

Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation der γ -Sekretase

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin an der Medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

Stephanie Schmitt

Aus dem Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie des Adolf-Butenandt-Instituts der
Ludwigs-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Haass

**Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation der
 γ -Sekretase**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Stephanie Michaela Schmitt

aus München

Im Jahr 2011

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichtersteller: Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Haass

2. Berichtersteller: Prof. Dr. Dan Rujescu

Mitberichtersteller: PD Dr. Katharina Bürger

Prof. Dr. Jochen Herms

Mitbetreuung durch den

Promovierten Mitarbeiter: Dr. Christoph Kaether

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

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2011

Abstract

Alzheimer's disease is characterized by brain deposition of extracellular amyloid β -peptide containing plaques. The cellular site of γ -secretase activity, which releases amyloid β -peptide and the corresponding APP intracellular domain (AICD) remains controversial. Proposed cleavage sites range from the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus, the cell surface to endosomal compartments. We now used C99-GFP, a fluorescent reporter substrate for γ -secretase activity and monitored AICD production in living cells. C99-GFP is efficiently cleaved by γ -secretase and AICD-GFP is released into the cytosol. Inhibiting γ -secretase results in accumulation of C99-GFP in early endosomes. By blocking selective transport steps along the secretory pathway we demonstrate that γ -secretase does not cleave its substrates in the endoplasmic reticulum, the Golgi/trans-Golgi network or in secretory vesicles. In contrast, inhibition of endocytosis did not inhibit cleavage of C99-GFP. Similar results were obtained for another γ -secretase substrate, Notch ΔE . Our results suggest that intracellular domains are generated by γ -secretase at the plasma membrane and/or early endosomes.

Zitat Quelle: [52] Kaether C, Schmitt S, Willem M, Haass C; Amyloid precursor protein and Notch intracellular domain are generated after transport of their precursors to the cell surface. *Traffic* 2006; 7: 408-415

Keywords: Alzheimer's disease, Amyloid precursor protein, AICD, C99, GFP, γ -Secretase

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	4
Abbildungsverzeichnis	8
1 Einleitung	13
1.1 Morbus Alzheimer	13
1.1.1 Geschichte	13
1.1.2 Epidemiologie	14
1.1.3 Genetik	14
1.1.4 Morphologie und Histopathologie	15
1.1.5 Die Amyloidhypothese	16
1.2 Molekularbiologische Grundlagen.....	17
1.2.1 APP und β -Amyloid.....	17
1.2.2 γ -Sekretase.....	19
1.2.3 Das „Spatial Paradox“	20
1.3 Ansatz und Fragestellung dieser Arbeit	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Zelllinien und Transfektion	21
2.1.1 Zelllinien.....	21
2.1.2 Transfektion	21
2.2 Konstrukte.....	22
2.2.1 Vektoren	22
2.2.2 Verwendete fertige Konstrukte.....	22
2.2.3 Eigene Konstrukte	23
2.2.4 Liste der stabil transfizierten Zelllinien	25
2.2.5 Primer	25
2.2.6 PCR	26
2.2.7 Klonierungen.....	26
2.2.8 Gelelektrophorese	26
2.2.9 Restriktion und Ligation	27
2.2.10 Transformation.....	27
2.3 Antikörper	28
2.3.1 Primäre Antikörper	28
2.3.2 Sekundäre Antikörper	29

2.4	Mikroskopie und Herstellung der Präparate zur Immunfluoreszenz.....	29
2.5	Lumio Technik	30
2.6	Spezifische Hemmung der γ - und α - Sekretase	31
2.6.1	Hemmung der γ -Sekretase mit DAPT.....	31
2.6.2	Hemmung der α -Sekretase mit TAPI.....	31
2.7	Untersuchung der einzelnen Abschnitte des Sekretorischen Wegs.....	32
2.7.1	Brefeldin A (BFA).....	32
2.7.2	Monensin	32
2.7.3	Tanninsäure (TA).....	33
2.8	20°C Block.....	33
2.9	Transferrin-Aufnahme-Experiment.....	33
2.10	Pulse-Chase-Analyse	34
2.11	In vitro γ -Sekretase-Assay.....	34
2.12	Proteinbiochemische Verfahren.....	35
2.12.1	Proteinextrakte.....	35
2.12.2	Immunpräzipitation	35
2.12.3	Western Blot und Proteinnachweis	36
2.13	Liste verwendeter Lösungen und Puffer	36
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Konstrukt C99-GFP ist ein Reporter für γ -Sekretase-Aktivität	38
3.1.1	Korrekte Prozessierung von C99-GFP	40
3.1.2	C99-GFP wird zu A β prozessiert	42
3.2	C99-GFP akkumuliert bei Inhibition der γ -Sekretase in frühen Endosomen.....	42
3.2.1	Akkumulation in frühen, Transferrin-positiven Endosomen.....	44
3.3	Keine AICD Bildung in frühen Kompartimenten des Sekretorischen Wegs 46	
3.3.1	AICD entsteht nicht im ER	47
3.3.2	AICD entsteht nicht im Golgi-Apparat	48
3.3.3	Keine Inhibition der γ -Sekretase durch BFA oder Monensin	49
3.3.4	AICD entsteht nicht im TGN	50
3.4	AICD entsteht nicht in sekretorischen Vesikeln	51
3.4.1	Tanninsäure (TA) hemmt die Exozytose.....	51
3.4.2	TA beeinflusst den intrazellulären Transport nicht.....	52
3.4.3	C99-GFP wird nicht in exozytotischen Vesikeln prozessiert	53
3.4.4	Auch in neuronalen Zellen entsteht AICD-GFP nicht in Sekretorischen Vesikeln	54
3.4.5	Effekt von TA nicht selektiv für Prozessierung von C99-GFP	55

3.5	Prozessierung von C99-GFP an der PM.....	56
3.5.1	C99-GFP wird an der PM geschnitten	56
3.5.2	Dynamin K44A inhibiert Vesikelbildung unter DAPT	57
4	Diskussion	59
4.1	γ -Sekretase Aktivität findet sich vor allem in frühen Endosomen und an der Plasmamembran.....	59
4.2	Inhibition des Sekretorischen Wegs führt zu Akkumulation von Substraten der γ -Sekretase	60
4.3	Keine Aktivität der γ -Sekretase in den frühen Kompartimenten des Sekretorischen Wegs.....	61
4.3.1	Gründe fehlender Prozessierung entlang des Sekretorischen Wegs.....	62
4.3.2	Substrate der γ -Sekretase sind Oberflächenproteine	62
4.3.3	Hemmung der Endozytose stört die Aktivität der γ -Sekretase nicht	63
4.3.4	Ungünstiges Verhältnis von aktivem γ -Sekretase-Komplex zu Substrat in sekretorischen Vesikeln	63
4.3.5	Kein aktiver γ -Sekretase-Komplex in Golgi und TGN	63
4.3.6	Minimales Vorkommen von aktiver γ -Sekretase im ER	64
4.3.7	Einfluss der Membran-Zusammensetzung auf die γ -Sekretase.....	64
4.4	Zusammenfassung	64
4.5	Bedeutung dieser Arbeit für die Entwicklung von Therapeutika zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung	65
5	Anhang: Vektorkarten	66
6	Literaturverzeichnis und Quellenangaben.....	68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schnitt von C99-GFP durch die γ -Sekretase	39
Abbildung 2: Prozessierung von C99-GFP: Western Blot von „C99-GFP“ Zell-Lysaten mit AK anti-GFP. Deutliche Banden C99-GFP und AICD-GFP. Nach Inkubation mit DAPT AICD-GFP deutlich vermindert, C99-GFP und C83-GFP-Bande deutlich sichtbar (Bei Inhibition der γ -Sekretase Abbau von C99-GFP durch α -Sekretase zu C83-GFP). * unspezifische Banden, bzw. Degradationsprodukte	41
Abbildung 3: Prozessierung von C99-GFP zu C83-GFP: Im Western-Blot Nachweis von C99-GFP und C83-GFP mit AK 6687 gegen den APP C-Terminus. Inhibition der γ -Sekretase (+DAPT) mit nachfolgender C83-GFP Produktion, dann Inhibition von γ - und α -Sekretase (+DAPT/+TAPI), dadurch Akkumulation von C99-GFP ohne Nachweis einer Bildung von C83-GFP. Nachweis der Bande C99-GFP mit AK 6E10. Außerdem Detektion von unspezifischen Banden bzw. Degradationsprodukten.	41
Abbildung 4: Nachweis von A β im Kulturmedium von „C99-GFP“ Zellen	42
Abbildung 5: C99-GFP Zellen zeigen nach PFA-Fixierung und mikroskopischer Analyse eine diffuse zytoplasmatische Lokalisation von AICD	43
Abbildung 6: Nach Inhibition der γ -Sekretase mit DAPT akkumuliert C99-GFP in Vesikeln. Vergleich von C99-GFP Zellen unbehandelt mit diskreter zytoplasmatischer Fluoreszenz (links, -DAPT) und mit Inhibitor behandelt (rechts, +DAPT) mit deutlichem Anstieg der Gesamtfluoreszenz. Im kleinen Bild links bei gleichen Einstellungen wie rechts kaum Fluoreszenz nachzuweisen; nach Inhibition der γ -Sekretase mit DAPT Abgrenzbarkeit von PM und multipler kleiner Vesikel ohne Färbung des Zytoplasmas	44
Abbildung 7: C99-GFP Vesikel co-lokalisieren mit Transferrin. Co-Lokalisierung (Pfeile) von bei Inhibition der γ -Sekretase mit DAPT sichtbaren Vesikeln (links) mit frühen Endosomen im Transferrin Aufnahme Experiment (Tf, rechts)	45
Abbildung 8: Co-Lokalisation von C99-GFP Vesikeln und frühen Endosomen. Co-Lokalisation (Pfeile) von bei Inhibition der γ -Sekretase mit DAPT sichtbaren Vesikeln (links) mit frühen Endosomen, markiert mit AK EEA1	45

- Abbildung 9: Marginale Co-Lokalisation von C99-GFP Vesikeln und Lysosomen. Geringfügige Co-Lokalisation (Pfeile) von bei Inhibition der γ -Sekretase mit DAPT sichtbar werdenden C99-GFP enthaltenden Vesikeln mit AK lamp1 markierten späten Endosomen bzw. Lysosomen 46
- Abbildung 10: C99-GFP wird nicht im ER von HEK293 Zellen prozessiert. C99-GFP HEK293 Zellen links unbehandelt (ctrl) und rechts nach 4stündiger Inkubation mit BFA. BFA führt zu einer deutlichen Fluoreszenzanhebung mit Anfärbung der ER-/Golgi-Fusionsorganelle; beide Seiten bei gleichen mikroskopischen Einstellungen aufgenommen (kleines Kästchen mit verlängerter Expositionszeit) 48
- Abbildung 11: C99-GFP wird nicht im ER von NT2 Zellen prozessiert. Wie Abbildung10; Zelllinie NT2-C99-GFP links unbehandelt (ctrl) und rechts nach 4stündiger Inkubation mit BFA deutliche Fluoreszenzanhebung mit Anfärbung der ER-/Golgi-Fusionsorganelle; beide Seiten bei gleichen mikroskopischen Einstellungen aufgenommen (kleines Kästchen mit verlängerter Expositionszeit) 48
- Abbildung 12: AICD entsteht nicht im Golgi-Apparat. C99-GFP HEK293 Zellen und NT2-C99-GFP Zellen zeigen nach 4stündiger Inkubation mit Monensin eine deutliche Fluoreszenzanhebung mit Anfärbung des Golgi-Apparates (links unbehandelt ctrl und rechts 4h Monensin); beide Seiten bei gleichen mikroskopischen Einstellungen aufgenommen (kleines Kästchen mit verlängerter Expositionszeit) 49
- Abbildung 13: BFA und Monensin beeinträchtigen die Funktion der γ -Sekretase nicht. Western Blot mit AK 6687 nach in vitro γ -Sekretase Assay mit Membranen von HEK 293 Zellen ohne und mit Zusatz von BFA bzw. Monensin zeigt äquivalente AICD Produktion bei 37°C unter allen Bedingungen. Nct dient als Ladekontrolle 50
- Abbildung 14: AICD entsteht nicht im TGN. C99-GFP Zellen links unbehandelt (ctrl) und rechts nach Aufbewahrung für 2h bei 20°C; beide Seiten bei gleichen mikroskopischen Einstellungen aufgenommen (kleines Kästchen mit verlängerter Expositionszeit) 51
- Abbildung 15: Tanninsäure (TA) hemmt die Exozytose bei VSVG-GFP stabil exprimierenden HEK 293 Zellen. Im linken Bild Inkubation bei 40°C mit Anreicherung von VSVG-GFP im ER. Bei anschließender Inkubation bei 30°C korrekter Transport von VSVG an die PM (Mitte). Bei Zusatz von 1%TA kann kein Transport an die PM stattfinden, VSVG-GFP verbleibt in multiplen Vesikeln. 52
- Abbildung 16: Prozessierung von APP nach Behandlung mit TA. Pulse-Chase-Experiment. SWE Zellen ohne und mit (TA) Inkubation mit 1% TA. Untersuchung der Zelllysate (ly) nach IP mit AK 6687 und des

