

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

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

Analyse der BACE-1-Regulation in der
Alzheimer-Krankheit und im Down-Syndrom

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

vorgelegt von

Katharina Schraner

aus

Moosburg a. d. Isar

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Florian Heinen

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Michael Willem

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

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Allgemeine Einführung in die Alzheimer-Krankheit.....	5
1.2	Molekularbiologische Grundlagen der Alzheimer-Krankheit	7
1.2.1	Amyloid-Kaskaden-Hypothese.....	7
1.2.2	Proteolytische Prozessierung von β APP	10
1.2.2.1	Die α -Sekretase und BACE-2	12
1.2.2.2	Der γ -Sekretase-Komplex	13
1.2.2.3	Die β -Sekretase BACE-1	16
1.2.3	BACE-1 Regulation in der Alzheimer-Krankheit.....	19
1.2.4	p25 und cdk5 in der Alzheimer-Krankheit	20
1.3	Die Alzheimer-Erkrankung bei Individuen mit Down-Syndrom	21
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	25
2	Material und Methoden	27
2.1	Proteinbiochemische Methoden.....	27
2.1.1	Gewinnung der humanen Gehirnproben	27
2.1.2	Homogenisierung der humanen Gehirnproben.....	27
2.1.3	Membranpräparation.....	28
2.1.4	Zellyse.....	29
2.1.5	Proteinbestimmung	30
2.1.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.1.7	Western-Blot-Analyse.....	32
2.2	Zellkultur.....	35
2.2.1	Zelllinien	35
2.2.2	Kulturmedien	39
2.2.3	Zellkultivierung.....	39
2.2.4	Transfektion von DNA und Selektion stabiler Transfektanten.....	41
2.3	BACE-1-Aktivitätsuntersuchung	41
2.4	Molekularbiologische Methoden	43
2.4.1	RNA-Isolation	43
2.4.2	Northern-Blot-Analyse.....	43
2.4.3	Agarosegelelektrophorese.....	45
2.4.4	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	45
2.4.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	45
2.4.6	Dephosphorylierung von DNA	46
2.4.7	Ligation von DNA	46
2.4.8	Herstellung kompetenter E. coli-Bakterien.....	46
2.4.9	Transformation von DNA-Konstrukten in kompetente E. coli-Bakterien.....	47
2.4.10	Präparation von Plasmidvektoren im kleinen Maßstab (Mini-Präp)	47
2.4.11	Präparation von Plasmidvektoren im großen Maßstab (Maxi-Präp)	48

Inhaltsverzeichnis

3	Ergebnisse	49
3.1	Expression von BACE-1 und β APP im Gehirn von Down-Syndrom- und Alzheimer-Demenz-Patienten	49
3.1.1	Analyse der Proteinexpression von BACE-1 und β APP im Gehirn von Down-Syndrom- und Alzheimer-Demenz-Patienten	50
3.1.2	Quantifizierung der Proteinexpression von BACE-1 und β APP im Gehirn von Down-Syndrom- und Alzheimer-Demenz-Patienten im RIPA-Lysat	55
3.2	Auswirkungen von p25 auf die BACE-1-Expression im Zellmodell	57
3.2.1	Erhöhte BACE-1-Proteinkonzentrationen in Sp25-Zellen	58
3.2.2	Erhöhte BACE-1-Aktivitäten in Sp25-Zellen.....	60
3.2.3	Unveränderte BACE-1-Proteinexpression in Sp35-Zellen.....	61
3.2.4	Northern-Blot-Analyse der BACE-1-mRNA in Sp25-Zellen.....	63
3.2.5	p25-Überexpression in murinen Neuroblastomazellen (N2a-Zellen).....	64
4	Diskussion	67
4.1	Expression von BACE-1 und β APP im Gehirn von Down-Syndrom- und Alzheimer-Demenz-Patienten	68
4.1.1	Analyse der Proteinexpression von BACE-1 und β APP im Gehirn von Down-Syndrom- und Alzheimer-Demenz-Patienten.....	68
4.1.2	Quantifizierung der Proteinexpression von BACE-1 und β APP im RIPA-Lysat	70
4.2	Sp25 – Ein Zellmodell zur BACE-1-Regulation	71
4.2.1	Erhöhte BACE-1-Proteinexpression in Sp25-Zellen im Gegensatz zu Sp35-Zellen	72
4.2.2	Analyse der mRNA-Expression in Sp25-Zellen.....	73
4.2.3	Keine BACE-1-Hochregulation in p25-überexprimierenden N2a-Zellen.....	75
5	Zusammenfassung und Ausblick	77
	Literaturverzeichnis.....	78
	Abkürzungsverzeichnis	91
	Danksagung	95
	Lebenslauf	96

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung in die Alzheimer-Krankheit

„Wie heißen Sie?“

„Auguste.“

„Und Ihr Nachname?“

„Auguste.“

„Wie lautet der Name Ihres Ehemannes?“

„Auguste.“

So lautete der Dialog zwischen der Patientin Auguste D. und ihrem Arzt Alois Alzheimer (siehe Abb. 1) im Jahre 1901 (1). Sechs Jahre später, nach dem Tod der Auguste D., brachte A. Alzheimer zum ersten Mal in seiner Veröffentlichung „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ die klinische Symptomatik der Erkrankung mit den neuropathologischen Befunden (Amyloid-Plaques und neurofibrilläre Bündel) in Zusammenhang (2) und schuf damit den Beginn der Forschung über die nach ihm benannte Demenz vom Alzheimer-Typ.



Abbildung 1: Alois Alzheimer (1864-1915) [Quelle: (3)]

Einleitung

Mittlerweile stellen die Demenzen mit einer Prävalenz von 250/100 000 Einwohner ein großes gesellschaftliches Problem dar. Neben anderen Demenzformen, wie die frontotemporalen und vaskulären Demenzen, ist die Demenz vom Alzheimer-Typ mit 60% die häufigste Form. In Deutschland sind derzeit ca. 1 000 000 Menschen betroffen, bei Personen über 84 Jahre beträgt die Prävalenz sogar ca. 30% (Masuhr und Neumann, Neurologie, Duale Reihe, Thieme Verlag, 2005).

Die Erkrankung manifestiert sich meist ab dem 65. Lebensjahr mit langsam progredienten Gedächtnis-, Orientierungs- und Aufmerksamkeitsstörungen. Die Patienten verlieren zunehmend ihre Selbstständigkeit, werden inkontinent und pflegebedürftig. Daraus ergeben sich Komplikationen wie Dekubitus, Lungenembolie oder Pneumonie, woran die Patienten in der Regel nach einer Krankheitsdauer von 5 bis 8 Jahren versterben (Masuhr und Neumann, Neurologie, Duale Reihe, Thieme Verlag, 2005).

Neben der am häufigsten vorkommenden sporadischen Alzheimer-Demenz beruhen 5-10% der Fälle auf genetisch vererbten Mutationen. Man nennt diese vererbte Form der Erkrankung, bei der die betroffenen Individuen wesentlich früher erkranken, FAD (familial Alzheimer's disease). Anhand dieser familiären Form der Erkrankung wurden drei Gene für die Entstehung der Demenz entdeckt, β APP (β -amyloid precursor protein), PS (presenilin) 1 und 2 (4-7).

Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem späten Beginn der Krankheit gehäuft das ApoE ϵ 4-Allel tragen. Daher konnte das ApoE ϵ 4-Allel als Risikofaktor für die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung identifiziert werden (8,9).

Neuropathologische Korrelate sind die Amyloid-Plaques (siehe Abb. 2A) und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (siehe Abb. 2B), die aus Aggregaten des mikrotubulus-assoziierten Proteins Tau zusammengesetzt sind (10). Die Amyloid-Plaques bestehen hauptsächlich aus extrazellulären Aggregaten des 39 bis 43 Aminosäuren langen Amyloid- β -Proteins ($A\beta$) (11), wobei $A\beta$ 42 den größten Anteil bildet (12).

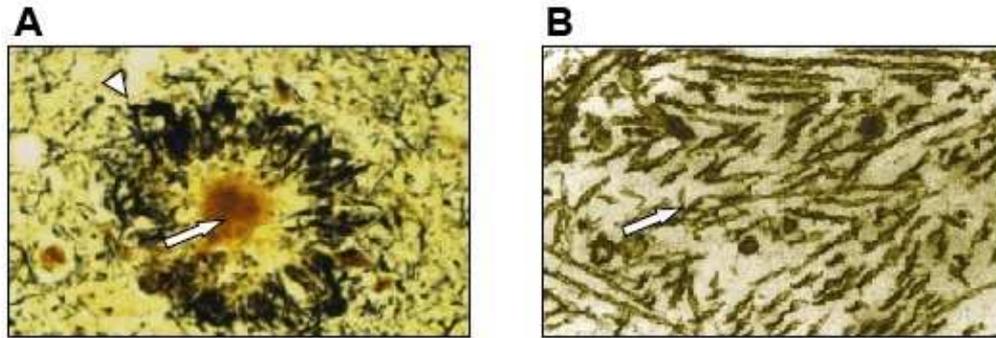


Abbildung 2: Neuropathologische Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit

A: Mikroskopische Aufnahme eines Amyloid-Plaques (Pfeil), umgeben von dystrophen Neuriten (Pfeilspitze)

B: Elektronenmikroskopische Aufnahme neurofibrillärer Bündel (Pfeil) [Quelle: (13)]

1.2 Molekularbiologische Grundlagen der Alzheimer-Krankheit

1.2.1 Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Der Zusammenhang zwischen den neuropathologischen Kennzeichen der Demenz, Amyloid-Plaques und neurofibrillären Bündeln, und dem klinischen Erscheinungsbild, den A. Alzheimer bereits vor über 100 Jahren erkannt hatte, wirft bis heute große Fragen auf. Das wohl anerkannteste Erklärungsmodell, die Amyloid-Kaskaden-Hypothese (14,15), geht davon aus, dass das Amyloid- β -Protein ($A\beta$), im Speziellen das aus 42 Aminosäuren bestehende $A\beta_{42}$, am Anfang einer Kaskade von Ereignissen steht. $A\beta$ ist somit der Auslöser dieser fatalen Erkrankung. Neueste Forschungsergebnisse geben Anlass sich von der früheren Vorstellung zu entfernen, die die großen unlöslichen Amyloid-Plaques an den Anfang der Kaskade gestellt hat. Studien zeigen, dass die Menge an löslichem $A\beta$ besser mit der Stärke des kognitiven Verfalls korreliert, als die Anzahl der Amyloidplaques im Gehirn (16-19). Durch Injektion von natürlichen löslichen $A\beta$ -Oligomeren konnte in Ratten eine verminderte Langzeitpotentiation (elektrophysiologisches Korrelat für Lernen und Gedächtnis) im Hippocampus (20) und eine Verschlechterung der Gedächtnisfunktion in Bezug auf erlerntes Verhalten (21) nachgewiesen werden. Interessant ist, dass der Effekt der natürlichen $A\beta$ -Oligomere auf die Langzeitpotentiation durch die Gabe von anti- $A\beta$ -

Einleitung

Antikörpern (sowohl mit aktiver als auch mit passiver Immunisation) in vivo neutralisiert werden konnte (22). Diese Erkenntnis eröffnet neue Ansätze in der Therapie der Erkrankung. Die anti-A β -Immunotherapie stellt so eine zukünftige erfolgsversprechende Behandlungstherapie dar (23,24).

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese (siehe Abb. 3) stellt Veränderungen im A β -Metabolismus an den Anfang der Kaskade. Die Gesamtmenge an A β kann entweder durch erhöhte Produktion und bzw. oder durch einen verminderten Abbau erhöht sein. Von Bedeutung ist die relative Erhöhung von A β 42 (erhöhtes Verhältnis von A β 42 zu A β 40), da A β 42 in vivo die höchste Neigung besitzt Oligomere zu bilden (25). Die A β -Oligomere sind, in einer bis dato nicht verstandenen Weise, in der Lage die Funktion der Synapsen zu beeinträchtigen. Man vermutet, dass sich die löslichen Oligomere an spezifische Rezeptoren der Synapsenplasmamembran binden, wodurch selektive Störungen in einer ausgewählten Gruppe von Neuronen verursacht werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Oligomere nicht-spezifisch an eine Vielzahl von Rezeptoren und Kanalproteine binden, wodurch eine Vielzahl von ungünstigen Signaleffekten hervorgerufen wird. Gleichzeitig bildet A β im Gehirnparenchym mikroskopisch sichtbare, nicht-fibrilläre (diffuse) Ablagerungen und fibrilläre A β -Plaques. Ebenso können lokale Entzündungsreaktionen (Mikrogliose, Astrocytose), Verlust von Nervenfortsätzen und Neuritendystrophie beobachtet werden. Mit der Zeit führen diese Ereignisse zu einer Anzahl von biochemischen Veränderungen wie z.B. oxidativem Stress, einer Beeinträchtigung des Ionen-Gleichgewichts (z.B. Calcium) und bzw. oder zu einer veränderten Aktivität von Kinasen und Phosphatasen (22).

Ein Beispiel dafür stellt die abnorme Phosphorylierung des Tau-Proteins durch die GSK3 (glykogen synthase kinase 3) und cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) dar (26,27). Das Tau-Protein ist dafür verantwortlich, die Mikrotubuli, wichtige Bestandteile des Zytoskeletts, zu stabilisieren. Das hyperphosphorylierte Tau-Protein dissoziiert jedoch von den Mikrotubuli, die dadurch destabilisiert werden, ab und bildet die zuvor beschriebenen Tangles (27).

Die Kaskade führt schließlich zur neuronalen Dysfunktion, zum Zelltod und dem damit einhergehenden Transmittermangel (22).

Einleitung

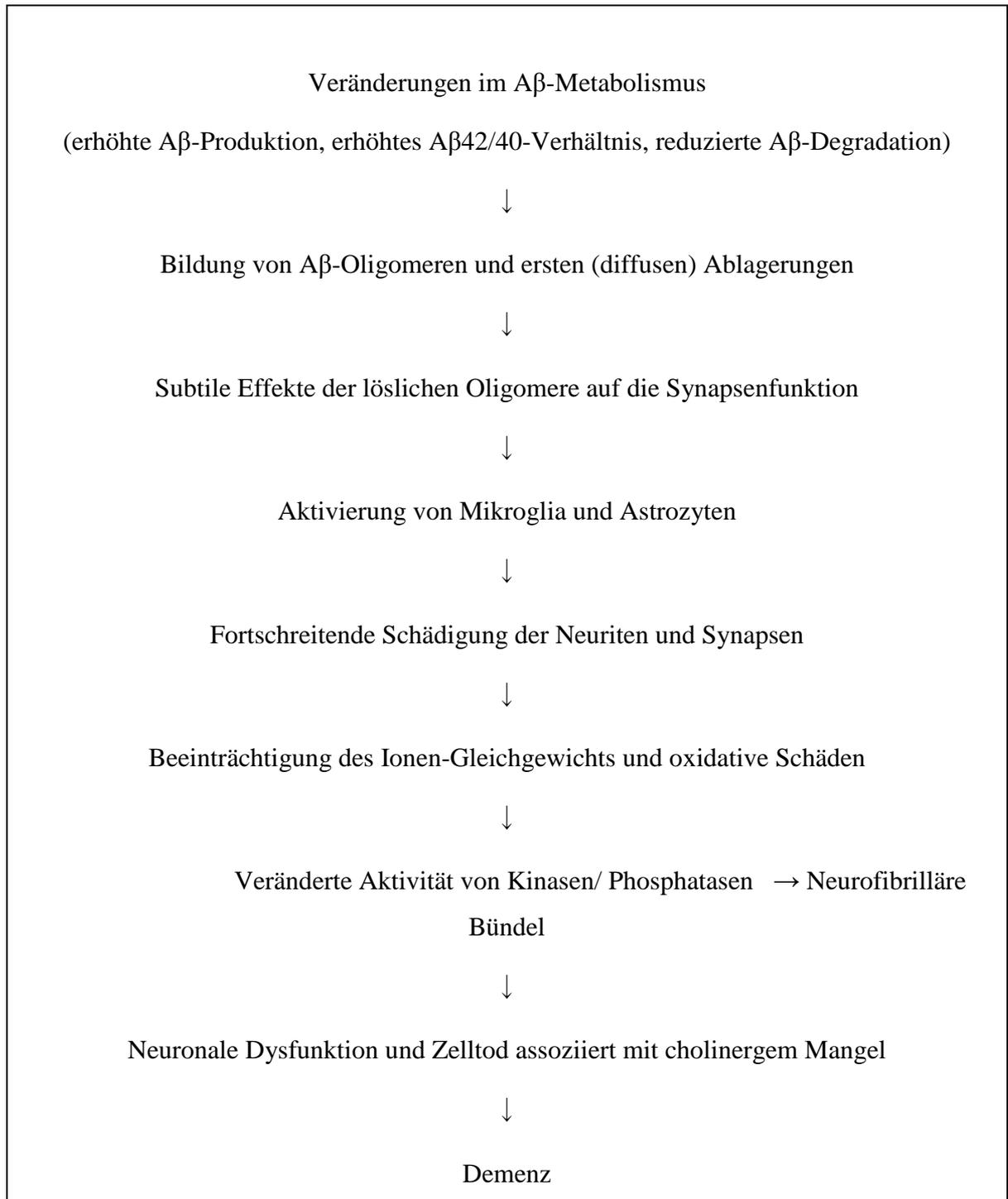


Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese
[Quelle: modifiziert nach (28)]

1.2.2 Proteolytische Prozessierung von β APP

Das β APP (β -Amyloid Precursor Protein) ist ein Typ I Transmembranprotein, das vom endoplasmatischen Retikulum zur Zelloberfläche transportiert wird. Während dieses Transportes reift es durch N- und O-Glykosylierungen, Sulfatierung und Phosphorylierung (29-31).

A β entsteht durch proteolytische Prozessierung (32) von β APP (siehe Abb. 4 und 5), indem zuerst die β -Sekretase BACE-1 (β -site APP cleaving enzyme 1) und anschließend der γ -Sekretase-Komplex das β -Amyloid-Vorläufer-Protein β APP schneiden. Außerdem existiert noch ein weiterer Prozessierungsmechanismus, der der Bildung von A β entgegenwirkt. Bei diesem schneidet anstelle der β -Sekretase die α -Sekretase.

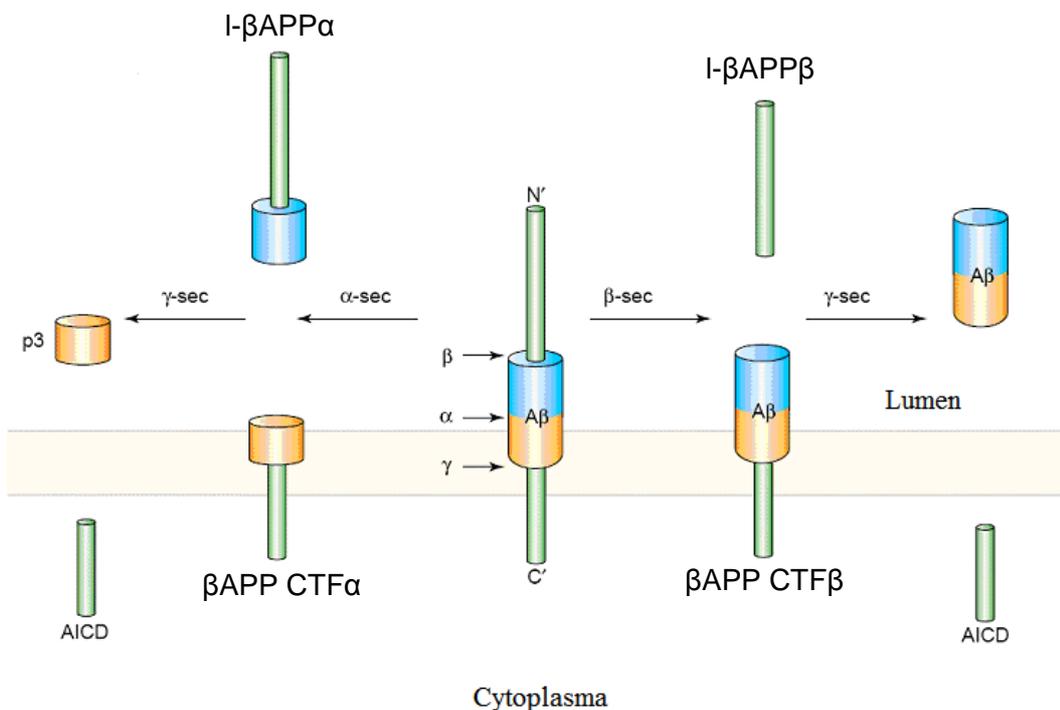


Abbildung 4: Prozessierung von β APP durch die α -, β - und γ -Sekretase

Das Schema zeigt β APP mit der A β -Domäne (blauer und oranger Zylinder). Dargestellt ist die Prozessierung durch die α -/ γ -Sekretase bzw. β -/ γ -Sekretase und die entstehenden Prozessierungsprodukte, p3 und A β . I- β APP α/β , lösliches β APP α/β ; β APP CTF α/β , β APP C-terminales Fragment α/β ; AICD, β APP-Intrazellulär-Domäne; sec, Sekretase [Quelle: modifiziert nach (33)]

Einleitung

A β (siehe Abb. 4, rechte Seite) entsteht, indem die β -Sekretase BACE-1 β APP an der β -Schnittstelle (Aspartat1) schneidet und damit das lösliche β APP β und das membrangebundene C-terminale Fragment β (β APP CTF β) generiert (34-38). Das C-terminale Fragment β kann nun von dem γ -Sekretase-Komplex weiter in Richtung C-Terminus gespalten werden, um A β zu bilden. Der Schnitt der γ -Sekretase ist variabel. So können A β -Peptide bestehend aus 37 bis zu 48 Aminosäuren nachgewiesen werden (39), wobei A β 40 am häufigsten gebildet wird und der Anteil von A β 42 nur 5-10% beträgt (12). Zusätzlich kann BACE-1 auch an einer weiteren Schnittstelle (Glutamat11) angreifen (siehe Abb. 5). Dieser Schnitt führt zu einer N-terminal verkürzten A β -Form (35,40-42).

Der antiamyloidogene Prozessierungsweg wirkt der Produktion von A β entgegen (siehe Abb. 4, linke Seite). Zuerst schneidet die α -Sekretase innerhalb der A β -Region, um das lösliche β APP α in das Lumen freizusetzen. Anschließend wird das in der Membran verbliebene β APP CTF α von der γ -Sekretase gespalten und damit das Produkt dieser Prozessierung, p3, freigesetzt (43-45).

Bei beiden Prozessierungswegen wird durch die Proteolyse des γ -Sekretase-Komplexes die β APP-Intrazellular-Domäne (AICD) in das Cytosol freigesetzt (46,47). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass BACE-1 (und BACE-2 (siehe 1.2.2.1)) A β nach dem γ -Schnitt an der Aminosäure 34 schneiden kann (48-50) (siehe Abb. 5).

Einleitung

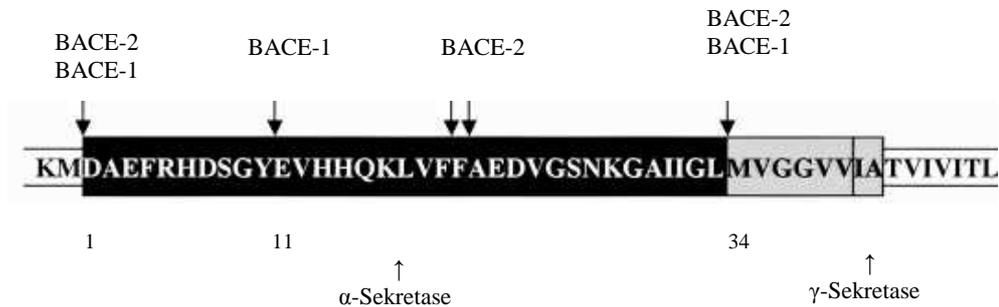


Abbildung 5: Prozessierung von β APP

Dargestellt ist ein Abschnitt von β APP, der die A β -Domäne enthält. β APP wird von BACE-1 an der Aminosäure Aspartat1 geschnitten, wobei das lösliche β APP β entsteht. Jedoch ist auch ein Schnitt an der Aminosäure Glutamat11 möglich. BACE-2 schneidet β APP innerhalb der A β -Domäne an den Aminosäuren 19 und 20, jedoch auch in einem geringeren Ausmaß an der β -Schnittstelle Asp1. Die α -Sekretase schneidet ebenfalls innerhalb der A β -Domäne. Nach der Prozessierung durch die α - und β -Sekretase schneidet die γ -Sekretase vorwiegend an den Aminosäuren 38/40/42/46/49. Sowohl für BACE-1 als auch für BACE-2 konnte nach dem γ -Schnitt ein Schnitt an der Aminosäure 34 nachgewiesen werden. [modifiziert nach (49)]

1.2.2.1 Die α -Sekretase und BACE-2

Als α -Sekretasen (siehe Abb. 5), die den antiamyloidogenen Prozessierungsweg initiieren (43-45), konnten membrangebundene Zink-Metalloproteasen (51) identifiziert werden. Für mehrere Proteasen der ADAM-Familie (a disintegrin and metalloproteinase), darunter ADAM 9 (52), ADAM 10 (53) und ADAM 17 (54,55), wurde die α -Sekretasen-Aktivität beschrieben.

Neben den α -Sekretasen der ADAM-Familie konnte eine weitere Protease, BACE-2 (β -site APP cleaving enzyme 2), mit einer α -ähnlichen Aktivität nachgewiesen werden (siehe Abb. 5) (42,56). Die homologen Proteasen BACE-1 und BACE-2 stimmen in 64% der Aminosäuresequenz überein (57). Die Aspartylprotease BACE-2 zeigt sich in Bezug auf eine luminal Glykosylierungsstelle, einem luminalen Cysteinbereich, der Signalpeptidschnittstelle und der Transmembrandomäne der β -Sekretase konserviert (58). In-vitro Versuche zeigen, dass BACE-2 β APP an der β -Sekretase Schnittstelle schneiden kann. Dies geschieht jedoch mit einer sehr geringen Effizienz (56,59,60). Es konnte nachgewiesen werden, dass BACE-2, ähnlich wie die α -Sekretase, β APP hauptsächlich

innerhalb der A β -Region, an den Aminosäuren 19 und 20, schneidet und somit die Bildung von A β verhindert (42).

