min Inkubation bei 32 °C / 700 upm auf einem Thermoschüttler durch Zugabe von 470 µl Lysepuffer gestoppt. Zur Abtrennung der Fusionsproteine wurde das Reaktionsgemisch 2 h mit 30 µl Glutathion Sepharose 4B (Amersham Biosciences) bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation (4000 xg/ 5 min/ 4 °C) pelletiert und 5 mal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Analyse der erhaltenen Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung (vgl. 2.5.10.1). Zum Nachweis der radioaktiv markierten Proteine wurden Röntgenfilme (Super RX, Fuji oder X-OMATTMLS, Kodak) verwendet.

2.5.7 Metabolische Markierung von Proteinen

2.5.7.1 Markierung mit [³⁵S]-Methionin/Cystein

Methionin/Cystein-freies Medium:

MEM (Minimum Essential Medium EAGLE; Sigma), 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penizillin (Invitrogen) und 50 µg/ml Streptomycin (Invitrogen). Vorgewärmt auf 37 °C.

[³⁵S]-Methionin/Cystein Medium:

Methionin/Cystein-freies Medium supplementiert mit 3,7 MBq/ml [³⁵S]-Methionin/Cystein (Promix; Amersham Biosciences) und 5 % (v/v) dialysiertes FCS (Invitrogen). Vorgewärmt auf 37 °C.

HEK293 Zellen wurden in 6 cm Schalen bis zu einer Konfluenz von 85 - 90 % kultiviert. Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen mit sterilem PBS-Puffer (vgl. 2.2.2) gewaschen und 1 h mit 2 ml Methionin/Cystein-freiem Medium bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Das Medium wurde anschließend vollständig entfernt und durch 2 ml [³⁵S]-Methionin/Cystein Medium ersetzt. Nach 4 - 6 h Inkubation bei 37 °C im CO₂-Inkubator, wurde das Medium abgenommen und nach Zentrifugation (Kühlzentrifuge: 16000 xg/ 4 °C/ 15 min) direkt für die Immunpräzipitation (vgl. 2.5.9) verwendet. Die Zellen wurden mit STEN-Lyse-Puffer lysiert (vgl. 2.5.4.1) und die zu untersuchenden Proteine ebenfalls immunpräzipitiert. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. 2.5.10.1) und Transfer auf PVDF-Membran (vgl. 2.5.10.3).

Zum Nachweis der immunpräzipitierten radioaktiven Proteine wurden Röntgenfilme (Super RX, Fuji, X-OMATTMLS, Kodak oder BioMaxTMMR, Kodak) verwendet.

2.5.7.2 Pulse Chase Experimente

Pulse-Medium:

Methionin/Cystein-freies Medium (vgl. 2.5.7.1) supplementiert mit 3,7 MBq/ml [³⁵S]-Methionin/Cystein (Promix, Amersham Biosciences). Vorgewärmt auf 37 °C.

Chase-Medium:

Grundmedium (vgl. 2.2.3.1) supplementiert mit 2 mM Methionin (Sigma). Vorgewärmt auf 37 °C.

HEK293 Zellen wurden in 6 cm Schalen bis zu einer Konfluenz von 85 - 90 % kultiviert. Nach Entfernung des Kulturmediums, wurden die Zellen mit sterilem PBS-Puffer (vgl. 2.2.2) gewaschen und 1 h mit 2 ml Methionin/Cystein-freiem Medium (vgl. 2.5.7.1) bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Das Medium wurde anschließend vollständig entfernt und durch 2 ml Pulse Medium ersetzt. Nach 15 min Inkubation bei 37°C im CO₂-Inkubator, wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit Chase Medium gewaschen und 2 ml frisches Chase Medium zugegeben. Die verschiedenen Ansätze wurden die entsprechenden Zeitintervalle bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert, anschließend die Zellen mit STEN-Lyse-Puffer lysiert (vgl. 2.5.4.1) und die Lysate direkt für die Immunpräzipitation (vgl. 2.5.9) verwendet. Die Analyse der Proteine erfolgte entsprechend 2.5.7.1.

2.5.7.3 Markierung mit [³²P]-ortho-Phosphat

Phosphat-freies Medium:

13,3 g DULBECCO's modified EAGLE's Medium ohne Natriumphosphat und Natriumbicarbonat (Sigma) und 3,7 g Natriumbicarbonat in 1 l dH₂O; pH-Wert 7,4 einstellen und steril filtrieren. Vorgewärmt auf 37 °C.

[³²P]-ortho-Phosphat Medium:

Phosphat-freies Medium supplementiert mit 18 MBq/ml [³²P]-ortho-Phosphat (Amersham Biosciences)

Okadasäure-Stocklösung:

Okadasäure (Alexis) 0,5 mM in DMSO

HEK293 Zellen wurden in 6 cm Schalen bis zu einer Konfluenz von 85 - 90 % kultiviert. Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen mit sterilem PBS-Puffer (vgl. 2.2.2) gewaschen und 45 min mit 2 ml Phosphat-freiem Medium bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Das Medium wurde anschließend vollständig entfernt und durch 2 ml [³²P]-ortho-Phosphat Medium ersetzt.

Nach 1 h Inkubation bei 37 °C im CO₂-Inkubator, wurden 0,2 µM Okadasäure oder die entsprechende Menge DMSO zugesetzt und die Zellen eine weitere 1 h bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit STEN-Lyse-Puffer (vgl. 2.5.4.1) supplementiert mit 1 µM Okadasäure lysiert und die Lysate direkt für die Immunpräzipitation (vgl. 2.5.9) verwendet. Die Analyse der Proteine erfolgte entweder direkt oder nach Deglykosylierung (vgl. 2.5.8) mittels SDS-PAGE (vgl. 2.5.10.1) und Transfer auf PVDF-Membran (vgl. 2.5.10.3). Zum Nachweis der radioaktiven Proteine wurden Röntgenfilme (Super RX, Fuji) verwendet. Die Exposition erfolgte unter Verwendung eines Phosphorscreens bei -80 °C.

2.5.7.4 Markierung mit [³⁵S]-Sulfat

Sulfat-freies Medium:

11,2 g Minimum Essential Medium Joklik-modified (Gibco Invitrogen Corporation) in 1 l dH₂O; pH-Wert 7,4 mit NaOH einstellen und steril filtrieren. Vorgewärmt auf 37 °C.

[³⁵S]-Sulfat Medium:

Sulfat-freies Medium supplementiert mit 74 MBq/ml [³⁵S]-Sulfat (Amersham Biosciences). Vorgewärmt auf 37 °C.

HEK293 Zellen wurden in 10 cm Schalen bis zu einer Konfluenz von 85 - 90 % kultiviert. Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen mit sterilem PBS-Puffer (vgl. 2.2.2) gewaschen und 1 h mit 4 ml Sulfat-freiem Medium bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Das Medium wurde anschließend vollständig entfernt und durch 4 ml [³⁵S]-Sulfat Medium ersetzt. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C im CO₂-Inkubator, wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit STEN-Lyse-Puffer lysiert (vgl. 2.5.4.1). Die Lysate wurden direkt für die Immunpräzipitation (vgl. 2.5.9) verwendet. Die Analyse der Proteine erfolgte nach Deglykosylierung (vgl. 2.5.8) wie unter 2.5.7.1. beschrieben.

2.5.7.5 Markierung mit [³H]-Aminosäuren und Radiosequenzierung

Valin-freies Medium (2 fach):

Die Herstellung erfolgte unter Verwendung des MEM Select-Amine Kit (Gibco Invitrogen Corporation) nach den Anweisungen des Herstellers. Vorgewärmt auf 37 °C.

[³H]-Valin-Medium:

2 ml Valin-freies Medium (2 fach), 5 % (v/v) FCS (Invitrogen) dialysiert, 62,9 MBq [³H]-Valin (Amersham Biosciences) mit dH₂O ad 4 ml. Vorgewärmt auf 37 °C.

HEK293 Zellen wurden in 10 cm Schalen bis zu einer Konfluenz von 85 - 90 % kultiviert. Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen mit sterilem PBS-Puffer (vgl. 2.2.2) gewaschen und 1 h mit 4 ml Valin-freiem Medium bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Das Medium wurde anschließend vollständig entfernt und durch 4 ml [³H]-Valin Medium ersetzt. Nach 4 - 6 h Inkubation bei 37 °C im CO₂-Inkubator, wurde das Medium abgenommen und nach Zentrifugation (Megafuge R1: 6000 xg/ 4°C/ 15 min) direkt für die Immunpräzipitation (vgl. 2.5.9) verwendet. Die Zellen wurden mit STEN-Lyse-Puffer lysiert (vgl. 2.5.4.1) und die zu untersuchenden Proteine ebenfalls immunpräzipitiert. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. 2.5.10.1) und Transfer auf PVDF Membran (vgl. 2.5.10.3). Parallel wurde eine Markierung mit [³⁵S]-Methionin/Cystein (vgl. 2.5.7.1) durchgeführt, um die [³H]-markierten Proteine auf der Membran lokalisieren zu können. Zum Nachweis der radioaktiven Proteine wurden Röntgenfilme (BioMaxTMMR, Kodak) verwendet. Die Exposition erfolgte bei -80 °C.

Radiosequenzierung:

Die [³H]-markierten Protein-Banden wurden mit einem Skalpell aus der PVDF Membran ausgeschnitten. Die an die Membran gebundenen Proteine wurden einem automatisierten Edman-Abbau (Applied Biosystems, Sequenzierer Model 475) unterzogen. Die erhaltenen Aminosäure-Thiohydantione wurden mit n-Butylchlorid extrahiert und in 6 ml Szintillationsgefäße (Sarstedt) überführt. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte unter Zusatz von 5 ml Szintillationscocktail (Ultra Gold; Perkin Elmer) im Szintillationszähler (Econofluor, NEN).

2.5.8 Analyse der Glykosylierung von Proteinen

2.5.8.1 N-Glykosidase F-Verdau

PNGase F Puffer:

100 mM Natrium-Phosphat, pH 8,0, 25 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol (Merck), 0,1 % (w/v) SDS und 2,5 mM PMSF in dH₂O

HEK293 Zellen wurden in einem Pulse Chase Experiment mit [³⁵S]-Methionin/Cystein oder [³⁵S]-Sulfat markiert (vgl. 2.5.7.2. und 2.5.7.4) und anschließend mit STEN-Lyse-Puffer lysiert (vgl. 2.5.4.1).

Die zu deglykosylierenden Proteine wurden durch Immunpräzipitation mit dem entsprechenden Antikörper und 50 µl Protein-A-Sepharose (vgl. 2.5.9) isoliert. Das Protein-A-Sepharose Pellet wurde in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert 1:1 geteilt, erneut pelletiert (4000 xg/ 5 min/ 4 °C) und in je 30 µl PNGase F-Puffer resuspendiert. Zu je einem Ansatz wurde 1 µl PNGase F (1 U/µl; Roche Molecular Biochemicals) hinzugefügt und alle Proben 14 h bei 37 °C/ 700 upm auf einem Thermoschüttler inkubiert, anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 fach SDS-Probenpuffer (vgl. 2.5.10.1) gestoppt. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. 2.5.10.1) und Transfer auf PVDF-Membran (vgl. 2.5.10.3). Zum Nachweis der radioaktiven Proteine wurden Röntgenfilme (Super RX, Fuji, X-OMATTMLS, Kodak oder BioMaxTMMR, Kodak) verwendet.

2.5.8.2 Endo-Glykosidase H Verdau

Endo-Glykosidase H-Puffer:

200 mM Natriumcitrat pH 5,8, 0,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol (Merck), 0,1 % (w/v) SDS und 2,5 mM PMSF in dH₂O

Die Proteine wurden wie unter 2.5.8.1. beschrieben radioaktiv markiert und isoliert. Das Protein-A-Sepharose Pellet wurde in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert 1:1 geteilt, erneut pelletiert (4000 xg/ 5 min/ 4°C) und in je 30 µl Endo-Glykosidase H-Puffer resuspendiert. Zu je einem Ansatz wurde 1µl Endo-Glykosidase-H (5 U/ml; Roche Molecular Biochemicals) hinzugefügt und alle Proben 14 h bei 37 °C/ 700 upm auf einem Thermoschüttler inkubiert, anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 fach SDS-Probenpuffer (vgl. 2.5.10.1) gestoppt. Die Analyse der Proteine erfolgte wie unter 2.5.8.1 beschrieben.

2.5.8.3 Tunikamyzin - Behandlung

Tunikamyzin-Stocklösung:

10 mg/ml Tunikamyzin (Calbiochem) in DMSO

HEK293 Zellen wurden in 6 cm Schalen bis zu einer Konfluenz von 85 - 90 % kultiviert und anschließend 2 h mit Grundmedium (vgl. 2.2.3) supplementiert mit 10 µg/ml Tunikamyzin bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert.

Im Folgenden wurden die Zellen in Gegenwart von 10 µg/ml Tunikamyzin in einem Pulse Chase Experiment metabolisch mit [³⁵S]-Methionin/Cystein markiert (vgl. 2.5.7.2). Die Zellen wurden mit STEN-Lyse-Puffer lysiert (vgl. 2.5.4.1) und die fraglichen Proteine immunpräzipitiert (vgl. 2.5.9). Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. 2.5.10.1) und Transfer auf PVDF-Membran (vgl. 2.5.10.3). Zum Nachweis der radioaktiven Proteine wurden Röntgenfilme (Super RX, Fuji, X-OMATTMLS, Kodak oder BioMaxTMMR, Kodak) verwendet.

2.5.9 Immunpräzipitation von Proteinen

STEN Puffer:

50 mM Tris pH 7,6, 2 mM EDTA, 0,2 % (v/v) NP-40 und 150 mM NaCl

STEN-NaCl Puffer:

50 mM Tris pH 7,6, 2 mM EDTA, 0,2 % (v/v) NP-40 und 500 mM NaCl

STEN-SDS Puffer:

50 mM Tris pH 7,6, 2 mM EDTA, 0,2 % (v/v) NP-40, 150 mM NaCl und 0,1 % (w/v) SDS

Protein-A-Sepharose Suspension:

100 mg/ml Protein A gebunden an Sepharose CL-4B (Sigma) und 2 mg/ml BSA (bovine serum albumin; Sigma) in STEN Puffer

Die Gesamtproteinextrakte (vgl. 2.5.4.1) wurden mit der entsprechenden Antikörpermenge (vgl. 2.3.2) und 30 µl Protein-A-Sepharose Suspension versetzt und 2 - 4 h bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Das Immunpräzipitat wurde durch Zentrifugation (4000 xg/ 5 min/ 4 °C) sedimentiert und nacheinander je 10 min mit je 1000 µl STEN-NaCl Puffer, STEN-SDS Puffer und STEN Puffer gewaschen.

Die Pellets wurden anschließend mit 20 µl 2 fach SDS-Probenpuffer (vgl. 2.5.10.1) versetzt, 5 min bei 95 °C gekocht und mittels SDS-PAGE (vgl. 2.5.10.1) und Western Blot (vgl. 2.5.10.3) analysiert.

2.5.10 Nachweis von Proteinen

2.5.10.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

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

Trenngelpuffer („Lower Tris) (4 fach)

1,5 M Tris und 0,4 % (w/v) SDS in dH₂O; pH 8,8 mit HCl einstellen

Sammelgelpuffer („Upper Tris) (4 fach)

0,5 M Tris und 0,4 % (w/v) SDS in dH₂O; pH 6,8 mit HCl einstellen

Acrylamid - Lösung (Q-BioGene):

40 % (w/v) Acrylamid – BIS-Acrylamid 37,5 :1 in dH₂O

Urea-Lösung:

8 M Urea in dH₂O

APS:

10 % (w/v) Ammonium Persulfat in dH₂O

TEMED:

N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (Merck)

5 fach SDS-Probenpuffer:

50 % (v/v) Glycerin, 7,5 % (w/v) SDS, 7,5 % (w/v) DTT und etwas Bromphenolblau in Sammelgelpuffer

2 fach SDS-Probenpuffer:

20 % (v/v) Glycerin, 3 % (w/v) SDS, 3 % (w/v) DTT und etwas Bromphenolblau in Sammelgelpuffer

2,5 fach Urea-Probenpuffer:

5 fach SDS-Probenpuffer 1:1 mit Urea-Lösung verdünnt.

Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris, 0,2 M Glycin und 0,1 % (w/v) SDS in dH₂O

Färbelösung:

50 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Eisessig und 0,5 % (w/v) Coomassie-Blue-R in dH₂O

Entfärbelösung:

5 % (v/v) Isopropanol und 7 % (v/v) Eisessig

Zusammensetzung der Gele für je 1 Minigel (1,5 mm)

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

Die Prozentigkeit der Gele ist für das jeweilige Experiment im Ergebnisteil angegeben. Bei Verwendung von Urea-Gelelen wurde anstelle von dH₂O Urea-Lösung verwendet.

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

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 Trennkammer 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 wurden in max. 30 µl Pobenpuffer resuspendiert und 5 min bei 95 °C gekocht (zum Nachweis von PS1 wurde nur auf 65 °C erhitzt). Nicht gelöstes Material wurde durch Zentrifugation (16000 xg/ 1 min) abgetrennt und die Probe in die Taschen des Gels eingebracht. Als Molekulargewichtsstandard wurden 10 µl See Blue Plus 2 (Invitrogen) geladen. Anode und Kathode wurden mit der Spannungsquelle verbunden. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 70 V und nach Eintritt der Proteine in das Trenngel bei 120 V.

Coomassie-Färbung:

Zum Proteinnachweis durch Coomassie-Färbung wurde das Gel direkt im Anschluss an die Elektrophorese 10 - 15 min bei RT in Färbelösung geschüttelt und dannach ca. 4 - 6 h mit Entfärbelösung bei RT entfärbt, bis der Gel-Hintergrund klar wurde. Die entfärbten Gele wurden 2 h bei 60 °C auf einem Gel-Trockner getrocknet.

2.5.10.2 Besondere Gelsysteme zur Trennung von Peptiden mit geringem Molekulargewicht

2.5.10.2.1 Tris-Tricine Gele

Zur Auftrennung von niedermolekularen Peptiden und Proteinen wurde das Gelsystem nach (Schägger and von Jagow, 1987) unter Verwendung des BioRad Minigelsystems eingesetzt.

Gelpuffer:

3 M Tris-HCl pH 8.45 und 0,3 % (w/v) SDS in dH₂O

Acrylamid-Lösung:

48 g Acrylamid und 1.5 g Bisacrylamid ad 100 ml mit dH₂O

Glycerol-Lösung

32 % (v/v) Glycerol (v/v) in dH₂O

Anodenpuffer:

0,2 M Tris in dH₂O, pH mit HCl auf 8,9 eingestellt

Kathodenpuffer:

0,1 M Tris-HCl , 0,1 M Tricine und 0,1 % (w/v) SDS in dH₂O

Zusammensetzung der Gele für je 2 Minigele (1,5 mm)

	Trenngel (16,5 %)	Spacergel (10 %)	Sammelgel (4 %)
dH ₂ O	---	3,5 ml	4,2 ml
Acrylamid-Lösung	3,5 ml	1,5 ml	0,5 ml
Gelpuffer	3,5 ml	2,5 ml	1,55 ml
Glycerol-Lösung	3,5 ml	---	---
TEMED (vgl. 2.5.8.1)	4 µl	4 µl	5 µl
APS (vgl. 2.5.8.1)	32,5 µl	35 µl	50 µl

Mit der Ausnahme, dass das Trenngel noch vor dem Aushärten mit dem Spacergel überschichtet wurde, wurden die Gele wie unter 2.5.10.1. beschrieben gegossen. Die Elektrophoreskammer wurde auf der Seite der Anode mit Anodenpuffer und auf der Seite der Kathode mit Kathodenpuffer gefüllt. Probenvorbereitung und Elektrophorese wurden wie unter 2.5.10.1. beschrieben durchgeführt.

In einigen Ausnahmefällen wurden, anstelle der selbstgegossenen Gele, fertige Gele (Invitrogen) nach den Anweisungen des Herstellers eingesetzt.

2.5.10.2.2 Urea Gele nach Wiltfang *et al*

Zur Unterscheidung der einzelnen Amyloid Spezies wurden Urea-Gele nach Wiltfang *et al.* (Wiltfang *et al.*, 1997) unter Verwendung des BioRad Minigelsystems eingesetzt.

Trenngel-Puffer:

1,6 M Tris und 0,4 M H₂SO₄ in dH₂O

Spacergel-Puffer:

0,8 M Bis-Tris und 0,2 M H₂SO₄ in dH₂O

Sammelgel-Puffer:

0,72 M Bis-Tris und 0,32 M Bicine in dH₂O

Anodenpuffer:

0,2 M Tris und 0,05 M H₂SO₄ in dH₂O

Kathodenpuffer:

0,2 M Bicine, 0,25 % (w/v) SDS und 0,1 M NaOH in dH₂O

Slotpuffer:

0,36 M Bis-Tris, 0,16 M Bicine und 0,1 % (w/v) SDS in dH₂O

2 fach Probenpuffer

0,72 M Bis-Tris, 0,32 M Bicine, 2 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol und 30 % (w/v) Saccharose in dH₂O. Zum Anfärben wurde Bromphenolblau verwendet.

SDS-Lösung:

20 % (w/v) SDS in dH₂O

Zusammensetzung der Gele für je 2 Minigele (1,5 mm)

	Trenngel	Spacergel	Sammelgel
Entsprechender Gelpuffer	5 ml	2 ml	3 ml
Acrylamid-Lösung (vgl. 2.5.8.1)	5 ml	600 µl	1,35 ml
Urea	9,6 g	---	---
SDS -Lösung	100 µl	20 µl	30 µl
dH ₂ O	2,5 ml	1,35 ml	1,45 ml
APS (vgl. 2.5.8.1)	80 µl	16 µl	36 µl
TEMED (vgl. 2.5.8.1)	10 µl	4 µl	12 µl

Alle drei Gelschichten wurden nach vollständigem Auspolymerisieren der vorherigen, wie unter 2.5.10.1. beschrieben, gegossen. Die Elektrophoreskammer wurde auf der Seite der Anode mit Anodenpuffer gefüllt und auf der Seite der Kathode mit Kathodenpuffer ohne, dass sich beide Lösungen mischen. Die Taschen wurden mehrmals mit Slotpuffer gespült. Die Proben wurden in max. 30 µl 2 fach Probenpuffer resuspendiert und 5 min bei 95 °C gekocht.

Nicht gelöstes Material wurde durch Zentrifugation (16000 xg / 1 min) abgetrennt und die Probe in die Taschen des Gels eingebracht. Als Molekulargewichtsstandard wurden 10 μ l Prestained Protein MW Standards Low (Fermentas) geladen. Anode und Kathode mit der Spannungsquelle verbunden. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einem konstanten Stromfluss von 12 mA und nach Erreichen des Trenngels bei 24 mA

2.5.10.3 Transfer und immunchemischer Nachweis von Proteinen

PBS-Puffer:

vgl. 2.2.6.

Transfer-Puffer:

25 mM Tris und 0,2 M Glycin in dH_2O

Nach Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese wurden die Proteine in einer Transferkammer auf eine PVDF-Membran (Immobilon, Transfer Membran; Milipore) übertragen.

Transferaufbau:

- * Anodenplatte
- * poröser Schwamm in Transfer-Puffer äquilibriert
- * zwei Lagen Gel Blotting-Papier (Schleicher & Schuell) in Transfer-Puffer äquilibriert
- * PVDF-Membran (Immobilon, Transfer Membran; Milipore) in Transfer-Puffer äquilibriert
- * SDS-Polyacrylamid-Gel
- * zwei Lagen Gel Blotting-Papier (Schleicher & Schuell) in Transfer-Puffer äquilibriert
- * poröser Schwamm in Transfer-Puffer äquilibriert
- * Kathodenplatte

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

Für den immunchemischen Nachweis von A β -Peptiden wurde anstelle der PVDF-Membran, Protran Nitrocellulose Transfer Membran (Schleicher & Schuell) verwendet, die unmittelbar nach dem Transfer 5 min in PBS-Puffer gekocht wurde.

Immunochemischer Nachweis der Proteine:**TBST-Puffer:**

0,3 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6 und 0,3 % (v/v) Triton X-100 in dH₂O

Blockierungspuffer:

5 % (w/v) Magermilchpulver (Töpfer) in TBST-Puffer

Nach erfolgtem Transfer wurde die PVDF-Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen über Nacht bei 4 °C in Blockierungspuffer geschüttelt. Die so vorbehandelte Membran wurde anschließend 1 h bei RT mit primärem Antikörper, verdünnt in Blockierungspuffer (vgl. 2.3.2), auf einem Schüttler inkubiert und 3 mal je 20 min mit TBST-Puffer gewaschen. Der entsprechende HRP gekoppelte sekundär Antikörper (vgl. 2.3.3) wurde ebenfalls in Blockierungspuffer verdünnt und analog zum primär Antikörper mit der PVDF-Membran inkubiert. Schließlich wurde erneut 3 mal je 20 min mit TBST-Puffer gewaschen und kurz mit bidest. H₂O nachgespült. Die Detektion der mit den Antikörpern gekoppelten Proteine erfolgte mit Hilfe der ECL (enhanced chemoluminescence) Technik (ECLTM Western Blotting Detection Reagent; Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers und unter Verwendung von Röntgenfilmen (Super RX, Fuji). Zum Nachweis schwacher Signale wurde das ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences) verwendet.

Zum immunochemischen Nachweis von A β -Peptiden wurde der Western Star Kit (Tropix) nach den Anweisungen des Herstellers eingesetzt.

2.5.10.4 „Strippen“ von Western Blot Membranen**„Stripping“-Puffer:**

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

Um eine PVDF-Membran nacheinander mit verschiedenen Antikörpern analysieren zu können, wurden die nicht denaturierten Proteine nach dem ersten Proteinnachweis durch 45 min Inkubation der Membran in „Stripping“-Puffer entfernt. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 50 °C unter Schütteln. Anschließend wurde die Membran 2 mal je 15 min in TBST-Puffer gewaschen und erneut zum immunochemischen Nachweis der Proteine (vgl. 2.5.10.3) verwendet.

2.5.11 Massenspektrometrische Analyse von A β -Spezies

HEK293 Zellen wurden in 10 cm Schalen bis zu einer Konfluenz von 85 - 90 % kultiviert und anschließend 24 h mit 4 ml frischem Grundmedium (vgl. 2.2.3) bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und durch Zentrifugation (6300 xg/ 20 min/ 4 °C) von den unlöslichen Bestandteilen befreit. Die A β -Peptide wurden durch Immunpräzipitation mit AK 3926 (1:200) und 20 μ l Protein-A-Sepharose-Lösung (vgl. 2.5.9) isoliert. Das Immunpräzipitat wurde durch Zentrifugation (400 xg/ 5 min/ 4 °C) sedimentiert, viermal je 10 min mit je 1000 μ l STEN Puffer (vgl. 2.5.9) und einmal mit 1000 μ l 10 mM Tris-HCl pH 7,4 gewaschen und anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Proteine wurden zweimal mit je 500 μ l Essigsäure (50 %) extrahiert und erneut in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das erhaltene Protein wurde in 20 μ l Ameisensäure (50 %) resuspendiert und 1:10 in Ameisensäure (10 %) verdünnt. Ca. 0,5 μ l der Antikörper-/ A β -Peptid-Lösung wurden auf dem „Target sample plate“ mit 0,5 μ l einer gesättigten Sinapinsäurelösung in Wasser/ Acetonitril /Trifluoressigsäure (1:1; 0,5 %) gemischt. Alternativ dazu wurde α -cyano-4-hydroxymizsäure als Matrix verwendet. Die Probe wurde einige Minuten an der Luft getrocknet und in einem MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption / ionization time of flight) Massenspektrometer (Bruker Reflex II) analysiert. Als externe Kalibrierungsstandards dienten Insulin, CLIP (corticotropin-like intermediate lobe peptide) und CIP (corticotropin-inhibiting peptide).

2.5.12 Analyse zellulärer Transport Mechanismen

2.5.12.1 Behandlung von HEK293 Zellen mit Brefeldin A oder Monensin

Brefeldin A Stocklösung:

5 mg/ml Brefeldin A (Sigma) in 100 % EtOH p.A.

Monensin Stocklösung:

10 mM Monensin (Sigma) in 100 % EtOH p.A.

HEK293 Zellen wurden in 6 cm Schalen bis zu einer Konfluenz von 85 - 90 % kultiviert und anschließend 2 h mit Grundmedium (vgl. 2.2.3) supplementiert mit 25 μ M Monensin bzw. 1 h mit Grundmedium supplementiert mit 10 μ g/ml Brefeldin A bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert.

Im Folgenden wurden die Zellen in Gegenwart von 25 μM Monensin bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ Brefeldin A metabolisch mit [^{35}S]-Methionin/Cystein markiert (vgl. 2.5.7.1). Die Zellen wurden mit STEN-Lyse-Puffer lysiert (vgl. 2.5.4.1) und die zu untersuchenden Proteine immunpräzipitiert (vgl. 2.5.9). Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. 2.5.10.1) und Transfer auf PVDF-Membran (vgl. 2.5.10.3). Zum Nachweis der radioaktiven Proteine wurden Röntgenfilme (Super RX, Fuji, X-OMATTMLS, Kodak oder BioMaxTMMR, Kodak) verwendet.

2.5.12.2 Biotinylierung von Oberflächenproteinen und Reinternalisierung biotinylierter Proteine

PBS-Puffer:

vgl. 2.2.6.

PBS-Puffer (Ca, Mg):

1 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl in PBS-Puffer

Biotinlösung:

0,5 mg/ml EZ-linkTM Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce) in PBS-Puffer

Glutathion-Puffer:

1,54 g Glutathion (Sigma), 0,53 g NaCl , 100 μl 1,25 M CaCl_2 , 100 μl 1,25 M MgSO_4 und 0,2 g BSA mit NaOH 5 M auf pH 8,6 in dH_2O

Glycin-Lösung:

20 mM Glycin in PBS-Puffer

HEK293 Zellen wurden in Poly-L-Lysin beschichteten (vgl. 2.2.2) 6 cm Schalen bis zu einer Konfluenz von 85 - 90 % kultiviert und dreimal mit eiskaltem PBS-Puffer (Ca, Mg) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 2 ml Biotinlösung 30 min auf Eis inkubiert und dreimal je 15 min mit je 3 ml eiskalter Glycin-Lösung gewaschen, um ungebundenes Biotin abzusättigen. Nach zwei weiteren Waschzyklen mit PBS-Puffer (Ca, Mg), wurden die Zellen mechanisch abgelöst, pelletiert (400 $\text{xg}/$ 5 min) und mit STEN-Lyse Puffer lysiert (vgl. 2.5.4.1). Zur Isolierung der biotinylierten Proteine wurden 30 μl Streptavidin Sepharose High Performance (Amersham Biosciences) für 2 h bei 4 $^\circ\text{C}$ auf einem Schüttler dem Proteinextrakt inkubiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (4000 $\text{xg}/$ 4 $^\circ\text{C}/$ 5 min) abgetrennt und gewaschen wie unter 2.5.9. beschrieben. Die so erhaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE (vgl. 2.5.10.1) getrennt und im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert (vgl. 2.5.10.3).

Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden separate 6 cm Schalen mit STEN-Lyse-Puffer lysiert (vgl. 2.5.4.1) und die entsprechenden Proteine immunpräzipitiert (vgl. 2.5.9).

Zum Nachweis der Reinternalisierung wurden die Zellen nach der letzten Inkubation mit PBS-Puffer (Ca, Mg) mit 2 ml vorgewärmtem Grundmedium für die entsprechenden Zeitintervalle bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert, einmal mit PBS-Puffer (Ca, Mg) gewaschen und anschließend dreimal für je 15 min mit Glutathion-Puffer behandelt, um alles an der Zelloberfläche verbliebene Biotin zu entfernen. Schließlich wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS-Puffer (Ca, Mg) gewaschen, mechanisch abgelöst und wie oben beschrieben weiter behandelt.

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den sekundären Modifikationen der beiden Aspartylproteasen BACE-1 und BACE-2, sowie deren subzellulärer Lokalisation und intrazellulärem Transport.

Zudem werden die katalytischen Spezifitäten der beiden Proteasen bezüglich β APP genauer untersucht.

3.1 Expression und Nachweis von BACE-1 und BACE-2

Um diese Problemstellungen bearbeiten zu können, musste ein geeignetes Modellsystem ausgewählt werden. In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in Gewebekulturzellen sowohl aus exogenem als auch aus endogenem β APP, A β Peptide entstehen (Busciglio et al., 1993; Haass et al., 1992b; Koo and Squazzo, 1994; Shoji et al., 1992).

Da die Prozessierung des β APP in allen Zell- und Gewebetypen sehr ähnlich verläuft (Haass et al., 1992b), wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293) bereits in zahllosen vorangegangenen Studien zur Beschreibung der proteolytischen Prozessierung von β APP verwendet. Im Gegensatz zu neuronalen Zelllinien stellen HEK293 Zellen ein leicht zu transfizierendes System dar und bieten vielseitige analytische Ansatzpunkte. Auch zur Beschreibung der verschiedenen Sekretaseaktivitäten, die die Entstehung der A β -Peptide beeinflussen, wurde dieses System in der Vergangenheit häufig herangezogen (Capell et al., 1998; Citron et al., 1992; Lammich et al., 1999), zudem erfolgte auch die Klonierung der β -Sekretase in dem hier verwendeten Zellsystem (Vassar et al., 1999).

3.1.1 Expression von BACE-1 und BACE-2 in HEK293 Zellen

Da insbesondere BACE-1 im gewählten Zellsystem endogen nur sehr schwach exprimiert wird und somit mit den üblichen proteinbiochemischen Methoden nur schwer nachweisbar ist, wurden die beiden Proteasen exogen stabil exprimiert. Zur Selektion der BACE-1 bzw. BACE-2 stabilen Linie wurden zwei unterschiedliche Selektionsantibiotika verwendet, so dass die Herstellung einer Zelllinie, die beide Enzyme stabil coexprimiert, ebenfalls möglich war.

Um die Analyse der β APP-Prozessierung zu erleichtern, wurden zur Transfektion von BACE-1 und BACE-2 HEK293 Zelllinien gewählt, die neben endogenem β APP₇₅₁ zusätzlich die verkürzte neuronale Isoform β APP₆₉₅ exprimieren [(Haass et al., 1992b) vgl. auch 1.3.1.] Einerseits ist durch die höhere Expression des exogenen β APP₆₉₅ die Detektion der Prozessierungsprodukte erleichtert, andererseits können exogenes und endogenes Holoprotein aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichtes leicht getrennt werden.

Zusätzlich wurde BACE-1 in einer HEK293 Zelllinie mit exogener Expression von β APP_{sw} exprimiert, da bekannt ist, dass β APP_{sw} durch die β -Sekretase verstärkt prozessiert wird (Citron et al., 1992; Citron et al., 1995).

3.1.2 Antikörper zum Nachweis von BACE-1 und BACE-2

Um artifizielle Funktionen oder Prozessierungsvorgänge der Proteasen, die durch eine Konjugation der Proteasen entstehen könnten, zu vermeiden, wurde überwiegend nicht konjugierte („ungetaggte“) cDNA in HEK293 Zellen exprimiert. Aus diesem Grund war es nötig, spezifische Antikörper (AK) gegen BACE-1 und BACE-2 herzustellen.

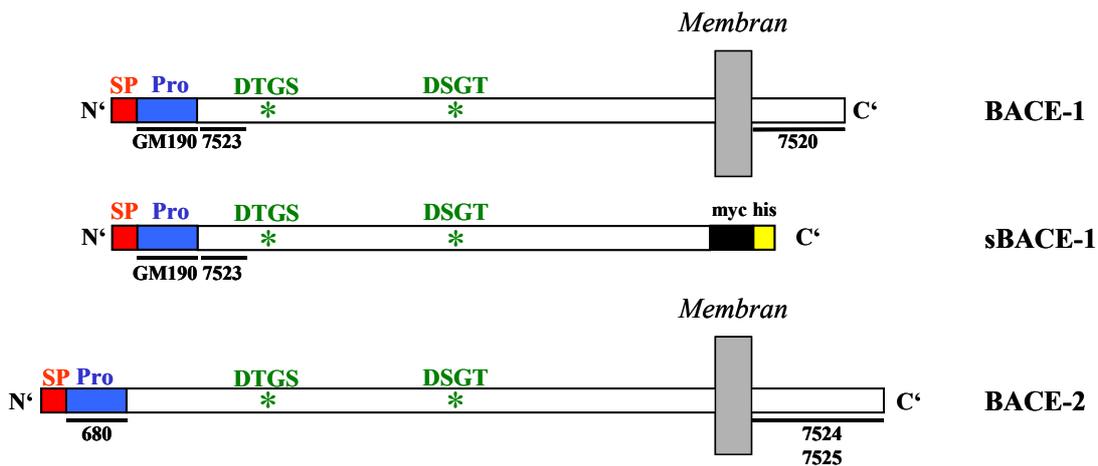


Abbildung 13: Modellzeichnung der verwendeten Konstrukte mit Angabe der entsprechenden Antikörper.

Die Aspartylprotease Motive (DTGS und DSGT) in BACE-1 und BACE-2 sind mit einem Stern (grün) gekennzeichnet. Ferner sind Signalpeptid (SP; rotes Rechteck), Prodomäne (Pro; blaues Rechteck) und die zelluläre Membran (graues Rechteck) markiert. Die Konjugate „myc“ (schwarzes Rechteck) und „his“ (gelbes Rechteck) sind angegeben und die von den entsprechenden Antikörpern erkannte Domäne ist mit einer Linie gekennzeichnet.

Für BACE-1 wurden drei verschiedenen polyklonale Antikörper generiert. AK GM190 gegen die Prodomäne, AK 7523 gegen den N-Terminus und AK 7520 gegen den C-Terminus (vgl. Abbildung 13). Für BACE-2 wurden ebenfalls drei verschiedene Antikörper generiert: AK 680 gegen die Prodomäne und die AK 7524/7525 gegen den C-Terminus (vgl. Abbildung 13). Die Antikörper 7524 und 7525 sind gegen die selbe Domäne von BACE-2 gerichtet, wurden aber in zwei unabhängigen Ansätzen gewonnen. Es stellte sich heraus, dass AK 7524 deutlich besser zur Detektion von BACE-2 im Western Blot geeignet ist, während Antikörper 7525 die besseren Ergebnisse in der Immunpräzipitation liefert (vgl. auch 3.1.3).

Die Gewinnung eines spezifischen AK gegen den N-Terminus der BACE-2 Protease war nicht möglich, da in diesem Bereich die Homologie zwischen BACE-1 und BACE-2 sehr stark ausgeprägt ist.

3.1.3 Spezifität der Antiseren und Nachweis von BACE-1 und BACE-2 im Western Blot

Um zu beweisen, dass die Antiseren spezifisch Ihr Zielprotein erkennen und nicht mit dem homologen Protein kreuzreagieren, wurden Membranfraktionen von Zellen, die stabil mit BACE-1 oder BACE-2 transfiziert wurden, isoliert. Als Kontrolle dienten Membranen von Zellen, die nur β APPwt, aber weder BACE-1 noch BACE-2, exogen exprimieren.

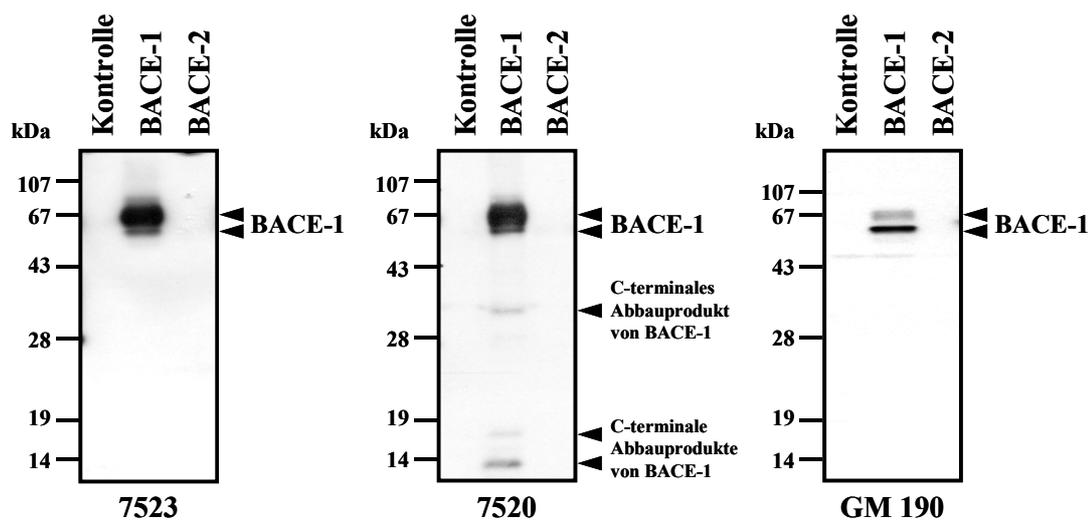


Abbildung 14: Nachweis von BACE-1 im Western Blot und Spezifität der verwendeten Antikörper.

Membranproteinextrakte von untransfizierten HEK293 Zellen (Kontrolle) und HEK293 Zellen mit exogener BACE-1 oder BACE-2 Expression wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt. BACE-1 wurde im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern nachgewiesen.

Sowohl N-terminaler (7523) als auch C-terminaler (7520) AK gegen BACE-1 erkennen im Western Blot in BACE-1 transfizierten Zellen jeweils eine prominente Bande bei ca. 70 kDa und eine schwache bei ca. 65 kDa (vgl. Abbildung 14 linke und mittlere Spalte). AK 7520 erkennt darüber hinaus zusätzliche Banden bei ca. 30 kDa und bei

15-20 kDa. Hierbei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Abbauprodukte von BACE-1, die ausschließlich in BACE-1 transfizierten Zellen nachweisbar sind, mit steigendem Expressionslevel verstärkt auftreten und folglich vermutlich auf die exogene Expression des Proteins zurückzuführen sind. GM 190, ein Antikörper der gegen die BACE-1 Prodomäne gerichtet ist, erkennt die Bande bei 70 kDa deutlich schwächer als die beiden anderen Antikörper. Die 65 kDa wird hingegen genauso gut, oder besser, erkannt. Die beiden Banden repräsentieren matures (70 kDa) und immatures (65 kDa) BACE-1 [(Capell et al., 2000; Haniu et al., 2000; Huse et al., 2000) und vgl. auch 3.2.]. Die Prodomäne von BACE-1 wird im Zuge der Maturierung durch Furin, oder eine Furin-ähnliche Protease abgespalten (Bennett et al., 2000b; Creemers et al., 2001) und ist daher in der 70 kDa Bande kaum mehr nachweisbar. Eventuell ist aufgrund der Überexpression des Proteins, die Propeptid abspaltende Protease gesättigt und die Propeptidabspaltung somit nicht mehr quantitativ.

Aus Abbildung 14 ist ersichtlich, dass die in dieser Arbeit verwendeten AK gegen BACE-1 überexprimiertes BACE-1 sehr gut detektieren, endogenes BACE-1 aufgrund der geringen Expression in HEK293 Zellen jedoch nicht detektieren. Weiterhin wird deutlich, dass diese AK spezifisch für BACE-1 sind und BACE-2 nicht erkennen.

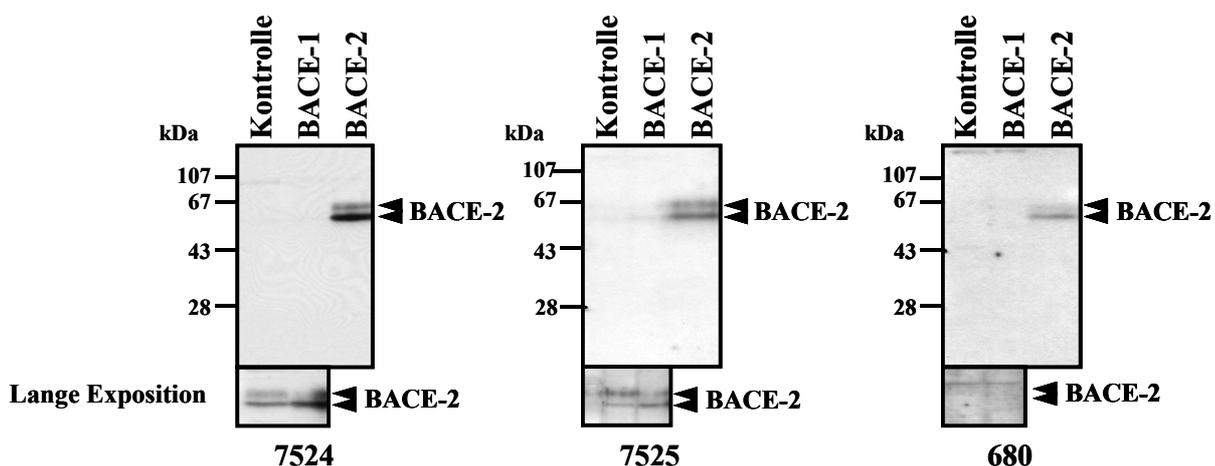


Abbildung 15: Nachweis von BACE-2 im Western Blot und Spezifität der verwendeten Antikörper.

Membranproteinextrakte von untransfizierten HEK293 Zellen (Kontrolle) und HEK293 Zellen mit exogener BACE-1 oder BACE-2 Expression wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt. BACE-2 wurde im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern nachgewiesen. Gezeigt sind jeweils zwei unterschiedlich lange Expositionen des selben Western Blots.

Die beiden AK (7524, 7525) gegen die C-terminale Domäne von BACE-2 zeigen in BACE-2 transfizierten Zellen jeweils zwei Banden von 62 kDa bzw. 65 kDa (vgl. Abbildung 15 linke und mittlere Spalte). Ähnlich BACE-1, handelt es sich auch hier um die immature und mature Form des Enzyms [(Acquati et al., 2000) und vgl. auch 3.2.]. Auffällig ist, dass, anders als für BACE-1 die immature Bande von BACE-2 genauso stark, oder sogar stärker nachweisbar ist, als die mature. Dies legt die Vermutung nahe, dass die BACE-2 Maturierung weniger effizient verläuft als die des BACE-1. Nach längerer Exposition ist mit beiden C-terminalen Antikörpern die endogene Form von BACE-2 nachweisbar (vgl. Abbildung 15). Auffällig ist, dass in Zellen, die beide Enzyme ausschließlich endogen exprimieren (Kontrolle) im Verhältnis zur maturen Form deutlich weniger immatures BACE-2 nachweisbar ist, als in Zellen die eines der beiden Enzyme zusätzlich exogen exprimieren.

Grund hierfür kann eventuell eine Beeinflussung der BACE-2 Maturierung in Abhängigkeit von der Menge an aktivem BACE-1 sein, oder aber eine Sättigung des sekretorischen Prozessierungsweges (vgl. 4.2).

Der AK 680 ist spezifisch gegen die BACE-2 Prodomäne gerichtet, die im Zuge der Maturierung autokatalytisch abgespalten wird (Hussain et al., 2001). Zu erwarten wäre folglich, dass AK 680 verstärkt die immature Bande (62 kDa) erkennt. Im vorliegenden Fall werden jedoch beide Banden in einem ähnlichen Verhältnis erkannt wie durch die beiden C-terminalen AK (vgl. Abbildung 15 rechte Spalte). Im Gegensatz zu den beiden C-terminalen Antikörpern kann aber mit dem für die Prodomäne spezifischen Antikörper auch nach längerer Exposition kein endogenes BACE-2 nachgewiesen werden. Vermutlich erfolgt die autokatalytische Propeptid Abspaltung endogen bevorzugt bei niedrigen pH-Werten (Hussain et al., 2001) und somit in einem definierten Zellkompartiment, das möglicherweise aufgrund der exogenen Expression nur von einem geringen Teil des exprimierten Proteins erreicht wird. Bemerkenswert ist, dass alle drei AK ausschließlich in BACE-2 transfizierten Zellen Signale liefern und somit eine Kreuzreaktion mit BACE-1 ausgeschlossen werden kann.

Die Tatsache, dass endogenes BACE-2 in HEK293 Zellen nachweisbar ist, während endogenes BACE-1 nicht detektierbar ist, steht in Einklang mit den für die beiden Proteine ermittelten mRNA Level in peripheren Geweben. Danach ist die Menge an BACE-1 mRNA in Nierengeweben deutlich geringer, als die an BACE-2 (Bennett et al., 2000a; Vassar et al., 1999).

3.2 Posttranslationale Modifikationen von BACE-1 und BACE-2

3.2.1 Glykosylierung

Die meisten im ER synthetisierten Proteine werden durch kovalente Bindung von Zuckern glykosyliert.

Die Übertragung der Oligosaccharide im ER erfolgt unmittelbar während der Peptidsynthese durch eine membrangebundene Glykosyltransferase, die ihr „Zielasparagin“ mit Hilfe folgender Konsensus-Sequenz erkennt: -N(X)-[S/T]-, wobei x jede beliebige AS außer Prolin sein kann. Mit Hilfe von Tunikamyzin, einem Antibiotikum mit Analogie zum UDP-N-Acetylglucosamin, kann die Bildung des Core-Oligosaccharids schon in der ersten Stufe gehemmt werden und die N-Glykosylierung vollständig unterbunden werden. In Gegenwart von Tunikamyzin kann folglich die vollständig unglykosylierte Form eines Proteins nachgewiesen werden. Zwischen der sog. Core-Glykosylierung im ER und der Komplex-Glykosylierung im Golgi-Apparat kann analytisch mit Hilfe verschiedener Glykosidasen unterschieden werden. Endoglykosidase H (Endo H) spaltet beispielweise selektiv die nicht komplexierten mannosereichen Zuckerreste, die im ER angefügt wurden, ab (Tarentino and Maley, 1974; Tarentino et al., 1974). Komplexe Zuckerketten an Asparagin-Resten, die durch Modifikation der Zuckerreste im Golgi-Apparat entstanden sind, sind hingegen resistent gegen eine Behandlung mit EndoH, können aber z.B. mit N-Glykosidase F (PNGase F) abgespalten werden.

Neben N-glykosidischer Bindung an Asparaginseitenketten, können Oligosaccharide auch kovalent an Serin- und Threoninreste gebunden sein. Diese Bindung wird als O-glykosidische Bindung bezeichnet und erfolgt ausschließlich im Golgi-Apparat. O-glykosidisch gebundene Zuckerreste sind resistent gegen eine Behandlung mit PNGase F (Tarentino et al., 1985).

3.2.1.1 Kinetik der Maturierung von BACE-1 und BACE-2

Die Doppelbanden in Abbildung 14 und Abbildung 15 geben bereits Grund zu der Annahme, dass BACE-1 und BACE-2 sekundär durch Glykosylierung modifiziert werden. Wenn die beiden Banden unterschiedlicher Größe auf Glykosylierungsvorgänge im ER und Golgi-Apparat zurückzuführen sind, so muss eine Unterscheidung der beiden Banden im zeitlichen Verlauf möglich sein, da die Proteine nach erfolgter Core-Glykosylierung im ER zur weiteren Modifikation der Oligosaccharidseitenketten mit Hilfe von Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert werden.

Um diesen Vorgang im zeitlichen Verlauf sichtbar zu machen, wurden Zellen, die entweder BACE-1 oder BACE-2 exogen exprimieren, kurz mit [³⁵S]-Methionin/Cystein haltigem Medium inkubiert (= Pulse). Hierbei werden die in diesem Zeitraum neu synthetisierten Proteine radioaktiv markiert. Werden die Zellen anschließend mit nicht-radioaktivem Grundmedium (= Chase) inkubiert, so werden die von diesem Zeitpunkt an synthetisierten Proteine nicht mehr markiert und es besteht die Möglichkeit selektiv, die Veränderungen der markierten Proteinpopulation zu verschiedenen Zeitpunkten zu verfolgen. Durch Immunpräzipitation der zu den verschiedenen Zeitpunkten erhaltenen Lysate mit AK 7520 bzw. AK 7525 konnte spezifisch die Veränderung von BACE-1 bzw. BACE-2 betrachtet werden.

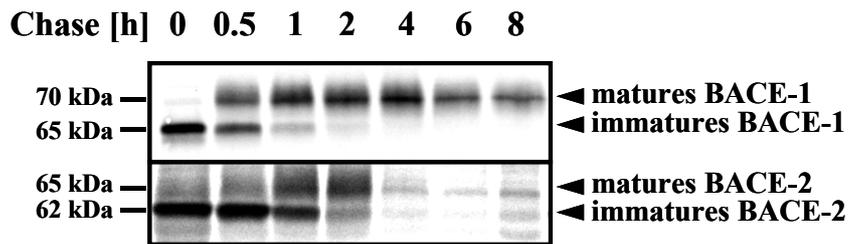
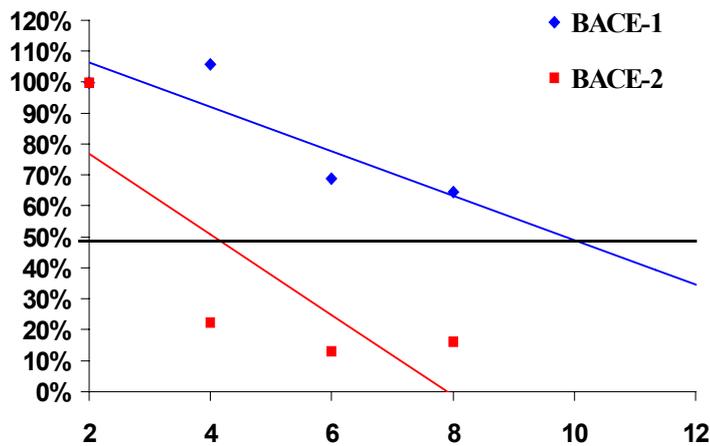
A**B**

Abbildung 16: BACE-1 und BACE-2 im „Pulse Chase“ Experiment.

A) HEK293 Zellen mit stabiler exogener BACE-1 bzw. BACE-2 Expression wurden 15 min mit [³⁵S]Methionin/Cystein markiert und anschließend für die angegebenen Zeitintervalle mit nicht-radioaktivem Medium inkubiert (= Chase). Die Zellen wurden lysiert und BACE-1 mit AK 7520 bzw. BACE-2 mit AK 7525 immunpräzipitiert. Abgebildet ist eine Autoradiographie der PVDF Membran nach Trennung der Proteine durch 10 % SDS-PAGE und Protein-Transfer. Matures und immatures BACE-1 bzw. BACE-2 sind gekennzeichnet. B) Dargestellt ist die Menge an maturem BACE-1 (blau) bzw. BACE-2 (rot) bezogen auf die Menge an maturem Protein zum Zeitpunkt 2 h. Die Halbwertszeit wurde durch lineare Regression abgeschätzt.

Das unmittelbar nach dem „Pulse“ erhaltene Lysat zeigt sowohl für BACE-1 als auch für BACE-2 nahezu ausschließlich eine Bande bei 65 kDa bzw. 62 kDa. Es handelt sich hierbei um die Ausgangsproteinpopulation, die während der Radiomarkierung in der Zelle synthetisiert wurde. Nach 30 min Inkubation mit nicht-radioaktivem Medium sind bereits ca. 50 % der betrachteten BACE-1 Population in die mature Form übergegangen, während BACE-2 noch größtenteils als immatures Protein vorliegt. Nach insgesamt 1 h „Chase“ liegt BACE-1 überwiegend in der maturen Form vor, während BACE-2 noch zu ca. 50 % in der immatures Form detektiert wird. Im weiteren Verlauf des Experiments kann der Abbau der beiden Proteine beobachtet werden. Auffällig ist, dass matures BACE-1 nach

8 h „Chase“ noch gut nachgewiesen werden kann, während BACE-2 bereits nach 4 h Inkubation mit nicht-radioaktivem Medium kaum mehr detektierbar ist. Angenommen BACE-2 wird wie auch BACE-1 nicht oder nur zu sehr geringem Anteil sezerniert (Benjannet et al., 2001), errechnet sich für BACE-1 eine 2-3fach längere Halbwertszeit als für BACE-2.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass beide Proteine eine zeitabhängige Veränderung ihres Molekulargewichtes erfahren, die mit großer Wahrscheinlichkeit auf Glykosylierung und anschließende Modifikation der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidseitenketten in den räumlich getrennten Organellesystemen ER und Golgi-Apparat beruht.

Weiterhin wird deutlich, dass BACE-2 einerseits tendenziell langsamer maturiert, als BACE-1, aber andererseits die mature Form von BACE-2 deutlich instabiler ist, als die des homologen Proteins.

3.2.1.2 Glykosylierung von BACE-1 und BACE-2 im ER und Golgi-Apparat

Um mit letzter Sicherheit zeigen zu können, dass die beiden Banden unterschiedlichen Molekulargewichtes durch Glykosylierung hervorgerufen werden, wurden die beiden Proteine mit spezifischen Glykosidasen behandelt bzw. die Maturierung von BACE-1 und BACE-2 in der Zelle durch Behandlung mit Tunikamyzin blockiert (vgl. 3.2.1).

Für BACE-1 konnte auf diese Weise bereits in vorausgegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass es sich bei der kleineren Bande (65 kDa) um eine core-glykosylierte Form im ER handelt, wohingegen die größere Bande (70 kDa) eine komplex-glykosylierte Form im oder nach dem Golgi-Apparat repräsentiert (Capell et al., 2000; Haniu et al., 2000; Huse et al., 2000).

Analog dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit die Glykosylierung der BACE-2 Protease untersucht. Um nachzuweisen, dass BACE-2 grundsätzlich eine N-Glykosylierung erfährt, wurden HEK293 Zellen mit exogener BACE-2 Expression für 15 min mit [³⁵S]-Methionin/Cystein haltigem Medium inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde unmittelbar nach der radioaktiven Markierung lysiert, der andere Teil wurde 2 h mit nicht-radioaktivem Vollmedium inkubiert. Die Zellen wurden während des gesamten

Experimentes entweder mit 10 µg/ml Tunikamyzin oder mit einer entsprechenden Menge DMSO behandelt.

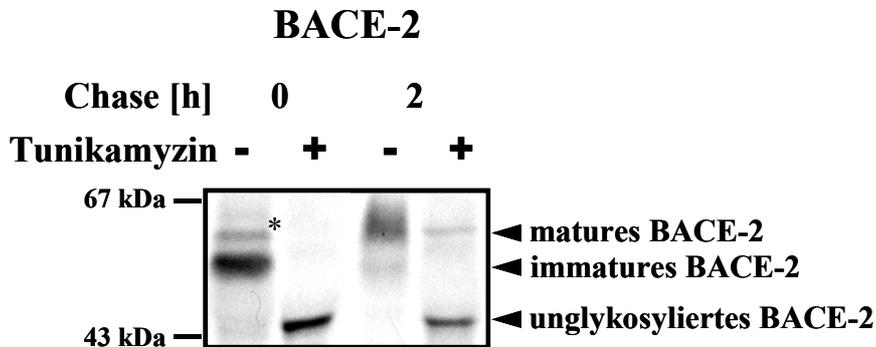


Abbildung 17: Tunikamyzin Behandlung von BACE-2 exprimierenden Zellen.

HEK293 Zellen mit stabiler BACE-2 Expression wurden entweder in Gegenwart von 10 µg/ml Tunikamyzin (+) oder in Gegenwart einer entsprechenden Menge DMSO (-) mit [³⁵S]Methionin/Cystein markiert und anschließend bis zu den angegebenen Zeitpunkten mit nicht-radioaktivem Medium inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und BACE-2 mit AK 7525 immunpräzipitiert. Abgebildet ist eine Autoradiographie der PVDF-Membran nach Trennung der Proteine durch 8 % SDS-PAGE und Protein-Transfer. Bei der mit einem Stern (*) markierten Bande handelt es sich vermutlich um immatures BACE-2, das die Prodomäne noch enthält, oder um eine nur partiell maturierte Form des Enzyms.

Zellen, die unmittelbar nach der radioaktiven Markierung lysiert und nicht mit Tunikamyzin wurden, zeigen fast ausschließlich die immature Form des BACE-2 (Abbildung 17; Spur 1 und Abbildung 16). Darüber hinaus kann eine weitere Form, deren Molekulargewicht zwischen dem der maturen und der imaturen Bande liegt, nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei entweder um immatures BACE-2, das die Prodomäne noch enthält, oder um eine bereits partiell maturierte Form des Enzyms.

Nach 2 h Inkubation mit nicht-radioaktivem Medium wird fast ausschließlich die mature und ein geringer Teil der immaturen Form des BACE-2 nachgewiesen (Abbildung 17; Spur 3).

In Gegenwart von Tunikamyzin erhält man unmittelbar nach der radioaktiven Markierung ausschließlich eine Bande von ca. 45 kDa, entsprechend der aus der Proteinsequenz errechneten Masse (Abbildung 17; Spur 2). Nach zweistündiger Inkubation mit nicht-radioaktivem Medium in Gegenwart von Tunikamyzin ist ebenfalls hauptsächlich die unglykosylierte Form des Enzyms nachweisbar. Die Hemmung der N-Glykosylierung durch Tunikamyzin war jedoch nicht vollständig, da ein kleiner Teil des Proteins in der maturen Form nachgewiesen werden kann (Abbildung 17; Spur 4).

Aus diesen Ergebnissen kann eindeutig geschlossen werden, dass BACE-2 unmittelbar nach seiner Synthese am ER durch N-Glykosylierung modifiziert wird.

Um zu zeigen, dass die im ER angefügten Oligosaccharidseitenketten im Golgi-Apparat modifiziert werden, wurden Zellen mit exogener BACE-2 Expression erneut für 15 min mit [³⁵S]-Methionin/Cystein haltigem Medium markiert und anschließend 2 h mit nicht-radioaktivem Medium inkubiert. Nach Immunpräzipitation des BACE-2 Proteins wurden 50 % des Präzipitates mit PNGase F behandelt, während die anderen 50 % nur mit dem entsprechenden Puffer inkubiert wurden.

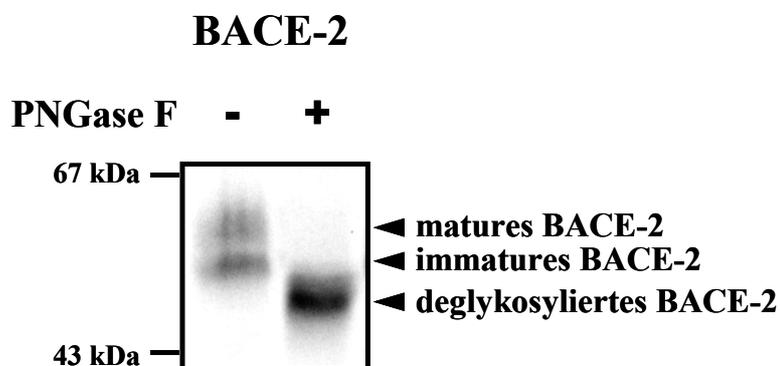


Abbildung 18: N-Glykosidase-F Behandlung von BACE-2.