Kulturmediums (m) nach IP mit AK 5313 auf markiertes APP bzw. APPs nach 15min pulse (p) und 90min chase (c). S* entspricht sekretorischem APPs, N'-APP N-glykosiliertem APP und N'O' vollmaturiertem APP.	53
Abbildung 17: C99-GFP wird nicht in exozytotischen Vesikeln prozessiert. C99-GFP Zellen links unbehandelt mit schwacher zytoplasmatischer Anfärbung und nach 90min Inkubation mit TA (rechts) mit Akkumulation sekretorischer Vesikel nahe der PM; beide Seiten bei gleichen mikroskopischen Einstellungen aufgenommen (kleines Kästchen mit verlängerter Expositionszeit).....	54
Abbildung 18: C99-GFP wird nicht in sekretorischen Vesikeln neuronaler Zellen prozessiert. Transient mit C99-GFP transfizierte SH-SY5Y Zellen unbehandelt (links) mit erwartungsgemäß schwacher, zytoplasmatischer Anfärbung und nach 90min Inkubation mit TA (rechts) mit Akkumulation sekretorischer Vesikel nahe der PM; beide Seiten bei gleichen mikroskopischen Einstellungen aufgenommen (kleines Kästchen mit verlängerter Expositionszeit).....	55
Abbildung 19: Tanninsäure inhibiert Prozessierung von Notch. Stabil NotchΔE exprimierende Zellen unbehandelt (links) mit typischer Anfärbung des Nukleus (schwarze Sternchen) und nach Inkubation mit TA (rechts) wobei sich multiple sekretorische Vesikel (Pfeile) bilden und der Nukleus ungefärbt (weiße Sternchen) bleibt.....	56
Abbildung 20: C99-GFP wird an der PM geschnitten. Links C99-GFP HEK 293 Zellen mit (Sternchen) und ohne Transfektion mit dem Endozytosehemmer Dynamin K44A (links) zeigen keinen Unterschied in der AICD-GFP-Fluoreszenz, es findet sich eine vergleichbare, diffuse Anfärbung des Zytosols; rechts Nachweis der Dynamin K44A-Expression mittels HA-tag	57
Abbildung 21: Dynamin K44A hemmt Endozytose. Links C99-GFP Färbung, die mittlere Zelle ist nicht mit Dynamin transfiziert und zeigt endosomale Vesikel (Pfeile). Die linke und die untere Zelle sind mit Dynamin K44A transfiziert und zeigen eine starke PM-Färbung (Pfeilspitzen). Rechts HA-Färbung zur Dynamin K44A Visualisierung. Zellen zusätzlich mit DAPT behandelt.	58
Abbildung 22: Vektor pEGFP-N1 (Clontech) [73].....	66
Abbildung 23: Vektor pcDNA3.1/Hygro (+) (Invitrogen) [74]	66
Abbildung 24: Vektor pCDNA3.1(+) Zeo (Invitrogen) [75].....	67
Abbildung 25: Vektor pCR2.1 TOPO (Invitrogen) [76]	67

Abkürzungsverzeichnis

A β	β -Amyloid (amyloid β)
AD	Alzheimer Erkrankung (Alzheimer's disease)
AICD	APP-intrazelluläre C-terminale Domäne (APP intracellular c-terminal domain)
AK	Antikörper
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Vorläufer Protein (amyloid precursor protein)
AS	Aminosäure
BFA	Brefeldin A
C83	C-terminales, 83 AS langes APP Fragment
C99	C-terminales, 99 AS langes APP Fragment
DAPT	N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine-t-butylester
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleinacid)
E.coli	Escherichia coli
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	Familiäre Alzheimer Erkrankung (familiar Alzheimer's disease)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
HEK	Humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells)
IF	Immunfluoreszenzmarkierung

IP	Immunpräzipitation
Nct	Nicastrin
NICD	Notch-intrazelluläre C-terminale Domäne (notch intracellular c-terminal domain), analog zu AICD
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (polymerase chain reaction)
PI	Protease-Inhibitor-Mix
PM	Plasmamembran
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
RFP	Rot fluoreszierendes Protein (red fluorescent protein)
Swe	APP Swe, enthält die APP Mutation einer schwedischen Familie mit FAD, auch kurz für HEK 293 Zellen, die APP Swe exprimieren
TA	Tanninsäure (tannic acid)
TAPI	TNF α -Protease-Inhibitor
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

1 Einleitung

1.1 Morbus Alzheimer

1.1.1 Geschichte

"Wie heißen Sie?"

"Auguste."

"Familiennamen?"

"Auguste."

"Wie heißt ihr Mann?" - Auguste Deter zögert, antwortet schließlich:

"Ich glaube... Auguste."

"Ihr Mann?"

"Ach so."

"Wie alt sind Sie?"

"51."

"Wo wohnen Sie?"

"Ach, Sie waren doch schon bei uns."

"Sind Sie verheiratet?"

"Ach, ich bin doch so verwirrt."

"Wo sind Sie hier?"

"Hier und überall, hier und jetzt, Sie dürfen mir nichts übel nehmen."

"Wo sind Sie hier?"

"Da werden wir noch wohnen."

"Wo ist Ihr Bett?"

"Wo soll es sein?"

Interview mit Auguste Deter

Der deutsche Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer (geboren 1864 in Marktbreit) führte am 25.11.1901 dieses Interview mit der Patientin Auguste Deter durch, die zu diesem Zeitpunkt erst 51 Jahre alt war und im vergangenen Jahr rasant und zunehmend ihre kognitiven Fähigkeiten verloren hatte [Krankenblatt Auguste Deter, 1901].

Ende des Jahres 1906 stellte er die Krankheit der Patientin erstmals als eigenständiges Krankheitsbild dar, inklusive der von ihm bei der Obduktion des Gehirns der Patientin gefundenen Eiweißablagerungen („Plaques“) sowie neurofibrillärer Bündel und dem Befund flächenweise abgestorbener Nervenzellen. Er unterscheidet die später nach ihm benannte Krankheit erstmals von der senilen Demenz.

Beim Morbus Alzheimer kommt es zu einem fortschreitenden Verlust aller höheren Gehirnleistungen, betroffen sind vor allem das Gedächtnis und alle kognitiven Funktionen. So führt die Erkrankung zu einer schweren Demenz mit nach und nach zunehmender Invalidität und Pflegebedürftigkeit, ist jedoch nicht an sich lebensbedrohlich. Ausnahme sind seltene, durch die Krankheit verursachte Hirnblutungen. Die Patienten sterben fast immer an Sekundärkomplikationen wie zum Beispiel Pneumonien oder Lungenembolien.

1.1.2 Epidemiologie

In Deutschland leiden etwa 750000 Menschen unter der Alzheimer-Demenz, weltweit sind über 20 Millionen Menschen betroffen [1]. Unter den 60-65jährigen ist die Prävalenz mit ca. 1,2% noch gering, nimmt aber mit steigendem Alter rasant zu, bis unter den 85jährigen mehr als 20% Symptome der Erkrankung zeigen. Männer und Frauen sind in etwa gleich häufig betroffen. Die Alzheimer-Demenz ist damit die häufigste Demenzerkrankung weltweit und wird mit dem zunehmenden Älterwerden der Bevölkerung noch an Bedeutung gewinnen.

1.1.3 Genetik

Bei einer durchschnittlich angenommenen Lebenserwartung von 72 Jahren für Männer und 78 Jahren für Frauen liegt die Wahrscheinlichkeit bei ca. 5% irgendwann im Leben an Alzheimer-Demenz zu erkranken [1]. Der Großteil der Erkrankungen tritt sporadisch auf und ist somit eine multifaktorielle Erkrankung. Es existieren verschiedene Risikofaktoren, die für die Erkrankung prädisponieren.

Für Menschen mit einem an Alzheimer erkrankten nahen Verwandten steigt die Erkrankungswahrscheinlichkeit auf das bis zu Vierfache. Zugrunde liegend sind genetische Faktoren, die die Entstehung der Erkrankung begünstigen, jedoch nicht verursachen. Ein Beispiel ist das gehäufte Vorliegen von $\epsilon 4$ -Allelen bei Polymorphismus des Gens für das Apolipoprotein E (ApoE). ApoE erfüllt wichtige Funktionen im Lipidstoffwechsel, wird aber auch als Bestandteil von Amyloidablagerungen im Gehirn gefunden [2]. Es kommen die Allele $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und

$\epsilon 4$ vor, liegen jedoch ein oder zwei Allele $\epsilon 4$ vor, erhöht dies die Wahrscheinlichkeit an Alzheimer zu erkranken erheblich, da Apo $\epsilon 4$ die Aggregation von β -Amyloid fördert [3].

Auch ein Polymorphismus des Gens für $\alpha 2$ -Makroglobulin, ein vor allem im Plasma vorkommendes, multifunktionales Protein, geht aufgrund eines bisher nicht eindeutig geklärten Mechanismus mit einem erhöhten Alzheimerisiko einher [4]. Ebenso fanden sich in großen Genom-Studien bestimmte Genvarianten der Gene für Clusterin (Clu), für den Complement Receptor 1 (CR1) und PICALM eng mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert [5,6].

Außerdem erkranken Menschen mit einer Trisomie des Chromosoms 21 (Down Syndrom) - und damit einem dreifach vorliegenden Allel des auf dem Chromosom 21 liegenden Gens für das Alzheimer Vorläufer Protein (APP) – mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit bereits in der 4. und 5. Lebensdekade an Alzheimer.

Für einen geringen Prozentsatz der Erkrankungen (unter 2%) sind autosomal-dominant vererbte Formen, die so genannten familiären Alzheimer Erkrankungen (FAD), verantwortlich. Es handelt sich um Missense-Mutationen in den Genen für Presenilin 1 und 2 (PS1 auf Chromosom 14 und PS2 auf Chromosom 1) oder APP. Träger dieser Mutationen erkranken meist bereits deutlich früher als bei der sporadisch auftretenden Alzheimer-Erkrankung. Der Krankheitsbeginn liegt meist zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr, wobei die Erkrankung bei den APP-Mutationen im Schnitt etwas früher beginnt als bei den Presenilin-Mutationen [1]. Ansonsten sind in Ausprägung, klinischem Verlauf und Prognose keine wesentlichen Unterschiede bekannt.

1.1.4 Morphologie und Histopathologie

In früheren Stadien zeigen sich makroskopisch häufig keine Veränderungen, mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es jedoch zu einer ausgeprägten kortikalen Atrophie des Gehirns, die die gesamte Großhirnrinde betreffen kann [7].

Mikroskopisch findet sich die für den Morbus Alzheimer typische Trias aus neuritischen Plaques im Neuropil, Amyloidablagerungen in kortikalen und kleinen leptomeningealen Gefäßen und Alzheimer-Fibrillen-Bündeln, so genannten neurofibrillären „tangles“ [8].

Bei diesen neurofibrillären Bündeln handelt es sich um Zytoskelettaggregate im Perikaryon von Neuronen. Hauptbestandteil sind periodisch gedrehte Neurofilamente, die hauptsächlich aus übermäßig phosphoryliertem Tau-Protein bestehen. Sie kommen auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen vor, in geringer Zahl auch bei gesunden älteren Menschen.

Unabhängig davon treten neuritische Plaques auf, welche extrazelluläre Ablagerungen von β -Amyloid ($A\beta$) mit einem umgebenden Kranz aus degenerierten dystrophen Neuriten und Astrozytenfortsätzen darstellen. $A\beta$ liegt hauptsächlich in der an Aminosäure 42 endenden Form ($A\beta_{42}$) vor, begleitet von der regulär häufiger produzierten, nun aber in der Minderheit vorkommenden Form $A\beta_{40}$. $A\beta_{42}$ neigt wesentlich stärker zur Aggregation. Auch diese Plaques finden sich in geringer Zahl beim Gesunden und lassen sich mit Versilberungstechniken gut darstellen.

Zusätzlich zu den $A\beta$ -Ablagerungen in Form von Plaques zeigt sich eine mikrovaskuläre Angiopathie, die durch Amyloidablagerungen in der Basalmembran der Gefäße charakterisiert ist. Sie wird auch als kongophile Angiopathie bezeichnet. Amyloidablagerungen können Nekrosen der Gefäßwand hervorrufen, was zu den oben bereits beschriebenen Hirnblutungen führen kann [2,7].

1.1.5 Die Amyloidhypothese

Im Gehirn Alzheimerkranker können gehäuft $A\beta$ -Ablagerungen in Form von neuritischen Plaques festgestellt werden. Auch in der zerebrospinalen Flüssigkeit und im Plasma Gesunder ist $A\beta$ in kleinen Mengen nachweisbar. Die geringfügige Sekretion von $A\beta$ durch APP-exprimierende Zellen ist somit sicher auch Teil des physiologischen Metabolismus. Sowohl bei den FAD als auch bei

den sporadischen Alzheimerformen kommt es zur vermehrten Ablagerung von A β -Plaques, die vor allem A β 42 enthalten. FAD verursachende Genmutationen führen zu einer deutlichen Überproduktion von A β , vor allem der stärker aggregierenden Form A β 42.

Die Amyloidhypothese geht davon aus, dass diese Amyloidablagerungen über die Induktion einer Entzündungsreaktion und von möglicherweise noch anderen subtileren Effekten auf die Synapsen der umliegenden Neurone zu einer zunehmenden Nervenschädigung führen. Ein gestörtes intrazelluläres Ionenmilieu könnte zusammen mit oxidativen Schäden zu veränderten Enzymaktivitäten innerhalb der Nervenzellen sowie zu einer Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen mit Bildung von neurofibrillären „tangles“ führen und damit ursächlich für neuronale Fehlfunktionen oder gar für den Untergang von Neuronen sein. Neuronale Fehlfunktion und Tod von Nervenzellen korrelieren gut mit dem klinischen Bild einer fortschreitenden Demenz [9].