1.2.2.2 Der γ -Sekretase-Komplex

Die γ -Sekretase ist eine bemerkenswerte Protease, da sie es vermag innerhalb der hydrophoben Umgebung der Membran ihr Substrat zu schneiden. Sie besteht aus vier Proteinen (siehe Abb. 6), die alle zusammen notwendig sind, um die Aktivität der Protease zu entfalten. Der Komplex setzt sich aus Presenilin-1 (PS1) oder Presenilin-2 (PS2), Nicastrin (Nct), anterior pharynx-defective phenotype (APH-1) und PS-enhancer (PEN-2) zusammen (61-64). Nachdem die β -Sekretase BACE-1 β APP geschnitten hat, kann das in der Membran verbleibende C-terminale Fragment β (CTF β) zum aktiven Zentrum des γ -Sekretase-Komplexes transferiert werden. Für die Aktivität der γ -Sekretase sind die Aspartate der Transmembrandomänen 6 und 7 von PS1/PS2 essentiell. Dies konnte gezeigt werden, indem die Aspartate der Transmembrandomänen 6 und 7 mutiert wurden. Die A β -Produktion ließ sich bereits durch die Mutation von einem der Aspartate vollständig verhindern (65,66). PS1 und PS2 werden durch Autoproteolyse der zytosolischen Schleife zwischen den Transmembrandomänen 6 und 7 aktiviert, wodurch ein N- und ein C-terminales Ende (NTF, CTF) entsteht (67), die aneinander gebunden (68) in einem hochmolekularen Proteinkomplex in der Zelle vorliegen (69). Im Gegensatz zu anderen Aspartylproteasen, wie zum Beispiel BACE-1, enthält PS jedoch kein D(T/S)G(T/S)-Motiv im aktiven Zentrum, sondern ein GxGD-Motiv um das kritische Aspartat in der Transmembrandomäne 7 (70). Der γ -Sekretase-Komplex ist in der Lage CTF β an verschiedenen Stellen innerhalb der Transmembrandomäne (ϵ -, ζ - und γ -Schnittstelle, siehe Abbildung 6b) zu schneiden. Es wird angenommen, dass der ϵ -Schnitt die Intrazellulardomäne (ICD) ins Cytosol freisetzt (46,71,72). Das restliche in der Membran verankerte Fragment kann dann an der ζ -Schnittstelle weiter prozessiert werden (39,73), bevor es letztendlich an der γ -Schnittstelle gespalten wird und damit A β freigesetzt wird. Der variable γ -Schnitt tritt mindestens nach den Aminosäuren 38, 40 oder 42 (die Nummern beziehen sich auf die A β -Sequenz) auf (28). Da A β 42 in vivo die höchste

Einleitung

Neigung besitzt Oligomere zu bilden (25), spielt die Lokalisation des γ -Schnittes eine wichtige Rolle in der Pathogenität von A β .

Momentan sind mehr als 160 Punktmutationen (74) im PS1-Gen und einige wenige im PS2-Gen bekannt, die mit einer familiären Form der Alzheimer-Erkrankung einhergehen. Die meisten Mutationen haben zur Folge, dass das Verhältnis A β 42 zu A β 40 erhöht ist. Das kann darauf beruhen, dass CTF β bzw. die längeren A β -Spezies häufiger nach der Aminosäure 42 als nach der Aminosäure 40 geschnitten werden und so mehr A β 42 als A β 40 gebildet wird (15,39). Es kann jedoch auch möglich sein, dass A β 40 vermindert gebildet wird (75).

β APP ist nicht das einzige Substrat der γ -Sekretase. Für viele Transmembranproteine konnte eine Prozessierung durch die γ -Sekretase nachgewiesen werden, unter anderem für APLP1 (76), Notch 1-4 Rezeptor (77-79) und CD44 (80). Die Prozessierung der Notch-Rezeptoren stellt eine besonders wichtige physiologische Funktion der γ -Sekretase dar. Dies wurde offensichtlich, nachdem man Mäusen das PS1- und das PS2-Gen oder das PS1-Gen alleine ausschaltete und die Tiere als Folge einen letalen Phänotyp zeigten, welcher dem Notch-Knockout glich (81). Durch die Prozessierung von Notch wird die Notch-Intrazellular-Domäne freigesetzt (82). Die Notch-Intrazellular-Domäne spielt durch die Induktion von Signaltransduktionswegen eine bedeutende Rolle in der embryonalen Zelldifferenzierung (82) und z.B. bei der Differenzierung der T-Lymphozyten (83).

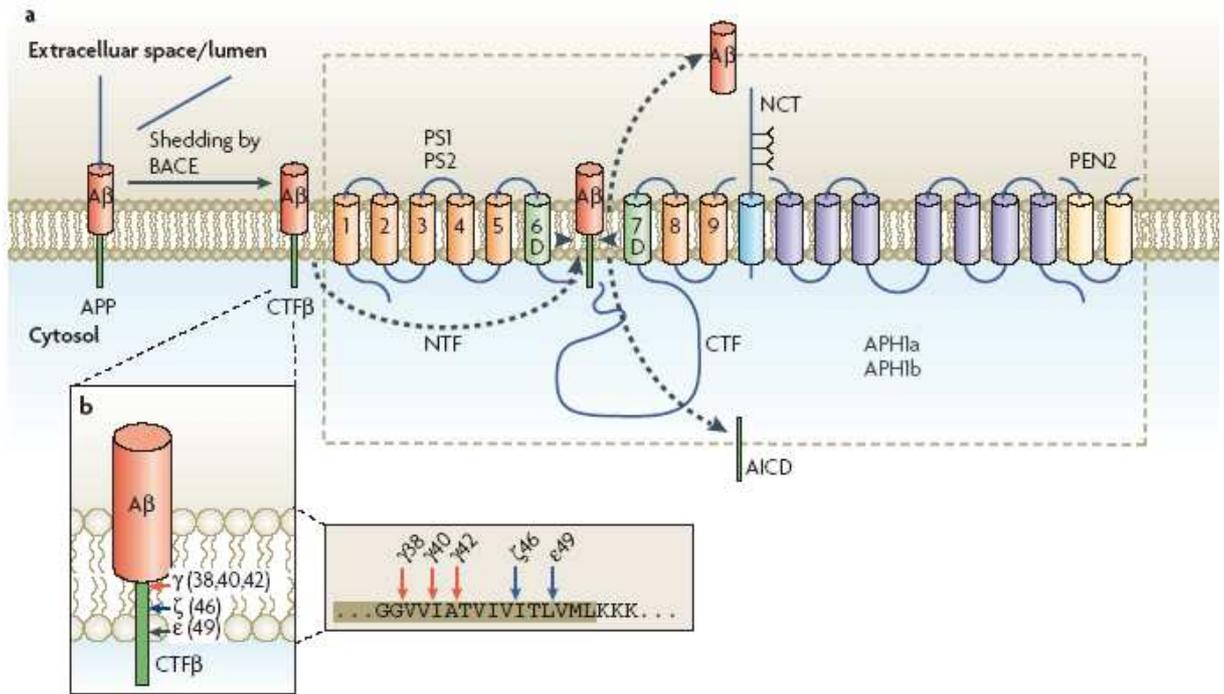


Abbildung 6: Schematische Darstellung der amyloiden Prozessierung von β APP und des γ -Sekretase-Komplexes

In der Abbildung 6a ist die A β -Bildung durch proteolytische Spaltung von β APP dargestellt. Nachdem BACE-1 β APP geschnitten hat, kann das in der Membran verbleibende CTF β (C-terminales Fragment β) zum aktiven Zentrum des γ -Sekretase-Komplexes transferiert werden. PS1 und PS2 werden durch Autoproteolyse, es entsteht ein N- und ein C-terminales Ende (NTF, CTF), aktiviert. Den zwei Transmembranaspartaten (D) der Transmembrandomäne 6 und 7 (grüne Zylinder) von NTF und CTF wird eine wichtige Bedeutung im katalytischen Zentrum des γ -Sekretase-Komplexes zugeschrieben. Weitere für die Funktion essentielle Bestandteile der γ -Sekretase sind Nicastrin (NCT), PEN-2 und APh1 (APh1a oder APh1b). Die γ -Sekretase spaltet CTF β in A β und AICD (β APP-Intrazellular-Domäne). In der Abbildung 6b ist die Aminosäuresequenz des β APP um den Bereich der Intermembrandomäne aufgeführt (die Nummern beziehen sich auf die A β -Sequenz). Die γ -Sekretase ist in der Lage CTF β mehrfach zu schneiden (ϵ -, ζ - und γ -Schnittstelle), wobei die γ -Schnittstelle mindestens nach der Aminosäure 38, 40 oder 42 auftreten kann. [Quelle: (33)]

Einleitung

1.2.2.3 Die β -Sekretase BACE-1

Das Gen für die β -Sekretase, BACE-1 (β -site APP cleaving enzyme 1), wurde 1999 nahezu gleichzeitig von vier verschiedenen Forschungsgruppen (32,35-37) entschlüsselt. Nur ein Jahr später konnte Hong et al. (84) die drei-dimensionale Struktur der Ektodomäne zusammen mit dem BACE-1 Inhibitor OM99-2 in der Kristallstruktur darstellen (siehe Abb. 7).

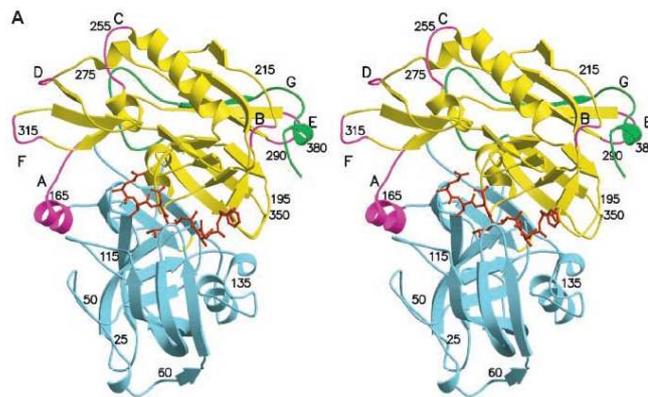


Abbildung 7: Kristallstruktur von BACE-1 im Komplex mit dem Inhibitor OM99-2
Räumliche Darstellung von BACE-1 als Schleifendiagramm: N-Lappen blau, C-Lappen gelb, Insertions-Schleifen A-G lila, COOH-Ende grün, Inhibitor OM99-2 rot
[Quelle: (84)]

Die membrangebundene Aspartyl-Protease BACE-1 (siehe Abb. 8) ist aus 501 Aminosäuren aufgebaut, bestehend aus einer Ektodomäne einer Transmembrandomäne und einer C-terminalen cytoplasmatischen Domäne, womit es sich als Typ-I Transmembranprotein auszeichnet. Die Protease besitzt zwei katalytische Zentren innerhalb der Ektodomäne, die beide die typische Aspartyl-Protease-Signatur D T/S G T/S enthalten, wobei die zweite oder vierte Stelle die Aminosäure T oder S sein kann.

Zudem beinhaltet die Ektodomäne von BACE-1 vier mögliche N-Glycosylierungsstellen und sechs Cysteinreste, deren Funktion die Bildung von drei Disulfidbrücken darstellen.

BACE-1 wird als Praeproprotein gebildet. Nach der Abspaltung des Signalpeptids, wird die Prodomäne durch eine furinähnliche Protease abgespalten (85-88). Dies geschieht, nachdem BACE-1 das endoplasmatische Retikulum verlassen hat (89). Vom Golgi-Apparat aus erreicht BACE-1 schließlich die Plasmamembran, von wo es via Endocytose

Einleitung

die Endosomen erreicht. Ein Teil kann jedoch auch direkt über das Trans-Golgi-Netzwerk in die Endosomen gelangen (90,91). Die Endosomen könnten für BACE-1 aufgrund des sauren pH-Optimums den bevorzugten Wirkungsort darstellen (92).

Nach der vollständigen Reifung wird die Protease BACE-1 vermutlich in Golgi- oder Postgolgi-kompartimenten an ihrer cytoplasmatischen Domäne, am Serin 498, phosphoryliert (91). Diese Phosphorylierungsstelle schließt sich dem Dileucin-Motiv der cytoplasmatischen Domäne, welches für den korrekten Transport der Protease verantwortlich gemacht wird (90), an. Findet die Phosphorylierung an der cytoplasmatischen Domäne nicht statt, wird BACE-1 beim Rücktransport von der Zellmembran in den frühen Endosomen „festgehalten“ und gelangt nicht in die späten Endosomen oder das Transgolgi-Netzwerk (91). Auch durch solche Veränderungen im Transport von BACE-1 innerhalb der Zelle könnte das empfindliche Gleichgewicht von verschiedensten Faktoren, das zur physiologischen Entstehung von A β führt, gestört werden.

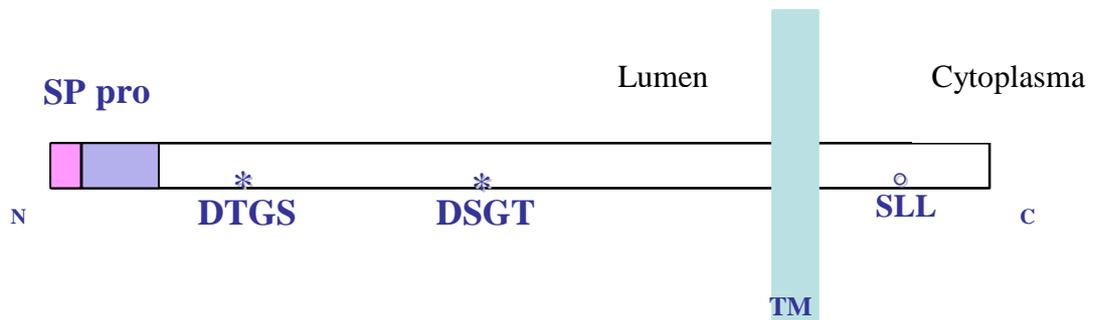


Abbildung 8: Schematische Darstellung von BACE-1

Die Abbildung zeigt schematisch die β -Sekretase BACE-1 mit der cytoplasmatischen Domäne und der ins Lumen ragenden Ektodomäne.

Rosa Kasten, Signalpeptid (SP); lila Kasten, Prodomäne (pro); hellblauer vertikaler Kasten, Membran; Sternchen, katalytisches Zentrum der Protease mit D T/S G T/S Motiv; Transmembrandomäne, TM; N-terminales Ende, N; C-terminales Ende, C; Ring, Serin-Dileucin-Motiv, SLL

Besonders das zentrale Nervensystem zeigt eine hohe Proteinexpression von BACE-1. Jedoch lässt es sich auch in Herz und Leber und mit sehr geringer Expression in der Bauchspeicheldrüse, den Nieren, dem Thymus, der Milz und der Lunge nachweisen. Im

Einleitung

Gegensatz dazu wird die Protease BACE-2 stark in peripheren Geweben wie der Bauchspeicheldrüse und der Plazenta exprimiert. Im Zentralnervensystem ist die Proteinexpression von BACE-2 gering (57,93).

Eine familiäre Form der Alzheimer-Erkrankung, die in einer schwedischen Familie aufgetreten ist, macht die Funktion der β -Sekretase besonders deutlich. Betroffene Patienten besitzen eine Doppelmutation im β APP-Gen, auch Schwedenmutation (APP^{sw}) genannt. Diese Mutationen (Lysin595→Asparagin und Methionin596→Leucin) liegen genau in der BACE-1-Schnittstelle und führen dazu, dass sich die Affinität von BACE-1 zu β APP deutlich erhöht (94-96). Dadurch erhöht sich der von BACE-1 prozessierte β APP-Anteil, mehr A β wird gebildet und die Mutationsträger erkranken früh an der Alzheimer-Demenz.

Die Inhibition der β -Sekretase stellt eine mögliche Therapieoption der Alzheimer-Erkrankung dar. Eine hochspezifische Inhibition kann zum Beispiel durch die Ausbildung charakteristischer Sekundärstrukturen, die das aktive Zentrum der Aspartylproteasen räumlich blockieren, ohne dabei selbst proteolytisch gespalten zu werden, erzielt werden (97-99). Um Nebenwirkungen der Therapie ausschließen zu können, ist die Suche nach Substraten von BACE-1 neben β APP von großem Interesse. Ein Hinweis darauf, dass β APP nicht das Hauptsubstrat der Protease darstellt, geben Untersuchungen an polarisierten Zellen. Hier konnte man zeigen, dass BACE-1 bevorzugt apikal und nur in geringen Mengen basolateral sortiert wird. APP ist jedoch an der apikalen Oberfläche nur sehr gering nachweisbar, da APP hauptsächlich basolateral sortiert wird. Das wenige basolateral sortierte BACE-1 konkurriert zusätzlich mit der vorwiegend basolateral sortierten α -Sekretase. Daher wird ein großer Teil von β APP von der antiamyloiden α -Sekretase und nur ein geringer Teil von der β -Sekretase prozessiert (100). Für P-selectin glycoprotein ligand-1 (101), Sialyl-Transferase ST6GalI (102) und Neuregulin-1 (103,104) konnte eine Proteolyse durch BACE-1 gezeigt werden. Neuregulin spielt eine entscheidende Rolle in der Schwann-Zell-Entwicklung und in der Myelinisierung von peripheren Nerven (105,106). In der Tat zeigen BACE-1-Knock-out-Mäuse eine Anhäufung von unprozessiertem Neuregulin-1, eine verringerte Myelinisierung und einen veränderten Aufbau der peripheren Nerven (103,104). Dieser Phänotyp entspricht dem der Neuregulin-Knock-out-Mäuse. Daher könnte es sein, dass eine Proteolyse von Neuregulin durch BACE-1 für eine korrekte Entwicklung der peripheren Nerven notwendig ist.

1.2.3 BACE-1 Regulation in der Alzheimer-Krankheit

In mehreren Studien konnte im Frontal- und Temporallappen von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Kontrollen erhöhte BACE-1-Proteinmengen und Aktivitäten nachgewiesen werden (107-112).

Einen weiteren Beitrag zur Unterstützung der Theorie, dass erhöhte BACE-1-Level zur Entstehung der Krankheit beitragen und nicht eine Folge der Krankheit darstellen, geben neue Forschungsergebnisse. In einem Alzheimer-Mausmodell (TG2576, APPsw) konnten erhöhte BACE-1-Proteinmengen nachgewiesen werden, bevor neuronaler Zelltod eintrat (113). Zudem beobachtete man in der Immunfluoreszenz, sowohl in Gehirnen von Mäusen (siehe Abb. 9) als auch in humanen Gehirnen, erhöhte BACE-1-Expressionen, die besonders um die A β -42-positiven Plaques dargestellt werden konnten. Eine mögliche Erklärung für diese Erscheinung ist, dass A β 42, beruhend auf einem bisher nicht verstandenen Mechanismus, die BACE-1-Expression hochreguliert (113) und so einen „Circulus vitiosus“ in Gang bringt.

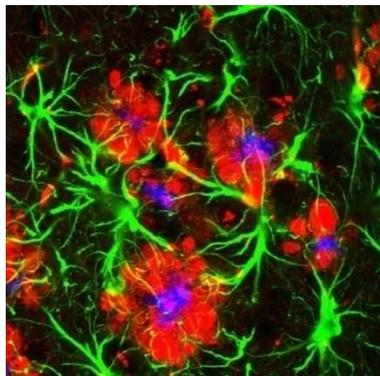


Abbildung 9: Konfokale Aufnahme eines Hirnschnittes einer 5XFAD Maus (APP/PS1 transgenic)

Die Amyloid-Plaques sind blau dargestellt, sie werden von Neuronen mit erhöhter BACE-1-Expression (rot) und Astrozyten (grün) umgeben. [Quelle: (113)]

Im Gegensatz zu der Erhöhung der Proteinexpression im Gehirn von Alzheimer-Demenz-Patienten wird von keiner Erhöhung der BACE-1-mRNA berichtet (114,115). Deshalb wird angenommen, dass die Hochregulation von BACE-1 in der Alzheimer-Demenz auf posttranskriptioneller Ebene erfolgt. Denkbar wäre ein verminderter Abbau von BACE-1,

Einleitung

z.B. durch einen veränderten endosomalen oder lysosomalen Transport, oder eine erhöhte Translation. Eine erhöhte Translation könnte z.B. durch eine Veränderungen der 5'UTR (untranslated region) von BACE-1 erklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die 5'UTR die Rate der Translation hemmt, ohne dabei die Transkriptionsrate zu beeinflussen (116). Dies könnte darauf beruhen, dass die 5'UTR durch ihre Sekundärstruktur die Ribosomen an einer effizienten Translation hindert (117,118).

1.2.4 p25 und cdk5 in der Alzheimer-Krankheit

In der Diskussion über die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung spielt auch die cyclinabhängige Kinase 5 (cyclin-dependent kinase 5, cdk5) eine Rolle. Die Serin-Threonin-Proteinkinase cdk5 besitzt eine entscheidende Funktion in der normalen Entwicklung des zentralen Nervensystems (119). In Gehirnen von Alzheimer-Demenz-Patienten konnte im Vergleich zu Kontrollgehirnen eine ca. 2-fach erhöhte Aktivität der cdk5 gemessen werden (120). cdk5 wird durch die Bindung und Phosphorylierung von p35 oder p39 aktiviert. Durch neurotoxische Vorgänge wie Ischämie, oxidativer Stress oder der Bildung von A β 42 wird der Calciumspiegel in den Neuronen erhöht. Dadurch kann die Cystein-Protease Calpain aktiviert werden. Calpain ist befähigt das membrangebundene p35 in ein N-terminales p10-Fragment und ein C-terminales p25-Fragment zu spalten (121-123) (siehe Abb. 10). p25 wird im Gehirn der Alzheimer-Demenz-Patienten vermehrt gebildet (124). Jedoch findet man in der Literatur auch widersprüchliche Ergebnisse, in denen von einer nicht signifikanten (125) oder erniedrigten p25-Produktion (126) berichtet wird. p25 ist in der Lage cdk5 zu stabilisieren. Der p25-cdk5-Komplex ist im Gegensatz zu dem p35-cdk5-Komplex nicht mehr an die Membran gebunden, da p25 frei in der Zelle beweglich ist (127). Die p25-induzierte Dysregulation der Kinase cdk5 wird für eine Reihe von neurodegenerativen Prozessen verantwortlich gemacht. Zum Beispiel ist sie an der Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins und so an der Bildung der neurofibrillären Bündel beteiligt (128). Außerdem wird sie mit der Phosphorylierung von β APP und in Folge dessen mit einer erhöhten Bildung von A β in Zusammenhang gebracht (129). Man vermutet, dass die Thr668 Phosphorylierung von APP, bedingt durch eine Konfirmationsveränderung, die Interaktion von β APP zu dem Adapterprotein FE65 schwächt. Da die Interaktion mit FE65 die Bildung von A β hemmt, könnte cdk5 die A β Bildung durch eine geschwächte Interaktion steigern (130,131).

Einleitung

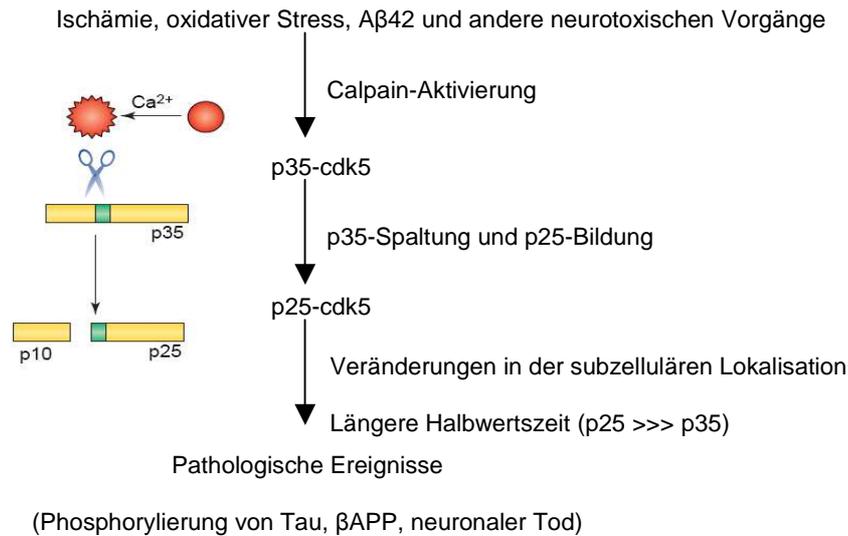


Abbildung 10: p25-/p35-abhängige Aktivierung der Kinase cdk5 (cyclin-dependent kinase 5)
Ischämie, oxidativer Stress und andere neurotoxische Stoffwechselfvorgänge aktivieren durch eine Erhöhung des Calciumspiegels die Protease Calpain. Calpain schneidet p35 und bildet somit p10 und p25. p25 bindet und aktiviert cdk5. Der p25-cdk5-Komplex ist im Vergleich zum p35-cdk5-Komplex nicht an die Zellmembran gebunden und besitzt eine längere Halbwertszeit. Die konstitutive Aktivierung der cdk5 führt zu verschiedensten pathologischen Ereignissen. [Quelle: modifiziert nach (132)]

1.3 Die Alzheimer-Erkrankung bei Individuen mit Down-Syndrom

Im Jahre 1866 wurde von John L. H. Down in seiner Abhandlung „Beobachtungen zu einer ethnischen Klassifizierung von Schwachsinnigen“ (133) erstmalig das Krankheitsbild des später nach ihm benannten Down-Syndroms beschrieben. Aufgrund ihres charakteristischen Phänotyps (siehe Abb. 12) teilte J. L. H. Down die Betroffenen in seinem Versuch, geistig retardierte Menschen verschiedenen ethnischen Gruppen zuzuordnen, der „mongolischen Rasse“ zu. Diese rassendiskriminierende Einteilung blieb lange durch die Verwendung des Begriffs „Mongolismus“ erhalten. Heutzutage verwendet man die Bezeichnung „Down-Syndrom“ oder aufgrund der Ätiologie „Trisomie 21“.

Einleitung

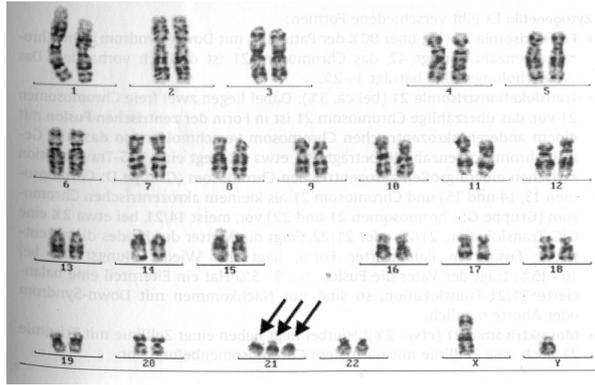


Abbildung 11: Bandenkaryogramm mit freier Trisomie 21

Karyogramm (G-Bänderungsfärbung) eines Jungen mit freier Trisomie 21; Karyotyp 47, XY+21; die drei Pfeile markieren das dreifache Chromosom 21; [Quelle: Sitzmann, Pädiatrie, Duale Reihe, Thieme Verlag, 2002]

Das Down-Syndrom stellt mit 1:700-800 Lebendgeborenen die häufigste autosomale Chromosomenaberration dar. Neben einer Translokations (5%)- oder Mosaiktrisomie (2%) ist die freie Trisomie 21 (siehe Abb. 11), mit einem dreifach vorhandenen Chromosom 21, die häufigste Ursache der Erkrankung. Zusätzlich zu dem charakteristischen Phänotyp (siehe Abb. 12), der sich unter anderem aus einer breiten und flachen Nasenwurzel, einer nach oben ansteigenden Lidachse, dem Epikanthus, einem kurzen Hals, kurzer und breiter Füße und Hände (mit Vierfingerfurche) zusammensetzt, zeigen Down-Syndrom-Patienten Fehlbildungen der inneren Organe (besonders betroffen ist das Herz), Immunschwäche, Skelettveränderungen und eine unterschiedlich ausgeprägte geistige Retardierung (Sitzmann, Pädiatrie, Duale Reihe, Thieme Verlag, 2002).