HEK293 Zellen mit stabiler BACE-2 Expression wurden mit [³⁵S]Methionin/Cystein markiert und anschließend 2 h mit nicht-radioaktivem Medium inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und BACE-2 mit AK 7525 immunpräzipitiert. Die eine Hälfte des Immunpräzipitates wurde über Nacht mit PNGase F (+) behandelt, während die andere Hälfte nur mit dem entsprechenden Puffer (-) inkubiert wurde. Abgebildet ist eine Autoradiographie der PVDF-Membran nach Trennung der Proteine durch 8 % SDS-PAGE und Protein-Transfer.

Der unbehandelte Teil des Präzipitates zeigt wie erwartet matures und immatures BACE-2, während nach Behandlung mit PNGase F ausschließlich eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa nachweisbar ist, die die deglykosylierte Form des Proteins repräsentiert.

Analog zur beschriebenen Behandlung mit PNGase F, wurde zusätzlich eine Behandlung mit Endo H durchgeführt, um zwischen mannosereichen und komplexen Oligosaccharidseitenketten unterscheiden zu können.

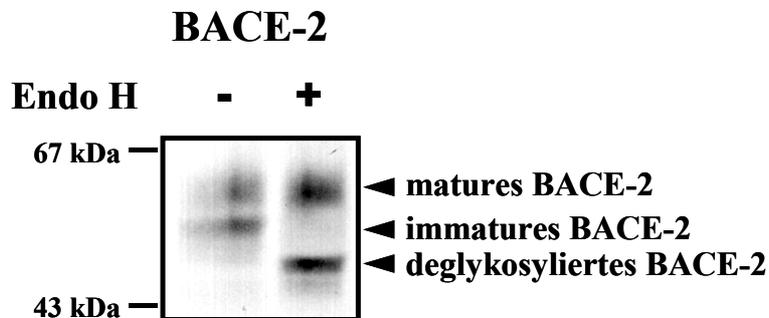


Abbildung 19: Endoglykosidase H Behandlung des BACE-2.

HEK293 Zellen mit stabiler BACE-2 Expression wurden mit [³⁵S]Methionin/Cystein markiert und anschließend 2 h mit nicht-radioaktivem Medium inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und BACE-2 mit AK 7525 immunpräzipitiert. Die eine Hälfte des Immunpräzipitates wurde über Nacht mit Endo H (+) behandelt, während die andere Hälfte mit dem entsprechenden Puffer (-) behandelt wurde. Abgebildet ist eine Autoradiographie der PVDF-Membran nach Trennung der Proteine durch 8 % SDS-PAGE und Protein-Transfer.

Im Gegensatz zur Behandlung mit PNGase F sind nach der Behandlung mit Endo H zwei Banden nachweisbar. Matures BACE-2 ist resistent gegen die Endo H Behandlung, während die immature Bande vollständig in die deglykosylierte Form überführt wird.

Folglich repräsentiert die mature, 65 kDa große, Bande eine komplex-glykosylierte Form des Proteins und bestätigt damit die Annahme, dass BACE-2 nach Core-Glycosylierung im ER in den Golgi-Apparat exportiert wird.

Zusammenfassend kann festgestellt werden: BACE-2 wird, wie auch BACE-1, in einer für Transmembranproteine typischen Weise N-glykosyliert und dabei vom ER bis zum Golgi-Apparat transportiert.

3.2.2 Phosphorylierung

Die Phosphorylierung von Proteinen ist ein wichtiger Regulationsmechanismus biologischer Vorgänge und nimmt bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen sowie bei der Signalübertragung eine zentrale Stellung ein (Hunter, 1995; Krebs, 1993). Phosphorylierungsvorgänge werden durch Proteinkinasen katalysiert, die den γ -Phosphorylrest von ATP oder GTP kovalent auf Serin-, Threonin- oder in einigen Fällen auch auf Tyrosin-Reste der entsprechenden Substratproteine übertragen. Phosphorylierte Proteine können durch Phosphoproteinphosphatasen wieder dephosphoryliert und in ihren Grundzustand zurückversetzt werden (Cohen, 1992; Wera and Hemmings, 1995).

3.2.2.1 Matures BACE-1 wird an S498 in der zytoplasmatischen Domäne phosphoryliert

Um herauszufinden, ob BACE-1 durch Phosphorylierung sekundär modifiziert wird, wurden Zellen mit exogener Expression von β APPwt und BACE-1 mit [32 P]Orthophosphat markiert. Phosphorylierung und Dephosphorylierung erfolgen *in vivo* meist in sehr kurzen Zeitabständen, so dass der Nachweis eines phosphorylierten Proteins häufig sehr schwierig ist. Okadasäure (OA) hemmt die Dephosphorylierung von Proteinen durch Proteinphosphatase 1 (PP1) und PP2A (Cohen et al., 1990), sodass phosphorylierte Proteine akkumulieren, und die Analyse phosphorylierter Proteine deutlich erleichtert ist.

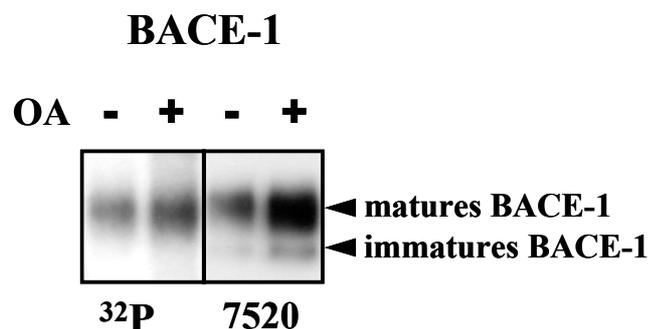


Abbildung 20: BACE-1 wird im Zellkulturmodell phosphoryliert.

HEK293 Zellen mit exogener Expression von β APPwt und BACE-1 wurden entweder in Gegenwart von 0,2 μ M OA (+) oder der entsprechenden Menge DMSO (-) mit [32 P]Orthophosphat markiert. BACE-1 wurde aus den Zelllysaten mit AK 7520 immunpräzipitiert und die erhaltenen Proteine mittels 12 % SDS-PAGE getrennt. Der Nachweis erfolgte durch Autoradiographie (32 P) der entsprechenden PVDF-Membran und anschließende Detektion von BACE-1 mit AK 7520 auf der selben Membran.

Die Autoradiographie zeigt sowohl im unbehandelten Ansatz, als auch nach OA - Behandlung ein deutliches Signal. Da Phosphorylierung von Membranproteinen in der Regel erst nach Erreichen des TGN oder späterer subzellulärer Kompartimente stattfindet, ist zu erwarten, dass ausschließlich matures BACE-1 phosphoryliert wird. Im Gegensatz zur Autoradiographie zeigt der korrespondierende Western Blot, auf dem die Gesamtmenge an BACE-1 nachgewiesen wurde, auch immatures BACE-1, so dass davon ausgegangen werden kann, dass ausschließlich matures BACE-1 durch Phosphorylierung modifiziert wird.

Diese Vermutung wurde durch Behandlung der Immunpräzipitate nach vorausgegangener Phosphorylierung entweder mit Endo H oder PNGase F belegt (Walter et al., 2001a). Ferner konnte gezeigt werden, dass BACE-1 ausschließlich innerhalb der zytoplasmatischen Domäne phosphoryliert wird (Walter et al., 2001a).

Die zytoplasmatische Domäne von BACE-1 enthält einen einzigen Serin-Rest an Position 498, dessen Phosphorylierung aufgrund der umgebenden Aminosäuresequenz sehr wahrscheinlich ist. Um herauszufinden, ob S498 die Phosphorylierungsstelle von BACE-1 darstellt, wurde BACE-1 mit der Mutation S498A exogen in HEK293 Zellen exprimiert. BACE-1 S498A kann, im Gegensatz zu BACE-1 wt, an Position 498 nicht mehr phosphoryliert werden.

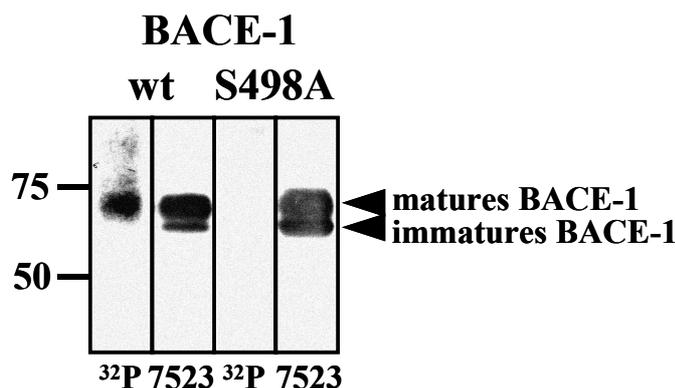


Abbildung 21: Phosphorylierung von BACE-1 an S498.

HEK293 Zellen mit exogener Expression von β APPwt und entweder BACE-1 wt oder BACE-1 S498A wurden in Gegenwart von 0,2 μ M OA mit [32 P]Orthophosphat markiert. BACE-1 wurde aus den Zelllysaten mit AK 7523 immunpräzipitiert und die erhaltenen Proteine mittels 12 % SDS-PAGE getrennt. Der Nachweis erfolgte durch Autoradiographie (32 P) der entsprechenden PVDF-Membran und Detektion des BACE-1 Proteins mit AK 7523 auf der selben Membran.

BACE-1 S498A wird im Gegensatz zu BACE-1 wt nicht mehr phosphoryliert, obwohl im entsprechenden Western Blot große Mengen Protein nachweisbar sind.

Folglich kann festgestellt werden, dass im Zellkulturmodell ausschließlich matures BACE-1 an S498 in der zytoplasmatischen Domäne phosphoryliert wird.

3.2.2.2 BACE-1 wird durch CK-1 an S498 phosphoryliert

Nachdem gezeigt werden konnte, dass BACE-1 ausschließlich an S498 phosphoryliert wird, stellt sich die Frage, welche Kinase die Phosphorylierung katalysiert.

Um diese Frage beantworten zu können, wurden Fusionsproteine bestehend aus Gluthathiontransferase (GST) und der zytoplasmatischen Domäne von BACE-1 (GST BACE-1 CT) hergestellt und *in vitro* unter Verwendung gereinigter Kinasen phosphoryliert. CK-1 und CK-2 wurden verwendet, da die potentielle Phosphorylierungsstelle S498 innerhalb eines sauren Erkennungsmotivs lokalisiert ist, und diese Kinasen deshalb für die Phosphorylierung dieses Serin-Restes prädestiniert sind (Tuazon and Traugh, 1991). PKA und PKC, die unter anderem das β -Sekretase Substrat β APP (Buxbaum et al., 1993; Hung et al., 1993; Nitsch et al., 1992) und PS1 (Walter et al., 1996; Walter et al., 1997) phosphorylieren, wurden als potentielle Negativkontrolle verwendet.

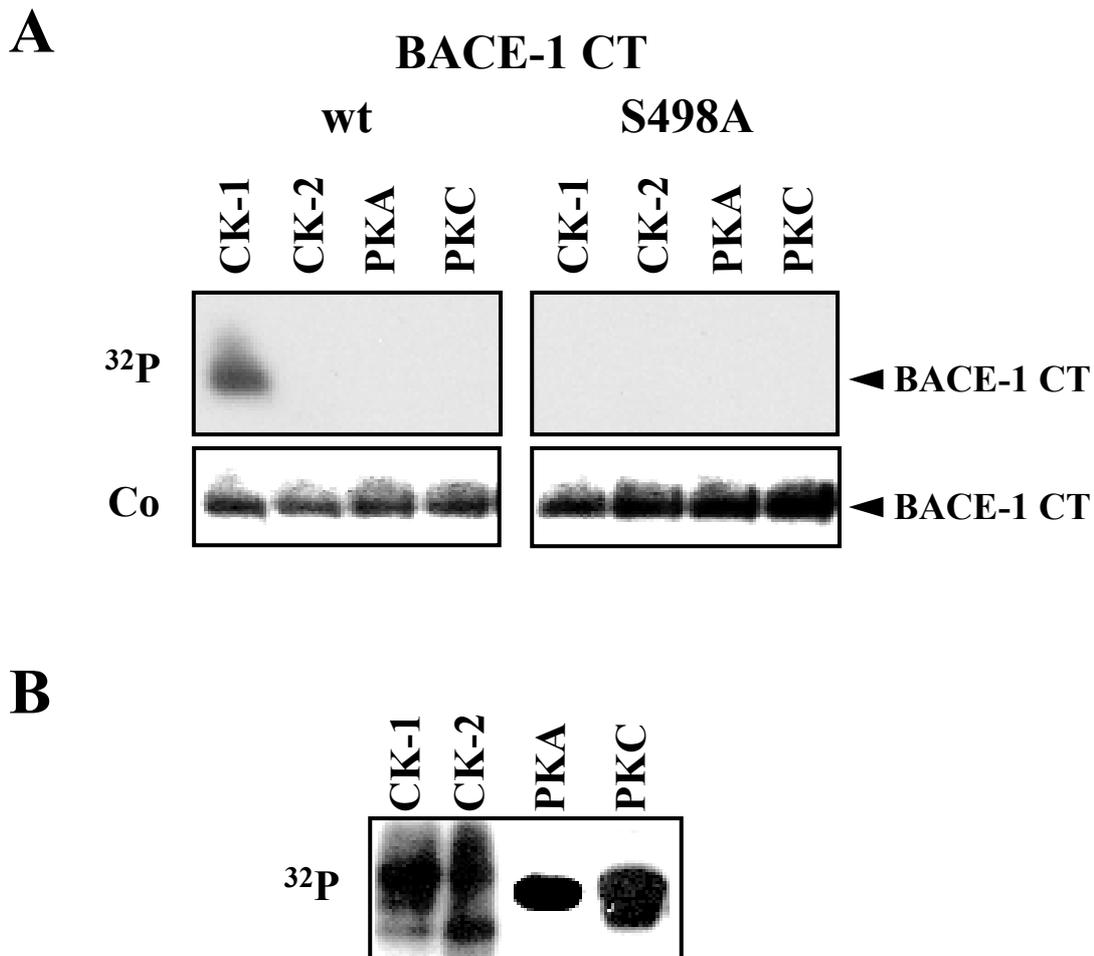


Abbildung 22: Casein Kinase-1 phosphoryliert BACE-1 an S498.

(A) Die Fusionsproteine GST BACE-1 CT wt oder GST BACE-1 CT S498A wurden *in vitro* durch CK-1, CK-2, PKA oder PKC in Gegenwart von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ phosphoryliert und die Reaktionsansätze mittels 12 % SDS-PAGE getrennt. Die Proteine wurden durch Autoradiographie (^{32}P) und Coomassie-Färbung (Co) des Gels nachgewiesen. (B) Die katalytische Aktivität der Kinasen wurde durch Verwendung von 1 mg/ml Phosvitin als Substrat für CK-1 und CK-2 bzw. 0,5 mg/ml Histon als Substrat für PKA und PKC nachgewiesen.

Ausschließlich CK-1 ist in der Lage GST BACE-1 CT wt *in vitro* zu phosphorylieren (vgl. Abbildung 22A), obwohl alle vier verwendeten Kinasen bei Verwendung des entsprechenden Kontrollsubstrates aktiv waren (vgl. Abbildung 22B) und vergleichbare Proteinmengen eingesetzt wurden (vgl. Abbildung 22A). Bei Verwendung von GST BACE-1 CT S498A als Substrat für den *in vitro* Phosphorylierungsansatz, bleibt auch mit CK-1 die Phosphorylierung aus, was S498 als Phosphorylierungsstelle bestätigt.

Die Phosphorylierung des GST BACE-1 CT wt Fusionsproteins durch Kinasen eines HEK293 Zelllysates, kann durch Hymenialdysin (HD), einen Inhibitor für CK-1, Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK 3 β) und Cyclin-abhängige Kinasen, gehemmt werden (Walter et al., 2001a).

Folglich kann davon ausgegangen werden, dass CK-1 eine mögliche Kinase ist, die BACE-1 auch *in vivo* phosphorylieren kann.

3.2.2.3 BACE-2 wird *in vitro* von CK1 an S511 phosphoryliert

Die zytoplasmatischen Domänen von BACE-1 und BACE-2 zeigen nur geringe Übereinstimmung, dennoch existiert zu S498 in BACE-1 ein homologes Serin an Position 511 der AS-Sequenz in BACE-2, das ebenfalls von sauren Resten umgeben ist. An Position 510 findet sich ein weiterer Serin-Rest, der ebenfalls eine potentielle Phosphorylierungsstelle darstellt.



Abbildung 23: Vergleich der zytoplasmatischen Domänen von BACE-1 und BACE-2.

Die Aminosäuresequenzen der zytoplasmatischen Domänen von BACE-1 und BACE-2 sind im Einbuchstabencode dargestellt. Die Nummerierungen geben die entsprechenden Positionen der AS innerhalb der gesamten Aminosäuresequenz wieder.

Um herauszufinden, ob und an welchem Serin-Rest die zytoplasmatische Domäne von BACE-2 phosphoryliert wird, wurde analog zu BACE-1 ein Fusionsprotein aus GST und der zytoplasmatischen Domäne von BACE-2 wt hergestellt. Für die Bestimmung der bevorzugten Phosphorylierungsstelle wurden zusätzlich Fusionsproteine mit folgenden Mutationen hergestellt: S510A, S511A und S510/511A.

Die *in vitro* Phosphorylierung wurde analog zu der von BACE-1 durchgeführt (vgl. 3.2.2.2).

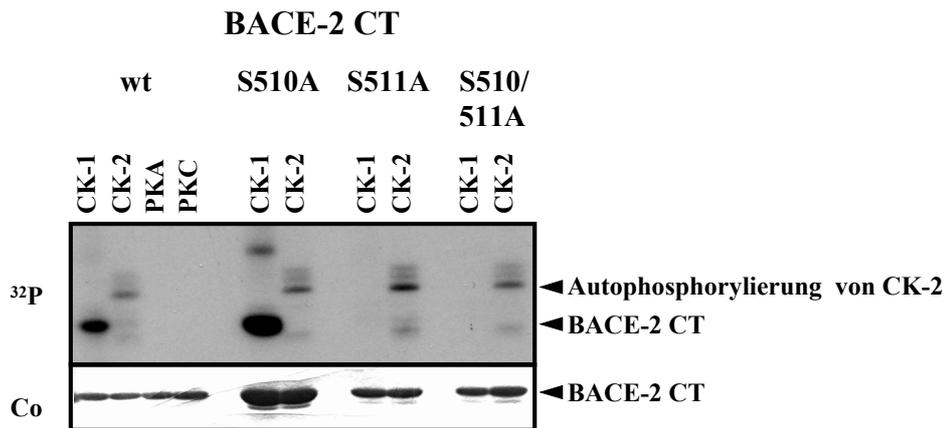


Abbildung 24: CK-1 phosphoryliert BACE-2 *in vitro* ausschließlich an S511.

Die Fusionsproteine GST BACE-2 CT wt, GST BACE-2 CT S510A, GST BACE-2 CT S511A oder GST BACE-2 CT S510/511A wurden *in vitro* durch CK-1, CK-2, PKA oder PKC in Gegenwart von [γ ³²P]ATP phosphoryliert und die Reaktionsansätze mittels 12 % SDS-PAGE getrennt. Die Proteine wurden durch Autoradiographie (³²P) und Coomassie-Färbung (Co) des Gels nachgewiesen.

Wie BACE-1 wird auch BACE-2 *in vitro* spezifisch durch CK-1 phosphoryliert, während PKA, PKC und CK-2 keine Wirkung zeigen (vgl. Abbildung 24 obere Spalte), obwohl alle verwendeten Kinasen in Gegenwart ihrer Kontrollsubstrate aktiv waren (vgl. Abbildung 22B) und in allen vier Reaktionsansätzen ausreichende Mengen Protein eingesetzt wurden (vgl. Abbildung 24 untere Spalte). Durch Mutation von S511 wird die Phosphorylierung von BACE-2 durch CK-1 vollständig verhindert (vgl. Abbildung 24 obere Spalte).

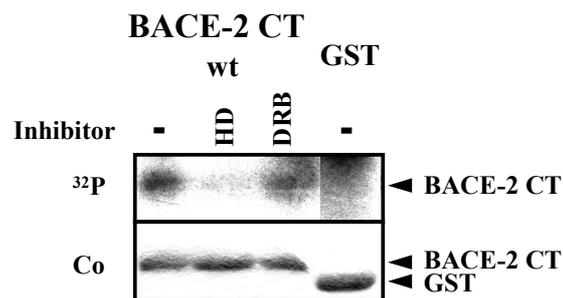


Abbildung 25: CK-1 aus HEK293 Zellysaten phosphoryliert BACE-2 *in vitro*.

HEK293 Zellysate wurden in Gegenwart von Hymenialdisin (HD), 5,6-Dichlorobenzimidazol-1- β -D-ribofuranosid (DRB) oder der entsprechenden Menge DMSO (-) mit Fusionsprotein GST BACE-2 CT wt inkubiert. Als Kontrolle wurde GST ohne weiteren Fusionsanteil verwendet. Anschließend wurden die Fusionsproteine unter Verwendung von GSH-Sepharose aus den Reaktionsansätzen isoliert und mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Autoradiographie (³²P) und Coomassie-Färbung (Co) des Gels.

Werden anstelle gereinigter Proteinkinasen, Zellysate als Quelle für die Kinasen verwendet, kann die Phosphorylierung von GST BACE-2 CT wt durch CK-1 ebenfalls reproduziert werden. In Gegenwart des CK-1 spezifischen Inhibitors HD (vgl. 3.2.2.2) bleibt die Phosphorylierung aus, während unter Verwendung von 5,6-Dichlorobenzimidazol-1- β -D-ribofuranosid (DRB) einem spezifischen Inhibitor für CK-2 (Zandomeni et al., 1986), die Phosphorylierung des Fusionsproteins immer noch möglich ist. Bei Verwendung von GST als Substrat bleibt die Phosphorylierung aus. Folglich ist die Phosphorylierung der Fusionsproteine nicht auf eine artifizielle Phosphorylierung dieses GST-Anteils zurückzuführen (vgl. Abbildung 25).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass auch BACE-2 *in vitro* innerhalb der zytoplasmatischen Domäne an S511 durch CK-1 phosphoryliert werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnten jedoch keine schlüssigen Daten erhalten werden, die bestätigen, dass BACE-2 auch *in vivo* phosphoryliert wird.

3.2.3 Sulfatierung

Proteine des sekretorischen Prozessierungsweges können sowohl durch kovalente Bindung von Sulfatresten an die komplexen Oligosaccharidseitenketten als auch an Tyrosin-Reste unmittelbar im Aminosäurerüst modifiziert werden. (Huttner, 1988). Tyrosinsulfatierung konnte bisher ausschließlich an Proteinen des sekretorischen Prozessierungsweges nachgewiesen werden. Grund hierfür ist vermutlich, dass die Lokalisierung der Tyrosylprotein Sulfotransferase (TPST) ausschließlich auf das TGN beschränkt ist. Membranproteine werden weiterhin nur in ihrer Ektodomäne sulfatiert, da die Domäne der TPST, die das aktive Zentrum enthält, im Lumen des TGN lokalisiert ist (Niehrs et al., 1994). Eine aktive Desulfatierung der Tyrosinreste konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Huttner, 1988).

Für β APP selbst konnte in vorangegangenen Arbeiten Tyrosinsulfatierung nachgewiesen werden (Oltersdorf et al., 1990; Weidemann et al., 1989). Im folgenden wurde untersucht, ob BACE-1 und BACE-2 ebenfalls auf diese Weise modifiziert werden.

HEK293 Zellen mit exogener Expression von β APPwt, BACE-1 oder BACE-2 wurden mit [35 S]-Sulfat markiert und die entsprechenden Proteine mittels Immunpräzipitation isoliert. Um zwischen Sulfatierung des Aminosäuregerüsts und der Oligosacchridseitenketten unterscheiden zu können, wurde jeweils die Hälfte des Präzipitates mit PNGase F behandelt (vgl. 3.2.1)

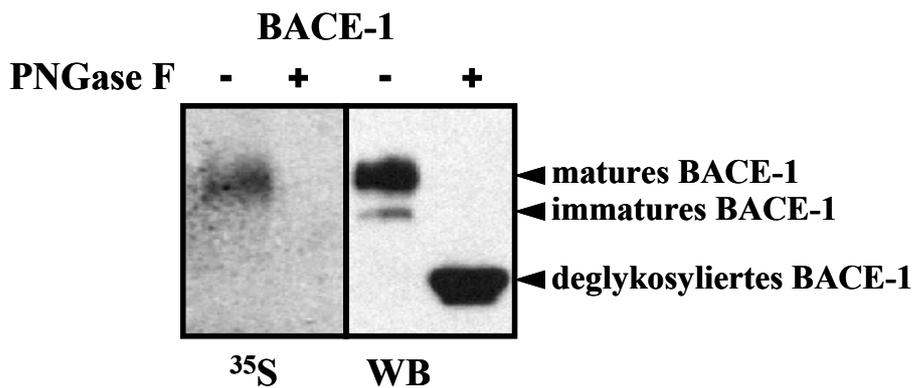
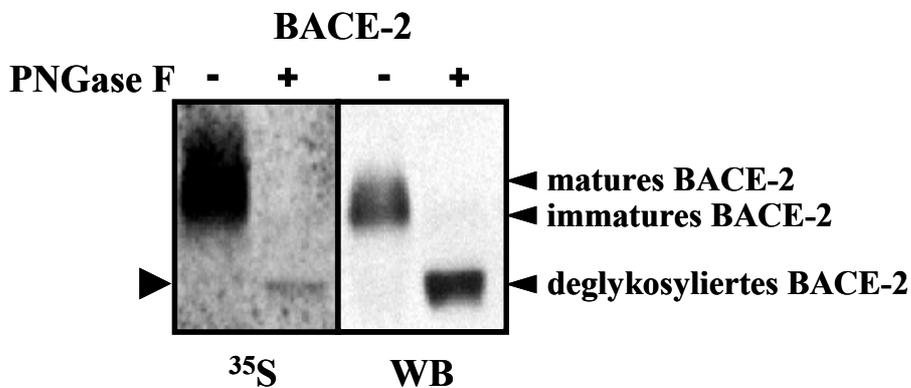
A**B**

Abbildung 26: *In vivo* Sulfatierung von BACE-1 und BACE-2.

HEK293 Zellen mit exogener Expression von BACE-1 (A) oder BACE-2 (B) wurden 2 h mit [35 S]-Sulfat markiert. Anschließend wurde BACE-1 mit AK 7520 und BACE-2 mit AK 7525 immunpräzipitiert. Jeweils 50 % des Präzipitates wurde über Nacht mit (+) oder ohne (-) PNGase F bei 37 °C inkubiert. Die Proteine wurden mittels 10 % SDS-PAGE getrennt und nach Protein-Transfer mittels Autoradiographie (35 S) und Detektion der selben Membran mit den entsprechenden AK (WB) nachgewiesen.

Die mature Form des BACE-1 Proteins zeigt einen deutlich nachweisbaren Sulfateinbau. Nach Deglykosylierung mittels PNGase F ist jedoch kein radioaktives Signal mehr detektierbar (vgl. Abbildung 26A). BACE-2 hingegen bleibt auch nach Behandlung mit PNGase F radiomarkiert (vgl. Abbildung 26B). Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass BACE-1 ausschließlich innerhalb seiner Oligosaccharidseitenketten sulfatiert wird, während BACE-2 auch eine kovalente Sulfataddition innerhalb seines Aminosäuregerüsts aufweist. Da das radioaktive Signal im Falle von BACE-2 nach PNGase F Behandlung stark abnimmt, muss geschlossen werden, dass auch BACE-2 zusätzlich innerhalb der Kohlehydratreste sulfatiert wird.

Eine computergestützte Sequenzanalyse liefert nur einen Tyrosin-Rest in der BACE-2 Ektodomäne, der für die Sulfatierung in Betracht kommt, was erklärt, warum das radioaktive Signal verglichen mit dem Proteinnachweis im Western Blot sehr schwach ist.

3.3 Subzelluläre Lokalisierung von BACE-1 und BACE-2

Zahlreiche Proteine sind, in Abhängigkeit von bestimmten Signalsequenzen, in definierten Kompartimenten der Zelle lokalisiert, anderen ist kein Kompartiment eindeutig zuzuweisen. Bei Membran- und sekretorischen Proteinen ist die Zuordnung zu bestimmten Kompartimenten häufig erschwert, da sie während der Maturierung den sekretorischen Prozessierungsweg vollständig durchlaufen und deshalb in allen Kompartimenten nachweisbar sind.

3.3.1 Oberflächenlokalisierung von BACE-1 und BACE-2 und Reinternalisierung in endosomale Kompartimente

Viele proteolytische Prozesse, u.a. auch die Spaltung von β APP durch α -Sekretase, finden bevorzugt an der Zelloberfläche statt (Lammich et al., 1999; Sisodia, 1992). Deshalb stellte sich die Frage, ob auch BACE-1 und BACE-2 an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Eine gute und sensitive Methode zum Nachweis von Oberflächenproteinen ist die Biotinylierung. Dabei wird ein nicht zellgängiges Biotinderivat mittels einer N-hydroxysulfosuccinimidester-Gruppe kovalent an die Aminogruppen der Oberflächenproteine gebunden (Green et al., 1971). Durch Präzipitation mit Streptavidin konjugierter Sepharose können die biotinmarkierten Proteine selektiv isoliert werden (Chalet and Wolf, 1964; Wilcheck M. and Bayer E.A., 1990). Die Biotinylierung von BACE-1 und BACE-2 wurde mit HEK293 Zellen die entweder BACE-1 oder BACE-2 exogen exprimieren durchgeführt.

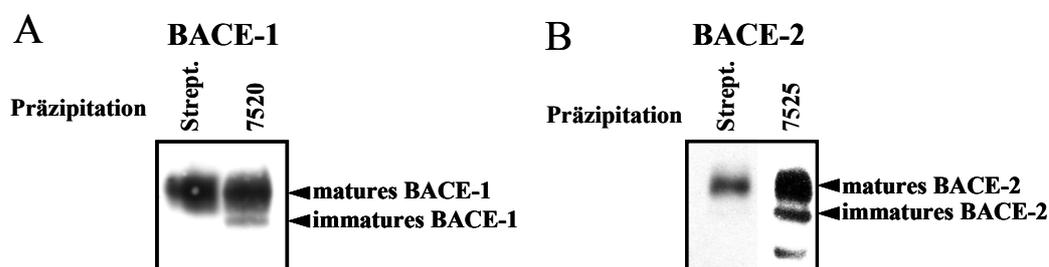


Abbildung 27: Die maturen Formen von BACE-1 und BACE-2 sind an der Zelloberfläche lokalisiert.

Die Oberflächenproteine von HEK293 Zellen mit exogener Expression von BACE-1 (A) oder BACE-2 (B) wurden mit EZ-linkTM Sulfo-NHS-SS-Biotin markiert und mit Streptavidin konjugierter Sepharose (Strept.) isoliert. Parallel dazu wurde BACE-1 mit AK 7520 und BACE-2 mit AK 7525 isoliert. Die so gewonnenen Proteine wurden mittels 10 % SDS-PAGE getrennt und BACE-1, im Western Blot mit AK 7520 bzw. BACE-2 mit AK 7524 nachgewiesen.

Sowohl BACE-1 als auch BACE-2 sind an der Zelloberfläche lokalisiert. Bemerkenswert ist, dass selektiv die mature Form des BACE-1 bzw. BACE-2 biotinyliert wird.

Um herauszufinden, ob und wie schnell BACE-1 und BACE-2 von der Zelloberfläche reinternalisiert werden, wurden die Zellen nach Biotinylierung bis zu 1 h bei 37 °C inkubiert. Proteine, die während der Inkubationszeit von der Zelloberfläche zurück in das Zellinnere gelangen, sind nun ebenfalls biotinmarkiert.

Um diese Proteine von den an der Zelloberfläche verbliebenen Proteinen zu unterscheiden, wurde das an die Oberflächenproteine gebundene Biotin nach Ende der Inkubationszeit durch Reduktion der Disulfidbrücke im Biotinderivat mit Glutathion-Puffer entfernt. Die Biotinmarkierungen im Inneren der Zelle sind hingegen resistent gegen die Behandlung mit dem reduzierenden Puffer.

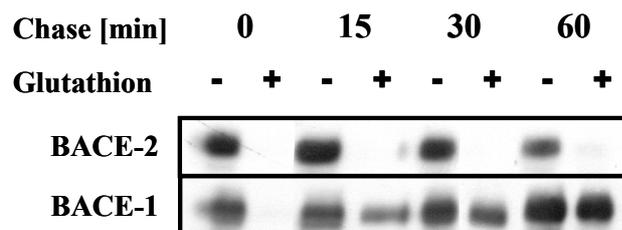


Abbildung 28: BACE-1 wird schnell von der Zelloberfläche reinternalisiert, BACE-2 hingegen nicht.

HEK293 Zellen mit exogener Expression von BACE-1 oder BACE-2 wurden mit EZ-linkTM Sulfo-NHS-SS-Biotin markiert und für die angegebenen Zeitintervalle bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Glutathion-Puffer behandelt (+) oder direkt lysiert (-) und die biotinylierten Proteine mit Streptavidin konjugierter Sepharose isoliert. Die so gewonnen Proteine wurden mittels 10 % SDS-PAGE getrennt und BACE-1, im Western Blot mit AK 7520 bzw. BACE-2 mit AK 7524 nachgewiesen.

Die Behandlung mit Glutathion-Puffer zum Zeitpunkt 0 unmittelbar nach der Biotinylierung, führt zu einer vollständigen Entfernung der Biotinmarkierung bei BACE-1 und BACE-2, während im unbehandelten Kontrollansatz beide Proteine mit Streptavidin konjugierter Sepharose isoliert werden konnten. Bereits nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37 °C ist eine deutlich nachweisbare BACE-1 Fraktion resistent gegen die Behandlung mit Glutathion-Puffer, während BACE-2 nahezu vollständig an der Zelloberfläche verbleibt. Auch nach 1 h Inkubation bei 37 °C ist keine Reinternalisierung von BACE-2 nachweisbar, während die reinternalisierte Proteinmenge von BACE-1 mit steigender Inkubationszeit stetig zunimmt.

Das Ergebnis zeigt, dass BACE-1 nach Erreichen der Zelloberfläche sehr schnell reinternalisiert wird, während BACE-2 entweder lange an der Zelloberfläche verbleibt und unmittelbar nach der Reinternalisierung vollständig abgebaut wird, oder aber innerhalb seiner Ektodomäne proteolytisch gespalten wird und in den extrazellulären Raum sezerniert wird.

3.3.2 Die Phosphorylierung des BACE-1 beeinflusst die subzelluläre Lokalisierung

Proteinphosphorylierung reguliert u.a. den Transport von Proteinen zwischen den Kompartimenten wie z.B. die Reinternalisierung von der Zelloberfläche, den Transport aus dem Golgi-Apparat an die Zelloberfläche oder den Rücktransport zum TGN (Alberts et al., 2002; Jones et al., 1995; Molloy et al., 1998).

Um herauszufinden, ob die Phosphorylierung von BACE-1 an S498 tatsächlich für einen dieser zellulären Transportvorgänge verantwortlich ist, wurden zwei Mutanten von BACE-1 generiert. BACE-1 S498D enthält statt eines Serin-Restes einen negativ geladenen Aspartat-Rest und ahmt somit den phosphorylierten Zustand des Proteins nach, während S498A, mit einem hydrophoben Rest anstelle des Serin-Restes den unphosphorylierten Zustand repräsentiert. Die Expression dieser beiden Mutanten wurde der Behandlung der Zellen mit phosphorylierungsstimmulierenden bzw. -hemmenden Agentien vorgezogen, um unspezifische Effekte zu vermeiden.

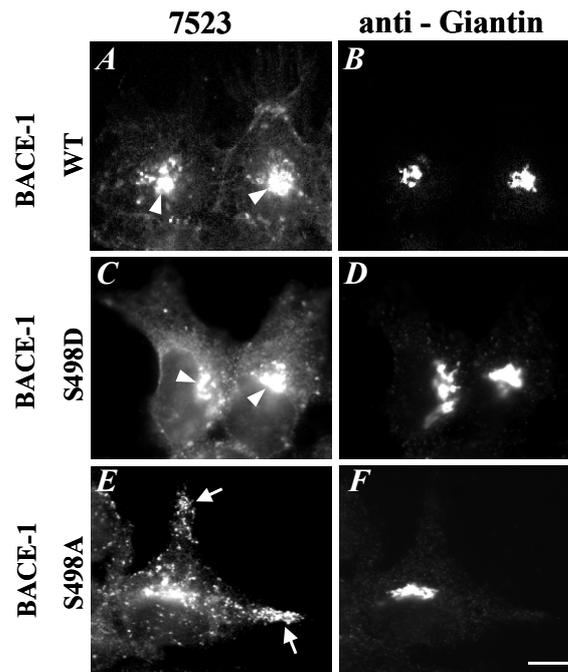


Abbildung 29: Mutationen an S498 von BACE-1 beeinflussen die subzelluläre Lokalisierung des Proteins.

HEK293 Zellen mit exogener Expression von BACE-1 wt (A/B), BACE-1 S498D (C/D) oder BACE-1 S498A (E/F) wurden auf Polylysin beschichteten Deckgläsern ausgesät, fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. BACE-1 wurde mit AK 7523 (A/C/E) markiert. Als Marker-Protein für den Golgi-Apparat diente Giantin (B/D/F).

BACE-1 wt und BACE-1 S498D zeigen eine vergleichbare Lokalisierung, die teilweise mit der Lokalisierung von Giantin übereinstimmt, sich darüber hinaus aber auch auf vesikuläre Kompartimente erstreckt. BACE-1 S498A hingegen weist weniger Kolo-kalisierung mit Giantin auf, ist aber stattdessen verstärkt in vesikulären Strukturen nachweisbar. Diese Beobachtung ist nicht auf einen klonalen Effekt der verwendeten Einzelzellklone zurückzuführen, da die Ergebnisse mit unterschiedlichen Zellklonen, sowie durch transiente Transfektion reproduziert werden konnten (Walter et al., 2001a).

Die Unterschiede in der subzellulären Lokalisierung sind auch nicht auf Maturierungsdefekte der mutierten BACE-1 Varianten zurückzuführen, sondern beruhen auf verändertem Rücktransport des Proteins zum TGN (Walter et al., 2001a). Ausgeschlossen werden konnte ferner, dass die BACE-1 Reinternalisierung von der Zelloberfläche phosphorylierungsabhängig erfolgt (Walter et al., 2001a). In diesem Zusammenhang spielt vielmehr ein LLK-Motiv im C-Terminus des Proteins eine wichtige Rolle (Huse et al., 2000).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass BACE-1 unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus von der Zelloberfläche in frühe endosomale Kompartimente reinternalisiert wird, anschließend aber nur die phosphorylierte Form des Proteins in späte Endosomen und zurück zum TGN transportiert wird. In den zuletzt genannten Kompartimenten ist darüberhinaus auch eine Kolo-kalisierung des Enzyms mit seinem Substrat β APP nachweisbar.

BACE-2 wird hingegen nach erfolgtem Transport zur Zelloberfläche offenbar nicht reinternalisiert, sondern entweder in den extrazellulären Raum sezerniert oder äußerst rasch nach Reinternalisierung abgebaut. Im Gegensatz zu BACE-1 erfolgt kein phosphorylierungsabhängiger Rücktransport aus Endosomen ins TGN.

3.4 Einfluss von BACE-1 und BACE-2 auf die Prozessierung von β APP und auf die Folgeprozessierung der A β -Spezies

BACE-1 und BACE-2 weisen die klassischen Aminosäuremotive einer Aspartylprotease auf (vgl. 1.2).

Die für Vertreter der Pepsinfamilie typischen hoch konservierten Sequenzmotive –D-T/S-G- bilden im fertig gefalteten Protein das katalytisch aktive Zentrum. Da es sich bei BACE-1 und BACE-2 um Transmembranproteine des Typ I handelt, befindet sich das aktive Zentrum der beiden Proteasen im Lumen von Vesikeln oder Organellsystemen bzw. im extrazellulären Raum.

3.4.1 Antikörper zum Nachweis von β APP und seinen Prozessierungsprodukten

β APP gehört ebenfalls zur Gruppe der glykosylierten Typ I Transmembranproteine. Während des Transportes vom ER zum Golgi-Apparat und schließlich zur Zelloberfläche kann β APP von α -, β - oder γ -Sekretasen proteolytisch prozessiert werden (vgl. 1.3.2). Die zum Nachweis der einzelnen proteolytischen Fragmente verwendeten Antikörper sind in Abbildung 30 dargestellt.

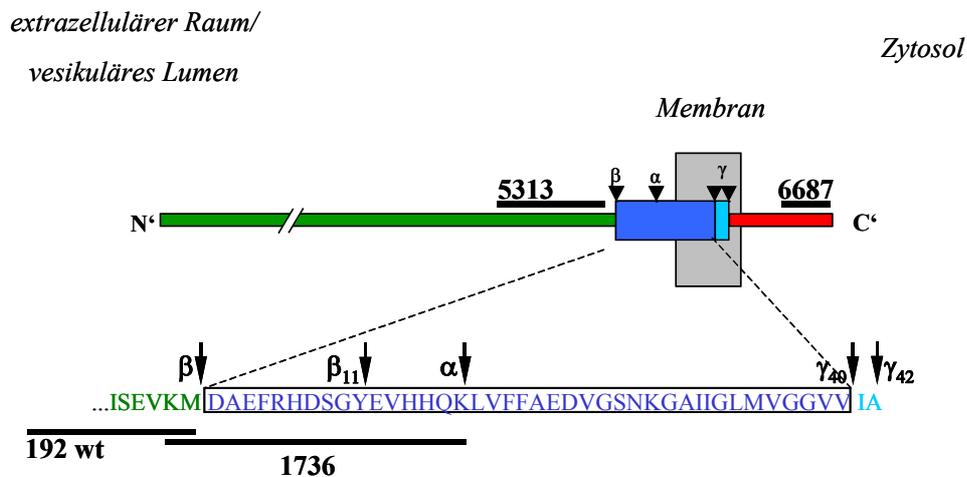


Abbildung 30: Schematische Darstellung des β APP-Proteins und der entsprechenden Antikörper Epitope.

Dargestellt ist eine Schemazeichnung des β APP. Die zelluläre Membran wird durch einen grauen Kasten symbolisiert. Die Ektodomäne des Proteins ist grün und die intrazelluläre Domäne (AICD) rot markiert. Die A β -Domäne wird durch einen vergrößerten blau unterlegten Kasten symbolisiert und ist zusätzlich mit Angabe der Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode dargestellt. Die potentiellen Schnittstellen der Sekretasen sind durch Pfeile symbolisiert und die Antigenepitope der verschiedenen Antikörper sind entsprechend gekennzeichnet.

AK 6687 (Walter et al., 2000) ist gegen die zytoplasmatische Domäne des β APP-Proteins gerichtet und detektiert alle membrangebundenen β APP Spezies (β APP Holoprotein, APP CTF) sowie AICD (vgl. 1.3.2). AK 5313 (Walter et al., 2000) kann zum Nachweis aller β APPs Spezies verwendet werden. Eine Unterscheidung zwischen β APPs α und β APPs β ist nicht möglich. Neben β APPs kann auch β APP Holoprotein mit AK 5313 detektiert werden. Zum spezifischen Nachweis von β APPs α wird AK 1736 (Haass et al., 1992b) verwendet. Es handelt sich hierbei um einen neoepitopspezifischen AK, der ausschließlich mit β APPs Spezies reagiert, die C-terminal im Bereich der α -Sekretase Schnittstelle enden.

Ein charakteristisches Produkt der β -Sekretase Spaltung ist β APPs β . Zum spezifischen Nachweis dieses Spaltproduktes dient AK 192wt (Seubert et al., 1993), ebenfalls ein neoepitopspezifischer AK, der ausschließlich β APPs-Spezies erkennt, die durch β -Sekretase Spaltung vor Asp1 der A β -Domäne aus β APPwt hervorgehen. AK 192wt ist nur zum Nachweis von denaturiertem Protein geeignet und kann deshalb ausschließlich zur Detektion im Western Blot eingesetzt werden und nicht zur Immunpräzipitation von nativem β APPs β .

Im Gegensatz zu AK 5313 reagieren AK 1736 und AK 192wt nicht mit β APP Holoprotein (Haass et al., 1992b; Seubert et al., 1993).

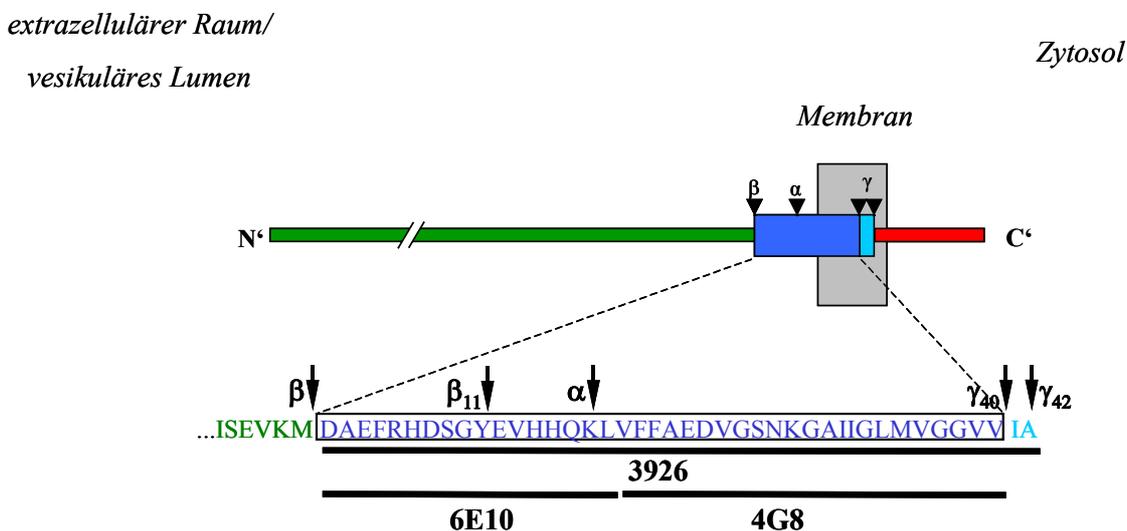


Abbildung 31: Darstellung der Antikörper gegen A β -Spezies mit ihren Epitopen.

Dargestellt ist die A β -Sequenz im Einbuchstabencode. Die Antigenepitope der verschiedenen Antikörper sind entsprechend gekennzeichnet.

Zum Nachweis der A β -Peptide stehen drei verschiedene AK zur Verfügung. AK 3926 (Wild-Bode et al., 1997) ist gegen die AS 1-42 der A β -Domäne gerichtet und erkennt alle A β -Spezies. AK 6E10 (AS 1-17) erkennt N-terminal verkürzte A β -Spezies nicht, wohingegen AK 4G8 (AS 17-24) eine Identifizierung N-terminal verkürzter Peptide, wie z.B. p3, ermöglicht.

3.4.2 Prozessierung von β APP durch BACE-1 und BACE-2

Die dominante A β -Spezies in Plaques eines an der Alzheimer Krankheit erkrankten Patienten sowie in verschiedenen Zellkulturmodellen, beginnt mit Asp1¹ (A β 1-40/42) (Glenner and Wong, 1984; Haass et al., 1992b; Masters et al., 1985a; Roher et al., 1993). Folglich muss die bevorzugte Schnittstelle der β -Sekretase zwischen M595 und D596, bezogen auf APP₆₉₅, liegen.

Neben den an Asp1 beginnenden A β -Spezies findet man vor allem in neuronalen Zellkulturmodellen auch zahlreiche N-terminal verkürzte A β -Spezies (Haass et al., 1992b; Wang et al., 1996). Die prominenteste unter diesen kürzeren Peptiden, ist A β 11-40/42 (Gouras et al., 1998; Haass et al., 1992b). Inhibitor-Studien legen nahe, dass die Prozessierung an Asp1 und Glu11 von der selben Protease katalysiert wird, während die übrigen, z.B. bei Val3 beginnenden Peptide eventuell auch durch andere Proteasen entstehen können (Capell et al., 1996; Citron et al., 1996; Gouras et al., 1998).

3.4.2.1 BACE-1 schneidet β APP an Position 1 und 11 der A β -Domäne

BACE-1 erfüllt alle von der β -Sekretase geforderten Kriterien [(Vassar et al., 1999) und vgl. auch 1.3.4.1.]. Es konnte gezeigt werden, dass BACE-1 im verwendeten Zellkulturmodell membrangebundenes β APP vor Asp1 und Glu11 schneidet (Farzan et al., 2000; Vassar et al., 1999). Dieses Ergebnis wird in Abbildung 32 bestätigt.

¹ Um die Nummerierung der A β -Peptide unabhängig von Isoformen des β APP zu machen, wird entsprechend der allgemein gebräuchlichen Nummerierung D596, bezogen auf β APP₆₉₅, mit Asp1 bezeichnet. Die folgenden AS der A β Domäne werden fortlaufend nummeriert.

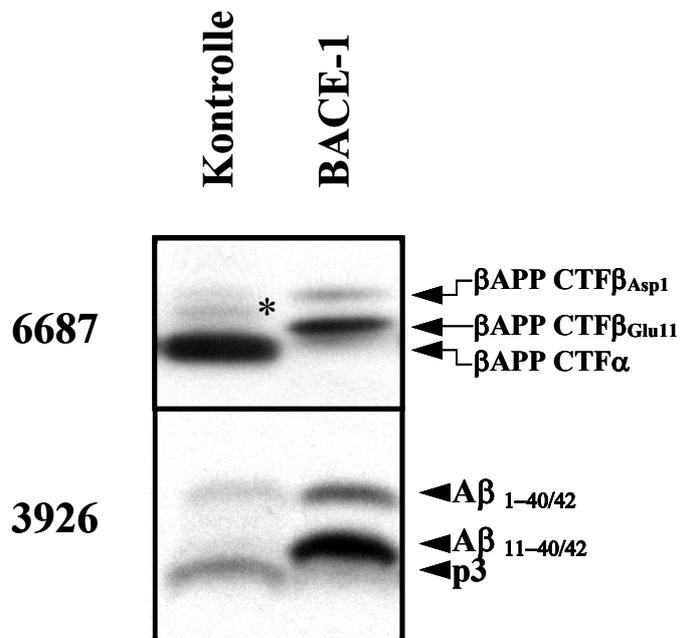


Abbildung 32: BACE-1 katalysiert die Spaltung von β APPwt an Asp1 und Glu11.

HEK293 Zellen mit exogener Expression von β APPwt sowie mit oder ohne (Kontrolle) exogener BACE-1 Expression wurden 4 h mit [35 S]Methionin/Cystein markiert. β APP CTFs wurden aus den Zellysaten mit AK 6687 und A β -Spezies aus den konditionierten Medien mit AK 3926 präzipitiert. Abgebildet ist eine Autoradiographie der PVDF Membran nach Trennung der Proteine mittels Tris-Tricine Gel und Protein-Transfer.

Wie erwartet ist in Zellen, die ausschließlich β APPwt exogen exprimieren, primär ein C-terminales β APP Fragment nachweisbar, das auf die Prozessierung durch α -Sekretase zurückzuführen ist [β APP CTF α ; (Haass et al., 1993)]. β APP CTF β_{Asp1} ist nur zu einem sehr geringen Anteil vorhanden, darüber hinaus ist eine zusätzliche Bande (*) nachweisbar, deren Natur in diesem Zusammenhang nicht explizit untersucht wurde, bei der es sich aber um N-terminal verkürzte β APP CTF handeln könnte (Haass et al., 1992b).

Im korrespondierenden konditionierten Medium wird hauptsächlich p3, das nach Prozessierung durch γ -Sekretase aus β APP CTF α entsteht, nachgewiesen (vgl. 1.3.2). Daneben findet sich auch A β 1-40/42, das γ -Sekretase Produkt aus β APP CTF β_{Asp1} (Haass et al., 1992b).

Wird nun zusätzlich BACE-1 in dieser Zelllinie exprimiert, findet sich im Lysat, ein weiteres C-terminales β APP Fragment (β APP CTF- β_{Glu11}), dessen Molekulargewicht zwischen dem des β APP CTF β_{Asp1} und β APP CTF α liegt. β APP CTF β_{Asp1} entsteht verglichen mit der Kontrollzelllinie in größerem Umfang, während β APP CTF α kaum nachweisbar ist.

Ein ähnliches Bild zeigt sich im zugehörigen Zellkulturüberstand. A β 1-40/42 entsteht wie erwartet verstärkt, während p3 kaum nachweisbar ist. Zusätzlich ist eine Bande mit größerem Molekulargewicht als p3 detektierbar.

Die Identität dieses Peptids wurde in einer anderen Arbeit durch Radiosequenzierung ermittelt (Capell et al., 2002). Es handelt sich um A β 11-40/42.

3.4.2.2 BACE-2 schneidet β APP an Position 20 der A β -Domäne

Die beiden Enzyme BACE-1 und BACE-2 sind zu 64 % homolog (vgl. 1.3.4.3), gleichen sich hinsichtlich ihrer Glykosylierung (vgl. 3.2.1) und besitzen konservierte Aspartylmotive, die ihre Eigenschaft als Proteasen bestimmen (vgl. 1.2. und 1.3.4). Trotz dieser Gemeinsamkeiten zeigen BACE-1 und BACE-2 deutliche Unterschiede bezüglich ihres subzellulären Transportes (vgl. 3.3). Folglich stellt sich die Frage, ob BACE-2 ebenfalls in der Lage ist β APP *in vivo* katalytisch zu spalten und ob die bevorzugten Schnittstellen denen des BACE-1 gleichen. *In vitro* Experimente mit synthetischen A β -Peptiden legen nahe, dass BACE-2 β APP vorzugsweise nach Phe19 oder Phe20 der A β -Domäne schneidet, während zu den von BACE-1 bevorzugten Prozessierungsstellen Glu11 und Asp1 keine oder nur eine sehr geringe Affinität besteht (Farzan et al., 2000). Um diesen Sachverhalt im Zellkulturmodell nachvollziehen zu können, wurden folgende HEK293 Zelllinien etabliert:

Bezeichnung der Zelllinie	Exogene Expression von		
	β APPwt	BACE-1	BACE-2
Kontrolle	+		
BACE-1	+	+	
BACE-2	+		+
BACE-1/ BACE-2	+	+	+

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.

Die in der entsprechenden Zelllinie exogen exprimierten Proteine sind jeweils mit „+“ gekennzeichnet.

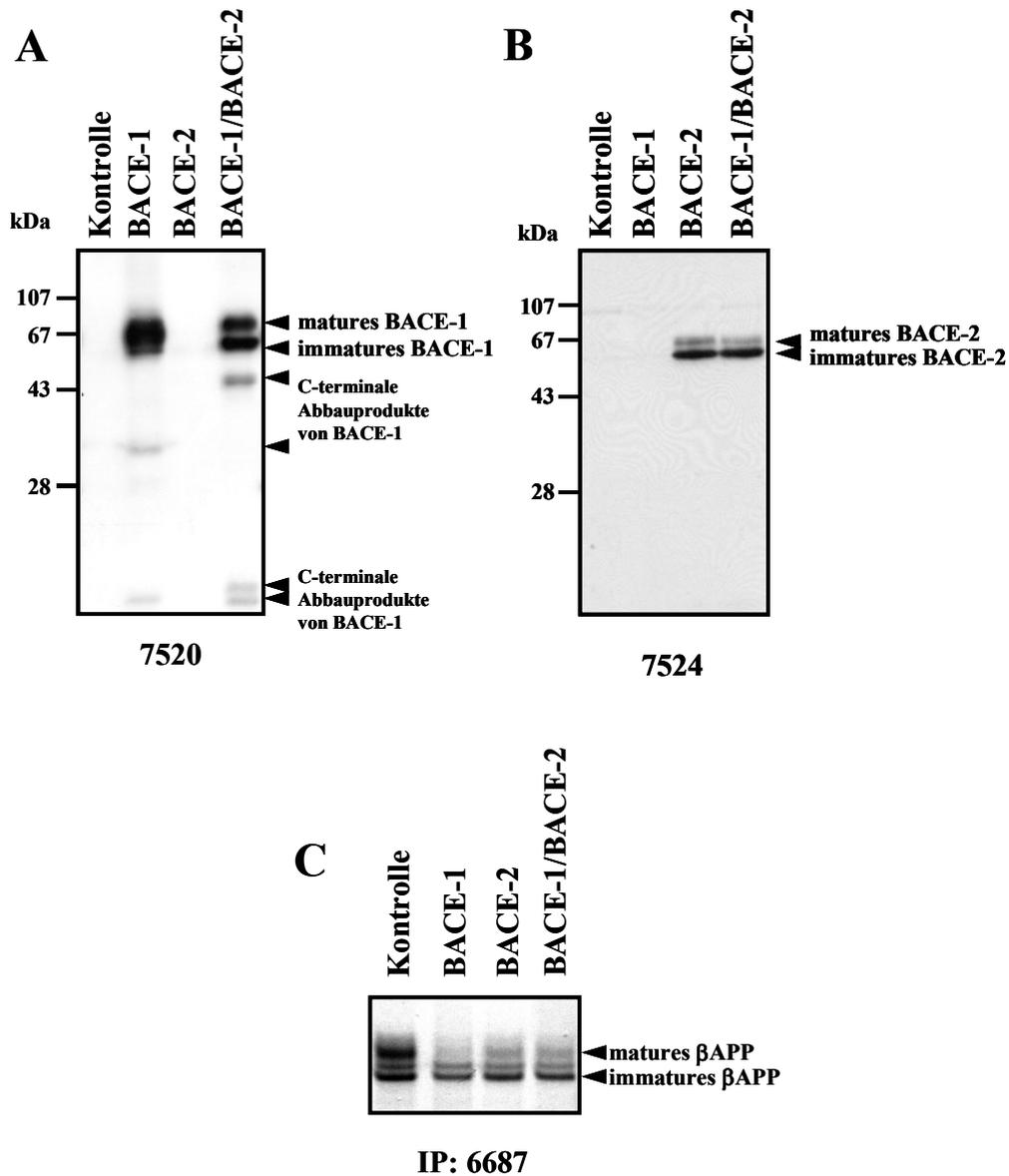


Abbildung 33: Proteinexpression in den verwendeten Zelllinien.

(A und B) Von Membranpräparationen der entsprechenden Zelllinien, wurden jeweils 100 μ g Gesamtprotein mittels 12 % SDS-PAGE getrennt. BACE-1 wurde nach Western Blot mit AK 7520 nachgewiesen (A), BACE-2 mit AK 7524 (B). (C) Zum Nachweis von β APPwt wurden die entsprechenden Zelllinien 4 h mit [35 S]Methionin/Cystein markiert und anschließend β APP aus Zelllysaten mit AK 6687 immunpräzipitiert. Abgebildet ist eine Autoradiographie der PVDF-Membran nach Trennung mittels 8 % SDS-PAGE und Protein-Transfer.

Alle verwendeten Zelllinien exprimieren vergleichbare Mengen immatures β APPwt (vgl. Abbildung 33C). Zelllinien, die eine der beiden Proteasen exogen exprimieren, weisen eine starke Reduktion an maturem β APPwt auf. Eine mögliche Ursache kann eine aufgrund der exogen exprimierten Proteasen erhöhte Prozessierung von maturen β APPwt sein.

BACE-2 wird ebenfalls in den beiden entsprechenden Zelllinien in vergleichbaren Mengen exprimiert (vgl. Abbildung 33B). Bezüglich der BACE-1 Expression fällt zum einen auf, dass in BACE-1 und BACE-2 coexprimierenden Zellen mehr immatures BACE-1 nachweisbar ist, als in ausschließlich BACE-1 exprimierenden Zellen. Zum anderen verändert sich das Muster der C-terminalen Abbauprodukte des BACE-1 in Gegenwart von BACE-2 (vgl. Abbildung 33A). Die Gesamtmenge an BACE-1 in den beiden Zelllinien ist aber vergleichbar, da die BACE-1/BACE-2 exprimierende Zelllinie aus der ausschließlich BACE-1 exprimierenden Linie hervorgegangen ist (vgl. 2.2.7).

Verglichen mit der BACE-2 Expression in den entsprechenden Zelllinien, entsteht der Eindruck, dass BACE-1 deutlich höher exprimiert wird als BACE-2. Da zur Detektion von BACE-1 und BACE-2 unterschiedliche polyklonale Antiseren verwendet wurden, ist jedoch ein direkter Vergleich der Enzymmengen nicht möglich.

Der Einfachheit halber wurden exemplarisch nur die zur weiteren Analyse verwendeten klonalen Zelllinien dargestellt. Insbesondere die Auswirkungen einer Koexpression von BACE-1 und BACE-2 sind aber in zahlreichen weiteren Einzelzellklonen vergleichbar.

Um die katalytische Spezifität von BACE-2 bezüglich β APP mit der von BACE-1 zu vergleichen, wurden die oben beschriebenen Zelllinien 4 h mit [35 S]Methionin/Cystein markiert und anschließend die proteolytischen Prozessierungsprodukte von β APP analysiert.

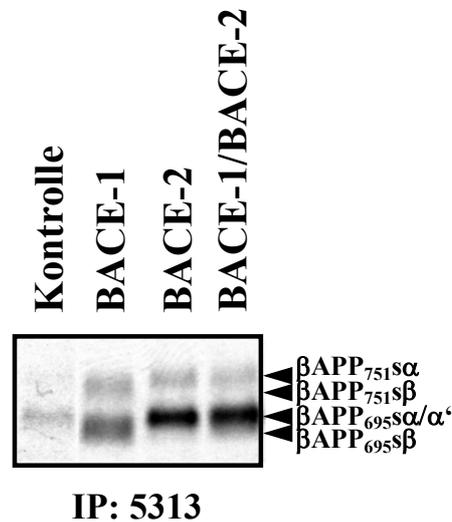


Abbildung 34: β APPs in BACE-1 und BACE-2 exprimierenden Zellen.

Die angegebenen Zelllinien wurden 4 h mit [35 S]Methionin/Cystein markiert und anschließend β APPs aus den konditionierten Medien mit AK 5313 immunpräzipitiert. Abgebildet ist eine Autoradiographie der PVDF-Membran nach Trennung der Proteine durch 8 % SDS-PAGE und Protein-Transfer.