1.2 Molekularbiologische Grundlagen

1.2.1 APP und β -Amyloid

Das Alzheimer Vorläufer Protein (Amyloid precursor protein, APP) ist ein Typ1 Transmembranprotein mit einer langen, N-terminalen Extrazellulär- und einer kurzen, C-terminalen Intrazellulärdomäne. Als Typ1 bezeichnet man Transmembranproteine, die die Phospholipiddoppelschicht von Membranen einmal ganz durchqueren und deren N-Terminus dabei extrazellulär liegt. APP wird in vielen verschiedenen Zelltypen und in orthologen Formen bei fast allen Wirbeltieren exprimiert. Es existieren verschiedene Spleissisoformen, in Neuronen wird hauptsächlich die 695 Aminosäuren (AS) lange Form APP695 gebildet. Nach einem Maturierungs-Prozess in endoplasmatischem Retikulum (ER) und Golgi wird APP an die Plasmamembran (PM) transportiert. Dort durchläuft es den endosomalen Recycling Pathway – das bedeutet, APP wird in endozytotische Vesikel aufgenommen und danach erneut in die PM eingebaut

oder abgebaut [10]. Die postulierten physiologischen Funktionen von APP und seinen Spaltprodukten reichen von einer Beteiligung am axonalen Transport über eine Rolle in der Transkriptions-Kontrolle bis hin zu einer Funktion im Rahmen der Apoptose [11].

APP wird durch verschiedene Proteasen prozessiert, den Sekretasen. Im ersten Schritt wird APP entweder von der α - oder wahlweise von der β -Sekretase geschnitten, wobei die lange, wasserlösliche, extrazelluläre Domäne entfernt wird („ectodomain shedding“). Nach Schnitt durch die α -Sekretase verbleibt das 83 AS lange Transmembranprotein C83, welches im Anschluss von der γ -Sekretase in das P3-Peptid und die APP-intrazelluläre-C-terminale-Domäne (AICD) geschnitten wird. Nach Schnitt durch die β -Sekretase entsteht analog zu C83 C99, welches durch die γ -Sekretase ebenfalls in AICD und ein extrazelluläres Produkt geschnitten wird. Dieses extrazelluläre Produkt ist das Amyloid- β -Peptid ($A\beta$), welches in verschiedenen Formen vorkommt. Die beiden wichtigsten Formen sind $A\beta_{40}$ oder $A\beta_{42}$. Die extrazelluläre Aggregation von $A\beta$ führt zu den bekannten Alzheimer-Plaques [12,13].

Da α - und β -Sekretase um APP als Substrat konkurrieren, verhindert das Schneiden der α -Sekretase die Entstehung von $A\beta$ [15].

Der Schnitt von APP durch β - und γ -Sekretase mit Freisetzung von AICD ins Cytosol verläuft analog zum Schnitt des Notch-Rezeptorproteins. Notch ist ein bekanntes Substrat der γ -Sekretase. Das cytosolische Produkt NICD hat eine Signalfunktion inne, so dass auch für AICD eine Signalwirkung postuliert wurde [14].

Die verschiedenen Missense-Mutationen des APP-Gens auf Chromosom 21, eine Ursache familiärer Alzheimer-Erkrankungen, führen zu Veränderungen nahe der Schnittstellen der verschiedenen Proteasen und beeinflussen so die Prozessierung [2].

1.2.2 γ -Sekretase

Die γ -Sekretase gehört zur Familie der Aspartat-Proteasen und schneidet eine ganze Liste an Typ1-Membranproteinen, wie zum Beispiel das Notch-Rezeptorprotein oder APP, die beiden bekanntesten und am meisten studierten Substrate der γ -Sekretase.

Der aktive γ -Sekretase-Komplex besteht aus einem vierteiligen Herzstück: Den Proteinen Presenilin (PS), Nicastrin (Nct), Aph-1 und Pen-2 [16].

PS1 und PS2 sind 467AS- bzw. 448AS-lange homologe Membranproteine, in deren Genen allein über 150 zu FAD führende Mutationen bekannt sind. Die Transmembran-Topologie ist nicht unumstritten, Modelle mit 9 Transmembrandomänen (TMD) sind am weitesten verbreitet. Unabhängig von der genauen Topologie befindet sich die katalytisch aktive Stelle in den TMD 6 und 7. Damit stellt Presenilin die aktive Aspartat-Protease des γ -Sekretase-Komplexes dar. Nach Synthese durchlaufen PS1 und 2 einen endoproteolytischen Prozess, sodass im Anschluss N- und C-terminale PS-Fragmente vorliegen (PS-NTF und PS-CTF). Holoprotein, das nicht in den Komplex eingebaut wird, wird schnell denaturiert. PS im aktiven γ -Sekretase-Komplex besteht aus einem Heterodimer aus PS-CTF und PS-NTF. [15]

Nicastrin (Nct) dagegen, an den C-Terminus von PS gebunden, fungiert als Substrat-Rezeptor. Die große extrazelluläre Domäne von Nct bindet spezifisch an Substrat C99, das nach Schnitt von APP durch die β -Sekretase entsteht, nicht jedoch an ungeschnittenes APP [17].

Die Funktion von Aph-1 besteht in der Stabilisierung des PS Holoproteins und der Regulation des Zusammenbaus bzw. der Maturierung des γ -Sekretase-Komplexes. Pen-2 beeinflusst die PS-Endoproteolyse und reguliert somit auch die γ -Sekretase-Aktivität. Alle vier Komponenten sind notwendig und zusammen ausreichend für eine Funktion der Protease [18].

1.2.3 Das „Spatial Paradox“

Frühe Studien zeigten bereits, dass sich Presenilin in großen Mengen im ER und Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) findet, während sich γ -Sekretase-Aktivität vor allem an der Plasmamembran nachweisen lässt. Diese Diskrepanz wurde als „spatial paradox“ im Sinne einer nicht zusammenpassenden räumlichen Verteilung der γ -Sekretase-Komponenten und deren Wirkungsort bezeichnet [19]. In den folgenden Jahren wurden viele Arbeiten zur Lokalisation von γ -Sekretase, APP und Ort der A β -Produktion durchgeführt (siehe 1.3), jedoch mit kontroversen Ergebnissen.

1.3 Ansatz und Fragestellung dieser Arbeit

Die Produktion von A β wurde nach und nach in allen möglichen Zellkompartimenten des Sekretorischen Wegs vom ER [18,20,21], TGN [21,22] bis hin zu sekretorischen post-Golgi-Vesikeln [23], Endosomen [24-27], Lysosomen und Autophagosomen [28] und an der Plasma Membran [29-31] nachgewiesen. Andere Studien wiederum schlossen eine A β -Produktion im ER [32-34] und TGN [23] aus. Auch in Neuronen wurde eine A β -Produktion in axonalen Transportvesikeln kontrovers diskutiert [35,36]. Auf subzellulärer Ebene wurde auch das ER als Ort der AICD-Entstehung vermutet [37].

In einigen Fällen beruhen die Schlussfolgerungen der letzten Jahre auf Arbeiten an subzellulären Fraktionen, bei denen es aufgrund schlechter Trennung von Kompartimenten immer wieder leicht zu Kontaminationen kommen kann [38].

Zusammengefasst ist nach wie vor der Ort der A β -Entstehung in der Zelle nicht eindeutig geklärt, weshalb eine erneute Untersuchung zur intrazellulären Lokalisation des aktiven γ -Sekretase-Komplexes, und somit der A β -Produktion, Inhalt dieser Arbeit ist. Ziel war es, einen Reporter herzustellen, der es mit mikroskopischen Methoden erlaubt, γ -Sekretaseaktivität subzellulär zu lokalisieren und somit den Ort der A β -Entstehung genauer zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien und Transfektion

2.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

- HEK 293: Human Embryonic Kidney Cells
- HEK 293/ APP Swe: HEK 293 Zellen, die APP Swe stabil exprimieren, auch nur als Swe bezeichnet. APP Swe zeichnet sich durch eine K595N/M596L Doppelmutation in APP aus, die bei einer schwedischen Familie mit erblicher Alzheimer-Erkrankung (FAD) gefunden wurde. Hierdurch kommt es zu einer stark erhöhten A β -Produktion und damit vereinfachter biochemischer Nachweisbarkeit [39].
- NT2-D1: Linie humaner, pluripotenter Teratokarzinom-Zellen (ICLC, Genova)
- SH-SY5Y: Linie humaner, dopaminergischer Neuroblastomzellen (ICLC, Genova)

Alle Zelllinien wurden in DMEM high Glucose (PAA) mit 2mM L-Glutamin (Invitrogen) und 10% fetalem Kälberserum (FCS) (PAA) kultiviert. Zum Umsetzen wurde Trypsin (PAA) und zum Einfrieren ein Medium aus FCS und 10% DMSO (Roth) verwendet. Selektionsmedien wurden zusätzlich mit entsprechenden Antibiotika (Invitrogen) angereichert, z.B. Hygromycin 200 μ g/ml.

2.1.2 Transfektion

Sowohl stabile als auch transiente Transfektionen mit GFP-C99 wurden nach Anweisung des Herstellers mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) oder Fugene (Roche) durchgeführt. Die darin enthaltenen liposomalen Vesikel können mit der Plasmamembran (PM) der Empfängerzellen verschmelzen und dienen so

als Träger der zu transfizierenden DNA. Für transiente Transfektionen wurden die behandelten Zellen nach 24h weiterverwendet, für stabile Transfektionen einzelne Zellklone 24h nach Transfektion ausgewählt und in verschiedenen Verdünnungen in entsprechenden Selektionsmedien weiter kultiviert.

2.2 Konstrukte

2.2.1 Vektoren

- pEGFP-N1 (Clontech), enthält grün fluoreszierendes Protein (GFP), das eine einfache fluoreszenzmikroskopische Darstellung ermöglicht (Abbildung 22)
- mRFP-N1, Vektor mit rot fluoreszierendem Protein (RFP), analog zu GFP
- pCDNA3.1(+) Hygro (Invitrogen), enthält Resistenz-Sequenz gegen das Antibiotikum Hygromycin (Abbildung 23)
- pCDNA3.1(+) Zeo (Invitrogen), mit Zeomycin-Resistenz (Abbildung 24)
- pCR2.1 TOPO (Invitrogen), linearisiert vorliegender Vektor, der 3'Thymidinüberhänge an den Enden aufweist sowie kovalent gebundene Topoisomerase trägt und daher zur einfachen Ligation mit Produkten der Taq-Polymerase-PCR verwendet werden kann (Abbildung 25)

2.2.2 Verwendete fertige Konstrukte

2.2.2.1 SP-C99/Peak12

Die DNA-Sequenz SP-C99 stellt die letzten 100 Aminosäuren des C-terminalen APP-Endes dar. Sie enthält die gesamte A β -Sequenz, die Transmembran-Domänen (TMD) und zytosolischen Domänen des Transmembran-APP und die APP-Signalsequenz [40]. Zur Verfügung gestellt von S. Lichtenthaler.

2.2.2.2 Notch Δ E- Δ RAM Myc-tag

Dieses Konstrukt enthält das etwas modifizierte Protein Notch [41]. Notch ist ein Transmembranprotein, das analog zu APP ebenfalls von der γ -Sekretase in eine extrazelluläre Domäne und eine intrazelluläre C-terminale Domäne (NICD, analog zu AICD) geschnitten wird [42]. Zur vereinfachten Detektion wurde das Konstrukt am C-Terminus mit einem 6-fachen Myc-tag versehen. Zur Verfügung gestellt von R. Kopan.

2.2.2.3 VSVG3-GFP

VSVG3-GFP ist ein Fusionsprotein aus Vesicular-Stomatitis-Virus G-Protein mit der t045-Mutation und GFP, das bei einer Inkubation transfizierter Zellen bei 39,5°C nicht korrekt gefaltet werden kann und daher im ER verbleibt. Bei geringeren Temperaturen <31°C verläuft die Prozessierung korrekt und VSVG3-GFP wird normal über den Golgi-Apparat an die PM transportiert [43]. Zur Verfügung gestellt von J. White.

2.2.2.4 Dynamin K44A HA-tag

Dynamin K44A HA-tag ist eine Mutation der Dynamin-GTPase, die transient transfiziert spezifisch die Endozytose an der PM blockiert, ohne den Transport innerhalb der Zelle (z.B. von ER zum Golgi) zu stören [44]. Zur vereinfachten Nachweisbarkeit ist ein HA-tag angefügt. Zur Verfügung gestellt von S. Schobel. Wir benutzten dieses Konstrukt zur transienten (Co-)Transfektion verschiedener Zelllinien.

2.2.3 Eigene Konstrukte

2.2.3.1 SP-C99-pcDNA3.1(+) Hygro

1. Ausschneiden der Sequenz C99 aus SP-C99/PEAK 12 mittels der Schnittstellen HindIII/NotI
2. Umklonierung in pcDNA3.1(+) Hygro mit HindIII/NotI

Erfolgreiche Transfektion von HEK 293 Zellen mit stabiler Expressierung.

2.2.3.2 FlasH-C99 -pcDNA3.1(+) Hygro

1. Klonierung von C99 mittels PCR aus SP-C99/Peak12 mit den passenden Primern FlasH-F und C99-Stop-R
2. Klonierung eines Stückes von Vektor pcDNA3.1(+) Hygro mit den Primern pcDNA3.1(+)-F und FlasH-R
3. Erneute PCR der Produkte aus 1.) und 2.) mit den Primern pcDNA3.1(+)-F und C99-R und damit Einfügen einer Tetracystein-Sequenz (C4) für die Lumio® Technik (über die Primer FlasH-F und -R kodiert) an den N-Terminus der C99-Sequenz
4. Nach Subklonierung in pCR2.1 TOPO Umklonierung mittels der Schnittstellen HindIII/NotI in Vektor pcDNA3.1(+) Hygro, die nachfolgende Sequenzierung zeigte eine korrekte Nukleotid-Folge

Erfolgreiche Transfektion mit stabiler Expressierung in HEK 293 Zellen.

2.2.3.3 C99-pEGFP-N1

1. Klonierung von C99 mittels PCR mit den Primern C99-F und C99-R aus SP-C99/Peak12 und damit Einfügen der endständigen Schnittstelle Sall
2. Subklonierung in TOPO, Ausschneiden mit Hilfe der Schnittstellen HindIII/Sall, dann Klonierung mit HindIII/Sall in Vektor pEGFP-N1

2.2.3.4 C99-EGFP-pcDNA3.1(+) Hygro

1. Ausschneiden von C99-GFP aus dem Konstrukt C99-pEGFP-N1 an den Schnittstellen HindIII/NotI
2. Umklonierung mit HindIII/NotI in Vektor pcDNA3.1(+) Hygro, anschließende Sequenzierung korrekt

Stabile Expressierung in HEK 293 und NT2-Zellen erfolgreich.