Abbildung 12: Typischer Phänotyp des Down-Syndroms beim Kind

a: Der Säugling zeigt den typischen Phänotyp mit der nach außen aufsteigenden Lidachse und der flachen Nasenwurzel; b: Epikanthus, Lidfalte am inneren Augenwinkel; c: Vierfingerfurche [Quelle: Sitzmann, Pädiatrie, Duale Reihe, Thieme Verlag, 2002]

Ab einem Alter von 40 Jahren entwickeln beinahe alle Individuen mit Down-Syndrom die für die Alzheimer-Erkrankung typischen neuropathologischen Kennzeichen, Amyloid-Plaques und neurofibrilläre Bündel (134). Die klinische Symptomatik des Morbus Alzheimer, die Demenz, tritt mit einem Durchschnittsalter von 56 Jahren auf (135). Die Prävalenz der Demenz steigt von 11 % zwischen einem Alter von 40 und 49 Jahren auf 77 % zwischen 60 und 69 Jahren. Alle Patienten mit einem Alter von 70 Jahren und älter präsentieren die Zeichen der Demenz. Bis jetzt gibt es nur sehr wenige Menschen mit Down-Syndrom in diesem Alter. Jedoch nimmt die Lebenserwartung im Vergleich zu früher deutlich zu, was vor allem auf bessere Operationstechniken zur Behebung der Fehlbildungen, im Besonderen der Herzfehler, zurückzuführen ist.

Lange bevor sich die Amyloid-Plaques im Gehirn der Betroffenen bilden, sind die Mengen an löslichem A β im Down-Syndrom bereits erhöht. Man konnte zeigen, dass im fetalen Gewebe von Trisomie 21-Aborten im Vergleich zu Kontrollgewebe die Menge an löslichem A β erhöht ist (136). Außerdem beobachtete man in der temporalen Gehirnrinde von Down-Syndrom-Patienten eine signifikante Erhöhung von intrazellulärem A β 42, also

Einleitung

der Variante von A β , der die höchste Aggregationsneigung zugeschrieben wird (137). Jedoch sind die Angaben in der Literatur zu intrazellulärem A β kontrovers. So zeigte eine Studie erhöhte A β 40-Levels, jedoch keine Erhöhung von A β 42 (138). In einer weiteren Studie konnten weder erhöhte A β 40- noch A β 42-Levels, jedoch eine Erhöhung von A β 43 nachgewiesen werden (139). Diese kontroversen Angaben in Bezug auf die A β -Subtypen könnten auf technischen Unterschieden beruhen.

Die Ursache für die Erhöhung der A β -Spiegel und das frühere Auftreten der neuropathologischen Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit im Down-Syndrom ist noch nicht vollkommen geklärt. Man nimmt an, dass die auf dem Chromosom 21 befindlichen Gene, besonders die der DSCR (Down's Syndrom critical region), eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Demenz spielen. Von besonderem Interesse ist das β APP-Gen, da A β aus dem β APP-Protein gebildet wird. Auch das BACE-2-Gen, das in der Kodierungssequenz zu 71% der β -Sekretase BACE-1 homolog ist (58), befindet sich auf dem Chromosom 21. Weitere mögliche Gene der DSCR stellen DSCR1 (Down Syndrome candidate region 1), ITSN1 (Intersectin 1), SYNJ1 (Synaptojanin 1) und DYRK1A (dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1A) dar, deren Genprodukte wichtige Funktionen in der Endocytose, im Transport der synaptischen Vesikel und bei verschiedenen Signalkaskaden einnehmen (140).

Durch Erforschung der Zusammenhänge der auf dem Chromosom 21 befindlichen Gene und der Alzheimer-Erkrankung im Down-Syndrom könnten sich auch Rückschlüsse auf die Ätiologie der sporadischen Alzheimer-Erkrankung ziehen lassen.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Patienten mit Down-Syndrom entwickeln ab einem Alter von 40 Jahren fast ausnahmslos die Amyloid-Plaques-Pathologie der Alzheimer-Erkrankung (134). Die Gründe für das frühe Auftreten der Amyloid-Plaques in den Gehirnen der Patienten sind jedoch noch nicht endgültig geklärt. Man nimmt an, dass Gene auf dem zusätzlichen Chromosom 21 an der Entstehung der Krankheit beteiligt sind. Das Gen für β APP befindet sich auf dem Chromosom 21. Es wird diskutiert, ob es deshalb zu einer vermehrten Produktion von β APP und nur damit zur verstärkten Freisetzung von Amyloid β -Peptid (A β) kommt (141). Jedoch gibt es noch keine endgültigen Beweise dafür, dass die erhöhte β APP-Produktion alleine für die frühe Plaquentstehung bei Patienten mit Down-Syndrom verantwortlich gemacht werden kann. Zumal in β APP-überexprimierenden Mäusen kein derartiger Anstieg in der A β -Synthese zu verzeichnen ist (142).

In Gehirnen von Alzheimer-Demenz-Patienten konnten im Vergleich zu Kontrollgehirnen erhöhte BACE-1-Proteinmengen und BACE-1-Aktivitäten nachgewiesen werden (107-112). Da BACE-1 durch Überexpressions- und Knock-out-Experimente eindeutig als alleinige β -Sekretase identifiziert werden konnte (143-148), wird der Sekretase eine entscheidende Bedeutung in der Amyloid-Plaques-Pathologie zugeschrieben.

Die Regulation der Protease BACE-1 könnte deshalb auch bei der Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung im Down-Syndrom eine bedeutende Rolle spielen. Durch eine Hochregulation von BACE-1 könnte vermehrt β APP prozessiert und somit A β gebildet werden. Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Regulation der Protease BACE-1 im Down-Syndrom zu untersuchen.

Dafür sollen die BACE-1-Proteinexpressionen in Gehirnen (Temporal- und Frontallappen) von Down-Syndrom-Patienten im Western-Blot analysiert werden. Diese Ergebnisse sollen dann mit den BACE-1-Proteinexpressionen in Gehirnen von Alzheimer-Patienten und mit den BACE-1-Proteinexpressionen in Gehirnen von Kontrollen verglichen werden.

BACE-1 scheint sowohl in der Pathogenese der Alzheimer-Demenz als auch in der des Down-Syndroms eine zentrale Rolle einzunehmen. Daher ist es sehr interessant die Regulation von BACE-1 näher zu analysieren. Da in p25-überexprimierenden Mäusen erhöhte BACE-1-Proteinexpressionen gezeigt werden konnten (149), stellt das zweite Ziel

Einleitung

der Arbeit die Analyse eines neuen möglichen Regulationsmechanismus von BACE-1 dar. p25, das in Gehirnen der Alzheimer-Demenz-Patienten vermehrt gebildet wird, bindet und aktiviert die Kinase ckd5 (cyclin-dependent kinase 5) (124). Eine mögliche Beteiligung von p25 an der Regulation der β -Sekretase soll geklärt werden. Dazu werden humane und murine Neuroblastomazellen, in die ein induzierbarer p25-Expressionsvektor kloniert wird, in Bezug auf ihre BACE-1-Expression mit Hilfe der Western-Blot-Analyse, der BACE-1-Aktivitätsmessung und der Northern-Blot-Analyse untersucht. Darüber hinaus soll geklärt werden, welche Auswirkung die Überexpression von p35, dem membrangebundenen Vorläufer-Protein von p25, auf die BACE-1-Proteinexpression ausübt.

2 Material und Methoden

2.1 Proteinbiochemische Methoden

2.1.1 Gewinnung der humanen Gehirnproben

Die Gehirnpräparate wurden von der Gehirnbank (Brain-Net; Institut für Neuropathologie, LMU) bezogen. Es handelte sich dabei um Sektionspräparate von zwölf Individuen (siehe Tabelle 5). Zur Verfügung standen drei Gehirne von Trisomie 21-Patienten (T21), vier Gehirne von Alzheimer-Patienten (AD) und fünf Kontrollgehirne. Von jedem Gehirn gab es sowohl ein kortikales Frontallappenpräparat als auch ein kortikales Temporallappenpräparat. Das Material wurde im Gefrierschrank (Elektrolux) bei -80°C aufbewahrt. Die Gehirne wurden auf Trockeneis mit einem sterilen Einwegskalpell (B. Braun, Aesculap AG+CoKG) in 200 mg schwere Proben aufgeteilt. Das Gewicht der Proben wurde mit Hilfe einer Analysenwaage (Analytical +; Ohaus) bestimmt. Die Proben wurden in Reaktionsgefäßen (1,5 ml; Sarstedt) bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.1.2 Homogenisierung der humanen Gehirnproben

Die humanen Gehirnproben wurden während der Durchführung der Arbeitsschritte auf Trockeneis gelagert. Zur Homogenisierung der Gewebeproben verwendete man einen gläsernen Homogenisator (B. Braun). Die gefrorenen 200 mg Proben wurden zusammen mit 1ml Citrat-EDTA Puffer (15 mM Citrat pH 6.4, 1 mM EDTA), versetzt mit Protease-Inhibitoren (PI-Mix 1:500, P-8340; Sigma), homogenisiert, indem der Stößel des gläsernen Homogenisators 20-mal manuell langsam auf- und abbewegt wurde. Mit einer 2 ml Einwegauslaufpipette (Sarstedt) wurde das homogenisierte Gehirngewebe in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml; Sarstedt) überführt, auf Eis gelagert und weiter wie in 2.1.3 beschrieben verarbeitet. Wenn aus den humanen Gehirnproben keine Membranpräparationen, sondern RIPA-Zelllysate hergestellt werden sollten, wurden die

Material und Methoden

Proben in RIPA-Lyse Puffer (20 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % NP40 (Igepal; Sigma), 0,05 % Triton X-100 (Merck), 0,5 % Na-desoxycholat, 0,5 M EDTA), versetzt mit Protease-Inhibitoren (PI-Mix 1:500, P-8340; Sigma), homogenisiert.

2.1.3 Membranpräparation

Die im hypotonen Citrat-EDTA-Puffer (15 mM Citrat pH 6.4, 1 mM EDTA), versetzt mit Protease-Inhibitoren (PI-Mix 1:500, P-8340; Sigma), homogenisierten Gehirnproben (siehe 2.1.2) wurden in flüssigem Stickstoff zwei Minuten schockgefroren und bei 37°C (Heizblock; Liebisch) langsam wieder aufgetaut. Durch diese „freeze-thaw“-Methode wurde die Zellmembran ruptiert und so die Zelle aufgeschlossen. Zu den Proben wurde nun 100 µl Brij 35 10 % (Pierce) und 100 µl Lubrol 10 % (Pierce) zugefügt. Diese Detergenzien verhinderten die Aggregation der Proteine. Durch Zentrifugation bei 5.000 x g, für 10 Minuten und bei 4°C (Kühlzentrifuge für Eppendorfreaktionsgefäße „Biofuge fresco“; Heraeus/Kendro) wurden die Zellkerne und die Mitochondrien pelletiert und der postnukleare Überstand („post-nuclear supernatant“, PNS) gewonnen. 950 µl des PNS wurden nun vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues, mit 140 µl Glycerol 40% befülltes, Ultrazentrifugenreaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. In dem folgenden Zentrifugationsschritt (130.000 x g/60 Minuten, 4°C, Optima™ Ultrazentrifuge mit TLA-55 Rotor; Beckmann) wurde die Gesamtmembranfraktion pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 190 µl Citrat-EDTA-Puffer (15 mM Citrat pH 6.4, 1 mM EDTA), versetzt mit PI-Mix (1:500, P-8340; Sigma), resuspendiert. Durch Zugabe von 10 µl Triton X-100 20% extrahierte man die Proteine aus den Membranen. Nach zehn Minuten Inkubation wurden die Proben einer erneuten Zentrifugation (130.000 x g/30 Minuten, 4°C, Optima™ Ultrazentrifuge mit TLA-55 Rotor; Beckmann) unterzogen. Im Pellet befanden sich nun die Reste der Membranen und die tritonunlöslichen Proteine. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert.

Wurde die Membranpräparation an Zellen durchgeführt, verwendete man das nach einem Waschschrift mit PBS-Puffer anfallende Zellpellet (siehe 2.2.3) einer 10 cm Zellkulturschale. Das Zellpellet wurde in 1 ml Citrat-EDTA-Puffer (15 mM Citrat pH 6.4, 1 mM EDTA), versetzt mit PI-Mix (1:500, P-8340; Sigma), resuspendiert und dann fünf Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Proben ebenfalls in flüssigem Stickstoff

Material und Methoden

schockgefroren und bei 37°C langsam wieder aufgetaut. Nach Zugabe von je 100 µl Brij 35 10% (Pierce) und Lubrol 10% (Pierce) wurden die Proben für 5 Minuten bei 5.000 x g und 4°C zentrifugiert (Kühlzentrifuge für Eppendorfreaktionsgefäße „Biofuge fresco“; Heraeus/ Kendro). Die Überstände (950 µl) wurden zusammen mit 140 µl Glycerol 40% in ein Ultrazentrifugenreaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und erneut zentrifugiert (130.000 x g, 60 Minuten, 4°C; Optima™ Ultrazentrifuge mit TLA-55 Rotor, Beckmann). Die Überstände wurden verworfen und die Pellets der Gesamtmembranfraktion in 95 µl Citrat-EDTA-Puffer (15 mM Citrat pH 6,4, 1 mM EDTA), versetzt mit PI-Mix (1:500, P-8340; Sigma), resuspendiert. Dann fügte man den Proben 5 µl Triton X-100 20% zu und inkubierte für weitere 10 Minuten auf Eis. Nach Zentrifugation (130.000 x g/30 Minuten, 4°C, Optima™ Ultrazentrifuge mit TLA-55 Rotor; Beckmann) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.1.4 Zelllyse

Die mit RIPA-Lyse Puffer (20 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 0,05 % Triton-X 100, 0,5 % Na-desoxycholat, 0,5 M EDTA), versetzt mit Protease-Inhibitoren (PI-Mix, 1:500, P-8340; Sigma), homogenisierten humanen Gehirnproben (siehe 2.1.2) wurden 60 Minuten bei 4°C inkubiert (200 upm (Umdrehungen pro Minute), KM2 Schüttler; Edmund Buhler). Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (130.000 x g/30 Minuten, 4°C, Optima™ Ultrazentrifuge mit TLA-55 Rotor; Beckmann). Der Überstand, der die gelösten Proteine enthielt, wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert.

Zellpellets (siehe 2.2.3) wurden zuerst in 1 ml eiskaltem RIPA-Lyse Puffer (20 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 0,05 % Triton-X 100, 0,5 % Na-desoxycholat, 0,5 M EDTA), versetzt mit Protease-Inhibitoren (PI-Mix, 1:500, P-8340; Sigma), resuspendiert, dann ebenfalls 60 Minuten bei 4°C inkubiert (200 upm, KM2 Schüttler; Edmund Buhler) und zentrifugiert (130.000 x g/30 Minuten, 4°C; Optima™ Ultrazentrifuge mit TLA-55 Rotor, Beckmann). Die Pellets wurden verworfen und der Überstand wurde abgenommen.

Um die Phosphorylierung an cdk5 zu erhalten, wurde bei den Sp25-Zellen ein spezieller RIPA-P-Lyse Puffer (20 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 0,05 % Triton-X 100,

Material und Methoden

0,5 % Na-desoxycholat, 0,5 M EDTA, 0,5 M EGTA, Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (1:100, P5726-5ML; Sigma)), versetzt mit Protease-Inhibitoren (PI-Mix, 1:500, P-8340; Sigma), verwendet. Hierfür wurden die Zellen in den 10 cm Zellkulturschalen (Nunc) auf Eis gelagert und mit PBS-Puffer (140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄ in dH₂O, pH 7,4; autoklaviert) gewaschen. Der PBS-Puffer wurde sorgfältig abgesaugt und anschließend 1ml eiskalter RIPA-P-Lyse Puffer, versetzt mit PI-Mix (1:500, P-8340; Sigma), in die Zellkulturschalen gegeben. Dann wurden die Zellen mit Hilfe eines sterilen Schabers und einer 2 ml Einwegauslaufpipette (Sarstedt) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die darauf folgenden Schritte (Inkubation und Zentrifugation) waren den oben beschriebenen Schritten identisch. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert.

2.1.5 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen von Gesamt- oder Membranproteinlysaten erfolgte mit Hilfe des Bicinchoninic Acid Assay (BCA; Uptima/Interchim). Es wurden je 10 µl der zu messenden Probe mit je 1 ml der BCA-Lösung (Reagenz A und B in einer 50:1 Verdünnung) versetzt und 30 Minuten bei 37°C (Wärmeschrank 37°C, Heraeus) inkubiert. Parallel wurden Verdünnungen einer BSA-Standardlösung (2 mg/ml Bovine Serum Albumin) zwischen 10 µg/ml und 80 µg/ml angesetzt und mit je 1 ml der BCA-Lösung versetzt und ebenfalls 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proben und Kalibrierstandards wurden in Einwegküvetten (10 x 11 x 45 mm; Sarstedt) überführt und die Extinktionen bei Raumtemperatur bei einer Wellenlänge von 562 nm mit dem SmartSpec™ 3000 Fotometer (Bio-Rad) gemessen. Anhand der linearen Standardkurve wurden die Proteinkonzentrationen berechnet.

2.1.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Acrylamid 40 %: 40 % Acrylamid-BIS-Acrylamid 37, in dH₂O (Serva)

4X Lower Tris: 1,5 M Tris (Biomol) pH 8,8, 0,4 % SDS (Calbiochem), in dH₂O

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

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Merck)

APS 10%: 10 % Ammoniumpersulfat in dH₂O (Sigma)

Tris-Glycin-SDS-Puffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin (Roth), 0,1 % SDS, in dH₂O

4X Laemmli-Puffer: 0,25 M Tris pH 6,8, 8 % SDS, 40 % Glycerol (Roth), 10 % β-Mercaptoethanol (Roth), 0,01 % Bromphenolblau (Sigma), in dH₂O

	8 % Trenngel	12 % Trenngel	Sammelgel
dH ₂ O	8,8 ml	7,2 ml	6,5 ml
Acrylamid 40%	3,2 ml	4,8 ml	1 ml
4X Lower Tris	4 ml	4 ml	
4X Upper Tris			2,5 ml
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl
APS 10%	30 µl	30 µl	30 µl

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele

Es wurden SDS-Polyacrylamid-Gele mit 10 Probestaschen und einer Dicke von 0,75 mm oder mit 15 Probestaschen und einer Dicke von 1,5 mm verwendet. Die in der Tabelle 1 angegebenen Mengen sind entweder für zwei dünne oder ein dickes Gel vorgesehen. Da die Trennfähigkeit der Gele von dem Anteil des Polyacrylamids abhängig ist (je höher der Anteil, desto kleinere Proteine können aufgetrennt werden), wurde für die Darstellung von BACE-1, Nicastrin, βAPP und β-Actin 8 % Gele und für die Darstellung von cdk5, p-cdk5, p25 und p35 12 % Gele verwendet. Nachdem von den Glasplatten mit Seifenlösung und Isopropanol Proteine und andere Verschmutzungen entfernt worden sind, wurden die Glasplatten in die Gießständer eingesetzt. Zuerst wurde das Trenngel (ca. 7 cm) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Aushärtung des Trenngels wurde das Isopropanol dekantiert. Anschließend wurde das Sammelgel (ca. 2 cm) auf das Trenngel gegossen und der entsprechende Probestaschenkamm eingesetzt. Nachdem das Gel

Material und Methoden

vollständig polymersiert war, setzte man es in die mit dem Elektrophoresepuffer (Tris-Glycin-SDS-Puffer) gefüllte Gelkammer (Miniprotean System; Biorad) ein.

Bei Membranpräparationen wurden 50 µg Membranprotein und bei RIPA-Lysaten 30 µg Gesamtprotein mit der entsprechenden Menge SDS-Probenpuffer (4X Laemmli-Puffer) versetzt. Vor dem Auftragen der Proben auf die Gele, wurden sie 10 Minuten bei 95°C (Heizblock; Liebsch) erhitzt und danach 1 Minute bei 16.000 x g (Biofuge pico, Zentrifuge für Eppendorfreaktionsgefäße; Heraeus/Kendro) zentrifugiert, um nicht gelöstes Material abzutrennen. Als Proteinstandard wurde See blue (Invitrogen) verwendet.

Anode und Kathode wurden mit der Spannungsquelle verbunden (Powerpac 300; Biorad) und es folgte das Einlaufen der Gele bei 50 Volt (ca. 15 Minuten). Anschließend wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht.

2.1.7 Western-Blot-Analyse

Tris-Glycin-Puffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin, in dH₂O

I-Block: 1 g I-Block (Tropix), 5 ml Tween-20 10 %, 50 ml 10X PBS, dH₂O ad 500ml, 2 Minuten in der Mikrowelle (Bosch) aufkochen, 1h Rühren (Magnetrührer; IKA Labortechnik), Lagerung bei 4°C

TBST-Puffer: 0,3 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,3 % Triton X-100 in dH₂O

Nachdem die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, wurden sie aus dem Gel auf eine PVDF-Transfermembran (Immobilion-P; Millipore) übertragen. Die PVDF-Transfermembranen wurden zuerst 10 Minuten mit Isopropanol benetzt und anschließend 30 Minuten mit dH₂O gewaschen.

Transferaufbau:

- Anodenplatte
- Poröser Schwamm in Tris-Glycin-Puffer äquilibriert
- Zwei Lagen Geltransferfilterpapier (Schleicher & Schuell)
- PVDF-Transfermembran
- SDS-Polyacrylamid-Gel
- Zwei Lagen Geltransferfilterpapier

Material und Methoden

- Poröser Schwamm in Tris-Glycin-Puffer äquilibriert
- Kathodenplatte

Der Transfer erfolgte in einer Mini-Trans-Blot-Kammer (Biorad) bei 400 mA für 1 Stunde. Tris-Glycin-Puffer wurde als Transferpuffer verwendet. Nach Beendigung des Transfers wurde die PVDF-Transfermembran über Nacht in I-Block inkubiert (200 upm, 4°C), um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Der Primärantikörper (siehe Tabelle 2) wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert (200 upm). Danach wurden die Membranen für 50 Minuten (5 Waschschrte, jeweils 10 Minuten) mit TBST-Puffer gewaschen (RT, 200 upm). Danach erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers (siehe Tabelle 3) für 1 Stunde bei Raumtemperatur (200 upm). Nach erneuten fünf Waschschrten mit TBST-Puffer (RT, 200 upm), jeweils 10 Minuten, wurden die Membranen mit je 5 ml ECL-Lösung (2,5 ml ECL-1, 2,5 ml ECL-2, ECL Western Blotting Kit; Amersham Biosciences) für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die Chemilumineszenzsignale wurden mit Super Rx (Fuji X-ray medical) Filmen detektiert und im Filmentwicklungsgerät (Curix 60; Agfa) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

Die entwickelten Filme wurden mit einem Scanner (SnapScan 1236 S; Agfa) aufgenommen und mit einem Fotoverarbeitungsprogramm (Photoshop 5.5; Universal Imaging Corporation Adobe) bearbeitet. Zusätzlich wurden die Chemilumineszenzsignale mit dem Fluor Chem 8900 (AlfaInnoTech) laut Herstellerangabe aufgenommen und die gemessenen Signale für die Quantifizierung der Proteinmengen verwendet.

Material und Methoden

Antikörper	Epitop	Verdünnung	Quelle
β-Actin	β-Actin	1:1000 (I-Block)	Maus, monoklonal (Sigma)
6687	APP-C-Terminus (AS 676-695)	1:1000 (I-Block)	Kaninchen, polyklonal (C. Haass)
22C11	APP-C-Terminus	1:2000 (I-Block)	Maus, monoklonal (Sigma)
B1-NT (EE-17)	BACE-1-N-Terminus (AS 47-60)	1:1000 (I-Block)	Kaninchen, polyklonal (Sigma)
B1-CT (LK-16)	BACE-1-C-Terminus (AS 482-501)	1:1000 (I-Block)	Kaninchen, polyklonal (Sigma)
N1660	Nicastrin-C-Terminus (AS 693-709)	1:5000 (I-Block)	Kaninchen, polyklonal (Sigma)
cdk5 (J-3)	cdk5 (AS 1-291)	1:1000 (I-Block)	Maus, monoklonal (Santa Cruz)
p-cdk5 (Ser 159)	p-cdk5 (kurze AS-Sequenz mit dem phosphorylierten Ser 159)	1:1000 (I-Block)	Ziege, polyklonal (Santa Cruz)
p35/ p25 (C-19)	p35-C-Terminus (p25-C-Terminus)	1:500 (I-Block)	Kaninchen, polyklonal (Santa Cruz)
BACE-Cat1 (3D5B1)	BACE-1-N-Terminus (AS 46-460)	1:1000 (I-Block)	Maus, monoklonal (113)

Tabelle 2: Übersicht der Primärantikörper, die in der Western-Blot-Analyse eingesetzt wurden

Antikörper	Epitop	Verdünnung	Quelle
Anti-Kaninchen-HRP	Kaninchen IgG	1:10.000 (I-Block)	Ziege (Promega)
Anti-Maus-HRP	Maus IgG	1:10.000 (I-Block)	Ziege (Promega)
Anti-Ziege-HRP	Ziege IgG	1:10.000 (I-Block)	Ziege (Promega)

Tabelle 3: Übersicht der Sekundärantikörper, die in der Western-Blot-Analyse eingesetzt wurden

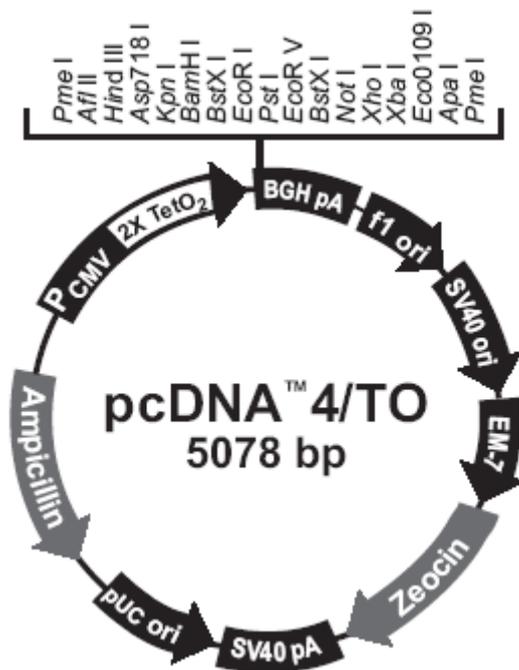
Die Sekundärantikörper sind gegen das IgG (Immunglobulin G) des Kaninchens, der Maus oder der Ziege gerichtet und an HRP („horseraddishperoxidase“, Meerrettichperoxidase) gekoppelt.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden Tau-SY5Y-Zellen, stabil Tau-Protein exprimierende SH-SY5Y-Zellen (humane Neuroblastomazellen), verwendet. Um gezielt p25 bzw. p35 in den Zellen zu induzieren, bediente man sich eines tetracyclinregulierten T-Rex-Expressionssystems (Invitrogen). Dieses System beruht darauf, dass die Zellen zunächst stabil mit dem Expressionsvektor pcDNA6/TR (Invitrogen), der ein Blastocidin-Resistenzgen besitzt, transfiziert werden. Dadurch wird in den Zellen der Tetracyclinrepressor exprimiert. Anschließend wird der Expressionsvektor pcDNATM4/TO (Invitrogen) (siehe Vektorkarte 1) stabil cotransfiziert. Dieser Expressionsvektor beinhaltet neben dem Zeocinresistenzgen einen Hybridpromotor, der aus einem humanen CMV (Cytomegalievirus)-immediate-early-Promotor und zwei Tetracyclinoperator 2 (TetO₂)-Sequenzen besteht. Die TetO₂-Sequenzen dienen als Bindungsstellen des Tetracyclin (Tet)-Repressor-Homodimers. Zudem besitzt der pcDNATM4/TO Vektor eine multiple Klonierungsstelle, die es ermöglicht das gewünschte Gen einzubringen. In Abwesenheit von Tetracyclin wird die Expression des gewünschten Gens durch die Bindung des Tet-Repressor-Homodimers an den TetO₂-Sequenzen unterdrückt. Fügt man jedoch

Tetracyclin zu den Zellen, verliert der Tetracyclinrepressor seine Repressorfunktion und der Hybrid-CMV/TetO₂-Promotor ist in der Lage das gewünschte Gen zu exprimieren.