In den konditionierten Medien der Zellen mit Expression eines der beiden Enzyme findet sich eine deutliche Erhöhung der β APPs Menge verglichen mit der Kontrollzelllinie. Dies unterstreicht erneut die proteolytische Aktivität sowohl von BACE-1 als auch BACE-2 bezüglich β APPwt. Weiterhin fällt auf, dass die β APPs Spezies in BACE-2 exprimierenden Zellen ein geringfügig höheres Molekulargewicht aufweisen, als in BACE-1 transfizierten Zellen. Das Molekulargewicht der β APPs Spezies in BACE-2 exprimierenden Zellen ist vergleichbar mit dem in der Kontrollzelllinie. In der Zelllinie die beide Proteasen exogen exprimiert findet sich eine Mischung aus beiden β APPs Spezies. Wie gezeigt werden konnte sezernieren die Kontrollzelllinien überwiegend β APPs α , das aus der Prozessierung von β APPwt durch die α -Sekretase hervorgeht (Haass et al., 1992b). In BACE-1 exprimierenden Zellen entsteht jedoch überwiegend β APPs β , das auf die Prozessierung von β APP an Asp1 der A β -Domäne zurückzuführen ist (Vassar et al., 1999). In Verbindung mit den Daten von Farzan et al. liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der β APPs Spezies in BACE-2 exprimierenden Zellen ebenfalls um eine β APPs α ähnliche Spezies (β APPs α') handelt.

Aus diesem Grund wurden konditionierte Medien der verschiedenen Zelllinien mit AK 1736 immunpräzipitiert und so spezifisch die Veränderung von sezerniertem β APPs α/α' betrachtet.

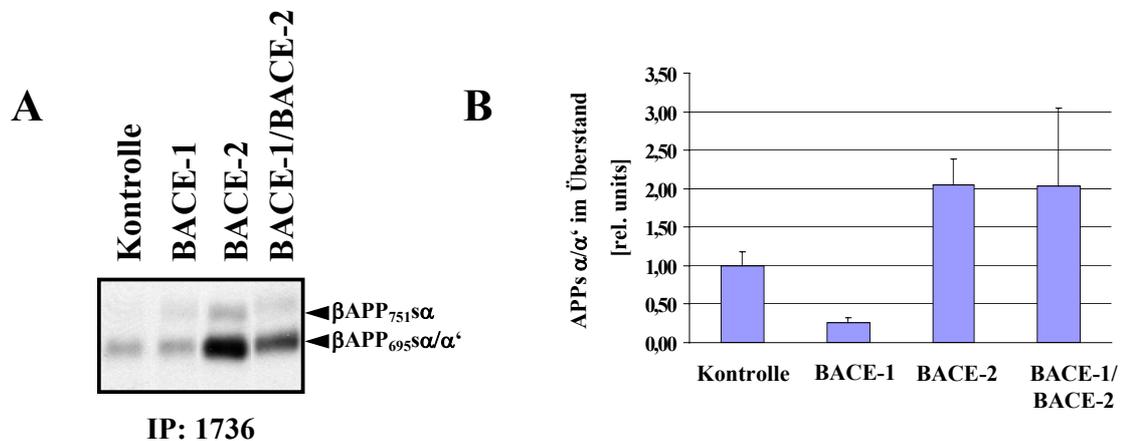


Abbildung 35: Qualitative und quantitative Analyse von β APPs α/α' in BACE-1 und BACE-2 exprimierenden Zellen.

(A) Die angegebenen Zelllinien wurden 4 h mit [³⁵S]-Methionin/Cystein markiert und anschließend β APPs α/α' aus den konditionierten Medien mit AK 1736 immunpräzipitiert. Abgebildet ist eine Autoradiographie der PVDF-Membran nach Trennung der Proteine durch 8 % SDS-PAGE und Protein-Transfer. (B) Quantitative Auswertung der β APPs α/α' Sezernierung. Die angegebenen Zelllinien wurden 15 min mit [³⁵S]Methionin/Cystein markiert und anschließend 4 h mit nicht radioaktivem Medium inkubiert. β APPwt wurde mit AK 6687 aus den Lysaten und β APPs α/α' mit AK 1736 aus den konditionierten Medien immunpräzipitiert. Dargestellt ist die Menge an sezerniertem β APPs α/α' nach 4 h bezogen auf die Gesamtmenge an immatorem β APP unmittelbar nach der radioaktiven Markierung. Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten sind angegeben.

Verglichen mit der Kontrollzelllinie ist in BACE-2 exprimierenden Zellen ein zweifacher Anstieg der β APPs α/α' Sezernierung festzustellen ($p=0,009$; Student'scher t-Test). In BACE-1 exprimierenden Zellen hingegen nimmt die β APPs α/α' Sezernierung im Vergleich zur Kontrollzelllinie auf fast ein viertel ab ($p=0,006$; Student'scher t-Test). Dies lässt den Schluss zu, dass zum einen in BACE-1 exprimierenden Zellen die α -Sekretase Prozessierung des β APP zu Gunsten der β -Sekretase Prozessierung zurückgedrängt ist (Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999) und zum anderen BACE-2 im zellulären System bezüglich membrangebundenem β APPwt eine andere katalytische Spezifität besitzt als BACE-1.

Tendenziell zeigen Zellen die beide Proteasen exogen exprimieren wie auch Zellen mit ausschließlich exogener BACE-2 Expression einen Anstieg der β APP α/α' Sezernierung im Vergleich zur Kontrollzelllinie. Ein statistisch signifikantes Ergebnis konnte in diesem Zusammenhang jedoch nicht reproduzierbar bestätigt werden.

Zur Ermittlung der exakten Schnittstelle von BACE-2 bezüglich β APP, wurden im folgenden die korrespondierenden β APP CTF untersucht.

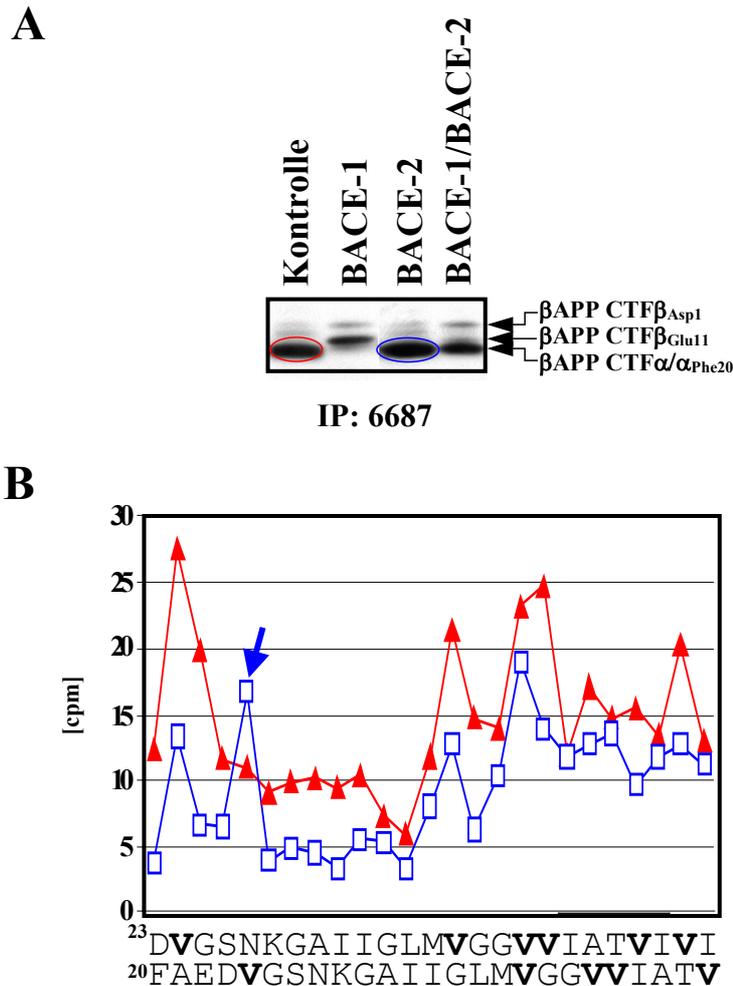


Abbildung 36: β APP CTF in BACE-1 und BACE-2 exprimierenden Zellen und Radiosequenzierung der entsprechenden β APP CTF.

(A) Die angegebenen Zelllinien wurden 4 h mit [35 S]Methionin/Cystein markiert und anschließend β APP CTF aus den Zelllysaten mit AK 6687 immunpräzipitiert. Abgebildet ist eine Autoradiographie der PVDF-Membran nach Trennung der Proteine mittels Tris Tricine Gel und Protein-Transfer. (B) Kontrollzelllinie (rot) und Zellen mit exogener BACE-2 Expression (blau) wurden 6 h mit [3 H]-Valin markiert. Anschließend wurden β APP CTFs mit AK 6687 isoliert und mittels Tris Tricine Gel getrennt. Die den in der Abbildung markierten Banden entsprechenden Banden, wurden isoliert und radiosequenziert. Angegeben ist die relative Radioaktivität in cpm pro Zyklus. Die entsprechenden Proteinsequenzen sind im Einbuchstabencode dargestellt.

Die Kontrollzelllinie zeigt, wie oben beschrieben, hauptsächlich β APP CTF α , während in Zellen mit exogener BACE-1 Expression vorwiegend zwei größere β APP CTF entstehen, die auf eine Prozessierung von β APP an Asp1 und Glu11 der A β -Domäne zurückzuführen sind (Creemers et al., 2001; Farzan et al., 2000; Vassar et al., 1999). In BACE-2 exprimierenden Zellen findet sich überwiegend ein β APP CTF mit einem dem β APP CTF α in Kontrollzelllinien vergleichbaren Molekulargewicht (vgl. Abbildung 36A). Zur genaueren Untersuchung der β APP CTF α -Spezies in Kontrollzelllinien und BACE-2 exprimierenden Zellen wurde eine Radiosequenzierung der entsprechenden [3 H]-Valin markierten β APP CTF durchgeführt. Die Radiosequenzierung der Bande in Kontrollzellen ergab als dominante Spezies β APP CTF, beginnend mit Asp23 der A β Domäne (vgl. Abbildung 36B). β APP CTF beginnend bei Leu17 sind ebenfalls nachweisbar, aber in deutlich geringerem Umfang. Die Verkürzung der β APP CTF α , die durch Folgeprozessierung des initialen CTF_{Leu17} entstehen, wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Zhong et al., 1994).

In BACE-2 exprimierenden Zellen liefert die Radiosequenzierung neben β APP CTF_{Asp23} hauptsächlich β APP CTFs beginnend bei Phe20 der A β -Domäne. Dies wird vor allem aus dem Signal in Zyklus 5 deutlich (vgl. Abbildung 36B).

Die beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 37 zusammengefaßt.

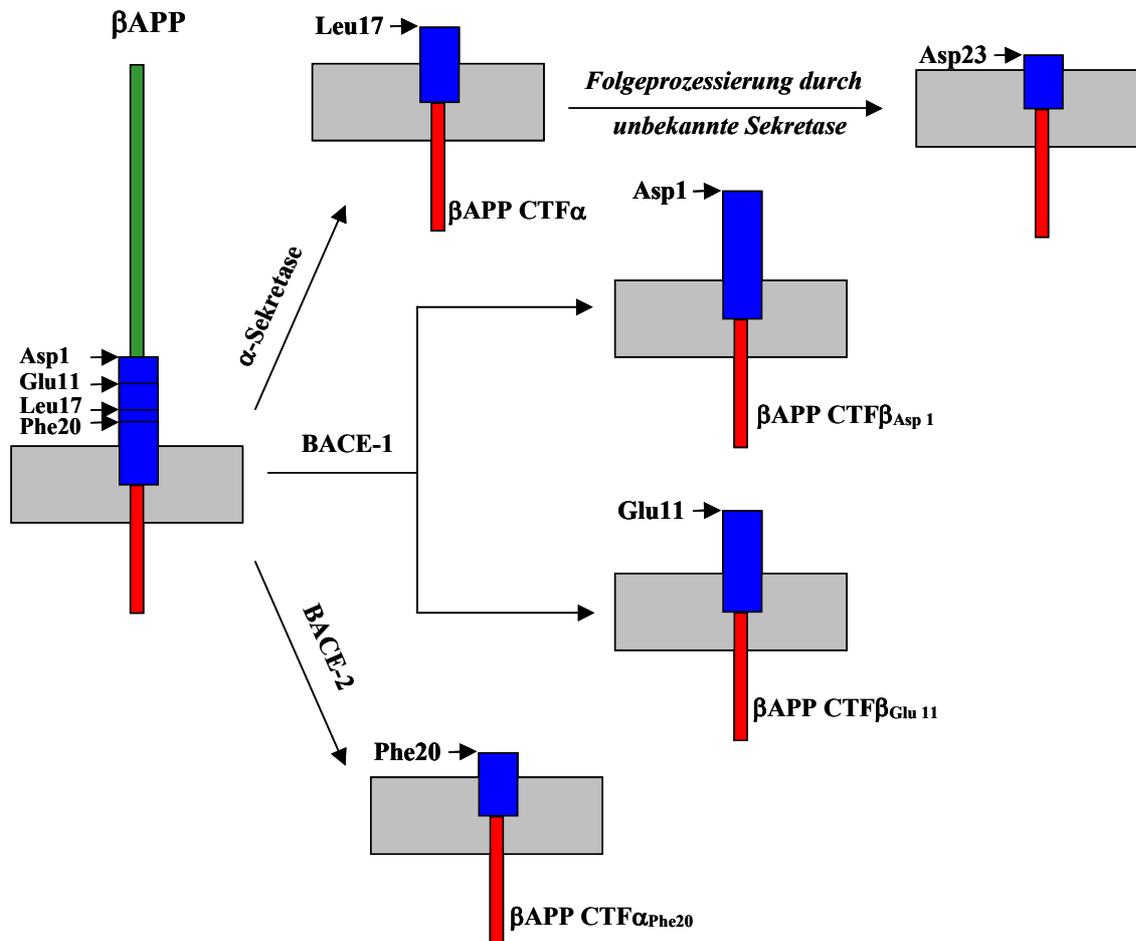


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Entstehung der verschiedenen betaAPP CTF Spezies. Dargestellt ist die betaAPP-Ektodomäne (grün), die intrazelluläre Domäne (rot), die Aβ-Domäne (vergrößert, blau) sowie die zelluläre Membran (grau). Die N-terminale Aminosäure der durch die verschiedenen Sekretasen entstehenden betaAPP CTF ist gekennzeichnet.

Auffällig ist weiterhin, dass in Zellen, die sowohl BACE-1 als auch BACE-2 exogen exprimieren, betaAPP CTF β_{Asp1} verglichen mit ausschließlich BACE-1 exprimierenden Zellen nahezu unverändert ist, was auf eine Aktivität des exogen exprimierten BACE-1 auch in Zellen mit Doppelsexpression schließen lässt, während betaAPP CTF β_{Glu11} kaum mehr nachweisbar ist. Stattdessen ist eine starke Erhöhung von betaAPP CTF α oder Spezies mit ähnlichem Molekulargewicht nachweisbar (vgl. Abbildung 36A).

3.4.2.3 BACE-2 reduziert die Mengen an A β 11-40/42

Um dieses Phänomen zu verstehen, wurden die A β -Spezies in den entsprechenden Zelllinien genauer betrachtet.

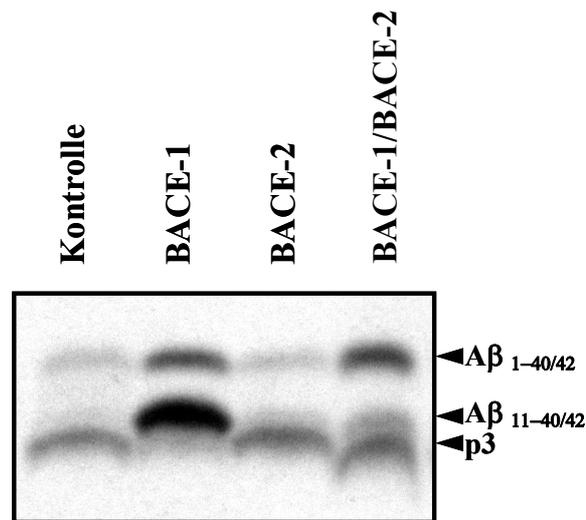


Abbildung 38: A β - und p3-Spezies in BACE-1 und BACE-2 exogen exprimierenden Zellen.

Zellen mit exogener Expression von β APPwt (Kontrolle) und zusätzlich BACE-1, BACE-2 oder beiden Enzymen wurden 4 h mit [35 S]Methionin/Cystein markiert. Anschließend wurde A β aus den konditionierten Medien mit AK 3926 immunpräzipitiert. Abgebildet ist eine Autoradiographie der PVDF-Membran nach Trennung der Proteine mittels Tris Tricine Gel und Protein-Transfer.

Korrespondierend zu den β APP CTF finden sich in Zellen mit exogener BACE-1 Expression zwei dominante A β -Spezies: A β 1-40/42 und A β 11-40/42, p3 oder p3 ähnliche Spezies sind hingegen kaum nachweisbar. In Zellen mit exogener BACE-2 Expression ist eine Spezies mit einem dem p3 vergleichbaren Molekulargewicht die prominente Spezies. A β 1-40/42 steigt im Vergleich zur Kontrolle nicht an. Wird in der Zelllinie, die zunächst nur BACE-1 exogen exprimierte zusätzlich BACE-2 exogen exprimiert, führt dies zu keiner Veränderung der Menge an A β 1-40/42. p3 oder p3 ähnliche Spezies steigen hingegen zu Lasten von A β 11-40/42 an.

Die folgende Quantifizierung verdeutlicht das beschriebene Ergebnis:

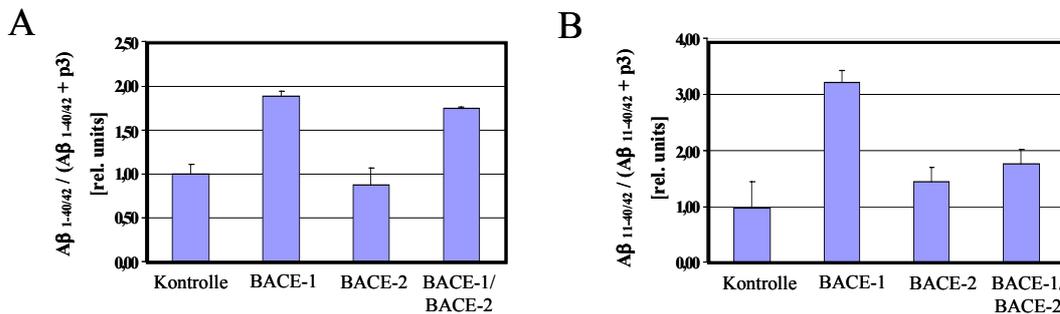


Abbildung 39: Quantifizierung von Aβ 1-40/42 und Aβ 11-40/42 in Zellen mit exogener BACE-1 und BACE-2 Expression.

Dargestellt ist eine Quantifizierung von Aβ 1-40/42 und Aβ 11-40/42 aus drei unabhängig Experimenten, die wie in Abb. 46 beschrieben durchgeführt wurden. Die sezernierte Menge an entsprechendem Peptid der Kontrollzelllinie wurde 1 gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte mit der entsprechenden Standardabweichung.

Die beschriebenen Daten geben Grund zu der Annahme, dass BACE-2 entweder in der Lage ist, selektiv das durch BACE-1 produzierte Aβ 11-40/42 weiter abzubauen, wohingegen Aβ 1-40/42 kaum weiter umgesetzt wird, oder, dass βAPP CTF_{Glu11} von BACE-2 direkt proteolytisch gespalten wird, noch bevor eine Umsetzung durch γ-Sekretase erfolgt ist.

3.4.3 BACE-1 und BACE-2 sind in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten aktiv

Da BACE-2 die Entstehung von Aβ 11-40/42 in Gegenwart von BACE-1 vermindert, die Bildung von Aβ 1-40/42 jedoch kaum beeinflusst, besteht die Möglichkeit, dass die beiden durch BACE-1 katalysierten βAPP Spaltungen in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten lokalisiert sind.

Vergleicht man Zellen mit exogener BACE-1 Expression, die entweder βAPP^{wt} oder βAPP^{sw} coexprimieren, stellt man fest, dass in Gegenwart von βAPP^{wt} Aβ 1-40/42 und Aβ 11-40/42 gleichermaßen entstehen, während bei Koexpression von βAPP^{sw} fast ausschließlich Aβ 1-40/42 gebildet wird.

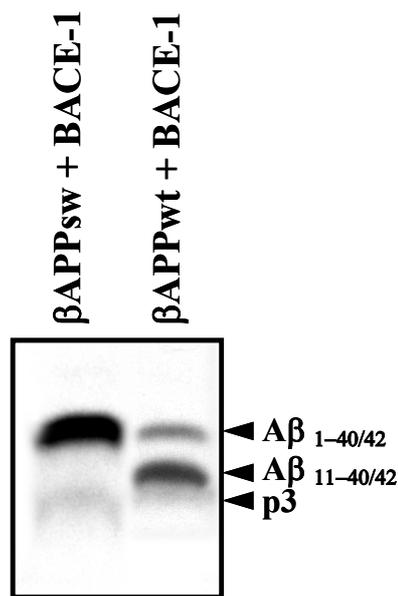


Abbildung 40: A β -Spezies in exogen BACE-1 exprimierenden Zellen mit unterschiedlichem β APP Hintergrund.

Zellen, die exogen BACE-1 und β APPwt exprimieren und Zellen, mit schwacher exogener Expression von BACE-1 in Kombination mit β APPsw, wurden 4 h mit [35 S]Methionin/Cystein markiert und anschließend A β aus den konditionierten Medien mit AK 3926 immunpräzipitiert. Abgebildet ist eine Autoradiographie der PVDF-Membran nach Trennung der Proteine mittels Tris Tricine Gel und Protein-Transfer.

Grund dafür ist möglicherweise die erhöhte Affinität von BACE-1 zu β APPsw zusammen mit der gesteigerten Expression von BACE-1, die eine A β -Entstehung anders als unter physiologischen Bedingungen bereits in frühen Kompartimenten einschließlich dem ER zulassen (Haass et al., 1995b) und somit A β 11-40/42 aufgrund des Substratmangels in späteren subzellulären Kompartimenten kaum entsteht.

Eine Möglichkeit, herauszufinden, in welchen subzellulären Kompartimenten ein Enzym aktiv ist, ist die Inhibition des Protein vorwärtstransports und anschließende Analyse der enzymatischen Spaltprodukte. Brefeldin A (BFA) inhibiert den Vorwärtstransport aus dem ER zum Golgi-Apparat. Da der Rückwärtstransport der Proteine nicht gehemmt wird, kommt es vermutlich zu einer Fusion des ER und Golgi-Apparates (Alberts et al., 2002; Haass et al., 1993). Enzymatische Aktivität, die unter BFA Behandlung nachweisbar ist, ist folglich im sekretorischen Transportweg vor dem TGN lokalisiert.

Der Transport vom Golgi-Apparat in spätere Kompartimente des sekretorischen Transportweges kann durch Monensin blockiert werden (Rosa et al., 1992; Wild-Bode et al., 1997). Enzymatische Aktivitäten, die unter Monensin Behandlung nachweisbar sind, sind im Golgi-Apparat oder früher lokalisiert.

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisierung der BACE-1 und BACE-2 Aktivitäten, wurden Zellen, mit exogener β APPwt und BACE-1 oder BACE-2 Expression, entweder mit BFA oder Monensin behandelt, anschließend wurden die proteolytischen Spaltprodukte des β APP analysiert.

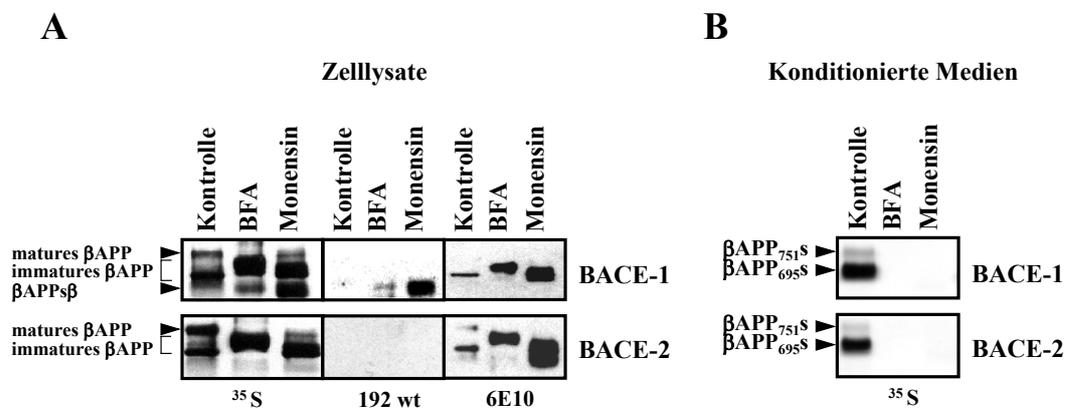


Abbildung 41: BACE-1 ist in einem früheren subzellulären Kompartiment aktiv als BACE-2.

(A) HEK293 Zellen mit exogener β APPwt und BACE-1 oder BACE-2 Expression wurden, entweder unbehandelt (Kontrolle), oder in Gegenwart von BFA oder Monensin, 4 h mit [³⁵S]-Methionin/Cystein markiert. Anschließend wurden die β APP-Spezies aus den Lysaten mit AK 5313 immunpräzipitiert. Die Proteine wurden mittels 8 % SDS-PAGE getrennt und nach anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran mittels Autoradiographie (linke Spalte), AK 192wt (mittlere Spalte) oder AK 6E10 (rechte Spalte) nachgewiesen. (B) Die konditionierten Medien der Zelllinien aus (A) wurden mit AK 5313 immunpräzipitiert und nach Trennung mittels 8 % SDS-PAGE und Protein-Transfer durch Autoradiographie nachgewiesen.

In den Lysaten unbehandelter Zellen sind sowohl in BACE-1 als auch BACE-2 exogen exprimierenden Zellen, zwei dominante β APP Spezies nachweisbar. Es handelt sich hierbei um matures und immatures β APP (Weidemann et al., 1989). Nach Behandlung der Zellen mit BFA oder Monensin sind weitere β APP Spezies nachweisbar, die auf eine veränderte Glykosylierung, aufgrund des blockierten Proteintransportes zurückzuführen sind (Haass et al., 1993). Der Einfachheit halber werden diese Spezies auch als immatures β APP bezeichnet (vgl. Abbildung 41A linke Spalte).

Nach Behandlung der Zellen mit BFA und Monensin sind keine β APPs Spezies in den Medien nachweisbar, während in unbehandelten Zellen die Sezernierung ungehindert stattfinden kann (vgl. Abbildung 41B). Dies zeigt, dass BFA und Monensin den Protein vorwärtstransport vollständig inhibieren.

In BACE-1 exogen exprimierende Zellen kann, neben maturem und immaturem β APP, eine zusätzliche β APP-Spezies nachgewiesen werden, die mit Hilfe des neoepitopspezifischen AK 192wt detektiert werden kann, nicht aber mit AK 6E10, der gegen die Aminosäuren 1-16 der A β -Domäne gerichtet ist (vgl. Abbildung 30 und Abbildung 31). AK 192wt detektiert ausschließlich β APPs, das durch Prozessierung der β -Sekretase entstanden ist und folglich die AS 1-16 der A β -Domäne nicht mehr enthält, β APP Holoprotein jedoch nicht (Seubert et al., 1993). Folglich handelt es sich bei der zusätzlichen β APP-Spezies um β APPs β . Da β APPs β bei BFA- und verstärkt bei Monensin-Behandlung entsteht, muss es früh innerhalb des sekretorischen Prozessierungsweges entstehen, kann aber aufgrund des unterdrückten Proteintransportes nicht sezerniert werden.

In BACE-2 exogen exprimierenden Zellen kann diese Spezies nicht nachgewiesen werden. Es handelt sich also um eine in ER oder Golgi-Apparat spezifisch durch BACE-1 katalysierte Spaltung des β APP.

BACE-2 katalysiert die Spaltung von β APP zwischen Phe19 und Phe20 der A β -Domäne (vgl. 3.4.2.2). Um herauszufinden, in welchem subzellulären Kompartiment diese proteolytische Prozessierung überwiegend stattfindet, wurden β APPs α/α' Spezies in den entsprechenden Zelllinien nach BFA bzw. Monensin Behandlung analysiert.

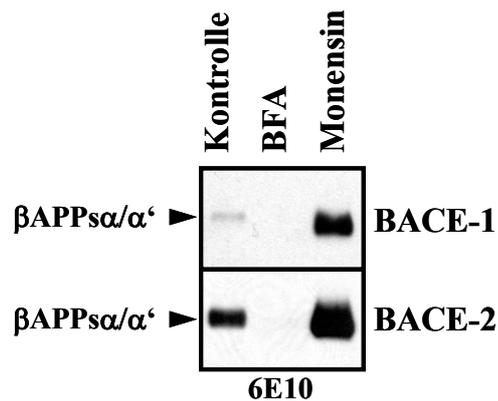


Abbildung 42: Aktivität von BACE-2 in späten subzellulären Kompartimenten.

HEK293 Zellen mit exogener β APPwt und BACE-1 oder BACE-2 Expression wurden, entweder unbehandelt (Kontrolle), oder in Gegenwart von BFA oder Monensin, 4 h mit [35 S]Methionin/Cystein markiert. Anschließend wurden die β APP-Spezies aus den Zelllysaten mit AK 1736 immunpräzipitiert. Die Proteine wurden mittels 8 % SDS-PAGE getrennt und im Western Blot mit AK 6E10 nachgewiesen.

Wird BACE-2 exogen exprimiert, ist in unbehandelten Zellen ein deutlicher Anstieg an intrazellulärem APPs α/α' im Vergleich zu BACE-1 exprimierenden Zellen nachweisbar. Durch Behandlung dieser Zellen mit BFA wird die Entstehung des APPs α/α' vollständig unterbunden, während in Gegenwart von Monensin die Bildung großer Mengen β APPs α/α' möglich ist (vgl. Abbildung 42 unten). Folglich findet die Prozessierung des β APP durch BACE-2 überwiegend in späten subzellulären Kompartimenten, wie z.B. Golgi-Apparat oder Zelloberfläche, statt. In Zellen mit exogener BACE-1 Expression ist nach Monensin Behandlung ebenfalls eine verstärkte Bildung von β APPs α/α' nachweisbar, die auf Prozessierung von β APP durch endogene α -Sekretasen bzw. endogenes BACE-2 zurückzuführen ist (vgl. Abbildung 42 oben)

Da BACE-1 neben der Spaltung vor Asp1 der A β -Domäne auch eine Spaltung vor Glu11 der A β Domäne katalysieren kann (vgl. 3.4.2.1), wurde untersucht, ob dieser Schnitt ebenfalls bereits früh im sekretorischen Prozessierungsweg erfolgen kann. Dazu wurden die β APP CTF in Zellen mit exogener BACE-1 oder BACE-2 Expression nach Behandlung mit BFA oder Monensin betrachtet.

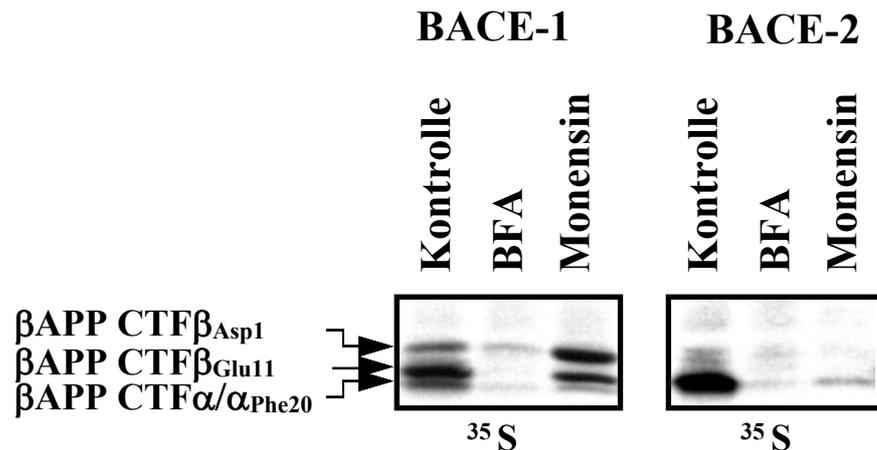


Abbildung 43: β APP CTF_{Glu11} entsteht in späteren subzellulären Kompartimenten als β APP CTF_{Asp1}.

HEK293 Zellen mit exogener β APPwt und BACE-1 oder BACE-2 Expression wurden, entweder unbehandelt (Kontrolle), oder in Gegenwart von BFA oder Monensin, 4 h mit [³⁵S]-Methionin/Cystein markiert. Anschließend wurden die β APP CTF aus den Zelllysaten mit AK 6687 immunpräzipitiert. Die Proteine wurden mittels Tris Tricine Gel getrennt und nach Protein-Transfer durch Autoradiographie nachgewiesen.

In nicht behandelten Zellen mit exogener BACE-1 Expression finden sich erwartungsgemäß hauptsächlich β APP CTF_{Glu11} und etwas geringere Mengen β APP CTF_{Asp1} (vgl. 3.4.2.1). Nach BFA Behandlung ist β APP CTF_{Asp1} immer noch nachweisbar, während β APP CTF_{Glu11} kaum detektierbar ist, d.h. das Verhältnis β APP CTF_{Asp1} / β APP CTF_{Glu11} verschiebt sich stark zugunsten des β APP CTF_{Asp1}. Nach Monensin Behandlung hingegen ist β APP CTF_{Glu11} deutlich nachweisbar (vgl. Abbildung 43 rechte Spalte). Daraus kann geschlossen werden, dass β APP CTF_{Asp1} in frühen Kompartimenten entstehen kann, während β APP CTF_{Glu11} in diesen Kompartimenten selbst bei exogener Expression von BACE-1 nicht nachweisbar ist.

Zellen mit exogener BACE-2 Expression zeigen in unbehandeltem Zustand fast ausschließlich β APP CTF α/α _{Phe20} (vgl. Abbildung 36 und Abbildung 43). Durch BFA Behandlung wird die Bildung des β APP CTF α/α _{Phe20} nahezu vollständig unterdrückt, während nach Monensin Behandlung die Spaltung von β APP durch BACE-2 wieder zu einem gewissen Teil ermöglicht wird (vgl. Abbildung 43 linke Spalte). Folglich ist BACE-2 in frühen Kompartimenten, trotz Überexpression wenig bis gar nicht aktiv, während die Aktivität in späten Kompartimenten, nämlich dem Golgi-Apparat, zu einem gewissen Teil vorhanden ist. Ein Großteil der Aktivität scheint aber in noch späteren Kompartimenten, wie z.B. Zelloberfläche, Endosomen oder Lysosomen lokalisiert zu sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die proteolytische Spaltung von β APP vor Glu11 der A β Domäne und die durch BACE-2 zwischen Phe19 und Phe20 der A β -Domäne in den selben subzellulären Kompartimenten, nämlich dem Golgi-Apparat bzw. späteren Kompartimenten wie Zelloberfläche, Lysosomen und Endosomen stattfinden. Die proteolytische Spaltung von β APP durch BACE-1 vor Asp1 der A β -Domäne kann hingegen u.a. in frühen Kompartimenten stattfinden, in dem BACE-2 auch nach exogener Expression nicht aktiv ist. Dies könnte der Grund für die spezifische Reduktion von β APP CTF_{Glu11} bzw. A β 11-40/42 in Zellen mit exogener Expression von BACE-1 und BACE-2 sein.

3.4.4 Prozessierung von A β -Spezies durch BACE-1 und BACE-2

Familien, die in β APP unmittelbar vor der β -Secretase-Schnittstelle die schwedischen Mutation KM595/596NL (β APP_{sw}) tragen, erkranken besonders früh an der Alzheimer'schen Krankheit [(Mullan et al., 1992) und vgl. auch 1.3.2.]. Dies wird auf eine erhöhte Affinität der β -Sekretase zu β APP_{sw} und eine damit verbundene Beschleunigung der β -Amyloid Plaque Bildung zurückgeführt (Cai et al., 1993; Citron et al., 1992).

Folglich sollte in einem Zellkulturmodell, in dem sowohl β APP_{sw} als auch BACE-1 überexprimiert werden, eine verstärkte Generierung des A β 1-40/42 Peptids nachweisbar sein. Tatsächlich findet man jedoch in einem solchen Modell im Vergleich zu Zellen ohne exogene BACE-1 Expression keine Erhöhung der A β -Sekretion, während die Menge an β APP_{sw} wie erwartet auf Kosten von APP α um fast 100 % ansteigt (Vassar et al., 1999). Auch die Menge an β APP CTF_{Asp1}, dem korrespondierenden C-terminalen β -Sekretase Produkt, steigt deutlich an, was den Schluss zulässt, dass das exprimierte Enzym proteolytisch aktiv ist (Vassar et al., 1999).

3.4.4.1 BACE-1 schneidet A β nach Aminosäure 34

Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wurden die A β -Spezies aus konditionierten Medien von HEK293 Zellen, die β APP_{sw} und unterschiedliche Mengen BACE-1 exogen coexprimieren, isoliert.

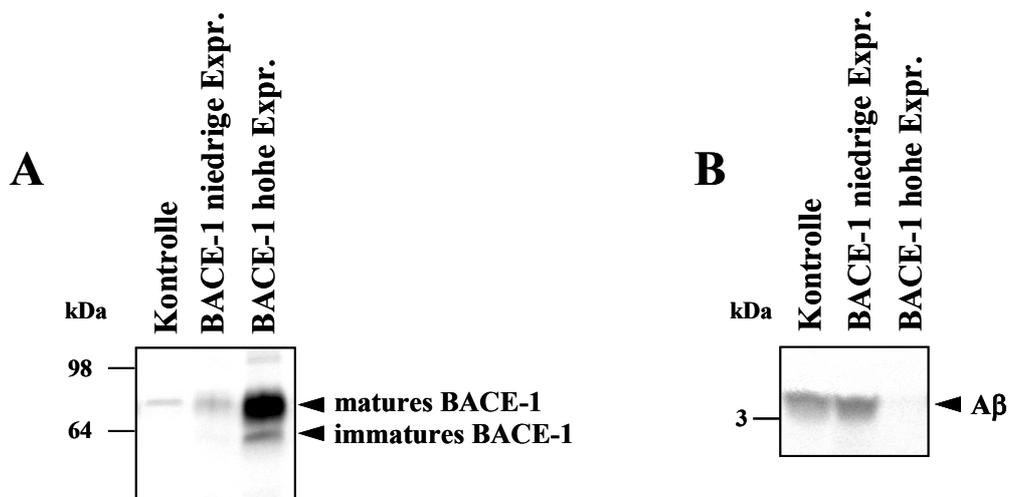


Abbildung 44: Abnahme von $A\beta_{\text{gesamt}}$ mit zunehmender Expression von BACE-1.

(A) HEK293 Zellen mit exogener Expression von $\beta\text{APP}_{\text{sw}}$ und endogener BACE-1 Expression (Kontrolle) oder unterschiedlicher Menge an exogen exprimiertem BACE-1 wurden 6 h mit [^{35}S]Methionin/Cystein markiert und anschließend BACE-1 aus den Lysaten mit AK 7520 immunpräzipitiert. Abgebildet ist die Autoradiographie der PVDF-Membran nach Trennung der Proteine durch 8 % SDS-PAGE und Protein-Transfer. (B) Aus den konditionierten Medien der unter (A) beschriebenen Zelllinien wurden die $A\beta$ -Spezies mit AK 3926 immunpräzipitiert. Abgebildet ist eine Autoradiographie der PVDF-Membran nach Trennung der Proteine durch ein Tris Tricine Gel und Protein-Transfer.

In der Kontrollzelllinie und in Zellen mit geringer exogener Expression von BACE-1 sind vergleichbare Mengen an $A\beta$ nachweisbar, während in Zellen mit starker exogener Expression von BACE-1 keine $A\beta$ -Spezies detektierbar sind (vgl. Abbildung 44B).

Für diese Beobachtung gibt es verschiedene mögliche Gründe: Entweder bleibt die $A\beta$ -Sezernierung in Zellen mit hoher BACE-1 Expression aus, da $\beta\text{APP CTF}\beta$ bereits in frühen sekretorischen Kompartimenten entsteht, in denen die γ -Sekretase nicht aktiv ist (Vassar, 2002), oder das bereits früh entstehende $A\beta$ wird schnell abgebaut (Wild-Bode et al., 1997). Es wäre auch möglich, dass andere $A\beta$ Spezies entstehen, die mit [^{35}S]-Methionin/Cystein nicht radioaktiv markiert werden können oder im verwendeten Gelsystem nicht nachweisbar sind.

Um herauszufinden, ob in BACE-1 transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie tatsächlich andere oder zusätzliche A β -Spezies entstehen, wurden die konditionierten Medien der beschriebene Zelllinien mittels MALDI-TOF MS untersucht.

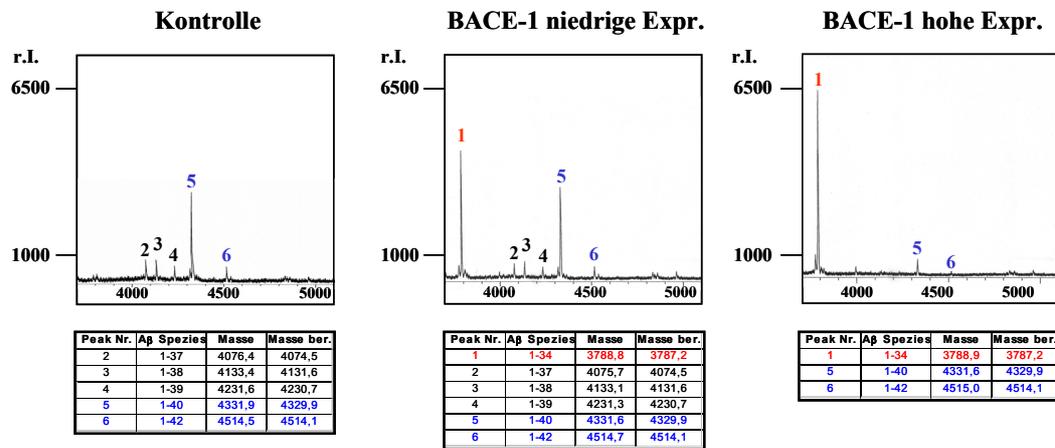


Abbildung 45: Die Entstehung von A β 1-34 korreliert mit der Menge an exprimiertem BACE-1.

A β -Spezies wurden aus konditionierten Medien von Zellen mit exogener Expression von β APPsw und unterschiedlich starker exogener BACE-1 Expression mit AK 3926 isoliert. Abgebildet sind die Massenspektren einer MALDI-TOF MS Analyse der Immunpräzipitate. Die Skalierung gibt die relative Intensität (r.I.) der Peaks an und die Tabellen unter den Spektren beschreiben die gemessenen Massenwerte (Masse) der entsprechenden Peaks sowie die errechneten theoretischen Massenwerte (Masse ber.) der entsprechenden A β -Spezies.

Wie auch in vorausgegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, sezernieren β APPsw transfizierte Zellen mit endogener BACE-1 Expression (Kontrolle) hauptsächlich A β 1-40 (Citron et al., 1992). Darüber hinaus können auch geringe Mengen A β 1-42, sowie A β 1-37/38/39 nachgewiesen werden (Wang et al., 1996). Wird in der selben Zelllinie die BACE-1 Expression leicht erhöht, kann eine zusätzliche A β -Spezies nachgewiesen werden, deren Masse der berechneten Masse von A β 1-34 entspricht. Mit steigender BACE-1 Expression nimmt die Menge an A β 1-34 stark zu, während die übrigen A β -Spezies in Zellen mit hoher exogener BACE-1 Expression kaum mehr nachweisbar sind.

Da A β 1-34 das einzige Methionin an Position 35 der A β -Domäne nicht mehr enthält, kann erklärt werden, warum die A β -Spezies in Zellen mit hoher BACE-1 Expression mit [35 S]-Methionin/Cystein nicht mehr nachweisbar sind.

Um auszuschließen, dass A β 1-34 ausschließlich aus β APP_{sw} entstehen kann, wurden zusätzlich konditionierte Medien von HEK293 Zellen mit exogener Expression von β APP_{wt} und BACE-1 (vgl. 3.4.2.1) mittels MALDI-TOF MS untersucht.

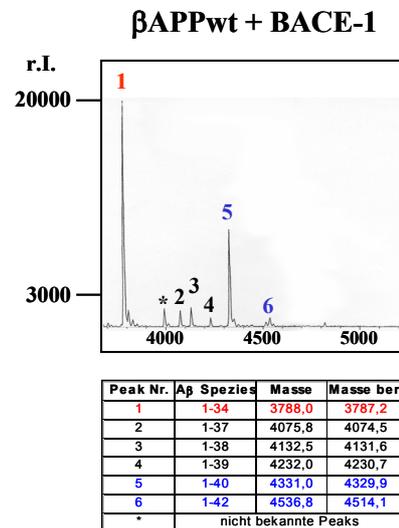


Abbildung 46: Entstehung von A β 1-34 aus β APP_{wt}.

A β -Spezies wurden aus konditionierten Medien von Zellen mit exogener β APP_{wt} und BACE-1 Expression mit AK 3926 isoliert. Abgebildet ist das Spektrum einer MALDI-TOF MS Analyse des Immunpräzipitates. Die Skalierung gibt die relative Intensität (r.I.) der Peaks an und die Tabelle unter den Spektren beschreibt die gemessenen Massenwerte (Masse) der entsprechenden Peaks sowie die errechneten theoretischen Massenwerte (Masse ber.) der entsprechenden A β -Spezies.

Auch bei Koexpression von β APP_{wt} und BACE-1 kann A β 1-34 als dominante Spezies nachgewiesen werden.

Die beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass BACE-1 an der Entstehung von A β 1-34 direkt oder indirekt beteiligt ist.

Vorausgegangene Studien zeigen jedoch, dass die Entstehung von A β 1-34 und anderen verkürzten A β -Peptiden PS1 abhängig ist (Behr et al., 2002; Vandermeeren et al., 2001).

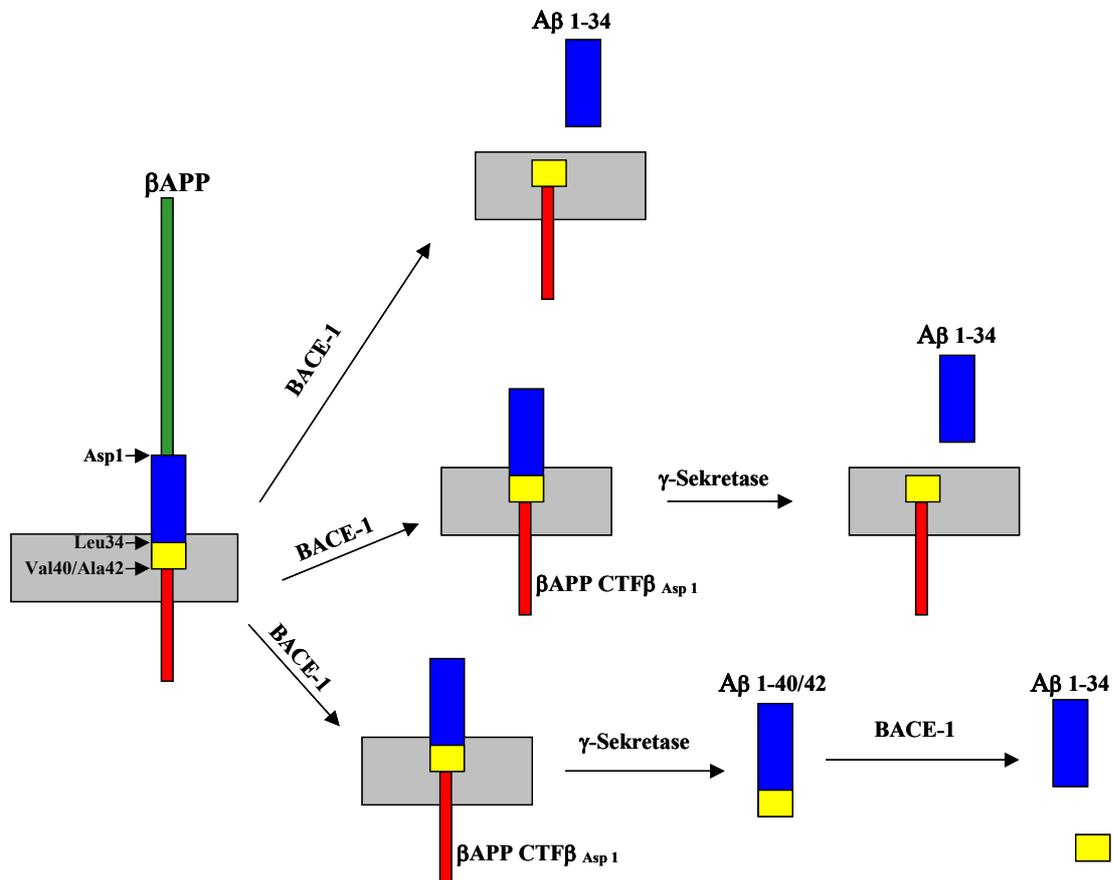


Abbildung 47: Schematische Darstellung der verschiedenen Entstehungsmöglichkeiten von A β 1-34.

Dargestellt sind die möglichen Prozessierungswege von β APP (Ektodomäne (grün), intrazelluläre Domäne (rot), A β -Domäne (vergrößert, blau/ gelb)) die zu einer Entstehung von A β 1-34 führen könnten.

Um herauszufinden, ob für die Entstehung von A β 1-34 PS1 Aktivität nötig ist, wurden A β -Spezies in HEK293 Zellen untersucht, die β APP_{sw} und BACE-1 entweder zusammen mit PS1wt oder PS1 D385N coexprimieren.

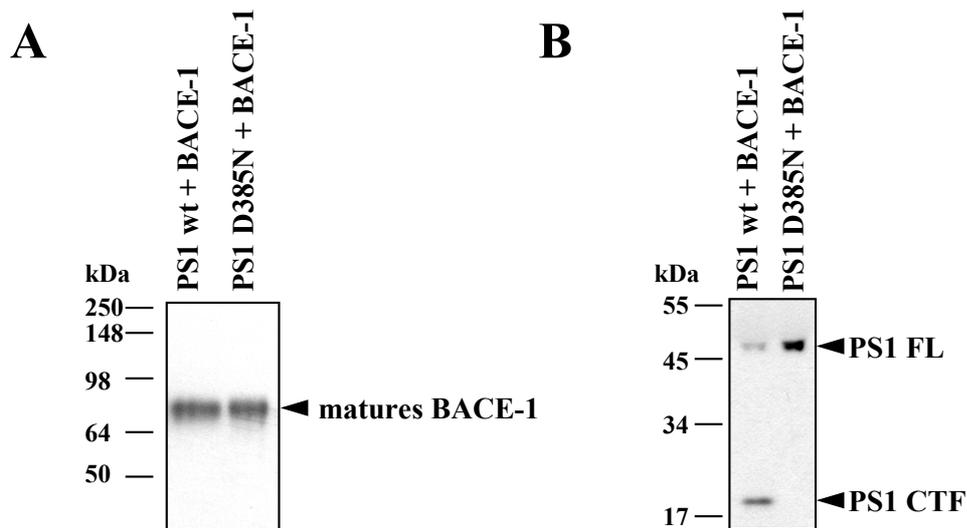


Abbildung 48: Koexpression von BACE-1 und PS1wt oder PS1 D385N in HEK293 Zellen.

Die Proteinmengen der Membranpräparationen von HEK293 Zellen mit exogener Expression von β APP_{sw} und BACE-1, sowie Koexpression von entweder PS1wt oder PS1 D385N, wurden mittels Bradford Proteinassay angeglichen. **(A)** Die Proteine wurden zum Nachweis von BACE-1 mittels 8 % SDS-PAGE getrennt und im Western Blot mit AK 7520 detektiert. **(B)** PS1 Proteine wurden nach Immunpräzipitation mit AK 3027 mittels 10 % Urea Gel getrennt und im Western Blot mit dem monoklonalen AK BI.3D7 nachgewiesen.

PS1 D385N ist eine funktionell inaktive Variante des PS1wt, d.h. endogenes PS1 wird durch exogene Expression der Mutante verdrängt [(Capell et al., 1997; Thinakaran et al., 1997) und vgl. auch 1.3.5.1] und die proteolytische Aktivität des γ -Sekretase Komplexes geht vollständig verloren (Steiner et al., 1999a; Wolfe et al., 1999b). Dies kann durch fehlende A β -Sezernierung und Bildung von AICD, sowie durch eine starke Akkumulation der β APP CTF, dem unmittelbaren Substrat der γ -Sekretase, in den entsprechenden Zelllinien nachgewiesen werden (Sastre et al., 2001; Wolfe et al., 1999b).

PS1 D385N wird im Gegensatz zu PS1wt nicht endoproteolytisch gespalten und ist folglich ausschließlich als PS1 Holoprotein nachweisbar [(Wolfe et al., 1999b) und vgl. Abbildung 48B].

Fraglich war nun, ob die Entstehung von A β 1-34 bei gleichzeitiger exogener Expression von aktivem BACE-1 und der dominant negativen PS1 Mutante D385N ebenfalls unterdrückt wird, oder ob A β 1-34 mit den verwendeten Methoden bisher lediglich nicht nachweisbar war.

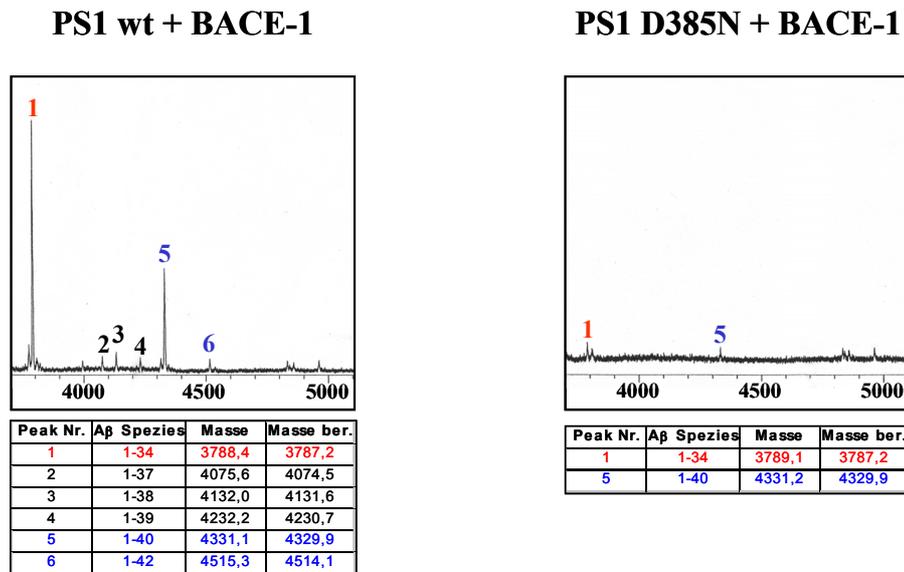


Abbildung 49: Die Entstehung von A β 1-34 wird in Gegenwart von PS1 D385N vollständig unterdrückt.

A β -Spezies wurden aus konditionierten Medien von Zellen mit exogener β APP^{sw}, BACE-1 und entweder PS1wt oder PS1 D385N Expression mit AK 3926 isoliert. Abgebildet sind die Spektren einer MALDI-TOF MS Analyse des Immunpräzipitates. Die Tabellen unter den Spektren beschreiben die gemessenen Massenwerte (Masse) der entsprechenden Peaks sowie die errechneten theoretischen Massenwerte (Masse ber.) der entsprechenden A β -Spezies.

Die MALDI-TOF MS Analyse der A β -Spezies aus den beschriebenen Zelllinien, zeigt dass in Gegenwart der funktionell inaktiven PS1 Mutante D385N die Sezernierung aller A β -Spezies, inklusive A β 1-34, nahezu vollständig unterdrückt wird, während bei Koexpression von BACE-1 mit PS1wt, A β 1-34 und A β 1-40 als dominante Spezies nachweisbar sind.

Folglich muss festgestellt werden, dass PS1 die Entstehung von A β 1-34 direkt beeinflusst, zugleich aber die Bildung dieser Spezies auch von der Menge an exprimiertem BACE-1 abhängt.

Um herauszufinden, ob BACE-1 die Proteolyse nach AS 34 der A β -Domäne direkt katalysieren kann, oder nur indirekt an diesem Vorgang beteiligt ist, wurden *in vitro* Experimente mit löslichem BACE-1 (sBACE-1) und synthetischem A β 1-40 durchgeführt. sBACE-1 wurde exogen in HEK293 Zellen exprimiert und aus den konditionierten Medien gewonnen (vgl. Abbildung 13).

Die katalytische Aktivität des sezernierten Proteins wurde im Aktivitätsassay mit einem fluorogenen Peptid-Substrat, das die schwedische Mutation von β APP trägt, nachgewiesen (Capell et al., 2002).

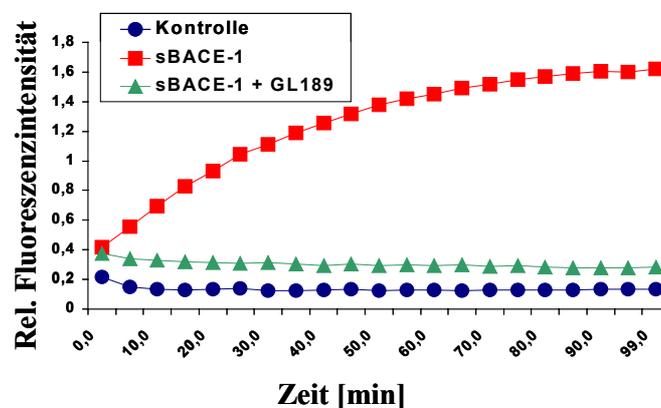


Abbildung 50: Aktivität von sBACE-1 im Fluoreszenz-Assay.

Konditionierte Medien von Zellen, die sBACE-1 (rote Kurve) exogen exprimieren, bzw. von Kontrollzellen (blaue Kurve) mit endogener BACE-1 Expression wurden bei pH 4,5 mit fluorogenem Substrat (vgl. 2.5.3.3) inkubiert und die Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität gemessen. Zur Inhibition der BACE-1 Aktivität wurde der spezifische Inhibitor GL189 (Capell et al., 2002) verwendet (grüne Kurve). Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität in Relation zur Inkubationszeit in min.

Medien, die sBACE-1 enthalten, zeigen mit steigender Inkubationszeit eine proportional ansteigende relative Fluoreszenzintensität, bis nach ca. 1 h Inkubationszeit ein Sättigungswert erreicht wird, während die konditionierten Medien der Kontrollzelle eine nahezu gleichbleibende Intensität aufweisen. Die Inkubation von sBACE-1 mit dem fluorogenen Substrat in Gegenwart des spezifischen Inhibitors GL 189 liefert eine Verlaufskurve, die mit der der Kontrollzelle vergleichbar ist.

sBACE-1 ist folglich unter *in vitro* Bedingungen katalytisch aktiv und seine Aktivität kann mit dem Inhibitor GL189 vollständig gehemmt werden.

Im nächsten Schritt wurde sBACE-1 unter den selben Bedingungen mit synthetischem A β 1-40 inkubiert (vgl. 2.5.3.2 und 2.5.3.3) und die entstehenden A β -Spezies mittels MALDI-TOF MS analysiert.

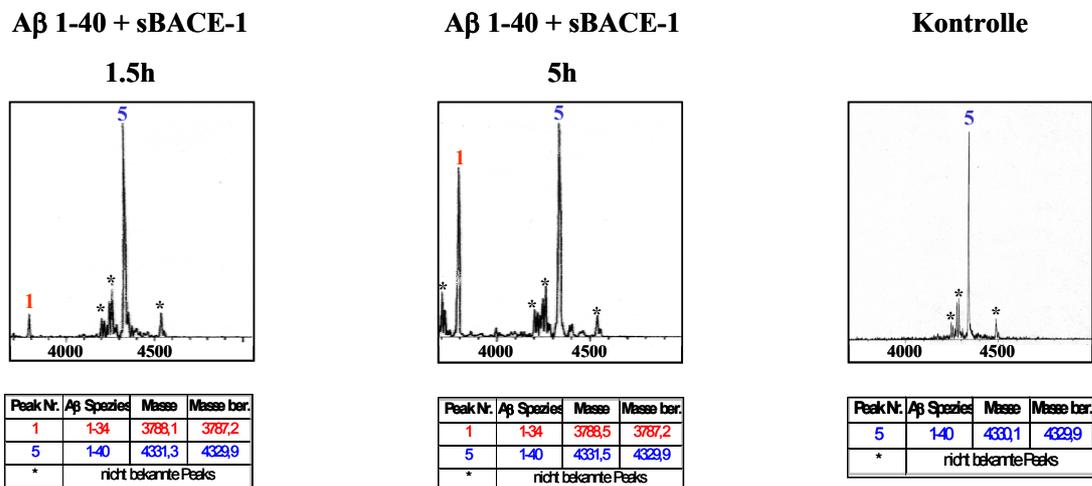


Abbildung 51: MALDI-TOF MS Analyse der Produkte aus der *in vitro* Inkubation von sBACE-1 mit synthetischem A β 1-40 zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Konzentriertes sBACE-1 oder eine entsprechende Fraktion die kein sBACE-1 enthält, wurden mit 50 μ g synthetischem A β 1-40 in Na-acetat Puffer (pH 4,5) für die angegebenen Zeitspannen bei 37°C inkubiert. Abgebildet sind die Spektren einer MALDI-TOF MS Analyse der Reaktionsansätze nach Ablauf der Inkubationszeit. Die Tabellen unter den Spektren beschreiben die gemessenen Massenwerte (Masse) der entsprechenden Peaks sowie die errechneten theoretischen Massenwerte (Masse ber.) der entsprechenden A β -Spezies.

Bereits nach 1,5 h Inkubationszeit kann die Entstehung von A β 1-34 aus A β 1-40 nachgewiesen werden. Nach weiteren 3,5 h Inkubationszeit steigt die entstandene Menge A β 1-34 deutlich an, während im Kontrollansatz, der kein sBACE-1 enthält, A β 1-34 nicht nachweisbar ist.

Zur Bestätigung des Ergebnisses, wurde sBACE-1 über Nacht mit synthetischem A β 1-40 inkubiert und die entstehenden A β -Spezies auf verschiedenen Gelsystemen analysiert.