2.2.3.5 SP-C99-RFP-pcDNA3.1(+) Zeo

1. Ausschneiden der Sequenz C99 aus C99-EGFP-pcDNA3.1(+) Hygro mittels der Restriktionsenzyme HindIII/BamHI

2. Umklonierung in Vektor mRFP-N1 mittels HindIII/BamHI
3. Ausschneiden von C99-mRFP aus 2.) mit HindIII/EcoRI
4. Umklonierung von C99-mRFP in Vektor pcDNA3.1(+) Zeomycin mittels HindIII/EcoRI, anschließende Sequenzierung korrekt

C99-mRFP konnte erfolgreich in HEK 293 Zellen transfiziert und stabil exprimiert werden.

2.2.4 Liste der stabil transfizierten Zelllinien

- Notch Δ E: HEK 293 Zellen mit Notch Δ E- Δ RAM Myc-tag
- VSVG-GFP: HEK 293 Zellen mit VSVG3-GFP
- C99: HEK 293 Zellen mit SP-C99-pcDNA3.1(+) Hygro (Hygromycinresistenz)
- F-C99 bzw. C4-C99: HEK 293 Zellen mit FlasH-C99 -pcDNA3.1(+) Hygro (Hygromycinresistenz)
- C99-GFP: HEK 293 Zellen mit C99-EGFP-pcDNA3.1(+) Hygro (Hygromycinresistenz)
- NT2-C99-GFP: Linie NT2-Zellen mit C99-EGFP-pcDNA3.1(+) Hygro (Hygromycinresistenz)
- C99-mRFP: HEK 293 Zellen mit SP-C99-RFP-pcDNA3.1(+) Zeo. Es konnte eine erfolgreiche Transfektion sowie eine stabile Expression erreicht werden, jedoch zeigten alle Klone, auch nach mehrfachen Klonierungs-, Transfektions- und Selektionierungsversuchen (Resistenz gegen Zeomycin), eine starke Überexprimierung von C99-RFP mit ausgeprägter Akkumulation von C99-RFP. Auch Zellklone mit geringerer Expression zeigten weder fluoreszenzmikroskopisch noch in proteinbiochemischen Untersuchungen eine typische Proteinprozessierung.

2.2.5 Primer

- Flash-R: 5'-GCAACCGGGACAACAGTCCCATTCTGCATCCTCCAGCGCCCG-3'
- Flash-F: 5'-GACTGTTGTCCCGTTGCTGTAAACATCATCAAAAA TTGGTGTTTC-3'

- C99- F: 5'-AAGCTTCCACCATGCTGCCCC-3'
- C99- R: 5'-GTCGACGCGTTCTGCATCTGCTC-3'
- pcDNA3.1(+)-F: 5'-GATTTCCAAGTCTCCACC-3'
- C99-Stop-R: 5'-GCGGCCGCTTAGTTCTGC-3'

2.2.6 PCR

Durchführung der Polymerase Chain Reaction (PCR) nach Standardprotokollen bzw. Herstellerangaben des PCR-Kits mit Hilfe der PCR Maschine Master Cycler Gradient (Eppendorf). Die verwendeten Primer wurden bei Invitrogen bzw. Metabion bestellt, als Reaktionsenzym diente eine Taq-DNA Polymerase mit dazugehörigem Puffer (PEQ Lab), ein dNTP Mix (Invitrogen) wurde zugesetzt. Einige wenige PCRs wurden entsprechend mit PWO statt mit Taq-Polymerase durchgeführt.

2.2.7 Klonierungen

Subklonierungen in pCR2.1-TOPO nach Herstelleranweisung des TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Hierbei können mit Hilfe der Taq-Polymerase hergestellte PCR-Produkte direkt mit dem pCR2.1-TOPO-Vektor, der kovalent gebundene Topoisomerase an beiden Enden trägt, ligiert werden.

Bei mit PWO hergestellten PCR-Produkten müssen vor Ligation in pCR2.1 TOPO 3' Desoxyadenosin-Überhänge mit Hilfe einer ca. 8minütigen Inkubation bei 72°C mit Taq-Polymerase und dNTP angefügt werden.

2.2.8 Gelelektrophorese

Gemäß Standardprotokollen [45] wurden die DNA-Moleküle gelelektrophoretisch in 1% Agarosegel der Größe nach aufgetrennt, dabei mit Ethidiumbromid gefärbt, die entsprechenden DNA-Banden (als Größenstandard

diente 1kb DNA Ladder) ausgeschnitten und mit Hilfe eines handelsüblichen Extract-Kits nach Herstellerangaben extrahiert.

2.2.9 Restriktion und Ligation

Zur Durchführung von Restriktionsverdau wurden die entsprechenden Restriktionsenzyme (z.B. HindIII, Sall, NotI) mit dem je nach Kombination der Enzyme passenden Puffer verwendet. Vorher wurden die (Vektor-) DNA-Konzentrationen photometrisch bestimmt, um eine gute Abstimmung von DNA- und Enzymmenge zu gewährleisten.

Nach dem Verdau wurden die Produkte auf Agarosegel der Größe nach aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. Daraufhin erfolgte die Ligation der Produkte des Restriktionsverdau mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche).

Alle Schritte wurden nach Standardverfahren [45] durchgeführt.

2.2.10 Transformation

Die bei der Ligation entstandene Vektor-DNA wurde in einen kompetenten E.coli-Stamm transformiert, dieser dann über Nacht auf entsprechenden Selektions-Nährböden (mit 50µg/ml Kanamycin bzw. 100µg/ml Ampicillin, beide von Sigma) kultiviert und dann resistente, also mit dem gewünschten Vektor transformierte Klone, selektioniert und erneut über Nacht in Selektions-Flüssigmedium vermehrt (je nach gewünschter Menge als „Mini-Prep“ 5ml oder „Maxi-Prep“ 200ml). Im nächsten Schritt konnten mit entsprechenden Plasmid Extract Kits die gewünschten Plasmide (Vektoren) präpariert werden.

Zur Kontrolle wurde jeweils eine kleine Menge der gewonnenen Plasmide erneut einem Restriktionsverdau unterzogen und die geschnittene DNA gelelektrophoretisch auf passende Größe der Schnittstücke hin untersucht. Korrekt erscheinende Klone wurden dann transient in HEK293 bzw. Swe Zellen

transfiziert, um diese dann auf die gewünschte Gen-Expression hin untersuchen zu können.

Bei Klonen, bei denen die Gen-Expression nach transienter Transfizierung quantitativ und qualitativ geeignet erschien, wurde zusätzlich eine Gensequenzierung zum Ausschluss von Mutationen oder Rasterverschiebungen durchgeführt.

2.3 Antikörper

2.3.1 Primäre Antikörper

Folgende primäre Antikörper (AK) wurden, unterschiedlich in Blocklösung verdünnt, zur Immunfluoreszenz (IF) bzw. zum Blotten verwendet:

- AK 6687: bindet an den C-Terminus von APP [52], IF/Blot 1:100
- AK 6E10 (Sigma): monoklonaler Antikörper, der A β erkennt [46], Blot 1:1000
- AK 5313: polyklonaler Antikörper gegen die APP Ektodomäne [47], Blot
- AK anti-GFP (Clonotech): monoklonaler Antikörper, der zur Detektion von GFP (bzw. C99-GFP in Western Blots) dient, Blot 1:500
- AK EEA1 (Sigma-Aldrich): monoklonaler Antikörper zur Markierung früher Endosomen und Lysosomen, IF 1:500
- AK lamp 1 (clone H4A4, Developmental Hybridoma Bank, Univ. of Iowa): monoklonaler Antikörper, bindet an das in späten Endosomen bzw. Lysosomen enthaltene Protein lamp1, IF 1:100
- AK lamp 2 (clone H4B4, Developmental Hybridoma Bank, Univ. of Iowa): wie lamp1, IF 1:100
- AK Giantin (Santa Cruz Biotechnology): Markierung des Golgi-Apparates, IF 1:100

- AK 9E10 (Santa Cruz Biotechnology): monoklonaler Antikörper zur Erkennung von Myc-tags, Blot 1:500
- AK HA-7 (Sigma-Aldrich): monoklonaler Antikörper zur Markierung von HA-tags, IF 1:500
- AK NCT (Sigma): polyklonaler Antikörper, der an Nicastrin bindet, Blot 1:2000
- AK anti-VSV-G (Santa Cruz Biotechnology): monoklonaler Antikörper gegen VSV, IF 1:500

2.3.2 Sekundäre Antikörper

Als sekundäre Antikörper bei der Immunfluoreszenz dienten Anti-Mouse bzw. Anti-Rabbit Antikörper in einer Verdünnung von 1:500, die mit rot bzw. grün fluoreszierendem Farbstoff versehen waren:

- Alexa Flour 488 bzw. 555 goat anti-Mouse IgG (Molecular Probes)
- Alexa Flour 555 bzw. 594 goat anti-Rabbit IgG (Molecular Probes)

Zum Blotten wurden an HRP gekoppelte anti-Mouse bzw. anti-Rabbit IgG AK (Promega) als sekundäre Antikörper verwendet.

Beim Endocytose-Essay wurde Alexa Fluor 568 conjugate (Molecular Probes) benutzt.

2.4 Mikroskopie und Herstellung der Präparate zur Immunfluoreszenz

Fixierung der Zellpräparate und Durchführung der Immunfluoreszenz (IF)-Markierungen erfolgte nach Standard-Protokoll [48], als primäre bzw. sekundäre AK wurden die unter 2.3 aufgeführten Antikörper verwendet.

Zur Auswertung und Fotografie der Präparate benutzten wir ein mit einem 63x1,4NA Objektiv ausgestattetes konfokales Zeiss Mikroskop LSM 510 Meta

(Carl Zeiss, Jena). Die entstandenen Bilder wurden zum Teil mit Photoshop 7.0 nachbearbeitet. Einige Bildpaare werden sowohl in unterschiedlich nachbearbeiteten Versionen, als auch in einer Version, in der die primären Bildeinstellungen und die Nachbearbeitung zum besseren Vergleich identisch sind, gezeigt.

2.5 Lumio Technik

Die Lumio Technik beruht darauf, dass Flash (= Lumio-Reagenz, Invitrogen), ein primär nicht fluoreszierendes Biarsen-Fluoreszin-Derivat, sich an eine (an- oder eingefügte) Tetracystein-Sequenz (C4) eines Proteins bindet und damit einen rot bzw. grün fluoreszierenden Komplex bildet [53]. Dieser fluoreszierende Komplex bietet damit sowohl die Möglichkeit eines einfachen, fluoreszenzmikroskopischen Nachweises entsprechend fluoreszenzmarkierter Proteine in lebenden Säugetierzellen als auch einer unkomplizierten quantitativen Proteinmengenbestimmung in vitro.

Wir fügten mit eigens angefertigten Primern die C4-Sequenz in den N-terminalen Anteil von C99 (vergleiche Kapitel 2.2.3.2) ein. Mit diesem Konstrukt konnte eine nachweislich stabil exprimierende Zelllinie erstellt werden.

Nach Anweisung des Herstellers (Invitrogen) wurden in abgedunkelter Umgebung verschiedene Konzentrationen des Lumio Reagenz (die vom Hersteller angegebene Verdünnung 1:800 entspricht 2,5µM Lumio Reagenz in Optimum, wir versuchten zusätzlich Verdünnungen von 1:100 bis 1:2000) bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (wir modifizierten die Empfehlung von 30min und probierten Inkubationszeiten von 10-90min) verwendet. Auch das nachfolgend anzuwendende Reagenz Dispers Blue (empfohlene Konzentration 20µM entspricht einer Verdünnung von 1:1000 in Optimum) wurde in verschiedenen Verdünnungen 1:200–1:5000 verwendet.

2.6 Spezifische Hemmung der γ - und α - Sekretase

APP wird in mehreren Schritten von den Enzymen α -, β - und γ -Sekretase geschnitten, das verwendete Substrat C99 entspricht im Wesentlichen dem APP-Rest (also die C-terminalen 99AS), der nach Schnitt durch die β -Sekretase übrig bleibt. Daher sind für diese Arbeit vor allem die γ -Sekretase, geringfügig auch die α -Sekretase, und ihre spezifischen Inhibitoren interessant.

2.6.1 Hemmung der γ -Sekretase mit DAPT

Eine konzentrationsabhängige, reversible Inhibition der γ -Sekretase kann mit DAPT (N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine-t-butylester) erreicht werden [49].

Wir fügten DAPT (Elan Pharmaceuticals Inc.) dem normalen Kulturmedium in einer Endkonzentration von 100nM zu und inkubierten 2-12h, danach erfolgte ein Waschgang mit Kulturmedium.

Stock-Lösung: DAPT 1mM in DMSO

2.6.2 Hemmung der α -Sekretase mit TAPI

Der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha-Protease-Inhibitor (TAPI) ist ein Metaloprotease-Inhibitor, der auch die Aktivität der α -Sekretase hemmt, und dadurch die Entstehung von Schnittprodukten der α -Sekretase verhindert [50].

Wir setzten TAPI in einer Konzentration von 2 μ M in Kulturmedium und einer Wirkzeit von mindestens 4h ein.

Stock-Lösung: TAPI 1mM in DMSO

2.7 Untersuchung der einzelnen Abschnitte des Sekretorischen Wegs

Um die Bildung von A β CD und β -Amyloid aus APP und damit die Aktivität der γ -Sekretase in den verschiedenen Kompartimenten des Sekretorischen Wegs zu untersuchen, wurde mit den im Folgenden beschriebenen Methoden in die normalen Stoffwechseltransportwege der Zelle eingegriffen.