Vektorkarte 1: pcDNA™4/TO

Der Expressionsvektor pcDNA™4/TO (Invitrogen) beinhaltet einen Hybridpromotor, der aus einem humanen CMV (Cytomegalievirus)-immediate-early-Promotor und zwei Tetracyclinoperator 2 (TetO₂)-Sequenzen besteht. Die TetO₂-Sequenzen dienen als Bindungsstellen des Tetracyclin (Tet)-Repressor-Homodimers. Zudem besitzt der pcDNA™4/TO Vektor eine multiple Klonierungsstelle und ein Zeocinresistenzgen.

Smock-Zellen bezeichnen Tau-SY5Y-Zellen mit einem leeren tetracyclininduzierbaren Expressionsvektor. Sp25-Zellen sind Tau-SY5Y-Zellen mit einem tetracyclininduzierbaren p25-Expressionsvektor und Sp35-Zellen bezeichnen Tau-SY5Y-Zellen mit einem tetracyclininduzierbaren p35-Expressionsvektor. Die Smock-, Sp25- und Sp35-Zellen wurden freundlicherweise von Luc Buée (Université de Lille) zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden mit Hilfe des T-Rex-Expressionssystems (Invitrogen) tetracyclinregulierbare N2a-Zellen (murine Neuroblastomazellen) generiert. NlacZ-Zellen bezeichnen N2a-Zellen mit einem tetracyclininduzierbaren lacZ (β -Galactosidase)-Expressionsvektor. Np25-Zellen sind N2a-Zellen mit einem tetracyclininduzierbaren p25-Expressionsvektor. Zudem wurden humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells, HEK 293) verwendet. HEK 269-Zellen sind β APPwt (β APP-Wildtyp) überexprimierende HEK 293-Zellen. BACE-1 überexprimierende HEK 293-Zellen bzw. HEK 269-Zellen werden HEK 293 B1-Zellen bzw. HEK 269 B1-Zellen genannt. HEK 293

Material und Methoden

5'UTR B1-Zellen bezeichnen HEK 293-Zellen, die BACE-1, welches die 5'UTR enthält, überexprimieren.

Material und Methoden

Name	Zelllinie	Resistenz
SH-SY5Y	SH-SY5Y (humane Neuroblastomazelllinie)	Keine Resistenz
Smock	Tau-SY5Y leerer tetracyclininduzierbarer Expressionsvektor	Blasticidin + Zeocin
Sp25	Tau-SY5Y tetracyclininduzierbarer p25-Expressionsvektor	Blasticidin + Zeocin
Sp35	Tau-SY5Y tetracyclininduzierbarer p35-Expressionsvektor	Blasticidin + Zeocin
HEK 293	HEK 293 (humane embryonale Nierenzelllinie)	Keine Resistenz
HEK 293 B1	HEK 293/ BACE-1	Zeocin
HEK 269	HEK 293/ β APPwt	Geneticin
HEK 269 B1	HEK 293/ β APPwt/ BACE-1	Geneticin + Zeocin
HEK 293 5'UTR B1	HEK 293/ 5'UTR BACE-1	Zeocin
N2a	N2a (murine Neuroblastomazelllinie)	Keine Resistenz
NlacZ	N2a tetracyclininduzierbarer lacZ (β -Galactosidase)-Expressionsvektor	Blasticidin + Zeocin
Np25	N2a tetracyclininduzierbarer p25-Expressionsvektor	Blasticidin + Zeocin

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien und deren Antibiotikaresistenzen

2.2.2 Kulturmedien

Als Kulturmedium diente Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, mit Glukose, L-Glutamin, ohne Na-Pyruvate; PAA), dem 1 % PEN/Strep (Penicillin/Streptomycin, 5000 U/ml/5 mg/ml; Gibco-Invitrogen Corporation) und 10 % FKS (fetales Kälberserum; PAA) zugesetzt wurden. Zur Selektion wurden die Antibiotika Blasticidin (5 µg/ml; Gibco-Invitrogen Corporation), Zeocin (200 µg/ml; Gibco-Invitrogen Corporation) und Geneticin (G418, 200 µg/ml; Gibco-Invitrogen Corporation) zugesetzt. Das Medium für die Smock-, Sp25, Sp35-Zellen, NlacZ- und Np25-Zellen wurde zur Aufrechterhaltung der tetracyclinregulierbaren Genexpression mit Zeocin und zur Aufrechterhaltung der Repressorexpression mit Blasticidin supplementiert. Um die Expression von p25 bzw. p35 zu induzieren, wurde den Zellen Tetracyclin (tet, 1µg/ml; Gibco-Invitrogen Corporation) zugesetzt. Dem Medium der HEK 269- und HEK 269 B1-Zellen wurde zur Aufrechterhaltung der βAPP-Expression Geneticin zugefügt. Die HEK 293 B1-Zellen bzw. HEK 269 B1-Zellen wurden zur Aufrechterhaltung der BACE-1-Expression mit Zeocin supplementiert.

2.2.3 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und Feuchtigkeitssättigung im CO₂-Inkubator (Hera cell; Heraeus/Kendro). Es wurden 10 cm Zellkulturschalen (Nunc) mit je 10 ml entsprechendem Kulturmedium (siehe 2.2.2) benutzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank (Hera Safe HS12; Heraeus/Kendro). Wachstum und Konfluenz der Zellen wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskopes (Wiloverts 10x 4/10/20; Hund) kontrolliert.

Bei Konfluenz wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml sterilem PBS-Puffer (140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄ in dH₂O, pH 7,4 mit HCl eingestellt, autoklaviert (120°C, 1,2 bar, 20 min)) gewaschen. Um die adhärenen Zellen von den Zellkulturschalen abzulösen, wurde ihnen 1 ml Trypsin-EDTA (Gibco-Invitrogen Corporation) zugefügt. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Trypsinierung durch Zugabe von 1ml Kulturmedium, das einen Trypsininhibitor im FKS enthält, angehalten. Die Zellen wurden mit Hilfe einer sterilen Einwegpipette (2 ml; Sarstedt) trituiert und in ein steriles

Material und Methoden

Einweg-PP-Röhrchen (15 ml; Sarstedt) überführt. In einem Zentrifugationsschritt (1000 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur, Megafuge 1,0; Heraeus/Kendro) wurden die Zellen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach Resuspensionierung der Zellen mit 1 ml Zellmedium, wurden sie in entsprechender Verdünnung auf Zellkulturschalen mit je 10 ml Kulturmedium aufgeteilt. Die Verdopplungsrate der Zellen beträgt ca. 24-36 Stunden.

Um die Zellen weiter verarbeiten zu können, wurden Zellpellets hergestellt. Dazu wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml sterilem PBS-Puffer gewaschen. Der PBS-Puffer wurde abgesaugt und durch 1 ml gekühlten (4°C) sterilen PBS-Puffer ersetzt. Mit einem sterilen Spatel löste man die Zellen von der Zellkulturschale ab und überführte sie in ein steriles Reaktionsgefäß (1,5 ml; Sarstedt). Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1000 x g, 5 Minuten, 4°C, Kühlzentrifuge für Eppendorfreaktionsgefäße „Biofuge fresco“; Heraeus/Kendro) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -80°C (Gefrierschrank -80°C; Elektrolux) gelagert.

Zum Anlegen einer Dauerkultur (Kryokonservierung) wurde zuerst das Kulturmedium der konfluenten Zellen abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml sterilem PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin versetzt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wurde die Ablösung der Zellen durch Zugabe von 1 ml Kulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden trituiert und in ein steriles Einweg-PP-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (1000 x g, 5 min, Raumtemperatur, Megafuge 1,0; Heraeus/Kendro) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml Einfriermedium (90 % FKS (PAA), 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid; Roth)) resuspendiert. Die gelösten Zellen wurden dann in drei Einfriergefäße (Qualifreeze; Qualilab) transferiert und mit Hilfe von Einfrierboxen (Starstedt) bei -80°C langsam herunter gekühlt. Die Zellen wurden entweder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung oder langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.4 Transfektion von DNA und Selektion stabiler Transfektanten

Die zur Transfektion vorgesehenen Zellen wurden in einer 10 cm Zellkulturschale bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert. 500 µl OptiMEM-Medium (Gibco-Invitrogen Corporation) wurden mit 10 µl Transfektionsreagenz Lipofectamine (Lipofectamine 2000; Invitrogen) versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem weiteren sterilen Reaktionsgefäß wurden 500 µl OptiMEM-Medium mit der gewünschten Plasmid-DNA versetzt. Die beiden Ansätze wurden zusammengefügt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung gleichmäßig in die Zellkulturschale der zu transfizierenden Zellen geträufelt. Wenn eine transiente Transfektion gewünscht war, wurden die Zellen innerhalb 24-48 Stunden für das entsprechende Experiment eingesetzt. Im Falle einer stabilen Transfektion wurden die Zellen nach 24 Stunden auf das entsprechende Selektionskulturmedium gesetzt. Nachdem untransfizierte Zellen abgestorben und ausreichend Einzelzellklone herangewachsen waren (ca. 2 Wochen), wurden die Einzelzellklone mit Hilfe einer 100 µl Pipette auf eine 24-well-Platte (Nunc) transferiert. Nach weiterer Kultivierung der Einzelzellklone unter Selektionsdruck wurden sie in größere Zellkulturschalen übertragen und anschließend mit der Western-Blot-Analyse auf die gewünschte Expression überprüft.

2.3 BACE-1-Aktivitätsmessung

Zur Messung der BACE-1-Aktivität der Sp25-Zellen bediente man sich des „BACE-Activity-Assay“ (100). Als Substrat der BACE-1-Aktivitätsmessung (siehe Abb. 13) wurde ein Peptid mit der β APP^{sw} Sequenz (Doppelmutation im β APP-Gen, Lysin595→Asparagin und Methionin596→Leucin) gewählt. Durch diese Mutationen an der BACE-1-Schnittstelle von β APP erhöht sich die Affinität von BACE zu β APP und der von BACE-1 prozessierte β APP-Anteil erhöht sich auf das sechs- bis acht-fache (94,95). Dieses Substrat wurde mit einer fluoreszierenden CyTM3- und einer quenchenden Cy5Q-Gruppe konjugiert, Cy3-SEVNLDAEFK-Cy5Q-NH₂ (Amplify Fluorografie Reagenz; Amersham Biosciences). Da das Absorptionsspektrum der quenchenden Gruppe mit dem Emissionsmaximum der fluoreszierenden Gruppe überlappt, wird die Fluoreszenz des Substratpeptids verhindert. Spaltet jedoch BACE-1 das Peptid, wird die fluoreszierende

Gruppe von der quenchenden Gruppe getrennt und man kann die Fluoreszenzsignale messen.

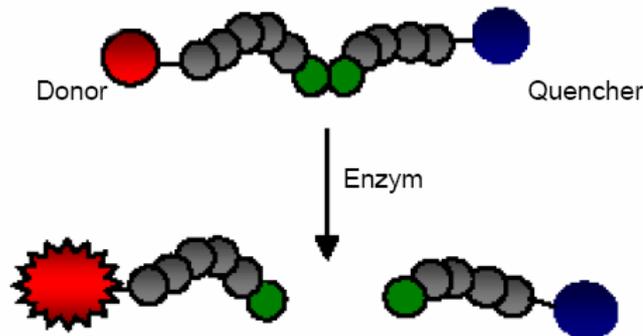


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Entstehung des Fluoreszenzsignals

Die Fluoreszenz des Substratpeptids wird durch die quenchende Gruppe (blau) verhindert. Spaltet BACE-1 das Peptid, wird die floureszierende Gruppe (rot) von der quenchenden Gruppe (blau) getrennt und die Fluoreszenz kann gemessen werden. [Quelle: modifiziert nach „Homogeneous Imaging Assay for Measuring Aspartic Proteinase Activity“; Amersham Biosciences]

Das Experiment wurde in 96-well Mikrotiterplatten (Nunc) angesetzt und die Fluoreszenzsignale mit Hilfe eines Fluorimeters (Fluoroscann Ascent FL, Excitation 530 nm, Emission 570 nm, Messintervall 30s, Messzeit 30 min; Labsystems) gemessen. Der Reaktionsansatz bestand aus je 10 μ l Probe (Membranpräparationen, siehe 2.1.3, der entsprechenden Zellen mit je gleicher Membranproteinkonzentration, siehe 2.1.5) und 90 μ l Substrat-Puffer-Lösung (2 μ l Amplify Fluorografie Reagenz, 50 mM NaAcetat pH 4,5). Um die BACE-1-Spezifität der gemessenen Signale zu überprüfen, wurden die Ansätze der BACE-1 exprimierenden Zellen mit einem BACE-Inhibitor (500 nM GL189, H-EVNstatineVAEF-NH₂; synthetisiert von K. Maskos und W. Bode) versetzt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Isolation

Zur Isolation der Total-RNA wurde der peqGOLD RNAPure Kit (PeqLab, Erlangen) verwendet. Zuerst wurden die konfluenten Zellen einer 6 cm Zellkulturschale (Nunc) mit 2 ml peqGOLD RNAPure durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette homogenisiert und in Polypropylen Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur fügte man 0,4 ml Chloroform (unter dem Abzug!) zu und schüttelte die Lösung kräftig für 15 Minuten. Nachdem die Lösung 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wurde zur Phasentrennung zentrifugiert (12.000 x g/ 5 min, 4°C; JA-20, Beckmann). Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Polypropylen Zentrifugenröhrchen überführt und 1 ml Isopropanol zugesetzt. Es erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten und anschließend eine Zentrifugation (12.000 x g/ 10 min, 4°C; JA-20, Beckmann). Die präzipitierte RNA wurde nun zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen. Dann wurde das RNA-Pellet 60 Minuten an der Luft getrocknet und in RNase-freiem Wasser gelöst.

2.4.2 Northern-Blot-Analyse

10X MOPS: 200 mM MOPS pH 7,0, 20 mM NaAc, 10 mM EDTA

Probenpuffer: 100 µl 5X MOPS, 175 µl Formaldehyd 37% (Sigma), 500 µl Formamide, 1 µl Ethidiumbromid

blue juice: 30 % Glycerin in DEPC-H₂O, 0,1 % Bromphenolblau (Fluka), 0,1 % Xylencyanol (Merck)

20X SSC: 3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat, pH 7,0

Hybridisationspuffer: 250 mM Na₂HPO₄, 250 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, 1 % BSA, 7 % SDS

Die Total-RNA wurde in einem 1,2 % Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurde je 10 µg RNA zusammen mit 72 µl Probenpuffer und 6 µl blue juice für 15 Minuten bei 65°C erhitzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 V und 50 mA für 5

Material und Methoden

Stunden, wobei der Laufpuffer (1X MOPS) nach 2 Stunden Laufzeit vollständig erneuert wurde. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel zuerst 5 Minuten mit DEPC-H₂O und dann 2-mal 20 Minuten in 10X SSC bei Raumtemperatur gewaschen (200 upm, KM2 Schüttler; Edmund Buhler). Daraufhin erfolgte über Nacht der Transfer auf eine HyBond-N-Membran (Amersham Biosciences) mittels Kapillarkräfte. Die Membran wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur in 5X SSC gewaschen (200 upm, KM2 Schüttler; Edmund Buhler) und anschließend 1 Stunde bei 80°C gebacken und zur weiteren Vernetzung von RNA und Membran mit UV-Licht (254 nm, 3 min) behandelt. Die Membran wurde 2 Stunden bei 65 °C in dem Hybridisationspuffer inkubiert. Dann wurde die ³²P-dCTP (Random Primers DNA Labeling System, Invitrogen)-markierte BACE-1-ORF-Sonde zugefügt und die Hybridisation über Nacht bei 65°C durchgeführt. Die überschüssige Sonde wurde durch Waschen mit 2X SSC und 0,1 % SDS bei 25°C, gefolgt von Waschen mit 0,1X SSC und 0,1 % SDS bei 65°C entfernt. Die Signale wurden mit Super Rx (Fuji X-ray medical) Filmen detektiert und im Filmentwicklungsgerät (Curix 60; Agfa) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

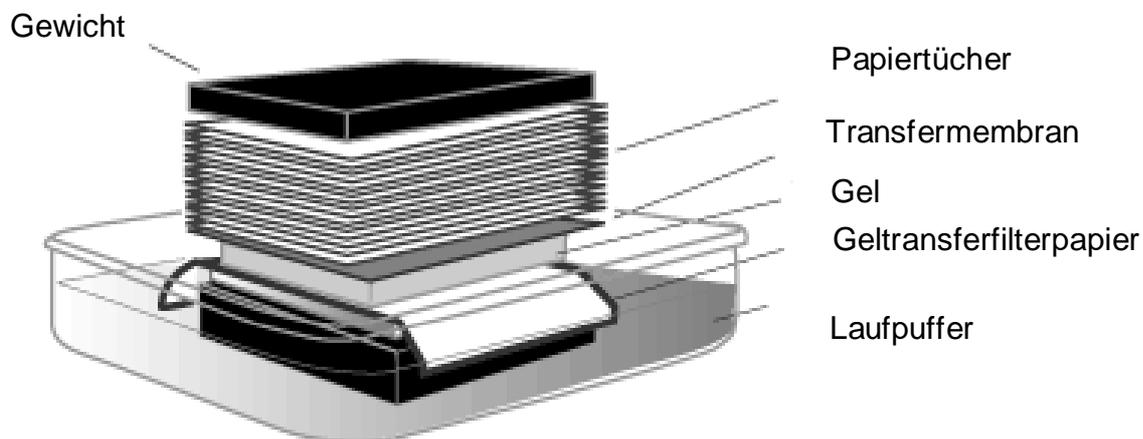


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung beim Northern-Blot

Dargestellt ist die Versuchsanordnung beim Northern-Blot. Die im Gel aufgetrennte RNA wird durch Kapillarkräfte in die Transfermembran überführt.

[modifiziert nach www.biochem.arizona.edu/.../lecture2.html]

2.4.3 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer: 0,04 M Tris-Acetat, 0,001 M EDTA

DNA-Ladepuffer (6X): 15 % Ficoll (Sigma), 0,25 % Bromphenolblau (Sigma), Xylene Cyanol (Merck)

Ethidiumbromid (50.000X): 10 mg/ ml in dH₂O (Sigma)

Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA wurden 1 % Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer gelöst, indem die Lösung ca. 2 min in der Mikrowelle erwärmt wurde. Die Agarosegellösung wurde in die Gelkammer gegossen, mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt und anschließend der Probentaschenkamm eingesetzt. Als Molekulargewichtsmarker wurde die 1 kb „DNA ladder“ von Gibco verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 120 V mit TAE-Puffer durchgeführt.

2.4.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Unter einem UV-Lichtschirm wurden die entsprechenden DNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der DNA-Fragmente unter Verwendung des Nucleo Spin Extract Kits (Macherey-Nagel) gemäß den Angaben des Herstellers.

2.4.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zum Verdau der Vektoren inkubierte man bei 37 °C über Nacht 3 µl Vektor mit je 1 µl der zwei benötigten Restriktionsendonukleasen (NEB) und 4 µl 10X Reaktionspuffer (NEB). Der Ansatz wurde bis zu einem Volumen von 40 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Zur Spaltung der cDNA-Fragmente verwendete man 1 µg DNA, 2 µl 10X Reaktionspuffer, je 0,5 µl Restriktionsendonuklease und 16 µl dH₂O.

2.4.6 Dephosphorylierung von DNA

Um zu verhindern, dass sich vor einer Ligation der linearisierte Vektor von selbst wieder schließt, wurden die 5'-Phosphatgruppen mit einer Krabben (shrimp) alkalischen Phosphatase (SAP; Roche) entfernt. Hierfür wurden 40 µl des Vektorplasmidverdaus mit 1 µl SAP, 6 µl Reaktionspuffer (entspricht dem beim Verdau verwendeten Puffer) und 53 µl destilliertem Wasser versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

2.4.7 Ligation von DNA

In den linearisierten und dephosphorylierten Plasmidvektor konnte nun das DNA-Fragment, welches zuvor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut wurde, eingefügt werden. Dazu verwendete man 2 µl Plasmidvektor, 8 µl DNA-Fragment, 2 µl Ligationspuffer (Fermentas), 1 µl T4-DNA Ligase (Fermentas) und 7 µl dH₂O. Dieser Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.4.8 Herstellung kompetenter E. coli-Bakterien

LB-Medium (Low Salt Luria-Bertani Medium): 1 % Trypton (BD), 0,5 % Yeast Extract (BD) und 0,5 % NaCl (Roth) in dH₂O, pH 7,0 mit NaOH einstellen und bei 120°C/ 1,2 bar für 20 min autoklavieren, vor Benutzung wurde Selektionsantibiotika zugesetzt (Ampicillin 100 µg/ml; Sigma)

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

Eine E. coli DH5α-Übernachtskultur wurde 1:100 in 100 ml LB-Medium verdünnt und im Schüttelinkubator (200 upm) bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Dann wurden die Zellen 5 Minuten zentrifugiert (Megafuge 1,0 R; Heraeus; 1.500 x g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 17,5 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer resuspendiert. Nach 30 min auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert (5 min, 1.500 x g, 4 °C) und in 1 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden dann entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -80°C konserviert.

2.4.9 Transformation von DNA-Konstrukten in kompetente E. coli-Bakterien

Ampicillin-LB-Agarplatten: 1 % Trypton (BD), 0,5 % Yeast Extract (BD) und 0,5 % NaCl (Roth) in dH₂O, pH 7,0 wurde mit NaOH (Merck) eingestellt, 15 g/l Agar (BD) zugesetzt und die Lösung bei 120 °C, 1,2 bar für 20 min autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wurde Ampicillin (Sigma) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt und die Lösung in die Platten (sterile Bakterialschalen, 10 cm Durchmesser; Nunc) gegossen

Zu den in 1 ml CaCl₂-Puffer suspendierten kompetenten E. coli (siehe 2.4.8) fügte man 1 µl Ligationsansatz hinzu und inkubierte für 60 min auf Eis. Darauf folgte bei 42 °C für 90 s ein Hitzeschock. Damit die Bakterien die DNA aufnehmen konnten, erfolgte eine Inkubation auf Eis für 2 min. Anschließend wurde den Bakterien 1 ml LB-Medium zugefügt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen für 1 min/2.300 upm bei Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand grob verworfen. Die verbleibenden Bakterien wurden mit einer 100 µl Pipette aufgenommen und auf die Ampicillin-LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

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

Zur Präparation von Plasmidvektoren im kleinen Maßstab wurde der NucleoSpin Plasmid Kit von Macherey-Nagel verwendet.

Von der mit transformierten E. coli DH5α beimpften Ampicillin-LB-Agar-Platte wurden Klone mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in je ein autoklaviertes Reaktionsgefäß (15 ml) mit 3ml LB-Medium gegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Dann wurde 1,5 ml davon für 1 min bei 12.000 upm (RT) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurden 150 µl P1-Puffer zugefügt und das Pellet gelöst (10 s, Vortex). Anschließend gab man 150 µl P2-Puffer hinzu und schüttelte die Lösung vorsichtig für 1 min. Als nächstes wurde der P3-Puffer zugefügt (3 s, Vortex). Es erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 12.000 upm (RT). Der die DNA enthaltende Überstand wurde in 1 ml 100 %-iges Ethanol überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (1 min, 12.000 upm, RT), der Überstand wurde verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Dann wurde die DNA in 80 µl dH₂O resuspendiert.

2.4.11 Präparation von Plasmidvektoren im großen Maßstab (Maxi-Präp)

Zur Präparation von Plasmidvektoren im großen Maßstab wurde der QIAfilter Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet.

Von der mit transformierten *E. coli* DH5 α beimpften Ampicillin-LB-Agar-Platte wurden Klone mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in je einen autoklavierten Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium gegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Dann wurde die Lösung auf zwei Reaktionsgefäße (50 ml) verteilt. Nach Zentrifugation (15 min, 4.500 upm, 4 °C) wurde der Überstand verworfen. Dann wurden die Zellen gemäß den Angaben des Herstellers behandelt und somit die DNA eluiert. Die gewonnene DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Nun wurde die DNA für 2 min mit 400 μ l dH₂O inkubiert und danach vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Alle hergestellten DNA-Konstrukte wurden zur Verifizierung von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) sequenziert.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von BACE-1 und β APP im Gehirn von Down-Syndrom- und Alzheimer-Demenz-Patienten

Die Analyse der Funktion der β -Sekretase BACE-1 in der Plauepathologie des Down-Syndroms stellte die zentrale Aufgabe der vorliegenden Arbeit dar. Um eine mögliche Beteiligung von BACE-1 an der erhöhten Bildung von $A\beta$ (150) aufzudecken, wurde die Proteinexpression im humanen Gehirn genauer untersucht. Zudem wurde die Expression von β APP, ein Chromosom 21-Gen und Substrat der β -Sekretase, mitbestimmt.

Es standen drei Gehirne von Trisomie 21 (T21)-Patienten, vier Gehirne von Alzheimer-Demenz (AD)-Patienten und fünf Gehirne von Kontrollen (K), die weder Zeichen einer T21 noch einer AD aufwiesen, zur Verfügung (siehe Tabelle 5). Die Zuordnung der Gehirne zu den verschiedenen Krankheitsstufen erfolgte durch die Braak & Braak-Klassifikation (151). Diese Klassifikation richtet sich nach der Lokalisation der neurofibrillären Bündel und unterscheidet zwischen sechs Krankheitsstufen. Stufe I und II bezeichnen klinisch unauffällige Fälle, Stufe III und IV die Progression der Erkrankung und Stufe V und VI die voll entwickelte Demenz-Erkrankung. Außerdem wurde die Einteilung der CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) herangezogen. Ziel der CERAD-Studie ist es anhand von klinischen, neuropathologischen und neuropsychologischen Kriterien die Diagnose der Alzheimer-Demenz möglichst exakt stellen zu können. In der CERAD-Klassifikation wird die Dichte der Amyloid-Plaques im Neokortex semiquantitativ als gering, mäßig oder hoch bewertet. Aus einem altersbezogenen Plaque-Score ergibt sich dann die Einteilung in CERAD 0, A, B oder C (152).

Da die Überexpression von BACE-1 in der Alzheimer-Demenz im Frontal- und Temporallappen (107-112) beschrieben wurde, wurden auch diese Bereiche in den folgenden Untersuchungen verwendet.