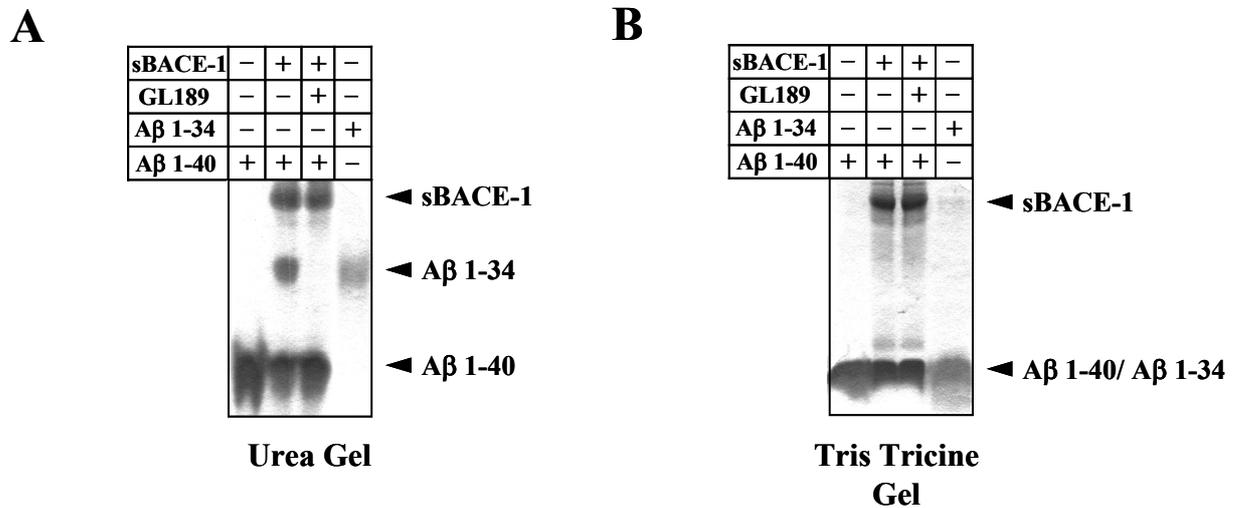


Abbildung 52: *In vitro* Inkubation von sBACE-1 mit synthetischem A β 1-40.

Konzentriertes sBACE-1 und 6 μ g synthetisches A β 1-40 wurden mit oder ohne Inhibitor (GL 189) in Na-acetat Puffer (pH 4,5) über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden mittels Urea Gel nach Wiltfang *et al* (A) bzw. Tris Tricine Gel (B) getrennt und durch Commassie-Färbung nachgewiesen. Als Molekulargewichtskontrolle wurden jeweils 6 μ g der entsprechenden synthetischen Peptide aufgetragen.

Auf einem Urea Gel [(Wiltfang *et al.*, 1997) und vgl. auch 2.5.10.2.2] ist deutlich zu erkennen, dass nach Inkubation von sBACE-1 mit synthetischem A β 1-40 eine zusätzliche Spezies entsteht, deren Molekulargewicht dem von synthetischem A β 1-34 entspricht (vgl. Abbildung 52). Die Entstehung von A β 1-34 lässt sich durch Zugabe des spezifischen BACE-1 Inhibitors GL 189 vollständig unterdrücken.

Die Analyse des selben Experiments auf einem Tris Tricine Gel, erlaubt keine eindeutige Trennung von A β 1-34 und A β 1-40 und zeigt zudem, dass synthetisches A β 1-34 in diesem System keine einzelne scharfe Bande, sondern wahrscheinlich zwei oder mehr Banden bildet. Es bleibt also festzustellen, dass die traditionell für die A β Analyse verwendeten Tris Tricine Gel Systeme ungeeignet sind A β 1-34 nachzuweisen, während ureahaltige Gelsysteme (Wiltfang *et al.*, 1997) sich gut eignen. Der Nachweis von A β 1-34 durch Immunpräzipitation und anschließende Western Blot Analyse gestaltet sich dennoch auch bei Verwendung eines Urea Gels aufgrund der in großer Menge vorhandenen IgGs, die in diesem Gelsystem ein ähnliches Migrationsverhalten aufweisen, schwierig.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Analyse des A β 1-34 Peptids ist das unerwartete Laufverhalten im Urea Gel nach Wiltfang *et al.* Obwohl A β 1-34 ein geringeres Molekulargewicht aufweist als A β 1-40 erscheint das Peptid auf dem Gel größer, was eventuell auf strukturelle Unterschiede oder auf verstärkte Aggregation zurückzuführen ist.

Zusammengenommen zeigen die zuletzt beschriebenen Experimente, dass *in vitro* die proteolytische Spaltung von A β 1-40 zwischen AS 34 und 35 der A β Domäne sehr effizient durch BACE-1 katalysiert wird. Aufgrund der spezifischen Inhibition der Katalyse durch GL 189 kann eine BACE-1 unabhängige Spaltung durch Exopeptidasen ausgeschlossen werden. In Gegenwart von inaktivem PS1 wird die Bildung von A β 1-34 durch BACE-1 vollständig unterdrückt. Folglich muss der BACE-1 katalysierten Spaltung nach AS 34 der A β -Domäne die γ -Sekretase Spaltung der β APP CTF_{Asp1} vorausgehen.

Um die Frage zu beantworten, ob auch membrangebundenes BACE-1 in der Lage ist lösliches A β 1-40 PS1 unabhängig zu spalten, wurde konditioniertes Medium von Zellen, die ausschließlich β APP_{sw} exogen exprimieren, mit Zellen inkubiert, die zusätzlich entweder nur PS1 D385N oder PS1 D385N und BACE-1 exprimieren.

Wie oben beschrieben wird die A β Sezernierung in Zelllinien, die eine funktionell inaktive Variante von PS1, wie zum Beispiel PS1 D385N, exprimieren, nahezu vollständig unterbunden (Wolfe et al., 1999b).

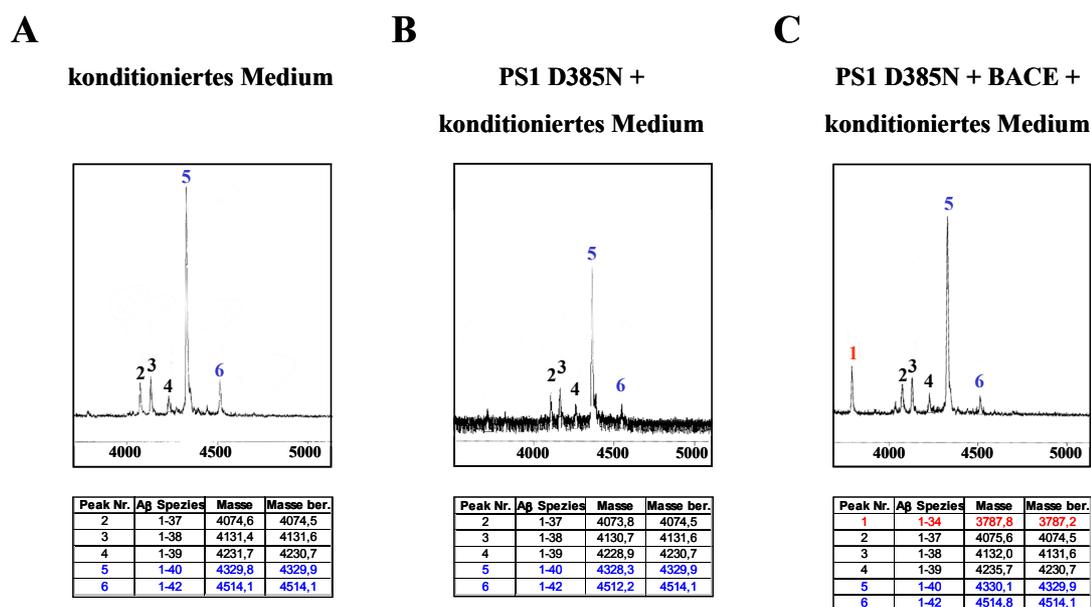


Abbildung 53: Membrangebundenes BACE-1 konvertiert A β 1-40/42 im Zellkulturmodell PS1 unabhängig zu A β 1-34.

(A) HEK293 Zellen, die ausschließlich β APPsw exogen exprimieren wurden 48 h mit Grundmedium inkubiert. Die A β -Spezies aus einem Drittel des so erhaltenen konditionierten Mediums wurden mit AK 3926 immunpräzipitiert und mittels MALDI-TOF MS analysiert. Das übrige Medium wurde zu gleichen Teilen 24 h entweder mit Zellen inkubiert, die nur β APPsw und PS1 D385N exogen exprimieren (B), oder mit Zellen, die zusätzlich auch BACE-1 exogen exprimieren (C). Auch diese Medien wurden anschließend mit AK 3926 immunpräzipitiert und mittels MALDI-TOF MS analysiert. Die Tabellen unter den Spektren beschreiben die gemessenen Massenwerte (Masse) der entsprechenden Peaks sowie die errechneten theoretischen Massenwerte (Masse ber.) der entsprechenden A β -Spezies.

Das konditionierte Medium von HEK293 Zellen, die nur β APPsw exprimieren, enthält wie oben beschrieben hauptsächlich A β 1-40 (vgl. Abbildung 53A). Daneben sind auch geringe Mengen A β 1-37/38/39/42 nachweisbar (Wang et al., 1996). A β 1-34 liegt hingegen unterhalb der Nachweisgrenze (vgl. Abbildung 53A). Wird dieses Medium zusammen mit Zellen inkubiert, die neben β APPsw auch eine dominant negative Variante von PS1 exogen exprimieren, findet keine nachweisbare Veränderung in der Zusammensetzung der A β -Spezies statt (vgl. Abbildung 53B). Inkubiert man jedoch das gleiche Medium mit einer Zelllinie, die zusätzlich auch BACE-1 exogen exprimiert, kann die Entstehung von A β 1-34 nachgewiesen werden, obwohl die verwendete Zelllinie selbst kein A β sezerniert (vgl. Abbildung 49 und Abbildung 53C).

Da BACE-1 im verwendeten Zellkulturmodell selbst nur zu einem sehr geringen Anteil sezerniert wird (Benjannet et al., 2001), ist davon auszugehen, dass der Umsatz von A β 1-40/42 durch BACE-1 größtenteils an der Zelloberfläche oder in Endosomen, nach vorausgegangener Endozytose des löslichen A β 1-40/42, stattfindet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass BACE-1 A β -Spezies, die zuvor durch proteolytische Spaltung der γ -Sekretase aus β APP CTF β entstanden sind, zwischen Leu34 und Met35 der A β -Domäne spalten kann. Eine direkte proteolytische Spaltung von membrangebundenen β APP nach Position 34 der A β -Domäne durch BACE-1 ist nicht möglich.

3.4.4.2 BACE-2 schneidet A β nach Aminosäure 34

Die Spezifität von BACE-1 und BACE-2 bezüglich der membrangebundenen β APP Substrate ist unterschiedlich. BACE-1 spaltet β APP vorzugsweise vor Asp1 und Glu11 der A β -Domäne und erfüllt somit die typischen Kriterien der β -Sekretase (vgl. 3.4.2.1), während BACE-2 β APP in erster Linie an Position 19 und 20 der A β -Domäne und mit geringerer Affinität auch vor Asp1 der A β -Domäne spaltet [(Hussain et al., 2000) und vgl. 3.4.2.2].

Da die beiden Enzyme weitgehend homolog sind, aber doch stark unterschiedliche katalytische Spezifitäten besitzen, stellte sich im folgenden die Frage, ob BACE-2 analog zu BACE-1 ebenfalls die proteolytische Spaltung von A β zwischen Leu 34 und Met 35 katalysieren kann.

Dazu wurden die A β -Spezies von HEK293 Zellen, die β APPwt und unterschiedliche Mengen BACE-2 exogen coexprimieren, mittels MALDI-TOF MS analysiert.

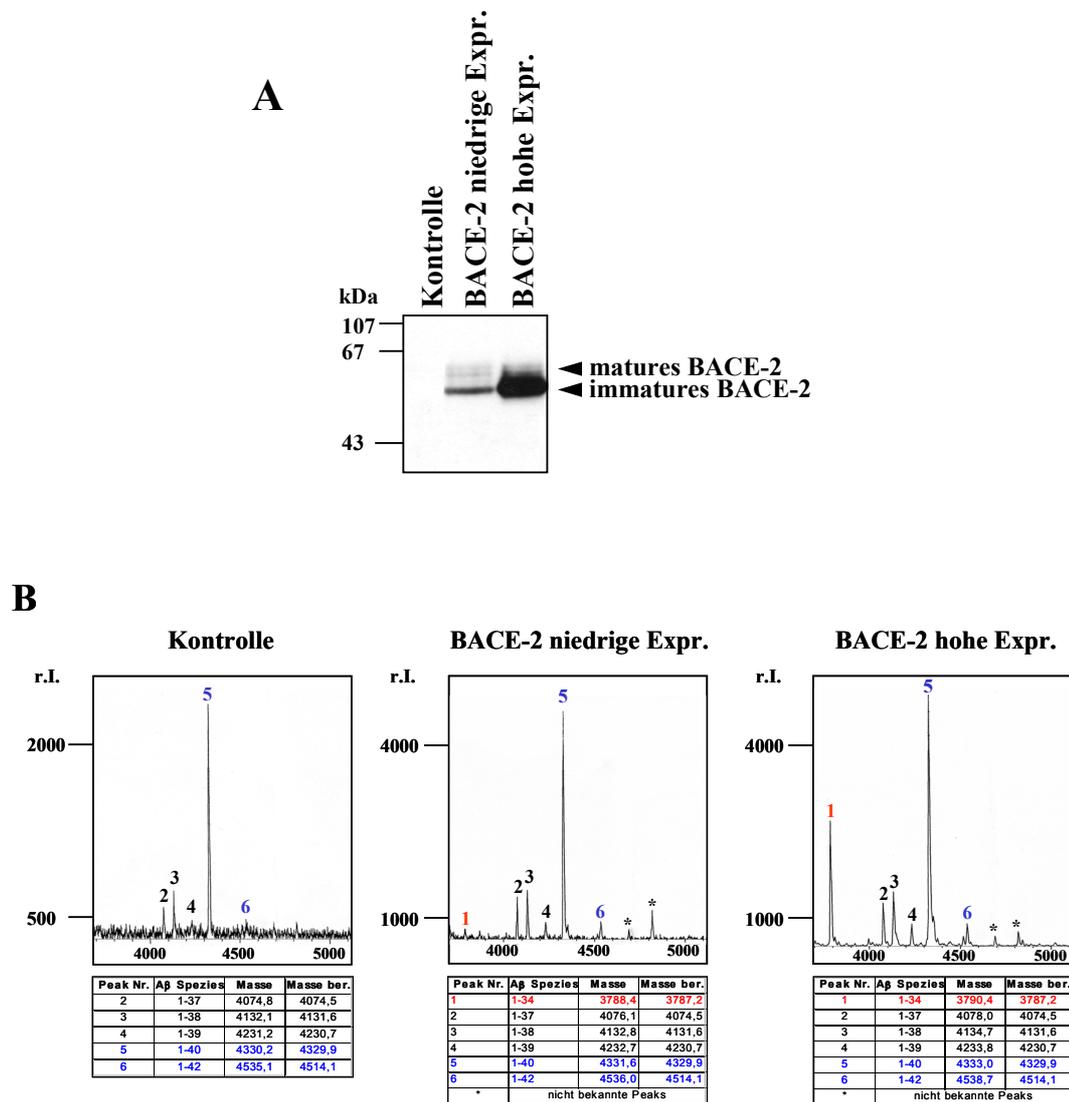


Abbildung 54: Die Entstehung von A β 1-34 korreliert mit der Menge an exprimiertem BACE-2.

(A) Membranpräparationen von HEK293 Zellen, die entweder ausschließlich β APPwt (Kontrolle) oder zusätzlich ansteigende Mengen an BACE-2 exogen exprimieren, wurden mittels Bradford-Reaktion auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt und mittels 10 % SDS-PAGE getrennt. BACE-2 wurde im Western Blot mit AK 7524 nachgewiesen. (B) A β -Spezies wurden aus den konditionierten Medien der Zelllinien mit AK 3926 isoliert. Abgebildet sind die Spektren einer MALDI-TOF MS Analyse der Immunpräzipitate. Die Skalierung gibt die relative Intensität (r.I.) der Peaks an und die Tabellen unter den Spektren beschreiben die gemessenen Massenwerte (Masse) sowie die errechneten theoretischen Massenwerte (Masse ber.) der entsprechenden Peaks.

Bei niedriger BACE-2 Expression findet sich im konditionierten Medium eine geringe Menge A β 1-34, während in der Kontrollzelllinie kein entsprechender Peak nachweisbar ist. Mit steigender BACE-2 Expression steigt auch die Menge an A β 1-34 im konditionierten Medium an, jedoch bleibt im Gegensatz zu Zellen mit exogener BACE-1 Expression A β 1-40 die dominante Spezies.

Das beschriebene Ergebnis zeigt, dass BACE-2, wie auch BACE-1, in der Lage ist, A β -Spezies, nach ihrer γ -Sekretase abhängige Entstehung, C-terminal zu verkürzen. Es entsteht jedoch der Eindruck, dass die Prozessierung von A β -Spezies durch BACE-2 weniger effizient ist als durch BACE-1.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es BACE-1 und BACE-2 hinsichtlich ihrer posttranslationalen Modifikationen, der subzellulären Lokalisierung sowie der katalytischen Spezifität bei der Proteolyse von β APP zu vergleichen, um einerseits neue Erkenntnisse bezüglich der β APP-Prozessierung zu gewinnen und andererseits die Unterschiede der beiden Enzyme zur Entwicklung spezifischer Inhibitoren nutzen zu können.

Die folgende Tabelle fasst die gewonnenen Erkenntnisse zusammen.

	BACE-1	BACE-2
<i>posttranslationale Modifikationen</i>		
Komplex-Glykosylierung in ER und Golgi-Apparat	ja	ja
Halbwertszeit	9-10 h	3-4 h
<i>In vitro</i> Phosphorylierung des C-Terminus	S498 durch CK1	S511 durch CK1
<i>In vivo</i> Phosphorylierung	ja S498	nicht nachweisbar
Tyrosinsulfatierung	nicht nachweisbar	ja
<i>subzelluläre Lokalisierung</i>		
Transport zur Zelloberfläche	ja	ja
Reinternalisierung in endosomale Kompartimente	ja	nicht nachweisbar
Rücktransport aus endosomalen Kompartimenten in das TGN	ja phosphorylierungsabhängig	nicht nachweisbar
<i>βAPP Prozessierung</i>		
Hauptprodukte bei der Proteolyse des β APP Holoproteins	β APP CTF _{Asp1} β APP CTF _{Glu11}	β APP CTF _{Phe20}
Kompartimente möglicher Aktivität	ER Golgi-Apparat <i>post</i> Golgi-Kompartimente	Golgi-Apparat <i>post</i> Golgi-Kompartimente
Sekundäre Prozessierung von sezerniertem A β 1-40/42	A β 1-34	A β 1-34

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse.

Vergleich der Eigenschaften von BACE-1 und BACE-2 in Bezug auf posttranslationale Modifikationen, subzelluläre Lokalisierung und katalytische Spezifität bezüglich β APP.

4.2 HEK293 Zellen als Modellsystem und transgene Überexpression von BACE-1 und BACE-2

Als Modellsystem für die Analyse der sekundären Modifikationen sowie der katalytischen Spezifität der beiden Proteasen bezüglich β APP wurden HEK293 Zellen verwendet. HEK293 Zellen stellen ein in der Alzheimer Forschung weit verbreitetes Modellsystem dar. So wurde beispielsweise die β -Sekretase selbst in einer der hier verwendeten Zelllinien identifiziert (Vassar et al., 1999) und auch im Rahmen der γ -Sekretase Forschung wurden zahlreiche Studien an HEK Zellen durchgeführt [z.B. (Capell et al., 1998; Chen et al., 2001; Steiner et al., 2002; Xia et al., 2000) usw.].

Die endogene Expression von BACE-1 und BACE-2 in HEK293 Zellen ist vergleichsweise gering. Um die Proteine dennoch gut nachweisen zu können, wurden die beiden Proteasen sowie das Substrat β APP exogen exprimiert. Aufgrund dieser exogenen Expression wird, verglichen mit der endogenen Situation, eine um ein vielfaches höhere Menge des entsprechenden Proteins synthetisiert. Folglich entsteht eine artifizielle Situation, die nicht kritiklos auf die physiologische Situation übertragen werden darf.

So treten beispielweise nach exogener Expression von BACE-1, niedermolekulare Banden auf, die spezifisch mit Antikörpern gegen die zytoplasmatische Domäne von BACE-1 nachgewiesen werden können (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 33). Bei Koexpression der beiden Enzyme verändert sich das Muster der C-terminalen BACE-1 Fragmente (vgl. Abbildung 33). Eine Möglichkeit für die Entstehung der C-terminalen Spaltprodukte ist die Ektodomänen-Spaltung von BACE-1 an der Zelloberfläche (Benjannet et al., 2001). Der Prozentsatz des gespaltenen BACE-1 ist jedoch selbst bei Überexpression von BACE-1 sehr gering und erklärt deshalb nicht die große Menge der C-terminalen Spaltprodukte. Ferner gibt es keine Anhaltspunkte, für eine Beteiligung von BACE-2 an der Ektodomänen-Spaltung von BACE-1, so dass die veränderten C-terminalen Spaltprodukte, die durch zusätzliche Expression von BACE-2 entstehen, auf diese Weise nicht erklärt werden können. Eine andere Möglichkeit für die Entstehung der C-terminalen Spaltprodukte ist die Sättigung der am Abbau der beiden Proteasen beteiligten Enzyme. Da mit BACE-1 und BACE-2 zwei sehr ähnliche Proteasen überexprimiert werden, ist bei Koexpression beider Proteasen diese Sättigung vermutlich noch stärker ausgeprägt und es

akkumuliert ein größeres Proteinfragment (vgl. Abbildung 33). Ein Beweis für die direkte Beteiligung von BACE-2 am Abbau von BACE-1 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht werden.

Weiterhin ist in einem System, in dem sowohl Enzym als auch Substrat überexprimiert werden, die Menge der gebildeten proteolytischen Produkte in der Regel um ein vielfaches höher als unter physiologischen Bedingungen. Es kann folglich mit Hilfe des verwendeten Zellsystems keine Aussage über die Menge an β APP Spaltprodukten gemacht werden, die unter physiologischen tatsächlich Bedingungen entstehen.

Überexprimierte Proteine können außerdem in der Zelle artifizielle Lokalisationen annehmen, da einzelne subzelluläre Kompartimente möglicherweise gesättigt sind und daher der Vorwärtstransport des Proteins eingeschränkt ist. Aussagen zur Lokalisation exogen exprimierter Proteine müssen deshalb im Bezug auf andere Proteine mit vergleichbarer exogener Expression gemacht werden, oder kritisch mit der endogenen Situation verglichen werden.

Auf der anderen Seite sind HEK293 Zellen im Vergleich zu neuronalen Zelllinien ein leicht zu kultivierendes System und können leicht stabil transfiziert werden. Folglich eignet sich dieses Zellsystem sehr gut, um die Auswirkungen mutierter Proteine in zellulärem Kontext zu untersuchen.

Die in HEK293 Zellen endogen exprimierte Form des β APP ist 751 AS lang, und enthält im Gegensatz zur neuronal exprimierten Form eine Kunitz-Proteaseinhibitor-ähnliche Domäne (Tanzi et al., 1988). Die endogene β APP Expression in HEK293 Zellen ist relativ niedrig, aber durch konventionelle Analyseverfahren nachweisbar. Um insbesondere kleine Spaltprodukte wie A β und p3 besser nachweisen zu können, wurde β APP₆₉₅ exogen in HEK293 Zellen exprimiert (Haass et al., 1992b). Aufgrund des Molekulargewichtsunterschiedes der beiden β APP Isoformen können exogenes und endogenes β APP im Gelsystem unterschieden werden (vgl. Abbildung 34 und Abbildung 35) und somit die Veränderungen mutierter Formen des β APP, wie z.B. der schwedischen Mutante, isoliert betrachtet werden.

Außerdem ermöglicht die exogene Expression der beiden Proteasen Vorgänge die endogen nur in geringem Maße ablaufen, oder Produkte, die unter physiologischen Bedingungen schnell abgebaut werden und somit nicht nachweisbar sind, sichtbar zu machen. Die katalytischen Eigenschaften und Spezifitäten der Proteasen können auf diese Weise gut

untersucht werden. Mit Hilfe des verwendeten Systems können deshalb wertvolle Grundkenntnisse über die Eigenschaften von BACE-1 und BACE-2 gewonnen werden, die in neuronalen Zellen oder Tiermodellen unerkannt bleiben.

Die mechanistischen Erkenntnisse über die Spaltung von β APP durch BACE-1 und BACE-2, die in HEK293 Zellen gewonnen werden, können zudem direkt auf neuronale Zellen übertragen werden, da die Spaltung des β APP ein physiologischer Prozess ist, der in jeder menschlichen Zelle in vergleichbarer Weise abläuft (Haass et al., 1992b; Seubert et al., 1993; Shoji et al., 1992).

4.3 Posttranslationale Modifikationen von BACE-1 und BACE-2 im Vergleich

BACE-1 und BACE-2 sind innerhalb ihrer Aminosäuresequenzen zu 64 % homolog. Die Prodomäne beider Proteine wird im Laufe der Maturierung abgespalten. Im Gegensatz zu BACE-1, dessen Prodomäne nach Erreichen des Golgi-Apparates durch Furin oder eine Furin-ähnliche Protease abgespalten wird (Bennett et al., 2000b; Capell et al., 2000), erfolgt die Propeptid Abspaltung von BACE-2 autokatalytisch (Hussain et al., 2001). Die Abspaltung des BACE-1 Propeptids durch eine unabhängige Protease ist eher untypisch für Aspartylproteasen der Pepsin-Gruppe, die, wie auch BACE-2, ihre Prodomäne meist autokatalytisch, aufgrund der pH-Änderung zwischen ER und Golgi-Apparat, abspalten (Vassar, 2002). Ebenfalls untypischerweise sind die beiden Prodomänen der Enzyme kaum physiologische Inhibitoren für die Proteaseaktivität (Creemers et al., 2001; Hussain et al., 2001). Die Hauptfunktion der BACE-1 Prodomäne scheint vielmehr im Zusammenhang mit der korrekten Proteinfaltung zu stehen (Shi et al., 2001). Folglich stellt die Inhibition der Propeptidabspaltung keine effektive Möglichkeit zur Beeinflussung der Proteaseaktivität dar.

4.3.1 Glykosylierung

Hinsichtlich ihrer Glykosylierung unterscheiden sich BACE-1 und BACE-2 nur wenig. Beide Proteine werden bei ihrer Synthese am ER durch die kovalente Bindung von Core-Zuckereinheiten modifiziert (vgl. 3.2.1.2). Diese einfachen Zuckereinheiten können größtenteils mittels EndoH abgespalten werden [vgl. Abbildung 19 und (Capell et al., 2000)]. Die Bindung der Zuckereinheiten im ER kann durch die Behandlung mit

Tunikamyzin verhindert werden. In diesem Fall wird sowohl BACE-1 (Capell et al., 2000) als auch BACE-2 (vgl. Abbildung 17) als unglykosyliertes Protein mit dem berechneten Molekulargewicht von ca. 50 kDa exprimiert.

Während BACE-1 vier N-Glykosylierungsstellen besitzt (Haniu et al., 2000), sind in BACE-2 nur zwei konserviert (Hussain et al., 2000). Folglich ist das tatsächliche Molekulargewicht von BACE-2 geringer als das von BACE-1 (vgl. Abbildung 14/ Abbildung 15/ Abbildung 16). Während ihres Transportes durch den sekretorischen Transportweg werden die Zuckereinheiten beider Proteine modifiziert, die so entstehenden komplexen Zuckereinheiten sind resistent gegen eine Behandlung mit EndoH, können aber mit PNGase bei beiden Proteinen vollständig abgespalten werden [vgl. Abbildung 18/ Abbildung 19 und (Capell et al., 2000)]. Die Mutation der beiden N-Glykosylierungsstellen in BACE-1, die in BACE-2 nicht konserviert sind, reduziert die BACE-1 Aktivität (Charlwood et al., 2001). Grund für die Verminderung der Enzymaktivität ist wahrscheinlich eine veränderte Faltung des Proteins aufgrund der fehlenden Zuckereinheiten und eine daraus resultierende verminderte Stabilität (Vassar, 2002).

Weder für BACE-1 noch für BACE-2 konnte eine O-Glykosylierung nachgewiesen werden (Haniu et al., 2000).

Trotz der Gemeinsamkeiten hinsichtlich der N-Glykosylierung unterscheiden sich BACE-1 und BACE-2 im Bezug auf die Kinetik der Maturierung. Ein „Pulse Chase“ Experiment der beiden Proteine zeigt, dass BACE-2 langsamer maturiert als BACE-1, die mature Form des BACE-1 aber stabiler ist (vgl. Abbildung 16). Die quantitative Auswertung des beschriebenen Experimentes muss kritisch betrachtet werden, da aufgrund des Proteinnachweises mit unterschiedlichen Antikörpern nicht sicher gestellt werden kann, dass die exogene Expression der beiden Proteine gleich hoch ist. Geht man davon aus, dass BACE-2 weniger stark exprimiert wird als BACE-1, ist die Maturierungsgeschwindigkeit von BACE-2 tatsächlich insgesamt langsamer, als die von BACE-1, da falls die Maturierungsmaschinerie im Falle von BACE-1 gesättigt wäre, das umgekehrte Ergebnis zu erwarten wäre. Für den Fall, dass BACE-2 stärker exprimiert ist, kann nicht mit Sicherheit geschlossen werden, dass sich die Maturierungsgeschwindigkeiten unterscheiden, da dann für BACE-2 eine Sättigung der Maturierungsmaschinerie in Betracht gezogen werden muss.

Gegen diese Annahme spricht der Nachweis von BACE-1 und BACE-2 mit Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 15), der vermuten lässt, dass BACE-1 tatsächlich etwas stärker exprimiert wird als BACE-2.

Die erhöhte Stabilität und die dadurch verlängerte Halbwertszeit des muren BACE-1 Proteins könnte dann auf eine Sättigung der am Abbau der Protease beteiligten Enzyme oder auf eine bessere Nachweisbarkeit des BACE-1 Proteins zurückgeführt werden. Die Erhöhung der Halbwertszeit ist jedoch sehr ausgeprägt (vgl. Abbildung 16B) und darüber hinaus beschreiben auch andere Arbeiten eine ausgeprägte Stabilität des BACE-1 Proteins (Haniu et al., 2000; Huse et al., 2000). Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass die Stabilität des BACE-1 Proteins durch weitere Faktoren beeinflusst wird. Biotinylierungsexperimente zeigen, dass beide Proteine auf ihrem Weg durch den sekretorischen Prozessierungsweg an die Zelloberfläche transportiert werden (vgl. Abbildung 27). Während BACE-2 nicht nachweislich reinternalisiert wird, ist BACE-1 nach seiner Reinternalisierung in endosomale Kompartimente, vermittelt durch ein Dileucinmotiv im C-Terminus (Huse et al., 2000), mehr als 60 min im Zellinneren nachweisbar (vgl. Abbildung 28). Diese Stabilität beruht vermutlich auf einem phosphorylierungsabhängigen Recycling zwischen Endosomen und TGN (Walter et al., 2001a). BACE-2 enthält nicht das charakteristische Dileucinmotiv im C-Terminus, was erklärt warum für BACE-2 keine Reinternalisierung nachgewiesen werden konnte. Die genauen Mechanismen, der weiteren Prozessierung von BACE-2 nach dem Transport an die Zelloberfläche, sowie der Abbau sind bisher ungeklärt. Eine weitere Möglichkeit, neben Reinternalisierung unmittelbar gefolgt von rascher Degradation des BACE-2 Proteins, ist eine Ektodomänenspaltung, die zu einer Sezernierung des N-terminalen Teils des Proteins führt. Für BACE-1 konnte gezeigt werden, dass sehr geringe Anteile der Oberflächenpopulation durch Proteolyse innerhalb der Ektodomäne sezerniert werden (Benjannet et al., 2001). Aus eigenen Experimenten muss jedoch geschlossen werden, dass es sich hierbei um einen sehr geringen, vernachlässigbaren Anteil handelt. Für BACE-2 hingegen konnte bisher kein entsprechender Nachweis erbracht werden, da außer dem Propeptidantikörper (AK 680) kein BACE-2 spezifischer N-terminaler Antikörper zur Verfügung stand. Eventuelle Anhaltspunkte für die Sezernierung der BACE-2 Ektodomäne geben die 15-20 kDa großen C-terminalen BACE-2 Fragmente, die häufig in Membranpräparationen nachgewiesen werden können und das korrespondierende Gegenstück zur abgespaltenen Ektodomäne darstellen könnten.

Eine noch eindeutiger Aussage bezüglich der Stabilität der beiden Proteine könnte getroffen werden, wenn die Halbwertszeit der endogenen Proteine bestimmt würde. Aufgrund der geringen endogenen Expression ist ein derartiges Experiment im verwendeten Zellsystem jedoch nicht durchführbar.

4.3.2 Phosphorylierung und ihr Einfluss auf Transport und Lokalisierung

Durch Expression entsprechend mutierter Proteine konnte gezeigt werden, dass BACE-1 *in vivo* ausschließlich an S498 im C-Terminus phosphoryliert wird (Walter et al., 2001a). *In vitro* Experimente mit verschiedenen Proteinkinasen legen nahe, dass CK-1 eine potentielle Kinase für die Phosphorylierung an S498 ist. Darüber hinaus konnte die Phosphorylierung der entsprechenden GST BACE-1 Fusionsproteine durch Kinasen aus Zellextrakten mit Hymenialdesin (HD) gehemmt werden (Walter et al., 2001a). HD ist ein Inhibitor für CK-1 und Glykogensynthase Kinase 3 β (GSK3 β) (Meijer et al., 2000). Die Phosphorylierungsstelle S498 in BACE-1 ist N-terminal von sauren AS-Resten umgeben, einer typischen Konsensussequenz für CK-1, jedoch nicht für GSK3 β (Tuazon and Traugh, 1991; Yu and Yang, 1994). Daraus kann geschlossen werden, dass CK-1 oder eine der CK-1 ähnliche Kinase BACE-1 auch *in vivo* phosphoryliert. Im Gegensatz zu BACE-1 konnte für BACE-2 im Rahmen dieser Arbeit keine *in vivo* Phosphorylierung nachgewiesen werden. In Homologie zu BACE-1 findet sich aber im C-Terminus von BACE-2 ein Serin-Rest, N-terminal umgeben von sauren AS-Resten. Im Gegensatz zu BACE-1 befindet sich im C-Terminus von BACE-2 ein weiterer Serin-Rest in unmittelbarer Nachbarschaft (vgl. Abbildung 23). *In vitro* Experimente mit mutierten GST BACE-2 Fusionsproteinen zeigen, dass BACE-2, in Analogie zu BACE-1, durch CK-1 ausschließlich an S511 phosphoryliert werden kann (vgl. Abbildung 24). Mittels der beschriebenen Ergebnisse kann jedoch nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass BACE-2 *in vivo* zusätzlich an S510 durch eine andere, nicht untersuchte, Kinase phosphoryliert werden kann. Die mangelnde Nachweisbarkeit einer *in vivo* Phosphorylierung von BACE-2 ist möglicherweise auf die Spezifität der C-terminalen Antikörper (AK 7524/ 7525) zurückzuführen, die entsprechend mutiertes bzw. phosphoryliertes Protein im nativen Zustand eventuell nur schlecht binden können und somit die Immunpräzipitation beeinträchtigen.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass BACE-2 *in vivo* nicht phosphoryliert wird, zumal für BACE-2 kein Rücktransport aus endosomalen Kompartimenten in das TGN, der für BACE-1 phosphorylierungsabhängig erfolgt, nachgewiesen werden konnte (vgl. 3.3.1).

Im Zellkulturmodell wird ausschließlich vollständig matures BACE-1, nach Abspaltung der Prodomäne und vollständiger Glykosylierung, phosphoryliert (Walter et al., 2001a), was auf eine Phosphorylierung im TGN und den nachfolgenden subzellulären Kompartimenten hindeutet. CK-1 selbst tritt in verschiedenen Isoformen in der Zelle auf, von denen einige spezifisch in vesikulären Strukturen und an der Zelloberfläche nachweisbar sind und selektiv Membranproteine phosphorylieren (Gross and Anderson, 1998). Zudem reguliert CK-1 im Hefe-System den vesikulären Transport (Panek et al., 1997). Folglich liegt die Vermutung nahe, dass eine Isoform der CK-1, die in TGN oder endosomalen Kompartimenten lokalisiert ist, spezifisch den Transport von BACE-1 reguliert.

Der Einfluss der Phosphorylierung von BACE-1 auf dessen zelluläre Lokalisierung wurde mit Hilfe mutierter BACE-1 Varianten, die anstelle des entsprechenden Serin-Restes entweder einen Alanin-Rest, oder einen Aspartat-Rest enthalten, untersucht. Der unpolare Alanin-Rest ahmt dabei den unphosphorylierten Zustand des Proteins nach, der polare Aspartat-Rest aufgrund seiner negativen Ladung den phosphorylierten Zustand. Eine derartige Strategie liefert neben dem Einsatz von phosphorylierungsstimmulierenden oder -hemmenden Agentien zusätzliche Information über die Funktion der Phosphorylierung eines bestimmten Proteins (Egelhoff et al., 1993; Walter et al., 1999). Nachteilig ist dabei, dass Strukturveränderungen die durch Einfügen einer artifiziellen Aminosäure hervorgerufen werden können, nicht notwendigerweise mit den Strukturveränderungen bedingt durch Phosphorylierung identisch sind. Zudem ist die durch Mutation des Serin-Restes nachgeahmte Phosphorylierung im Gegensatz zum physiologischen Vorgang der Phosphorylierung nicht reversibel. Vorteil dieser Methode gegenüber unspezifischen Agenzien wie z.B. Okadasäure ist, dass die Auswirkungen der Phosphorylierung spezifisch für ein Protein betrachtet werden können, ohne dabei die übrigen Phosphorylierungsvorgänge in der Zelle zu beeinflussen (Egelhoff et al., 1993; Walter et al., 1999).

Um trotz der exogenen Expression der Mutanten Aussagen über eine veränderte Lokalisierung machen zu können, wurde sichergestellt, dass BACE-1 wt, BACE-1 S498A und BACE-1 S498D in vergleichbarer Menge exprimiert werden (Walter et al., 2001a). Folglich ist es möglich eine veränderte Lokalisierung eines der beiden Proteine im Vergleich zu den anderen beiden Proteinen festzustellen.

BACE-1 wt und BACE-1 S498D sind überwiegend in kernnahen Strukturen, die durch ein Markerprotein als Golgi-Kompartimente identifiziert werden konnten, nachweisbar (vgl. Abbildung 29). Für BACE-1 wt wurde in vorausgegangenen Arbeiten bereits eine ähnliche Lokalisierung beschrieben (Capell et al., 2000; Huse et al., 2000; Vassar et al., 1999).

BACE-1 S498A zeigt darüber hinaus eine verstärkte Lokalisierung in vesikulären Strukturen der Zelle, die als endosomale Kompartimente identifiziert wurden (Walter et al., 2001a). Da die unterschiedliche Lokalisierung der Mutanten nicht auf eine veränderte Glykosylierung zurückzuführen ist (Walter et al., 2001a), muss davon ausgegangen werden, dass der Phosphorylierungszustand des Proteins seine Lokalisierung direkt beeinflusst.

BACE-1 wt erreicht auf seinem Weg durch den sekretorischen Prozessierungsweg die Zelloberfläche (vgl. Abbildung 27) und wird aufgrund eines Dileucinmotivs im C-Terminus wieder in das Zellinnere reinternalisiert [vgl. Abbildung 28 und (Capell et al., 2000; Huse et al., 2000)]. Diese Reinternalisierung erfolgt unabhängig vom Phosphorylierungsstatus an S498, da beide Mutanten wie auch BACE-1 wt reinternalisiert werden (Walter et al., 2001a). Die veränderte Lokalisierung der BACE-1 S498A Mutante ist vielmehr auf die Störung des Rücktransportes aus endosomalen Kompartimenten in das TGN zurückzuführen (Walter et al., 2001a). Dieser „Recycling-Prozess“ aus Endosomen dient dazu, Proteine, die von der Zelloberfläche aufgenommen wurden und nicht zum Abbau in Lysosomen bestimmt sind, zurück in den sekretorischen Prozessierungsweg zu transportieren (Alberts et al., 2002).

BACE-2 scheint einen derartigen „Recycling-Prozess“ nicht oder nur zu einem nicht nachweisbaren Anteil zu durchlaufen und wird stattdessen wahrscheinlich entweder in den extrazellulären Raum sezerniert, oder rasch in Lysosomen abgebaut. Das folgende Modell veranschaulicht die beschriebenen Vorgänge.

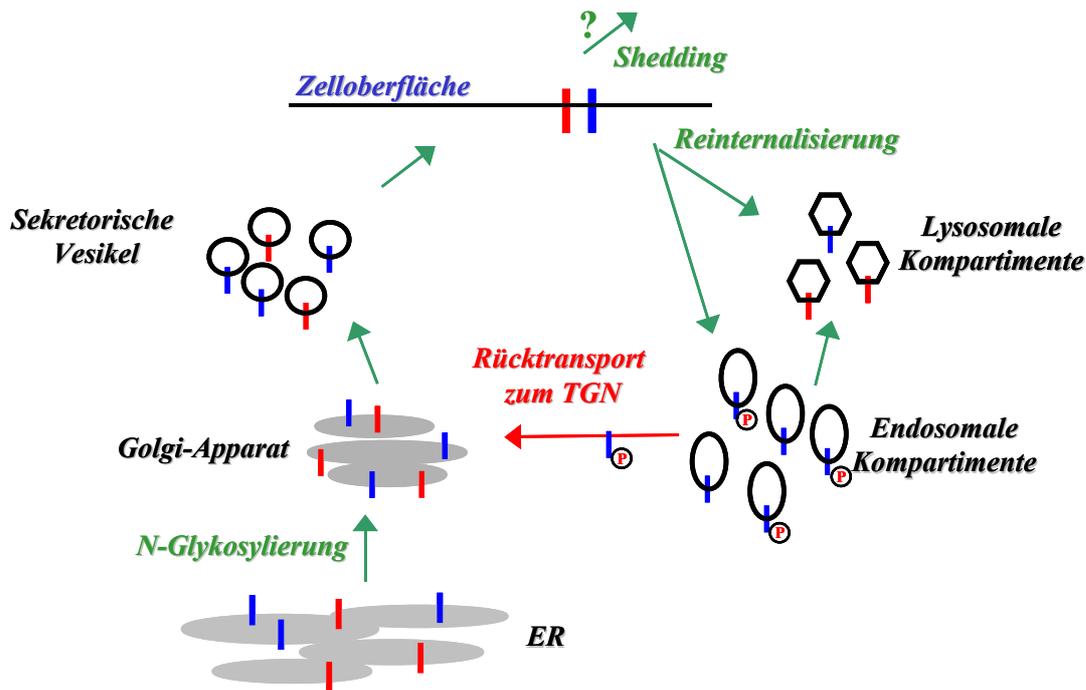


Abbildung 55: Modellzeichnung zum Transport der Proteasen im sekretorischen Prozessierungsweg.

Abgebildet ist ein Modell des Transportes von BACE-1 (blauer Balken) und BACE-2 (roter Balken) durch die Kompartimente des sekretorischen Prozessierungsweges zur Zelloberfläche und die Vorgänge nach der Reinternalisierung ins Zellinnere.

Auffällig ist, dass dieser Kreislauf des BACE-1 genau zwischen den Kompartimenten stattfindet, in denen die Protease aufgrund ihres sauren pH Optimums vermutlich die höchste proteolytische Aktivität besitzt (Huse et al., 2000; Vassar et al., 1999). Zudem sind die beiden Enzymaktivitäten in diesem Kompartimenten mit β APP colokalisiert (Golde et al., 1992; Haass et al., 1992a; Nordstedt et al., 1993).

Eine signifikante Auswirkung der beiden BACE-1 Mutanten S498A und S498D auf die Bildung von A β 1-40/42 konnte mit dem verwendeten Zellsystem nicht gezeigt werden, da einerseits die endogene BACE-1 Aktivität nach wie vor vorhanden ist und andererseits BACE-1 S498A immer noch effektiv in endosomale Kompartimente reinternalisiert wird und somit keine vollständig Inaktivierung der BACE-1 Aktivität zu erwarten ist.

4.3.3 Sulfatierung

Im Gegensatz zu BACE-1, das ausschließlich innerhalb seiner Oligosaccharidseitenketten sulfatiert wird, enthält BACE-2 zusätzlich mindestens an einer Aminosäure einen Sulfatrest (vgl. Abbildung 26).



Abbildung 56: Modell zur BACE-2 Sulfatierungsstelle.

Dargestellt ist eine Schemazeichnung des BACE-2. Die zelluläre Membran wird durch einen grauen Kasten symbolisiert. Gekennzeichnet sind das Signalpeptid (rot), die Prodomäne (blau) und die beiden kritischen Aspartylmotive (grüner Stern). Die AS-Sequenz im Bereich der möglichen Sulfatierungsstelle ist im Einbuchstabencode dargestellt und der kritische Tyrosin-Rest ist vergrößert.

Eine computergestützte Sequenzanalyse des BACE-2 N-Terminus liefert eine potentielle Sulfatierungsstelle an Y129 zwischen den beiden kritischen Aspartatmotiven. Bisher wurde nicht untersucht, ob es sich dabei tatsächlich um eine *in vivo* Sulfatierungsstelle handelt. Entsprechende Mutationen an der fraglichen Stelle könnten diese Frage beantworten.

Der Proteinsulfatierung konnte bisher keine allgemein gültige Funktion zugeordnet werden. So beeinflusst beispielweise die Sulfatierung von „yolk protein 2“ in *Drosophila melanogaster* dessen Transport vom Golgi-Apparat an die Zelloberfläche (Friederich et al., 1988). Für andere Proteine konnte gezeigt werden, dass Tyrosinsulfatierung deren Aktivität, ihre proteolytische Prozessierung im sekretorischen Prozessierungsweg, sowie ihre Wechselwirkung mit anderen Proteinen beeinflusst (Huttner, 1988; Niehrs et al., 1994). So wird beispielsweise die Prozessierung des Gastrinvorläuferproteins zum aktiven Gastrin durch Tyrosinsulfatierung reguliert (Bundgaard et al., 1995) und die hormonelle Aktivität des Cholecystokinin durch Sulfatierung eines Tyrosinrestes drastisch gesteigert (Mutt, 1980).

Aufgrund der vielseitigen Funktion der Tyrosinsulfatierung wäre es denkbar, dass die Unterschiede zwischen BACE-1 und BACE-2 bezüglich intrazellulärem Transport oder der Substratspezifität in unterschiedlichem Sulfatierungsverhalten begründet sind.

4.4 Einflüsse von BACE-1 und BACE-2 auf die Prozessierung von β APP und auf die Folgeprozessierung der A β -Spezies

BACE-1 erfüllt nicht nur alle für eine β -Sekretase geforderten Kriterien (vgl. 1.3.4.1), sondern scheint auch das Enzym mit der höchsten β -Sekretase Aktivität zu sein, da BACE-1 „knockout“ Mäuse keine nachweisbare Amyloid Bildung im Gehirn zeigen (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001). Die Expression von BACE-1 ist zudem im Zentralnervensystem am höchsten, während umgekehrt BACE-2 im Zentralnervensystem nur wenig, dafür aber in peripheren Geweben, wie z.B. der Bauchspeicheldrüse, der Gebärmutter oder dem Magen, hoch exprimiert wird (Bennett et al., 2000a; Vassar and Citron, 2000). Aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten lag die Vermutung nahe, dass BACE-2 ebenfalls die Eigenschaften einer β -Sekretase besitzt, diese sich jedoch in Neuronen aufgrund der geringen Protein Expression nicht auswirkt.

4.4.1 BACE-1 und BACE-2 verhalten sich unterschiedlich bezüglich der Prozessierung membrangebundener β APP Substrate

BACE-1 katalysiert in den verwendeten Zellkulturmodellen wie erwartet vorwiegend die Spaltung des β APP an Position 1 und 11 der A β -Domäne [vgl. Abbildung 32 und (Citron et al., 1995; Vassar et al., 1999)]. Dabei entsteht das membrangebundene Fragment β APP CTF_{Asp1} und lösliches β APPs β , sowie β APP CTF_{Glu11}. Durch γ -Sekretase-Prozessierung der beiden membrangebundenen Fragmente werden die löslichen A β -Spezies A β 1-40/42 und A β 11-40/42 in die Zellkulturmedien sezerniert (vgl. Abbildung 6 und Abbildung 32). Die durch exogene BACE-1 Expression entstandenen β APP Fragmente spiegeln also die typischen Spaltprodukte der β -Sekretase wieder (Vassar, 2002).

Exogene BACE-2 Expression führt im Zellkulturmodell hingegen zu verstärkter Sezernierung einer β APPs α' -Spezies und zur Bildung membrangebundener β APP CTF Fragmente, die mit Phe20 der A β -Domäne beginnen (vgl. Abbildung 35 und Abbildung 36).

Folglich entstehen durch die γ -Sekretase Prozessierung dieser Fragmente keine für eine β -Sekretase typischen amyloidogenen Spezies, sondern vielmehr p3-ähnliche Fragmente (vgl. Abbildung 6). Diese Art der β APP Prozessierung entspricht daher mehr der einer α -Sekretase, als der der β -Sekretase. Folglich muss davon ausgegangen werden, dass BACE-2 in der Regel eine antiamyloidogene Funktion besitzt. Diese Beobachtung wurde auch durch *in vitro* Experimente mit synthetischen Peptiden (Farzan et al., 2000) und Zellkulturexperimente mit transienter BACE-2 Expression (Yan et al., 2001) bestätigt. Es kann jedoch nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass BACE-2 auch einen geringen Anteil zur β -Sekretase Aktivität beisteuert. Zumal andere Arbeiten zeigen, dass BACE-2 synthetische Peptide, mit der schwedischen Doppelmutation K595N/M596L (bezogen auf β APP₆₉₅) proteolytisch spalten kann (Farzan et al., 2000; Hussain et al., 2000). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass FAD Mutationen im Bereich der α -Sekretase Schnittstelle, wie z.B. A617G (Hendriks et al., 1992) oder E618Q (Levy et al., 1990) die β -Sekretase Aktivität der BACE-2 Protease erhöhen, während die α -Sekretase Aktivität abnimmt (Farzan et al., 2000). Damit besteht die Möglichkeit, dass BACE-2 in diesen speziellen Fällen zusätzlich zur Amyloid-Produktion beiträgt.

In Fibroblasten von Down Syndrom-Patienten konnte hingegen eine verstärkte Bildung von β APP CTF_{Phc20} nachgewiesen werden (Zhong et al., 1994). Aufgrund der dritten Kopie des Chromosoms 21 exprimieren Down Syndrom Patienten nicht nur vermehrt β APP, sondern vermutlich auch BACE-2 (vgl. 1.6.4.3).

Gegen eine ausgeprägte β -Sekretase Aktivität des BACE-2 spricht weiterhin die Beobachtung, dass die antisens Inhibition des BACE-1 eine dramatische Reduktion der A β -Sekretion im Zellkulturmodell bewirkt, während die Inhibition des BACE-2 nur sehr geringe Auswirkungen auf die A β -Produktion hat (Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999).

Der Grund für die unterschiedlichen Spezifitäten der beiden Proteasen ist bisher unklar. Obwohl sich beide Enzyme in ihrer Primärstruktur stark ähneln, können geringe Unterschiede in der Sekundär- und Tertiärstruktur eine veränderte Substratspezifität bedingen. In diesem Zusammenhang wäre ein Vergleich der beiden Kristallstrukturen hilfreich. Bisher konnte jedoch nur die Struktur von BACE-1 aufgeklärt werden (Hong et al., 2000; Sauder et al., 2000).

Zudem unterscheiden sich die beiden Proteine, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, in ihren sekundären Modifikationen, wie z.B. Propeptid Abspaltung, Sulfatierung und ggf.

Phosphorylierung, was unter anderem einen veränderten intrazellulären Transport zur Folge hat (vgl. 4.3.2) und somit die Aktivität in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten bewirken kann (vgl. 4.1 und 4.3).

4.4.2 Entstehung der verschiedenen β APP CTF Spezies in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten

Die Blockade des Proteinfortschritts durch BFA oder Monensin in HEK293 Zellen mit exogener BACE-1 Expression zeigt, dass die Prozessierung von β APP an Asp1 der A β -Domäne schon unmittelbar nach der Synthese des Enzyms im ER erfolgen kann (vgl. Abbildung 41), obwohl das pH Optimum der Protease von 4,5 (Vassar et al., 1999) bei einem pH von ca. 7 im ER deutlich überschritten ist (Alberts et al., 2002). Die Spaltung des β APP an Glu11 der A β Domäne erfolgt hingegen auch bei Überexpression der BACE-1 Protease ausschließlich im Golgi-Apparat oder in späteren sekretorischen Kompartimenten (vgl. Abbildung 41). Die Entstehung des β APP CTF_{Glu11} wurde auch von anderen Arbeitsgruppen ausschließlich in späteren subzellulären Kompartimenten nachgewiesen (Huse et al., 2002; Liu et al., 2002). Im Golgi-Apparat herrscht ein pH-Wert von ca. 6,3 (Machen et al., 2003) und ist somit im Vergleich mit dem ER deutlich niedriger und deshalb näher am pH Optimum der Protease (Vassar et al., 1999). Zudem sind in diesem Kompartiment die sekundären Modifikationen des Proteins, insbesondere Glykosylierung und die Abspaltung der Prodomäne weitgehend abgeschlossen (vgl. 4.3), so dass davon ausgegangen werden könnte, dass die eigentlich bevorzugte Spaltungsstelle des muren BACE-1 bei Glu11 der A β -Domäne liegt. Auch repräsentiert A β 11-40/42 die dominante A β -Spezies in neuronalen Primärkulturen der Ratte und der Maus (Gouras et al., 1998; Wang et al., 1996). In humanen neuronalen Zellkulturen ist aber A β 1-40/42 die am meisten sezernierte A β -Spezies und A β 11-40/42 entsteht nur zu einem geringen Anteil (Lee et al., 2002a). Folglich liegt im humanen System die bevorzugte BACE-1 Schnittstelle vor Asp1 der A β -Domäne (vgl. auch 4.4.3).

Die Spaltung des β APP an Asp1 der A β -Domäne im ER wurde in dieser Arbeit durch Überexpression der Protease beobachtet, so dass sich die Frage nach der physiologischen Relevanz dieses Prozessierungsvorganges stellt. In anderen Arbeiten wurde die Entstehung des β APP CTF_{Asp1} sowie entsprechender A β -Spezies im ER jedoch auch bei endogener

Expression von BACE-1 beobachtet (Chyung et al., 1997; Cook et al., 1997; Skovronsky et al., 1998; Wild-Bode et al., 1997), was beweist, dass BACE-1 auch ohne artifizielle Überexpression bereits im ER aktiv sein kann, auch wenn die überwiegende BACE-1 Aktivität in späteren subzellulären Kompartimenten lokalisiert ist. BACE-1 Koexpression mit β APP_{sw} bewirkt eine Verschiebung innerhalb der β APP Prozessierungsprodukte hin zu β APP CTF_{Asp1}. Die Entstehung des β APP CTF_{Glu11} wird fast vollständig unterbunden (vgl. Abbildung 40). Grund hierfür ist vermutlich die erhöhte Affinität zu diesem Substrat, die zur Folge hat, dass unter diesen Bedingungen der größte Teil der Proteolyse bereits im ER stattfindet, während nur wenige ungespaltene β APP Moleküle in die späteren sekretorischen Kompartimente gelangen und dort prozessiert werden. Unterstrichen wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass die Deletion der zytoplasmatischen Domäne in β APP_{wt} zu einer drastischen Verminderung der A β -Bildung führt, während die selbe Deletion in β APP_{sw} keinen derartigen Effekt zeigt (Citron et al., 1995). Mit der Deletion der zytoplasmatischen Domäne in β APP wird das für die Reinternalisierung nötige Signal entfernt (Haass et al., 1993; Koo and Squazzo, 1994). Folglich findet die Prozessierung des β APP_{wt} zu A β hauptsächlich in endosomalen oder lysosomalen Kompartimenten statt, während β APP_{sw} bereits vor Erreichen der Zelloberfläche nahezu vollständig zu A β konvertiert wird (Haass et al., 1995b).

Werden BACE-1 und BACE-2 in einer Zelllinie coexprimiert, wird die Entstehung des β APP CTF_{Glu11} und des korrespondierenden A β 11-40/42 stark reduziert, während β APP CTF_{Asp1} und das zugehörige A β 1-40/42 nicht wesentlich beeinflusst werden (vgl. Abbildung 36/ Abbildung 38 und Abbildung 39). Die Behandlung der Zelllinien, die nur eine der Proteasen überexprimieren, mit BFA oder Monensin, zeigt dass BACE-2 im Gegensatz zu BACE-1 auch nach artifizieller Überexpression nahezu ausschließlich in späten subzellulären Kompartimenten proteolytisch aktiv ist (vgl. Abbildung 41 und Abbildung 42). Folglich überlagert sich die Aktivität der BACE-2 Protease, mit der Entstehung von β APP CTF_{Glu11} durch BACE-1 im Golgi-Apparat und den nachfolgenden Kompartimenten. Deshalb lässt sich folgendes Modell für die Entstehung und Prozessierung der β APP CTF ableiten:

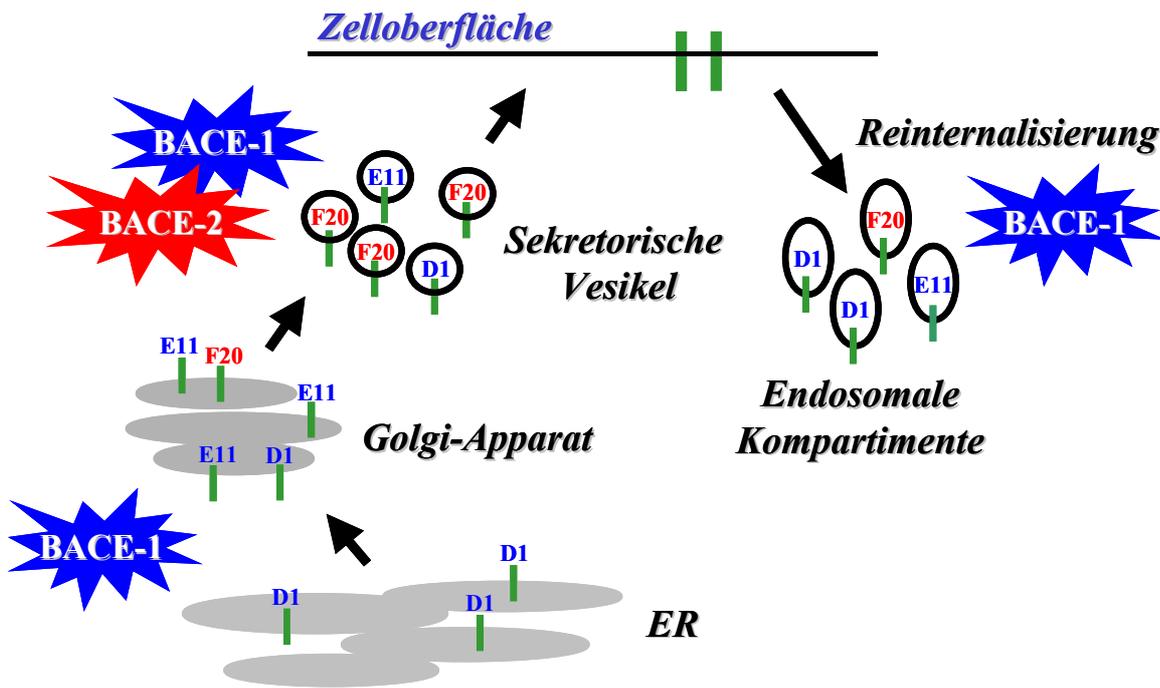


Abbildung 57: Modell zur Entstehung und Prozessierung der β APP CTF durch BACE-1 und BACE-2.

Abgebildet ist ein Modell der Entstehung und des Transportes der β APP CTF (grüner Balken mit Bezeichnung der N-terminalen AS) durch die Kompartimente des sekretorischen Prozessierungsweges zur Zelloberfläche, sowie die Reinternalisierung in endosomale Kompartimente. Die BACE-1 (blau) und BACE-2 (rot) Aktivitäten sind gekennzeichnet. β APP kann durch BACE-1 bereits im ER an Asp1 der A β -Domäne gespalten werden, während BACE-2 in diesem Kompartiment nahezu nicht aktiv ist, da weder die entsprechende β APP α -ähnliche Spezies noch β APP CTF_{Phe20} nach BFA-Behandlung der Zelllinie nachweisbar war. Nach Monensin-Behandlung der Zelllinie waren hingegen beide BACE-2 Produkte sowie β APP CTF_{Glu11} detektierbar (vgl. Abbildung 41 und Abbildung 42).

Für die Reduktion des amyloidogenen A β 11-40/42 in Gegenwart von BACE-2 sind mehrere Szenarien denkbar. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die BACE-2 Affinität bezüglich der Spaltung des β APP zwischen Phe19 und Phe20 der A β -Domäne größer ist, als die des BACE-1 bezüglich der Spaltung vor Glu11 und β APP deshalb bei ausreichender BACE-2 Expression im Golgi-Apparat bevorzugt durch BACE-2 prozessiert wird. Zum anderen besitzt BACE-2 vermutlich auch die Fähigkeit, die durch BACE-1 entstandenen β APP CTF_{Glu11}, sekundär zu spalten und so die Entstehung des A β 11-40/42 Peptids zu verhindern. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die beiden Enzyme in ihrem Maturierungsverhalten beeinflussen oder regulieren. Betrachtet man die unter 3.1.3. und 3.4.2.2. beschriebenen Zelllinien genauer, entsteht der Eindruck, dass sowohl endogenes, als auch exogenes BACE-2 in Gegenwart von exogenem BACE-1 schlechter maturieren (vgl. Abbildung 15 und Abbildung 33). Umgekehrt scheint auch BACE-1 in Gegenwart von BACE-2 schlechter zu maturieren und offensichtlich in

veränderter Art und Weise prozessiert zu werden (vgl. Abbildung 33). Dennoch konnte im Rahmen dieser Arbeit keine direkte gegenseitige Beeinflussung der beiden Proteasen, beispielsweise in Form von gegenseitiger Proteolyse gezeigt werden. Folglich kann eine Beeinflussung nur indirekt, beispielsweise durch die Saturierung anderer, an der Prozessierung der beiden Proteasen beteiligter Enzyme, erfolgen. Derartige Mechanismen in einem Überexpressionsystem schlüssig zu zeigen, ist kaum möglich.