2.7.1 Brefeldin A (BFA)

Behandlung von Zellen mit BFA führt zu einer Fusion von Endoplasmatischem Retikulum (ER) und Golgi-Apparat, wobei der anterograde Export von Proteinen inhibiert wird, während gleichzeitig ein retrograder Transport möglich bleibt [51].

Wir verwendeten BFA (Sigma-Aldrich) in einer Lösung von 10 μ g/ml in normalem Kulturmedium und mit einer Inkubationszeit von 2-4h. Danach wurden die Zellen standardmäßig fixiert bzw. zur IF weiterverwendet. Für den γ -Sekretase-Assay wurde bei gleicher Konzentration 24h inkubiert.

Stock-Lösung: BFA 10mg/ml in DMSO.

2.7.2 Monensin

Eine Inkubation von Zellen mit Monensin führt zu einer Blockade des Transportes von Proteinen im Golgi-Apparat [52].

Wir inkubierten unsere Zellen 2-4h mit einer Konzentration von 5 μ M Monensin (Sigma-Aldrich) in Optimem und 1%FCS, bzw. normalem Kulturmedium, danach wurden sie nach Standardverfahren zur IF weiterbehandelt. Eine Inkubationszeit von 24h bei einer Konzentration 5mM wurde für die Verwendung von Monensin beim γ -Sekretase-Assay benötigt.

Stock-Lösung: Monensin 10mM in Ethanol

2.7.3 Tanninsäure (TA)

Tanninsäure (TA) verhindert die Exozytose von sekretorischen Vesikeln an der Plasmamembran (PM) und damit den Transport des Inhaltes dieser Vesikel an die Zelloberfläche [54].

Wir behandelten unsere Zellen im Versuch 1-2h mit einer stets frisch zubereiteten Lösung von TA 0,5%-1% in Kulturmedium ohne FCS oder in PBS (pH7.4 + Ca, Mg). Danach wuschen wir 2x mit PBS (pH7.4) bzw. Kulturmedium, bevor die behandelten Zellen standardmäßig weiter verarbeitet werden konnten.

2.8 20°C Block

Eine Aufbewahrung der Zellen für eine gewisse Zeit bei 20°C führt zu einer vorübergehenden Hemmung des Exports aus dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), wobei die Glykosilierung von Proteinen nicht gestört wird [55].

Eine Blockierung des TGN-Exportes wurde mittels Inkubation über 2h in einem 20°C warmen Wasserbad, platziert in einem auf 4°C-temperierten Raum, in Hepes-gepuffertem Kulturmedium erreicht.

2.9 Transferrin-Aufnahme-Experiment

Nach Inkubation von Zellen in Serum-freiem Medium kann man anschließend eine verstärkte Aufnahme von Transferrin über frühe Endosome beobachten. Diesen Effekt kann man nutzen, um frühe Endosome mit Hilfe von Fluoreszenz-markiertem Transferrin sichtbar zu machen.

Im Versuch wurden die Zellen 30min lang in Serum-freiem Medium ausgehungert (Starving) und danach Alexa 568-konjugiertem Transferrin (Molecular Probes) in einer Konzentration von 25µl/ml in Zellkulturmedium ausgesetzt, woraufhin nach 5-30min die Fixierung erfolgte.

2.10 Pulse-Chase-Analyse

In der Pulse-Chase-Analyse können neu gebildete Proteine markiert und ihr Weg durch den Stoffwechsel der Zelle weiter verfolgt werden.

Hierfür müssen die zu untersuchenden Zellen zuerst „ausgehungert“ werden, das heißt, es erfolgt eine Präinkubation für 30min in Methionin- und Cystein-freiem Medium (Starving). In unserem Fall wurden HEK 293/APP Swe Zellen anschließend über 15min der radioaktiv markierten Aminosäure [(35)S]-Methionin ausgesetzt (Pulse) [56]. Auf diese Weise wurden alle in dieser Zeit neu synthetisierten Proteine markiert. Nachfolgend wurden die Zellen über 1,5-4h in Kulturmedium mit einem Überschuss an Methionin und Cystein gehalten (Chase), so dass nachfolgend produzierte Proteine keine radioaktive Markierung mehr aufwiesen. So konnte eine bestimmte, in diesen 15min synthetisierte Menge an Proteinen (und damit auch das in dieser Zeit produzierte APP), singulär untersucht werden. Zusätzlich wurde einigen Ansätzen TA bzw. BFA zugesetzt, um den Einfluss dieser Chemikalien darstellen zu können. Nach 1,5-4h wurden Zelllysate und gesammeltes Medium mit Hilfe der Antikörper 5313 (Zelllysate) und 6687 (Medium) immunpräzipitiert und die ausgefällten Proteine mit Phosphoimaging sichtbar gemacht.

2.11 In vitro γ -Sekretase-Assay

Beim in vitro γ -Sekretase-Assay kann die Bildung von Schnittprodukten der γ -Sekretase in vitro unter verschiedenen Bedingungen nachvollzogen werden.

Wir führten den in vitro γ -Sekretase-Assay mit rekombinantem C99-His₆ leicht modifiziert (CHAPSO-lysierte Membranen von HEK293 Zellen wurden direkt ohne vorherige Immunpräzipitation (IP) der γ -Sekretase verwendet) nach Standardprotokoll durch [57]. In einigen Versuchsreihen wurden dem Reaktions-Mix BFA 10 μ g/ml bzw. Monensin 5nM zugefügt und 24h bei 37°C (Kontrollreihe bei 0°C) inkubiert.

Reaktions-Mix für in vitro γ -Sekretase-Assay: 150mM NaCitrat pH6.4, 0,25%CHAPSO, 0,5mg/ml Phosphatidylcholin, 10mM DTT, 0,1mg/ml BSA, 1 μ l C99-His, PI-Mix complete

2.12 Proteinbiochemische Verfahren

2.12.1 Proteinextrakte

Zur Herstellung eines Gesamtproteinextraktes verwendeten wir STEN-Lysispuffer, der nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS (pH7.4) aufgetragen wurde. Dann wurden die Zellen abgeschabt und 30min auf Eis inkubiert, zentrifugiert und danach der proteinhaltige Überstand (STEN-Lysat) zur weiteren Verwendung mit einer Pipette abgezogen.

Für Membranproteinextrakte wurde CHAPSO-Lysis-Puffer benutzt. Nachdem Zellpellets mit Hilfe von PBS (pH7.4) hergestellt worden waren, wurden diese mit Hypotonpuffer resuspendiert und auf Eis für 10min inkubiert. Nach Homogenisation mittels mehrfachem Aufziehen in eine Spritze und erneutem Abzentrifugieren wurde der proteinhaltige Überstand 1h ultrazentrifugiert, das neu entstandene Pellet in CHAPSO-Lysis-Puffer gelöst, erneut 1h auf Eis inkubiert und nochmals 1h ultrazentrifugiert, bevor das dabei als Überstand entstandene CHAPSO-Lysat weiterverwendet werden konnte.

2.12.2 Immunpräzipitation

Um mit Proteinen aus entsprechenden Lysaten eine Immunpräzipitation durchzuführen, wurden diesen zuerst die entsprechenden Antikörper zugesetzt, dann die AK-Lysat-Mischung für mind. 2h (bis 12h) bei 4°C geschüttelt, woraufhin Protein-G-Sepharose-Lösung (bei monoklonalem AK) bzw. Protein-A-Sepharose-Lösung (bei polyklonalem AK) zugegeben und erneut 2h geschüttelt wurde. Das abzentrifugierte Pellet wurde nochmals mit Waschpuffer (STEN-Lysate nacheinander mit STEN-NaCl, STEN-SDS und STEN-Puffer; CHAPSO-Lysate 4x mit CHAPSO-Puffer) gewaschen und dann mit zweifach

Laemmli Puffer versehen und bei 95°C 10min inkubiert. Im letzten Schritt wurde eine elektrophoretische Auftrennung mittels Polyacrylamidgel durchgeführt.

2.12.3 Western Blot und Proteinnachweis

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach Inkubation mit Laemmli Puffer für 10min bei 95°C mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Standardprotokoll [45] mit Tris-Glycin-SDS-Puffer über 60-90min bei 130V. Für sehr kleine Proteine verwendeten wir 10-20%ige Tris-Tricine-Gele mit Tris-Tricine-SDS-Puffer. Es wurde jeweils ein passender Größenstandard mit aufgetragen.

Nach Auftrennung der Proteine in der Gelelektrophorese erfolgte ein Western Blot mit Tris-Glycin-Puffer über 60min bei 400mA nach Standardprotokoll [58].

Nach dem Blotten der Proteine auf Membranen wurde erst ein Block der Membranen mit I-Block-Lösung durchgeführt, bevor mit den entsprechenden primären Antikörpern für ca. 2h inkubiert werden konnte. Danach erfolgten mehrere Waschgänge mit TBS und eine Inkubation von 1h mit sekundären, HRP-gekoppelten anti-Mouse-AK bzw. anti-Rabbit-AK, der erneute Waschgänge folgten.

Die von den HRP-gekoppelten, sekundären AK über die primären AK erkannten Proteinbanden konnten dann mit Hilfe der Enhanced Chemoluminescence Technik (ECT) nach Herstelleranweisung sichtbar gemacht bzw. fotografiert werden. Danach wurden die Filme (Fuji) entwickelt, eingescannt und die Bilder ggf. mit Photoshop 7.0 nachbearbeitet.

2.13 Liste verwendeter Lösungen und Puffer

- Ammoniumchloridlösung: PBS pH7.4, 50mM NH₄CL
- Blocklösung: PBS pH7.4, 1% FCS, 1% BSA, 0,1%Fischgelantine
- I-Block-Lösung: PBS pH7.4, 0,5g/l I-Block, 0,1% Tween

- CHAPSO-Lysis-Puffer: 150mM NaCitrat pH6.4, 2% CHAPS, 1:500 verdünnter PI-Mix
- CHAPSO-Puffer: 150mM NaCitrat pH6.4, 2% CHAPS
- Fixierungslösung: PBS pH7.4, 4% Paraformaldehyd, 4% Saccharose
- Hypotonpuffer: 10mM Tris, 1mM EDTA, 1mM EGTA
- Laemmli-Puffer: 50mM Tris, 20%Glycerol, 10% Mercaptoethanol, 4% SDS, pH7.2
- Moviollösung: 15% Moviol, 50mg/ml DABCO
- PBS pH7.4: 140mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,75mM KH₂PO₄, pH Einstellung mit HCL
- PBS pH7.4 + Ca, Mg: PBS pH7.4, 1mM CaCl₂, 0,5mM MgCl₂
- STEN-Lysis-Puffer: 50mM Tris pH7.6, 150mM NaCl, 20mM EDTA, 1% NP-40 (USB), 1:500 verdünnter Protease-Inhibitor-Mix (PI) (Sigma)
- STEN-Puffer: 0,05M Tris pH7.6, 20mM EDTA, 0,2% NP-40, 0,15M NaCl
- STEN-NaCl-Puffer: 0,05M Tris pH7.6, 20mM EDTA, 0,2% NP-40, 0,5M NaCl
- STEN-SDS-Puffer: 0,05M Tris pH7.6, 20mM EDTA, 0,2% NP-40, 0,15M NaCl, 0,1% SDS
- TBS: 25mM Tris pH7.6, 140mM NaCl, 2,7mM KCl
- Tris-Glycin-Puffer: 25mM Tris, 0,2M Glycin, H₂O
- Tris-Glycin-SDS-Puffer: 25mM Tris, 0,2M Glycin, 0,01% SDS, H₂O
- Tris-Tricine-SDS-Puffer: 0,1M Tris, 0,1M Tricine, 3mM SDS

3 Ergebnisse

3.1 Konstrukt C99-GFP ist ein Reporter für γ -Sekretase-Aktivität

Ein Ziel dieser Dissertation war in vivo darzustellen, in welchem Kompartiment APP durch die γ -Sekretase geschnitten wird und somit β -Amyloid und AICD gebildet werden. Hierzu wurde ein Konstrukt benötigt, das aufgrund seiner Zusammensetzung und Größe als Substrat für die γ -Sekretase geeignet sein würde. Außerdem erschien eine einfache in-vitro-Nachweisbarkeit für biochemische Kontrolluntersuchungen sinnvoll.

Hierfür wählten wir folgenden Ansatz:

Zunächst wurde das Konstrukt C99 ausgewählt, da es ein bekanntes direktes Substrat der γ -Sekretase ist und die gleichen Schnittstellen enthält wie APP, weshalb von einer gleichartigen Prozessierung ausgegangen werden kann. C99 enthält die gesamte A β -Sequenz, die transmembranösen und zytosolischen Domänen des Transmembran-APP und die APP-Signalsequenz. Bei identischen C-Termini von APP und dem Konstrukt C99 ist ein vergleichbares Trafficking anzunehmen. Als Template verwendeten wir SP-C99 (siehe Kapitel 2.2.2.1, [40]), hieraus erfolgte eine Klonierung in pcDNA3.1(+) Hygro sowie eine stabile Expressierung in HEK 293 Zellen. Zur Visualisierung fügten wir ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) an den C-Terminus an, indem wir aus dem Template SP-C99 zunächst in den Vektor pEGFP-N1 klonierten und das Konstrukt C99-GFP anschließend in pcDNA3.1(+) Hygro umklonierten. Auch hier erfolgte die stabile Expression in HEK 293 Zellen.

Bei Konstrukt C99-GFP wird nun nach Schnitt durch die γ -Sekretase A β in den Extrazellulärraum und fluoreszierendes AICD-GFP ins Zytoplasma entlassen (Abbildung 1).