Ergebnisse

	Nummer	Diagnose	Geschlecht	Alter	Braak & Braak	CERAD	Region	PMI
1	A48/00	T21	M	58	V-VI	C	f/t	86h
2	S16/02	T21	W	23	0	0	f/t	34h
3	RZ236	T21	M	37	III	0	f/t	12h
4	RZ63	AD	M	73	V-VI	C	f/t	>24h
5	RZ55	AD	M	80	V	C	f/t	12h
6	RZ171	AD	W	73	V-VI	C	f/t	?
7	RZ122	AD	W	83	V-VI	C	f/t	14h
8	RZ77	K	M	57	I	0	f/t	>24h
9	RZ85	K	M	63	I	0	f/t	18h
10	RZ99	K	W	56	0	0	f/t	14h
11	RZ104	K	M	60	I-II	0	f/t	11h
12	RZ143	K	M	62	0	0	f/t	24h

Tabelle 5: Humanes Hirngewebe

Die Tabelle listet die zur Verfügung gestandenen Gewebeprobe auf. Es wurden drei Gehirne von Trisomie 21-Patienten (T21), vier Gehirne von Alzheimer-Patienten (AD) und fünf Kontrollgehirne (K) verwendet. Der ersten Spalte kann man die Nummerierungen der Proben entnehmen, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Die Bezeichnung der Proben in der zweiten Spalte gibt die Nomenklatur der Gehirnbank wieder. Die neuropathologische und klinische Einordnung der Alzheimer-Stadien erfolgte durch die Braak & Braak (0-VI)- und CERAD (0/C)-Klassifikation. Männlich (M); weiblich (W); Frontallappen (F); Temporallappen (T); post mortem Intervall (PMI), Stunde [Zeitangabe] (h)

3.1.1 Analyse der Proteinexpression von BACE-1 und β APP im Gehirn von Down-Syndrom- und Alzheimer-Demenz-Patienten

Da es sich sowohl bei BACE-1 als auch bei β APP um Transmembranproteine handelt, wurde das Expressionsverhalten zunächst mit Hilfe der Membranpräparation (siehe 2.1.3) studiert. Mit dieser Technik lassen sich Proteine, die in der Zellmembran verankert sind, sehr gut anreichern. Bei der späteren Auftrennung der Proteine lässt sich so unspezifischer Hintergrund verringern. Die Darstellung der β APP-Banden in der Western-Blot-Analyse bereitete zuerst Schwierigkeiten, da sich mit dem 6687-Antikörper (153) gegen das C-terminale Ende von β APP keine spezifischen Signale darstellen ließen. Unter der

Ergebnisse

Verwendung des 22C11-Antikörpers (146) konnten jedoch Doppelbanden nachgewiesen werden. Bei 100 kDa zeigte sich die immature und bei 110 kDa die mature Bande von β APP. Zur Detektion von BACE-1 erwies sich der B1-NT-Antikörper am besten geeignet. Mit ihm konnten spezifische BACE-1-Banden bei 65 kDa nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle wurde das Transmembranprotein Nicastrin, ein Bestandteil des γ -Sekretase-Komplexes (154-157), ausgewählt, und mit dem N1660-Antikörper spezifische Banden bei ca. 100 kDa detektiert.

Die Abbildung 15 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Western-Blot-Analyse. Das untersuchte Material entstammte aus dem Bereich des Frontallappens. In den ersten drei Spalten sind die T21-Proben aufgetragen, gefolgt von vier AD-Proben und fünf Kontrollproben (K). Man erkannte hier, dass die T21-Gehirne Nr. 1 und Nr. 3 im Vergleich zu den Kontrollgehirnen eine deutlich höhere Proteinexpression an β APP aufwiesen. Zudem zeigten sich in den T21-Gehirnen Nr. 1 und Nr. 3 und in AD-Gehirnen ebenfalls deutlich höhere BACE-1-Proteinexpressionen als in den Kontrollgehirnen. Jedoch waren die Proteinmengen innerhalb der einzelnen Gewebegruppen nicht homogen. So fielen bei der Darstellung von β APP in dem T21-Gehirn Nr. 2 und in dem Kontrollgehirn Nr. 11 sehr schwache Banden auf. Ein derartiger „Ausreißer“ war auch bei der Detektion von BACE-1 im T21-Gehirn Nr. 2 zu verzeichnen.

Als Ladekontrolle der Membranproteine wurde ein Nachweis für Nicastrin geführt. Hier zeigte sich ebenfalls eine sehr hohe Variabilität. Mit den Membranpräparationen des humanen Gehirngewebes konnten daher keine abschließenden Erkenntnisse demonstriert werden. Die weiteren Arbeiten wurden mit RIPA-Lysaten (2.1.4) durchgeführt.

Zur Detektion der β APP- bzw. BACE-1-Expression im RIPA-Lysat wurde ebenfalls der 22C11- bzw. der B1-NT-Antikörper verwendet. Als Ladekontrolle wurde β -Actin verwendet. β -Actin liegt in den Zellen in Bündeln oder als Netzwerk vor und ist entscheidend an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und der Motilität der Zelle beteiligt (Löffler und Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 1998). Wegen der ubiquitären Bedeutung von β -Actin ist davon auszugehen, dass es auch im menschlichen Gehirn konstant exprimiert ist und daher eine stabile Ladekontrolle darstellt.

Ergebnisse

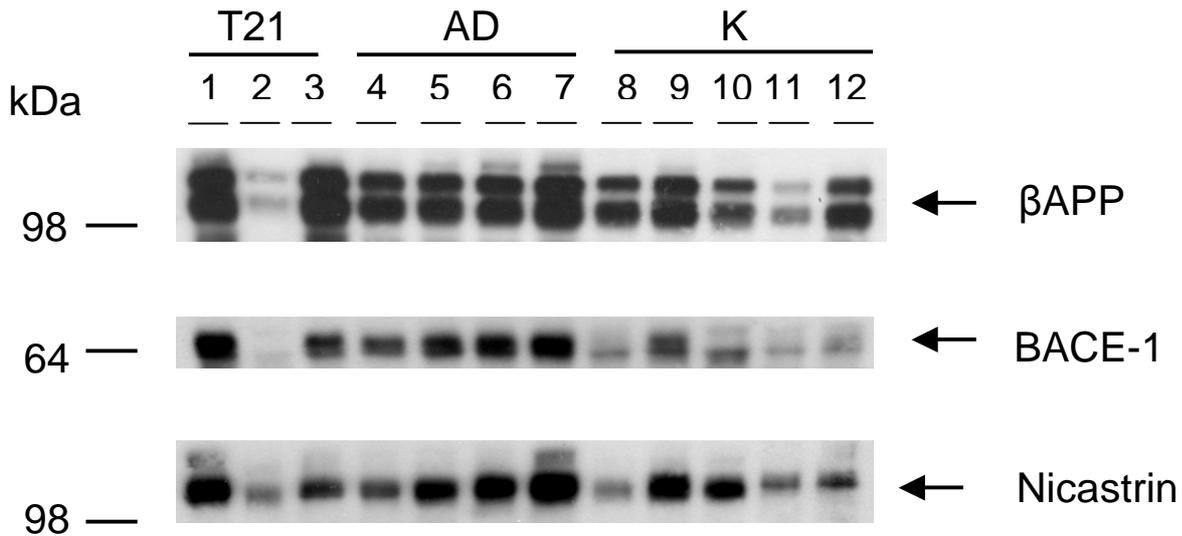


Abbildung 15: Proteinexpression von BACE-1 und β APP im humanen Gehirngewebe (Frontallappen) in der Membranpräparation

Es wurden drei Membranpräparationen von Trisomie 21 (T21)-Patienten, vier von Alzheimer-Demenz (AD)-Patienten und fünf von Kontrollen (K) verwendet. Je 50 μ g Proteinmasse wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Mit dem 22C11-Antikörper gegen β APP, dem B1-NT-Antikörper gegen BACE-1 und dem N1660-Antikörper gegen Nicastrin, als Ladekontrolle, konnten spezifische Banden detektiert werden. Molekulargewichtsstandards sind an der linken Seite der Abbildung in [kDa] angezeigt.

Die Abbildung 16 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse. Es wurden Gewebeproben des Frontallappens von T21-Gehirnen (1-3), AD-Gehirnen (4-7) und Kontrollgehirnen (8-12) verwendet. Mit dem Antikörper gegen β APP konnten hier im T21-Gehirn Nr. 3 höhere β APP-Spiegel als in den Kontrollgehirnen dargestellt werden. In der Analyse der BACE-1-Expression erkannte man in den T21- und den AD-Gehirnen höhere Expressionen als in den Kontrollgehirnen. Jedoch zeigten sich auch im RIPA-Lysat Schwankungen in der Proteinexpression innerhalb der einzelnen Gewebegruppen (T21, AD und K). So wiesen die T21-Gehirne (1-3) mit der schwächeren Bande bei Gehirn Nr. 2 keine einheitliche Expression an BACE1 auf. Dies ist ebenso in den AD- und Kontrollgehirnen festzustellen. β -Actin erwies sich im RIPA-Lysat als geeignete Ladekontrolle, da man sehr gleichmäßige Banden bei ca. 50 kDa erhielt.

Ergebnisse

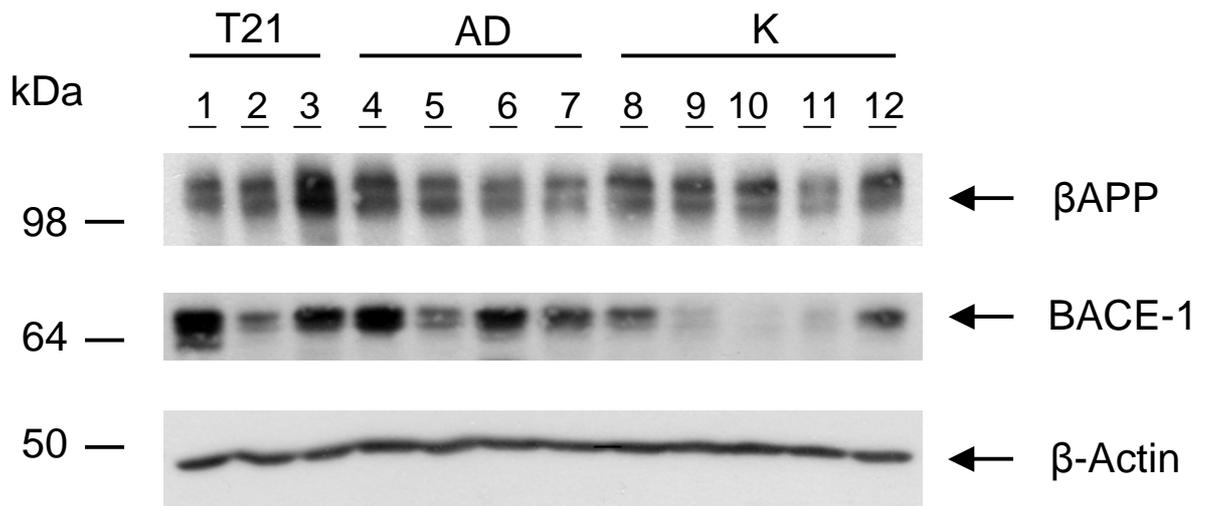


Abbildung 16: Proteinexpression von BACE-1 und β APP im RIPA-Lysat des humanen Gehirngewebes (Frontallappen)

Es wurden RIPA-Lysate der drei Trisomie 21 (T21)-Patienten, der vier Alzheimer-Demenz (AD)-Patienten und der fünf Kontrollen (K), die weder an T21 noch an AD erkrankt waren, verwendet. Es wurde je 30 μ g Protein auf das Gel aufgetragen. Mit dem 22C11-Antikörper gegen β APP, dem B1-NT-Antikörper gegen BACE-1 und dem β -Act-Antikörper gegen β -Actin, als Ladekontrolle, konnten spezifische Banden detektiert werden. Molekulargewichtsstandards sind an der linken Seite der Abbildung in [kDa] angezeigt.

Die Abbildung 17 zeigt ein RIPA-Lysat von den Gehirnen (1-12), die auch für die Abbildung 16 verwendet worden sind, jedoch handelt es sich hierbei um regional unterschiedliche Gewebeproben der jeweiligen Frontallappen. Mit diesen Proben wurde wie in Abbildung 16 verfahren und die gleichen Antikörper verwendet. Bezüglich der β APP-Expression zeigten sich hier besonders die T21-Gehirne Nr. 1 und Nr. 3 im Vergleich zu den AD- und Kontrollgehirnen prominent. Es ist aber zu vermerken, dass auch die AD-Proben Nr. 4 und Nr. 5 eine höhere β APP-Expression aufwiesen. Die T21- und AD-Gehirne stellten sich auch hier im Vergleich zu den Kontrollgehirnen mit einer erhöhten BACE-1-Proteinexpression dar. Jedoch konnte im T21-Gehirn Nr. 2 nur eine niedrige BACE-1-Proteinexpression dargestellt werden. Im Alzheimer-Gehirn Nr. 7 fiel im Gegensatz zu den restlichen AD-Gehirnen eine schwache BACE-1-Bande auf. Die β -Actin-Banden sprachen für eine jeweils gleich aufgetragene Proteinmenge.

Ergebnisse

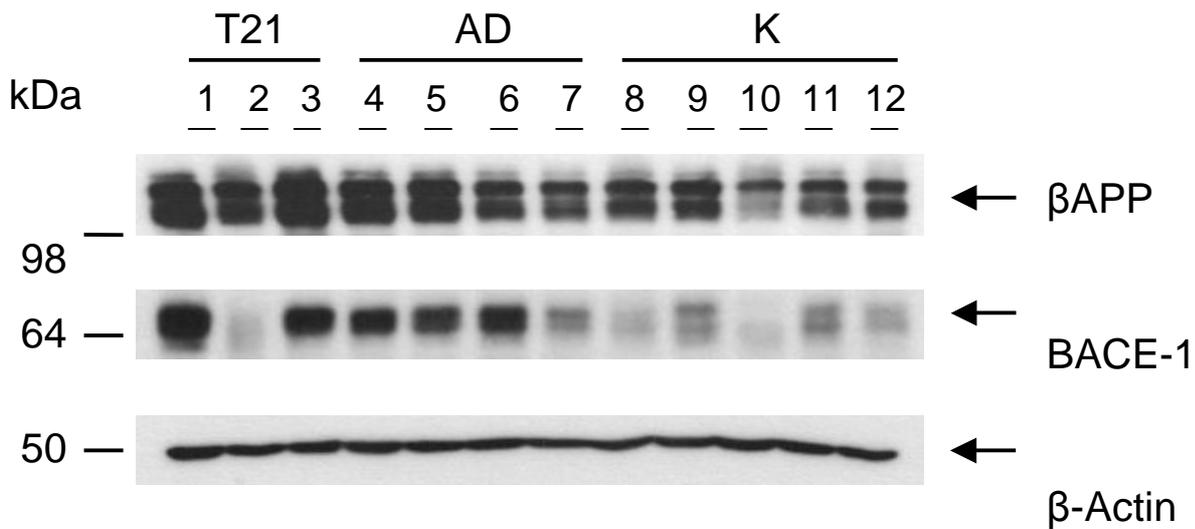


Abbildung 17: Proteinexpression von BACE-1 und β APP im RIPA-Lysat des humanen Gehirngewebes (Frontallappen)

Es wurden RIPA-Lysate der drei Trisomie 21 (T21)-Patienten, der vier Alzheimer-Demenz (AD)-Patienten und der fünf Kontrollen (K) verwendet (andere Gewebeproben der gleichen Gehirne im Vergleich zu Abb. 16). Je 30 μ g Protein wurden auf das Gel aufgetragen. Mit dem 22C11-Antikörper gegen β APP, dem B1-NT-Antikörper gegen BACE-1 und dem β -Actin-Antikörper gegen β -Actin, als Ladekontrolle, konnten spezifische Banden detektiert werden. Molekulargewichtsstandards sind an der linken Seite der Abbildung in [kDa] angezeigt.

Neben Proben der Frontallappen wurden auch Proben der Temporallappen der Gehirne (1-12) im RIPA-Lysat analysiert. Abbildung 18 zeigt exemplarisch eine Western-Blot-Analyse. Hier konnte in den T21-Gehirnen eine erhöhte β APP-Proteinexpression nachgewiesen werden. Jedoch ließen sich auch in dem AD-Gehirnen Nr. 7 und den K-Gehirnen Nr. 8, 9 und 10 erhöhte β APP-Proteinexpressionen detektieren. Die BACE-1-Proteinexpression zeigte sich in diesem Experiment in den AD- und K-Gehirnen variabel.

Ergebnisse

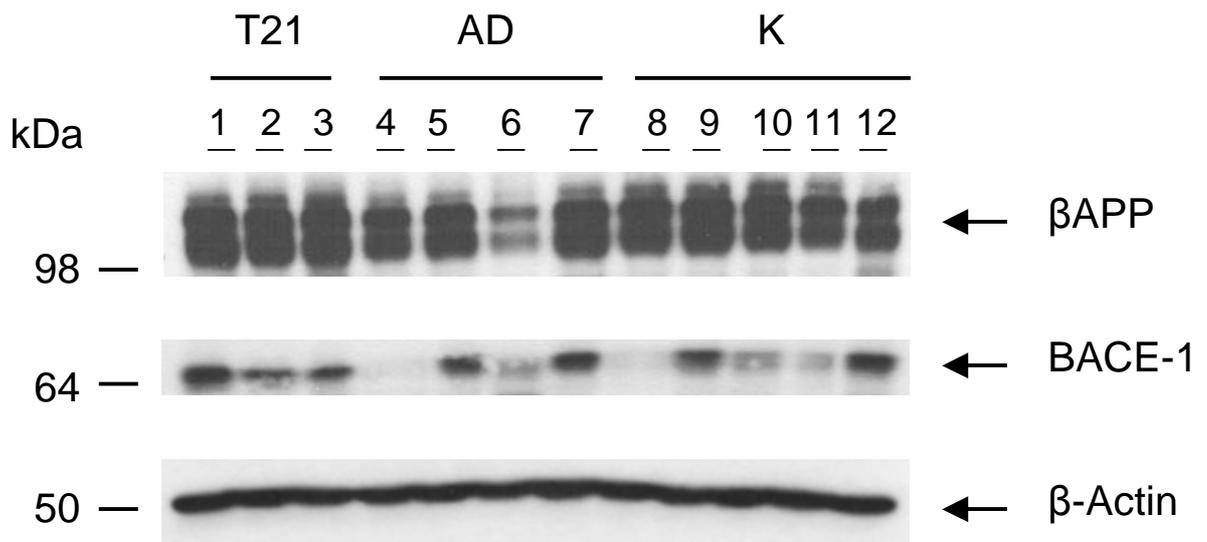


Abbildung 18: Proteinexpression von BACE-1 und βAPP im RIPA-Lysat des humanen Gehirngewebes (Temporallappen)

Es wurden RIPA-Lysate der drei Trisomie 21 (T21)-Patienten, der vier Alzheimer-Demenz (AD)-Patienten und der fünf Kontrollen (K) verwendet. Je 30 µg Protein wurden auf das Gel aufgetragen. Mit dem 22C11-Antikörper gegen βAPP, dem B1-NT-Antikörper gegen BACE-1 und dem β-Actin-Antikörper gegen β-Actin, als Ladekontrolle, konnten spezifische Banden detektiert werden. Molekulargewichtsstandards sind an der linken Seite der Abbildung in [kDa] angezeigt.

3.1.2 Quantifizierung der Proteinexpression von BACE-1 und βAPP im Gehirn von Down-Syndrom- und Alzheimer-Demenz-Patienten im RIPA-Lysat

Die Ergebnisse von sieben Wiederholungen des RIPA-Lysat-Experimentes (vier Experimente aus Material des Frontallappens und drei Experimente aus Material des Temporallappens) wurden ausgewertet, indem die Chemilumineszenzsignale aufgenommen wurden (siehe 2.1.7). Zuerst wurden die gemessenen Signale der BACE-1- und βAPP-Proteinexpressionen der einzelnen Proben eines Experimentes in Relation zur Ladekontrolle β-Actin gesetzt. Aus diesen Werten wurde der Mittelwert für die BACE-1 bzw. βAPP-Expression für die jeweilige Gewebegruppe (T21, AD und K) bestimmt. Dann wurden die Mittelwerte der BACE-1- bzw. βAPP-Expressionen der Trisomie-Gehirne zu den Mittelwerten der BACE-1- bzw. βAPP-Expressionen der Kontrollgehirne ins Verhältnis gesetzt. Dementsprechend wurden auch die Mittelwerte der BACE-1- bzw.

Ergebnisse

β APP-Expressionen der Alzheimer-Demenz-Gehirne zu den Mittelwerten der BACE-1- bzw. β APP-Expressionen der Kontroll-Gehirne ins Verhältnis gesetzt. Diese Berechnung wurde für jedes Experiment durchgeführt und anschließend wurden die Ergebnisse in einem Diagramm zusammengefasst (siehe Abbildung 19). Die BACE-1-Proteinmengen in der T21 waren im Vergleich zu den Kontrollproben 1,4-fach nichtsignifikant (TT-Test; $p=0,76$) erhöht. Die β APP-Proteinmengen zeigten in der T21 im Vergleich zu den Kontrollen eine 1,4-fache nichtsignifikante (TT-Test; $p=0,53$) Erhöhung. In den Gehirnproben der Alzheimer-Demenz-Patienten konnte die BACE-1-Proteinexpression 1,5-fach nichtsignifikant (TT-Test; $p=0,95$) und die β APP-Proteinexpression 1,1-fach nichtsignifikant (TT-Test; $p=0,97$) erhöht berechnet werden. Aufgrund der Expressionsschwankungen (siehe Standardabweichungen der Mittelwerte in Abbildung 19) erreichten die Ergebnisse keine Signifikanz (TT-Test, $p>0,05$), stellten jedoch Trends im Expressionsverhalten dar.

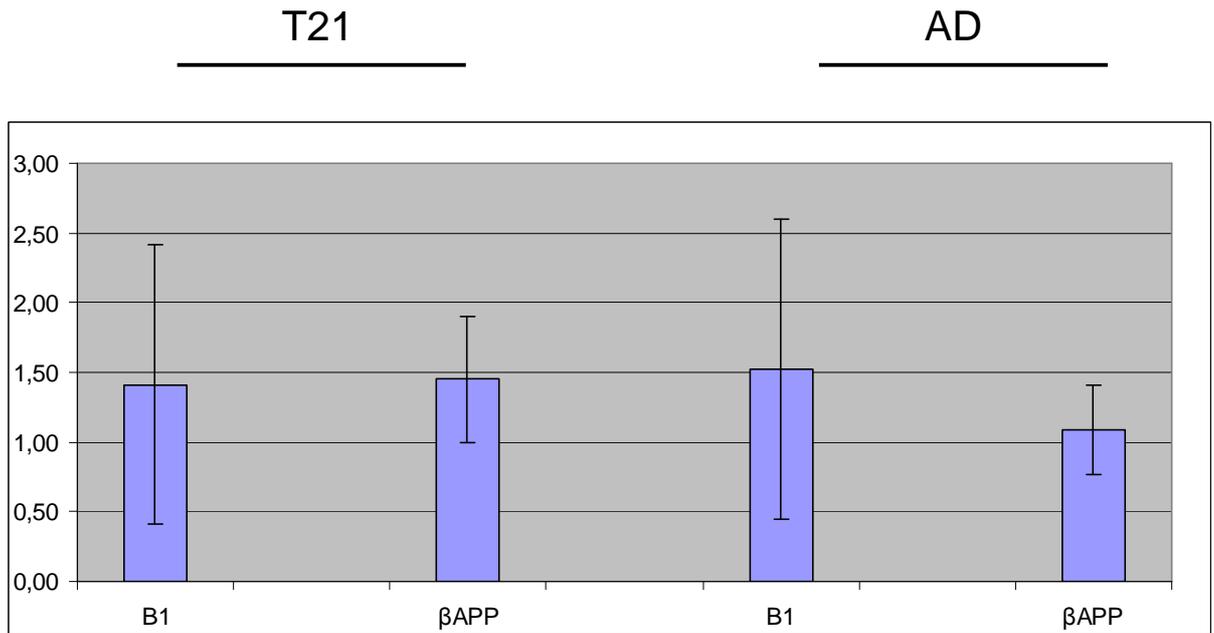


Abbildung 19: Quantifizierung der Proteinexpression von BACE-1 und βAPP im humanen Gehirn

Das Diagramm zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung der Proteinexpression von BACE-1 (B1) und βAPP im RIPA-Lysat des humanen Gehirngewebes (n=7). Die y-Achse gibt das x-fache der Proteinerhöhung im Vergleich zu den Kontrollgehirnen wieder. Die linke Hälfte des Diagramms zeigt die Ergebnisse für die Trisomie 21 (T21)-Proben. Die Mittelwerte der B1-Proteinmengen waren in der T21 im Vergleich zu den Kontrollproben 1,4-fach ($p=0,76$) erhöht. Die Mittelwerte der βAPP-Proteinmengen in der T21 waren im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls 1,4-fach ($p=0,53$) erhöht. In der rechten Hälfte des Diagramms sind die Verhältnisse für die Gehirnproben der Alzheimer-Demenz-Patienten (AD) dargestellt. Die Mittelwerte der B1-Proteinexpressionen zeigten sich in der AD 1,5-fach ($p=0,95$) und die der βAPP-Proteinexpressionen 1,1-fach ($p=0,97$) im Vergleich zu den Kontrollgehirnen erhöht. Die Ergebnisse erreichten keine Signifikanz. Die vertikalen Balken geben die Standardabweichungen an.

3.2 Auswirkungen von p25 auf die BACE-1-Expression im Zellmodell

BACE-1 scheint sowohl in der Alzheimer-Demenz als auch im Down-Syndrom eine zentrale Rolle einzunehmen, daher ist es sehr interessant die Regulation von BACE-1 besser zu verstehen. Da in p25-überexprimierenden Mäusen erhöhte BACE-1 Proteinexpressionen festgestellt wurden (149), stellte sich die Frage, ob p25 mit der Regulation der β-Sekretase BACE-1 in Verbindung steht. Damit würde sich ein neuer Regulationsmechanismus in der Pathogenese des Morbus Alzheimer erschließen.

3.2.1 Erhöhte BACE-1-Proteinkonzentrationen in Sp25-Zellen

Zur Analyse der Auswirkungen von p25 auf die Expression von BACE-1 wurden humane Neuroblastomazellen, SH-SY5Y-Zellen, verwendet. Diese Zellen verfügten über einen tetracyclin (tet)-induzierbaren p25-Expressionsvektor. Dieses „tetracyclinregulierte Expressions-T-Rex-System“ von Invitrogen stellte eine Methode dar, die Transskription bestimmter Gene spezifisch durch Zugabe des Antibiotikums Tetracyclin zu induzieren (siehe 2.2.1). Um die Wirkung des stark zytotoxischen p25 abzuschwächen, wurden die Zellen zusätzlich stabil mit dem Mikrotubulus-assoziierten Protein Tau transfiziert. Das überexprimierte Tau-Protein sollte als „Phosphorylierungs-Auffangbecken“ fungieren (158). Diese Zellen wurden Tau-SY5Y-Zellen genannt. Die Tau-SY5Y-Zellen, die den tet-induzierbaren p25-Expressionsvektor besitzen, wurden Sp25-Zellen genannt. Als Smock-Zellen wurden tau-SY5Y-Zellen bezeichnet, die einen leeren tet-induzierbaren Expressionsvektor besitzen. Die Sp25- und Smock-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Luc Buée (Université de Lille) zur Verfügung gestellt.