Zusammengenommen zeigen die beschriebenen Ergebnisse deutlich, dass BACE-1 und BACE-2 β APP unterschiedlich prozessieren und, dass die Notwendigkeit besteht, Strategien zu entwickeln, BACE-1 selektiv zu inhibieren oder BACE-2 selektiv stimulieren zu können. Die unspezifische Stimulation von BACE-2 im Rahmen einer Therapie am Patienten würde die Wirkung neutralisieren, da zwar die antiamyloidogene Wirkung des BACE-2 verstärkt wird, gleichzeitig aber auch die amyloidogene Wirkung des BACE-1 ansteigt. Umgekehrt führt die unspezifische Inhibition von BACE-1 gleichzeitig zur Verringerung der antiamyloidogenen Wirkung von BACE-2. Eine unspezifische Stimulation oder Inhibition kann zudem zu unkalkulierbaren Nebenwirkungen führen, da bisher keine Daten über die physiologische Funktion der beiden Enzyme vorliegen. Die Inhibition von BACE-2 kann insbesondere zu Störungen in peripheren Geweben mit hoher Expression, wie z.B. Niere oder Bauchspeicheldrüse, führen.

4.4.3 Sekundäre Prozessierung der A β -Spezies durch BACE-1 und BACE-2

Bisher wurde davon ausgegangen, dass die β -Sekretase zum einen ihr Substrat β APP hochspezifisch spaltet und zum anderen *in vivo* ausschließlich die Spaltung membrangebundener Formen von β APP katalysiert [(Citron et al., 1995) und vgl. auch 1.3.4.1]. Die massenspektrometrische Analyse der A β -Spezies aus Zellen mit exogener BACE-1 Expression liefert jedoch im wesentlichen eine C-terminal verkürzte A β -Spezies (A β 1-34), während die primär erwarteten A β -Formen (A β 1-40/42) mit steigender BACE-1 Expression stark reduziert sind (vgl. Abbildung 45). Der Nachweis des A β 1-34 Peptids durch Radiomarkierung gestaltet sich schwierig, da eine Markierung des Peptids mit [35 S]-Methionin aufgrund des fehlenden Methionins an Position 35 der A β -Domäne nicht möglich ist, und zudem das Laufverhalten des Peptids in den zum Nachweis von

A β -Spezies gemeinhin verwendeten Gelsystemen sehr ungewöhnlich ist (vgl. Abbildung 52). Das veränderte Laufverhalten ist vermutlich auf eine veränderte Struktur des A β 1-34 Peptids zurückzuführen und erklärt eventuell auch, warum A β 1-34 mittels gängiger ELISA – Verfahren nicht nachgewiesen werden konnte (Vassar et al., 1999). Folglich löst sich auch der in der Literatur auftauchende Widerspruch, dass die exogene BACE-1 Expression im Zellkultursystem zwar einen Anstieg der unmittelbaren β -Sekretase Produkte, β APP CTF_{Asp1} und β APPs β , bewirkt, aber kaum eine Erhöhung der A β -Sekernierung induziert, sondern im Gegenteil diese sogar teilweise reduziert (Vassar et al., 1999).

Die Entstehung der A β 1-34 Spezies wurde zunächst auf eine veränderte Prozessierung der β APP CTF durch die γ -Sekretase zurückgeführt (Behr et al., 2002; Vandermeeren et al., 2001). Diese Vermutung war auf die Beobachtung gestützt, dass in Gegenwart einer funktionell inaktiven PS1-Mutante (PS1 D385N) oder bei Verwendung spezifischer γ -Sekretase Inhibitoren (DAPT) die Entstehung von A β 1-34, wie auch die der übrigen A β -Spezies, vollständig unterdrückt wird [vgl. Abb.62 und (Behr et al., 2002; Vandermeeren et al., 2001)]. *In vitro* Experimente zeigen jedoch, dass BACE-1 in der Lage ist, A β 1-40 vor Met35 direkt zu schneiden, so dass A β 1-34 gebildet wird (vgl. Abbildung 52 und Abbildung 51). Darüber hinaus konnte die γ -Sekretase unabhängige Entstehung von A β 1-34 aus löslichem A β 1-40/42 durch BACE-1 auch im zellulären System nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 53). Neben BACE-1 ist auch BACE-2 in der Lage A β 1-34 aus A β 1-40/42 zu generieren (vgl. Abbildung 54).

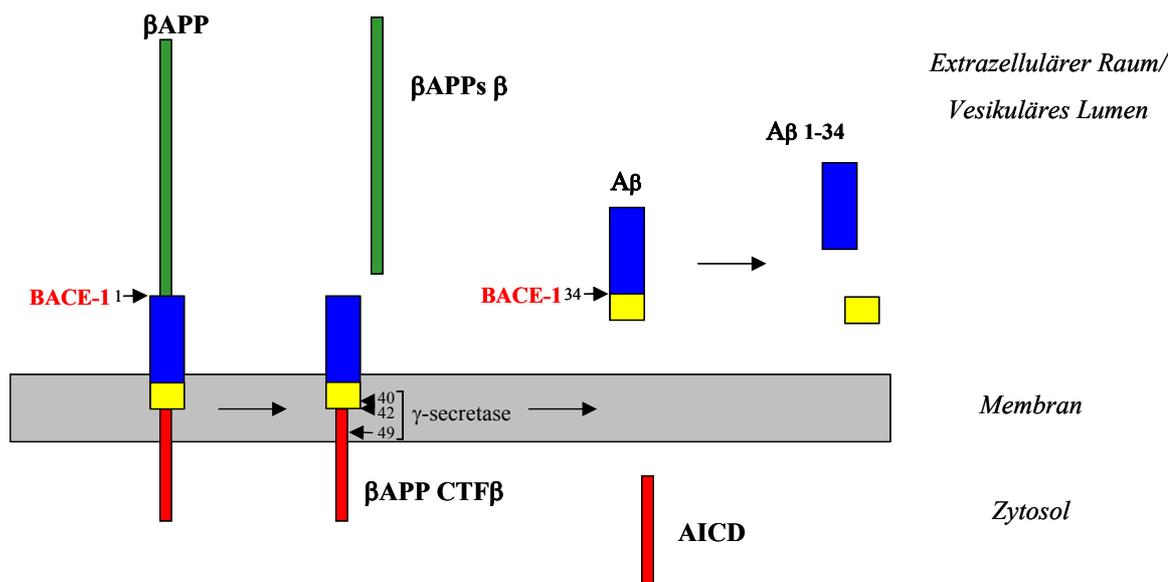


Abbildung 58: Schema der β APP-Prozessierung durch BACE-1, BACE-2 und γ -Sekretase.

BACE-1 schneidet β APP vor Asp1 der A β -Domäne (blau-gelber Kasten), dabei wird β APPs β (grüner Kasten) freigesetzt. Der in der Membran verbleibende Rest (β APP CTF $_{\beta_{Asp1}}$) wird durch die γ -Sekretase geschnitten. Es entsteht AICD (roter Kasten) und A β (blau-gelber Kasten). Das auf diese Weise freigesetzte A β kann nun erneut durch BACE-1 oder BACE-2 an Position 34 geschnitten werden, wobei A β 1-34 (blauer Kasten) und ein kleines hydrophobes Peptid (gelber Kasten), welches vermutlich schnell abgebaut wird, entstehen.

Die beschriebenen Ergebnisse widerlegen, dass BACE-1 ausschließlich die Spaltung membrangebundener Substrate katalysiert. Diese Erkenntnis legt die Vermutung nahe, dass nicht nur Membranproteine als physiologische Substrate für BACE-1 und BACE-2 in Betracht zu ziehen sind, sondern zusätzlich auch lösliche Peptide berücksichtigt werden müssen. Da BACE-1 und BACE-2 gleichermaßen in der Lage sind lösliche Peptide zu prozessieren, besteht die Möglichkeit, dass sich die beiden Enzyme bezüglich der Spaltung von Peptidsubstraten redundant verhalten und ein eventueller Phänotyp nur im doppel „knockout“ Maus-Modell sichtbar wird. Eine gleichzeitige Inhibition beider Enzyme könnte folglich zu Nebenwirkungen aufgrund fehlender Prozessierung von Peptidsubstraten führen. Auf der anderen Seite bietet die Erkenntnis, dass BACE-1 und BACE-2 auch lösliche Substrate spalten können neue Ansatzpunkte für die Entwicklung synthetischer Inhibitoren.

Während sich BACE-1 und BACE-2 hinsichtlich der Katalyse membrangebundener Substrate stark unterscheiden (vgl. 4.1), erfolgt die Spaltung der A β -Peptide nach Leu34 durch beide Enzyme mit gleicher Spezifität (vgl. 4.1).

Dieser Unterschied ist entweder auf unterschiedliche Struktureigenschaften des membrangebundenen Substrates und des löslichen Peptids zurückzuführen, oder auf die Tatsache, dass die Spaltstelle nach Leu34 der A β -Domäne innerhalb der zellulären Membran lokalisiert ist und deshalb für BACE vor der γ -Sekretase Spaltung nicht zugänglich ist.

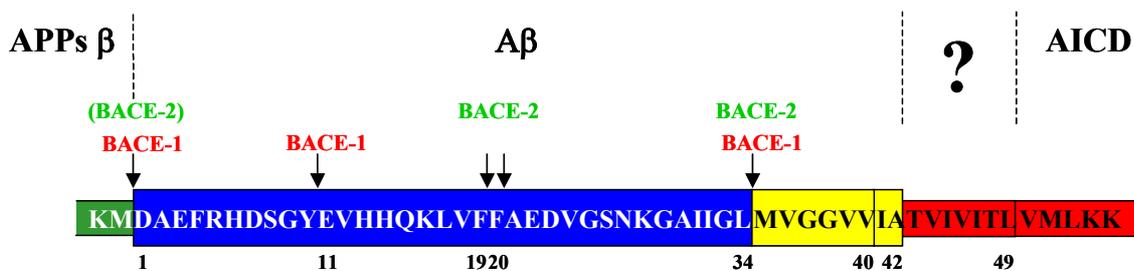


Abbildung 59: BACE-1 und BACE-2 Spaltstellen innerhalb der A β -Sequenz.

Vergrößerte Darstellung der A β -Domäne. Die Farbgebung entspricht der aus Abbildung 58. Die AS-Sequenz der A β -Domäne ist im Einbuchstabencode dargestellt und die potentiellen BACE-1 und BACE-2 Schnittstellen sind durch Pfeile markiert.

Für BACE-1 wird eine hohe Sequenzspezifität für die Spaltung seiner Substrate diskutiert (Citron et al., 1995; Vassar et al., 1999). Das einzige derzeit bekannte physiologische BACE-1 Substrat neben β APP ist die Sialyltransferase ST6Gal I, ein Typ II Transmembranprotein, dessen Ektodomänenspaltung und die damit verbundene Sezernierung in den extrazellulären Raum durch BACE-1 katalysiert wird (Kitazume et al., 2001). Die Spaltung der Sialyltransferase ST6Gal I erfolgt an folgender Stelle der Ektodomäne: DYEALTL \downarrow QAKEFQMPKSQ (Kitazume et al., 2002). Vergleicht man die Sequenz um die Spaltstelle der Sialyltransferase mit der Sequenz in Nachbarschaft zu Asp1 der A β -Domäne, so sind keine offensichtlichen Sequenzhomologien feststellbar. Dennoch scheint die AS an Position -1 der Spaltungsstelle großen Einfluss auf die Effizienz der Spaltung sowohl von β APP als auch der Sialyltransferase zu haben (Citron et al., 1992; Citron et al., 1995; Kitazume et al., 2002; Mullan et al., 1992). Es fällt auf, dass große hydrophobe Reste an Position -1 der Spaltstelle die Prozessierung des Substrates durch BACE-1 begünstigen. So findet sich an Position -1 der Sialyltransferaseschnittstelle ein Leucin-Rest wie auch an Position -1 der A β 1-34 Schnittstelle (vgl. Abbildung 59). Bei Mutation des Methionin-Restes an Position -1 der Asp1 Schnittstelle in β APP zu Leucin,

wie beispielweise im Falle der schwedischen Mutation, steigt die Affinität von BACE-1 zu seinem Substrat dramatisch an (Citron et al., 1992).

In unmittelbarer Nachbarschaft zu Glu11 der A β -Domäne befindet sich ein Tyrosin-Rest. Hierbei handelt es sich einerseits um einen voluminösen AS-Rest, der folglich die Prozessierung durch BACE-1 begünstigt, aber zugleich, wie auch im Falle des Methionins neben Asp1 der A β -Domäne, um einen polaren Rest. Die Spaltung des β APP_{sw} vor Asp1 der A β -Domäne findet sowohl bei endogener als auch bei exogener Expression von BACE-1 früher statt als die Spaltung des β APP_{wt} vor Asp1 und Glu11 [vgl. 3.4.3 und (Citron et al., 1995; Haass et al., 1992a)]. Folglich kann vermutet werden, dass einerseits sterisch große Reste an Position -1 der Spaltstelle generell die Spaltung eines Substrates durch BACE-1 begünstigen und andererseits polare Reste nur die Spaltung bei niedrigem pH-Wert und damit in späteren subzellulären Kompartimenten zulassen.

Unterstrichen wird diese Vermutung weiterhin durch einen Vergleich der β APP Sequenzen von Maus und Ratte mit der humanen β APP Sequenz im Bereich der Glu11 Schnittstelle.

		1	5	10	13		34
		1		11			
Mensch	EEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT						
Maus	EEISEVKMDAEFGHDSGFEV R HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT						
Ratte	EEISEVKMDAEFGHDSGFEV R HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT						

Abbildung 60: Vergleich der human β APP Sequenz mit den β APP Sequenzen von Maus und Ratte.

Dargestellt ist die AS-Sequenz des β APP von Mensch, Maus und Ratte im Bereich der A β - Domäne. Die AS sind im Einbuchstabencode angegeben und die BACE-1 Schnittstellen mit schwarzen Zahlen, entsprechend der Nummerierung der A β -Domäne gekennzeichnet. Die nicht konservierten AS in Maus und Ratte sind rot markiert.

Der Tyrosin-Rest an Position -1 der Glu11 Schnittstelle in der menschlichen β APP Sequenz ist in der Sequenz von Maus und Ratte zu Phenylalanin mutiert. Neuronale Zellen von Maus und Ratte sezernieren in Kultur im Gegensatz zu neuronalen Zellen des Menschen mehr A β Spezies beginnend mit Glu11 als solche beginnend mit Asp1 [(Gouras et al., 1998; Wang et al., 1996) und vgl. 4.4.2].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich an Position -1 aller bislang bekannten BACE-1 Spaltstellen sterisch große Reste befinden. Je größer und unpolarer diese Reste sind, desto mehr wird die Spaltung des Substrates durch BACE-1 begünstigt.

Es ist noch nicht restlos geklärt, an welcher Stelle im sekretorischen Prozessierungsweg die Spaltung von A β -1-40/42 durch BACE-1 erfolgt. Experimente mit konditionierten Medien zeigen jedoch, dass A β 1-34 aus dem im Medium vorhandenen A β 1-40 gebildet werden kann, obwohl in der Zelle *de novo* kein A β entsteht (vgl. Abbildung 53). Die Proteolyse durch BACE-1 erfolgt deshalb in diesem Fall entweder unmittelbar an der Zelloberfläche oder nach der Reinternalisierung der A β -Peptide in Endosomen. Wie unter 4.4.2. beschrieben, kann BACE-1 aber auch in frühen sekretorischen Kompartimenten proteolytisch aktiv sein. Auch wurde die Entstehung von A β -Spezies in diesen Kompartimenten beschrieben (Chyung et al., 1997; Skovronsky et al., 1998; Wild-Bode et al., 1997), so dass eine Bildung von A β 1-34 in frühen Zellkompartimenten nicht ausgeschlossen werden kann. BACE-1 wird ferner zu einem geringen Teil nach Abspaltung der Ektodomäne in Zellkulturmedien sezerniert (Benjannet et al., 2001). Der sezernierte BACE-1 Anteil ist jedoch sehr gering, so dass eine alleinige Entstehung des A β 1-34 Peptids im extrazellulären Raum unwahrscheinlich ist. Für BACE-2 liegen in diesem Zusammenhang bisher keine Ergebnisse vor.

Die Entstehung des A β 1-34 Peptids wurde auch ohne exogene Expression von BACE-1 in neuronalen Zellkulturmodellen nachgewiesen (Wang et al., 1996). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Entstehung des A β 1-34 Peptids ausschließlich auf die exogene Expression von BACE-1 im verwendeten Modell zurückzuführen ist. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass A β 1-34 auch physiologisch in Abhängigkeit von der endogenen BACE-1 Expression entsteht. Da BACE-1 z.B. in HEK293 Zellen nur sehr wenig exprimiert wird, ist deshalb auch die Entstehung von A β 1-34 nicht nachweisbar, während es in Zellen mit höherer endogener BACE-1 Expression, wie z.B. N2a, A β 1-34 auch ohne Überexpression des Proteins detektierbar ist (Wang et al., 1996). Auffällig ist weiterhin, dass durch die Spaltung des A β 1-40/42 Peptids nach Position 34 ein Großteil der hydrophoben AS-Reste, die für die Aggregation von A β verantwortlich gemacht werden, entfernt wird. Möglicherweise wird dadurch die Aggregation des amyloidogenen Peptids verhindert und der Abbau durch Neprilysin (Iwata et al., 2001) oder IDE [insulin degrading enzyme; (Iwata et al., 2000; Kurochkin, 2001)] erleichtert. Neben der amyloidogenen Funktion könnte zusätzlich auch eine antiamyloidogene Funktion für BACE-1 postuliert werden. Die Inhibition von BACE-1 würde folglich auch die positive antiamyloidogene Funktion der Protease hemmen. Die Spaltung von β APP an Asp1 der A β -Domäne und von A β 1-40/42 nach Leu34 erfolgt jedoch vermutlich in einem anderen

strukturellen Kontext. Deshalb könnten Inhibitoren gefunden werden, die selektiv die Spaltung des membrangebundenen β APP durch BACE-1 blockieren.

4.5 Relevanz der Ergebnisse bezüglich der Alzheimer Krankheit und Ausblick

Ein wesentliches pathologisches Merkmal der Alzheimer Krankheit ist die Bildung von Amyloid Plaques in definierten Gehirnregionen (vgl. 1.1). Der Hauptbestandteil dieser Plaqueablagerungen ist das A β -Peptid. Aus diesem Grund werden Therapieansätze gesucht, die entweder die Bildung von A β -Peptiden verhindern oder sogar bestehende A β -Ablagerungen reduzieren. Die Modulation der an der Prozessierung von β APP beteiligten Sekretasen bietet deshalb einen guten Ansatzpunkt. Die Aktivierung der α -Sekretase fördert beispielsweise die Entstehung nicht amyloidogener Spezies und reduziert gleichzeitig aufgrund der dadurch verringerten β -Sekretase Prozessierung des β APP Proteins die Bildung von amyloidogenen Spezies. Eine Möglichkeit der α -Sekretase Stimulation ist die Aktivierung von PKC durch Phorbolster. Dabei wird vermehrt β APPs α gebildet und gleichzeitig die Bildung von A β stark vermindert (Buxbaum et al., 1993; Hung et al., 1993; Lammich et al., 1999). Den gleichen Effekt zeigt die indirekte Aktivierung von PKC durch Stimulation der muskarinergen Rezeptoren (Nitsch et al., 1992). Die Inhibition der γ -Sekretase vermindert wie auch die Stimulation der α -Sekretase die Bildung amyloidogener Spezies (Wolfe et al., 1998). „Knockout“ Mausmodelle lassen aber vermuten, dass die Aktivierung der α -Sekretase, sowie die Inhibition der γ -Sekretase, neben der erwünschten Beeinflussung der β APP Prozessierung unmittelbaren Einfluss auf den Notch-Signalübertragungsweg haben könnten, der auch im erwachsenen Menschen wichtige Funktionen erfüllt [vgl. 1.3.5.3 und (Ahmad et al., 1995; Berezovska et al., 1998; Berezovska et al., 1997)]. Unerwünschte Nebenwirkungen wie z.B. die Beeinflussung der T-Lymphozyten Differenzierung (Varnum-Finney et al., 2000) könnte die Folge eines derartigen Therapieansatzes sein. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass einige γ -Sekretase Inhibitoren nicht nur mit dem PS-Komplex selbst interagieren, sondern auch homologe Proteasen, wie beispielweise die Signal-Peptid-Petidase, inhibieren (Esler et al., 2000; Weihofen et al., 2002).

Wie BACE-1 „knockout“ Mausmodelle vermuten lassen, würde auch die Inhibition der β -Sekretase die Amyloid Bildung drastisch verringern. BACE-1 „knockout“ Mausmodelle zeigen zudem keinen auffälligen Phänotyp, so dass bei einer Inhibition von BACE-1 auf den ersten Blick keine Nebenwirkungen zu erwarten sind (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001). Dennoch gestaltet es sich bisher aufgrund der Struktur des aktiven Zentrums schwierig, selektive zellgängige Inhibitoren zu entwickeln (Haass, 2002). Hinzu kommt, dass Inhibitoren, die die Aktivität von BACE-1 reduzieren, mit großer Wahrscheinlichkeit ebenso auf BACE-2 wirken. Die Auswirkungen einer BACE-2 Inhibition sind bisher vollständig unbekannt, da weder physiologische Substrate bekannt sind, noch entsprechende Tiermodelle verfügbar sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass BACE-1 nach seiner Reinternalisierung von der Zelloberfläche in Endosomen phosphorylierungsabhängig zurück zum TGN transportiert wird (Walter et al., 2001a), während BACE-2 ein derartiges „Recycling“ nicht durchläuft (vgl. 3.3). Die Phosphorylierung von BACE-1 wird durch CK-1 katalysiert (vgl. 3.2.2.2). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CK-1 in Gehirnen von Alzheimer Patienten im Vergleich zu Kontrollindividuen erhöht ist (Schwab et al., 2000; Yasojima et al., 2000). Darüber hinaus belegen *in vitro* Experimente, dass A β selbst die Aktivität von CK-1 steigern kann (Chauhan et al., 1993). Möglicherweise wird der intrazelluläre BACE-1 Transport in Gegenwart von Amyloid beeinflusst und bedingt somit eine weiter verstärkte Entstehung neuer A β -Spezies. In diesem Zusammenhang wäre interessant zu untersuchen, ob der Phosphorylierungsstatus von BACE-1 in Gehirnen von Alzheimer Patienten im Vergleich zu Kontrollindividuen verändert ist.

Von großer Bedeutung für eine erfolgreiche Inhibition oder Aktivierung einer Protease ist das Verständnis ihrer katalytischen Spezifität. Trotz der homologen Primärstruktur der beiden Proteasen unterscheiden sich ihre katalytischen Spezifitäten im Bezug auf Membranproteine erheblich. BACE-2 katalysiert entgegen der Erwartungen verstärkt eine anti-amyloidogene Spaltung des β APP, während BACE-1 ausschließlich die unmittelbaren Vorläufer-Spezies für amyloidogene Peptide liefert (vgl. 3.4.2). Eine Verringerung der BACE-1 Aktivität mittels Inhibitoren, die auch die Aktivität der BACE-2 Protease reduziert könnte, vor allem in peripheren Geweben unerwünschte Folgen haben, wenn die Spaltung bisher unbekannter physiologischer Substrate durch BACE-2 ebenfalls blockiert wird.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass beide BACE Proteasen in der Lage sind, A β -Peptide nach ihrer Entstehung C-terminal zu verkürzen und somit wahrscheinlich die Aggregationsbereitschaft von A β reduzieren (vgl. 3.4.4). Auch in diesem Zusammenhang würde eine Verminderung der Proteaseaktivität durch Inhibitoren gleichzeitig den erwünschten Abbau der neurotoxischen Substanzen verhindern. Für die Therapie bereits an der Alzheimer Krankheit erkrankter Patienten würde eine BACE-1 Inhibition zwar das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen, jedoch ist fraglich, ob bestehende Symptome gelindert werden könnten, da der Abbau bereits vorhandener A β -Spezies möglicherweise gestört ist. Im Falle einer präventiven Therapie wäre dieser Effekt hingegen vernachlässigbar, sofern die Spaltung löslicher Substrate durch BACE-1 keine andere physiologische Funktion hat, da BACE-1 wahrscheinlich die einzige β -Sekretase ist und somit kein A β entstehen würde. So dass die Inhibition von BACE-1 beispielsweise zur Prophylaxe gegen die Alzheimer Krankheit eingesetzt werden könnte.

Um BACE-1 in Zukunft eventuell als Ansatzpunkt für eine Therapie nutzen zu können, ist es ferner von größtem Interesse, weitere physiologische Substrate, neben β APP und Sialyltransferase (ST6 Gal 1) zu identifizieren und somit die physiologische Funktion besser zu verstehen, damit eventuelle Nebenwirkungen im Rahmen einer Therapie durch Inhibition der Protease ausgeschlossen oder minimiert werden können. In diesem Zusammenhang gilt es auch, die Funktion der homologen Protease BACE-2 genauer zu untersuchen. Die Charakterisierung von BACE-2 „knockout“ Mäusen, sowie von BACE-1 und BACE-2 doppel „knockout“ Mäusen ist deshalb von großer Bedeutung.

5. Zusammenfassung

Die Inhibition der β -Sekretase stellt derzeit einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie der Alzheimer Krankheit dar. Der Hauptanteil der β -Sekretase Aktivität ist auf BACE-1, eine neuartige membrangebundene Typ I Aspartylprotease, zurückzuführen. Um gezielt spezifische und wirksame Inhibitoren entwickeln zu können, ist es notwendig, die Eigenschaften und katalytischen Spezifitäten der Protease genauer zu verstehen. Da neben BACE-1 eine weitere hochgradig homologe Aspartylprotease, BACE-2, bekannt ist, ist es für die Suche nach Inhibitoren ferner von Bedeutung, charakteristische Unterschiede zwischen den beiden Enzymen zu kennen, um mögliche Kreuzreaktionen der Inhibitoren minimieren zu können. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die beiden Enzyme bezüglich ihrer posttranslationalen Modifikationen und insbesondere ihrer katalytischen Spezifitäten vergleichend zu analysieren. Als Modell für die durchgeführten Experimente dienten HEK293 Zellen, mit exogener Expression der beiden Proteasen, sowie dem Substrat β APP.

Beide Proteine werden in ähnlicher Weise durch die kovalente Bindung komplexer Kohlehydrateinheiten modifiziert. Matures BACE-1 besitzt im Vergleich zu BACE-2 eine längere Halbwertszeit. *In vitro* werden beide Enzyme durch CK1 an homologen Serinen in der zytoplasmatischen Domäne phosphoryliert. Während für BACE-2 bisher nicht schlüssig gezeigt werden konnte, dass auch *in vivo* eine Phosphorylierung erfolgt, wurde für BACE-1 S498 auch als Phosphorylierungsstelle *in vivo* bestätigt. Mittels Biotinylierung konnte demonstriert werden, dass beide BACE-Proteasen effizient an die Zelloberfläche transportiert werden. Im Gegensatz zu BACE-1, welches rasch in endosomale Kompartimente reinternalisiert wird und phosphorylierungsabhängig zurück zum TGN transportiert wird, wird BACE-2 entweder durch Spaltung der Ektodomäne in den extrazellulären Raum sezerniert, oder aber unmittelbar nach der Reinternalisierung ins Zellinnere in lysosomalen Kompartimenten abgebaut. Dieser Unterschied begründet vermutlich die unterschiedlichen Halbwertszeiten der beiden Proteine und erhöht gleichzeitig die Gesamtverweildauer von BACE-1 in endosomalen Kompartimenten, die aufgrund ihres pH-Wertes günstige Bedingungen für die proteolytische Aktivität des Enzyms schaffen.

Hinsichtlich der katalytischen Spezifität bezüglich des membrangebundenen β APP unterscheiden sich BACE-1 und BACE-2 grundlegend. Während BACE-1 die erwarteten

β -Sekretase Spaltungen an Asp1 und Glu11 der A β -Domäne katalysiert, spaltet BACE-2 vorzugsweise zwischen Phe19 und Phe20 der A β -Domäne, wodurch Spaltprodukte entstehen, die denen der α -Sekretase Spaltung ähneln. Durch Koexpression der beiden Enzyme konnte gezeigt werden, dass BACE-2 die BACE-1 abhängige Prozessierung des Substrates direkt oder indirekt beeinflussen kann. Die Behandlung der entsprechenden Zelllinien mit BFA oder Monensin belegt, dass BACE-1 bereits in den frühen Kompartimenten des sekretorischen Prozessierungsweges proteolytisch aktiv sein kann, während BACE-2 auch nach exogener Expression keine Aktivität in diesen Kompartimenten zeigt.

Mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen wurde bewiesen, dass BACE-1 und BACE-2 entgegen bisheriger Annahmen nicht ausschließlich die proteolytische Spaltung membrangebundener β APP Substrate katalysieren, sondern zudem A β -Peptide, nach ihrer Freisetzung durch γ -Sekretase, C-terminal verkürzen können. *In vitro* Versuche zeigen, dass BACE-1 selbst in der Lage ist, A β 1-40 an Position 34 zu spalten und dieser Schnitt nicht wie bislang angenommen durch γ -Sekretase katalysiert wird. Dieser Vorgang führt *in vivo* zu einer Reduktion der amyloidogenen A β 1-40/42 Peptide.

Da sich der Nachweis des A β 1-34 Peptides mittels konservativer Proteinanalytik schwierig gestaltet, erklärt sich, warum in Zelllinien mit exogener BACE-1 Expression keine merkliche Steigerung der A β -Sezernierung bzw. teilweise sogar eine Reduktion detektierbar war. Letztendlich bietet die Beobachtung, dass auch Peptide als Substrate für die BACE fungieren können, interessante Ansatzpunkte für die Suche nach neuen physiologischen Substraten und Inhibitoren.

Die Analyse des subzellulären Transportes und die Charakterisierung, sowohl pro- als auch anti-amyloidogener Enzymaktivitäten der beiden Proteasen BACE-1 und BACE-2 liefert neue Grundlagen für die Entwicklung therapeutischer Inhibitoren und für die Suche neuer Substrate.

6. Literatur

- Acquati, F., M. Accarino, C. Nucci, P. Fumagalli, L. Jovine, S. Ottolenghi, and R. Taramelli. 2000. The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region. *FEBS Lett.* 468:59-64.
- Ahmad, I., P. Zaqouras, and S. Artavanis-Tsakonas. 1995. Involvement of Notch-1 in mammalian retinal neurogenesis: association of Notch-1 activity with both immature and terminally differentiated cells. *Mech Dev.* 53:73-85.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2002. Molecular biology of the cell. Garland Science (Taylor & Francis Group).
- Alzheimer, A. 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtl. Med.* 64:146-148.
- Andreeva, N.S., A. Bochkarev, and I. Pechik. 1995. A new way of looking at aspartic proteinase structures: a comparison of pepsin structure to other aspartic proteinases in the near active site region. *Adv Exp Med Biol.* 362:19-32.
- Baxter, J.D., K. Duncan, W. Chu, M.N. James, R.B. Russell, M.A. Haidar, F.M. DeNoto, W. Hsueh, and T.L. Reudelhuber. 1991. Molecular biology of human renin and its gene. *Recent Prog Horm Res.* 47:211-57.
- Behr, D., J.D. Wrigley, A.P. Owens, and M.S. Shearman. 2002. Generation of C-terminally truncated amyloid-beta peptides is dependent on gamma-secretase activity. *J Neurochem.* 82:563-75.
- Belitz, H.-D., and W. Grosch. 1992. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Benjannet, S., A. Elagoz, L. Wickham, M. Mamarbachi, J.S. Munzer, A. Basak, C. Lazure, J.A. Cromlish, S. Sisodia, F. Checler, M. Chretien, and N.G. Seidah. 2001. Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J Biol Chem.* 276:10879-87.
- Bennett, B.D., S. Babu-Khan, R. Loeloff, J.C. Louis, E. Curran, M. Citron, and R. Vassar. 2000a. Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem.* 275:20647-51.

- Bennett, B.D., P. Denis, M. Haniu, D.B. Teplow, S. Kahn, J.C. Louis, M. Citron, and R. Vassar. 2000b. A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J Biol Chem.* 275:37712-7.
- Berezovska, O., M.Q. Xia, and B.T. Hyman. 1998. Notch is expressed in adult brain, is coexpressed with presenilin-1, and is altered in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 57:738-45.
- Berezovska, O., M.Q. Xia, K. Page, W. Wasco, R.E. Tanzi, and B.T. Hyman. 1997. Developmental regulation of presenilin mRNA expression parallels notch expression. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56:40-4.
- Bernstein, N.K., M.M. Cherney, H. Loetscher, R.G. Ridley, and M.N. James. 1999. Crystal structure of the novel aspartic proteinase zymogen proplasmepsin II from plasmodium falciparum. *Nat Struct Biol.* 6:32-7.
- Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23.
- Bondareff, W., C. Harrington, C.M. Wischik, D.L. Hauser, and M. Roth. 1994. Immunohistochemical staging of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 53:158-64.
- Bott, R., E. Subramanian, and D.R. Davies. 1982. Three-dimensional structure of the complex of the *Rhizopus chinensis* carboxyl proteinase and pepstatin at 2.5-Å resolution. *Biochemistry.* 21:6956-62.
- Braak, H., E. Braak, J. Bohl, and R. Reintjes. 1996. Age, neurofibrillary changes, A beta-amyloid and the onset of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 210:87-90.
- Bundgaard, J.R., J. Vuust, and J.F. Rehfeld. 1995. Tyrosine O-sulfation promotes proteolytic processing of progastrin. *Embo J.* 14:3073-9.
- Bursavich, M.G., C.W. West, and D.H. Rich. 2001. From peptides to non-peptide peptidomimetics: design and synthesis of new piperidine inhibitors of aspartic peptidases. *Org Lett.* 3:2317-20.
- Busciglio, J., D.H. Gabuzda, P. Matsudaira, and B.A. Yankner. 1993. Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:2092-6.
- Buxbaum, J.D., E.H. Koo, and P. Greengard. 1993. Protein phosphorylation inhibits production of Alzheimer amyloid beta/A4 peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:9195-8.

- Buxbaum, J.D., K.N. Liu, Y. Luo, J.L. Slack, K.L. Stocking, J.J. Peschon, R.S. Johnson, B.J. Castner, D.P. Cerretti, and R.A. Black. 1998. Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* 273:27765-7.
- Cai, H., Y. Wang, D. McCarthy, H. Wen, D.R. Borchelt, D.L. Price, and P.C. Wong. 2001. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci.* 4:233-4.
- Cai, X.D., T.E. Golde, and S.G. Younkin. 1993. Release of excess amyloid β protein from a mutant amyloid β protein precursor. *Science.* 259:514-6.
- Cao, X., and T.C. Südhof. 2001. A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science.* 293:115-20.
- Capell, A., J. Grunberg, B. Pesold, A. Diehlmann, M. Citron, R. Nixon, K. Beyreuther, D.J. Selkoe, and C. Haass. 1998. The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. *J. Biol. Chem.* 273:3205-11.
- Capell, A., L. Meyn, R. Fluhner, D.B. Teplow, J. Walter, and C. Haass. 2002. Apical sorting of beta-secretase limits amyloid beta-peptide production. *J Biol Chem.* 277:5637-43.
- Capell, A., R. Saffrich, J.C. Olivo, L. Meyn, J. Walter, J. Grunberg, P. Mathews, R. Nixon, C. Dotti, and C. Haass. 1997. Cellular expression and proteolytic processing of presenilin proteins is developmentally regulated during neuronal differentiation. *J. Neurochem.* 69:2432-40.
- Capell, A., H. Steiner, M. Willem, H. Kaiser, C. Meyer, J. Walter, S. Lammich, G. Multhaup, and C. Haass. 2000. Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J Biol Chem.* 275:30849-54.
- Capell, A., D. Teplow, M. Citron, D. Selkoe, and C. Haass. 1996. Substitution of phenylalanine by proline at position 19 of amyloid beta peptide results in an increased production of amyloid beta peptides with alternative N-termini after protein kinase C stimulation. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 3:150-155.
- Chalet, G., and F.J. Wolf. 1964. The properties of strepavidin, a biotin-binding protein produced by Streptomycetes. *Arch. Biochem. Biophys.* 106:1-5.

- Charlwood, J., C. Dingwall, R. Matico, I. Hussain, K. Johanson, S. Moore, D.J. Powell, J.M. Skehel, S. Ratcliffe, B. Clarke, J. Trill, S. Sweitzer, and P. Camilleri. 2001. Characterization of the glycosylation profiles of Alzheimer's beta - secretase protein Asp-2 expressed in a variety of cell lines. *J Biol Chem.* 276:16739-48.
- Chauhan, A., V.P. Chauhan, N. Murakami, H. Brockerhoff, and H.M. Wisniewski. 1993. Amyloid beta-protein stimulates casein kinase I and casein kinase II activities. *Brain Res.* 629:47-52.
- Chen, F., G. Yu, S. Arawaka, M. Nishimura, T. Kawarai, H. Yu, A. Tandon, A. Supala, Y.Q. Song, E. Rogaeva, P. Milman, C. Sato, C. Yu, C. Janus, J. Lee, L. Song, L. Zhang, P.E. Fraser, and P.H. St George-Hyslop. 2001. Nicastrin binds to membrane-tethered Notch. *Nat. Cell Biol.* 3:751-4.
- Chyung, A.S., B.D. Greenberg, D.G. Cook, R.W. Doms, and V.M. Lee. 1997. Novel beta-secretase cleavage of beta-amyloid precursor protein in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *J Cell Biol.* 138:671-80.
- Citron, M. 2002. Beta-secretase as a target for the treatment of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 70:373-9.
- Citron, M., T.S. Diehl, A. Capell, C. Haass, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe. 1996. Inhibition of amyloid beta-protein production in neural cells by the serine protease inhibitor AEBSF. *Neuron.* 17:171-9.
- Citron, M., T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A.Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg, and D.J. Selkoe. 1992. Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature.* 360:672-4.
- Citron, M., D. Teplow, and D. Selkoe. 1995. Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron.* 14:661-670.
- Cohen, P. 1992. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem Sci.* 17:408-13.
- Cohen, P., C.F. Holmes, and Y. Tsukitani. 1990. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci.* 15:98-102.
- Cook, D.G., M.S. Forman, J.C. Sung, S. Leight, D.L. Kolson, T. Iwatsubo, V.M. Lee, and R.W. Doms. 1997. Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat Med.* 3:1021-3.

- Creemers, J.W., D. Ines Dominguez, E. Plets, L. Serneels, N.A. Taylor, G. Multhaup, K. Craessaerts, W. Annaert, and B. De Strooper. 2001. Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *J Biol Chem.* 276:4211-7.
- Crowther, R.A., and M. Goedert. 2000. Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases. *J Struct Biol.* 130:271-9.
- Cruts, M., H. Backhovens, S.Y. Wang, G.V. Gassen, J. Theuns, C.D. De Jonghe, A. Wehnert, J. De Voecht, G. De Winter, P. Cras, and et al. 1995. Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum. Mol. Genet.* 4:2363-71.
- De Strooper, B., P. Saftig, K. Craessaerts, H. Vanderstichele, G. Guhde, W. Annaert, K. Von Figura, and F. Van Leuven. 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature.* 391:387-90.
- Dickson, D.W. 1997. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56:321-39.
- Dunn, B.M. 2002. Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chem Rev.* 102:4431-58.
- Edbauer, D., E. Winkler, C. Haass, and H. Steiner. 2002. Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid β -peptide production via complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:8666-71.
- Edbauer, D., E. Winkler, J.T. Regula, B. Pesold, H. Steiner, and C. Haass. 2003. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol.* 5:486-8.
- Egelhoff, T.T., R.J. Lee, and J.A. Spudich. 1993. Dictyostelium myosin heavy chain phosphorylation sites regulate myosin filament assembly and localization in vivo. *Cell.* 75:363-71.
- Esch, F.S., P.S. Keim, E.C. Beattie, R.W. Blacher, A.R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure, and P.J. Ward. 1990. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science.* 248:1122-4.
- Esler, W.P., W.T. Kimberly, B.L. Ostaszewski, T.S. Diehl, C.L. Moore, J.-Y. Tsai, T. Rahmati, W. Xia, D.J. Selkoe, and M.S. Wolfe. 2000. Transition-state analogue inhibitors of γ -secretase bind directly to presenilin-1. *Nat. Cell Biol.* 2:428-433.
- Esler, W.P., and M.S. Wolfe. 2001. A portrait of Alzheimer secretases-new features and familiar faces. *Science.* 293:1449-54.

- Farzan, M., C.E. Schnitzler, N. Vasilieva, D. Leung, and H. Choe. 2000. BACE2, a beta - secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:9712-7.
- Fearon, K., A. Spaltenstein, P.B. Hopkins, and M.H. Gelb. 1987. Fluoro ketone containing peptides as inhibitors of human renin. *J Med Chem.* 30:1617-22.
- Felsenstein, K.M., K.M. Ingalls, L.W. Hunihan, and S.B. Roberts. 1994. Reversal of the Swedish familial Alzheimer's disease mutant phenotype in cultured cells treated with phorbol 12,13-dibutyrate. *Neurosci Lett.* 174:173-6.
- Fischer, F., M. Molinari, U. Bodendorf, and P. Paganetti. 2002. The disulphide bonds in the catalytic domain of BACE are critical but not essential for amyloid precursor protein processing activity. *J Neurochem.* 80:1079-88.
- Fortini, M.E. 2002. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:673-84.
- Francis, R., G. McGrath, J. Zhang, D.A. Ruddy, M. Sym, J. Apfeld, M. Nicoll, M. Maxwell, B. Hai, M.C. Ellis, A.L. Parks, W. Xu, J. Li, M. Gurney, R.L. Myers, C.S. Himes, R.D. Hiesch, C. Ruble, J.S. Nye, and D. Curtis. 2002. aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP, and presenilin protein accumulation. *Dev. Cell.* 3:85-97.
- Francis, S.E., D.J. Sullivan, Jr., and D.E. Goldberg. 1997. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol.* 51:97-123.
- Fraser, M.E., N.C. Strynadka, P.A. Bartlett, J.E. Hanson, and M.N. James. 1992. Crystallographic analysis of transition-state mimics bound to penicillopepsin: phosphorus-containing peptide analogues. *Biochemistry.* 31:5201-14.
- Friederich, E., H.J. Fritz, and W.B. Huttner. 1988. Inhibition of tyrosine sulfation in the trans-Golgi retards the transport of a constitutively secreted protein to the cell surface. *J Cell Biol.* 107:1655-67.
- Friedhoff, P., M. von Bergen, E.M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 2000. Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim Biophys Acta.* 1502:122-32.
- Gelb, M.H., J.P. Svaren, and R.H. Abeles. 1985. Fluoro ketone inhibitors of hydrolytic enzymes. *Biochemistry.* 24:1813-7.
- Giaccone, G., F. Tagliavini, G. Linoli, C. Bouras, L. Frigerio, B. Frangione, and O. Bugiani. 1989. Down patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neurosci Lett.* 97:232-8.

- Girod, A., V. Kinzel, and D. Bossemeyer. 1996. In vivo activation of recombinant cAPK catalytic subunit active site mutants by coexpression of the wild-type enzyme, evidence for intermolecular cotranslational phosphorylation. *FEBS Lett.* 391:121-5.
- Glabe, C. 2001. Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 17:137-45.
- Glenner, G.G., and C.W. Wong. 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 120:885-90.
- Glenner, G.G., C.W. Wong, V. Quaranta, and E.D. Eanes. 1984. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol.* 2:357-69.
- Golde, T.E., S. Estus, L.H. Younkin, D.J. Selkoe, and S.G. Younkin. 1992. Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science.* 255:728-30.
- Gouras, G.K., H. Xu, J.N. Jovanovic, J.D. Buxbaum, R. Wang, P. Greengard, N.R. Relkin, and S. Gandy. 1998. Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons. *J Neurochem.* 71:1920-5.
- Goutte, C., M. Tsunozaki, V.A. Hale, and J.R. Priess. 2002. APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:775-779.
- Green, N.M., L. Konieczny, E.J. Toms, and R.C. Valentine. 1971. The use of bifunctional biotinyl compounds to determine the arrangement of subunits in avidin. *Biochem J.* 125:781-91.
- Gross, S.D., and R.A. Anderson. 1998. Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal.* 10:699-711.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, and L.I. Binder. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4913-7.
- Haass, C. 2002. New hope for Alzheimer disease vaccine. *Nat Med.* 8:1195-6.
- Haass, C., A. Capell, M. Citron, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe. 1995a. The vacuolar H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 differentially affects proteolytic processing of mutant and wild-type beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 270:6186-92.
- Haass, C., A.Y. Hung, M.G. Schlossmacher, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe. 1993. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem.* 268:3021-4.

- Haass, C., E.H. Koo, A. Mellon, A.Y. Hung, and D.J. Selkoe. 1992a. Targeting of cell-surface β -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*. 357:500-3.
- Haass, C., C.A. Lemere, A. Capell, M. Citron, P. Seubert, D. Schenk, L. Lannfelt, and D.J. Selkoe. 1995b. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta- secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med*. 1:1291-6.
- Haass, C., M.G. Schlossmacher, A.Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B.L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E.H. Koo, D. Schenk, D.B. Teplow, and et al. 1992b. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. 359:322-5.
- Haass, C., and D.J. Selkoe. 1993. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*. 75:1039-42.
- Haass, C., and H. Steiner. 2002. Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol*. 12:556-62.
- Hadland, B., N. Manley, D.M. Su, G. Longmore, C. Moore, M. Wolfe, E. Schroeter, and R. Kopan. 2001. γ -Secretase inhibitors repress thymocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98:7487-7491.
- Haniu, M., P. Denis, Y. Young, E.A. Mendiaz, J. Fuller, J.O. Hui, B.D. Bennett, S. Kahn, S. Ross, T. Burgess, V. Katta, G. Rogers, R. Vassar, and M. Citron. 2000. Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J Biol Chem*. 275:21099-106.
- Hardy, J., and D.J. Selkoe. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297:353-6.
- Harrison, T.M., M.A. Chidgey, W.J. Brammar, and G.J. Adams. 1989. The pro-peptide is not necessary for active renin secretion from transfected mammalian cells. *Proteins*. 5:259-65.
- Hartmann, D., B. de Strooper, L. Serneels, K. Craessaerts, A. Herreman, W. Annaert, L. Umans, T. Lubke, A. Lena Illert, K. von Figura, and P. Saftig. 2002. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet*. 11:2615-24.
- Hendriks, L., C.M. van Duijn, P. Cras, M. Cruts, W. Van Hul, F. van Harskamp, A. Warren, M.G. McInnis, S.E. Antonarakis, J.J. Martin, and et al. 1992. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet*. 1:218-21.

- Herreman, A., L. Serneels, W. Annaert, D. Collen, L. Schoonjans, and B. De Strooper. 2000. Total inactivation of γ -secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 2:461-2.
- Hong, L., G. Koelsch, X. Lin, S. Wu, S. Terzyan, A.K. Ghosh, X.C. Zhang, and J. Tang. 2000. Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science.* 290:150-3.
- Hung, A.Y., C. Haass, R.M. Nitsch, W.Q. Qiu, M. Citron, R.J. Wurtman, J.H. Growdon, and D.J. Selkoe. 1993. Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J Biol Chem.* 268:22959-62.
- Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* 80:225-36.
- Huse, J.T., K. Liu, D.S. Pijak, D. Carlin, V.M. Lee, and R.W. Doms. 2002. Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem.* 277:16278-84.
- Huse, J.T., D.S. Pijak, G.J. Leslie, V.M. Lee, and R.W. Doms. 2000. Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem.* 275:33729-37.
- Hussain, I., G. Christie, K. Schneider, S. Moore, and C. Dingwall. 2001. Prodomain processing of Asp1 (BACE2) is autocatalytic. *J Biol Chem.* 276:23322-8.
- Hussain, I., D. Powell, D.R. Howlett, D.G. Tew, T.D. Meek, C. Chapman, I.S. Gloger, K.E. Murphy, C.D. Southan, D.M. Ryan, T.S. Smith, D.L. Simmons, F.S. Walsh, C. Dingwall, and G. Christie. 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* 14:419-27.
- Hussain, I., D.J. Powell, D.R. Howlett, G.A. Chapman, L. Gilmour, P.R. Murdock, D.G. Tew, T.D. Meek, C. Chapman, K. Schneider, S.J. Ratcliffe, D. Tattersall, T.T. Testa, C. Southan, D.M. Ryan, D.L. Simmons, F.S. Walsh, C. Dingwall, and G. Christie. 2000. ASP1 (BACE2) cleaves the amyloid precursor protein at the beta-secretase site. *Mol Cell Neurosci.* 16:609-19.
- Huttner, W.B. 1988. Tyrosine sulfation and the secretory pathway. *Annu Rev Physiol.* 50:363-76.
- Iwata, N., S. Tsubuki, Y. Takaki, K. Shirotani, B. Lu, N.P. Gerard, C. Gerard, E. Hama, H.J. Lee, and T.C. Saido. 2001. Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. *Science.* 292:1550-2.

- Iwata, N., S. Tsubuki, Y. Takaki, K. Watanabe, M. Sekiguchi, E. Hosoki, M. Kawashima-Morishima, H.J. Lee, E. Hama, Y. Sekine-Aizawa, and T.C. Saido. 2000. Identification of the major A β 1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat. Med.* 6:143-50.
- Jacobsen, J.S., M.A. Spruyt, A.M. Brown, S.R. Sahasrabudhe, A.J. Blume, M.P. Vitek, H.A. Muenkel, and J. Sonnenberg-Reines. 1994. The release of Alzheimer's disease beta amyloid peptide is reduced by phorbol treatment. *J Biol Chem.* 269:8376-82.
- James, M.N., A. Sielecki, F. Salituro, D.H. Rich, and T. Hofmann. 1982. Conformational flexibility in the active sites of aspartyl proteinases revealed by a pepstatin fragment binding to penicillopepsin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:6137-41.
- Jones, B.G., L. Thomas, S.S. Molloy, C.D. Thulin, M.D. Fry, K.A. Walsh, and G. Thomas. 1995. Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *Embo J.* 14:5869-83.
- Kamal, A., A. Almenar-Queralt, J.F. LeBlanc, E.A. Roberts, and L.S. Goldstein. 2001. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature.* 414:643-8.
- Kang, J., H.G. Lemaire, A. Unterbeck, J.M. Salbaum, C.L. Masters, K.H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, and B. Muller-Hill. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 325:733-6.
- Kimberly, W.T., M.J. LaVoie, B.L. Ostaszewski, W. Ye, M.S. Wolfe, and D.J. Selkoe. 2003. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:6382-7.
- Kimberly, W.T., W. Xia, T. Rahmati, M.S. Wolfe, and D.J. Selkoe. 2000. The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for γ -secretase activity and amyloid β -protein generation. *J. Biol. Chem.* 275:3173-8.
- Kitazume, S., Y. Tachida, R. Oka, N. Kotani, K. Ogawa, M. Suzuki, N. Dohmae, K. Takio, T.C. Saido, and Y. Hashimoto. 2002. Characterization of alpha 2,6-sialyltransferase cleavage by Alzheimer's beta -secretase(BACE1). *J Biol Chem.* 7:7.
- Kitazume, S., Y. Tachida, R. Oka, K. Shirotani, T.C. Saido, and Y. Hashimoto. 2001. Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein- cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi- resident sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:13554-9.

- Koelsch, G., M. Mares, P. Metcalf, and M. Fusek. 1994. Multiple functions of pro-parts of aspartic proteinase zymogens. *FEBS Lett.* 343:6-10.
- Koike, H., S. Tomioka, H. Sorimachi, T.C. Saido, K. Maruyama, A. Okuyama, A. Fujisawa-Sehara, S. Ohno, K. Suzuki, and S. Ishiura. 1999. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an α -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem. J.* 343:371-375.
- Koo, E.H., and S.L. Squazzo. 1994. Evidence that production and release of amyloid β -protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 269:17386-9.
- Koo, E.H., S.L. Squazzo, D.J. Selkoe, and C.H. Koo. 1996. Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *J Cell Sci.* 109:991-8.
- Kopan, R., and A. Goate. 2002. Aph-2/Nicastrin: an essential component of γ -secretase and regulator of Notch signaling and Presenilin localization. *Neuron.* 33:321-4.
- Krebs, E.G. 1993. Nobel Lecture. Protein phosphorylation and cellular regulation I. *Biosci Rep.* 13:127-42.
- Kruse, P.K., and M.K. Patterson. 1973. Tissue culture, methods and applications. *Academic Press New York and London.*
- Kurochkin, I.V. 2001. Insulin-degrading enzyme: embarking on amyloid destruction. *Trends Biochem. Sci.* 26:421-5.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lai, E.C. 2002. Notch cleavage: Nicastrin helps Presenilin make the final cut. *Curr Biol.* 12:R200-2.
- Lammich, S., E. Kojro, R. Postina, S. Gilbert, R. Pfeiffer, M. Jasionowski, C. Haass, and F. Fahrenholz. 1999. Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:3922-7.
- Lammich, S., M. Okochi, M. Takeda, C. Kaether, A. Capell, A.-K. Zimmer, D. Edbauer, J. Walter, H. Steiner, and C. Haass. 2002. Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an A β -like peptide. *J Biol Chem.* in press.

- Lapatto, R., T. Blundell, A. Hemmings, J. Overington, A. Wilderspin, S. Wood, J.R. Merson, P.J. Whittle, D.E. Danley, K.F. Geoghegan, and et al. 1989. X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes. *Nature*. 342:299-302.
- LaPointe, C.F., and R.K. Taylor. 2000. The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. *J. Biol. Chem.* 275:1502-10.
- Lee, E.B., D.M. Skovronsky, F. Abtahian, R.W. Doms, and V.M. Lee. 2002a. Secretion and intracellular generation of truncated Aβ in BACE expressing human neurons. *J Biol Chem.* 11:11.
- Lee, H.J., K.M. Jung, Y.Z. Huang, L.B. Bennett, J.S. Lee, L. Mei, and T.W. Kim. 2002b. Presenilin-dependent γ -secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. *J. Biol. Chem.* 277:6318-23.
- Lee, S., S. Shah, H. Li, C. Yu, W. Han, and G. Yu. 2002c. Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin, and is required for intramembrane proteolysis of APP and Notch. *J Biol Chem.* in press.
- Leem, J.Y., S. Vijayan, P. Han, D. Cai, M. Machura, K.O. Lopes, M.L. Veselits, H. Xu, and G. Thinakaran. 2002. Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin. *J. Biol. Chem.* 277:19236-40.
- Levy, E., M.D. Carman, I.J. Fernandez-Madrid, M.D. Power, I. Lieberburg, S.G. van Duinen, G.T. Bots, W. Luyendijk, and B. Frangione. 1990. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*. 248:1124-6.
- Levy-Lahad, E., E.M. Wijsman, E. Nemens, L. Anderson, K.A. Goddard, J.L. Weber, T.D. Bird, and G.D. Schellenberg. 1995. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*. 269:970-3.
- Li, M., L.H. Philip, W.E. Lees, J.R. Winther, B.M. Dunn, A. Wlodawer, J. Kay, and A. Gustchina. 2000a. The aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae* folds its own inhibitor into a helix. *Nat Struct Biol.* 7:113-7.
- Li, Y.M., M. Xu, M.T. Lai, Q. Huang, J.L. Castro, J. DiMuzio-Mower, T. Harrison, C. Lellis, A. Nadin, J.G. Neduvelli, R.B. Register, M.K. Sardana, M.S. Shearman, A.L. Smith, X.P. Shi, K.C. Yin, J.A. Shafer, and S.J. Gardell. 2000b. Photoactivated γ -secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature*. 405:689-94.

- Lichtenthaler, S.F., D. Beher, H.S. Grimm, R. Wang, M.S. Shearman, C.L. Masters, and K. Beyreuther. 2002. The intramembrane cleavage site of the amyloid precursor protein depends on the length of its transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:1365-70.
- Lin, X., G. Koelsch, S. Wu, D. Downs, A. Dashti, and J. Tang. 2000. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:1456-60.
- Linstedt, A.D., and H.P. Hauri. 1993. Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. *Mol Biol Cell*. 4:679-93.
- Liu, K., R.W. Doms, and V.M. Lee. 2002. Glu11 site cleavage and N-terminally truncated A beta production upon BACE overexpression. *Biochemistry*. 41:3128-36.
- Luo, W.J., H. Wang, H. Li, B.S. Kim, S. Shah, H.J. Lee, G. Thinakaran, T.W. Kim, G. Yu, and H. Xu. 2003. PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem*.
- Luo, Y., B. Bolon, S. Kahn, B.D. Bennett, S. Babu-Khan, P. Denis, W. Fan, H. Kha, J. Zhang, Y. Gong, L. Martin, J.C. Louis, Q. Yan, W.G. Richards, M. Citron, and R. Vassar. 2001. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci*. 4:231-2.
- Machen, T.E., M.J. Leigh, C. Taylor, T. Kimura, S. Asano, and H.P. Moore. 2003. pH of TGN and recycling endosomes of H⁺/K⁺-ATPase-transfected HEK-293 cells: implications for pH regulation in the secretory pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 285:C205-14.
- Mager, P.P. 2001. The active site of HIV-1 protease. *Med Res Rev*. 21:348-53.
- Mandelkow, E.M., and E. Mandelkow. 1998. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*. 8:425-7.
- Marambaud, P., J. Shioi, G. Serban, A. Georgakopoulos, S. Sarnier, V. Nagy, L. Baki, P. Wen, S. Efthimiopoulos, Z. Shao, T. Wisniewski, and N.K. Robakis. 2002. A presenilin-1/ γ -secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *Embo J*. 21:1948-56.
- Marcinkiewicz, M., and N.G. Seidah. 2000. Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem*. 75:2133-43.

- Masters, C.L., G. Multhaup, G. Simms, J. Pottgiesser, R.N. Martins, and K. Beyreuther. 1985a. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *Embo J.* 4:2757-63.
- Masters, C.L., G. Simms, N.A. Weinman, G. Multhaup, B.L. McDonald, and K. Beyreuther. 1985b. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:4245-9.
- Maurer, K., and U. Maurer. 1998. Alzheimer. Das Leben eines Arztes und die Karriere einer Krankheit. Piper, München.
- Meijer, L., A.M. Thunnissen, A.W. White, M. Garnier, M. Nikolic, L.H. Tsai, J. Walter, K.E. Cleverley, P.C. Salinas, Y.Z. Wu, J. Biernat, E.M. Mandelkow, S.H. Kim, and G.R. Pettit. 2000. Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3beta and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem Biol.* 7:51-63.
- Milward, E.A., R. Papadopoulos, S.J. Fuller, R.D. Moir, D. Small, K. Beyreuther, and C.L. Masters. 1992. The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron.* 9:129-37.
- Mizutani, T., Y. Taniguchi, T. Aoki, N. Hashimoto, and T. Honjo. 2001. Conservation of the biochemical mechanisms of signal transduction among mammalian Notch family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:9026-31.
- Molloy, S.S., L. Thomas, C. Kamibayashi, M.C. Mumby, and G. Thomas. 1998. Regulation of endosome sorting by a specific PP2A isoform. *J Cell Biol.* 142:1399-411.
- Morris, H.R., M.N. Khan, J.C. Janssen, J.M. Brown, J. Perez-Tur, M. Baker, M. Ozansoy, J. Hardy, M. Hutton, N.W. Wood, A.J. Lees, T. Revesz, P. Lantos, and M.N. Rossor. 2001. The genetic and pathological classification of familial frontotemporal dementia. *Arch Neurol.* 58:1813-6.
- Mullan, M., F. Crawford, K. Axelman, H. Houlden, L. Lilius, B. Winblad, and L. Lannfelt. 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet.* 1:345-7.
- Müller, U., V. Gajic, J. Steinbach, A. Aguzzi, J.T. Herms, P., S.S. Sisodia, D.P. Wolfer, and H.-P. Lipp. 1998. Single and combined gene deficiencies of APP/APLP-family members. *Neurobiol. Aging.* 16:1174.
- Mumm, J.S., and R. Kopan. 2000. Notch signaling: from the outside in. *Dev. Biol.* 228:151-65.

- Mutt, V. 1980. Chemistry, isolation and purification of gastrointestinal hormones. *Biochem Soc Trans.* 8:11-4.
- Naruse, S., G. Thinakaran, J.J. Luo, J.W. Kusiak, T. Tomita, T. Iwatsubo, X. Qian, D.D. Ginty, D.L. Price, D.R. Borchelt, P.C. Wong, and S.S. Sisodia. 1998. Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron.* 21:1213-21.
- Ng, K.K., J.F. Petersen, M.M. Cherney, C. Garen, J.J. Zolatoris, C. Rao-Naik, B.M. Dunn, M.R. Martzen, R.J. Peanasky, and M.N. James. 2000. Structural basis for the inhibition of porcine pepsin by *Ascaris* pepsin inhibitor-3. *Nat Struct Biol.* 7:653-7.
- Ni, C.Y., M.P. Murphy, T.E. Golde, and G. Carpenter. 2001. γ -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science.* 294:2179-2181.
- Niehrs, C., R. Beisswanger, and W.B. Huttner. 1994. Protein tyrosine sulfation, 1993--an update. *Chem Biol Interact.* 92:257-71.
- Nishimoto, I., T. Okamoto, Y. Matsuura, S. Takahashi, Y. Murayama, and E. Ogata. 1993. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature.* 362:75-9.
- Nitsch, R.M., B.E. Slack, R.J. Wurtman, and J.H. Growdon. 1992. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science.* 258:304-7.
- Nordstedt, C., G.L. Caporaso, J. Thyberg, S.E. Gandy, and P. Greengard. 1993. Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. *J Biol Chem.* 268:608-12.
- Norman, J.A., O. Hadjilambri, R. Baska, D.Y. Sharp, and R. Kumar. 1992. Stable expression, secretion, and characterization of active human renin in mammalian cells. *Mol Pharmacol.* 41:53-9.
- Odetti, P., G. Angelini, D. Dapino, D. Zaccheo, S. Garibaldi, F. Dagna-Bricarelli, G. Piombo, G. Perry, M. Smith, N. Traverso, and M. Tabaton. 1998. Early glycoxidation damage in brains from Down's syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 243:849-51.
- Okochi, M., H. Steiner, A. Fukumori, H. Tanii, T. Tomita, T. Tanaka, T. Iwatsubo, T. Kudo, C. Haass, and M. Takeda. 2002. Presenilins mediate a dual intramembraneous γ -secretase cleavage of Notch, which is required for signaling and removal of the transmembrane domain. *EMBO J.* 21:5408-16.
- Okoniewska, M., T. Tanaka, and R.Y. Yada. 1999. The role of the flap residue, threonine 77, in the activation and catalytic activity of pepsin A. *Protein Eng.* 12:55-61.