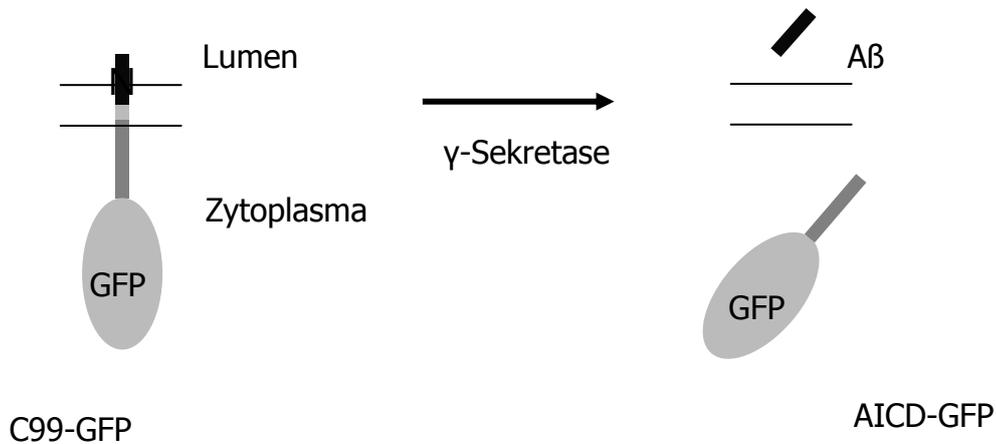


Abbildung 1: Schnitt von C99-GFP durch die γ -Sekretase

Der Versuch - analog zu C99-GFP - eine HEK293-Zellreihe mit C99-mRFP (siehe auch Kapitel 2.2.3.5), einem rot fluoreszierendem Protein, zu installieren schlug fehl. C99-mRFP ließ sich zwar zunächst gut stabil exprimieren, zeigte aber eine ausgeprägte Aggregationsneigung, so dass das Konstrukt für weitere Untersuchungen ungeeignet erschien.

Zusätzlich wurde versucht auch den N-terminalen Anteil von C99 direkt visuell zu markieren. Da das Anfügen eines zusätzlichen fluoreszierenden Proteins an den N-Terminus von C99 die Prozessierung durch die γ -Sekretase beeinflusst, entschieden wir uns für die Verwendung der Lumio Technologie (siehe Kapitel 2.5). Hierfür wurde mit speziellen Primern eine Tetracystein-Sequenz in C99 (C4-C99) eingefügt, die in Verbindung mit einem Biarsen-Fluoreszin-Derivat, genannt FlasH, einen fluoreszierenden Komplex bildet. In multiplen Versuchsreihen mit nachweisbar stabil exprimiertem C4-C99 (Sequenzierung korrekt) wurde vergeblich versucht, mit rot-fluoreszierendem „FlasH“ in lebenden HEK 293 Zellen spezifische Fluoreszenz mit der Lumio-Technik nachzuweisen. So musste von einer weiteren Verfolgung dieses Ansatzes mit dem Ziel einer visuellen Doppelmarkierung von C99 – GFP am C-terminalen und rot fluoreszierenden FlasH am N-terminalen Ende - abgesehen werden.

3.1.1 Korrekte Prozessierung von C99-GFP

Um die Eignung von C99-GFP als γ -Sekretase-Reporter zu untersuchen, inkubierten wir stabil transfizierte HEK C99-GFP Zellen über Nacht mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT [49]. Zum Vergleich führten wir die selben Schritte mit HEK C99-GFP Zellen ohne Inkubation mit DAPT durch. Nach Lysierung markierten wir GFP mit AK GFP. Nach Auftrennen der Lysate konnten mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterschiedliche Banden detektiert werden (Abbildung 2). Die erste und größte Bande, die sich sowohl mit als auch ohne Inkubation mit DAPT darstellte, entspricht am ehesten C99-GFP. Die nächst kleinere Bande, die sich nur nach Inhibition der γ -Sekretase nachweisen ließ, würde der Größe nach zu alternativ gebildetem C83-GFP passen. Die dritte Bande fand sich nur in Abwesenheit von DAPT und ist daher AICD-GFP zuzuordnen. Die weiteren kleineren Banden entsprechen vermutlich Abbauprodukten, da AICD nur über eine kurze Halbwertszeit verfügt.

Zur Überprüfung unserer Annahmen wurden Zelllysate wie bereits beschrieben aufgetrennt und Western Blots mit AK 6687 (markiert den APP C-Terminus) und AK 6E10 (erkennt A β) statt mit AK GFP durchgeführt. Eine zusätzliche Versuchsreihe wurde außer mit DAPT auch noch mit TAPI [50], einem Inhibitor der α -Sekretase, inkubiert und anschließend analog zu den anderen lysiert, mit AK 6687 bzw. AK 6E10 markiert und geblottet (Abbildung 3). Die oberste Bande konnte in allen Lysaten und mit allen AK nachgewiesen werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich wie angenommen um C99-GFP handelt. Auch die vermutete C83-GFP-Bande ließ sich in diesem Aufbau bestätigen, da ein Nachweis dieser Bande nur mit AK 6687 und nicht mit AK 6E10 erfolgen konnte. Außerdem konnte bei zusätzlicher Inhibition der α -Sekretase mit TAPI keine entsprechende Bande detektiert werden. Die im ersten Versuchsaufbau gefundene AICD-GFP-Bande konnte erwartungsgemäß mit AK 6687 und AK GFP, nicht jedoch mit AK 6E10, nachgewiesen werden. Passend zu den AK-Nachweisen zeigte sich nach Inkubation der Zellen mit DAPT über Nacht eine entsprechende Verminderung von AICD-GFP, was auf die γ -Sekretase-abhängige Bildung von AICD-GFP zurückzuführen ist. Außerdem fand sich eine

Produktion von C83-GFP aus sich ansammelndem C99-GFP ohne wesentliche Akkumulation von C99-GFP (Abbildung 2). Dies lässt vermuten, dass C99-GFP bei Inhibition der γ -Sekretase vermehrt durch die α -Sekretase geschnitten wird. Eine gleichzeitige Inhibition von γ - und α -Sekretase durch DAPT und TAPI führt zu einer deutlichen Akkumulation von C99-GFP ohne Bildung von C83-GFP oder AICD-GFP (Abbildung 3).

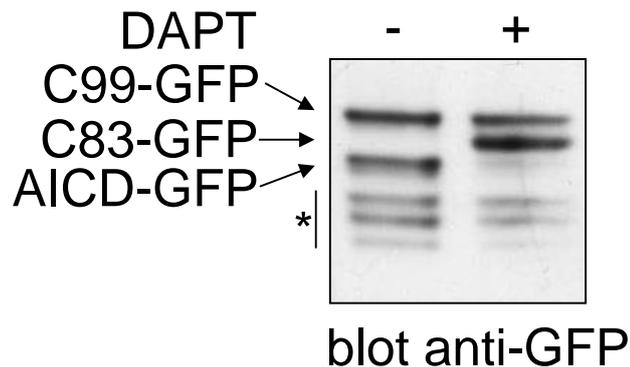


Abbildung 2: Prozessierung von C99-GFP: Western Blot von „C99-GFP“ Zell-Lysaten mit AK anti-GFP. Deutliche Banden C99-GFP und AICD-GFP. Nach Inkubation mit DAPT AICD-GFP deutlich vermindert, C99-GFP und C83-GFP-Bande deutlich sichtbar (Bei Inhibition der γ -Sekretase Abbau von C99-GFP durch α -Sekretase zu C83-GFP). * unspezifische Banden, bzw. Degradationsprodukte

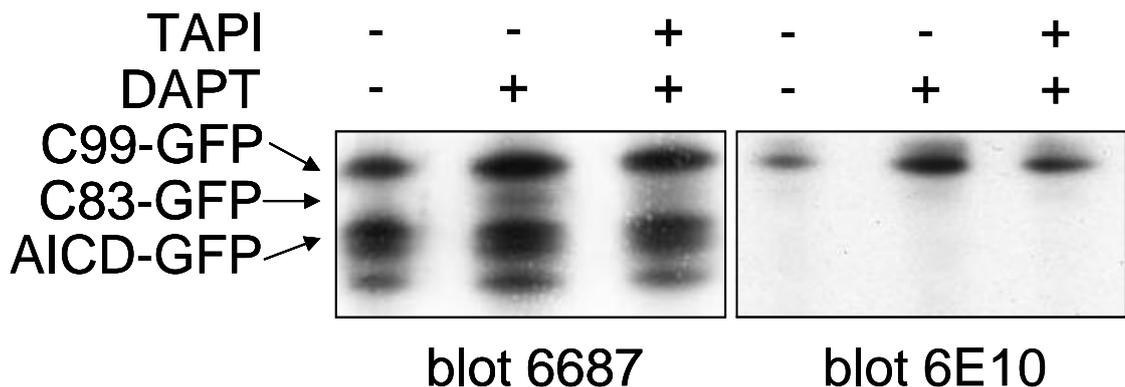


Abbildung 3: Prozessierung von C99-GFP zu C83-GFP: Im Western-Blot Nachweis von C99-GFP und C83-GFP mit AK 6687 gegen den APP C-Terminus. Inhibition der γ -Sekretase (+DAPT) mit nachfolgender C83-GFP Produktion, dann Inhibition von γ - und α -Sekretase (+DAPT/+TAPI), dadurch Akkumulation von C99-GFP ohne Nachweis einer Bildung von C83-GFP. Nachweis der Bande C99-GFP mit AK 6E10. Außerdem Detektion von unspezifischen Banden bzw. Degradationsprodukten.

3.1.2 C99-GFP wird zu A β prozessiert

In einem weiteren Schritt wurde die korrekte Bildung und Sekretion von A β der stabil transfizierten HEK C99-GFP Zellen untersucht. Dazu wurde Kulturmedium untransfizierter HEK 293 Zellen und von C99-GFP Zellen nach 24stündiger Inkubation auf enthaltenes A β hin untersucht.

Dabei lag die A β -Sekretion der untransfizierten Zellen unter der Nachweisgrenze, während das Medium der C99-GFP Zellen gut nachweisbare Mengen an A β enthielt (Abbildung 4) was auf eine effiziente Produktion und Sekretion von A β nach Schnitt von C99-GFP hinweist.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass das Konstrukt C99-GFP nach stabiler Transfektion ausreichend exprimiert wird, durch die γ -Sekretase korrekt in AICD-GFP und A β geschnitten wird, wobei A β erwartungsgemäß in den Extrazellulärraum sezerniert wird.

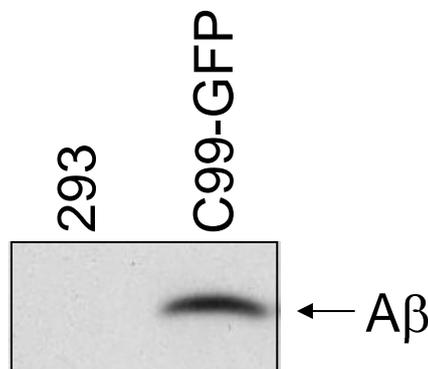


Abbildung 4: Nachweis von A β im Kulturmedium von „C99-GFP“ Zellen

3.2 C99-GFP akkumuliert bei Inhibition der γ -Sekretase in frühen Endosomen

Im nächsten Schritt analysierten wir die stabil C99-GFP exprimierende HEK 293- Zelllinie mikroskopisch.

Es zeigte sich erwartungsgemäß eine diffuse, schwache Fluoreszenz des gesamten Zytoplasmas (Abbildung 5). Diese diffuse Verteilung im Zytoplasma lässt sich auf effizientes Schneiden von C99-GFP durch die γ -Sekretase und folglich Freisetzung des Schnittproduktes AICD-GFP ins Zytoplasma zurückführen. In einigen Zellen konnte eine geringfügige erhöhte Fluoreszenz des Golgi-Apparates festgestellt werden, es zeigte sich jedoch keine signifikante Anfärbung anderer Zellorganellen wie etwa des Nukleus, weshalb von einer freien Diffusion von AICD-GFP ohne besonderes Ziel oder Eingeschlossenwerden ausgegangen werden kann.

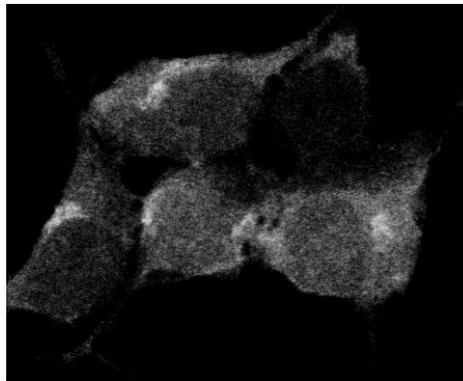


Abbildung 5: C99-GFP Zellen zeigen nach PFA-Fixierung und mikroskopischer Analyse eine diffuse zytoplasmatische Lokalisation von AICD

Während unbehandelte C99-GFP Zellen eine diffuse zytoplasmatische Fluoreszenz zeigten, ergab sich nach Inkubation der Zellen mit dem γ -Sekretase Hemmstoff DAPT ein völlig anderes Bild. Nachdem C99-GFP nicht mehr geschnitten werden konnte, kam es insgesamt zu einem starken Anstieg der allgemeinen Fluoreszenz und es konnten zahlreiche kleine Vesikel beobachtet werden. Außerdem ließ sich die PM abgrenzen, während das Zytosol keine Fluoreszenz mehr zeigte (Abbildung 6). Dies weist auf eine Akkumulation von ungeschnittenem C99-GFP an PM und in sekretorischen Vesikeln hin. Das nun nicht mehr gefärbte Zytosol bestätigt die effektive Inhibition der γ -Sekretase mit somit weitestgehend gehemmter AICD-GFP Produktion.