Aus den Smock- und Sp25-Zellen wurden RIPA-P-Lysate (siehe 2.1.4) gewonnen. Durch die Zugabe von Phosphatase-Inhibitoren wurde die Dephosphorylierung der Kinase p-cdk5 (p-cdk5 stellt die phosphorylierte und aktivierte Form der Kinase cdk5 dar) verhindert. In den ersten beiden Spalten der Abbildung 20 wurden zur Kontrolle Smock-Zellen untersucht, die mit tetracyclinhaltigem Serum (tet^+) behandelt wurden. Wie erwartet konnte man in den Smock-Zellen kein endogenes p25 nachweisen, jedoch die Proteinkinase cdk5 und schwächer deren aktivierte Form p-cdk5. Endogenes BACE-1 konnte im RIPA-P-Lysat nicht aufgezeigt werden. In den nächsten beiden Spalten wurden tet^+ Sp25-Zellen und in den darauf folgenden Sp25-Zellen, die mit tetracyclinfreiem (tet^-) Serum behandelt worden sind, aufgetragen. In den tet^+ -Sp25-Zellen konnte stark exprimiertes p25 detektiert werden. Jedoch wurde auch in den tet^- -Sp25-Zellen, wenn auch geringer als in den tet^+ -Sp25-Zellen, p25 nachgewiesen. Daraus ist zu schließen, dass der tet-induzierbare p25-Expressionsvektor auch in Abwesenheit von Tetracyclin in geringen Mengen p25 produziert und daher in den Sp25-Zellen stabil p25 exprimiert wurde. Die aktivierte Form der Proteinkinase cdk5, p-cdk5, konnte in den tet^- -Sp25-Zellen im Vergleich zu den Smock-Zellen leicht erhöht dargestellt werden. In den tet^+ -Sp25-Zellen konnte ebenfalls im Vergleich zu den tet^- -Sp25-Zellen eine leichte Erhöhung der cdk5-p Proteinmengen gezeigt werden. cdk5 konnte sowohl in den Smock- als auch in den $\text{tet}^{+/-}$ -Sp25-Zellen mit gleicher Proteinexpression nachgewiesen werden. Der Nachweis mit dem

Ergebnisse

B1NT-Antikörper deckte in den tet⁺-Sp25- und in den tet⁻-Sp25-Zellen, also unabhängig von der zusätzlichen p25-Induktion, gleich stark erhöhte Proteinmengen an BACE-1 auf.

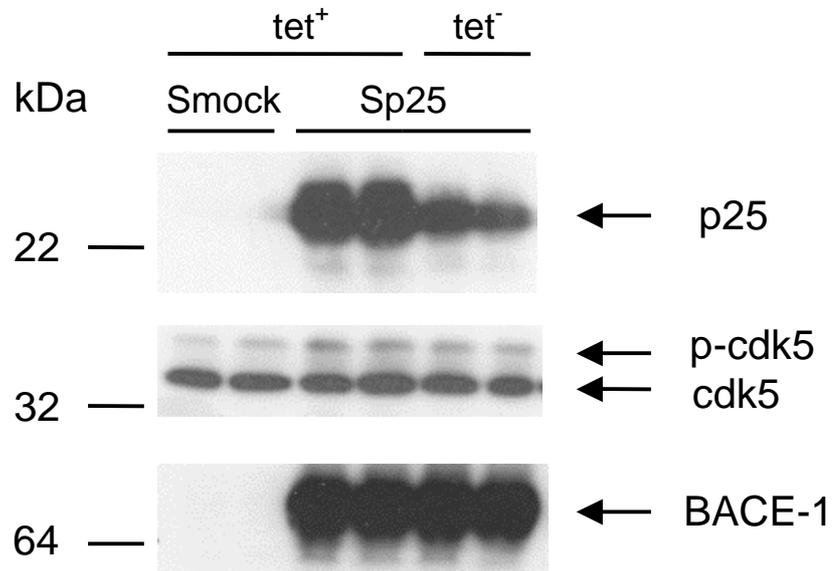


Abbildung 20: Hochregulation von BACE-1 in Sp25-Zellen im RIPA-P-Lysat

Gezeigt ist eine Western-Blot-Analyse der RIPA-P-Lysate der Zellen. In den ersten beiden Spalten wurden Tau-SY5Y-Zellen (tau-überexprimierende humane Neuroblastoma Zellen), die einen leeren tetracyclin (tet)-induzierbaren Expressionsvektor besitzen, die sog. Smock-Zellen, geladen. In den letzten vier Spalten wurden Sp25-Zellen aufgetragen. Die Sp25-Zellen sind ebenfalls Tau-SY5Y-Zellen, die jedoch einen tet-induzierbaren p25-Expressionsvektor besitzen. Mit dem p35-Antikörper gegen p25, dem cdk5-Antikörper gegen cdk5 und p-cdk5 und mit dem B1NT-Antikörper gegen BACE-1 konnten spezifische Banden detektiert werden. Die Molekulargewichtsstandards sind an der linken Seite der Abbildung in [kDa] angegeben. Zellen, die mit tetracyclinhaltigem Serum behandelt wurden, sind mit „tet⁺“ bezeichnet. Zellen, die mit tetracyclinfreiem Serum behandelt wurden, sind mit „tet⁻“ bezeichnet.

3.2.2 Erhöhte BACE-1-Aktivitäten in Sp25-Zellen

Nachdem in der Western-Blot-Analyse in den Sp25-Zellen hohe BACE-1-Proteinexpressionen gemessen wurden, folgte die Analyse der enzymatischen BACE-1-Aktivität in den Sp25-Zellen. Hierzu verwendete man die BACE-1-Aktivitätsmessung (BACE-Activity-Assay (100), siehe 2.3) mit der es möglich war, spezifisch die Aktivität der β -Sekretase zu bestimmen. Die Abbildung 21 zeigt das Ergebnis der BACE-1-Aktivitätsmessung. Als Negativkontrolle wurden HEK 269-Zellen, humane embryonale Nierenzellen mit überexprimiertem Wildtyp-APP, und Smock-Zellen benutzt. In diesen Zellen konnte nur eine sehr niedrige BACE-1-Aktivität (A) nachgewiesen werden. In den Sp25-Zellen konnte im Verlauf von 30 min (t) im Vergleich zu den HEK 269- und Smock-Zellen eine ca. 6-fach erhöhte Aktivität aufgezeichnet werden. Eine ebenfalls etwa gleich hohe BACE-1-Aktivität erzielten die HEK 269 B1-Zellen, HEK 269-Zellen, die stabil mit BACE-1 transfiziert wurden. Nach Zugabe des BACE-Inhibitors GL 189 zu den Membranpräparationen der Sp25- und HEK 269 B1-Zellen konnten nur noch geringe Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden, womit sich die gemessene Aktivität als spezifische BACE-1-Aktivität identifizieren ließ.

Ergebnisse

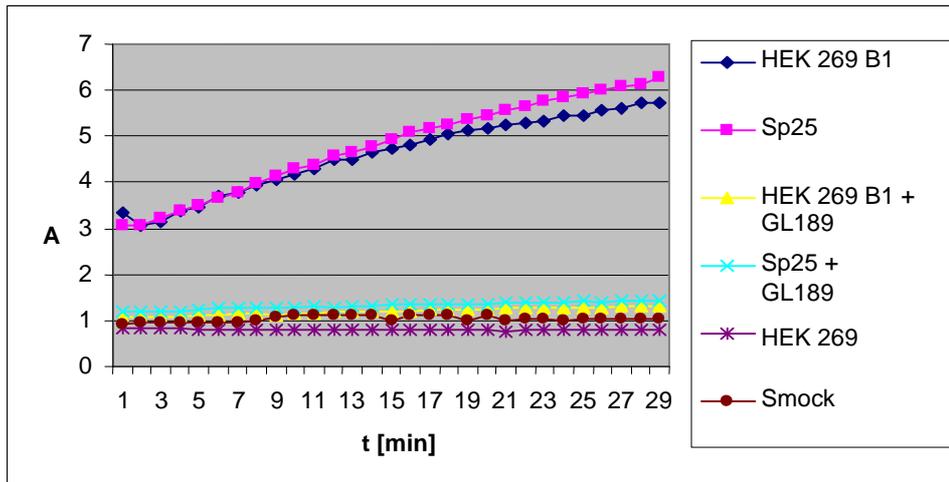


Abbildung 21: BACE-1-Aktivitätsmessung

In der BACE-1-Aktivitätsmessung (siehe 2.3) wurde die Aktivität von BACE-1 in verschiedenen Zelllinien untersucht. Es wurden Membranpräparationen der entsprechenden Zellen verwendet. Zur Hemmung der BACE-1-Aktivität benutzte man einen BACE-spezifischen Inhibitor (GL 189). Untersucht wurden BACE-1 transfizierte HEK 269-Zellen (HEK 269 B1; blau), Sp25-Zellen (Sp25; rosa), BACE-1 transfizierte HEK 269-Zellen zusammen mit GL 189 (HEK 269 B1 + GL 189; gelb), Sp25-Zellen zusammen mit GL 189 (Sp25 + GL189; türkis), HEK 269-Zellen (HEK 269; lila) und Smock-Zellen (Smock; braun). Die Aktivität (A [relative Skalierung]; y-Achse) wurde gegen die Zeit (T [min]; x-Achse) aufgetragen.

3.2.3 Unveränderte BACE-1-Proteinexpression in Sp35-Zellen

Die Hochregulation von BACE-1 in Sp25-Zellen konnte sowohl in Form von erhöhten Proteinmengen in der Western-Blot-Analyse (siehe 3.2.1.) als auch in der gesteigerten β -Sekretase-Aktivität in der BACE-Aktivitätsmessung (siehe 3.2.2) verifiziert werden. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von p35 auf die Tau-SY5Y-Zellen untersucht. Damit konnte überprüft werden, ob nicht nur p25, sondern auch dessen membrangebundene Vorstufe p35, in der Lage ist die BACE-1-Proteinexpression zu beeinflussen. Die Sp35-Zellen, Tau-SY5Y-Zellen mit einem tetracyclininduzierbaren p35-Expressionsvektor, wurden ebenfalls von Prof. Dr. Luc Buée (Université de Lille) bereitgestellt. Abbildung 22 zeigt eine Western-Blot-Analyse der RIPA-Zelllysate. Die als Kontrolle verwendeten Smock-Zellen zeigten mit dem p35-Antikörper, der sowohl p35 als auch p25 detektiert, schwache Banden bei 35 kDa, die als endogene p35-Proteinexpressionen zu deuten sind. p25-spezifische Banden konnten in den Smock-Zellen nicht gezeigt werden. Zudem

Ergebnisse

konnten mit dem B1NT-Antikörper keine spezifischen BACE-1-Banden nachgewiesen werden. Die An- oder Abwesenheit von Tetracyclin in den Seren der verwendeten Smock-Zellen zeigte, wie erwartet, keine Unterschiede in den p35-, p25- oder BACE-1-Expressionen auf. Die tet⁺-Sp25-Zellen zeigten eine starke p25-Expression auf. Jedoch wiesen auch die tet⁻-Sp25-Zellen eine geringe Bildung von p25 auf. Sowohl in den tet⁺- als auch in den tet⁻-Sp25-Zellen konnte eine gleich hohe BACE-1-Proteinexpression detektiert werden. Somit reproduzierte diese Analyse der Sp25-Zellen die Ergebnisse, die in 3.2.1 erläutert wurden.

In den Sp35-Zellen konnte durch die Zugabe von Tetracyclin, und die damit verbundene Induktion des p35-Expressionsvektors, die p35-Expression, im Vergleich zu der endogenen Expression in den tet⁻-Sp35-Zellen, erhöht werden. Eine p25-Expression wurde weder in den tet⁻-Sp35-Zellen noch in den tet⁺-Sp35-Zellen detektiert. In den tet⁻-Sp35-Zellen wurde keine BACE-1-Proteinexpression nachgewiesen. Auch in den p35-überexprimierenden tet⁺-Sp35-Zellen konnte, im Gegensatz zu den p25-überexprimierenden Zellen, keine erhöhte BACE-1-Proteinexpression gezeigt werden.

Ergebnisse

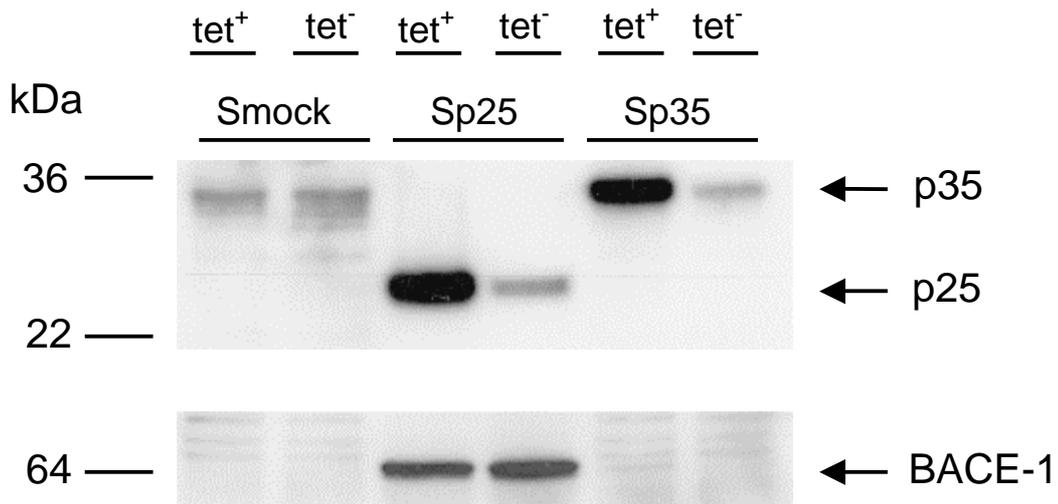


Abbildung 22: Hochregulation von BACE-1 in den Sp25-Zellen, im Gegensatz zu den Sp35-Zellen

Gezeigt ist eine Western-Blot-Analyse der RIPA-Lysate der Zellen. In den ersten beiden Spalten wurden Smock-Zellen, in der dritten und vierten Spalte Sp25-Zellen geladen. Zusätzlich wurden Sp35-Zellen, tau-SY5Y-Zellen, die einen tetracyclininduzierbaren Expressionsvektor besitzen, aufgetragen. Mit dem p35-Antikörper gegen p35 und p25 und dem B1NT-Antikörper gegen BACE-1 konnten spezifische Banden detektiert werden. Die Molekularstandards sind an der linken Seite der Abbildung in [kDa] angegeben. „tet⁺“ zeichnet Zellen aus, die mit tetracyclinhaltigem Serum behandelt wurden, und „tet⁻“ bezeichnet Zellen, die mit tetracyclinfreiem Serum behandelt wurden.

3.2.4 Northern-Blot-Analyse der BACE-1-mRNA in Sp25-Zellen

Nachdem man in den Sp25-Zellen eine erhöhte BACE-1-Proteinexpression feststellen konnte, stellte sich die Frage, ob die erhöhten Proteinmengen auf transkriptionellen oder posttranskriptionellen Regulationsmechanismen beruhten. Dazu wurde zusammen mit Dr. Sven Lammich die Expression der BACE-1-mRNA in den tet⁺-Sp25-Zellen untersucht. Zuerst wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert (siehe 2.4.1) und anschließend eine Northern-Blot-Analyse (siehe 2.4.2) durchgeführt. Außerdem wurden Smock-, HEK 293 B1- und HEK 293 5'UTR B1-Zellen verwendet. HEK 293 5'UTR B1-Zellen sind HEK 293-Zellen, denen die BACE-1-cDNA mit der 5'UTR (5'untranslated region) von BACE-1 transfiziert wurden. BACE-1 gehört zu den 10% aller Gene, die eine lange GC-reiche 5'untranslatierte Region besitzen. Der 5'UTR wird durch die Bildung von stabilen Sekundärstrukturen eine Hemmung der Translation des nachfolgenden Gens zugeschrieben

Ergebnisse

(159). Abbildung 23 zeigt das Ergebnis der Northern-Blot-Analyse. In der ersten Spur wurde die RNA der HEK 293 5'UTR B1-, in der zweiten Spur die der HEK 293 B1-, in der dritten Spur die der tet⁺-Sp25- und in der vierten Spur die RNA der Smock-Zellen aufgetragen. Mit einer BACE-1-ORF (open reading frame)-Sonde konnte bei den HEK 293 B1- und bei den Sp25-Zellen eine Bande bei ca. 1,9 kb detektiert werden. Die BACE-1 Bande der Sp25-Zellen zeigte eine höhere Signalintensität. Bei den HEK 293 5'UTR B1- und den Smock-Zellen konnten bei ca. 1,9 kb keine Banden nachgewiesen werden. Die HEK 293 5'UTR B1-Zellen zeigten bei ca. 2,3 kb eine größere Form der BACE-1 mRNA. Auch bei den tet⁺-Sp25-Zellen hätte man eine größere Form der BACE-1-mRNA erwartet (siehe Diskussion 4.2.3), da endogene BACE-1-Transkriptate mit einer Größe von ca. 2,6 kb, 4,4 kb und 7,0 kb beschrieben werden (35).

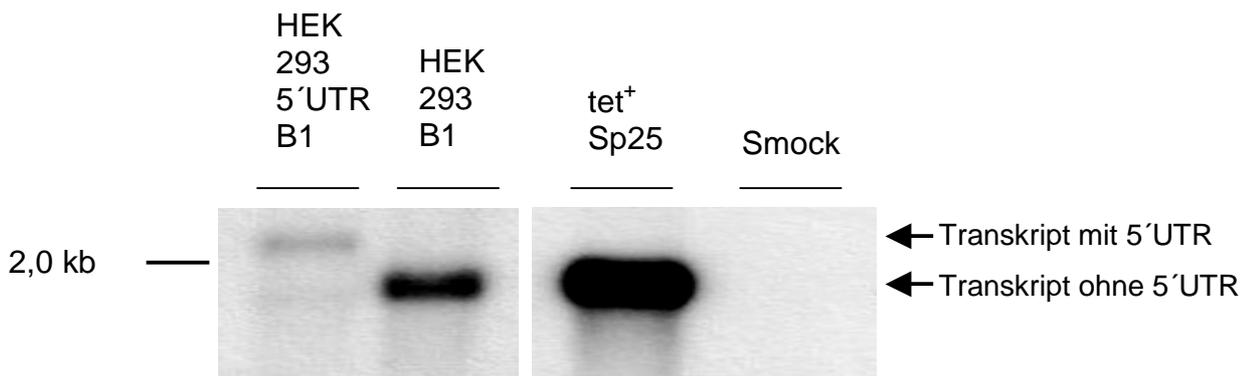


Abbildung 23: Northern-Blot-Analyse der Sp25-Zellen

Gezeigt ist eine Northern-Blot-Analyse bei der jeweils 10 µl Gesamt-RNA auf das Gel geladen wurden. Es wurde (von links nach rechts) RNA von HEK 293 5'UTR B1-, HEK 293 B1-, tet⁺-Sp25- und Smock-Zellen aufgetragen. In den HEK 293 B1-Zellen und in den tet⁺-Sp25-Zellen wurden mit einer BACE-ORF-Sonde bei ca. 1,9 kb Banden detektiert. Die HEK 293 5'UTR B1-Zellen zeigten bei ca. 2,3 kb ein B1-Bande auf. In den Smock-Zellen konnten keine spezifischen Banden detektiert werden.

3.2.5 p25-Überexpression in murinen Neuroblastomazellen (N2a-Zellen)

Die oben beschriebenen Versuche zur Analyse der p25-Überexpression in Bezug auf die BACE-1-Regulation wurden an SH-SY5Y-Zellen (humane Neuroblastomazellen) durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse auch auf andere Zelllinien übertragbar sind, verwendete man N2a-Zellen (murine Neuroblastomazellen). Diese wurden ebenfalls

Ergebnisse

mit einem tetracyclininduzierbaren p25-Expressionsvektorsystem (siehe 2.2.1) transfiziert. Es wurden die Np25-Zellklone Np25 2, Np25 3 und Np25 4 analysiert. Als Kontrolle diente der Zellklon NlacZ 1. Dieser besaß einen tetracyclininduzierbaren lacZ (β -Galaktosidase)-Expressionsvektor. In der Western-Blot-Analyse der RIPA-Lysate (siehe Abbildung 24) der Np25-Zellen, die mit tetracyclinfreiem Serum (tet^-) behandelt wurden, konnte in den drei verschiedenen Zellklonen keine p25-Banden detektiert werden. Fügte man jedoch Tetracyclin dem Serum der Zellen hinzu (tet^+), zeigte sich ein deutlicher Anstieg der p25-Expression. Zur Detektion der endogenen murinen BACE-1-Expression wurde ein neuer, hochspezifischer Antikörper, BACE-Cat1 (113), verwendet. BACE-Cat1 detektierte bei 65 kDa ein BACE-1 spezifisches Signal in Form einer Doppelbande. Die Expression von BACE-1 zeigte sich in den verschiedenen Np25-Zellklonen relativ gleich stark. Hervorzuheben ist, dass die p25-überexprimierenden Np25-Zellen (tet^+ -Np25-Zellen), im Vergleich zu den nicht p25-überexprimierenden Zellen (tet^- -Np25-Zellen), keine erhöhten BACE-1-Expressionen zeigten. In den Kontrollzellen NlacZ (tet^- und tet^+) konnten keine spezifischen p25-Banden nachgewiesen werden. In Bezug auf die BACE-1-Expression zeigten die NlacZ-Zellen das gleiche Expressionsmuster wie die Np25-Zellen (tet^- und tet^+). Die gleichmäßigen β -Actin-Banden sprachen für eine jeweils gleich aufgetragene Proteinmasse.

Ergebnisse

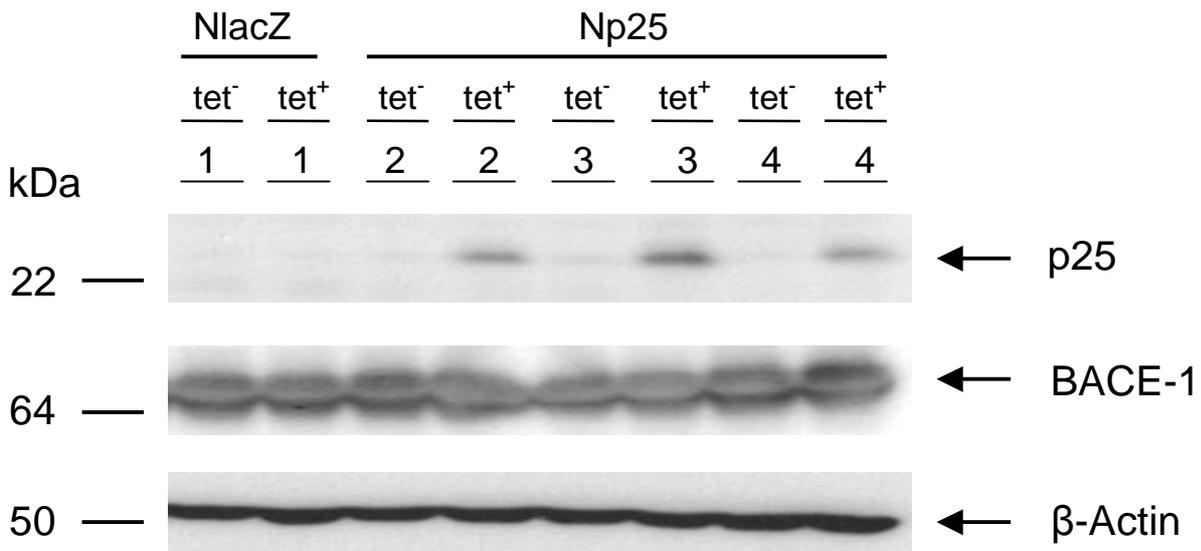


Abbildung 24: p25-Überexpression in N2a-Zellen (murine Neuroblastomazellen)

Die Abbildung zeigt die Western-Blot-Analyse der RIPA-Lysate der p25-überexprimierenden N2a-Zellen (murine Neuroblastomazellen). In den ersten beiden Spalten wurde der NlacZ-Zellklon 1 geladen. Die NlacZ-Zellen sind N2a-Zellen, die einen tet-induzierbaren lacZ (β -Galactosidase)-Expressionsvektor besitzen. Gefolgt von den Np25-Zellklonen 2, 3 und 4. Die Np25-Zellen sind N2a-Zellen, die einen tet-induzierbaren p25-Expressionsvektor besitzen. Zellen, die mit tetracyclinfreiem Serum behandelt wurden, sind mit „tet⁻“ bezeichnet. Zellen, die mit tetracyclinhaltigem Serum behandelt wurden, sind mit „tet⁺“ gekennzeichnet. Mit dem p25-Antikörper gegen p25, dem BACE-Cat1 Antikörper gegen BACE-1 und dem β -Actin-Antikörper gegen β -Actin konnten spezifische Banden detektiert werden. Die Molekularstandards sind an der linken Seite der Abbildung in [kDa] angegeben.

4 Diskussion

Menschen mit dem Down-Syndrom zeigen ab einem Alter von 40 Jahren fast ausnahmslos die für die Alzheimer-Erkrankung typischen neuropathologischen Veränderungen. In ihren Gehirnen sind sowohl β -Amyloid-Plaques als auch neurofibrilläre Bündel nachzuweisen (134). Bereits in fetalen DS-Geweben sind höhere Mengen an löslichem A β als in fetalen Kontroll-Geweben zu verzeichnen (136). Die Ursache für diese frühe Akkumulation von A β ist jedoch noch nicht endgültig geklärt.

Ein Erklärungsversuch beruht darauf, dass sich das Gen für das Amyloid-Vorläufer-Protein β APP auf dem Chromosom 21 befindet. Eine Schlussfolgerung wäre nun, dass durch das zusätzliche Chromosom 21 im DS mehr β APP gebildet wird und daher auch mehr β APP zur Bildung von A β zur Verfügung steht. Diese Aussage wird unterstützt durch eine familiäre Form der Alzheimer-Erkrankung, bei der nur eine Duplikation des Genortes für β APP und vier weiteren Genen vorliegt (141). Die Betroffenen erkranken bereits im Durchschnitt mit 52 Jahren und zeigen die typische Pathologie mit β -Amyloid-Plaques und neurofibrillären Bündeln. Man weiß jedoch nicht, welchen Einfluss die vier weiteren Gene oder weitere Faktoren ausüben und kann daher nicht die „Extrakopie“ des β APP-Gens alleine für die frühe Plaquepathologie verantwortlich machen. Zumal in überexprimierenden β APP-Mäusen kein derartiger Anstieg in der A β -Synthese zu verzeichnen ist (142). Zudem gibt es zur Expression von β APP im Down-Syndrom sehr kontrovers publizierte Daten, was mitunter auf die verwendeten Materialien (fetal/ adult, Fibroblasten/ Gehirngewebe) und die Methoden (Lysate, Antikörper) zurückzuführen ist. In einer Veröffentlichung wurde beispielsweise gezeigt, dass sich weder auf mRNA- noch auf Proteinebene erhöhte Werte für β APP im adulten DS-Gehirn im Vergleich zu Kontrollgehirnen nachweisen ließen (160). Diese Ergebnisse basierten jedoch lediglich auf der zweimaligen Analyse von zwei DS-Gehirnen und zwei Kontrollgehirnen. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte anhand von sieben humanen fetalen DS-Gehirnen im Vergleich zu sieben Kontrollgehirnen, dass die β APP-mRNA-Expression zwar ca. 1,4-fach erhöht ist, die β APP-Proteinexpression jedoch nicht signifikant erhöht ist (161).