- Okoniewska, M., T. Tanaka, and R.Y. Yada. 2000. The pepsin residue glycine-76 contributes to active-site loop flexibility and participates in catalysis. *Biochem J.* 349:169-77.
- Oltersdorf, T., P.J. Ward, T. Henriksson, E.C. Beattie, R. Neve, I. Lieberburg, and L.C. Fritz. 1990. The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J Biol Chem.* 265:4492-7.
- Panek, H.R., J.D. Stepp, H.M. Engle, K.M. Marks, P.K. Tan, S.K. Lemmon, and L.C. Robinson. 1997. Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *Embo J.* 16:4194-204.
- Peschon, J.J., J.L. Slack, P. Reddy, K.L. Stocking, S.W. Sunnarborg, D.C. Lee, W.E. Russell, B.J. Castner, R.S. Johnson, J.N. Fitzner, R.W. Boyce, N. Nelson, C.J. Kozlosky, M.F. Wolfson, C.T. Rauch, D.P. Cerretti, R.J. Paxton, C.J. March, and R.A. Black. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science.* 282:1281-4.
- Phylip, L.H., W.E. Lees, B.G. Brownsey, D. Bur, B.M. Dunn, J.R. Winther, A. Gustchina, M. Li, T. Copeland, A. Wlodawer, and J. Kay. 2001. The potency and specificity of the interaction between the IA3 inhibitor and its target aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 276:2023-30.
- Pike, C.J., B.J. Cummings, R. Monzavi, and C.W. Cotman. 1994. Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 63:517-31.
- Ponting, C.P., M. Hutton, A. Nyborg, M. Baker, K. Jansen, and T.E. Golde. 2002. Identification of a novel family of presenilin homologues. *Hum. Mol. Genet.* 11:1037-44.
- Ratovitski, T., H.H. Slunt, G. Thinakaran, D.L. Price, S.S. Sisodia, and D.R. Borchelt. 1997. Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin. *J. Biol. Chem.* 272:24536-41.
- Rich, D.H., M.S. Bernatowicz, N.S. Agarwal, M. Kawai, F.G. Salituro, and P.G. Schmidt. 1985. Inhibition of aspartic proteases by pepstatin and 3-methylstatine derivatives of pepstatin. Evidence for collected-substrate enzyme inhibition. *Biochemistry.* 24:3165-73.

- Roberds, S.L., J. Anderson, G. Basi, M.J. Bienkowski, D.G. Branstetter, K.S. Chen, S.B. Freedman, N.L. Frigon, D. Games, K. Hu, K. Johnson-Wood, K.E. Kappenman, T.T. Kawabe, I. Kola, R. Kuehn, M. Lee, W. Liu, R. Motter, N.F. Nichols, M. Power, D.W. Robertson, D. Schenk, M. Schoor, G.M. Shopp, M.E. Shuck, S. Sinha, K.A. Svensson, G. Tatsuno, H. Tintrup, J. Wijsman, S. Wright, and L. McConlogue. 2001. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta- secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet.* 10:1317-24.
- Rogaev, E.I., R. Sherrington, E.A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, T. Tsuda, and et al. 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature.* 376:775-8.
- Roher, A.E., J.D. Lowenson, S. Clarke, C. Wolkow, R. Wang, R.J. Cotter, I.M. Reardon, H.A. Zurcher-Neely, R.L. Heinrikson, M.J. Ball, and et al. 1993. Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 268:3072-83.
- Rosa, P., S. Mantovani, R. Rosboch, and W.B. Huttner. 1992. Monensin and brefeldin A differentially affect the phosphorylation and sulfation of secretory proteins. *J Biol Chem.* 267:12227-32.
- Saitoh, T., M. Sundsmo, J.M. Roch, N. Kimura, G. Cole, D. Schubert, T. Oltersdorf, and D.B. Schenk. 1989. Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell.* 58:615-22.
- Sali, A., B. Veerapandian, J.B. Cooper, D.S. Moss, T. Hofmann, and T.L. Blundell. 1992. Domain flexibility in aspartic proteinases. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 12:158.
- Sambrook, J., and D.W. Russel. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Habor, New York.
- Sandbrink, R., C.L. Masters, and K. Beyreuther. 1994. Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4- amyloid protein precursor-like proteins. *J Biol Chem.* 269:14227-34.
- Sastre, M., H. Steiner, K. Fuchs, A. Capell, G. Multhaup, M.M. Condron, D.B. Teplow, and C. Haass. 2001. Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep.* 2:835-41.

- Sauder, J.M., J.W. Arthur, and R.L. Dunbrack, Jr. 2000. Modeling of substrate specificity of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein beta-secretase. *J Mol Biol.* 300:241-8.
- Saunders, A., T.-W. Kim, and R. Tanzi. 1999. BACE Maps to Chromosome 11 and a BACE Homolog, BACE2, Reside in the Obligate Down Syndrome Region of Chromosome 21. *Science.* 286:1255a.
- Saxena, M.T., E.H. Schroeter, J.S. Mumm, and R. Kopan. 2001. Murine Notch homologs (N1-4) undergo presenilin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 276:40268-73.
- Schägger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 166:368-79.
- Schupf, N., B. Patel, W. Silverman, W.B. Zigman, N. Zhong, B. Tycko, P.D. Mehta, and R. Mayeux. 2001. Elevated plasma amyloid beta-peptide 1-42 and onset of dementia in adults with Down syndrome. *Neurosci Lett.* 301:199-203.
- Schwab, C., A.J. DeMaggio, N. Ghoshal, L.I. Binder, J. Kuret, and P.L. McGeer. 2000. Casein kinase 1 delta is associated with pathological accumulation of tau in several neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging.* 21:503-10.
- Seals, D.F., and S.A. Courtneidge. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17:7-30.
- Seelmeier, S., H. Schmidt, V. Turk, and K. von der Helm. 1988. Human immunodeficiency virus has an aspartic-type protease that can be inhibited by pepstatin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:6612-6.
- Seiffert, D., J.D. Bradley, C.M. Rominger, D.H. Rominger, F. Yang, J.E. Meredith, Jr., Q. Wang, A.H. Roach, L.A. Thompson, S.M. Spitz, J.N. Higaki, S.R. Prakash, A.P. Combs, R.A. Copeland, S.P. Arneric, P.R. Hartig, D.W. Robertson, B. Cordell, A.M. Stern, R.E. Olson, and R. Zaczek. 2000. Presenilin-1 and -2 are molecular targets for gamma-secretase inhibitors. *J Biol Chem.* 275:34086-91.
- Selkoe, D.J. 1994. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Biol.* 10:373-403.
- Selkoe, D.J. 1996. Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 271:18295-8.
- Selkoe, D.J. 1999. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature.* 399:A23-31.

- Selkoe, D.J. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81:741-66.
- Selkoe, D.J., M.B. Podlisny, C.L. Joachim, E.A. Vickers, G. Lee, L.C. Fritz, and T. Oltersdorf. 1988. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:7341-5.
- Seubert, P., T. Oltersdorf, M.G. Lee, R. Barbour, C. Blomquist, D.L. Davis, K. Bryant, L.C. Fritz, D. Galasko, L.J. Thal, and et al. 1993. Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the β -amyloid peptide. *Nature.* 361:260-3.
- Sherrington, R., E.I. Rogaev, Y. Liang, E.A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, and et al. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 375:754-60.
- Shi, X.P., E. Chen, K.C. Yin, S. Na, V.M. Garsky, M.T. Lai, Y.M. Li, M. Platchek, R.B. Register, M.K. Sardana, M.J. Tang, J. Thiebeau, T. Wood, J.A. Shafer, and S.J. Gardell. 2001. The pro domain of beta-secretase does not confer strict zymogen-like properties but does assist proper folding of the protease domain. *J Biol Chem.* 276:10366-73.
- Shoji, M., T.E. Golde, J. Ghiso, T.T. Cheung, S. Estus, L.M. Shaffer, X.D. Cai, D.M. McKay, R. Tintner, B. Frangione, and et al. 1992. Production of the Alzheimer amyloid β -protein by normal proteolytic processing. *Science.* 258:126-9.
- Sielecki, A.R., A.A. Fedorov, A. Boodhoo, N.S. Andreeva, and M.N. James. 1990. Molecular and crystal structures of monoclinic porcine pepsin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol.* 214:143-70.
- Sinha, S., J.P. Anderson, R. Barbour, G.S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, H.F. Dovey, N. Frigon, J. Hong, K. Jacobson-Croak, N. Jewett, P. Keim, J. Knops, I. Lieberburg, M. Power, H. Tan, G. Tatsuno, J. Tung, D. Schenk, P. Seubert, S.M. Suomensari, S. Wang, D. Walker, V. John, and et al. 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature.* 402:537-40.
- Sisodia, S.S. 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:6075-9.
- Sisodia, S.S., E.H. Koo, K. Beyreuther, A. Unterbeck, and D.L. Price. 1990. Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science.* 248:492-5.

- Sisodia, S.S., and P.H. St George-Hyslop. 2002. gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci.* 3:281-90.
- Skovronsky, D.M., R.W. Doms, and V.M. Lee. 1998. Detection of a novel intraneuronal pool of insoluble amyloid beta protein that accumulates with time in culture. *J Cell Biol.* 141:1031-9.
- Solans, A., X. Estivill, and S. de La Luna. 2000. A new aspartyl protease on 21q22.3, BACE2, is highly similar to Alzheimer's amyloid precursor protein beta-secretase. *Cytogenet Cell Genet.* 89:177-84.
- Sprecher, C.A., F.J. Grant, G. Grimm, P.J. O'Hara, F. Norris, K. Norris, and D.C. Foster. 1993. Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry.* 32:4481-6.
- Steiner, H., K. Duff, A. Capell, H. Romig, M.G. Grim, S. Lincoln, J. Hardy, X. Yu, M. Picciano, K. Fichteler, M. Citron, R. Kopan, B. Pesold, S. Keck, M. Baader, T. Tomita, T. Iwatsubo, R. Baumeister, and C. Haass. 1999a. A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling. *J Biol Chem.* 274:28669-73.
- Steiner, H., M. Kostka, H. Romig, G. Basset, B. Pesold, J. Hardy, A. Capell, L. Meyn, M.G. Grim, R. Baumeister, K. Fichteler, and C. Haass. 2000. Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in polytopic bacterial aspartyl proteases. *Nat. Cell Biol.* 2:848-51.
- Steiner, H., H. Romig, M.G. Grim, U. Philipp, B. Pesold, M. Citron, R. Baumeister, and C. Haass. 1999b. The biological and pathological function of the presenilin-1 Deltaexon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J Biol Chem.* 274:7615-8.
- Steiner, H., H. Romig, B. Pesold, U. Philipp, M. Baader, M. Citron, H. Loetscher, H. Jacobsen, and C. Haass. 1999c. Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis. *Biochemistry.* 38:14600-5.
- Steiner, H., E. Winkler, D. Edbauer, S. Prokop, G. Basset, A. Yamasaki, M. Kostka, and C. Haass. 2002. PEN-2 is an integral component of the gamma -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem.* 277:39062-65.
- Struhl, G., and A. Adachi. 2000. Requirements for presenilin-dependent cleavage of Notch and other transmembrane proteins. *Mol. Cell.* 6:625-636.

- Tagliavini, F., G. Giaccone, B. Frangione, and O. Bugiani. 1988. Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and nondemented individuals. *Neurosci Lett.* 93:191-6.
- Tanzi, R.E., A.I. McClatchey, E.D. Lamperti, L. Villa-Komaroff, J.F. Gusella, and R.L. Neve. 1988. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature.* 331:528-30.
- Tarentino, A.L., C.M. Gomez, and T.H. Plummer, Jr. 1985. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry.* 24:4665-71.
- Tarentino, A.L., and F. Maley. 1974. Purification and properties of an endo-beta-N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces griseus*. *J Biol Chem.* 249:811-7.
- Tarentino, A.L., T.H. Plummer, Jr., and F. Maley. 1974. The release of intact oligosaccharides from specific glycoproteins by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J Biol Chem.* 249:818-24.
- Tatnell, P.J., S.D. Fowler, D. Bur, W.E. Lees, and J. Kay. 1998. Cathepsin E. The best laid plans of mice and men. *Adv Exp Med Biol.* 436:147-152.
- Terry, R.D., N.K. Gonatas, and M. Weiss. 1964. The ultrastructure of the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Trans Am Neurol Assoc.* 89:12.
- Thinakaran, G., D.R. Borchelt, M.K. Lee, H.H. Slunt, L. Spitzer, G. Kim, T. Ratovitsky, F. Davenport, C. Nordstedt, M. Seeger, J. Hardy, A.I. Levey, S.E. Gandy, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, D.L. Price, and S.S. Sisodia. 1996. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron.* 17:181-90.
- Thinakaran, G., C.L. Harris, T. Ratovitski, F. Davenport, H.H. Slunt, D.L. Price, D.R. Borchelt, and S.S. Sisodia. 1997. Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *J. Biol. Chem.* 272:28415-22.
- Thorsett, E.D., and L.H. Latimer. 2000. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol.* 4:377-82.
- Tuazon, P.T., and J.A. Traugh. 1991. Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 23:123-64.
- Vandermeeren, M., M. Geraerts, S. Pype, L. Dillen, C. Van Hove, and M. Mercken. 2001. The functional gamma-secretase inhibitor prevents production of amyloid beta 1-34 in human and murine cell lines. *Neurosci Lett.* 315:145-8.

- Varnum-Finney, B., L. Xu, C. Brashem-Stein, C. Nourigat, D. Flowers, S. Bakkour, W.S. Pear, and I.D. Bernstein. 2000. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med.* 6:1278-81.
- Vassar, R. 2002. beta-Secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 54:1589-602.
- Vassar, R., B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, and M. Citron. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 286:735-41.
- Vassar, R., and M. Citron. 2000. A β -generating enzymes: recent advances in β - and γ -secretase research. *Neuron.* 27:419-22.
- Walsh, D.M., I. Klyubin, J.V. Fadeeva, W.K. Cullen, R. Anwyl, M.S. Wolfe, M.J. Rowan, and D.J. Selkoe. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature.* 416:535-9.
- Walter, J., A. Capell, J. Grunberg, B. Pesold, A. Schindzielorz, R. Prior, M.B. Podlisny, P. Fraser, P.S. Hyslop, D.J. Selkoe, and C. Haass. 1996. The Alzheimer's disease-associated presenilins are differentially phosphorylated proteins located predominantly within the endoplasmic reticulum. *Mol Med.* 2:673-91.
- Walter, J., R. Fluhrer, B. Hartung, M. Willem, C. Kaether, A. Capell, S. Lammich, G. Multhaup, and C. Haass. 2001a. Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem.* 276:14634-41.
- Walter, J., J. Grunberg, A. Capell, B. Pesold, A. Schindzielorz, M. Citron, K. Mendla, P.S. George-Hyslop, G. Multhaup, D.J. Selkoe, and C. Haass. 1997. Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an *in vivo* substrate for protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:5349-54.
- Walter, J., C. Kaether, H. Steiner, and C. Haass. 2001b. The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases. *Curr Opin Neurobiol.* 11:585-90.
- Walter, J., A. Schindzielorz, J. Grunberg, and C. Haass. 1999. Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:1391-6.

- Walter, J., A. Schindzielorz, B. Hartung, and C. Haass. 2000. Phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein at the cell surface by ectocasein kinases 1 and 2. *J Biol Chem.* 275:23523-9.
- Wang, R., D. Sweeney, S.E. Gandy, and S.S. Sisodia. 1996. The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *J Biol Chem.* 271:31894-902.
- Wasco, W., K. Bupp, M. Magendantz, J.F. Gusella, R.E. Tanzi, and F. Solomon. 1992. Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:10758-62.
- Wasco, W., S. Gurubhagavatula, M.D. Paradis, D.M. Romano, S.S. Sisodia, B.T. Hyman, R.L. Neve, and R.E. Tanzi. 1993. Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet.* 5:95-100.
- Weidemann, A., G. Konig, D. Bunke, P. Fischer, J.M. Salbaum, C.L. Masters, and K. Beyreuther. 1989. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell.* 57:115-26.
- Weihofen, A., K. Binns, M.K. Lemberg, K. Ashman, and B. Martoglio. 2002. Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science.* 296:2215-8.
- Weihofen, A., M.K. Lemberg, E. Friedmann, H. Rueeger, A. Schmitz, P. Paganetti, G. Rovelli, and B. Martoglio. 2003. Targeting Presenilin-type Aspartic Protease Signal Peptide Peptidase with gamma -Secretase Inhibitors. *J Biol Chem.* 278:16528-33.
- Weihofen, A., and B. Martoglio. 2003. Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol.* 13:71-8.
- Wera, S., and B.A. Hemmings. 1995. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J.* 311:17-29.
- Wertkin, A.M., R.S. Turner, S.J. Pleasure, T.E. Golde, S.G. Younkin, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 1993. Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:9513-7.

- Weskamp, G., H. Cai, T.A. Brodie, S. Higashyama, K. Manova, T. Ludwig, and C.P. Blobel. 2002. Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol Cell Biol.* 22:1537-44.
- Wilcheck M., and Bayer E.A. 1990. Avidin-biotin technology. *Methods in Enzymology.* 184.
- Wild-Bode, C., T. Yamazaki, A. Capell, U. Leimer, H. Steiner, Y. Ihara, and C. Haass. 1997. Intracellular generation and accumulation of amyloid β -peptide terminating at amino acid 42. *J. Biol. Chem.* 272:16085-8.
- Wiltfang, J., A. Smirnov, B. Schnierstein, G. Kelemen, U. Matthies, H.W. Klafki, M. Staufenbiel, G. Huther, E. Ruther, and J. Kornhuber. 1997. Improved electrophoretic separation and immunoblotting of β -amyloid (A β) peptides 1-40, 1-42, and 1-43. *Electrophoresis.* 18:527-32.
- Wolfe, M.S., M. Citron, T.S. Diehl, W. Xia, I.O. Donkor, and D.J. Selkoe. 1998. A substrate-based difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's gamma-secretase activity. *J Med Chem.* 41:6-9.
- Wolfe, M.S., W. Xia, C.L. Moore, D.D. Leatherwood, B. Ostaszewski, T. Rahmati, I.O. Donkor, and D.J. Selkoe. 1999a. Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's γ -secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry.* 38:4720-7.
- Wolfe, M.S., W. Xia, B.L. Ostaszewski, T.S. Diehl, W.T. Kimberly, and D.J. Selkoe. 1999b. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature.* 398:513-7.
- Xia, W., W.J. Ray, B.L. Ostaszewski, T. Rahmati, W.T. Kimberly, M.S. Wolfe, J. Zhang, A.M. Goate, and D.J. Selkoe. 2000. Presenilin complexes with the C-terminal fragments of amyloid precursor protein at the sites of amyloid β -protein generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:9299-9304.
- Yamaguchi, H., Y. Nakazato, S. Hirai, M. Shoji, and Y. Harigaya. 1989. Electron micrograph of diffuse plaques. Initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain. *Am J Pathol.* 135:593-7.

- Yan, R., M.J. Bienkowski, M.E. Shuck, H. Miao, M.C. Tory, A.M. Pauley, J.R. Brashier, N.C. Stratman, W.R. Mathews, A.E. Buhl, D.B. Carter, A.G. Tomasselli, L.A. Parodi, R.L. Heinrikson, and M.E. Gurney. 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature*. 402:533-7.
- Yan, R., J.B. Munzner, M.E. Shuck, and M.J. Bienkowski. 2001. BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells. *J Biol Chem*. 276:34019-27.
- Yasojima, K., J. Kuret, A.J. DeMaggio, E. McGeer, and P.L. McGeer. 2000. Casein kinase 1 delta mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain. *Brain Res*. 865:116-20.
- Yu, G., F. Chen, G. Levesque, M. Nishimura, D.M. Zhang, L. Levesque, E. Rogueva, D. Xu, Y. Liang, M. Duthie, P.H. St George-Hyslop, and P.E. Fraser. 1998. The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains β -catenin. *J. Biol. Chem*. 273:16470-5.
- Yu, G., M. Nishimura, S. Arawaka, D. Levitan, L. Zhang, A. Tandon, Y.Q. Song, E. Rogueva, F. Chen, T. Kawarai, A. Supala, L. Levesque, H. Yu, D.S. Yang, E. Holmes, P. Milman, Y. Liang, D.M. Zhang, D.H. Xu, C. Sato, E. Rogaev, M. Smith, C. Janus, Y. Zhang, R. Aebersold, L.S. Farrer, S. Sorbi, A. Bruni, P. Fraser, and P. St George-Hyslop. 2000. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. *Nature*. 407:48-54.
- Yu, J.S., and S.D. Yang. 1994. Protein kinase FA/glycogen synthase kinase-3 predominantly phosphorylates the in vivo site Thr97-Pro in brain myelin basic protein: evidence for Thr-Pro and Ser-Arg-X-X-Ser as consensus sequence motifs. *J Neurochem*. 62:1596-603.
- Zandomeni, R., M.C. Zandomeni, D. Shugar, and R. Weinmann. 1986. Casein kinase type II is involved in the inhibition by 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole of specific RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem*. 261:3414-9.
- Zhang, Z., P. Nadeau, W. Song, D. Donoviel, M. Yuan, A. Bernstein, and B.A. Yankner. 2000. Presenilins are required for γ -secretase cleavage of β APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat. Cell Biol*. 2:463-465.
- Zhong, Z., J. Higaki, K. Murakami, Y. Wang, R. Catalano, D. Quon, and B. Cordell. 1994. Secretion of beta-amyloid precursor protein involves multiple cleavage sites. *J Biol Chem*. 269:627-32.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Haass bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen, sowie für die stete und enthusiastische Unterstützung während dieser Arbeit.

Mein aufrichtiger Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Rudolf Grosschedl für seine Bereitschaft, meine Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten.

Prof. Dr. Jochen Walter danke ich für die Einführung in die Methodik der Molekularbiologie, seine andauernde Diskussionsbereitschaft und für wertvolle Tipps während der gesamten Arbeit.

Für die Bereitstellung wichtiger und wertvoller Reagenzien und für fruchtbare Kollaboration bedanke ich mich bei den Herren Dr. Dennis Selkoe, Dr. Dale Schenk, Dr. Roberto Taramelli, Dr. Wolfram Bode, Dr. Klaus Maskos, Dr. Luis Moroder, Dr. V. Kinzel, Dr. Laurent Meijer und Dr. Gerd Multhaup.

Ohne meine Kollegen/Innen Anja und Eddie wäre diese Arbeit nur mit halb soviel Spaß verbunden gewesen. Vielen Dank für Gummibärchen, Rittersport Joghurt (= Glückshormon), Wein, wissenschaftliche Tipps und Lebenshilfe zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Bianka, Sabine, Ann-Katrin, Liane, Sven, Harald und allen anderen Mitgliedern des Labors danke ich für die praktische Unterstützung, die uneingeschränkte Diskussionsbereitschaft und zahlreiche entspannende Spieleabende.

Ferner möchte ich mich bei allen nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern, besonders bei Frau Barbara Kassner, für die stets schnelle und unbürokratische Hilfe bedanken.

Herrn Kilian Witzel danke ich herzlich für das Korrekturlesen des Manuskriptes.

Ganz besonders dankbar bin ich meinen Eltern und Isabelle, die mich sehr unterstützt haben, viel Verständnis für meine Arbeit aufgebracht haben und mich immer zum Durchhalten ermutigt haben.

Lebenslauf

Regina Fluhner

Geburtsdatum: 22.03.1976
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

Grundschule: 1982-1986 in Glonn

Gymnasium: 1986-1988 Gymnasium Grafing
1988-1995 Gymnasium Vaterstetten
30.06.1995 Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung:

Studium der Lebensmittelchemie

1995 – 1997 Ludwig-Maximilians-Universität München
23.10.1997 Lebensmittelchemische Vorprüfung
1997 – 1999 Technische Universität München
07.12.1999 Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

Forschungspraktikum

17.08. – 11.09.1998 im Arbeitskreis Prof. Dr. Ernst Winnacker am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dissertation

Seit 01.07.2000 Ausführung der Promotionsarbeit im Labor Prof. Dr. Christian Haass am Institut für Stoffwechselbiochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München

20.07.-25.07.2002 Teilnahme (Posterpräsentation) an der „8th international Conference on Alzheimer's Disease and related Disorders“ in Stockholm.

Publikationen**Phosphorylation Regulates Intracellular Trafficking of beta-Secretase**

J. Walter, R. Fluhner, B. Hartung, M. Willem, C. Kaether, A. Capell, S. Lammich, G. Multhaup and C. Haass

J Biol Chem. 2001 May 4; 276 (18): 14634-41

Apical Sorting of beta-Secretase Limits Amyloid beta-Peptide Production

A. Capell, L. Meyn, R. Fluhner, DB. Teplow, J. Walter and C. Haass

J Biol Chem. 2002 Feb 15;277(7):5637-43

A Non-Amyloidogenic Function of BACE-2 in the Secretory Pathway

R. Fluhner, A. Capell, G. Westmeyer, M. Willem, B. Hartung, MM. Condron, DB. Teplow, C. Haass and J. Walter

J Neurochem. 2002 Jun;81(5):1011-20.

Identification of a beta-Secretase Activity, Which Truncates Amyloid beta-Peptide after Its Presenilin-dependent Generation.

R. Fluhner, G. Multhaup, A. Schlicksupp, M. Okochi, M. Takeda, S. Lammich, M. Willem, G. Westmeyer, W. Bode, J. Walter and C. Haass.

J Biol Chem. 2003 Feb 21;278(8):5531-5538

Phosphorylation of presenilin 1 at the caspase recognition site regulates its proteolytic processing and the progression of apoptosis

R. Fluhner, A. Friedlein, C. Haass and J. Walter

J Biol Chem. 2003 Oct 22; *in press*

Anhang: Publikationen

Phosphorylation Regulates Intracellular Trafficking of β -Secretase*

Received for publication, December 11, 2000, and in revised form, January 26, 2001
Published, JBC Papers in Press, January 29, 2001, DOI 10.1074/jbc.M011116200

Jochen Walter^{‡§}, Regina Fluhner[‡], Bianka Hartung[‡], Michael Willem[‡], Christoph Kaether[‡],
Anja Capell[‡], Sven Lammich[‡], Gerd Multhaup[¶], and Christian Haass^{‡||}

From the [‡]Adolf Butenandt-Institute, Department of Biochemistry, Laboratory for Alzheimer's and Parkinson's Disease Research, Ludwig-Maximilians-University, 44 Schillerstrasse, 80336 Munich, Germany and [¶]Center for Molecular Biology Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 282, 69120 Heidelberg, Germany

β -Secretase (BACE) is a transmembrane aspartyl protease, which generates the N terminus of Alzheimer's disease amyloid β -peptide. Here, we report that BACE can be phosphorylated within its cytoplasmic domain at serine residue 498 by casein kinase 1. Phosphorylation exclusively occurs after full maturation of BACE by propeptide cleavage and complex *N*-glycosylation. Phosphorylation/dephosphorylation affects the subcellular localization of BACE. BACE wild type and an S498D mutant that mimics phosphorylated BACE are predominantly located within juxtannuclear Golgi compartments and endosomes, whereas nonphosphorylatable BACE S498A accumulates in peripheral EEA1-positive endosomes. Antibody uptake assays revealed that reinternalization of BACE from the cell surface is independent of its phosphorylation state. After reinternalization, BACE wild type as well as BACE S498D are efficiently retrieved from early endosomal compartments and further targeted to later endosomal compartments and/or the trans-Golgi network. In contrast, nonphosphorylatable BACE S498A is retained within early endosomes. Our results therefore demonstrate regulated trafficking of BACE within the secretory and endocytic pathway.

Alzheimer's disease is the most common form of dementia and is pathologically characterized by the invariant accumulation of senile plaques and neurofibrillary tangles in certain areas of the brains of Alzheimer's disease patients (1). The major constituent of senile plaques is the amyloid β -peptide ($A\beta$),¹ which derives from the β -amyloid precursor protein (β APP) by endoproteolytic processing (2). β -Secretase cleaves β APP at the N terminus of the $A\beta$ -domain, resulting in the generation of soluble APP_S- β and a membrane-associated C-terminal fragment bearing the complete $A\beta$ -domain. Subse-

quent cleavage of this fragment by γ -secretase, which appears to be identical with the presenilins, results in the release and secretion of $A\beta$ (3).

Recently, an aspartyl protease with β -secretase activity was identified in human embryonic kidney (HEK) 293 cells and was initially called BACE (β -site APP-cleaving enzyme, Asp2, or memapsin 2) (4–8) (Fig. 1A). A close homologue was also identified and termed as BACE-2, Asp1, DRAP, or memapsin 1 (4, 5, 9).² Both enzymes are type I membrane proteins sharing significant homology with other members of the aspartyl protease family (5–8). While BACE-2 is predominantly expressed in peripheral tissues, BACE is highly expressed in neurons, the major site of $A\beta$ generation. However, it appears that β APP is not the only substrate for BACE. In fact, mouse β APP is a very poor substrate for β -secretase activity (10). "Humanizing" the $A\beta$ domain of mouse β APP by three amino acid substitutions resulted in efficient cleavage by β -secretase (10), suggesting that β APP may not be the exclusive substrate for BACE. However, other physiological substrates of BACE remain to be identified.

BACE is cotranslationally modified by *N*-glycosylation and further matures by complex glycosylation as well as proteolytic removal of its prodomain by a furin-like protease (11–14). The majority of BACE molecules are localized within Golgi and endosomal compartments, where they colocalize with β APP (4, 5, 7, 12, 14). The acidic pH optimum of BACE (5–8) indicates that it is predominantly active within late Golgi compartments and/or endosomes/lysosomes. This is consistent with previous findings demonstrating that β -secretase cleavage of β APP can occur in all of these acidic compartments (15–18).

It has recently been reported that BACE is reinternalized from the cell surface to early endosomes and can recycle back to the cell surface, a process that depends on a dileucine motif in the cytoplasmic tail of BACE (14). This signal is located close to a negatively charged domain, which contains a potential phosphorylation site. We found that BACE is indeed phosphorylated within its C-terminal domain and that the biological function of BACE phosphorylation resides in the regulation of the retrieval of reinternalized BACE from endosomes.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Transfection—Human embryonic kidney (HEK) 293 and green monkey kidney COS-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with Glutamax (Life Technologies, Inc.) supplemented with 10% fetal calf serum (Life Technologies). The cell lines stably overexpressing β APP₆₉₅ (19) and BACE carrying Myc epitopes at the C terminus (12) have been described previously. Transfection of cells with BACE cDNAs was carried out using Fugene reagent (Roche Molecular Biochemicals) according to the supplier's instructions. Single

* This work was supported by Boehringer Ingelheim Inc. and the Deutsche Forschungsgemeinschaft. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 49 89 5996 471 or 49 89 5996 472; Fax: 49 89 5996 415; E-mail: jwalter@pbm.med.uni-muenchen.de.

|| To whom correspondence may be addressed. Tel.: 49 89 5996 471 or 49 89 5996 472; Fax: 49 89 5996 415; E-mail: chaass@pbm.med.uni-muenchen.de.

¹ The abbreviations used are: $A\beta$, amyloid β -peptide; BFA, brefeldin A; β APP, β -amyloid precursor protein; CK, casein kinase; CT, cytoplasmic tail; EEA1, early endosome antigen 1; GST, glutathione *S*-transferase; HD, hyphenaldisine; HEK, human embryonic kidney; PVDF, polyvinylidene difluoride; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; BACE, β -secretase; endo H, endoglycosidase H; PBS, phosphate-buffered saline; ER, endoplasmic reticulum; TGN, trans-Golgi network; WT, wild type; PNGase F, peptidase-N-glycanase F.

² For reasons of simplicity, we use the terms BACE and BACE-2 in this study.

cell clones were generated by selection in 200 $\mu\text{g/ml}$ zeocine (Invitrogen).

cDNAs and Fusion Proteins—The phosphorylation site mutants of BACE were generated by polymerase chain reaction techniques using the appropriate oligonucleotides. The resulting polymerase chain reaction fragments were subcloned into the *EcoRI/XhoI* restriction sites of pcDNA3.1 containing a zeocine resistance gene (Invitrogen). To generate fusion proteins of glutathione *S*-transferase and the cytoplasmic domain of BACE, the sequence of BACE encoding amino acids 476–501 was amplified by polymerase chain reaction using appropriate primers. The resulting fragments were subcloned into *EcoRI/XhoI* restriction sites of pGEX-5X-1 (Amersham Pharmacia Biotech), and fusion proteins were expressed in *Escherichia coli* DH5 α and purified on GSH-Sepharose according to the supplier's instructions.

Antibodies, Metabolic Labeling, Immunoprecipitation, and Immunoblotting—The polyclonal antibodies 7523, 7520, and GM190 recognizing the N terminus of BACE (amino acids 46–60), the C terminus (amino acids 482–501), and the propeptide (amino acids 22–45), respectively, have been described previously (12). Monoclonal α -giantin antibodies and monoclonal α - β APP antibodies were generously provided by Drs. H.-P. Hauri and E. H. Koo, respectively. Monoclonal α -EEA1 antibody was from Transduction Laboratories, and monoclonal antibody 9E10 developed by J. M. Bishop was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa).

To radiolabel cellular proteins, cells were incubated at 37 °C in methionine-free serum-free medium for 45 min. Cells were then incubated with the same medium supplemented with [³⁵S]methionine/[³⁵S]cysteine (Promix; Amersham Pharmacia Biotech) and kept at 37 °C for the times indicated in the respective experiments. For immunoprecipitations cells were lysed in buffer containing 1% Nonidet P-40 on ice for 10 min. Lysates were clarified by centrifugation for 10 min at 14,000 $\times g$ and immunoprecipitated for 3 h at 4 °C. After separation by SDS-PAGE, proteins were transferred to PVDF membrane (Imobilon; Millipore) and analyzed by autoradiography or phosphorimaging. Alternatively, BACE was detected by immunoblotting using the enhanced chemiluminescence technique (Amersham Pharmacia Biotech).

In Vivo Phosphorylation—HEK 293 cells were incubated 45 min in phosphate-free media (Sigma). Media were aspirated, and the respective fresh media were added containing 18 MBq/ml [³²P]orthophosphate (Amersham Pharmacia Biotech). After 1 h at 37 °C, cells were incubated for an additional 1 h in the presence or absence of protein kinase activators/inhibitors or the phosphatase inhibitor okadaic acid at the concentrations indicated in the respective experiments. To inhibit *N*-glycosylation, cells were treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ tunicamycin for 2 h prior to the addition of [³²P]orthophosphate and during the labeling period. After labeling, media were aspirated, and the cells were washed twice with ice-cold PBS and immediately lysed on ice with lysis buffer containing 1% Nonidet P-40 for 10 min. Cell lysates were centrifuged for 10 min at 14,000 $\times g$, and supernatants were immunoprecipitated with specific antibodies as indicated.

In Vitro Phosphorylation Assays—*In vitro* phosphorylation assays were carried out as described previously (20). Recombinant rat casein kinase (CK)-1 δ (New England Biolabs), recombinant α -subunit of human CK-2 (New England Biolabs), and the catalytic subunit of protein kinase A purified from bovine heart (gift from Dr. V. Kinzel) were used for *in vitro* phosphorylation assays in a buffer containing 20 mM Tris, pH 7.5, 5 mM magnesium acetate, 5 mM dithiothreitol. Protein kinase C purified from rat brain (Biomol) was assayed in a similar buffer supplemented with 1 μM phorbol 12,13-dibutyrate, 0.5 mM calcium chloride, and 100 $\mu\text{g/ml}$ phosphatidylserine under mixed micellar conditions. As substrates, fusion proteins of GST and the C terminus of BACE (see above) were used. Phosphorylation reactions were started by the addition of 10 μM [γ -³²P]ATP and allowed to proceed for 10 min at 32 °C. To control the kinase activities, parallel phosphorylation reactions were carried out using phosvitin (1 mg/ml; Sigma) or histone (0.5 mg/ml; Sigma) as protein substrates. Reactions were stopped by the addition of SDS sample buffer. Alternatively, cell extracts were used to phosphorylate fusion proteins of GST and BACE. HEK 293 cells were lysed in a buffer containing 20 mM Tris, pH 7.5, 5 mM magnesium acetate, 5 mM dithiothreitol, and 0.5% Triton X-100. Lysates were centrifuged for 10 min at 14,000 $\times g$, and fusion proteins of GST and BACE-CT were added to the supernatant. Phosphorylation reactions were started by the addition of [γ -³²P]ATP and allowed to proceed for 15 min in the presence or absence of 10 μM hymenialdisine (HD) and 1 μM okadaic acid. GST fusion proteins were isolated by precipitation with GSH-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) for 2 h at 4 °C. Precipitates were washed five times with PBS and eluted by the addition of SDS sample buffer and separated by SDS-gel electrophoresis.

Phosphoamino Acid Analysis—Phosphoamino acid analysis was carried out by one-dimensional high voltage electrophoresis according to Jelinek and Weber (21). Radiolabeled proteins, electrotransferred onto PVDF membrane were hydrolyzed in 6 M HCl for 90 min at 110 °C. Subsequently, supernatants were dried in a SpeedVac concentrator, and pellets were dissolved in 8 μl of pH 2.5 buffer (5.9% glacial acetic acid, 0.8% formic acid, 0.3% pyridine, 0.3 mM EDTA) and spotted onto 20 \times 20-cm cellulose thin layer chromatography plates (Merck) together with unlabeled phosphoamino acids (Ser(P), Thr(P), Tyr(P); 1 μg each; Sigma). High voltage electrophoresis was carried out for 45 min at 20 mA. Radiolabeled phosphoamino acids were localized by autoradiography and identified by comparison with comigrating phosphoamino acids after ninhydrine staining.

Deglycosylation Experiments—BACE was immunoprecipitated from cell lysates as described above, and precipitates were incubated in the presence of endoglycosidase H (endo H; Roche Molecular Biochemicals) or PNGase F (Roche Molecular Biochemicals) for 14 h at 37 °C in the appropriate buffer. Reactions were stopped by the addition of SDS sample buffer, and reaction mixtures were separated by SDS gel electrophoresis.

Immunocytochemistry—Cells stably expressing BACE cDNAs were grown on polylysine-coated glass coverslips to 50–80% confluence. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS at room temperature and processed for immunofluorescence as described previously (12). Bound primary antibodies were detected by Alexa 488- or Alexa 594-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). In some experiments, cells were incubated in the presence of 10 $\mu\text{g/ml}$ brefeldin A (BFA) for 30 min at 37 °C before fixation.

Antibody Uptake Assays—Cells grown on polylysine-coated glass coverslips were washed twice with ice-cold PBS and incubated for 20 min on ice in serum-free medium (Opti-MEM; Life Technologies, Inc.) containing the indicated antibodies. Cells were then washed three times with ice-cold PBS and subsequently incubated at 37 °C or 18 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium with Glutamax supplemented with 10% fetal calf serum for various time periods. After two washes with PBS, cells were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS and processed for immunofluorescence.

Cells were analyzed using a Leica DMRB fluorescence microscope, and photographs were taken with an RT monochrome spot camera (Diagnostic Instruments) and processed with Metaview program (Visitron Systems).

RESULTS

BACE Is Phosphorylated at Serine 498—To investigate whether BACE is posttranslationally modified by phosphorylation, we used HEK 293 cells stably overexpressing human BACE. HEK 293 cells were used previously to identify BACE in a functional screening assay and to analyze its proteolytic function (7). The same cell line was also used to successfully investigate the effects of the Swedish β APP mutation on β -secretase cleavage (16), thus demonstrating that HEK 293 cells represent a valid model system to study the cell biology of BACE.

After *in vivo* labeling with [³²P]orthophosphate, cell lysates were immunoprecipitated with antibody 7523 directed to an N-terminal sequence after the prodomain (Fig. 1A). Analysis of immunoprecipitated BACE by autoradiography revealed that BACE undergoes phosphorylation (Fig. 1B). Incorporation of [³²P]orthophosphate is dependent on the presence of the phosphatase inhibitor okadaic acid (Fig. 1B). However, longer exposure of the autoradiograms revealed weakly radiolabeled BACE also in the absence of okadaic acid (data not shown). To prove if BACE is phosphorylated within its cytoplasmic tail or within its ectodomain as previously demonstrated for its substrate β APP (22–24), we generated a truncated derivative lacking the cytoplasmic domain (BACE Δ C; Fig. 1A (12)). Although high levels of BACE Δ C were expressed, the deletion of the cytoplasmic tail of BACE completely abolished phosphorylation (Fig. 1B). A soluble derivative of BACE lacking the transmembrane domain (12) is also not phosphorylated by cultured cells (data not shown), further supporting the finding that the ectodomain of BACE is not phosphorylated. These results therefore demonstrate exclusive phosphorylation of BACE within its cytoplasmic tail.

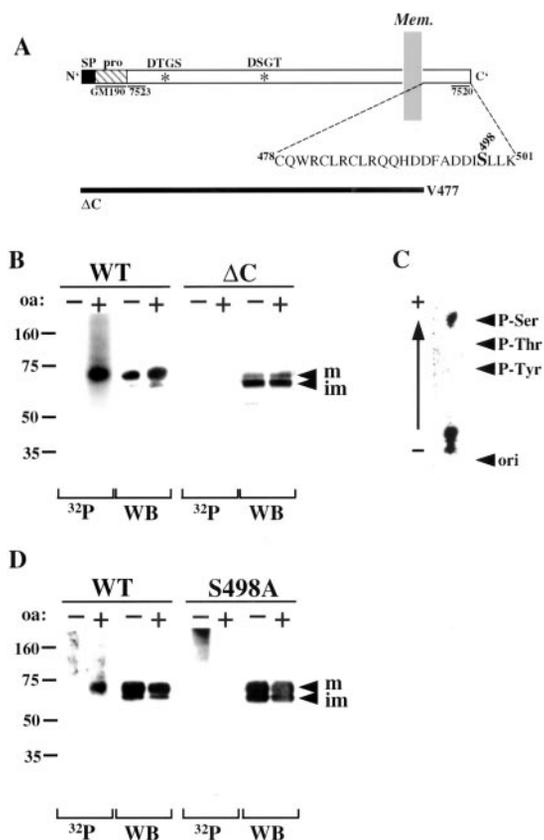


FIG. 1. Phosphorylation of BACE at serine residue 498 within the cytoplasmic domain. *A*, schematic of BACE. The aspartyl protease active site motifs (DTGS and DSGT) are indicated by asterisks. The signal peptide (SP) is indicated by a black box, and the propeptide (pro) is shown by a hatched box. The amino acid sequence of the cytoplasmic domain is given in single letter code, and the phosphorylation site (Ser⁴⁹⁸) is shown in boldface type. The epitopes of antibodies 7520, 7523, and GM190 are indicated. *B*, HEK cells stably expressing wild-type human BACE (WT) or a truncated derivative lacking the cytoplasmic domain (Δ C) were labeled with [³²P]orthophosphate in the presence or absence of 0.2 μ M okadaic acid (oa). BACE was isolated by immunoprecipitation, separated by SDS-PAGE, and transferred to a PVDF membrane. Radiolabeled proteins were visualized by phosphorimaging (³²P), and BACE was detected by Western immunoblot with antibody 7523 (WB). Mature (m) and immature (im) forms of BACE are indicated by arrowheads. *C*, phosphoamino acid analysis of radiolabeled BACE. The arrowheads indicate migrations of standard phosphoamino acids (P-Ser, P-Thr, P-Tyr) and origin of sample application (ori). *D*, phosphorylation of BACE WT and BACE S498A was analyzed as described for *B*. Substitution of Ser⁴⁹⁸ by Ala completely abolished phosphate incorporation.

Phosphoamino acid analysis of ³²P-labeled BACE revealed that it is phosphorylated on serine residues (Fig. 1C). The cytoplasmic domain of BACE contains a single serine residue at position 498 close to the C terminus (Fig. 1A). To confirm that serine 498 is indeed phosphorylated *in vivo*, we generated a cell line stably expressing BACE containing a serine to alanine substitution (BACE S498A). This mutation completely blocks phosphorylation of BACE, thus demonstrating that serine 498 is the sole *in vivo* phosphorylation site (Fig. 1D).

Phosphorylation Occurs Selectively after Full Maturation of BACE—The results shown in Fig. 1 indicate that selectively mature BACE (70 kDa) is phosphorylated but not the immature 66-kDa form of BACE. If that is the case, phosphorylated BACE should be resistant to endo H treatment (12, 14). To prove this, cells expressing BACE carrying a Myc tag at the C terminus (12) were labeled with [³²P]orthophosphate in the presence of okadaic acid, and BACE was isolated from cell lysates by immunoprecipitation with the α -Myc antibody 9E10. Immunoprecipitates were incubated *in vitro* in the presence or

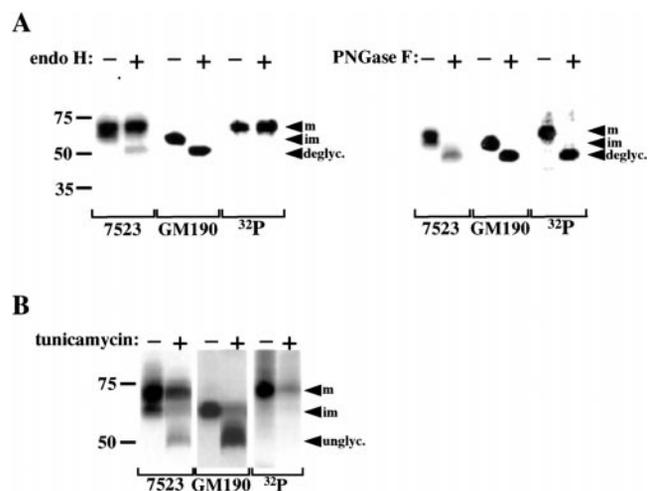


FIG. 2. Selective phosphorylation of mature BACE. *A*, cells stably expressing BACE WT were labeled with [³²P]orthophosphate in the presence of 0.2 μ M okadaic acid. BACE was isolated by immunoprecipitation and incubated in the presence (+) or absence (-) of endo H or PNGase F. Proteins were then separated by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. After detection of ³²P-phosphorylated BACE by phosphorimaging (³²P), membranes were subjected to immunoblotting with antibody 7523. To specifically detect immature forms of BACE, the same membrane was reprobed with antibody GM190 directed against the prodomain. The phosphorylated form of BACE is resistant to treatment with endo H, while it is sensitive to PNGase F. *B*, HEK cells were incubated with [³²P]orthophosphate in the presence of 0.2 μ M okadaic acid and in the presence or absence of tunicamycin. BACE was isolated by immunoprecipitation, separated by SDS-PAGE, and transferred to a PVDF membrane. The membrane was first subjected to autoradiography to visualize ³²P-labeled proteins (³²P) and then probed with antibody 7523 and with antibody GM190. Note that BACE is exclusively phosphorylated after full maturation by complex N-glycosylation and proteolytic removal of its prodomain.

absence of endo H or PNGase F and separated by SDS-PAGE. Immunoblot analysis with antibody 7523 revealed that endo H deglycosylated exclusively the immature 66-kDa form of BACE (Fig. 2A, left panel), consistent with the specificity of endo H for immature, biantennary or high mannose, N-linked glycans. We also identified the immature forms of BACE using antibody GM190 directed against the prodomain (12) and found that endo H selectively deglycosylates prodomain-containing immature forms of BACE (Fig. 2A, left panel). Autoradiography of the same membrane revealed that phosphorylated BACE is completely resistant to endo H treatment (Fig. 2A, left panel). In contrast to endo H, treatment with PNGase F, which removes all types of N-linked glycans, resulted in complete deglycosylation of both phosphorylated mature and unphosphorylated immature BACE as demonstrated by a significant molecular mass shift of ³²P-labeled BACE from 70 to 50 kDa (Fig. 2A, right panel). These results indicate that selectively fully mature BACE is phosphorylated. To confirm this in living cells, HEK 293 cells were labeled with [³²P]orthophosphate in the presence or absence of tunicamycin to inhibit cotranslational N-glycosylation. BACE was immunoprecipitated with the α -Myc antibody 9E10 and separated by SDS-PAGE. Consistent with previous results (12), tunicamycin treatment resulted in the accumulation of unglycosylated 50-kDa forms of BACE (Fig. 2B). Detection with antibody GM190 demonstrates accumulation of substantial levels of the unglycosylated prodomain-containing 50-kDa form of BACE after tunicamycin treatment (Fig. 2B). Autoradiography of the same membrane revealed that the unglycosylated form is not phosphorylated, in contrast to the fully mature BACE at 70 kDa (Fig. 2B). Taken together, these experiments demonstrate that phosphorylation of BACE occurs selectively after full maturation by removal of the prodomain and complex N-glycosylation.

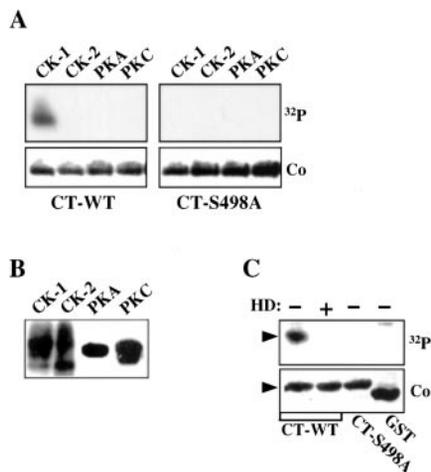


FIG. 3. Casein kinase-1 phosphorylates BACE. *A*, fusion proteins of GST carrying the WT (CT-WT; *left panels*) or the S498A mutant (CT-S498A; *right panels*) cytoplasmic domain of BACE were incubated with protein kinases CK-1, CK-2, A (PKA), and C (PKC) in the presence of [γ - 32 P]ATP. Reaction mixtures were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. Phosphorylated fusion proteins were detected by autoradiography (32 P). The same membrane was stained with Coomassie (Co) to control protein loading. *B*, the catalytic activities of CK-1 and CK-2 were assayed using 1 mg/ml phosvitin, and that of protein kinase A was assayed with 0.5 mg/ml histone. The activity of rat brain protein kinase C was controlled by detection of autophosphorylation. *C*, lysates of HEK 293 cells were incubated with fusion protein CT-WT and [γ - 32 P]ATP in the presence or absence of the CK-1-selective inhibitor hymenialdisine (HD). As controls, the fusion protein CT-S498A or GST alone were used as substrates. After the phosphorylation reaction, fusion proteins were precipitated with GSH-Sepharose and separated by SDS-PAGE. Phosphorylated fusion protein was detected by autoradiography (32 P). To prove equal loading, fusion proteins were stained with Coomassie (Co). The arrowheads indicate migration of GST fusion proteins. Hymenialdisine efficiently inhibits phosphorylation of CT-WT.

Casein Kinase 1 Phosphorylates BACE—To identify a protein kinase involved in phosphorylation of BACE, we first carried out *in vitro* phosphorylation assays using fusion proteins of GST with the cytoplasmic domain of BACE WT (CT-WT) or the S498A mutation (CT-S498A). The fusion proteins were incubated with four selected purified protein kinases in the presence of [γ - 32 P] ATP. Since the phosphorylation site of BACE is located within an acidic motif typical for substrate recognition by CKs (25) (see Fig. 1A), we used CK-1 and CK-2 in initial experiments. We also analyzed protein kinases A and C, since these enzymes have been shown to affect endoproteolytic processing of β APP (26–28). The fusion protein CT-WT was readily phosphorylated by CK-1, while CK-2, protein kinase A, and protein kinase C were not efficient (Fig. 3A, *left panel*), although all kinases were catalytically active under the assay conditions (Fig. 3B). CK-1-mediated phosphorylation of the cytoplasmic domain of BACE was completely abolished when CT-S498A was used as a substrate (Fig. 3A, *right panels*).

We next analyzed the involvement of CK-1 in the phosphorylation of BACE by cellular extracts. Lysates of HEK 293 cells were incubated with [γ - 32 P]ATP in the presence or absence of HD, which preferentially inhibits CK-1, glycogen synthase kinase 3 β , and cyclin-dependent kinases (29), using the fusion protein CT-WT as substrate. CT-WT was readily phosphorylated by the cellular extracts in the absence of HD (Fig. 3C). In contrast, phosphorylation was completely blocked by HD. As expected, the fusion protein CT-S498A and GST alone were not phosphorylated by cellular extracts (Fig. 3C).

Phosphorylation of the Cytoplasmic Domain Affects the Subcellular Localization of BACE—We next examined the subcellular localization of BACE in stably transfected HEK 293 cells. Cells grown on glass coverslips were fixed and costained with

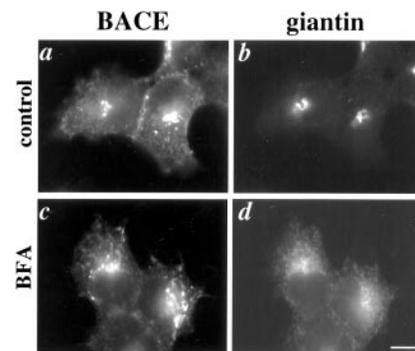


FIG. 4. Subcellular localization of BACE. HEK 293 cells stably transfected with cDNAs encoding BACE WT were grown on glass coverslips and incubated for 30 min at 37 °C in the presence (*c* and *d*) or absence (*a* and *b*) of brefeldin A (10 μ g/ml). Cells were fixed and costained with the polyclonal antibody 7523 (*a* and *c*) and the monoclonal anti-giantin antibody (*b* and *d*). Note the difference in the redistribution of BACE and giantin after BFA treatment. Bar, 10 μ m.

polyclonal antibody 7523 against BACE and with monoclonal antibody against giantin, a Golgi marker protein (30). BACE WT and giantin partially colocalize in juxtannuclear structures (Fig. 4, *a* and *b*). Consistent with previous results (4, 5, 7, 12, 14), additional staining was observed in juxtannuclear and vesicular structures that did not overlap with the Golgi marker giantin (Fig. 4, *a* and *b*). To prove whether this additional staining is due to localization of BACE in post-Golgi compartments, cells were treated with BFA for 30 min at 37 °C. BFA treatment is known to result in the fusion of Golgi compartments with the ER, while the trans-Golgi network (TGN) and other post-Golgi compartments fuse with endosomes to form vesicular/tubular structures (31). Treatment with BFA resulted in reticular staining of giantin, indicative for a redistribution of the Golgi marker protein giantin to the ER (Fig. 4d). In contrast, BACE was detected in juxtannuclear and peripheral vesicular structures after BFA treatment (Fig. 4c). These results indicate that BACE is not only localized in the ER and Golgi but also in post-Golgi compartments.

To examine if phosphorylation of BACE affects its accumulation in these compartments, we generated cDNA constructs encoding BACE derivatives in which serine residue 498 is substituted by alanine or by aspartate residues in order to mimic unphosphorylated or phosphorylated BACE molecules, respectively. HEK 293 cells stably expressing BACE WT, BACE S498D, or BACE S498A were permeabilized and costained with antibody 7523 and antibodies against giantin. As shown above (Fig. 4), BACE WT and giantin partially colocalize in juxtannuclear structures (Fig. 5, *a* and *b*). A very similar localization was observed for BACE S498D, which mimics phosphorylated BACE (Fig. 5, *c* and *d*). In contrast, nonphosphorylatable BACE S498A showed less juxtannuclear staining. Rather, BACE S498A accumulated in peripheral vesicular structures near the plasma membrane, particularly in cellular processes (Fig. 5e). Very similar data were obtained with independent cell clones and transiently transfected HEK 293 cells (data not shown). These data indicate that some aspects of subcellular sorting of BACE are affected by phosphorylation/dephosphorylation of serine residue 498.

To prove that the distinct staining pattern of the BACE mutants is not simply due to impaired maturation, we performed pulse-chase experiments. Immunoprecipitation with antibody 7520 against the C terminus of BACE demonstrate that the phosphorylation site mutants BACE S498A and BACE S498D mature with similar kinetics as the WT protein by complex *N*-glycosylation as indicated by the molecular mass shift from 66 to 70 kDa (Fig. 6A, *left panel*). To analyze proteo-

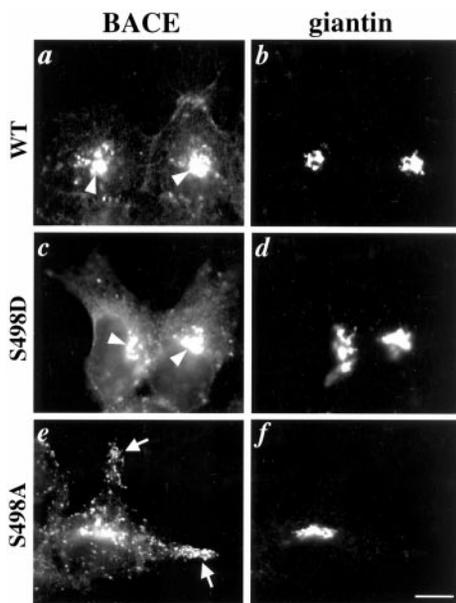


FIG. 5. Phosphorylation state-dependent subcellular localization of BACE. HEK 293 cells expressing BACE WT (*a* and *b*), the mutant derivatives BACE S498D (*c* and *d*), or BACE S498A (*e* and *f*) were grown on glass coverslips and then processed for immunocytochemistry. After fixation, cells were costained with polyclonal antibodies 7523 against BACE (*a*, *c*, and *e*) and monoclonal antibodies against giantin (*b*, *d*, and *f*). Note that BACE WT and BACE S498D showed similar subcellular distribution predominantly in juxtannuclear compartments (arrowheads) and partial colocalization with giantin. In contrast, BACE S498A revealed more vesicular staining in the periphery of the cell (arrows). Bar, 10 μ m.

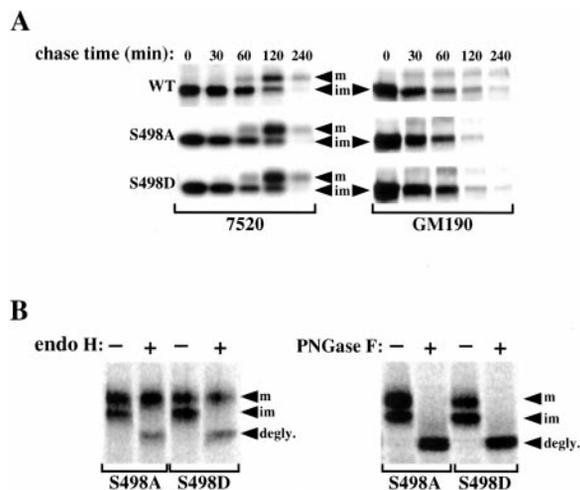


FIG. 6. Substitution of serine residue 498 does not affect maturation of BACE. *A*, pulse-chase experiments with cells expressing BACE WT, S498A, and S498D. Cells stably expressing the respective cDNAs were pulse-labeled for 10 min with [35 S]methionine and chased in the presence of excess amounts of unlabeled methionine for the time points indicated. BACE was immunoprecipitated with antibody 7520 (*left panel*) or with antibody GM190 (*right panel*) and detected by autoradiography. *B*, BACE S498A and S498D were isolated by immunoprecipitation from cells labeled with [35 S]methionine and incubated in the presence or absence of endo H or PNGase F. After separation by SDS-PAGE, radiolabeled proteins were detected by autoradiography.

lytic cleavage of the prodomain of BACE, cell lysates were immunoprecipitated with antibody GM190 directed against the prodomain. Similar to our previous results (12), the prodomain is predominantly observed in the immature 66-kDa BACE species (Fig. 6A, *right panel*). The gradual disappearance of prodomain-containing forms indicates efficient maturation of BACE S498A and BACE S498D similar to BACE WT (Fig. 6A, *right panel*). Moreover, the mature 70-kDa forms of mutant BACE

S498A and S498D are both resistant to endo H cleavage, while PNGase F efficiently deglycosylated the 70- and 66-kDa forms (Fig. 6B). These data demonstrate that the mutations in the cytoplasmic domain of BACE do not interfere with maturation by complex *N*-glycosylation, indicating unimpaired forward transport to late Golgi compartments and beyond. Therefore, the altered subcellular localization of the nonphosphorylated mutant BACE S498A is not due to impaired maturation.

Phosphorylation Regulates Retrieval of BACE from Endocytosed Vesicles—Recently, it was reported that cell surface-located BACE is internalized into endosomes (14). We therefore first investigated whether phosphorylation of BACE might regulate its reinternalization from the cell surface. HEK 293 cells stably expressing BACE WT or the phosphorylation site mutant BACE S498A or BACE S498D were incubated for 20 min on ice with antibody 7523 directed toward the ectodomain of BACE. After removal of nonspecifically bound antibodies, cells were returned to 37 $^{\circ}$ C for the time points indicated and processed for immunocytochemistry. At time point 0 min, cells expressing BACE WT or the S498D or S498A variants revealed strong staining of the cell surface (Fig. 7, *a*, *e*, and *i*). In contrast, untransfected HEK 293 cells were not labeled by antibody 7523, demonstrating specific detection of exogenous BACE at the cell surface (Fig. 7*n*). Staining of cells after 30 min at 37 $^{\circ}$ C revealed that all BACE variants are efficiently internalized from the cell surface (Fig. 7, *b*, *f*, and *k*). Again, untransfected cells were not stained, demonstrating that antibodies were not internalized by fluid phase endocytosis (Fig. 7*o*). Staining cells after 1 and 2 h at 37 $^{\circ}$ C revealed significant differences in the subcellular localization of internalized BACE S498A as compared with BACE WT and BACE S498D. Cells expressing BACE WT or the BACE S498D mutant that mimics phosphorylated BACE revealed intensive juxtannuclear localization indicative for late endosomal compartments and/or TGN (Fig. 7, *b–d* and *f–h*). In contrast, the nonphosphorylated mutant S498A showed predominant localization in vesicles near the plasma membrane, which occasionally appeared to accumulate in cellular processes (Fig. 7, *k–m*).