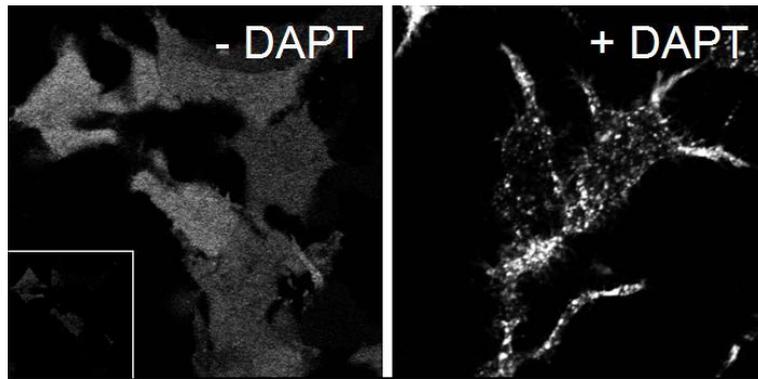


Abbildung 6: Nach Inhibition der γ -Sekretase mit DAPT akkumuliert C99-GFP in Vesikeln. Vergleich von C99-GFP Zellen unbehandelt mit diskreter zytoplasmatischer Fluoreszenz (links, -DAPT) und mit Inhibitor behandelt (rechts, +DAPT) mit deutlichem Anstieg der Gesamtfluoreszenz. Im kleinen Bild links bei gleichen Einstellungen wie rechts kaum Fluoreszenz nachzuweisen; nach Inhibition der γ -Sekretase mit DAPT Abgrenzbarkeit von PM und multipler kleiner Vesikel ohne Färbung des Zytoplasmas

3.2.1 Akkumulation in frühen, Transferrin-positiven Endosomen

Zur genaueren Identifizierung der unter der Behandlung mit DAPT sichtbar werdenden Vesikel führten wir ein Transferrin-Aufnahme-Experiment sowie Co-Immuno-Fluoreszenzen mit AK gegen Marker verschiedener bekannter sekretorischer Vesikel durch, um dann eventuelle Übereinstimmungen in der Lokalisation feststellen zu können.

Nach Aushungern der mit DAPT behandelten „C99-GFP“ Zellen in Serum-freiem Medium für 30min wurde mit einem fluoreszierenden Alexa-Farbstoff versehenes Transferrin zugesetzt und die Zellen nach 30min fixiert. Hierbei fanden sich multiple Übereinstimmungen von C99-GFP markierten Vesikeln und Alexa555-Transferrin-markierten frühen Endosomen (Abbildung 7).

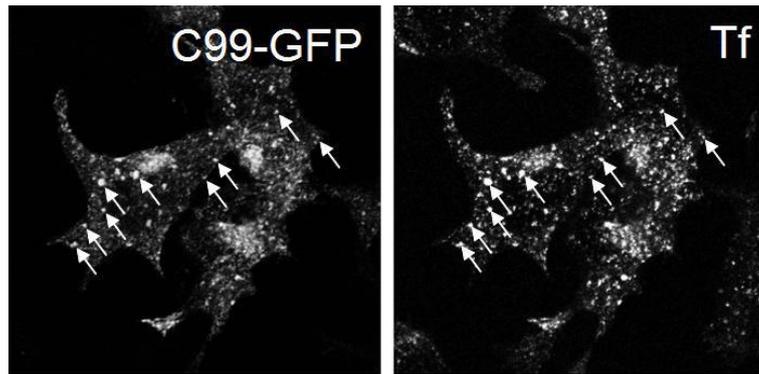


Abbildung 7: C99-GFP Vesikel co-lokalisieren mit Transferrin. Co-Lokalisierung (Pfeile) von bei Inhibition der γ -Sekretase mit DAPT sichtbar werdenden Vesikeln (links) mit frühen Endosomen im Transferrin Aufnahme Experiment (Tf, rechts)

Zur weiteren Bestimmung der unter DAPT entstehenden Vesikel wurden die mit DAPT behandelten „C99-GFP“ Zellen fixiert und Immunfluoreszenzen mit den Antikörpern EEA1 gegen frühe Endosome (Abbildung 8) und lamp1 (Abbildung 9) und lamp2 (nicht gezeigt) gegen späte Endosome bzw. Lysosome durchgeführt. Hierbei fanden sich Übereinstimmungen mit frühen Endosomen, jedoch deutlich weniger Co-Lokalisation mit Lysosomen.

Zusammengenommen weisen diese Daten darauf hin, dass C99-GFP unter Behandlung mit dem γ -Sekretase Inhibitor DAPT hauptsächlich in einem Transferrin-positiven frühen endosomalen Kompartiment akkumuliert.

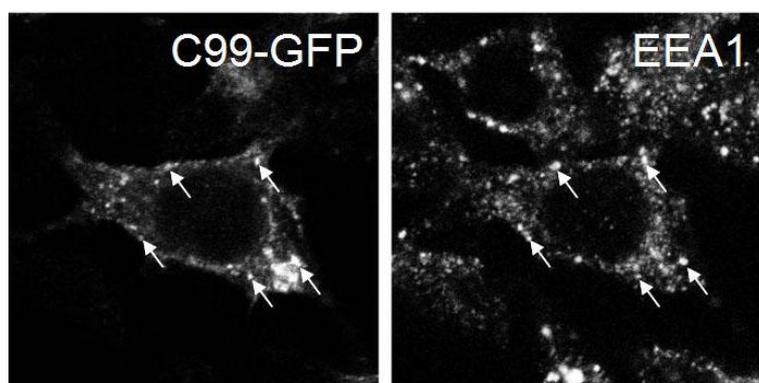


Abbildung 8: Co-Lokalisation von C99-GFP Vesikeln und frühen Endosomen. Co-Lokalisation (Pfeile) von bei Inhibition der γ -Sekretase mit DAPT sichtbar werdenden Vesikeln (links) mit frühen Endosomen, markiert mit AK EEA1

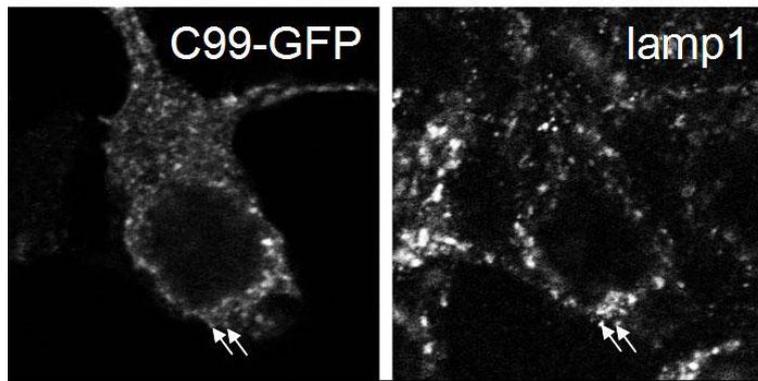


Abbildung 9: Marginale Co-Lokalisation von C99-GFP Vesikeln und Lysosomen. Geringfügige Co-Lokalisation (Pfeile) von bei Inhibition der γ -Sekretase mit DAPT sichtbar werdenden C99-GFP enthaltenden Vesikeln mit AK lamp1 markierten späten Endosomen bzw. Lysosomen

3.3 Keine AICD Bildung in frühen Kompartimenten des Sekretorischen Wegs

C99-GFP akkumulierte nach Inkubation mit dem γ -Sekretase Inhibitor DAPT in Transferrin-positiven, früh-endosomalen Vesikeln.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese Vesikel das Kompartiment sind, in dem C99 normalerweise geschnitten wird, und es daher bei Hemmung der γ -Sekretase zu Akkumulation des Substrates in diesem Bereich kommt.

Alternativ käme es zu einem Transport von C99 mit nachfolgender Akkumulation in diesen Vesikeln, wenn durch Inhibition der γ -Sekretaseaktivität in früheren Kompartments des Sekretorischen Wegs nicht geschnittenes C99 weiterhin ein Transportsignal für dieses endosomale Kompartiment am C-terminalen Ende tragen würde. Daraus würde sich bei Unterbrechung der Prozessierung durch die γ -Sekretase ein entsprechender Transport in frühe Endosome ergeben.

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten differenzieren zu können, hemmten wir einzelne Schritte des sekretorischen Transportsystems und beobachteten, ob eine Bildung von AICD stattfand oder sich C99-GFP anreicherte:

Sollte in einem Kompartiment, von dem aus der Weitertransport blockiert wurde, eine angemessene Aktivität der γ -Sekretase vorhanden sein, würde effektiv AICD-GFP gebildet und ins Zytosol sezerniert werden. Folglich wäre die entsprechende Organelle nicht sichtbar. Dagegen wäre eine Akkumulation von C99-GFP bei nur geringfügiger oder nicht vorhandener Aktivität der γ -Sekretase durch einen deutlichen Fluoreszenzanstieg im entsprechenden Bereich einfach zu detektieren.

Im letzten Schritt wurde eine gleichzeitige Hemmung der γ -Sekretase durch die verwendeten Techniken zur Hemmung der einzelnen intrazellulären Transportschritte ausgeschlossen.

3.3.1 AICD entsteht nicht im ER

Inkubation von lebenden Zellen mit Brefeldin A (BFA) führt zur Bildung eines Fusionskompartiments von ER und Golgi, da der anterograde Transport von Proteinen reversibel blockiert wird, während der retrograde Transport weiterhin stattfinden kann [51].

Wir behandelten C99-GFP Zellen über 4h mit BFA in normalem Kulturmedium, um einen Weitertransport von neu gebildetem C99-GFP aus dem ER zu verhindern. Dann erfolgte die Fixierung. Dabei beobachteten wir einen deutlichen Fluoreszenzanstieg in dem neu gebildeten ER-/Golgi-Fusions-Kompartiment, was auf mangelnde Aktivität der γ -Sekretase in diesem Bereich schließen lässt (Abbildung 10).

Derselbe Effekt zeigte sich auch in NT2-C99-GFP Zellen, war also nicht spezifisch für die primär verwendeten HEK 293 Zellen (Abbildung 11).

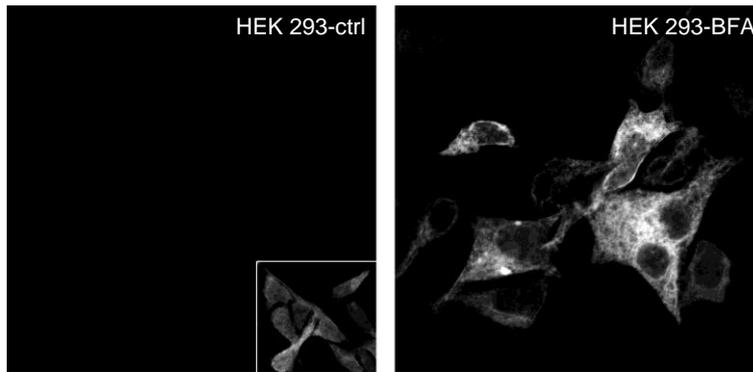


Abbildung 10: C99-GFP wird nicht im ER von HEK293 Zellen prozessiert. C99-GFP HEK293 Zellen links unbehandelt (ctrl) und rechts nach 4stündiger Inkubation mit BFA. BFA führt zu einer deutlichen Fluoreszenzanhebung mit Anfärbung der ER-/Golgi-Fusionsorganelle; beide Seiten bei gleichen mikroskopischen Einstellungen aufgenommen (kleines Kästchen mit verlängerter Expositionszeit)

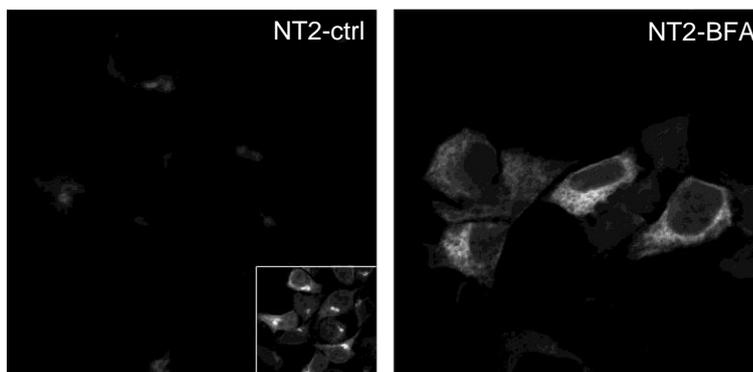


Abbildung 11: C99-GFP wird nicht im ER von NT2 Zellen prozessiert. Wie Abbildung10; Zelllinie NT2-C99-GFP links unbehandelt (ctrl) und rechts nach 4stündiger Inkubation mit BFA deutliche Fluoreszenzanhebung mit Anfärbung der ER-/Golgi-Fusionsorganelle; beide Seiten bei gleichen mikroskopischen Einstellungen aufgenommen (kleines Kästchen mit verlängerter Expositionszeit)

3.3.2 AICD entsteht nicht im Golgi-Apparat

Monensin blockiert den Transportweg der Zelle auf Höhe des Golgi-Apparates, indem es den Transport von Proteinen innerhalb des Golgi hemmt, ohne dabei andere Stoffwechselfvorgänge zu inhibieren [52].

C99-GFP Zellen wurden über 4h mit Monensin in normalem Kulturmedium inkubiert bevor sie fixiert wurden. Dabei unterbrachen wir den Sekretorischen Weg auf Höhe des Golgi-Apparates und auch hier zeigte sich ein erheblicher

Anstieg der Fluoreszenz, vor allem im Golgi-Apparat (Abbildung 12). Auch hier scheint keine ausreichende Aktivität der γ -Sekretase vorhanden zu sein, um akkumulierendes C99-GFP effektiv zu schneiden.

Diese Ergebnisse ließen sich ebenfalls an der neuronalen NT2-C99-GFP Zelllinie erfolgreich wiederholen (ebenfalls Abbildung 12).