Ein weiteres Chromosom 21-Gen, das häufig in Verbindung mit der Demenz im Down-Syndrom genannt wird, ist BACE-2. Jedoch wurde mittlerweile klar dargestellt, dass die Sekretase BACE-2, obwohl sie in der Kodierungssequenz zu 71 % der β -Sekretase BACE-

Diskussion

1 homolog ist (58), hauptsächlich innerhalb der A β -Domäne β APP schneidet und somit nicht zur erhöhten Bildung von A β beiträgt (42,162). Über die Expression von BACE-2 im Down-Syndrom ist bekannt, dass die mRNA-Levels in fetalem humanen Gehirngewebe ca. 1,5-fach im Vergleich zu Kontrollgewebe erhöht sind, während die Proteinexpression unveränderte Werte zeigt (112). Jedoch auch zur Expression von BACE-2 sind in der Literatur (163,164) unterschiedliche Angaben zu finden.

BACE-1 konnte durch Überexpressions- und Knock-out-Experimente eindeutig als alleinige β -Sekretase identifiziert werden (143-148). In Gehirnen von Alzheimer-Demenz-Patienten konnten im Vergleich zu Kontrollgehirnen erhöhte BACE-1-Proteinmengen und Aktivitäten nachgewiesen werden (78-83). Es war deshalb interessant zu untersuchen, ob auch im Down-Syndrom die BACE-1-Proteinexpression erhöht ist. Durch eine Hochregulation von BACE-1 im Down-Syndrom könnte vermehrt β APP prozessiert und somit A β gebildet werden. BACE-1 könnte damit eine Funktion in der Plauepathologie des Down-Syndroms zugeschrieben werden.

4.1 Expression von BACE-1 und β APP im Gehirn von Down-Syndrom- und Alzheimer-Demenz-Patienten

4.1.1 Analyse der Proteinexpression von BACE-1 und β APP im Gehirn von Down-Syndrom- und Alzheimer-Demenz-Patienten

Zur Analyse der Proteinexpression von BACE-1 und β APP wurde adultes humanes kortikales Hirngewebe verwendet.

In der Membranpräparation (siehe Abb. 15) zeigte sich im Durchschnitt die Proteinexpression von β APP in den T21-Gewebeproben im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Zudem präsentierte sich eine Erhöhung der BACE-1-Proteinexpression in den T21- und AD-Proben im Vergleich zu den Kontrollproben. Jedoch konnte die BACE-1- und β APP-Proteinexpression in den verschiedenen Gewebegruppen (T21, AD und K) nicht homogen nachgewiesen werden. So ließen sich beispielsweise in der T21-Gehirnprobe Nr. 2 im Vergleich zu den anderen T21-Gehirnproben eine schwächere Proteinexpression für β APP und BACE-1 detektieren. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die Qualität

Diskussion

dieser frontalen kortikalen Gehirnprobe beeinträchtigt ist. Rein von den post-mortem Zeiten, also dem Intervall zwischen Tod und Sektion, ließ sich diese Begebenheit nicht erklären, da das T21-Gehirn Nr. 2 im Vergleich zu dem T21-Gehirn Nr. 1 sogar ein kurzes post-mortem Intervall aufweist (siehe Tabelle Nr. 5). Die Beeinträchtigung der Qualität des Materials könnte jedoch auch auf andere Faktoren zurückgeführt werden, wie zum Beispiel Sektionsdurchführung, Transport der Proben und Aufbewahrung der Proben. Die beobachteten Schwankungen der BACE-1- und β APP-Proteinexpression innerhalb der einzelnen Gewebegruppen (T21, AD und K) könnten daher von einer Vielzahl von Faktoren, welche die Qualität der Proben beeinflussen, resultieren. Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, zeigten die Nicastrinbanden, die als Ladekontrolle gedacht waren, keine gleiche Expression an. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die geladenen Proteilmengen, obwohl sie durch eine Proteinkonzentrationsbestimmung angeglichen wurden, differierten. Ein anderer Erklärungsversuch ist, dass Nicastrin unter den Versuchsbedingungen, die für die Membranpräparation angewandt wurden, nicht korrekt detektiert werden konnte.

Da aus den Ergebnissen der Membranpräparationen keine abschließenden Erkenntnisse gewonnen werden konnten, wurde eine andere Methode, das RIPA-Lysat, angewandt. Mit dieser Methode können nicht nur speziell die Membranproteine, sondern alle Proteine nachgewiesen werden. Dieses Verfahren wurde sowohl mit den frontalen als auch mit den temporalen Gewebeproben mehrfach wiederholt. Mit dem β -Act-Antikörper gegen β -Actin konnten gleichstarke Banden detektiert werden. In der Abbildung 16 zeigte sich das T21-Gehirn Nr. 3 im Vergleich zu den AD- und Kontrollproben mit einer erhöhten β APP-Expression. Im Durchschnitt erschien die BACE-1-Proteinexpression der T21- und AD-Gewebeproben im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls erhöht. In der nächsten aufgezeigten Western-Blot-Analyse (siehe Abb. 17) wird deutlich, dass die Proteinexpression von BACE-1 und β APP in verschiedenen Proben der gleichen Gehirne auch Schwankungen unterlagen. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass zur Analyse zwar jeweils das gleiche Gehirnpräparat zur Verfügung stand, man aber zur Gewinnung der Probe jeweils ein Stück des Präparates auswählte, ohne den histologischen Aufbau zu kennen. So zeigte sich zum Beispiel das AD-Gehirn Nr. 5 in der Abbildung 16 mit einer schwächeren BACE-1-Proteinexpression als in der Abbildung 17. Auch die Analyse des Temporallappens (siehe Abb. 18) zeigte die Expressionsschwankungen der

Diskussion

Proteine β APP und BACE-1 in den T21-, AD- und K-Gehirnen auf. Immunhistochemische Analysen von Gehirnschnitten würden eine Option darstellen, um die BACE-1- und β APP-Proteinexpressionen genauer zu studieren. Mit dieser Methode kann man mit Hilfe von Antikörpern in Gehirnschnitten gezielt die Verteilung der Proteinexpressionen aufzeigen. Zudem wäre es sehr interessant zu untersuchen, ob sich im Gehirn der Down-Syndrom-Patienten ebenso eine BACE-1-Hochregulation im Bereich der Amyloid-Plaques zeigt, wie sie in Gehirnen von Alzheimer-Demenz-Patienten und im Mausmodell nachgewiesen wurde (113). Eine lokale Hochregulation von BACE-1 könnte die schlechte Nachweisbarkeit der BACE-1-Hochregulation im Gehirnlisat erklären.

4.1.2 Quantifizierung der Proteinexpression von BACE-1 und β APP im RIPA-Lysat

Im nächsten Schritt wurden die Ergebnisse von sieben Wiederholungen des RIPA-Lysat-Experimentes (vier Versuchsdurchführungen mit Gewebeproben des Frontallappens und drei Versuchsdurchführungen mit Gewebeproben des Temporallappens) quantifiziert, berechnet und in einem Diagramm zusammengefasst (siehe Abb. 19) dargestellt. Bezüglich der Trisomie 21-Gehirne war zu erkennen, dass die BACE-1-Proteinmengen im Vergleich zu den Kontrollgehirnen 1,4-fach nichtsignifikant (TT-Test; $p=0,76$) erhöht waren. Die Proteinexpression von β APP zeigte sich in den T21-Gehirnen im Vergleich zu den Kontrollen 1,4-fach nichtsignifikant (TT-Test; $p=0,53$) erhöht. Die Ergebnisse für die AD-Gehirne ließen sich in einer 1,5-fachen nichtsignifikanten (TT-Test; $p=0,95$) BACE-1- und einer 1,1-fachen nichtsignifikanten (TT-Test; $p=0,97$) β APP-Proteinexpressionserhöhung zusammenfassen. In Bezug auf die AD-Gehirne stimmten die Ergebnisse sehr gut mit den bereits publizierten Daten überein (107-112). Man geht davon aus, dass β APP in Alzheimer-Gehirnen nicht erhöht ist und auch die hier ermittelten Ergebnisse zeigten, dass keine signifikante Erhöhung der β APP-Proteinexpression in den AD-Gehirnen im Vergleich zu den Kontrollgehirnen vorlag. Außerdem stimmte die in der Literatur angegebene Überexpression von BACE-1 im AD-Gehirn mit dem hier gezeigten Trend zur Erhöhung überein.

Die nicht erreichte Signifikanz der Ergebnisse könnte einerseits auf die Qualität der Gehirnproben und andererseits auf eine lokale Hochregulation im Gehirngewebe zurückzuführen sein. Außerdem wäre es notwendig eine größere Anzahl an Gehirnen, vor allem an Down-Syndrom-Gehirnen, zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen aber einen Trend zu einer sowohl höheren BACE-1- als auch höheren β APP-Proteinexpression im Gehirn der Down-Syndrom-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung an. Es ergibt sich somit ein Hinweis darauf, dass das Protein β APP im Down-Syndrom, vermutlich durch die zusätzliche Kopie des β APP-Gens, erhöht ist. Zudem deutet der Trend zur Überexpression von BACE-1 auf eine Hochregulation von BACE-1 im Gehirn von Down-Syndrom-Patienten und damit auf eine mögliche Beteiligung der Protease an der erhöhten A β -Bildung und der damit verbundenen Plauepathologie der Trisomie 21 hin.

Im Verlauf dieser Arbeit konnte die These der BACE-1-Hochregulation im Down-Syndrom von einer anderen Arbeitsgruppe unterstützt werden. Diese zeigte in der Trisomie 21 im Vergleich zu Kontrollen eine ca. 2-fache signifikante Erhöhung der BACE-1-Proteinexpression (161). In dieser Studie wurde humanes fetales Gehirngewebe verwendet. Durch die schnelle Präparataufbereitung des Abortmaterials ist hier mit einer besseren Qualität der Proben zu rechnen. Jedoch ist bei einem Fetus die Gehirnentwicklung noch nicht komplett ausgereift, weswegen ein verändertes Proteinexpressionsmuster nicht ausgeschlossen werden kann. Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht-fetales Material zur Analyse gewählt, obwohl dieses den Nachteil der unterschiedlichen Qualität aufweist.

4.2 Sp25 – Ein Zellmodell zur BACE-1-Regulation

Wenn man nun von einer Überexpression der β -Sekretase BACE-1 im Down-Syndrom ausgeht, stellt sich die Frage, welcher Regulationsmechanismus sich hinter dieser Proteinüberexpression verbirgt. Die nicht erhöhten BACE-1-mRNA-Pegel in Gehirnen von Down-Syndrom-Feten (161) deuten auf einen posttranskriptionalen Mechanismus hin. Denkbar wäre ein verminderter Abbau von BACE-1 durch einen veränderten Transport von Proteinen in den Endosomen und Lysosomen. In Gehirnen von Down-Syndrom-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Endosomen der Neuronen vergrößert sind (165). Dies könnte zum Teil darauf zurückgeführt werden, dass einige Gene auf dem Chromosom 21, wie Synaptojanin oder Intersectin (140), am Ablauf der Endocytose beteiligt sind. So spielt Intersectin mit seiner „Gerüstfunktion“ eine entscheidende Rolle bei der korrekten

Diskussion

Interaktion der zur Endocytose benötigten Proteine (166). Eine unphysiologische Endocytose könnte daher an der Regulation von BACE-1 beteiligt sein. Diese Theorie wird durch Studien bestärkt, die zeigen konnten, dass im Gehirn von Down-Syndrom-Patienten im Golgiapparat vermehrt reifes BACE-1-Protein zu finden ist (161). Durch einen veränderten Proteintransport im DS könnte BACE-1 im Golgiapparat akkumulieren und so dem normalen Abbau entgehen.

Außerdem wird der cyclinabhängigen Kinase 5 (cyclin-dependent kinase 5, cdk5) und deren Aktivator p25 in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung eine Bedeutung zugeschrieben (siehe 1.2.4). Die Tatsache, dass in p25-überexprimierenden Mäusen eine ca. 2-fach erhöhte BACE-1-Proteinexpression gezeigt wurde (149), gab Anlass zur weiteren Analyse der Auswirkungen von p25 auf die BACE-1-Expression.

4.2.1 Erhöhte BACE-1-Proteinexpression in Sp25-Zellen im Gegensatz zu Sp35-Zellen

Zur Analyse der Auswirkungen von p25 auf die BACE-1-Expression wurden Tau-SY5Y-Zellen, humane Neuroblastomazellen mit überexprimierten Tau-Protein, gewählt. Diese Zellen enthalten das T-Rex-Expressionssystem (siehe 2.2.1), welches es ermöglicht gezielt p25 durch die Zugabe von Tetracyclin zu exprimieren. In der Abbildung 20 ist zu erkennen, dass die Zellen mit dem leeren Expressionvektor (Smock-Zellen) selbst kein nachweisbares p25 bildeten. Auch das endogene BACE-1 unterschritt die Nachweisgrenze. Sie erfüllten jedoch die notwendige Voraussetzung der cdk5-Expression. Wäre cdk5 in den Zellen nicht exprimiert, könnte p25 cdk5 nicht aktivieren und so auch keine weiteren Veränderungen hervorrufen. Die Funktionsfähigkeit des induzierbaren Vektorsystems wurde dadurch gezeigt, dass die tet⁺-Sp25-Zellen große Mengen an p25 exprimierten. Jedoch produzierten die Sp25-Zellen auch ohne Zugabe von Tetracyclin p25. Der Expressionsvektor war also auch ohne den Induktionsfaktor Tetracyclin aktiviert. Eine mögliche Kontamination des verwendeten Serums mit Tetracyclin konnte ausgeschlossen werden. p25 war in der Lage seine Funktion, die Phosphorylierung und damit Aktivierung der Proteinkinase cdk5, in den Tau-SY5Y-Zellen zu erfüllen. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass die p25-exprimierenden Sp25-Zellen im Vergleich zu den Smock-Zellen eine erhöhte p-cdk5-Proteinexpression aufwiesen. Zudem zeigte sich die cdk5-Expression unabhängig von der p25-Expression. Diese Tatsache könnte darauf zurückzuführen sein,

Diskussion

dass cdk5 in der Zelle aufgrund der p25-Induktion ebenfalls hochreguliert wurde und so, trotz der erhöhten Umwandlung zu p-cdk5, cdk5 in gleichen Spiegeln vorlag. In den Sp25-Zellen wurde eine deutliche Erhöhung der BACE-1-Proteinexpression nachgewiesen. Die Erhöhung der BACE-1-Proteinexpression zeigte sich in den tet⁺-Sp25-Zellen und in den tet⁻-Sp25-Zellen gleich stark. Dies könnte darauf beruhen, dass die Regulationsmechanismen bereits bei der Menge an stabil exprimierendem p25 in den tet⁻-Sp25-Zellen gesättigt waren und sich eine weitere transiente Erhöhung von p25, wie sie in den tet⁺-Sp25-Zellen zu finden war, nicht mehr auf die Expression von BACE-1 auswirkte. In der BACE-Aktivitätsuntersuchung (siehe Abb. 21) zeigten die tet⁺-Sp25-Zellen im Vergleich zu den Smock-Zellen eine ca. sechsfach erhöhte β -Sekretase-Aktivität. Die HEK 269 B1-Zellen stellten sich im Vergleich zu den HEK 269-Zellen mit einer ebenfalls ca. sechsfachen Erhöhung der Aktivität der β -Sekretase dar. Somit konnte gezeigt werden, dass die tet⁺-Sp25-Zellen über eine ebenso hohe BACE-Aktivität verfügten, wie Zellen, denen stabil BACE-1-cDNA transfiziert wurde.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss einer erhöhten Proteinexpression von p35 auf die Regulation der β -Sekretase untersucht. Hierfür wurden Tau-SY5Y-Zellen mit einem tetracyclininduzierbaren p35-Expressionvektor (siehe Abb. 22) verwendet. In den p35-überexprimierenden tet⁺-Sp35-Zellen ließ sich keine erhöhte BACE-1-Proteinexpression nachweisen. Der p35-cdk5-Komplex scheint also nicht in der Lage zu sein, die BACE-1-Proteinexpression in den Tau-SY5Y-Zellen zu beeinflussen. Dies könnte damit in Verbindung stehen, dass p35 an der Zellmembran gebunden ist, während p25 sich frei im Cytosol befindet. Die Lokalisation der cdk5-Aktivierung könnte eine entscheidende Rolle in der Regulation von BACE-1 spielen.

4.2.2 Analyse der mRNA-Expression in Sp25-Zellen

Erhöhte Proteinmengen können auf verschiedenen Ursachen beruhen. So kann zum Beispiel das Protein verlangsamt abgebaut werden oder aber es wird aufgrund einer gesteigerten Transkription oder Translation vermehrt gebildet. Um den zugrunde liegenden Mechanismus der erhöhten BACE-1-Proteinmengen in den Sp25-Zellen zu identifizieren, wurden die RNA-Mengen in den tet⁺-Sp25-Zellen im Vergleich zu den Smock-Zellen mit

Diskussion

Hilfe der Northern-Blot-Analyse (siehe Abb. 23) bestimmt. Zusätzlich wurden die tet⁺-Sp25-Zellen mit BACE-1-exprimierenden HEK 293-Zellen (HEK 293 B1 und HEK 293 5'UTR B1-Zellen) verglichen. Mit einer BACE-1-ORF-Sonde konnte in den Smock-Zellen keine für BACE-1-mRNA spezifische Bande nachgewiesen werden. In den Sp25-Zellen konnte ein starkes Signal bei ca. 1,9 kb detektiert werden. Daraus ist zu schließen, dass die erhöhte BACE-1-Proteinexpression in den tet⁺-Sp25-Zellen auf eine erhöhte Transkription des Gens für BACE-1 zurückzuführen ist. Mittlerweile konnte eine andere Arbeitsgruppe ebenfalls eine p25-induzierte Hochregulation von BACE-1 auf mRNA- und Proteinebene in SH-SY5Y-Zellen und Mäusen nachweisen (149). Wen et al. legten dar, dass das cdk5-Substrat STAT3 an der BACE-1-Promotor-DNA bindet und so die Transkriptionsrate erhöht. Dies steht jedoch nicht in Einklang mit der BACE-1-Regulation in der Alzheimer Erkrankung. Da man bei der Demenz von gleich bleibenden Mengen an BACE-1-mRNA und somit von einer post-transkriptionalen Regulation aus (114,115,161). Weitere Diskussionspunkte ergeben sich aufgrund der Größe der detektierten BACE-1-mRNA. Endogene BACE-1-Transkripte werden in der Literatur mit einer Größe von ca. 2,6 kb, 4,4 kb und 7,0 kb beschrieben (35). In den tet⁺-Sp25-Zellen konnten jedoch keine Banden mit diesen Größen nachgewiesen werden. In den tet⁺-Sp25-Zellen konnte man, wie in den HEK 293-Zellen, die mit BACE-1-cDNA transfiziert wurden, nur bei ca. 1,9 kb ein Signal detektieren. Die HEK 293 5'UTR B1-Zellen zeigten eine Bande bei ca. 2,3 kb.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass es sich in den Sp25-Zellen nicht um eine endogene BACE-1-Proteinexpression handelt. Um der Möglichkeit der Kontamination der Zellen mit BACE-1-cDNA nachzuforschen, wurden von Prof. Dr. Luc Buée neue Sp25-Zellen angefordert. Diese neuen Zellen wurden ohne weitere Zellpassage im RIPA-Lysat analysiert. Obwohl man bei allen Reaktionsschritten sorgsam auf eine Vermeidung möglicher Kontaminationen achtete, wurden bei diesen Zellen ebenfalls die gleichen Ergebnisse bezüglich der BACE-1-Proteinexpression wie bei den oben diskutierten Sp25-Zellen (siehe Abb. 20) erzielt. Prof. Dr. Luc Buée teilte auf Anfrage mit, dass in seinem Institut keine BACE-1-cDNA verwendet wurde und so die Kontamination unwahrscheinlich sei. Abschließend lässt sich die hier dargestellte Diskrepanz nicht klären.

4.2.3 Keine BACE-1-Hochregulation in p25-überexprimierenden N2a-Zellen

Als nächstes wurde untersucht, ob die p25-Überexpression auch in anderen Zelllinien eine erhöhte BACE-1-Expression bewirkt. N2a-Zellen sind murine Neuroblastomazellen. Um gezielt p25 in den N2a-Zellen (murine Neuroblastomazellen) zu induzieren, bediente man sich des tetracyclinregulierten T-Rex-Expressionssystems (siehe 2.2.1), welches bereits bei den SH-SY5Y (humane Neuroblastoma)-Zellen Verwendung fand. Np25-Zellen (siehe Abb. 24), die mit Tetracyclin behandelt wurden, exprimierten p25. Im Gegensatz dazu ist in den tet⁻-Np25-Zellen und in den als Kontrolle verwendeten NlacZ (tet⁻ und tet⁺) keine p25-Proteinexpression nachweisbar. Damit wurde die Funktionsfähigkeit des Expressionssystems gezeigt. Jedoch konnte in den p25-exprimierenden tet⁺-Np25-Zellen, entgegen der Erwartung, keinen Anstieg der BACE-1-Expression nachgewiesen werden. Das in den Sp25-Zellen beobachtete Ergebnis der p25-induzierten BACE-1-Hochregulation konnte also in den Np25-Zellen nicht reproduziert werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Regulationsmechanismus auf einer bestimmten Genexpression beruht, welche die N2a-Zellen im Vergleich zu den SH-SY5Y-Zellen nicht aufweisen. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass die in den Sp25-Zellen beobachtete BACE-1-Hochregulation eine Ausnahme darstellte und es sich nicht um einen reproduzierbaren Regulationsmechanismus handelte.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Alzheimer-Krankheit (AD), die häufigste Form der Demenz, manifestiert sich klinisch meist ab dem 65. Lebensjahr mit langsam progredienten Gedächtnis-, Orientierungs- und Aufmerksamkeitsstörungen. Neuropathologische Korrelate sind die Amyloid-Plaques, die hauptsächlich aus extrazellulären Aggregaten des β -Amyloid-Proteins ($A\beta$) zusammengesetzt sind, und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel, die aus Aggregaten des mikrotubulus-assoziierten Proteins Tau bestehen. Der „Auslöser“ der Alzheimer-Krankheit ist das β -Amyloid-Protein (Amyloid-Kaskaden-Hypothese), welches durch proteolytische Prozessierung von β APP (β -Amyloid-Vorläufer-Protein) entsteht. Dies geschieht, indem zuerst BACE-1 (β -site APP cleaving enzyme 1) und anschließend der γ -Sekretase-Komplex β APP schneiden. Menschen mit Down-Syndrom (DS), welches die häufigste autosomale Chromosomenaberration darstellt, entwickeln bereits ab einem Alter von 40 Jahren die typischen neuropathologischen Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit und zeigen mit einem Durchschnittsalter von 56 Jahren die klinischen Symptome der Demenz. Die Gründe für das frühe Auftreten der Amyloid-Plaques sind noch nicht vollständig geklärt. Das Gen für β APP befindet sich auf dem Chromosom 21, welches im DS dreifach vorhanden ist, und wird daher mit der frühen Plaque-Pathologie im Down-Syndrom in Zusammenhang gebracht. BACE-1 konnte durch Überexpressions- und Knock-out-Experimente eindeutig als alleinige β -Sekretase identifiziert werden. In Gehirnen von Alzheimer-Demenz-Patienten konnten im Vergleich zu Kontrollgehirnen erhöhte BACE-1-Proteinmengen und BACE-1-Aktivitäten nachgewiesen werden. Es war deshalb interessant zu untersuchen, ob auch im Gehirn von Down-Syndrom-Patienten die BACE-1-Proteinexpression erhöht ist. Durch eine Hochregulation von BACE-1 im Down-Syndrom könnte vermehrt β APP prozessiert und somit $A\beta$ gebildet werden. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit die Expression von BACE-1 in Gehirnen (Temporal- und Frontallappen) von DS-Patienten im Vergleich zu Kontrollgehirnen zu analysieren. In der Western-Blot-Analyse der Gewebeproben konnte gezeigt werden, dass die BACE-1-Proteinmengen im Down-Syndrom im Vergleich zu den Kontrollen (K) 1,4-fach erhöht waren. Die Proteinexpressionen von β APP zeigten sich im DS im Vergleich zu den Kontrollen 1,4-fach erhöht. Diese Ergebnisse erzielten keine Signifikanz, zeigten aber deutliche Trends im Expressionsverhalten. Dies könnte auf die Anzahl der untersuchten Gehirne (Temporal- und Frontallappen je 3 DS, 4 AD und 5 K), Qualitätsmängel der Gehirnproben oder einer ungleichen Verteilung der Proteinexpression im Gewebe

zurückzuführen sein. Es ist daher notwendig mehr Gehirne zu untersuchen. Zudem wäre es interessant in Gehirnschnitten das Verteilungsmuster der BACE-1-Expression im DS genauer zu studieren. Die Ergebnisse deuten jedoch auf eine Hochregulation von BACE-1 im DS-Gehirn und somit auf eine Beteiligung der Protease an der Plaquepathologie des Down-Syndroms hin.

BACE-1 scheint also sowohl in der Pathogenese der Alzheimer-Demenz als auch in der des Down-Syndroms eine zentrale Rolle einzunehmen. Daher ist es sehr interessant die Regulation von BACE-1 weiter zu analysieren. Da in p25-überexprimierenden Mäusen erhöhte BACE-1-Proteinexpressionen gezeigt werden konnten, vermutete man eine Beteiligung von p25 an der Regulation der β -Sekretase. p25, das im Gehirn der AD-Patienten vermehrt gebildet wird und aus der Proteolyse von p35 entsteht, bindet und aktiviert die Kinase cdk5. cdk5 phosphoryliert unter anderem das Tau-Protein und wird daher mit der Bildung der neurofibrillären Bündel in Zusammenhang gebracht. Durch die Hochregulation von BACE-1 könnte p25 in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung eine neue Bedeutung zugeschrieben werden. Zur Analyse der p25 induzierten Veränderungen in den Neuronen wurden humane Neuroblastomazellen mit einem induzierbaren p25-Expressionsvektor, Sp25-Zellen, verwendet. In diesen p25-überexprimierenden Zellen konnten sowohl in der Western-Blot-Analyse als auch in der BACE-1-Aktivitätsmessung erhöhte BACE-1-Proteinexpressionen bzw. BACE-1-Aktivitäten gezeigt werden. Die Northern-Blot-Analyse der Sp25-Zellen ergab erhöhte BACE-1-mRNA-Spiegel, die sich jedoch in einer für endogene BACE-1-mRNA untypische Größe detektieren ließen. p35, das membrangebundene Vorläufer-Protein von p25, war indes nicht in der Lage die BACE-1-Proteinexpression in humanen Neuroblastomazellen zu erhöhen. Die Ergebnisse der Sp25-Zellen konnten in p25-überexprimierenden murinen Neuroblastomazellen, Np25-Zellen, nicht reproduziert werden. Daher ist es notwendig, den p25-induzierten BACE-1-Regulationsmechanismus auf seine Reproduzierbarkeit, z.B. in weiteren In-vivo-Modellen, zu überprüfen.