To identify the subcellular compartment to which BACE is targeted after internalization from the cell surface, we performed antibody uptake assays as described above. To detect early endosomes, cells were costained with monoclonal antibodies recognizing the early endosome antigen 1 (EEA1) (32). Staining of cells after 15 min showed internalization of BACE into some EEA1-positive compartments. No significant differences in the staining pattern between BACE WT and the phosphorylation site mutants (S498A and S498D) were detected at this time point, demonstrating that internalized BACE is targeted to early endosomal compartments independent of its phosphorylation state (Fig. 8, *a–f*). After 30 min, internalized BACE WT and BACE S498D were efficiently targeted to juxtannuclear structures (as described above; Fig. 8), showing less colocalization with the EEA1-positive compartments (Fig. 8, *g–k*). In contrast, the nonphosphorylated mutant BACE S498A showed less pronounced accumulation in juxtannuclear structures (as described above) but appeared to be retained at least partially in EEA1 positive endosomal compartments (Fig. 8, *l* and *m*).

We next sought to identify the cellular trafficking step of BACE, which is regulated by its phosphorylation. It was shown previously that incubation of cells at 18 $^{\circ}$ C inhibits both forward transport from the ER to Golgi and retrograde transport from endocytosed vesicles to late endosomal compartments and the TGN but allows endocytosis (33, 34). Cells were incubated with antibody 7523 on ice as described above. After washing, the cells were returned to 37 or 18 $^{\circ}$ C and incubated for an

FIG. 7. Phosphorylation regulates intracellular trafficking of BACE. HEK 293 cells stably expressing BACE WT (*a–d*), BACE S498D (*e–h*), or BACE S498A (*i–m*) or untransfected cells (*n* and *o*) were incubated for 20 min with antibody 7523 on ice. Cells were washed and incubated at 37 °C for the time points indicated. Internalized antibodies 7523 were detected by Alexa 488-labeled anti-rabbit secondary antibody. *Bar*, 25 μ m.

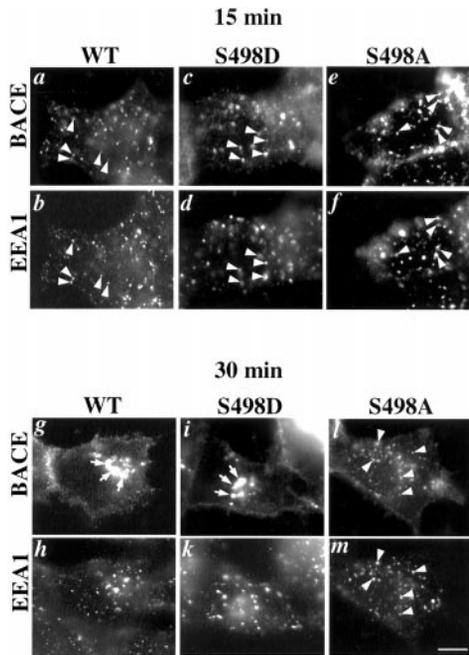
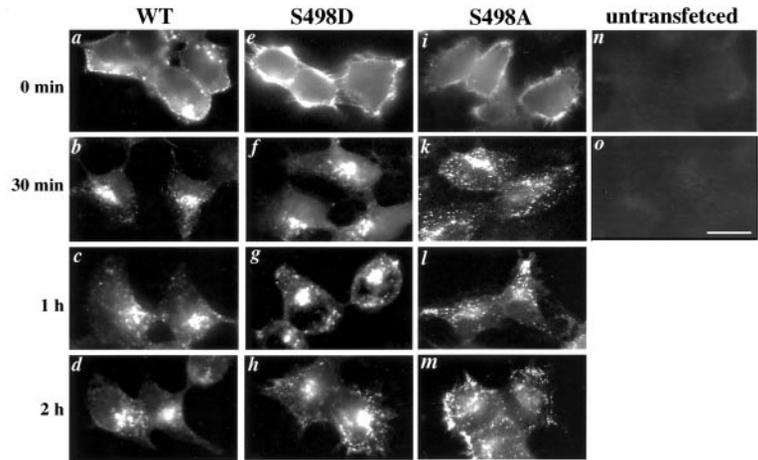


FIG. 8. BACE is internalized from the cell surface into EEA1 positive early endosomes. HEK 293 cells stably expressing BACE WT (*a, b, g, and h*), BACE S498D (*c, d, i, and k*), or BACE S498A (*e, f, l, and m*) were incubated for 20 min with antibody 7523 on ice. Cells were washed and incubated at 37 °C for 15 min (*a–f*) or 30 min (*g–m*) before fixation. Internalized antibodies 7523 were detected by Alexa 488-labeled anti-rabbit secondary antibody (*a, c, e, g, i, and l*), and early endosomal compartments were detected with monoclonal antibodies against EEA1 (*b, d, f, h, k, and m*). Colocalization of BACE and EEA1 in early endosomal compartments is indicated by arrowheads (*a–f, l, and m*), while juxtannuclear structures containing BACE WT (*g*) or BACE S498D (*i*) are indicated by *arrows*. *Bar*, 10 μ m.

additional 1 h. Internalized BACE was then detected with fluorescence-labeled secondary antibody. After incubation at 37 °C, the above-described differences in the subcellular localization of BACE WT, BACE S498D, and BACE S498A were observed. While BACE WT and BACE S498D accumulated in juxtannuclear compartments, BACE S498A was predominantly localized in peripheral endocytosed vesicles (Fig. 9, *a, c, and e*), identified as early endosomes (see Fig. 8). Costaining of these cells with the monoclonal antibodies IG7/5A3 against β APP (35) revealed that internalized BACE WT and S498D partially colocalized with its protein substrate β APP in juxtannuclear structures, while internalized BACE S498A showed less colocalization with β APP (Fig. 9, *a–f*).

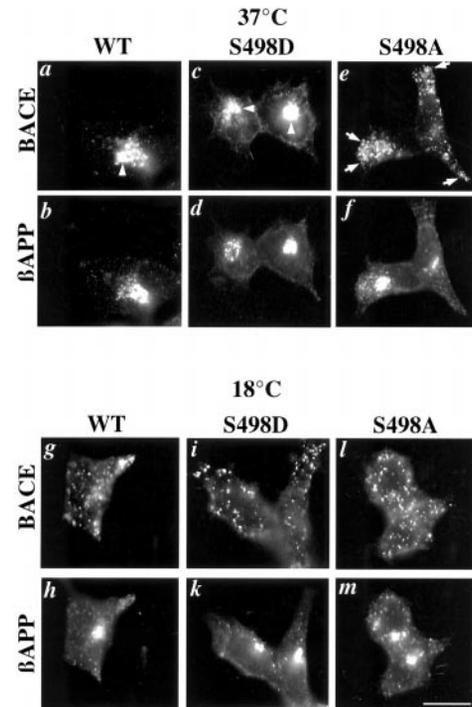


FIG. 9. Phosphorylation-dependent retrieval of BACE from endocytosed vesicles. HEK 293 cells stably expressing BACE WT (*a, b, g, and h*), BACE S498D (*c, d, i, and k*), or BACE S498A (*e, f, l, and m*) were incubated for 20 min with antibody 7523 on ice. Cells were washed and incubated at 37 °C (*a–f*) or 18 °C (*g–m*) for an additional 1 h. Cells were fixed, and internalized antibodies were visualized with Alexa 488-labeled anti-rabbit secondary antibody. β APP was detected with monoclonal antibodies IG7/5A3 and Alexa 594-labeled anti-mouse secondary antibody. The *arrowheads* indicate juxtannuclear localization of BACE WT and BACE S498D (*a* and *c*), and the *arrows* indicate localization of BACE S498A in peripheral vesicles (*e*). *Bar*, 25 μ m.

When cells were incubated at 18 °C, all variants of BACE were readily internalized, but, in contrast to incubation at 37 °C, transport of reinternalized BACE WT and BACE S498D to juxtannuclear structures was inhibited (Fig. 9, *g* and *i*). Rather, at 18 °C all variants of BACE accumulated in peripheral vesicles, and BACE WT and S498D showed a very similar localization as the nonphosphorylated S498A variant of BACE (Fig. 9, *g, i, and l*). Costaining of these cells with β APP antibodies demonstrates that localization of β APP in juxtannuclear structures was not impaired under these experimental conditions (Fig. 9, *g–m*).

DISCUSSION

In this study, we analyzed the subcellular trafficking of BACE dependent on its phosphorylation state. A single phosphorylation site was identified by mutagenesis of serine residue 498 in the C-terminal domain of BACE (Fig. 1A). By testing several protein kinases *in vitro*, we found that CK-1 can phosphorylate BACE at the *in vivo* phosphorylation site at serine residue 498. HD, which preferentially inhibits CK-1 beside glycogen synthase kinase 3 β and cyclin-dependent kinases (29), significantly reduced phosphorylation of the cytoplasmic domain of BACE in cellular extracts. The phosphorylation site identified at serine residue 498 is preceded by a stretch of acidic amino acid residues (Fig. 1A) representing a canonical recognition motif for CK-1, but not for glycogen synthase kinase 3 β or cyclin-dependent kinases. Taken together, these data indicate that CK-1 or a CK-1-like kinase is involved in the phosphorylation of BACE *in vivo*. Phosphorylation occurs exclusively on the fully matured BACE after propeptide removal and complex *N*-glycosylation. This indicates that phosphorylation of BACE takes place selectively after its exit from the ER, presumably in Golgi or post-Golgi compartments. CK-1 occurs in several isoforms, and some have been shown to be associated with the plasma membrane and synaptic vesicles and to selectively phosphorylate a subset of membrane proteins (36). CK-1 is implicated in the regulation of vesicular trafficking in yeast presumably by phosphorylating components of clathrin adaptor proteins (37, 38). Our data suggest that a CK-1 isoform with a particular subcellular distribution (*i.e.* in late Golgi and/or endosomal compartments) might be responsible for the highly selective phosphorylation of mature BACE. It has been reported that CK-1 is significantly elevated in Alzheimer's disease brains (39, 40). Moreover, A β has been shown to activate CK-1 *in vitro* (41). However, it remains to be determined if phosphorylation of BACE is altered during pathogenesis of Alzheimer's disease.

In order to investigate the cellular function of phosphorylation/dephosphorylation on the trafficking of BACE, we generated mutants in which the phosphorylation site at serine residue 498 has been substituted by an alanine or an aspartate residue to mimic nonphosphorylated and phosphorylated forms of BACE, respectively. The major advantage of this strategy is to circumvent the use of agents modulating kinase or phosphatase activities that might cause nonspecific or indirect effects (42, 43). BACE carrying the S498D substitution was predominantly localized in juxtannuclear compartments, where it partially colocalizes with the Golgi marker protein giantin. A very similar distribution was observed for BACE WT, which is consistent with previous results (7, 12, 14). In contrast, the non-phosphorylated form BACE S498A showed less localization in juxtannuclear structures but pronounced localization in vesicular compartments including EEA1 positive early endosomes. It was demonstrated previously that the complete deletion of the cytoplasmic domain of BACE results in its retention within the ER and in impaired maturation (12). However, the phosphorylation site mutants BACE S498A and BACE S498D mature normally by complex *N*-glycosylation and proteolytic removal of the prodomain as compared with BACE WT. Therefore, the significant differences in subcellular localization of the mutant variants of BACE are due to distinct sorting. Consistent with previous results (12, 14), we found that BACE is transported to the cell surface and that BACE is internalized into EEA1-positive early endosomal compartments. BACE WT as well as the mutant derivatives S498A and S498D were efficiently endocytosed, indicating that phosphorylation of BACE does not determine its reinternalization from the cell surface. Rather, we found that phosphorylation of BACE is functionally re-

quired for efficient retrieval of the enzyme from early endosomes to later endosomal and/or TGN compartments from which BACE might be recycled into the secretory pathway.

Interestingly, phosphorylation of reinternalized BACE affected its colocalization with its protein substrate β APP in juxtannuclear structures. However, overexpressing BACE WT or the phosphorylation site mutants led to increased secretion of A β as compared with untransfected control cell lines (data not shown). This may reflect that expression of exogenous BACE leads to saturated levels of A β generation, regardless of the differences in subcellular localization of the BACE variants. Indeed, previous studies demonstrated that β APP could be cleaved by β -secretase activity in distinct compartments, including endosomes and late Golgi compartments (16, 17, 44). We also demonstrate that reinternalization of BACE was not affected by the S498A or S498D mutation. In addition, all variants of BACE undergo normal maturation by complex *N*-glycosylation. These data indicate that at least two major sites of β -secretase activity, endosomes and secretory vesicles, can be reached by BACE independent of its phosphorylation state. However, it might be possible that regulation of subcellular trafficking of endogenously expressed BACE by phosphorylation affects proteolytic processing of other, yet unknown, protein substrates. In addition, we cannot yet exclude the possibility that phosphorylation may have subtle effects on β APP processing.

The regulatory mechanism of subcellular trafficking of BACE is highly reminiscent to that of furin. Retrieval of furin from endosomal to TGN compartments was also shown to be dependent on phosphorylation/dephosphorylation of its cytoplasmic domain (45). Therefore, the subcellular localization of BACE is regulated in a remarkably similar fashion like furin, a protease that has recently been demonstrated to be required for propeptide cleavage of BACE (11–13).

Acknowledgments—We are grateful to Drs. H.-P. Hauri for anti-giantin and E. H. Koo for anti- β APP antibodies and to Dr. V. Kinzel for purified protein kinase A. We thank Drs. L. Meijer and G. Pettit for hymenialdisine. We also thank Drs. M. Sastre and H. Steiner for helpful discussions and critically reading the manuscript and L. Meyn for expert technical assistance.

REFERENCES

- Selkoe, D. J. (1999) *Nature* **399**, A23–A31
- Haass, C., and Selkoe, D. J. (1993) *Cell* **75**, 1039–1042
- Haass, C., and De Strooper, B. (1999) *Science* **286**, 916–919
- 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., Smith, T. S., Simmons, D. L., Walsh, F. S., Dingwall, C., and Christie, G. (1999) *Mol. Cell Neurosci.* **14**, 419–427
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1456–1460
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaar, S. M., Wang, S., Walker, D., John, V., et al. (1999) *Nature* **402**, 537–540
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. (1999) *Science* **286**, 735–741
- 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., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrichson, R. L., and Gurney, M. E. (1999) *Nature* **402**, 533–537
- Acquati, F., Accarino, M., Nucci, C., Fumagalli, P., Jovine, L., Ottolenghi, S., and Taramelli, R. (2000) *FEBS Lett.* **468**, 59–64
- De Strooper, B., Simons, M., Multhaup, G., Van Leuven, F., Beyreuther, K., and Dotti, C. G. (1995) *EMBO J.* **14**, 4932–4938
- Bennett, B. D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D. B., Kahn, S., Louis, J. C., Citron, M., and Vassar, R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 37712–37717
- Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 30849–30854
- Creemers, J. W., Dominguez, D. I., Plets, E., Serneels, L., Taylor, N. A., Multhaup, G., Craessaerts, K., Annaert, W., and De Strooper, B. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 4211–4217

14. Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M., and Doms, R. W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 33729–33737
15. Haass, C., Koo, E. H., Mellon, A., Hung, A. Y., and Selkoe, D. J. (1992) *Nature* **357**, 500–503
16. Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., and Selkoe, D. J. (1995) *Nat. Med.* **1**, 1291–1296
17. Koo, E. H., and Squazzo, S. L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 17386–17389
18. Koo, E. H., Squazzo, S. L., Selkoe, D. J., and Koo, C. H. (1996) *J. Cell Sci.* **109**, 991–998
19. Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1992) *Nature* **359**, 322–325
20. Walter, J., Grunberg, J., Schindzielorz, A., and Haass, C. (1998) *Biochemistry* **37**, 5961–5967
21. Jelinek, T., and Weber, M. J. (1993) *BioTechniques* **15**, 628–630
22. Hung, A. Y., and Selkoe, D. J. (1994) *EMBO J.* **13**, 534–542
23. Walter, J., Schindzielorz, A., Hartung, B., and Haass, C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 23523–23529
24. Walter, J., Capell, A., Hung, A. Y., Langen, H., Schnolzer, M., Thinakaran, G., Sisodia, S. S., Selkoe, D. J., and Haass, C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 1896–1903
25. Pearson, R. B., and Kemp, B. E. (1991) *Methods Enzymol.* **200**, 62–81
26. Buxbaum, J. D., Koo, E. H., and Greengard, P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9195–9198
27. Hung, A. Y., Haass, C., Nitsch, R. M., Qiu, W. Q., Citron, M., Wurtman, R. J., Growdon, J. H., and Selkoe, D. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22959–22962
28. Nitsch, R. M., Slack, B. E., Wurtman, R. J., and Growdon, J. H. (1992) *Science* **258**, 304–307
29. Meijer, L., Thunnissen, A. M., White, A. W., Garnier, M., Nikolic, M., Tsai, L. H., Walter, J., Cleverley, K. E., Salinas, P. C., Wu, Y. Z., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Kim, S. H., and Pettit, G. R. (2000) *Chem. Biol.* **7**, 51–63
30. Linstedt, A. D., and Hauri, H. P. (1993) *Mol. Biol. Cell* **4**, 679–693
31. Klausner, R. D., Donaldson, J. G., and Lippincott-Schwartz, J. (1992) *J. Cell Biol.* **116**, 1071–1080
32. Mu, F. T., Callaghan, J. M., Steele-Mortimer, O., Stenmark, H., Parton, R. G., Campbell, P. L., McCluskey, J., Yeo, J. P., Tock, E. P., and Toh, B. H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13503–13511
33. Matlin, K. S., and Simons, K. (1983) *Cell* **34**, 233–243
34. Ludwig, T., Griffiths, G., and Hoflack, B. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 1561–1572
35. Haass, C., Koo, E. H., Capell, A., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1995) *J. Cell Biol.* **128**, 537–547
36. Gross, S. D., and Anderson, R. A. (1998) *Cell Signal.* **10**, 699–711
37. Faundez, V. V., and Kelly, R. B. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 2591–2604
38. Panek, H. R., Stepp, J. D., Engle, H. M., Marks, K. M., Tan, P. K., Lemmon, S. K., and Robinson, L. C. (1997) *EMBO J.* **16**, 4194–4204
39. Schwab, C., DeMaggio, A. J., Ghoshal, N., Binder, L. I., Kuret, J., and McGeer, P. L. (2000) *Neurobiol. Aging* **21**, 503–510
40. Yasojima, K., Kuret, J., DeMaggio, A. J., McGeer, E., and McGeer, P. L. (2000) *Brain Res.* **865**, 116–120
41. Chauhan, A., Chauhan, V. P., Murakami, N., Brockerhoff, H., and Wisniewski, H. M. (1993) *Brain Res.* **629**, 47–52
42. Egelhoff, T. T., Lee, R. J., and Spudich, J. A. (1993) *Cell* **75**, 363–371
43. Walter, J., Schindzielorz, A., Grunberg, J., and Haass, C. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1391–1396
44. Lo, A. C., Haass, C., Wagner, S. L., Teplow, D. B., and Sisodia, S. S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 30966–30973
45. Molloy, S. S., Thomas, L., Kamibayashi, C., Mumby, M. C., and Thomas, G. (1998) *J. Cell Biol.* **142**, 1399–1411

A non-amyloidogenic function of BACE-2 in the secretory pathway

Regina Fluhner,* Anja Capell,* Gil Westmeyer,* Michael Willem,* Bianka Hartung,* Margaret M. Condrón,† David B. Teplow,† Christian Haass* and Jochen Walter*‡

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

†Department of Neurology, Harvard Medical School, and Center for Neurologic Diseases, Brigham and Woman's Hospital, Boston, Massachusetts, USA

‡Department of Neurology, University of Bonn, Bonn, Germany

Abstract

β -Site amyloid precursor protein cleavage enzyme (BACE)-1 and BACE-2 are members of a novel family of membrane-bound aspartyl proteases. While BACE-1 is known to cleave β -amyloid precursor protein (β APP) at the β -secretase site and to be required for the generation of amyloid β -peptide ($A\beta$), the role of its homologue BACE-2 in amyloidogenesis is less clear. We now demonstrate that BACE-1 and BACE-2 have distinct specificities in cleavage of β APP in cultured cells. Radiosequencing of the membrane-bound C-terminal cleavage product revealed that BACE-2 cleaves β APP in the middle of the $A\beta$ domain between phenylalanines 19 and 20, resulting in increased secretion of APPs- α - and p3-like prod-

ucts and reduced production of $A\beta$ species. This cleavage can occur in the Golgi and later secretory compartments. We also demonstrate that BACE-1-mediated cleavage of β APP at Asp1 of the $A\beta$ domain can occur as early as in the endoplasmic reticulum, while cleavage at Glu11 occurs in later compartments. These data indicate that the distinct specificities of BACE-1 and BACE-2 in their cleavage of β APP differentially affect the generation of $A\beta$.

Keywords: Alzheimer's disease, β -amyloid precursor protein, β -secretase, β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme.

J. Neurochem. (2002) **81**, 1011–1020.

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the invariant accumulation of senile plaques and neurofibrillary tangles in certain areas of the brains of AD patients (Selkoe 1999). The major constituent of senile plaques is the amyloid β -peptide ($A\beta$), which derives by endoproteolytic processing of the β -amyloid precursor protein (β APP; Steiner and Haass, 2000).

$A\beta$ is generated by sequential cleavages of β APP by β - and γ -secretase. β -Secretase cleaves β APP at the N terminus of the $A\beta$ -domain, resulting in the generation of soluble APPs- β and a membrane-associated C-terminal fragment (CTF) bearing the complete $A\beta$ -domain (CTF- β). Subsequent cleavage of this fragment by γ -secretase, which critically requires presenilins, results in the release and secretion of $A\beta$ (Steiner and Haass, 2000). In an alternative pathway, β APP is cleaved by α -secretase within the $A\beta$ domain, therefore precluding the formation of $A\beta$ (Steiner and Haass, 2000).

α -Secretase cleavage results in the secretion of APPs- α and the generation of CTF- α , which can also be processed further

Received January 18, 2002; revised manuscript received February 18, 2002; accepted February 18, 2002.

Address correspondence and reprint requests to Dr Jochen Walter, Department of Neurology, Laboratory for Molecular Neurology, University of Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn, Germany or Dr Christian Haass, Adolf-Butenandt-Institute, Laboratory for Alzheimer's Disease Research, Ludwig-Maximilians-University-Munich, Department of Biochemistry, Schillerstrasse 44, 80336 Munich, Germany. E-mail: jwalter@pbm.med.uni-muenchen.de or chaass@pbm.med.uni-muenchen.de

Abbreviations used: APP, amyloid precursor protein; $A\beta$, amyloid β -peptide; AD, Alzheimer's disease; BACE, β -site APP cleaving enzyme; BFA, brefeldin A; endo, H, endoglycosidase H; HEK, human embryonic kidney; PNGase F, peptide-N-glycosidase F; PVDF, polyvinylidene difluoride; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

by γ -secretase to yield p3 (Haass *et al.* 1993; Steiner and Haass, 2000).

The membrane-bound aspartyl protease beta-site APP-cleaving enzyme (BACE)-1 with β -secretase activity was identified in human embryonic kidney (HEK) 293 cells and brain tissue (Hussain *et al.* 1999; Sinha *et al.* 1999; Vassar *et al.* 1999; Yan *et al.* 1999; Lin *et al.* 2000). BACE-1 and its homologue BACE-2 are type I membrane proteins sharing significant homology with other members of the aspartyl protease family (Fan *et al.* 1999; Hussain *et al.* 1999; Saunders *et al.* 1999; Sinha *et al.* 1999; Vassar *et al.* 1999; Yan *et al.* 1999; Acquati *et al.* 2000; Lin *et al.* 2000). While BACE-1 is highly expressed in neurons, BACE-2 expression is low in the central nervous system, but higher in peripheral tissues including pancreas, placenta and stomach (Bennett *et al.* 2000a; Vassar and Citron, 2000). BACE-1 appears to be the major enzyme in amyloidogenesis in brain, because BACE-1^{-/-} mice have greatly reduced brain A β levels (Cai *et al.* 2001; Luo *et al.* 2001; Roberds *et al.* 2001). Moreover, antisense inhibition of BACE-1, but not of BACE-2, reduces the generation of A β in cultured cells (Vassar *et al.* 1999; Yan *et al.* 1999).

Consistent with the highly similar structural features of BACE-1 and BACE-2, both enzymes undergo similar post-translational modifications by complex *N*-glycosylation and proteolytic removal of their prodomains (Vassar and Citron, 2000; Walter *et al.* 2001a). However, while propeptide cleavage of BACE-1 is mediated by proteases of the furin family or by furin itself (Bennett *et al.* 2000b; Capell *et al.* 2000; Huse *et al.* 2000; Creemers *et al.* 2001), the propeptide of BACE-2 appears to be removed autocatalytically (Hussain *et al.* 2001; Yan *et al.* 2001a).

The majority of BACE-1 is localized within Golgi and endosomal compartments, where it co-localizes with β APP (Hussain *et al.* 1999; Vassar *et al.* 1999; Capell *et al.* 2000; Huse *et al.* 2000; Lin *et al.* 2000; Walter *et al.* 2001b). The subcellular localization is consistent with the acidic pH optimum of the enzyme and the known subcellular sites of β APP processing by β -secretase (Vassar and Citron, 2000; Walter *et al.* 2001a). The intracellular trafficking of BACE-1 is regulated by a di-leucine motif within its cytoplasmic domain and by phosphorylation/dephosphorylation of an adjacent serine residue (Huse *et al.* 2000; Walter *et al.* 2001b). In addition, the transmembrane domain of BACE-1 plays a role for its retention in the trans-Golgi network (Yan *et al.* 2001b).

While the catalytic activity of BACE-1 in cultured cells is well understood (Hussain *et al.* 1999; Sinha *et al.* 1999; Vassar *et al.* 1999; Yan *et al.* 1999; Lin *et al.* 2000), the role of BACE-2 in amyloidogenesis is less clear. Studies *in vitro* (Farzan *et al.* 2000; Hussain *et al.* 2000; Lin *et al.* 2000) and with transiently transfected cells (Yan *et al.* 2001a) indicate that BACE-2 cleaves β APP much less efficiently at the known β -secretase sites as compared with BACE-1.

Materials and methods

Cell culture, cDNAs and transfection

HEK 293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with Glutamax (DMEM; Gibco Life Sciences, Karlsruhe, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco Life Sciences). The cell lines stably overexpressing β APP₆₉₅ (Haass *et al.* 1992) and BACE-1 (Capell *et al.* 2000; Walter *et al.* 2001b) have been described previously. BACE-2 cDNA was provided by Dr R. Tamarelli (Acquati *et al.* 2000) and was subcloned into the *Apal/HindIII* sites of pcDNA3.1 hygro (-) expression vector (Invitrogen, Groningen, the Netherlands). Transfection of cells with BACE-2 cDNAs was carried out using Fugene reagent (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) according to the supplier's instructions. Single-cell clones were generated by selection in 100 μ g/mL hygromycin (Invitrogen).

Antibodies, metabolic labeling, immunoprecipitation and immunoblotting

The polyclonal antibodies 7524 and 7525 were obtained from rabbits, which were inoculated with synthetic peptide representing amino acids 492–518 of BACE-2 coupled to keyhole limpet hemocyanin. Antibody 7520, directed against the C-terminus of BACE-1 (Capell *et al.* 2000; Walter *et al.* 2001) and antibody 3926 against A β (Wild-Bode *et al.* 1997), has been described previously. Antibodies 1736 and 192wt were provided by Drs D. J. Selkoe (Haass *et al.* 1992) and D. Schenk (Seubert *et al.* 1993), respectively, and 6E10 was obtained from Senetek Inc (Napa, CA, USA).

To radiolabel cellular proteins, cells were incubated at 37°C in methionine-free, serum-free MEM (Gibco Life Sciences) for 60 min. Cells were then incubated with fresh medium supplemented with [³⁵S]methionine/[³⁵S]cysteine (Promix; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) and kept at 37°C for the time periods indicated in the respective experiment. The secretion of β APP variants in pulse–chase experiments was calculated by setting the amount of cellular radiolabeled β APP after the pulse as 100%. In some experiments, brefeldin A (BFA) or monensin was added during the preincubation and the labeling period. As a control, cells were incubated with the carrier (ethanol) alone.

For immunoprecipitations cells were lysed in STEN buffer (50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) supplemented with 1% nonidet P-40 (NP-40)/1% Triton X-100/2% bovine serum albumin (BSA) on ice for 10 min. Lysates were clarified by centrifugation for 20 min at 14 000 g and immunoprecipitated for 3 h at 4°C. After separation by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE), proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Imobilon, Millipore Corporation, Eschborn, Germany) and analyzed by autoradiography or phosphoimaging. Alternatively, proteins were detected by immunoblotting using an enhanced chemiluminescence technique (Amersham Pharmacia Biotech).

Radiosequencing

Cells were labeled with [³H]valine or [³H]phenylalanine for 6 h and β APP CTFs were isolated by immunoprecipitation with antibody 6687, separated by SDS–PAGE and transferred to PVDF membrane. Radiolabeled proteins were detected by autoradiography, and

subjected to radiosequencing as described previously (Haass *et al.* 1992).

Deglycosylation experiments

BACE-1 and BACE-2 were immunoprecipitated from cell lysates as described above and precipitates were incubated in the presence of endoglycosidase H (endo H; Roche Molecular Biochemicals) or PNGase F (Roche Molecular Biochemicals) for 14 h at 37°C in the appropriate buffer. Reactions were stopped by the addition of SDS sample buffer and reaction mixtures were separated by SDS-PAGE.

Cell surface biotinylation and uptake assay

Cells were washed three times with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and incubated on ice with PBS containing 0.5 mg/mL EZ-link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce, Bonn, Germany) for 30 min. Cells were then washed three times with ice-cold PBS supplemented with 20 mM glycine for 5 min each and finally washed twice with PBS. To allow re-internalization, cells were then incubated with DMEM (10% fetal calf serum) at 37°C for the time periods indicated. Subsequently, cells were washed three times with glutathione buffer (50 mM glutathione; 90 mM NaCl, 1.25 mM CaCl₂, 1.25 mM MgSO₄, 0.2% BSA, pH 8.6) for 15 min each. After two final washes with PBS, cells were lysed in STEN buffer containing 1% NP-40/1% Triton X-100/1% BSA.

Results

Cellular expression and post-translational modifications of BACE-2

We generated HEK 293 cells which stably express human BACE-2. BACE-2 was detected in membrane preparations by western blotting with the polyclonal antibody 7524 directed to the cytoplasmic domain of BACE-2 (Fig. 1a). Two bands of ~62 kDa and ~65 kDa were specifically detected in cells transfected with BACE-2 (Fig. 1b, left panel). No reactivity was observed in untransfected cells or in cells overexpressing BACE-1. Similar results were obtained with antibody 7525 directed to the same epitope of BACE-2 as antibody 7524 (data not shown). In contrast, antibody 7520 directed to the C-terminus of BACE-1 (Capell *et al.* 2000; Walter *et al.* 2001b), selectively detected a ~65 kDa and a ~70 kDa protein in membrane preparations of BACE-1-transfected cells (Fig. 1b, right panel), representing immature and mature forms of the enzyme (Capell *et al.* 2000; Walter *et al.* 2001b). These data demonstrate that antibodies 7524 and 7520 selectively recognize BACE-2 and BACE-1, respectively.

To prove whether the 62 kDa and 65 kDa variants of BACE-2 result from post-translational modifications we performed pulse-chase experiments. Cells were pulse-labeled with [³⁵S]methionine, and BACE-2 was immunoprecipitated at the chase time periods as indicated. After pulse labeling a band of 62 kDa was detected (Fig. 2a, upper panel). During the chase, levels of the 65 kDa species

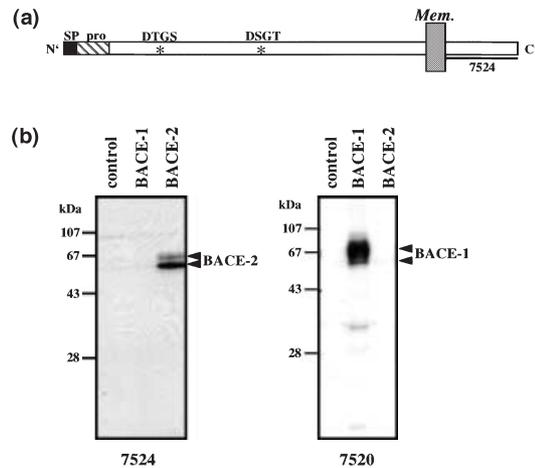


Fig. 1 Stable expression of BACE-1 and BACE-2 in HEK 293 cells. (a) Schematic of BACE-2 showing the epitope of antibody 7524. The aspartyl protease active site motifs (DTGS and DSGT) are indicated by asterisks. The signal peptide (SP) is indicated by a black box, and the propeptide (pro) is indicated by a hatched box. (b) Membranes of untransfected HEK 293 cells or cells stably overexpressing BACE-1 or BACE-2 were probed with antibodies 7524 (left panel) or 7520 (right panel) by western immunoblotting. Note that antibodies 7520 and 7524 specifically detect BACE-1 and BACE-2, respectively.

increased with time, becoming the predominant species after 2 h. This species almost completely disappeared after 4 h of chase (Fig. 2a, upper panel). In contrast, BACE-1 appeared to be more stable, with an estimated half-life of more than 8 h [Fig. 2a, lower panel; (Capell *et al.* 2000; Huse *et al.* 2000; Walter *et al.* 2001b)].

The molecular weight shift from 62 kDa to 65 kDa indicates that BACE-2 matures by post-translational modification, as previously described for BACE-1 (Capell *et al.* 2000; Haniu *et al.* 2000; Huse *et al.* 2000; Benjannet *et al.* 2001; Walter *et al.* 2001b). To prove whether BACE-2 is modified by *N*-glycosylation, cells were pulse-labeled with [³⁵S]methionine and chased for 1 h in the presence or absence of tunicamycin, which inhibits *N*-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. Immediately after the pulse the 62 kDa immature species was detected, which matures to higher molecular weight species during the 1 h chase (Fig. 2b). In the presence of tunicamycin BACE-2 migrated at the expected molecular mass of ~50 kDa, demonstrating that *N*-glycosylation of BACE-2 was inhibited.

To further prove whether BACE-2 undergoes complex *N*-glycosylation during its maturation, cells were labeled with [³⁵S]methionine and then incubated in the presence or absence of PNGase F or endo H. While PNGase F removes all types of N-linked sugars, endo H selectively cleaves mannose-rich N-linked sugars (Capell *et al.* 2000; Benjannet *et al.* 2001; Walter *et al.* 2001b). Treatment of BACE-2 with

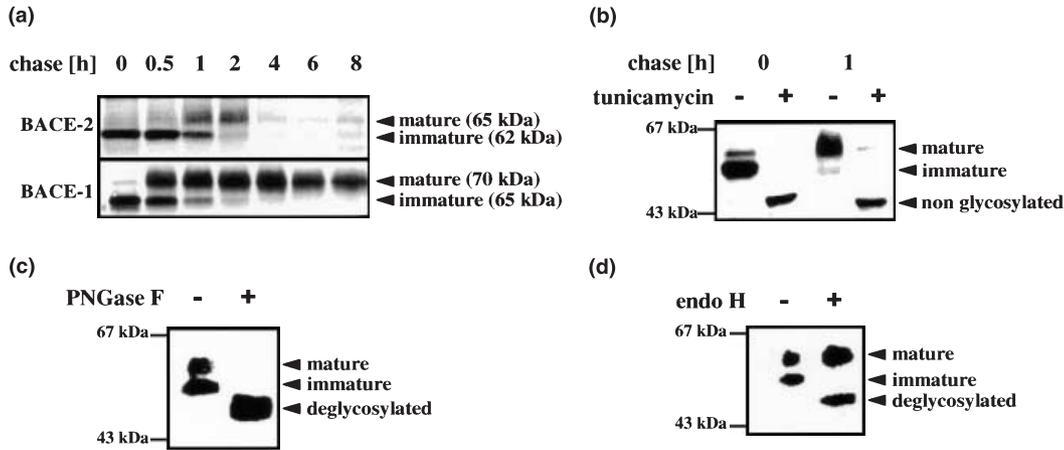


Fig. 2 BACE-2 matures by complex *N*-glycosylation. HEK 293 cells expressing BACE-1 or BACE-2 were pulse labeled with [³⁵S]methionine for 10 min and chased for the time-points indicated. (a) BACE-1 and BACE-2 were isolated by immunoprecipitation with antibodies 7520 and 7525, respectively, and detected by autoradiography. Mature and immature forms are indicated by arrowheads. (b) Cells were

labeled in the presence or absence of 10 μ g/mL tunicamycin. After the time periods indicated BACE-2 was immunoprecipitated and analyzed by autoradiography. (c and d) Immunoprecipitated BACE-2 was incubated in the presence of PNGase F (c) or endo H (d). Samples were separated by SDS-PAGE and radiolabeled BACE-2 was detected by autoradiography.

PNGase F resulted in a molecular weight shift of both the 62 kDa and the 65 kDa species of BACE-2 to approximately 50 kDa (Fig. 2c). In contrast, endo H selectively deglycosylated the 62 kDa species of BACE-2, while the 65 kDa species was endo H resistant (Fig. 2d), indicating that BACE-2 undergoes complex *N*-glycosylation during its maturation. This finding also demonstrates that BACE-2 is transported from the endoplasmic reticulum to the Golgi, where complex *N*-glycosylation occurs.

To investigate whether BACE-2 is further transported to the cell surface, we carried out biotinylation assays. Plasma membrane proteins of BACE-2-expressing cells were biotinylated and then isolated by precipitation with streptavidin-conjugated agarose beads. In parallel, BACE-2 was isolated by immunoprecipitation with antibody 7525 and precipitates were separated by SDS-PAGE. Biotinylated BACE-2 was detected by western immunoblotting as a single 65-kDa band (Fig. 3a). In contrast, immunoprecipitation with antibody 7525 revealed the presence of both immature (62 kDa) and mature (65 kDa) species of BACE-2 (Fig. 3a). The selective biotinylation of the 65 kDa species indicates that mature BACE-2 is transported to the cell surface. To test whether BACE-2 is reinternalized from the plasma membrane, cells were kept at 37°C for up to 60 min after surface biotinylation. After the indicated time periods, biotin bound to surface proteins was removed by incubation with glutathione buffer on ice. Under these conditions biotin was selectively removed from proteins localized at the cell surface, while internalized proteins were protected against removal of biotin. These experiments revealed that BACE-2 is reinternalized very inefficiently, since little if any biotinylated BACE-2 was detected upon treatment with glutathione buffer

at all time periods tested (Fig. 3b, upper panel). Consistent with previous results (Huse *et al.* 2000; Walter *et al.* 2001b) and in contrast to BACE-2, BACE-1 was readily endocytosed

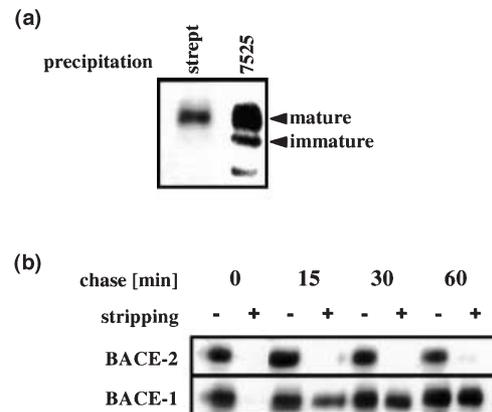


Fig. 3 Detection of BACE-2 at the cell surface. (a) Cell surface proteins were labeled with biotin and isolated by precipitation with streptavidin-conjugated sepharose beads. In parallel, BACE-2 was immunoprecipitated with antibody 7525. Precipitates were separated by SDS-PAGE and BACE-2 was detected by western immunoblotting. Note that selectively the mature form of BACE-2 is biotinylated, demonstrating selective labeling of cell surface proteins. (b) Internalization of cell-surface-located BACE-2 and BACE-1 was analyzed by incubation of cells at 37°C after biotinylation. At the time-points indicated cells were treated with glutathione buffer (+) or left untreated (-). Biotinylated proteins were precipitated with streptavidin-conjugated Sepharose beads and BACE-2 and BACE-1 were detected by western immunoblotting with antibodies 7524 and 7520, respectively. The increased amounts of biotinylated BACE-1 both with and without stripping at 30 and 60 min is due to experimental variability.

sed under these conditions, as indicated by the resistance of biotin-label of BACE-1 against removal with glutathione (Fig. 3b, lower panel).

BACE-2 cleaves β APP within the A β domain

To characterize the catalytic specificity of BACE-2 in comparison to that of BACE-1 we analyzed proteolytic processing of β APP. In cells that stably overexpress BACE-1, BACE-2 or both enzymes, the levels of mature β APP were strongly reduced as compared to control cells (Fig. 4a, first panel). Accordingly, conditioned media of BACE-1- or BACE-2-transfected cells contained increased levels of secreted β APP (APPs), indicating secretory processing of β APP by BACE-1 and BACE-2 (Fig. 4a, second panel). Notably, APPs in media from BACE-2-expressing cells co-migrated with APPs- α from control cells, while APPs from BACE-1-expressing cells migrated slightly faster (Fig. 4a, second panel). This is consistent with predominant cleavage of β APP by BACE-1 at the β -site resulting in slightly smaller APPs- β as compared to APPs- α (Citron *et al.* 1992; Haass

et al. 1995). We also precipitated conditioned media with antibody 1736 that recognizes selectively APPs cleaved at, or close to, the α -secretase site (Haass *et al.* 1992). In the media of BACE-2-expressing cells significantly increased levels of APPs recognized by antibody 1736 were detected, demonstrating that BACE-2 elevates the secretion of APPs cleaved at (APPs- α), or close to (APPs- α') the α -secretase site (Fig. 4a, third panel). Quantification revealed that BACE-2-expressing cells secreted approximately sevenfold more APPs- α/α' than BACE-1-expressing cells (Fig. 4b). These data indicate that BACE-2 cleaves β APP at or close to the cleavage site of α -secretase and therefore has distinct substrate specificity than its homologue BACE-1 in cultured cells. We next analyzed the β APP CTFs and predominantly detected CTF- α in control cells (Fig. 4a, fourth panel). Only low amounts of CTF_{Asp1} were detected in these cells, consistent with predominant α -secretory processing in HEK 293 cells (Haass *et al.* 1992). In line with increased processing of β APP by BACE-2 at or close to the α -site, the level of a β APP fragment co-migrating with CTF- α

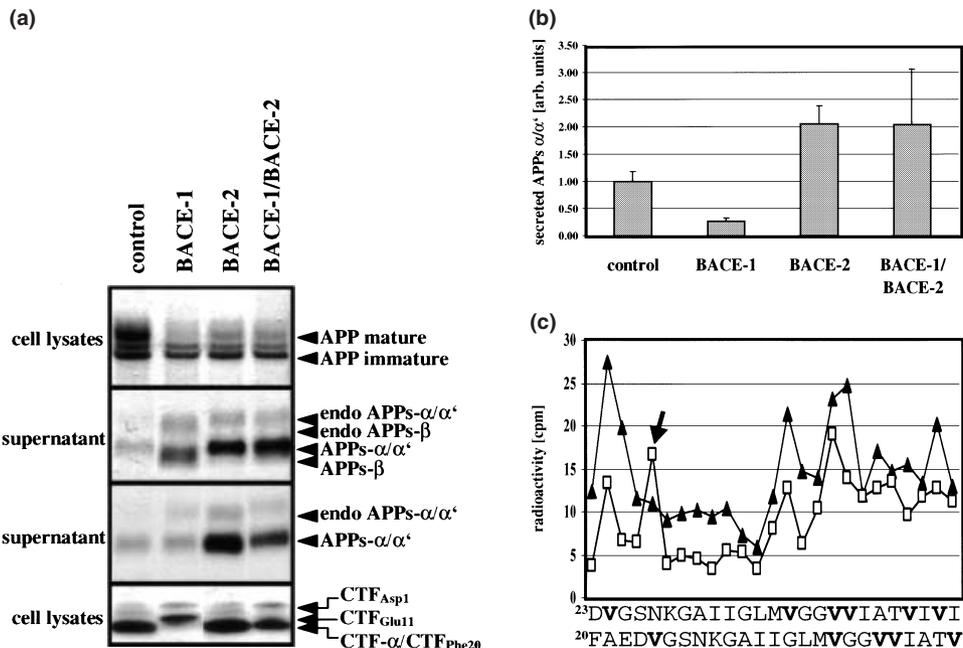


Fig. 4 BACE-2 cleaves β APP within the A β domain. (a) HEK 293 cells stably expressing BACE-1, BACE-2 or both were labeled with [35 S]methionine, and intracellular β APP and its C-terminal fragments were precipitated with antibody 6687 from cell lysates (upper and lower panel). Secreted forms of β APP were precipitated from conditioned media with antibody 5313 detecting both APPs- α and APPs- β (second panel) or with antibody 1736, which selectively detects APPs- α/α' (third panel). Secreted species derived from endogenous (endo) APP are indicated by arrow heads. The identity of the additional CTF species migrating slightly below CTF_{Asp1} in control cells and BACE-2-transfected cells (lower panel) is unknown. Since HEK 293 cells secrete N-terminal truncated forms of A β (Haass *et al.* 1992), this

species likely represents an N-terminally truncated CTF. (b) Quantification of APPs- α/α' normalized to β APP expression in stably transfected cells was carried out as described in the Methods section. Values represent means \pm SD of three independent experiments. APPs- α secretion of cells expressing only β APP was set as 1. (c) Radiosequencing of [3 H]valine-labeled CTF- α from untransfected cells (\blacktriangle) and BACE-2-transfected cells (\square). The values are given in cpm per sequencing cycle. Amino acid sequences matching to the radio-sequences are given below in single letter code with valine residues in bold. The peak in cycle 5 of CTFs from BACE-2-expressing cells (arrow) is consistent with a CTF starting at Phe20.

increased in BACE-2-expressing cells (Fig. 4a, fourth panel). To determine the cleavage site of BACE-2 within β APP, CTFs from cells metabolically labeled with [3 H]valine were radiosequenced. In control cells, prominent peaks in cycles 2, 14, 17 and 18 were detected, indicating that β APP CTFs predominantly start at Asp23 while the quantity of CTFs starting at Leu17 appears to be low (Fig. 4c). CTFs starting at Asp23 have been described previously (Zhong *et al.* 1994) and might originate from subsequent processing of CTF_{Leu17} to CTF_{Asp23}. Importantly, sequencing of β APP CTFs from BACE-2-transfected cells revealed a distinct profile of radioactivity. Here, a peak in cycle 5 demonstrated that BACE-2 cleaved β APP between Phe19 and Phe20 to generate CTF_{Phe20} (Fig. 4c). The additional peaks in cycles 2, 14 and 17 in the BACE-2 sample show that CTFs beginning both at Asp23 and Phe20 are present (Fig. 4c). Cleavage of β APP by BACE-2 at the Phe19–Phe20 bond in cultured cells is consistent with *in vitro* experiments demonstrating that BACE-2 can cleave synthetic peptides at this site (Farzan *et al.* 2000). Cells overexpressing BACE-1 contain predominantly two slower migrating CTF species (Fig. 4a, lower panel), consistent with cleavage of β APP by BACE-1 at Asp1 (CTF_{Asp1}) and Glu11 (CTF_{Glu11}) of the A β domain (Vassar *et al.* 1999; Farzan *et al.* 2000; Creemers *et al.* 2001). Interestingly, cells expressing BACE-1 together with BACE-2 revealed low amounts of CTF- α /CTF_{Phe20}, while CTF_{Glu11}, which is the major species in BACE-1 transfected cells, was almost absent (Fig. 4a, lower panel). Taken together, these data indicate that the combined activities of BACE-1 and BACE-2 determine the generation of β APP CTFs and A β species and suggest a non-amyloidogenic activity of BACE-2.

We therefore investigated the effect of BACE-2 expression on the generation of A β - and p3-species. Control cells secrete more p3 than A β _{1–40/42} (Fig. 5a), due to predominant non-amyloidogenic processing of β APP in HEK 293 cells (Haass *et al.* 1992). Consistent with previous reports (Hussain *et al.* 1999; Vassar *et al.* 1999; Yan *et al.* 1999; Capell *et al.* 2000; Creemers *et al.* 2001), BACE-1 expression leads to increased production of A β _{1–40/42} and even more A β _{11–40/42}. As expected, the increased amyloidogenic activity of BACE-1 strongly reduced p3 production (Fig. 5a). Cells expressing BACE-2 did not secrete significant amounts of A β _{11–40/42}, but produced predominantly p3 species and low amounts of A β _{1–40/42}. Based on the identified cleavage specificity of BACE-2 between Phe19 and Phe20, we assume that the p3 species secreted from BACE-2-expressing cells contained p3 starting at Phe20 (p3_{Phe20}). Interestingly, cells expressing both BACE-1 and BACE-2 secreted strongly decreased levels of A β _{11–40/42} compared to BACE-1-expressing cells. Due to the activity of BACE-2, double-transfected cells secreted significantly higher amounts of p3/p3_{Phe20} as compared to cells expressing BACE-1 alone. In addition, double-transfected cells also generated significant amounts of

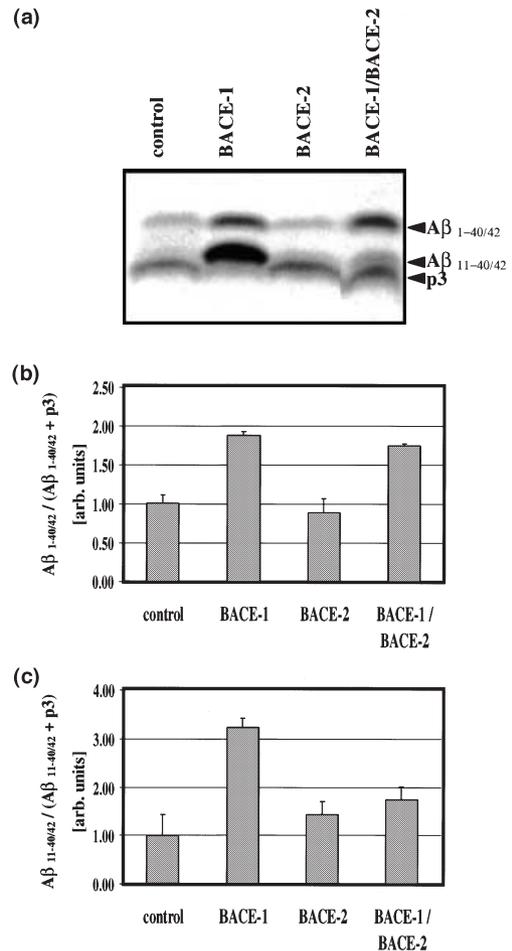


Fig. 5 BACE-2 selectively reduces the generation of A β starting at Glu11. (a) Cells were labeled for 4 h with [35 S]methionine and conditioned media were precipitated with antibody 3926 recognizing the A β domain of β APP. Precipitates were separated on 10–20% Tris–tricine gels and radiolabeled A β and p3 species were detected by autoradiography. (b,c) Quantification of secreted A β _{1–40/42} and A β _{11–40/42}. Values represent means \pm SD of three independent experiments. Values of cells expressing β APP only were set as 1.

A β _{1–40/42}, most likely reflecting the activity of BACE-1. Quantification of these β APP derivatives confirmed that BACE-2 selectively reduced A β _{11–40/42} levels, while A β _{1–40/42} generation was not significantly affected (Fig. 5b,c).

Distinct activities of BACE-1 and BACE-2 in the secretory pathway

The distinct effects of BACE-2 on A β and CTF species starting either at Asp1 or at Glu11 suggest that these BACE-1-mediated cleavages occur sequentially. To address this question, cells were labeled with [35 S]methionine in the presence or absence of inhibitors of protein forward transport. We used BFA to inhibit protein transport from the endoplasmic reticulum to Golgi compartments or monensin to inhibit transport from the Golgi to later secretory

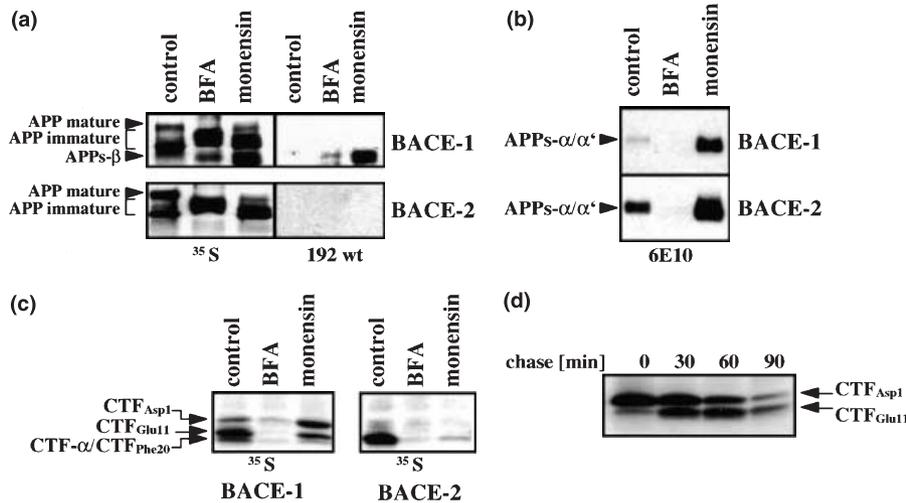


Fig. 6 Cleavage of β APP by BACE-1 and BACE-2 in distinct subcellular compartments. Cells expressing BACE-1 or BACE-2 were labeled with [35 S]methionine in the presence or absence of BFA or monensin. (a) Intracellular β APP was precipitated from cell lysates with antibody 5313 and detected by autoradiography (left panels). The same membrane was probed with antibody 192wt to detect intracellular APPs- β (right panels). (b) Cell lysates were precipitated with

antibody 1736 and detected with antibody 6E10. (c) β APP CTFs were precipitated with antibody 6887 from cell lysates and detected by autoradiography. (d) Cells expressing β APP K670N/M671L ('Swedish mutation') and BACE-1 were pulse-labeled with [35 S]methionine and chased for the time periods indicated. β APP CTFs were isolated by immunoprecipitation with antibody 6887 and detected by autoradiography.

compartments (Haass *et al.* 1993; Wild-Bode *et al.* 1997). Holo- β APP and its proteolytic processing products were isolated from cell lysates and conditioned media. Immunoprecipitation of intracellular β APP with antibody 5313 directed against the β APP ectodomain revealed two major variants of β APP in untreated cells, representing immature and mature β APP in both BACE-1 and BACE-2 expressing cells (Fig. 6a, left panels). BFA and monensin treatment led to the detection of β APP variants migrating between mature and immature β APP due to aberrant glycosylation (Haass *et al.* 1993; Wild-Bode *et al.* 1997). BFA and monensin also blocked secretion of APPs in all cell lines analyzed (data not shown), indicating inhibition of protein forward transport. In BACE-1-transfected cells, BFA treatment induced the accumulation of an additional intracellular β APP derivative. This species was detected by the neopeptide-specific antibody 192wt that selectively recognizes APPs- β but not holo- β APP [Seubert *et al.* 1993; Fig. 6(a), upper right panel]. Moreover, antibody 6E10 directed against amino acids 1–16 of the A β domain did not recognize this species (data not shown), indicating that β APP is selectively cleaved at the β -site within the endoplasmic reticulum. Monensin treatment led to an increased accumulation of intracellular APPs- β recognized by antibody 192wt (Fig. 6a). These results indicate that BACE-1 can cleave β APP at the β -site in early secretory compartments, namely in the endoplasmic reticulum and Golgi. Intracellular APPs- β was not observed in BACE-2-expressing cells (Fig. 6a, lower panels), consistent with the distinct specificity of BACE-2 in cleavage of β APP between Phe19 and Phe20. We therefore analyzed the levels of

intracellular APPs- α/α' in BACE-1- or BACE-2-expressing cells. Only low amounts of intracellular APPs- α/α' were detected in untreated cells expressing BACE-1 (Fig. 6b, upper panel), because of predominant cleavage of β APP at the β -site and residual α -secretase cleavage at or close to the cell surface followed by rapid secretion of APPs- α/α' (Sisodia *et al.* 1990). Significantly higher levels of intracellular APPs- α/α' were detected in untreated cells expressing BACE-2 (Fig. 6b, lower panel). Cell treatment with BFA strongly inhibited production of intracellular APPs- α/α' , also indicating that cleavage of β APP by BACE-2 predominantly occurred in post-endoplasmic reticulum compartments. Indeed, the detection of high amounts of APPs- α/α' in cells treated with monensin demonstrated that BACE-2 can efficiently cleave β APP in the Golgi compartment. To prove this, we next analyzed the levels of β APP CTFs. In BACE-1-expressing cells, CTF_{Asp1} and predominantly CTF_{Glu11} were detected (Fig. 6c, left panel). BFA treatment strongly increased the ratio of CTF_{Asp1}/CTF_{Glu11}. While the generation of CTF_{Glu11} was strongly reduced, significant amounts of CTF_{Asp1} were produced. Again, these data indicate that BACE-1-mediated cleavage of β APP at Asp1 can occur in the endoplasmic reticulum, while cleavage at Glu11 is very inefficient in this compartment. By using β APP bearing the K670N/M671L double mutation ('Swedish mutation'), we also observed cleavage at Asp1 within the endoplasmic reticulum even without overexpression of BACE-1, therefore indicating endogenous β -secretase activity in this compartment (data not shown). Interestingly, treatment of BACE-1-expressing cells with monensin allowed generation of

CTF_{Glu11}, indicating that this cleavage can occur in the Golgi (Fig. 6c, left panel). In BACE-2-transfected cells, BFA strongly inhibited the cleavage of β APP as indicated by the significant reduction of CTF- α /CTF_{Phe20} (Fig. 6c, right panel). However, treatment with monensin allows generation of β APP CTF- α /CTF_{Phe20} to some extent, indicating that BACE-2 can cleave β APP within the Golgi apparatus. Taken together these results demonstrate that cleavage of β APP by BACE-2 between Phe19 and Phe 20 and by BACE-1 between Tyr10 and Glu11 can occur within the same subcellular compartments, namely the Golgi and later secretory compartments, while cleavage of the Met–Asp bond at the beginning the A β domain mediated by BACE-1 can also occur earlier within the endoplasmic reticulum. Pulse–chase analysis of β APP containing the K670N/M671L ‘Swedish’ double mutation revealed that CTF_{Asp1} was generated earlier as CTF_{Glu11}, also indicating sequential cleavages of β APP by BACE-1 first at Asp1 and then at Glu11 (Fig. 6d).

Discussion

This study demonstrates that BACE-1 and BACE-2 undergo similar post-translational modifications and subcellular trafficking, but have distinct specificity in cleavage of β APP. Like BACE-1, BACE-2 matures by complex *N*-glycosylation during its transport through the secretory pathway. However, pulse–chase experiments revealed that BACE-2 is less stable than BACE-1. Cell surface biotinylation demonstrates that both BACE-1 and BACE-2 are transported to the plasma membrane. Unlike BACE-1, which is readily re-internalized into endosomes, BACE-2 can hardly be detected in these compartments. This may suggest that BACE-2 is degraded immediately after its uptake in endosomes (Fig. 2). BACE-2 might also be secreted into the media to some extent, a mechanism shown previously for minor portions of BACE-1 (Benjannet *et al.* 2001). The detection of membrane-bound C-terminal fragments of 15–20 kDa might indeed indicate internal cleavage of BACE-2 and subsequent shedding of the enzyme (data not shown).

By analyzing β APP processing we demonstrate that BACE-2 strongly increases the secretion of an APPs- α -like variant which is recognized by the neoepitope-specific antibody 1736. In line with this finding, radiosequencing reveals the accumulation of an intracellular β APP CTF- α -like species starting at Phe20 in BACE-2-transfected cells, demonstrating that BACE-2 cleaves β APP between Phe19 and Phe20 within the A β domain, close to the α -secretase site. Our data are fully consistent with the findings that BACE-2 cleaves synthetic peptides *in vitro* more efficiently at this site than at the Met–Asp bond at the N terminus of the A β domain (Farzan *et al.* 2000), and that cells transiently transfected with BACE-2 secrete increased levels of an APPs- α -like species (Yan *et al.* 2001a). Notably, fibroblasts

from Down’s syndrome patients have been shown to produce significantly more β APP CTF starting at Phe20 (Zhong *et al.* 1994). This might indicate a higher BACE-2 activity due to triplication of the BACE-2 gene, which is localized in the Down critical region of chromosome 21 (Fan *et al.* 1999; Saunders *et al.* 1999; Acquati *et al.* 2000). However, our data do not exclude the possibility that BACE-2 cleaves β APP at the β -secretase site(s) to some extent. Indeed, it was shown that the FAD-associated K670N/M671L double mutation (‘Swedish mutation’) of β APP is efficiently cleaved by BACE-2 at the β -secretase site (Farzan *et al.* 2000; Hussain *et al.* 2000) therefore indicating that BACE-2 might also function as β -secretase and might be involved in increased A β production in Swedish mutant cases.

In contrast to BACE-2-mediated cleavage at Phe20, our data indicate that BACE-1 generates two CTFs starting at Asp1 and Glu11 that can subsequently be cleaved by γ -secretase to produce the respective A β species (Fig. 5). The reason for the distinct cleavage specificity of BACE-1 and BACE-2 is unclear. Both enzymes are highly similar in their primary structure (Hussain *et al.* 1999; Sinha *et al.* 1999; Vassar *et al.* 1999; Yan *et al.* 1999; Lin *et al.* 2000). However, subtle structural differences might determine the cleavage specificity of both enzymes. In addition, differences in the post-translational modifications, like propeptide cleavage or distinct *N*-glycosylation might also contribute to the distinct substrate specificity. Comparison of the crystal structure of BACE-2, which remains to be determined, with that of BACE-1 (Hong *et al.* 2000) might answer this question.

We demonstrate that the distinct cleavages of β APP by BACE-1 at Asp1 and Glu11 can occur in distinct subcellular compartments. By treatment with BFA we found that BACE-1 can cleave β APP at Asp1 as early as in the endoplasmic reticulum. It will be interesting to determine whether this cleavage is involved in the production of intracellular A β that can be detected in early secretory compartments (Cook *et al.* 1997; Hartmann *et al.* 1997; Wild-Bode *et al.* 1997). In contrast, the Glu11 cut of β APP, also mediated by BACE-1, is almost completely inhibited by BFA, indicating selective Glu11 cleavage in post-endoplasmic reticulum compartments. It has been shown that the pro-domain of BACE-1 is cleaved by furin-like proteases or furin itself (Bennett *et al.* 2000b; Capell *et al.* 2000; Huse *et al.* 2000; Benjannet *et al.* 2001; Creemers *et al.* 2001), which are active predominantly in post-endoplasmic reticulum compartments. Therefore, propeptide removal might contribute to the distinct substrate specificities of BACE-1 in distinct subcellular compartments. In addition, differences in the *N*-glycosylation pattern of BACE-1 in the endoplasmic reticulum and the Golgi might alter its cleavage specificity.