Literaturverzeichnis

1. Dahm, R. (2006) *Curr Biol* **16**(21), R906-910
2. Alzheimer, A. (1907) *Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtlich. Med.* **64**, 146-148
3. Goedert, M., and Ghetti, B. (2007) *Brain Pathol* **17**(1), 57-62
4. Goate, A., Chartier Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M., and Hardy, J. (1991) *Nature* **349**(6311), 704-706
5. St George-Hyslop, P., Haines, J., Rogaev, E., Mortilla, M., Vaula, G., Pericak-Vance, M., Foncin, J. F., Montesi, M., Bruni, A., Sorbi, S., and et al. (1992) *Nat Genet* **2**(4), 330-334
6. Levy-Lahad, E., Wijsman, E. M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K. A., Weber, J. L., Bird, T. D., and Schellenberg, G. D. (1995) *Science* **269**(5226), 970-973
7. Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., and et al. (1995) *Nature* **376**(6543), 775-778
8. Saunders, A. M., Schmechel, K., Breitner, J. C., Benson, M. D., Brown, W. T., Goldfarb, L., Goldgaber, D., Manwaring, M. G., Szymanski, M. H., McCown, N., and et al. (1993) *Lancet* **342**(8873), 710-711
9. Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L. M., Salvesen, G. S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A. M., Goldgaber, D., and Roses, A. D. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(17), 8098-8102
10. Kosik, K. S., Joachim, C. L., and Selkoe, D. J. (1986) *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(11), 4044-4048
11. Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4245-4249
12. Wolfe, M. S., and Guenette, S. Y. (2007) *J Cell Sci* **120**(Pt 18), 3157-3161
13. Sisodia, S. S., and St George-Hyslop, P. H. (2002) *Nat Rev Neurosci* **3**(4), 281-290

Literaturverzeichnis

14. Hardy, J., and Allsop, D. (1991) *Trends Pharmacol Sci* **12**(10), 383-388
15. Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002) *Science* **297**(5580), 353-356
16. Naslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, A. D., Tjernberg, L. O., Silberring, J., Gandy, S. E., Winblad, B., Greengard, P., and et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**(18), 8378-8382
17. Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E., and Rogers, J. (1999) *Am J Pathol* **155**(3), 853-862
18. McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A. I., and Masters, C. L. (1999) *Ann Neurol* **46**(6), 860-866
19. Wang, J., Dickson, D. W., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (1999) *Exp Neurol* **158**(2), 328-337
20. Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., and Selkoe, D. J. (2002) *Nature* **416**(6880), 535-539
21. Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J., and Ashe, K. H. (2005) *Nat Neurosci* **8**(1), 79-84
22. Klyubin, I., Walsh, D. M., Lemere, C. A., Cullen, W. K., Shankar, G. M., Betts, V., Spooner, E. T., Jiang, L., Anwyl, R., Selkoe, D. J., and Rowan, M. J. (2005) *Nat Med* **11**(5), 556-561
23. Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J. R., Tracy, J., Signorell, A., Muller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M. A., Umbricht, D., de Quervain, D. J., Hofmann, M., Maddalena, A., Papassotiropoulos, A., and Nitsch, R. M. (2003) *Neuron* **38**(4), 547-554
24. Nicoll, J. A., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H., and Weller, R. O. (2003) *Nat Med* **9**(4), 448-452
25. Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994) *Neuron* **13**, 45-53
26. Mandelkow, E. M., Biernat, J., Drewes, G., Gustke, N., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1995) *Neurobiol Aging* **16**(3), 355-362; discussion 362-353

Literaturverzeichnis

27. Ballatore, C., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (2007) *Nat Rev Neurosci*
28. Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(2), 101-112
29. Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1989) *Cell* **57**, 115-126
30. Hung, A. Y., and Selkoe, D. J. (1994) *EMBO J* **13**(3), 534-542
31. Walter, J., Grunberg, J., Capell, A., Pesold, B., Schindzielorz, A., Citron, M., Mendla, K., George-Hyslop, P. S., Multhaup, G., Selkoe, D. J., and Haass, C. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10), 5349-5354
32. Sinha, S., and Lieberburg, I. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20), 11049-11053
33. Haass, C., and Steiner, H. (2002) *Trends Cell Biol* **12**(12), 556-562
34. 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., John, V., and et al. (1999) *Nature* **402**(6761), 537-540
35. 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**(5440), 735-741
36. 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., Henrikson, R. L., and Gurney, M. E. (1999) *Nature* **402**(6761), 533-537
37. 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**(6), 419-427
38. Bennett, B. D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D. B., Kahn, S., Louis, J. C., Citron, M., and Vassar, R. (2001) *J Biol Chem* **276**(18), 15561.

Literaturverzeichnis

39. Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirotsu, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T. C., Wang, R., and Ihara, Y. (2005) *J Neurosci* **25**(2), 436-445
40. Liu, K., Doms, R. W., and Lee, V. M. (2002) *Biochemistry* **41**(9), 3128-3136
41. Huse, J. T., Liu, K., Pijak, D. S., Carlin, D., Lee, V. M., and Doms, R. W. (2002) *J Biol Chem* **277**(18), 16278-16284
42. Fluhrer, R., Capell, A., Westmeyer, G., Willem, M., Hartung, B., Condrón, M. M., Teplow, D. B., Haass, C., and Walter, J. (2002) *J Neurochem* **81**(5), 1011-1020
43. Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P. J. (1990) *Science* **248**(4959), 1122-1124
44. Sisodia, S. S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**(13), 6075-6079
45. Anderson, J. P., Esch, F. S., Keim, P. S., Sambamurti, K., Lieberburg, I., and Robakis, N. K. (1991) *Neurosci Lett* **128**(1), 126-128
46. Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condrón, M. M., Teplow, D. B., and Haass, C. (2001) *EMBO Rep* **2**(9), 835-841
47. Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tani, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M., and Haass, C. (2002) *Embo J* **21**(20), 5408-5416
48. Vandermeeren, M., Geraerts, M., Pype, S., Dillen, L., Van Hove, C., and Mercken, M. (2001) *Neurosci Lett* **315**(3), 145-148
49. Fluhrer, R., Multhaup, G., Schlicksupp, A., Okochi, M., Takeda, M., Lammich, S., Willem, M., Westmeyer, G., Bode, W., Walter, J., and Haass, C. (2003) *J Biol Chem* **278**(8), 5531-5538
50. Shi, X. P., Tugusheva, K., Bruce, J. E., Lucka, A., Wu, G. X., Chen-Dodson, E., Price, E., Li, Y., Xu, M., Huang, Q., Sardana, M. K., and Hazuda, D. J. (2003) *J Biol Chem* **278**(23), 21286-21294
51. Roberts, S. B., Ripellino, J. A., Ingalls, K. M., Robakis, N. K., and Felsenstein, K. M. (1994) *J Biol Chem* **269**(4), 3111-3116

Literaturverzeichnis

52. Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., and Ishiura, S. (1999) *Biochem J* **343 Pt 2**, 371-375
53. Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7), 3922-3927
54. Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., and Black, R. A. (1998) *J Biol Chem* **273**(43), 27765-27767
55. Merlos-Suarez, A., Fernandez-Larrea, J., Reddy, P., Baselga, J., and Arribas, J. (1998) *J Biol Chem* **273**(38), 24955-24962
56. Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D., and Choe, H. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(17), 9712-9717
57. Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J. C., Curran, E., Citron, M., and Vassar, R. (2000) *J Biol Chem* **275**(27), 20647-20651
58. Acquati, F., Accarino, M., Nucci, C., Fumagalli, P., Jovine, L., Ottolenghi, S., and Taramelli, R. (2000) *FEBS Lett* **468**(1), 59-64
59. 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**(5), 609-619
60. Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(4), 1456-1460
61. Haass, C. (2004) *Embo J* **23**(3), 483-488
62. Kimberly, W. T., and Wolfe, M. S. (2003) *J Neurosci Res* **74**(3), 353-360
63. Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., and Iwatsubo, T. (2003) *Nature* **422**(6930), 438-441
64. Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003) *Nat Cell Biol* **5**(5), 486-488
65. Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999) *Nature* **398**(6727), 513-517

Literaturverzeichnis

66. Steiner, H., Duff, K., Capell, A., Romig, H., Grim, M. G., Lincoln, S., Hardy, J., Yu, X., Picciano, M., Fechteler, K., Citron, M., Kopan, R., Pesold, B., Keck, S., Baader, M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Baumeister, R., and Haass, C. (1999) *J Biol Chem* **274**(40), 28669-28673
67. Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., Hardy, J., Levey, A. I., Gandy, S. E., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L., and Sisodia, S. S. (1996) *Neuron* **17**(1), 181-190
68. 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**(6), 3205-3211
69. De Strooper, B. (2003) *Neuron* **38**(1), 9-12
70. Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. L., Baumeister, R., Fechteler, K., and Haass, C. (2000) *Nat Cell Biol* **2**(11), 848-851
71. Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F. B., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C. L., Beyreuther, K., and Evin, G. (2002) *Biochemistry* **41**(8), 2825-2835
72. Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., and Ihara, Y. (2001) *J Biol Chem* **276**(38), 35235-35238
73. Zhao, G., Cui, M. Z., Mao, G., Dong, Y., Tan, J., Sun, L., and Xu, X. (2005) *J Biol Chem* **280**(45), 37689-37697
74. Selkoe, D. J., and Wolfe, M. S. (2007) *Cell* **131**(2), 215-221
75. Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horre, K., Wiltfang, J., Esselmann, H., and De Strooper, B. (2006) *J Neurochem* **96**(3), 732-742
76. Naruse, S., Thinakaran, G., Luo, J. J., Kusiak, J. W., Tomita, T., Iwatsubo, T., Qian, X., Ginty, D. D., Price, D. L., Borchelt, D. R., Wong, P. C., and Sisodia, S. S. (1998) *Neuron* **21**(5), 1213-1221.
77. Mizutani, T., Taniguchi, Y., Aoki, T., Hashimoto, N., and Honjo, T. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16), 9026-9031

Literaturverzeichnis

78. Okochi, M., Fukumori, A., Jiang, J., Itoh, N., Kimura, R., Steiner, H., Haass, C., Tagami, S., and Takeda, M. (2006) *J Biol Chem*
79. Saxena, M. T., Schroeter, E. H., Mumm, J. S., and Kopan, R. (2001) *J Biol Chem* **276**(43), 40268-40273
80. 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**(47), 44754-44759
81. Selkoe, D., and Kopan, R. (2003) *Annu Rev Neurosci* **26**, 565-597
82. Mumm, J. S., and Kopan, R. (2000) *Dev Biol* **228**(2), 151-165
83. Hadland, B. K., Manley, N. R., Su, D., Longmore, G. D., Moore, C. L., Wolfe, M. S., Schroeter, E. H., and Kopan, R. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13), 7487-7491
84. Hong, L., Koelsch, G., Lin, X., Wu, S., Terzyan, S., Ghosh, A. K., Zhang, X. C., and Tang, J. (2000) *Science* **290**(5489), 150-153
85. 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**(48), 37712-37717
86. Capell, A., Steiner, H., Romig, H., Keck, S., Baader, M., Grim, M. G., Baumeister, R., and Haass, C. (2000) *Nat Cell Biol* **2**(4), 205-211
87. Huse, J. T., and Doms, R. W. (2000) *Mol Neurobiol* **22**(1-3), 81-98
88. 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**(6), 4211-4217
89. Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2000) *J Biol Chem* **275**(40), 30849-30854
90. Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M., and Doms, R. W. (2000) *J Biol Chem* **275**(43), 33729-33737
91. Walter, J., Fluhner, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2001) *J Biol Chem* **276**(18), 14634-14641
92. Vassar, R. (2001) *J Mol Neurosci* **17**(2), 157-170
93. Vassar, R., and Citron, M. (2000) *Neuron* **27**(3), 419-422.

Literaturverzeichnis

94. Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., and Lannfelt, L. (1992) *Nat Genet* **1**(5), 345-347
95. 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**(6405), 672-674
96. Cai, X. D., Golde, T. E., and Younkin, S. G. (1993) *Science* **259**(5094), 514-516
97. Fraser, M. E., Strynadka, N. C., Bartlett, P. A., Hanson, J. E., and James, M. N. (1992) *Biochemistry* **31**(22), 5201-5214
98. Li, M., Phylip, L. H., Lees, W. E., Winther, J. R., Dunn, B. M., Wlodawer, A., Kay, J., and Gustchina, A. (2000) *Nat Struct Biol* **7**(2), 113-117
99. Phylip, L. H., Lees, W. E., Brownsey, B. G., Bur, D., Dunn, B. M., Winther, J. R., Gustchina, A., Li, M., Copeland, T., Wlodawer, A., and Kay, J. (2001) *J Biol Chem* **276**(3), 2023-2030
100. Capell, A., Meyn, L., Fluhrer, R., Teplow, D. B., Walter, J., and Haass, C. (2002) *J Biol Chem* **277**(7), 5637-5643
101. Lichtenthaler, S. F., Dominguez, D.-i., Westmeyer, G. G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., and Seed, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**(49), 48713-48719
102. Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T. C., and Hashimoto, Y. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24), 13554-13559
103. Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., and Haass, C. (2006) *Science* **314**(5799), 664-666
104. Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B., Trapp, B. D., and Yan, R. (2006) *Nat Neurosci* **9**(12), 1520-1525
105. Garratt, A. N., Britsch, S., and Birchmeier, C. (2000) *Bioessays* **22**(11), 987-996
106. Lemke, G. (2006) *Sci STKE* **2006**(325), pe11

Literaturverzeichnis

107. Holsinger, R. M., McLean, C. A., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Evin, G. (2002) *Ann Neurol* **51**(6), 783-786
108. Fukumoto, H., Rosene, D. L., Moss, M. B., Raju, S., Hyman, B. T., and Irizarry, M. C. (2004) *Am J Pathol* **164**(2), 719-725
109. Tyler, S. J., Dawbarn, D., Wilcock, G. K., and Allen, S. J. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **299**(3), 373-376
110. Sennvik, K., Bogdanovic, N., Volkmann, I., Fastbom, J., and Benedikz, E. (2004) *J Cell Mol Med* **8**(1), 127-134
111. Yang, L. B., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X. L., Beach, T., Sue, L., Wong, P., Price, D., Li, R., and Shen, Y. (2003) *Nat Med* **9**(1), 3-4
112. Li, R., Lindholm, K., Yang, L. B., Yue, X., Citron, M., Yan, R., Beach, T., Sue, L., Sabbagh, M., Cai, H., Wong, P., Price, D., and Shen, Y. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10), 3632-3637
113. Zhao, J., Fu, Y., Yasvoina, M., Shao, P., Hitt, B., O'Connor, T., Logan, S., Maus, E., Citron, M., Berry, R., Binder, L., and Vassar, R. (2007) *J Neurosci* **27**(14), 3639-3649
114. Gatta, L. B., Albertini, A., Ravid, R., and Finazzi, D. (2002) *Neuroreport* **13**(16), 2031-2033
115. Preece, P., Virley, D. J., Costandi, M., Coombes, R., Moss, S. J., Mudge, A. W., Jazin, E., and Cairns, N. J. (2003) *Brain Res Mol Brain Res* **116**(1-2), 155-158
116. Lammich, S., Schobel, S., Zimmer, A. K., Lichtenthaler, S. F., and Haass, C. (2004) *EMBO Rep* **5**(6), 620-625
117. Wood, M. W., VanDongen, H. M., and VanDongen, A. M. (1996) *J Biol Chem* **271**(14), 8115-8120
118. Clemens, M. J., and Bommer, U. A. (1999) *Int J Biochem Cell Biol* **31**(1), 1-23
119. Dhavan, R., Greer, P. L., Morabito, M. A., Orlando, L. R., and Tsai, L. H. (2002) *J Neurosci* **22**(18), 7879-7891
120. Lee, K. Y., Clark, A. W., Rosales, J. L., Chapman, K., Fung, T., and Johnston, R. N. (1999) *Neurosci Res* **34**(1), 21-29

Literaturverzeichnis

121. Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M., and Tsai, L. H. (2000) *Nature* **405**(6784), 360-364
122. Kusakawa, G., Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto, T., and Hisanaga, S. (2000) *J Biol Chem* **275**(22), 17166-17172
123. Nath, R., Davis, M., Probert, A. W., Kupina, N. C., Ren, X., Schielke, G. P., and Wang, K. K. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **274**(1), 16-21
124. Tseng, H. C., Zhou, Y., Shen, Y., and Tsai, L. H. (2002) *FEBS Lett* **523**(1-3), 58-62
125. Taniguchi, S., Fujita, Y., Hayashi, S., Kakita, A., Takahashi, H., Murayama, S., Saido, T. C., Hisanaga, S., Iwatsubo, T., and Hasegawa, M. (2001) *FEBS Lett* **489**(1), 46-50
126. Yoo, B. C., and Lubec, G. (2001) *Nature* **411**(6839), 763-764; discussion 764-765
127. Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P., and Tsai, L. H. (1999) *Nature* **402**(6762), 615-622
128. Flaherty, D. B., Soria, J. P., Tomasiewicz, H. G., and Wood, J. G. (2000) *J Neurosci Res* **62**(3), 463-472
129. Liu, F., Su, Y., Li, B., Zhou, Y., Ryder, J., Gonzalez-DeWhitt, P., May, P. C., and Ni, B. (2003) *FEBS Lett* **547**(1-3), 193-196
130. Ramelot, T. A., and Nicholson, L. K. (2001) *J Mol Biol* **307**(3), 871-884
131. Ando, K., Iijima, K. I., Elliott, J. I., Kirino, Y., and Suzuki, T. (2001) *J Biol Chem* **276**(43), 40353-40361
132. Cruz, J. C., and Tsai, L. H. (2004) *Trends Mol Med* **10**(9), 452-458
133. Down, J. L. H. (1866) *London Hospital Reports* **3**, 259-262
134. Mann, D. M. (1989) *Neurobiol Aging* **10**(5), 397-399; discussion 412-394
135. Visser, F. E., Aldenkamp, A. P., van Huffelen, A. C., Kuilman, M., Overweg, J., and van Wijk, J. (1997) *Am J Ment Retard* **101**(4), 400-412

Literaturverzeichnis

136. Teller, J. K., Russo, C., DeBusk, L. M., Angelini, G., Zaccheo, D., Dagna-Bricarelli, F., Scartezzini, P., Bertolini, S., Mann, D. M., Tabaton, M., and Gambetti, P. (1996) *Nat Med* **2**(1), 93-95
137. Mori, C., Spooner, E. T., Wisniewsk, K. E., Wisniewski, T. M., Yamaguch, H., Saido, T. C., Tolan, D. R., Selkoe, D. J., and Lemere, C. A. (2002) *Amyloid* **9**(2), 88-102
138. Gyure, K. A., Durham, R., Stewart, W. F., Smialek, J. E., and Troncoso, J. C. (2001) *Arch Pathol Lab Med* **125**(4), 489-492
139. Hirayama, A., Horikoshi, Y., Maeda, M., Ito, M., and Takashima, S. (2003) *Brain & development* **25**(3), 180-185
140. Gardiner, K. (2004) *Genome Biol* **5**(10), 244
141. Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerriere, A., Vital, A., Dumanchin, C., Feuillette, S., Brice, A., Vercelletto, M., Dubas, F., Frebourg, T., and Campion, D. (2006) *Nat Genet* **38**(1), 24-26
142. Phinney, A. L., Horne, P., Yang, J., Janus, C., Bergeron, C., and Westaway, D. (2003) *Neurol Res* **25**(6), 590-600
143. 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., and McConlogue, L. (2001) *Hum Mol Genet* **10**(12), 1317-1324
144. Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., and Wong, P. C. (2001) *Nat Neurosci* **4**(3), 233-234
145. 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**(3), 231-232
146. Willem, M., Dewachter, I., Smyth, N., Van Dooren, T., Borghgraef, P., Haass, C., and Van Leuven, F. (2004) *Am J Pathol* **165**(5), 1621-1631

Literaturverzeichnis

147. Mohajeri, M. H., Saini, K. D., and Nitsch, R. M. (2004) *J Neural Transm* **111**(3), 413-425
148. Bodendorf, U., Danner, S., Fischer, F., Stefani, M., Sturchler-Pierrat, C., Wiederhold, K. H., Staufenbiel, M., and Paganetti, P. (2002) *J Neurochem* **80**(5), 799-806
149. Wen, Y., Yu, W. H., Maloney, B., Bailey, J., Ma, J., Marie, I., Maurin, T., Wang, L., Figueroa, H., Herman, M., Krishnamurthy, P., Liu, L., Planel, E., Lau, L. F., Lahiri, D. K., and Duff, K. (2008) *Neuron* **57**(5), 680-690
150. Lott, I. T., and Head, E. (2005) *Neurobiol Aging* **26**(3), 383-389
151. Braak, H., and Braak, E. (1991) *Acta Neuropathol (Berl)* **82**(4), 239-259
152. Mirra, S. S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S. M., Crain, B. J., Brownlee, L. M., Vogel, F. S., Hughes, J. P., van Belle, G., and Berg, L. (1991) *Neurology* **41**(4), 479-486
153. Walter, J., Schindzielorz, A., Hartung, B., and Haass, C. (2000) *J Biol Chem* **275**(31), 23523-23529
154. Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogaeva, 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., Rogaev, 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**(6800), 48-54
155. Edbauer, D., Winkler, E., Haass, C., and Steiner, H. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13), 8666-8671
156. Kopan, R., and Goate, A. (2002) *Neuron* **33**(3), 321-324
157. Lai, E. C. (2002) *Curr Biol* **12**(6), R200-202
158. Hamdane, M., Bretteville, A., Sambo, A. V., Schindowski, K., Begard, S., Delacourte, A., Bertrand, P., and Buee, L. (2005) *J Cell Sci* **118**(Pt 6), 1291-1298
159. Willis, A. E. (1999) *Int J Biochem Cell Biol* **31**(1), 73-86

Literaturverzeichnis

160. Argellati, F., Massone, S., d'Abramo, C., Marinari, U. M., Pronzato, M. A., Domenicotti, C., and Ricciarelli, R. (2006) *IUBMB life* **58**(2), 103-106
161. Sun, X., He, G., Qing, H., Zhou, W., Dobie, F., Cai, F., Staufenbiel, M., Huang, L. E., and Song, W. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(49), 18727-18732
162. Sun, X., He, G., and Song, W. (2006) *Faseb J* **20**(9), 1369-1376
163. Barbiero, L., Benussi, L., Ghidoni, R., Alberici, A., Russo, C., Schettini, G., Pagano, S. F., Parati, E. A., Mazzoli, F., Nicosia, F., Signorini, S., Feudatari, E., and Binetti, G. (2003) *Exp Neurol* **182**(2), 335-345
164. Motonaga, K., Itoh, M., Becker, L. E., Goto, Y., and Takashima, S. (2002) *Neurosci Lett* **326**(1), 64-66
165. Cataldo, A. M., Petanceska, S., Terio, N. B., Peterhoff, C. M., Durham, R., Mercken, M., Mehta, P. D., Buxbaum, J., Haroutunian, V., and Nixon, R. A. (2004) *Neurobiol Aging* **25**(10), 1263-1272
166. Marie, B., Sweeney, S. T., Poskanzer, K. E., Roos, J., Kelly, R. B., and Davis, G. W. (2004) *Neuron* **43**(2), 207-219

Bücherverzeichnis:

Masuhr und Neumann: Neurologie, Duale Reihe, 5. Auflage, 2005, Thieme Verlag

Sitzmann: Pädiatrie, Duale Reihe, 2. Auflage, 2002, Thieme Verlag

Löffler und Petrides: Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage, 1998, Springer Verlag

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Aktivität
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer-Demenz-Erkrankung
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AICD	β APP Intracellular Domain
APH-1	Anterior Pharynx-Defective Phenotype-1
ApoE	Apolipoprotein E
AS	Aminosäure
A β	Amyloid- β -Peptid
BACE	β -site APP Cleaving Enzyme
BSA	Bovines Serum Albumin
Cdk5	Cyclin-dependent kinase 5
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
CTF	C-terminales Fragment
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DS	Down Syndrome
DSCR	Down Syndrome Critical Region
DSCR-1	Down Syndrome Candidate Region 1
DYRK1A	Dual-specificity tyrosine-regulated Kinase 1A
ECL	Enhanced Chemiluminescence

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Frontallappen
FAD	Familial Alzheimer's Disease
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
G418	Geneticin 418
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
h	hour (Stunde)
HEK	Human embryonic Kidney
HRP	Horseraddish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
ITSN1	Intersectin 1
K	Kontrolle
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	löslich
M	männlich
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
Nct	Nicastrin
nM	Nanomolar
NTF	N-terminales Fragment

Abkürzungsverzeichnis

ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEN	Penicillin
PEN-2	Presenilin Enhancer 2
PI	Protease Inhibitor
PMI	Post Mortem Intervall
PNS	Post-Nuclear Supernatant
PP2B	Protein Phosphatase 2B
PS	Presenilin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Strep	Streptomycin
SW	Schweden
SYNJ1	Synaptojanin 1
T	Temporallappen
t	tempus (Zeit)
T21	Trisomie 21
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tet	Tetracyclin
TM	Transmembranbdomäne
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslated Region
W	weiblich
wt	Wildtyp
x g	x Erdbeschleunigung, $g=9,81 \text{ m/s}^2$

Abkürzungsverzeichnis

β APP	β-Amyloid Precursor Protein
μ l	Mikroliter

Einbuchstabencode für Aminosäuren

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

Danksagung

Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. Christian Haass, der es mir ermöglicht hat meine Dissertation am Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München durchzuführen.

Besonderer Dank gilt außerdem meinem Betreuer Herrn Dr. Michael Willem, der mich mit großer Motivation und fachlichem Rat unterstützt hat. Ich danke allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Stoffwechselbiochemie, besonders Linnéa Rabe, Peer-Hendrik Kuhn, Dominik Büll, Sven Lammich, Sonja Zilow, Anja Capell, Katrin Fellerer, Alice Sülzen und Lucas Martin für fruchtbare Diskussionen und tatkräftige Unterstützung. Für die gute Einarbeitung und experimentelle Unterstützung sind Bozidar Novak und Ann-Katrin Ludwig hervorzuheben. Bei Herrn Prof. Dr. Luc Buée (Université de Lille), Frau Dr. Karen Duff (New York University) und Frau Dr. Elizabeth Head (University of California) bedanke ich mich für die gute Kooperation. Diese Arbeit wurde durch ein Stipendium des Promotionsstudiums Molekulare Medizin unterstützt. Wofür ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann bedanken möchte.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern und Martin bedanken, die mich immer unterstützt und aufgemuntert haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Katharina Anna Schraner

geboren am 29.06.1982

in Moosburg a. d. Isar

Ausbildung

1988-1992	Grundschule Moosburg – Süd
1992-2001	Karl-Ritter-von-Frisch-Gymnasium Moosburg
2001	Allgemeine Hochschulreife

Studium

Oktober 2001	Beginn Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
September 2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Dezember 2008	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt
Februar 2009	Assistenzärztin in der Klinik für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie im Klinikum Rosenheim

Stipendium

Februar 2005 bis Juli 2006	Stipendium des Promotionsstudiums Molekulare Medizin (FöFoLe der LMU)
----------------------------	--