Interestingly, co-expression of BACE-1 and BACE-2 almost completely inhibits the production of CTF_{Glu11} but has little effect on the levels of CTF_{Asp1}. Together with the data derived from pharmacological cell treatment, the

following picture of sequential β APP cleavage by BACE-1 and BACE-2 emerges. β APP can be first cleaved by BACE-1 at Asp1 as early as in the endoplasmic reticulum. BACE-2 appears not to cleave β APP efficiently in this compartment, because neither APPs- α' nor the corresponding CTF starting at Phe20 accumulates upon BFA treatment. Rather, BACE-2 can cleave β APP in post-endoplasmic reticulum compartments, like the Golgi and later secretory compartments during transport of β APP to the cell surface as indicated by an increase of intracellular APPs- α' in BACE-2-transfected cells treated with monensin (Fig. 6). Within these compartments BACE-1 and BACE-2, together with α -secretase, determine the relative amounts of β APP CTFs and A β species. Indeed, cell treatment with monensin reveals that cleavage of β APP by BACE-1 at Glu11 and by BACE-2 at Phe20 can both occur in the Golgi compartment. The strong reduction of both intracellular β APP CTF_{Glu11} and secreted A β _{11–40/42} of cells expressing BACE-1 and BACE-2 might be due to a higher affinity of BACE-2 for its cleavage site in β APP, than that of BACE-1 for cleavage at Glu11. The CTF_{Glu11} generated by BACE-1 might also be processed further by BACE-2 before it is finally cleaved by γ -secretase.

This study might help to understand why brain neurons secrete the highest levels of both A β _{1–40/42} and A β _{11–40/42} (Gouras *et al.* 1998; Cai *et al.* 2001). Because BACE-1 is expressed in neurons at much higher levels than BACE-2 (Bennett *et al.* 2000a; Hussain *et al.* 2000), there might be less competition between both proteases, favoring therefore the generation of these A β species. In cells expressing higher levels of BACE-2, the enzyme might, in addition to α -secretase, efficiently compete with BACE-1, favoring the generation of APPs- α - and p3-like species, and thereby inhibit the production of A β . These data suggest that in the secretory pathway, amyloidogenic or non-amyloidogenic processing of β APP involves the distinct enzymatic activities of BACE-1 and BACE-2. Specific facilitation of BACE-2 activity or inhibition of BACE-1 activity would be therefore attractive therapeutic strategies in the treatment of AD.

Acknowledgements

We are grateful to Drs D. Selkoe and D. Schenk for providing antibodies 1736 and wt192, respectively, and to Dr A. Tamarelli for providing BACE-2 cDNA. We also thank Dr S. Lammich for helpful discussion and L. Meyn for expert technical assistance. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 596 'Molecular Mechanisms of Neurodegeneration', project B1 to CH; and grant WA1477/1 to JW), and by the Boehringer Ingelheim Inc. to CH.

Note added in proof

While this manuscript was under consideration, similar results were described by the groups of Drs V. M. Lee and R. W. Doms

demonstrating that cleavage of β APP at Asp1 and Glu11 can occur in distinct subcellular compartments (Huse *et al.* 2002; Liu *et al.* 2002).

References

- Acquati F., Accarino M., Nucci C., Fumagalli P., Jovine L., Ottolenghi S. and Taramelli R. (2000) The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region. *FEBS Lett.* **468**, 59–64.
- Benjannet S., Elagöz A., Wickham L., Mambarchi M., Munzer J. S., Basak A., Lazure C., Cromlish J. A., Sisodia S., Checler F., Chretien M. and Seidah N. G. (2001) Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 10879–10887.
- 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. *J. Biol. Chem.* **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. *J. Biol. Chem.* **275**, 37712–37717.
- 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. *Nat. Neurosci.* **4**, 233–234.
- 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. *J. Biol. Chem.* **275**, 30849–30854.
- 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.
- Cook D. G., Forman M. S., Sung J. C., Leight S., Kolson D. L., Iwatsubo T., Lee V. M. and Doms R. W. (1997) Alzheimer's A beta (1–42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat. Med.* **3**, 1021–1023.
- 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. *J. Biol. Chem.* **276**, 4211–4217.
- Fan W., Bennet B. D., Babu-Kahn S., Luo Y., Louis J.-C., McCaleb M., Citron M., Vassar R. and Richards W. G. (1999) BACE maps to chromosome 11 and a BACE homolog, BACE2, reside in the obligate Down syndrome region of chromosome 21. *Science* **286**, 1255a.
- 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. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 9712–9717.
- Gouras G. K., Xu H., Jovanovic J. N., Buxbaum J. D., Wang R., Greengard P., Relkin N. R. and Gandy S. (1998) Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons. *J. Neurochem.* **71**, 1920–1925.
- Haass C., Schlossmacher M. G., Hung A. Y., Vigo-Pelfrey C., Mellon A., Ostaszewski B. L., Lieberburg I., Koo E. H., Schenk D., Teplow D. B. *et al.* (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**, 322–325.
- 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. *J. Biol. Chem.* **268**, 3021–3024.

- Haass C., Lemere C. A., Capell A., Citron M., Seubert P., Schenk D., Lannfelt L. and Selkoe D. J. (1995) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat. Med.* **1**, 1291–1296.
- Haniu M., Denis P., Young Y., Mendiaz E. A., Fuller J., Hui J. O., Bennett B. D., Kahn S., Ross S., Burgess T., Katta V., Rogers G., Vassar R. and Citron M. (2000) Characterization of Alzheimer's beta-secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J. Biol. Chem.* **275**, 21099–21106.
- Hartmann T., Bieger S. C., Bruhl B., Tienari P. J., Ida N., Allsop D., Roberts G. W., Masters C. L., Dotti C. G., Unsicker K. and Beyreuther K. (1997) Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat. Med.* **3**, 1016–1020.
- 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* **290**, 150–153.
- Huse J. T. and Doms R. W. (2000) Closing in on the amyloid cascade: recent insights into the cell biology of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* **22**, 81–98.
- Huse J. T., Pijak D. S., Leslie G. J., Lee V. M. and Doms R. W. (2000) Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J. Biol. Chem.* **275**, 33729–33737.
- Huse J. T., Liu K., Pijak D. S., Carlin D., Lee V. M. and Doms R. W. (2002) Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* (published online ahead of print).
- 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., Smith T. S., Simmons D. L., Walsh F. S., Dingwall C. and Christie G. (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* **14**, 419–427.
- Hussain I., Powell D. J., Howlett D. R., Chapman G. A., Gilmour L., Murdock P. R., Tew D. G., Meek T. D., Chapman C., Schneider K., Ratcliffe S. J., Tattersall D., Testa T. T., Southan C., Ryan D. M., Simmons D. L., Walsh F. S., Dingwall C. and Christie G. (2000) ASP1 (BACE2) cleaves the amyloid precursor protein at the beta-secretase site. *Mol. Cell. Neurosci.* **16**, 609–619.
- Hussain I., Christie G., Schneider K., Moore S. and Dingwall C. (2001) Prodomain processing of Asp1 (BACE2) is autocatalytic. *J. Biol. Chem.* **276**, 23322–23328.
- 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. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 1456–1460.
- Liu K., Doms R. W. and Lee V. M. (2002) Glu11 site cleavage and N-terminally truncated A beta production upon BACE overexpression. *Biochemistry* **41**, 3128–3136.
- Luo Y., Bolon B., Kahn S., Bennett B. D., Babu-Khan S., Denis P., Fan W., Kha H., Zhang J., Gong Y., Martin L., Louis J. C., Yan Q., Richards W. G., Citron M. and Vassar R. (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat. Neurosci.* **4**, 231–232.
- 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., Johnson-Wood K., Kappenman K. E., Kawabe T. T., Kola I., Kuehn R., Lee M., Liu W., Motter R., Nichols N. F., Power M., Robertson D. W., Schenk D., Schoor M., Shopp G. M., Shuck M. E., Sinha S., Svensson K. A., Tatsuno G., Tintrup H., Wijsman J., Wright S., McConlogue L. (2001) BACE and knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1317–1324.
- Saunders A. J., Kim T.-W. and Tanzi R. A. (1999) BACE maps to chromosome 11 and a BACE homolog, BACE2, reside in the obligate Down syndrome region of chromosome 21. *Science* **286**, 1255a.
- Selkoe D. J. (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**, A23–A31.
- Seubert P., Oltersdorf T., Lee M. G., Barbour R., Blomquist C., Davis D. L., Bryant K., Fritz L. C., Galasko D., Thal L. J., Thal L., Lieberburg I. and Schenk D. (1993) Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* **361**, 260–263.
- Sinha S., Anderson J. P., Barbour R., Basi G. S., Caccavello R., Davis D., Doan M., Dovey H. F., Frigon N., Hong J., Jacobson-Croak K., Jewett N., Keim P., Knops J., Lieberburg I., Power M., Tan H., Tatsuno G., Tung J., Schenk D., Seubert P., Suomensaaari S. M., Wang S., Walker D., John V. *et al.* (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* **402**, 537–540.
- 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* **248**, 492–495.
- Steiner H. and Haass C. (2000) Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 217–224.
- Vassar R. and Citron M. (2000) Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research. *Neuron* **27**, 419–422.
- Vassar R., Bennett B. D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E. A., Denis P., Teplow D. B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jarosinski M. A., Biere A. L., Curran E., Burgess T., Louis J. C., Collins F., Treanor J., Rogers G. and Citron M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735–741.
- Walter J., Kaether C., Steiner H. and Haass C. (2001a) The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 585–590.
- Walter J., Fluhre R., Hartung B., Willem M., Kaether C., Capell A., Lammich S., Multhaup G. and Haass C. (2001b) Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J. Biol. Chem.* **276**, 14634–14641.
- Wild-Bode C., Yamazaki T., Capell A., Leimer U., Steiner H., Ihara Y. and Haass C. (1997) Intracellular generation and accumulation of amyloid beta-peptide terminating at amino acid 42. *J. Biol. Chem.* **272**, 16085–16088.
- 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., Carter D. B., Tomasselli A. G., Parodi L. A., Heinrichson R. L. and Gurney M. E. (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. (2001a) BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 34019–34027.
- Yan R., Han P., Miao H., Greengard P. and Xu H. (2001b) The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to APP substrate. *J. Biol. Chem.* **276**, 36788–36796.
- Zhong Z., Higaki J., Murakami K., Wang Y., Catalano R., Quon D. and Cordell B. (1994) Secretion of beta-amyloid precursor protein involves multiple cleavage sites. *J. Biol. Chem.* **269**, 627–632.

Identification of a β -Secretase Activity, Which Truncates Amyloid β -Peptide after Its Presenilin-dependent Generation*

Received for publication, November 11, 2002, and in revised form, December 4, 2002
Published, JBC Papers in Press, December 5, 2002, DOI 10.1074/jbc.M211485200

Regina Fluhrer,^{a,b} Gerd Multhaup,^{b,c,d} Andrea Schlicksupp,^c Masayasu Okochi,^e
Masatoshi Takeda,^e Sven Lammich,^a Michael Willem,^a Gil Westmeyer,^a Wolfram Bode,^f
Jochen Walter,^{a,g,h,i} and Christian Haass^{a,h,j}

From the ^aAdolf-Butenandt Institute, Department of Biochemistry, Laboratory for Alzheimer's and Parkinson's Disease Research, Schillerstrasse 44, Ludwig-Maximilians University, 80336 Munich, Germany, the ^cZMBH-Center for Molecular Biology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 282, Germany, the ^eDepartment of Postgenomics and Diseases, Division of Psychiatry and Behavioral Proteomics, Osaka University Graduate School of Medicine, 565-0871 Osaka, Japan, and the ^fMax-Planck Institute for Biochemistry, Am Klopferspitz 18a, 82152 Martinsried, Germany

The β -amyloid precursor protein (β APP) is proteolytically processed by two secretase activities to produce the pathogenic amyloid β -peptide ($A\beta$). N-terminal cleavage is mediated by β -secretase (BACE) whereas C-terminal intramembraneous cleavage is exerted by the presenilin (PS) γ -secretase complex. The $A\beta$ -generating γ -secretase cleavage principally occurs after amino acid 40 or 42 and results in secretion of $A\beta$ -(1–40) or $A\beta$ -(1–42). Upon overexpression of BACE in cultured cells we unexpectedly noticed a reduction of secreted $A\beta$ -(1–40/42). However, mass spectrometry revealed a truncated $A\beta$ species, which terminates at amino acid 34 ($A\beta$ -(1–34)) suggesting an alternative γ -secretase cut. Indeed, expression of a loss-of-function variant of PS1 inhibited not only the production of $A\beta$ -(1–40) and $A\beta$ -(1–42) but also that of $A\beta$ -(1–34). However, expression levels of BACE correlate with the amount of $A\beta$ -(1–34), and $A\beta$ -(1–34) is produced at the expense of $A\beta$ -(1–40) and $A\beta$ -(1–42). Since this suggested that BACE is involved in a C-terminal truncation of $A\beta$, we incubated purified BACE with $A\beta$ -(1–40) *in vitro*. Under these conditions $A\beta$ -(1–34) was generated. Moreover, when conditioned media containing $A\beta$ -(1–40) and $A\beta$ -(1–42) were incubated with cells expressing a loss-of-function PS1 variant together with BACE, $A\beta$ -(1–34) was efficiently produced *in vivo*. These data demonstrate that an apparently γ -secretase-dependent $A\beta$ derivative is produced after the generation of the non-truncated $A\beta$ via an additional and unexpected activity of BACE.

Because of the increasing mean life expectancy, there is considerable interest in the understanding of the molecular and biochemical mechanisms of age-related diseases. By far the

most frequent age-related neurological disorder is Alzheimer's disease (AD).¹ During the aging process the patients accumulate insoluble amyloid β -peptide ($A\beta$), which is deposited in senile plaques and microvessels in the brain. $A\beta$ is generated by endoproteolytic processing of the β -amyloid precursor protein (β APP), involving β - and γ -secretase (1).

β -secretase (also called BACE; β -site APP-cleaving enzyme) was identified as a membrane-associated aspartyl protease (2–6). BACE mediates the primary amyloidogenic cleavage of β APP and generates a membrane-bound β APP C-terminal fragment (APP CTF β), which is the immediate precursor for the intramembraneous γ -secretase cleavage (1). BACE also generates N-terminally truncated $A\beta$ species starting with amino acid 11 of the $A\beta$ domain (2, 7–9). A close homologue (BACE-2) (6, 10–12) can also mediate the typical β -secretase cut although with much lower efficiency (13). BACE-2 rather exhibits an α -secretase-like activity, which cleaves in the middle of the $A\beta$ domain at amino acid 19 and 20 (9, 13, 14). Apparently BACE-2 does not contribute to the amyloidogenic processing of $A\beta$, since the deletion of BACE fully abrogates $A\beta$ generation (15–17).

γ -Secretase activity is associated with a protein complex, composed of presenilins (PS1 or PS2), Nicastrin (Nct), PEN-2, APH-1a, and APH-1b (18–25). The expression of these complex components is coordinately regulated, and γ -secretase activity is only detected in the presence of all subunits (21, 23–25). Removing a single subunit results in the destabilization or reduced maturation of the remaining components (23–26). The catalytic activity is most likely contributed by the PSs (1, 27). PSs are polytopic transmembrane proteins, which together with the signal peptide peptidases and the type-4 prenilin peptidases may belong to a novel family of aspartyl proteases of the GXGD type (for review see Ref. 1). The cleavage of BACE-generated CTF β by γ -secretase results in the secretion of $A\beta$ into biological fluids (1). This cleavage principally occurs after amino acid 40 and 42, the latter being enhanced by numerous familial AD-associated mutations in the PS genes and β APP itself (28). Beside the predominant cleavage after amino acid 40 and 42 slightly shorter peptides have been observed as well, suggesting that the γ -secretase has loose sequence specificity (29). This includes peptides terminating after amino acid 34,

* This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 596-Project B1 (to C. H.) and the Priority Program (to J. W., C. H., and G. M.)) and the DIADEM Project (to C. H.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

^b These authors contributed equally to this work.

^d Present address: Dept. of Chemistry/Biochemistry, Freie Universität Berlin, Thielallee 63, 14195 Berlin, Germany.

^g Present address: Dept. of Neurology, University of Bonn; Sigmund-Freud-Str. 25, 53105 Bonn, Germany.

^h These authors contributed equally to this work.

ⁱ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 49-89-5996-471/472; Fax: 49-89-5996-415; E-mail: chaass@pbn.med.uni-muenchen.de.

^j To whom correspondence may be addressed. Tel.: 49-228-2879782; Fax: 49-228-2874387; E-mail: jochen.walter@ukb.uni-bonn.de.

¹ The abbreviations used are: AD, Alzheimer's disease; $A\beta$, amyloid β -peptide; β APP, β -amyloid precursor protein; PS, presenilin; BACE, β -site APP-cleaving enzyme; sBACE, soluble BACE; wt, wild type; HEK, human embryonic kidney; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight.

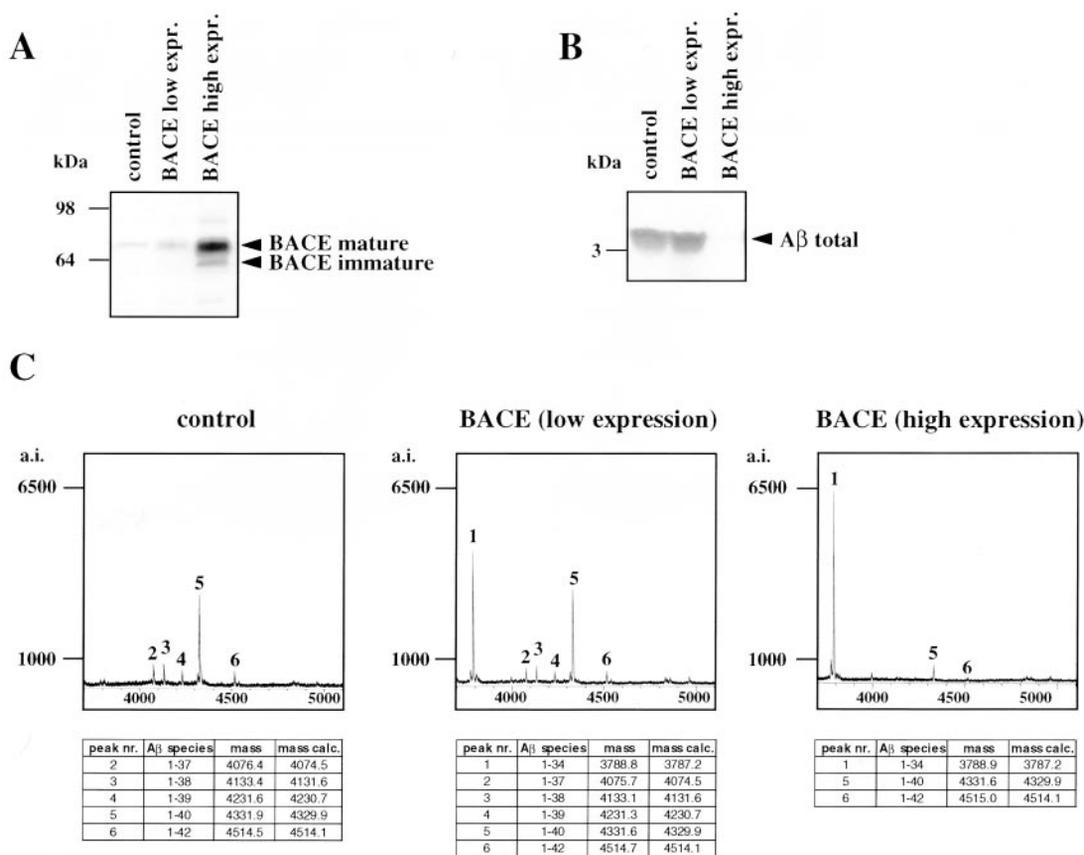


FIG. 1. Production of A β (1-34) correlates with BACE expression. *A*, HEK 293 cells stably overexpressing β APP₆₉₅ sw (control; lane 1) or β APP₆₉₅ sw and BACE (lanes 2 and 3) were labeled with [³⁵S]methionine. BACE was immunoprecipitated from cell lysates with antibody 7520. *B*, conditioned media were analyzed for A β accumulation by immunoprecipitation with antibody 3926. *C*, MALDI-TOF MS of A β peptides immunoprecipitated from conditioned media of the three cell lines with antibody 3926. Arbitrary intensities are given on the y-axis (*a.i.*). The tables below the spectra indicate the peak masses obtained by mass spectrometry (*mass*) and the respective calculated masses (*mass calc.*). Note that the relative levels of A β (1-34) correlate with increasing amounts of BACE expression while other A β species are reduced.

37, 38, and 39 (29). In addition or in parallel to these cleavages, γ -secretase also cleaves within the transmembrane domain shortly before the cytoplasmic border after amino acid 49 to liberate the β APP intracellular domain (AICD) (30–33), which may be involved in nuclear signaling (34, 35). The biological function of γ -secretase is related to the very similar intramembraneous processing of Notch. Indeed, a depletion of PS1 leads to a very severe Notch phenotype (summarized in Ref. 36).

BACE and γ -secretase are obvious targets for therapeutic strategies aimed to inhibit A β generation. Unfortunately γ -secretase inhibitors not only block A β generation but also interfere with Notch signaling (37–39). Therefore treatment of patients with such inhibitors remains problematic. On the other side it has been shown that the gene encoding BACE can be removed without any deleterious effects (15–17). Therefore inhibition of BACE with small chemical compounds seems to be a safer approach for long term treatment. However, a detailed understanding of the cleavage specificity and the substrate specificity of BACE is required for the generation of selective drugs. Surprisingly, overexpression of BACE in cell culture models leads to reduced A β secretion (2). In order to investigate this paradox we analyzed A β peptides secreted from cells stably expressing various levels of BACE and made the surprising observation that BACE can also cleave 34 amino acids C-terminal from its primary cleavage site, thus mimicking a PS-like cleavage specificity.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture, cDNAs, and Transfection—HEK293 were cultured as described (9). The cell lines stably overexpressing wild type β APP₆₉₅

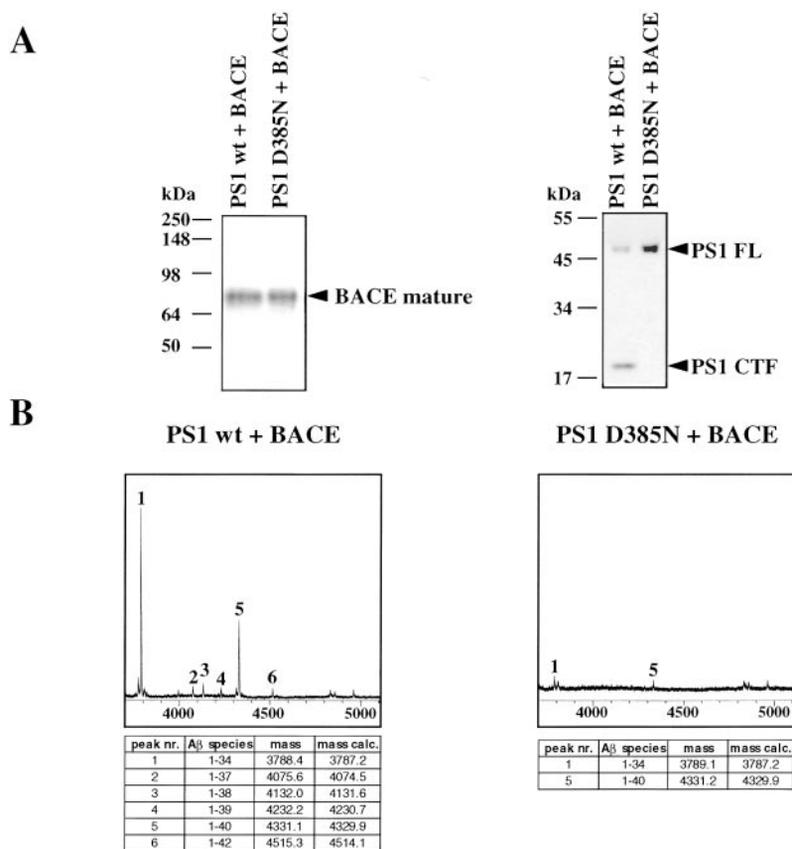
(40) or β APP₆₉₅ containing the Swedish double mutation (β APP_{sw}) (41) and cell lines co-expressing either PS1 wt or PS1 D385N have been described (42). To transfect BACE into these cell lines, the BACE cDNA was cloned into the *EcoRI/XhoI* sites of pcDNA3.1 hygro (+) expression vector (Invitrogen). Transfection was carried out using FuGENE 6 reagent (Roche Molecular Biochemicals). Pooled stable cell clones were selected in 150 μ g/ml hygromycin (Invitrogen). The cell lines expressing BACE-2 have been described previously (9).

Antibodies, Metabolic Labeling, Immunoprecipitation, and Immunoblotting—Antibodies 7520 (43, 44) and 7524 (9) directed against the respective C termini of BACE or BACE-2 and antibody 3926 (45) against the A β domain of β APP, as well as the antibodies 6687, against the C terminus of β APP, and 5313, against the N terminus of β APP (46), have been described previously. The monoclonal antibody 6E10 directed against amino acids 1–17 of the A β domain was obtained from Senetek Inc. For immunodetection of PS1 the polyclonal and monoclonal antibodies against the large hydrophilic loop of PS1 (3027 and BI.3D7) were used (47, 48). Metabolic labeling, immunoprecipitations, and Western blotting were carried out as described previously (9).

BACE Activity Assay—The fluorometric BACE activity assay was carried out as described previously (46). To selectively inhibit BACE activity GL189 was used as described previously (46). Soluble BACE (sBACE) was isolated and incubated with synthetic sBACE as follows: HEK 293 cells expressing sBACE were incubated with OptiMem 1 containing Glutamax (Invitrogen) for 24 h. 400 ml of the conditioned medium were purified using a mono Q-Sepharose column (Amersham Biosciences). 20 μ l of the fraction derived from cells expressing sBACE or from control fractions not containing sBACE were incubated with 50 μ g of synthetic A β (1–40) for MALDI-TOF MS and with 6 μ g of synthetic A β (1–40) for gel analysis at 37 $^{\circ}$ C for the indicated time points. The pH was adjusted to 4.5 with acetic acid. Samples were dried in a Speed Vac and resuspended in acetic acid. Subsequently samples were purified by using a Zip-Tip column and were then subjected to MALDI-TOF MS.

Mass Spectrometry/MALDI-TOF—Cells were grown on 10-cm

FIG. 2. Production of A β -(1-34) is PS1-dependent. *A, left panel*, BACE expression in cells co-expressing PS1 wt or PS1 D385N. Membrane fractions were probed with antibody 7520. Immature BACE can only be detected upon longer exposure (data not shown). *Right panel*, PS1 derivatives were identified by a combined immunoprecipitation/immunoblotting protocol using antibody 3027 and BI.3D7 (47). Note full replacement of endogenous PS1 by the uncleaved non-functional PS1 D385N mutant. *B*, MALDI-TOF MS of A β peptides immunocaptured from conditioned media of cell lines shown in *A* using antibody 3926. The tables below the spectra indicate the peak masses measured (*mass*) and the respective masses calculated (*mass calc.*). Note that in the presence of a non-functional PS1 mutant (PS1 D385N) and BACE almost no A β species is generated, whereas in the presence of PS1 wt and BACE A β -(1-34) is the predominant species.



dishes and incubated with 4 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM; PAA Laboratories) supplemented with 10% fetal calf serum (PAA Laboratories) and penicillin/streptomycin for 24 h. Subsequently the samples were prepared for mass spectrometry as described previously (49-51). Samples were analyzed on MALDI-target plates by matrix-assisted laser desorption ionization (Bruker Reflex III).

RESULTS

In order to analyze the A β species secreted by BACE-expressing cells we collected conditioned media from HEK 293 cells stably transfected with Swedish mutant β APP₆₉₅ (β APPsw) and BACE. Cells expressing either endogenous levels of BACE or moderate or high levels of transfected BACE were investigated (Fig. 1A). To prove the catalytic activity of BACE in these cell lines we performed *in vitro* activity assays using solubilized membranes of the respective cell lines (46). As expected we found substantially increased β -secretase activity in the cell line expressing high levels of BACE as compared with non-transfected cells or cells expressing low levels of BACE (data not shown). These cell lines were labeled with [³⁵S]methionine and conditioned media were immunoprecipitated with the anti-A β antibody 3926. Surprisingly, increasing BACE expression negatively correlated with A β production (Fig. 1B). This is consistent with previous findings by Vassar *et al.* (2) who observed reduced A β production despite increased BACE activity in cells transfected with β APPsw (2). This paradoxical finding raised the possibility that A β species produced under these conditions could either not be metabolically labeled or not detected by conventional gel electrophoresis. We thus used an independent method and attempted to identify secreted A β species by a combined immunoprecipitation/MALDI-TOF MS method. As expected cells expressing endogenous BACE secreted predominantly A β -(1-40) (Fig. 1C). In addition we also obtained small amounts of A β -(1-42) and A β -(1-37/38/39) (Fig. 1C). Upon expression of moderate levels of BACE we

observed an additional A β species (A β -(1-34); Fig. 1C). In order to analyze if the production of this truncated species is related to BACE expression levels, we next investigated A β species secreted from cells expressing higher levels of BACE (Fig. 1A). This revealed robust amounts of A β -(1-34), which was accompanied by reduced levels of A β -(1-40), A β -(1-42), and A β -(1-37/38/39) (Fig. 1C). Similar results were obtained using cell lines co-expressing wtAPP and BACE (data not shown). The detection of robust levels of A β -(1-34) upon expression of BACE explains the lack of its detection upon metabolic labeling, since the single radioactively labeled Met residue at position 35 of the A β peptide has been removed by the additional cleavage.

Although the above described results suggest that BACE is directly involved in the enhanced production of A β -(1-34), previous observations indicated that C-terminally truncated A β species including A β -(1-34) are generated by the γ -secretase complex in a PS-dependent manner (52, 53). In order to analyze if a PS-dependent γ -secretase activity is required for A β -(1-34) generation, we co-expressed BACE with either PS1 wt or the non-functional PS1 D385N mutant (Fig. 2A). As shown previously (42), PS1 wt undergoes endoproteolysis whereas no endoproteolysis was obtained in cells expressing PS1 D385N (Fig. 2A, right panel; Ref. 27). The non-functional PS1 D385N fully replaced biologically active endogenous PS (Fig. 2A, right panel). Whereas robust levels of A β -(1-34) and A β -(1-40) (and all other minor A β species) were produced from cells co-expressing PS1 wt and BACE, A β -(1-34) generation as well as generation of all other A β species was almost completely inhibited in the presence of the non-functional PS1 D385N (Fig. 2B, right panel). This clearly demonstrates that a PS-dependent γ -secretase activity is involved directly or indirectly in the production of A β -(1-34). However, the results described in Fig. 1, demonstrated that upon BACE

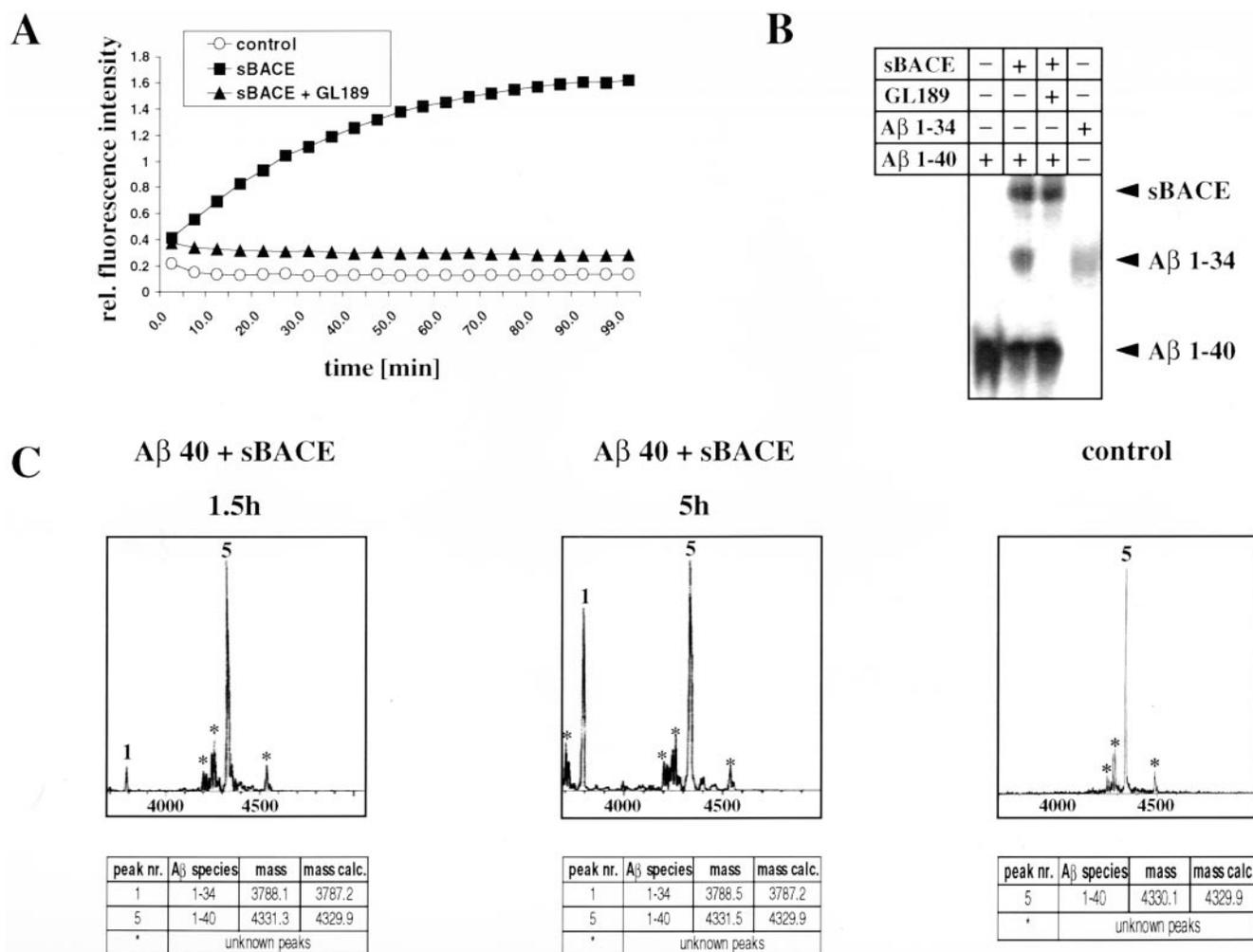


FIG. 3. BACE cleaves synthetic A β (1-40) after amino acid 34 *in vitro*. *A*, conditioned media from cells expressing sBACE were analyzed *in vitro* for β -secretase activity. Note that medium containing sBACE (filled squares) shows significant activity upon incubation with the fluorogenic substrate, while the control medium without sBACE (open circles) and sBACE in the presence of the specific BACE inhibitor GL189 (filled triangles) do not display activity. *B*, sBACE was incubated with 6 μ g of synthetic A β (1-40) overnight at 37 °C in the presence or absence of the inhibitor GL189. As a control the synthetic peptides A β (1-40) and A β (1-34) were co-migrated. The proteins were visualized by Coomassie Blue staining. Note the aberrant migration of A β (1-34). Significant *in vitro* production of an A β species co-migrating with synthetic A β (1-34) was obtained. The production of this peptide was fully inhibited by the specific BACE inhibitor GL189. *C*, analysis of *in vitro* produced A β (1-34) by MALDI-TOF MS. 50 μ g of synthetic A β (1-40) were incubated at 37 °C for 1, 5, or 8 h with purified sBACE or a control fraction not containing sBACE. The tables below the spectra indicate the peak masses measured (*mass*) and the respective masses calculated (*mass calc.*). Note that BACE is capable of producing A β (1-34) under *in vitro* conditions.

expression A β (1-34) generation occurs to the expense of the production of all other A β variants and thus suggests a direct involvement of BACE in the cleavage of A β at position 34. This apparent paradox may indicate that γ -secretase activity is required first to produce secreted A β species, which are then trimmed at their C termini by a so far unknown BACE activity.

In order to prove this hypothesis, synthetic A β (1-40) was incubated with purified BACE isolated from conditioned media of cells secreting a soluble version of BACE lacking the transmembrane domain and the C terminus (43). To prove the catalytic activity of secreted BACE we carried out *in vitro* assays (46). Soluble BACE was fully active in the *in vitro* assay, whereas no activity was obtained in control media (Fig. 3A). This activity was fully blocked by the BACE-specific inhibitor GL189 (Fig. 3A). Upon incubation of synthetic A β (1-40) with soluble BACE an additional peptide, which co-migrated with synthetic A β (1-34) was detected on a gel system capable to separate low molecular weight peptides (Fig. 3B; Ref. 54). *In vitro* generation of A β (1-34) was completely inhibited upon addition of the specific BACE in-

hibitor GL189 (Fig. 3B). Using MALDI-TOF MS we confirmed a time-dependent generation of A β (1-34) during incubation of soluble BACE with A β (1-40) (Fig. 3C). In contrast incubation of synthetic A β (1-40) with conditioned media, not containing soluble BACE does not reveal truncated A β species (Fig. 3C). This finding demonstrates that BACE has the ability to cleave A β after amino acid 34 and, together with the results shown in Fig. 1, excludes artificial trimming by exopeptidases.

Because *in vivo*, only very minor amounts of BACE are secreted (data not shown and Ref. 55) we next investigated if membrane-bound BACE can convert secreted A β (1-40/42) to A β (1-34) in living cells. To do so we collected conditioned media (Fig. 4A) from cells expressing β APPsw and endogenous BACE. These media were then added either to cells expressing PS1 D385N alone or to cells co-expressing PS1 D385N and BACE. Because of the lack of γ -secretase activity in the latter cell line almost no *de novo* synthesis of any A β species occurs (Ref. 42; compare also Fig. 2B). Therefore any truncation of A β should occur independent of γ -secretase activity. In conditioned media incubated with cells expressing PS1 D385N no

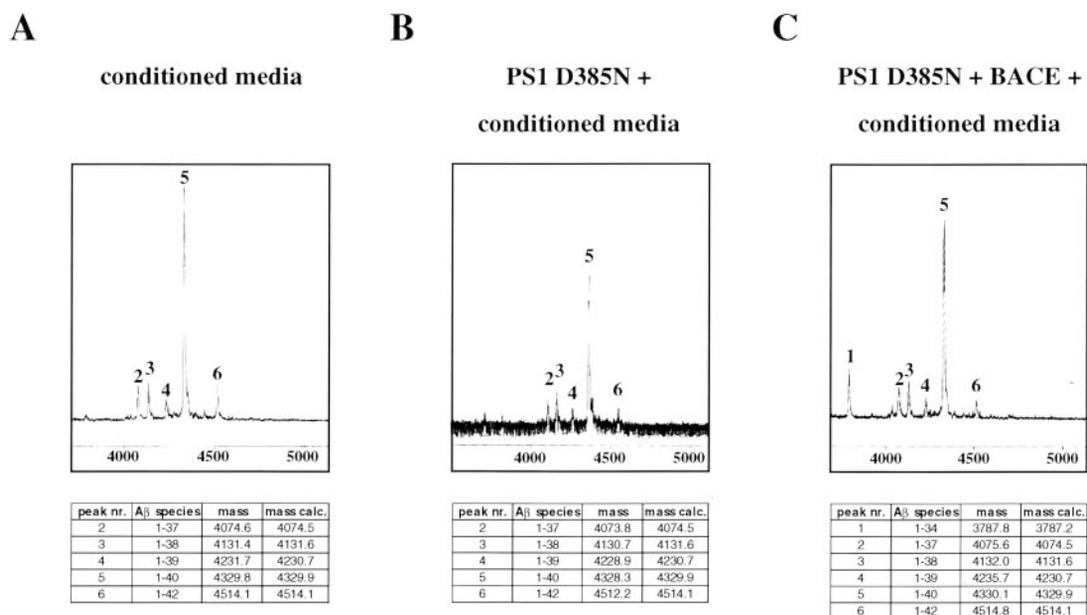


FIG. 4. Membrane-bound BACE generates A β (1–34) in living cells. A, HEK 293 cells stably expressing β APP₆₉₅ sw were incubated with Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum for 48 h. One-third of the conditioned media of HEK 293 cells was immunoprecipitated with antibody 3926. Immunoprecipitated A β was analyzed by MALDI-TOF MS. The remaining conditioned media (see A) was added to cells expressing either β APP₆₉₅ sw and PS1 D385N alone (B) or β APP₆₉₅ sw, PS1 D385N, and BACE (C). A β species were immunoprecipitated from the media after an incubation period of 24 h using antibody 3926. Subsequently samples were subjected to MALDI-TOF MS. The tables below the spectra indicate the peak masses measured (*mass*) and the respective masses calculated (*mass calc.*). Note that although no A β species are secreted in cells expressing PS1 D385N (compare Fig. 2), A β (1–34) is generated in conditioned media when BACE is overexpressed.

detectable conversion of A β (1–40) to A β (1–34) was observed (Fig. 4B). However, upon addition of the conditioned media to cells expressing both PS1 D385N and BACE, A β (1–34) was readily produced (Fig. 4C). Taken together these results demonstrate that BACE can proteolytically modify A β species, which were originally produced by a γ -secretase-dependent pathway.

While BACE is the protease with the major β -secretase activity (15–17), the homologous BACE-2 can also proteolytically process β APP to some extent (9, 13, 14, 56). To investigate if the BACE homologue BACE-2 may also be able to convert A β (1–40/42) into A β (1–34) we co-expressed wild type β APP together with either moderate or high levels of BACE-2 (Fig. 5A). Low level expression of BACE-2 allowed the recovery of very small amounts of A β (1–34), which were not detectable in cells expressing no exogenous BACE-2 (Fig. 5B). However, high level expression of BACE-2 allowed the generation of increased amounts of A β (1–34) thus demonstrating a BACE-2-dependent generation of A β (1–34). These data demonstrate that both BACE and BACE-2 have the unexpected ability to generate C-terminally truncated A β species.

DISCUSSION

BACE plays a central role in the pathogenesis of AD and appears to be the sole β -secretase, since its knock-out in mice fully abolishes A β generation (15–17). In addition and in contrast to the loss of γ -secretase activity the knock out of BACE has no obvious phenotype (15–17). Thus BACE became a primary target for the development of therapeutic strategies. However, very little is known about the biological function of BACE. In addition we do not yet know precisely where the major proteolytic activity of BACE is localized within the cell. BACE is co-translated into the endoplasmic reticulum (ER) as a pro-enzyme (43, 57). During its trafficking through the secretory pathway the pro-domain is removed, and complex glycosylation occurs (43, 57–61). Upon reaching the plasma membrane BACE is reinternalized and targeted to endosomes (44, 62). From endosomes BACE is retrieved in a phosphorylation-

dependent manner and transported back to the *trans*-Golgi network (44). Although BACE has an acidic pH optimum it is apparently active in early compartments such as the ER, since small amounts of A β can accumulate in pre-Golgi compartments (45). Work on the Swedish β APP mutation also demonstrated β -secretase activity within the *trans*-Golgi network (64). In contrast wild type β APP is apparently processed by BACE within early endosomes after reinternalization from the plasma membrane (65). So far no proteolytic activity of BACE was demonstrated on the cell surface. Here we show that A β can be truncated by BACE at its C terminus after its generation by γ -secretase (Fig. 6). Thus it appears likely that secreted A β is further processed by BACE at or close to the plasma membrane although we cannot exclude uptake of A β prior to its processing by BACE.

Our data demonstrate a novel cleavage site at position 34 of the A β domain. This was unexpected since full-length β APP is cleaved by BACE in a highly sequence-specific manner (66). Moreover, previous work demonstrated that *in vivo* a membrane bound substrate is required for recognition by BACE (66). Obviously, soluble A β escapes these requirements and is cleaved by BACE after amino acid 34 of the A β domain. This suggests that the initial cleavage of BACE at the Met-Asp bond of the A β domain occurs in a different structural context than the secondary cut at position 34. This latter cleavage occurs only after A β (1–40/42) generation, whereas the first cleavage requires the membrane bound precursor with a specific recognition sequence at the Met-Asp bond. Furthermore, BACE-2, which differs in its cleavage specificity of β APP (Fig. 6) by predominantly generating an α -secretase-like cleavage after amino acid 19 of the A β domain (9, 13, 14) is also able to generate A β (1–34) from A β (1–40/42). Both enzymes apparently share similar sequence requirements for recognition and cleavage of soluble A β but different preferences for cleavage of full-length β APP. This may also have implications for the search for physiological substrates of BACE. So far only a sialyltransferase (ST6 Gal 1) has been identified as a putative

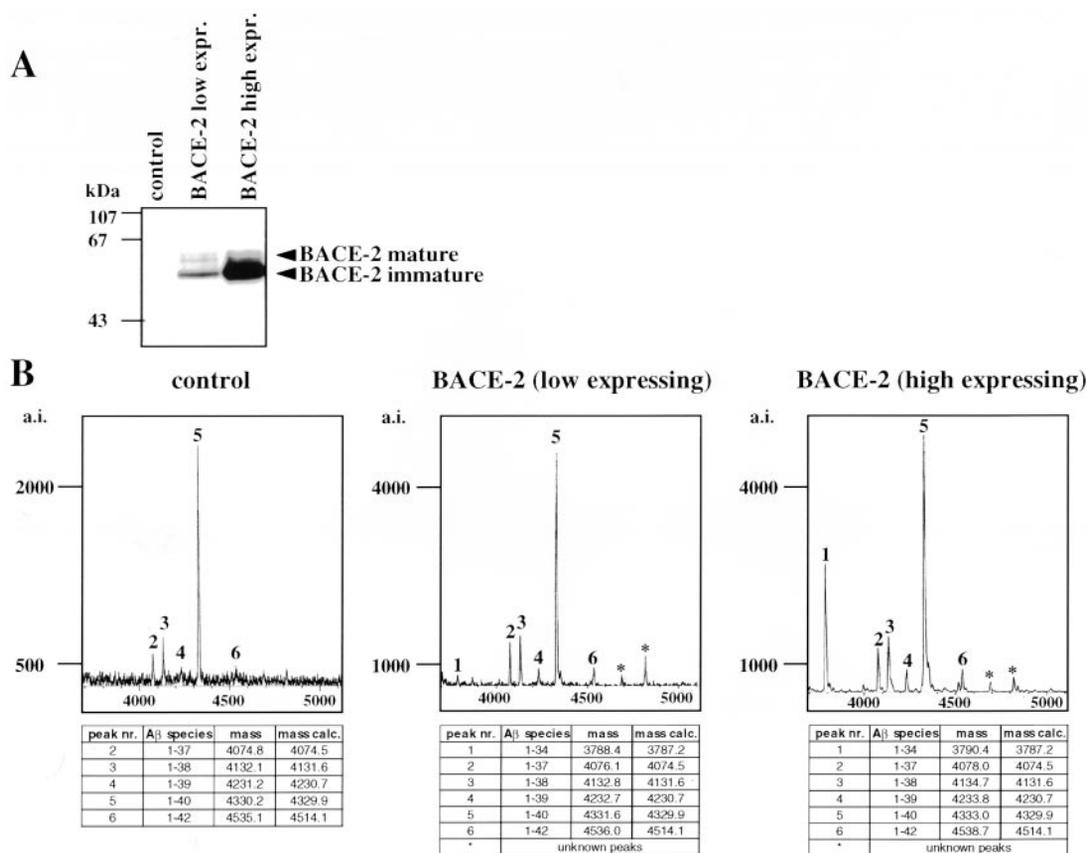


FIG. 5. A β (1-34) generation correlates with BACE-2 expression. *A*, membranes of HEK 293 cells stably overexpressing either β APP₆₉₅ wt (control; lane 1) or additionally BACE-2 (lanes 2 and 3) were probed with antibody 7524. Note the increasing amounts of BACE-2 expression in the three cell lines. Longer exposure reveals endogenous BACE-2 (data not shown). *B*, MALDI-TOF MS of A β peptides immunocaptured directly from conditioned media of the cell lines shown in *A*, using antibody 3926. Arbitrary intensities are given on the y-axis (*a.i.*). The tables below the spectra indicate the peak masses measured (*mass*) and the respective masses calculated (*mass calc.*). Note that A β (1-34) levels correlate with BACE-2 expression.

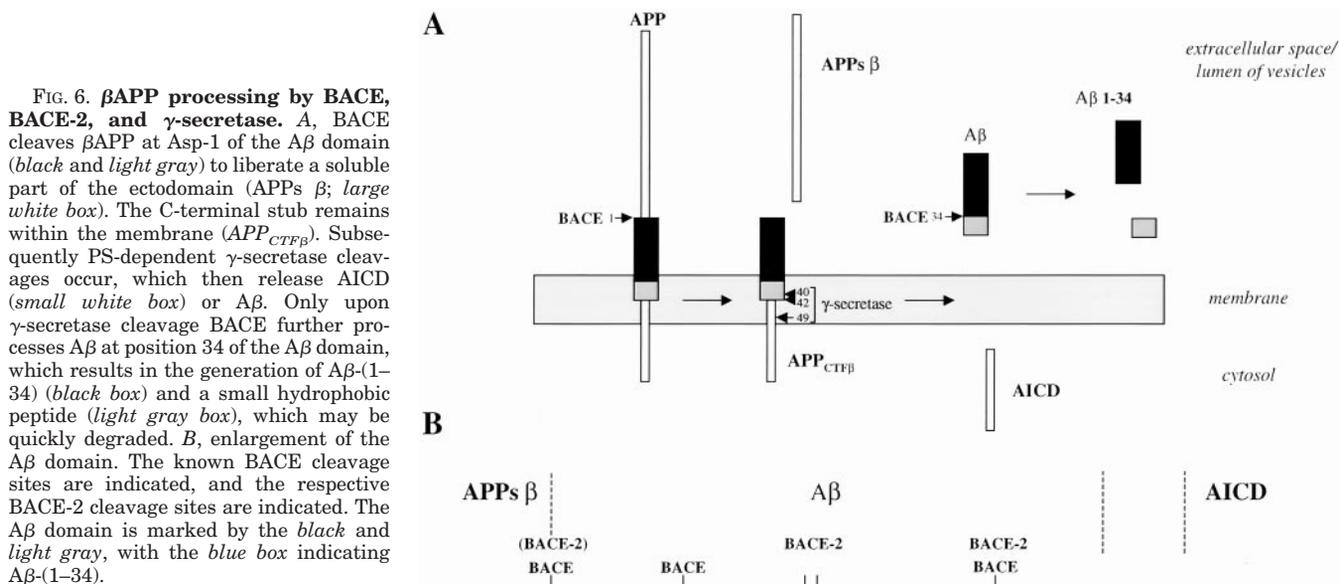


FIG. 6. β APP processing by BACE, BACE-2, and γ -secretase. *A*, BACE cleaves β APP at Asp-1 of the A β domain (black and light gray) to liberate a soluble part of the ectodomain (APPs β ; large white box). The C-terminal stub remains within the membrane (APP_{CTF β}). Subsequently PS-dependent γ -secretase cleavages occur, which then release AICD (small white box) or A β . Only upon γ -secretase cleavage BACE further processes A β at position 34 of the A β domain, which results in the generation of A β (1-34) (black box) and a small hydrophobic peptide (light gray box), which may be quickly degraded. *B*, enlargement of the A β domain. The known BACE cleavage sites are indicated, and the respective BACE-2 cleavage sites are indicated. The A β domain is marked by the black and light gray, with the blue box indicating A β (1-34).

BACE substrate beside β APP (67). Our results suggest that substrate-mimicking peptides have to be considered as natural BACE substrates *in vivo*.

A β (1-34) has been shown to exist *in vivo* (29). The novel cleavage activity of BACE and BACE-2 removes the most hy-

drophobic sequences of the A β domain. This may inhibit aggregation and thus facilitate proteolytic clearance by the insulin-degrading enzyme (68) or neprilysin (63, 69). Thus BACE may play an unexpected role in A β clearance.

Finally, our data also demonstrate that an apparently PS-

and γ -secretase-dependent cut is in fact mediated by BACE. Since the cleavage after amino acid 34 is fully dependent on the previous PS/ γ -secretase cleavage, the involvement of proteases in the generation of C-terminally truncated A β peptides may have been misinterpreted (52, 53). Moreover, our results also solve the apparent paradox that increased BACE expression results in reduced A β production (2), since the truncated A β -(1–34) species cannot be detected by autoradiography due to the loss of the Met residue at position 35 of the A β domain. Furthermore, under the electrophoretic conditions used (54), the peptide aberrantly migrates at a higher molecular weight as expected, again confusing the analysis of A β produced in BACE-expressing cells. Finally our findings may also suggest that substrate-mimetic peptides could represent a novel therapeutic approach *in vivo*.

Acknowledgments—We thank H. Steiner, P. Kahle, and A. Capell for critical discussion and Klaus Maskos and Luis Moroder for the generation of the BACE inhibitor GLL189.

REFERENCES

- Haass, C., and Steiner, H. (2002) *Trends Cell Biol.* **12**, 556–562
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. (1999) *Science* **286**, 735–741
- 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., Smith, T. S., Simmons, D. L., Walsh, F. S., Dingwall, C., and Christie, G. (1999) *Mol. Cell. Neurosci.* **14**, 419–427
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensari, S. M., Wang, S., Walker, D., and John, V. (1999) *Nature* **402**, 537–540
- 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., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L., and Gurney, M. E. (1999) *Nature* **402**, 533–537
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1456–1460
- Liu, K., Doms, R. W., and Lee, V. M. (2002) *Biochemistry* **41**, 3128–3136
- Huse, J. T., Liu, K., Pijak, D. S., Carlin, D., Lee, V. M., and Doms, R. W. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 16278–16284
- Fluhrer, R., Capell, A., Westmeyer, G., Willem, M., Hartung, B., Condron, M. M., Teplow, D. B., Haass, C., and Walter, J. (2002) *J. Neurochem.* **81**, 1011–1020
- Fan, W., Bennett, B., Babu-Khan, S., and Luo, Y. (1999) *Science* **286**, 1255a
- Saunders, A., Kim, T.-W., and Tanzi, R. (1999) *Science* **286**, 1255a
- Acquati, F., Accarino, M., Nucci, C., Fumagalli, P., Jovine, L., Ottolenghi, S., and Taramelli, R. (2000) *FEBS Lett.* **468**, 59–64
- Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D., and Choe, H. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 9712–9717
- Yan, R., Munzner, J. B., Shuck, M. E., and Bienkowski, M. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34019–34027
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J. C., Yan, Q., Richards, W. G., Citron, M., and Vassar, R. (2001) *Nat. Neurosci.* **4**, 231–232
- 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., Johnson-Wood, K., Kappenman, K. E., Kawabe, T. T., Kola, I., Kuehn, R., Lee, M., Liu, W., Motter, R., Nichols, N. F., Power, M., Robertson, D. W., Schenk, D., Schoor, M., Shopp, G. M., Shuck, M. E., Sinha, S., Svensson, K. A., Tatsuno, G., Tintrop, H., Wijsman, J., Wright, S., and McConlogue, L. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1317–1324
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., and Wong, P. C. (2001) *Nat. Neurosci.* **4**, 233–234
- Yu, G., Chen, F., Levesque, G., Nishimura, M., Zhang, D. M., Levesque, L., Rogava, E., Xu, D., Liang, Y., Duthie, M., St George-Hyslop, P. H., and Fraser, P. E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 16470–16475
- Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D. J., and Haass, C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 3205–3211
- Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogava, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D. S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D. M., Xu, D. H., Sato, C., Rogava, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebersold, R., Farrer, L. S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., and St George-Hyslop, P. (2000) *Nature* **407**, 48–54
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M. C., Parks, A. L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R. L., Himes, C. S., Hiebsch, R. D., Ruble, C., Nye, J. S., and Curtis, D. (2002) *Dev. Cell* **3**, 85–97
- Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V. A., and Priess, J. R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 775–779
- Edbauer, D., Winkler, E., Haass, C., and Steiner, H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8666–8671
- Steiner, H., Winkler, E., Edbauer, D., Prokop, S., Basset, G., Yamasaki, A., Kostka, M., and Haass, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 39062–39065
- Lee, S., Shah, S., Li, H., Yu, C., Han, W., and Yu, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 45013–45019
- Leem, J. Y., Vijayan, S., Han, P., Cai, D., Machura, M., Lopes, K. O., Veselits, M. L., Xu, H., and Thinakaran, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 19236–19240
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999) *Nature* **398**, 513–517
- Selkoe, D. J. (2001) *Physiol. Rev.* **81**, 741–766
- Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S. E., and Sisodia, S. S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31894–31902
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M. M., Teplow, D. B., and Haass, C. (2001) *EMBO Rep.* **2**, 835–841
- Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., and Ihara, Y. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 35235–35238
- Yu, C., Kim, S. H., Ikeuchi, T., Xu, H., Gasparini, L., Wang, R., and Sisodia, S. S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 43756–43760
- Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F. B., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C. L., Beyreuther, K., and Evin, G. (2002) *Biochemistry* **41**, 2825–2835
- Cao, X., and Südhof, T. C. (2001) *Science* **293**, 115–120
- Baek, S. H., Ohgi, K. A., Rose, D. W., Koo, E. H., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2002) *Cell* **110**, 55–67
- Mumm, J. S., and Kopan, R. (2000) *Dev. Biol.* **228**, 151–165
- Hadland, B., Manley, N., Su, D. M., Longmore, G., Moore, C., Wolfe, M., Schroeter, E., and Kopan, R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7487–7491
- Doerfler, P., Shearman, M. S., and Perlmutter, R. M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9312–9317
- Geling, A., Steiner, H., Willem, M., Bally-Cuif, L., and Haass, C. (2002) *EMBO Rep* **3**, 688–694
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1992) *Nature* **359**, 322–325
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D. J. (1992) *Nature* **360**, 672–674
- Steiner, H., Romig, H., Pesold, B., Philipp, U., Baader, M., Citron, M., Loetscher, H., Jacobsen, H., and Haass, C. (1999) *Biochemistry* **38**, 14600–14605
- Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 30849–30854
- Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 14634–14641
- Wild-Bode, C., Yamazaki, T., Capell, A., Leimer, U., Steiner, H., Ihara, Y., and Haass, C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16085–16088
- Capell, A., Meyn, L., Fluhrer, R., Teplow, D. B., Walter, J., and Haass, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 5637–5643
- Steiner, H., Romig, H., Grim, M. G., Philipp, U., Pesold, B., Citron, M., Baumeister, R., and Haass, C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7615–7618
- Walter, J., Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Schindzielorz, A., Prior, R., Podlitsny, M. B., Fraser, P., Hyslop, P. S., Selkoe, D. J., and Haass, C. (1996) *Mol. Med.* **2**, 673–691
- Kulic, L., Walter, J., Multhaup, G., Teplow, D. B., Baumeister, R., Romig, H., Capell, A., Steiner, H., and Haass, C. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5913–5918
- Lammich, S., Okochi, M., Takeda, M., Kaether, C., Capell, A., Zimmer, A.-K., Edbauer, D., Walter, J., Steiner, H., and Haass, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 44754–44759
- Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tani, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Haass, C., and Takeda, M. (2002) *EMBO J.* **21**, 5408–5416
- Vandermeeren, M., Geraerts, M., Pype, S., Dillen, L., Van Hove, C., and Mercken, M. (2001) *Neurosci. Lett.* **315**, 145–148
- Behr, D., Wrigley, J. D., Owens, A. P., and Shearman, M. S. (2002) *J. Neurochem.* **82**, 563–575
- Wiltfang, J., Smirnov, A., Schnierstein, B., Kelemen, G., Matthies, U., Klafki, H. W., Staufienbiel, M., Huther, G., Ruther, E., and Kornhuber, J. (1997) *Electrophoresis* **18**, 527–532
- Benjannet, S., Elagoz, A., Wickham, L., Mamarbachi, M., Munzer, J. S., Basak, A., Lazure, C., Cromlish, J. A., Sisodia, S., Checler, F., Chretien, M., and Seidah, N. G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 10879–10887
- Hussain, I., Powell, D. J., Howlett, D. R., Chapman, G. A., Gilmour, L., Murdock, P. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., Schneider, K., Ratcliffe, S. J., Tattersall, D., Testa, T. T., Southan, C., Ryan, D. M., Simmons, D. L., Walsh, F. S., Dingwall, C., and Christie, G. (2000) *Mol. Cell Neurosci.* **16**, 609–619
- Haniu, M., Denis, P., Young, Y., Mendiaz, E. A., Fuller, J., Hui, J. O., Bennett, B. D., Kahn, S., Ross, S., Burgess, T., Katta, V., Rogers, G., Vassar, R., and Citron, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 21099–21106
- Bennett, B. D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D. B., Kahn, S., Louis, J. C., Citron, M., and Vassar, R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 37712–37717
- Creemers, J. W., Ines Dominguez, D., Plets, E., Serneels, L., Taylor, N. A., Multhaup, G., Craessaerts, K., Annaert, W., and De Strooper, B. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 4211–4217
- Charlwood, J., Dingwall, C., Matico, R., Hussain, I., Johanson, K., Moore, S., Powell, D. J., Skehel, J. M., Ratcliffe, S., Clarke, B., Trill, J., Sweitzer, S., and Camilleri, P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 16739–16748
- Pinnix, I., Council, J. E., Roseberry, B., Onstead, L., Mallender, W., Susic, J., and Sambamurti, K. (2001) *FASEB J.* **15**, 1810–1812

62. Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M., and Doms, R. W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 33729–33737
63. Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H. J., and Saido, T. C. (2001) *Science* **292**, 1550–1552
64. Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., and Selkoe, D. J. (1995) *Nat. Med.* **1**, 1291–1296
65. Koo, E. H., and Squazzo, S. L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 17386–17389
66. Citron, M., Teplow, D., and Selkoe, D. (1995) *Neuron* **14**, 661–670
67. Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T. C., and Hashimoto, Y. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13554–13559
68. Kurochkin, I. V. (2001) *Trends Biochem. Sci.* **26**, 421–425
69. Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H. J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., and Saido, T. C. (2000) *Nat. Med.* **6**, 143–150