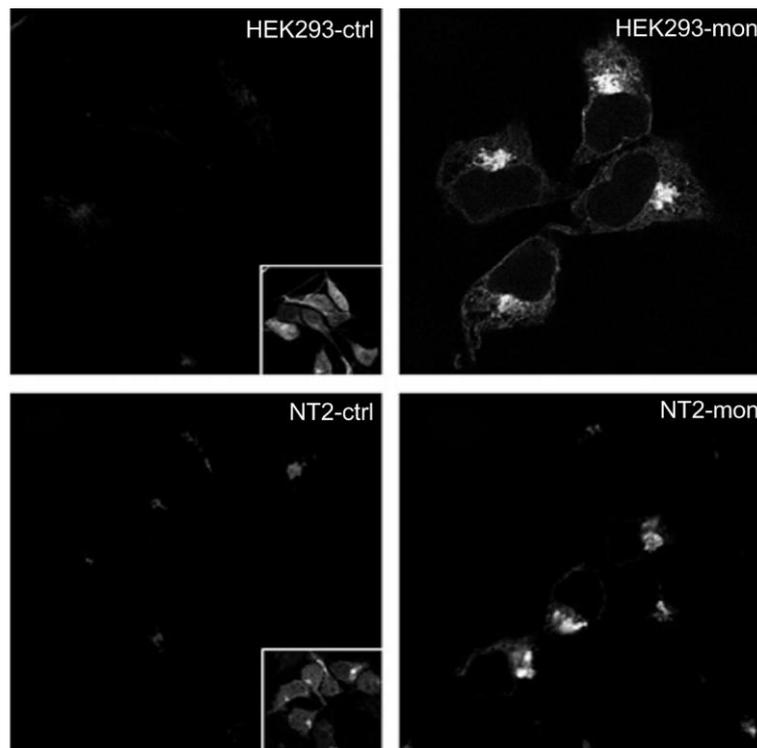


Abbildung 12: AICD entsteht nicht im Golgi-Apparat. C99-GFP HEK293 Zellen und NT2-C99-GFP Zellen zeigen nach 4stündiger Inkubation mit Monensin eine deutliche Fluoreszenzanhebung mit Anfärbung des Golgi-Apparates (links unbehandelt ctrl und rechts 4h Monensin); beide Seiten bei gleichen mikroskopischen Einstellungen aufgenommen (kleines Kästchen mit verlängerter Expositionszeit)

3.3.3 Keine Inhibition der γ -Sekretase durch BFA oder Monensin

Insgesamt weisen unsere Daten darauf hin, dass C99-GFP weder im ER noch im Golgi (siehe auch 3.3.4) geschnitten wird. Dieses könnte jedoch auch durch eine direkte Hemmung der γ -Sekretase durch BFA oder Monensin verursacht sein.

Um dies auszuschließen, wurde ein *in vitro* γ -Sekretase-Assay durchgeführt, wobei Membranen von HEK 293 Zellen, die endogene γ -Sekretase enthalten, und rekombinantes C99 verwendet wurden. Gleichzeitig wurde Monensin bzw. BFA in den üblichen Dosierungen zugegeben. Nach dem Western Blot konnte AICD mit AK 6687 in allen Proben erfolgreich detektiert werden, was zeigt, dass weder Monensin noch BFA die Funktion der γ -Sekretase nennenswert beeinträchtigen (Abbildung 13). Zu dem gleichen Ergebnis gelangten wir bei Verwendung von Zellmembranen von Monensin bzw. BFA inkubierter Zellen (Daten nicht gezeigt).

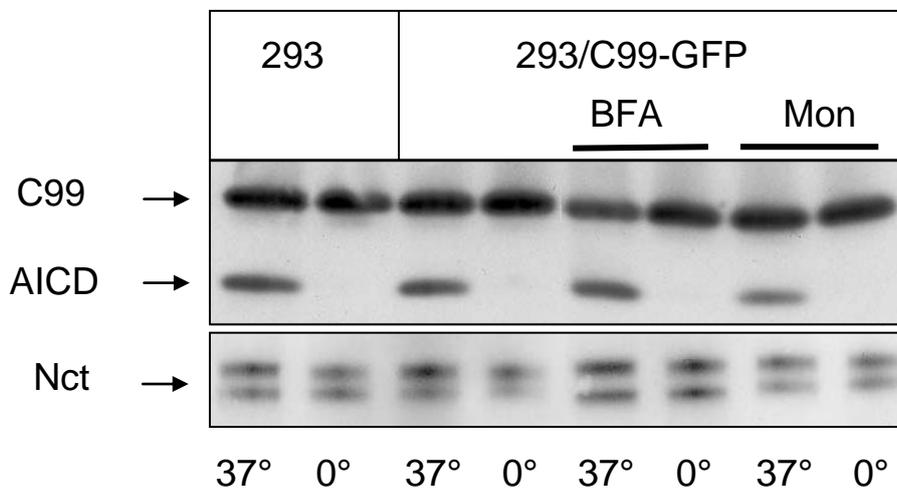


Abbildung 13: BFA und Monensin beeinträchtigen die Funktion der γ -Sekretase nicht. Western Blot mit AK 6687 nach *in vitro* γ -Sekretase Assay mit Membranen von HEK 293 Zellen ohne und mit Zusatz von BFA bzw. Monensin zeigt äquivalente AICD Produktion bei 37°C unter allen Bedingungen. Nct dient als Ladekontrolle.

3.3.4 AICD entsteht nicht im TGN

Es konnte gezeigt werden [37], dass eine Kühlung von Zellen auf 20°C für 2h den Weitertransport von Proteinen aus dem TGN an die PM verhindert. Gleichzeitig wird die Glykosilierung und Prozessierung der Proteine nicht gestört. Durch Wiedererwärmung auf 37°C kann diese Blockade vollständig aufgehoben werden.

Diesen Effekt nutzten wir um zu untersuchen, ob C99-GFP im TGN effektiv geschnitten werden kann. Dazu wurden C99-GFP Zellen vor Fixierung für 2h im

Wasserbad auf 20°C gehalten. Unter dem Mikroskop konnte eine deutliche Färbung des TGN beobachtet werden (Abbildung 14), was darauf schließen lässt, dass hier keine ausreichende γ -Sekretase Aktivität vorliegt, um sich aufstauendes C99-GFP ausreichend zu AICD-GFP und A β zu schneiden.

Damit konnte in keinem der frühen Kompartimente des Sekretorischen Wegs, also weder im ER noch im Golgi-Apparat, eine nennenswerte Aktivität der γ -Sekretase nachgewiesen werden.

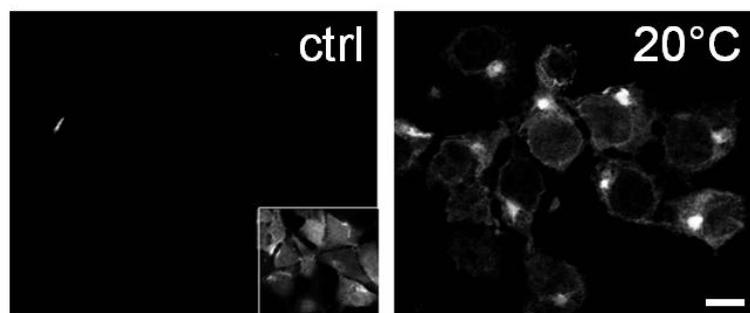


Abbildung 14: AICD entsteht nicht im TGN. C99-GFP Zellen links unbehandelt (ctrl) und rechts nach Aufbewahrung für 2h bei 20°C; beide Seiten bei gleichen mikroskopischen Einstellungen aufgenommen (kleines Kästchen mit verlängerter Expositionszeit)

3.4 AICD entsteht nicht in sekretorischen Vesikeln

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob ein effektiver Schnitt von C99-GFP in den Kompartimenten der Exozytose stattfindet, da bei Inhibition der γ -Sekretase die Bildung vieler kleiner Vesikel beobachtet werden konnte. Dazu verwendet wird Tanninsäure (TA), die innerhalb von wenigen Sekunden die Fusion von Transportvesikeln mit der PM hemmt [54]. So wird der Transport von Proteinen zur PM inhibiert und diese Proteine verbleiben folglich in exozytotischen Transportvesikeln.

3.4.1 Tanninsäure (TA) hemmt die Exozytose

Zunächst aber wurde noch einmal überprüft, ob TA tatsächlich die Exozytose effektiv hemmt. Dazu verwendeten wir HEK 293 Zellen, die stabil VSVG-GFP

(siehe Kapitel 2.2.2.3) exprimieren. Diese wurden entweder bei 40°C inkubiert, um eine Anreicherung von VSVG-GFP im ER zu erreichen, oder es fand eine Inkubation bei 19°C statt, um VSVG-GFP im Golgi-Apparat anzureichern [43]. Anschließend wurde der Transport von VSVG-GFP an die PM bei 30°C mit und ohne Zusatz von 1% TA beobachtet [54]. Hierbei konnte eine effektive Hemmung der Exozytose von VSVG-GFP mit fehlender Anfärbung der PM und Bildung multipler VSVG-GFP enthaltender Vesikel unter Zusatz von TA beobachtet werden, während unbehandelte Zellen einen ungestörten Transport von VSVG-GFP an die PM innerhalb von 45min zeigten (Abbildung 15).

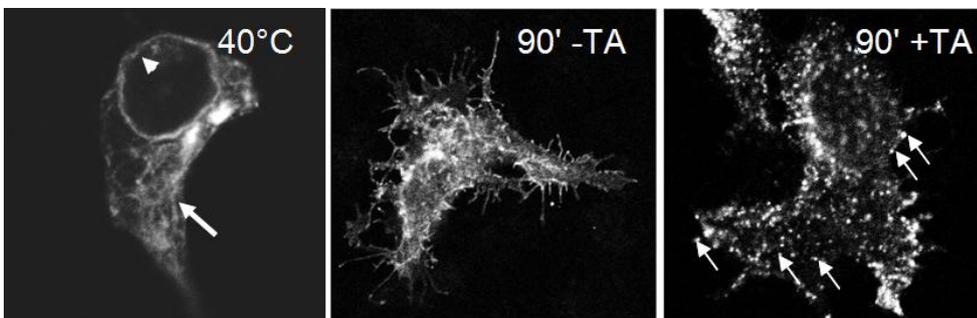


Abbildung 15: Tanninsäure (TA) hemmt die Exozytose bei VSVG-GFP stabil exprimierenden HEK 293 Zellen. Im linken Bild Inkubation bei 40°C mit Anreicherung von VSVG-GFP im ER. Bei anschließender Inkubation bei 30°C korrekter Transport von VSVG an die PM (Mitte). Bei Zusatz von 1%TA kann kein Transport an die PM stattfinden, VSVG-GFP verbleibt in multiplen Vesikeln.

3.4.2 TA beeinflusst den intrazellulären Transport nicht

Um auszuschließen, dass TA nicht auch andere Bereiche des intrazellulären Transports blockiert, führten wir ein Pulse-Chase-Experiment durch. Bei diesem wurde die Bildung von APP bzw. die Sekretion von APPs (sekretorisches APP) ins Medium von Swe Zellen, deren Stoffwechsel von APP_{SWE} im Detail bekannt ist [58], getestet. Die Zellen wurden mit und ohne TA-Inkubation 15min gepulst und 90min später Zelllysate bzw. gesammeltes Kulturmedium auf APP bzw. APPs untersucht. Nach der 15min pulse zeigte sich hauptsächlich neu synthetisiertes N-glykosyliertes APP. Bei unbehandelten „SWE“ Zellen ließen sich nach 90min davon nur noch geringe Mengen im Zelllysate nachweisen, dafür aber reichlich markiertes APPs im gesammelten Medium.

Die Lysate der mit TA inkubierten Zellen hingegen enthielten deutliche Mengen an markiertem vollglykosiliertem, also maturem, APP und N'-APP, was auf einen deutlich verlangsamten Turnover, aber korrekte Maturierung und damit auf einen intakten intrazellulären Transport schließen lässt. Zudem zeigte sich die effektive Hemmung der Exozytose mit Verschluss der PM darin, dass sich kein markiertes APPs im Medium nachweisen ließ. Medium wurde mit AK 5313, Zelllysate mit AK 6687 immunpräzipitiert (Abbildung 16).

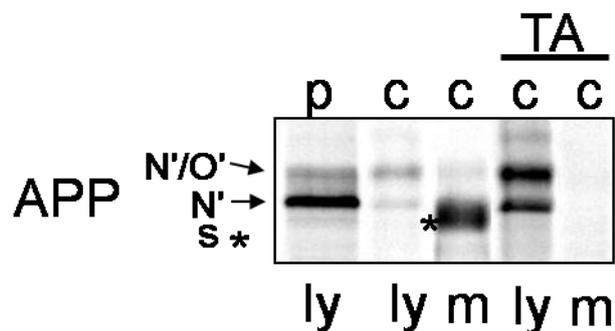


Abbildung 16: Prozessierung von APP nach Behandlung mit TA. Pulse-Chase-Experiment. SWE Zellen ohne und mit (TA) Inkubation mit 1% TA. Untersuchung der Zelllysate (ly) nach IP mit AK 6687 und des Kulturmediums (m) nach IP mit AK 5313 auf markiertes APP bzw. APPs nach 15min pulse (p) und 90min chase (c). S* entspricht sekretorischem APPs, N'-APP N-glykosiliertem APP und N'O' vollmaturiertem APP.

3.4.3 C99-GFP wird nicht in exozytotischen Vesikeln prozessiert

Es lässt sich also zusammenfassend sagen, dass TA zwar die PM effektiv versiegelt, indem eine Verschmelzung von exozytotischen Vesikeln mit der PM verhindert wird, aber den intrazellulären Transport und damit die Protein-Maturierung nicht behindert.

Daher wurde TA benutzt, um zu untersuchen, ob C99-GFP bei Hemmung der Exozytose weiterhin durch die γ -Sekretase geschnitten werden würde. Dazu wurden C99-GFP Zellen 90min lang mit 1% TA inkubiert, worauf sich nach Fixierung eine Ansammlung multipler kleiner Vesikel nahe der PM zeigte (vergleichbar mit den Ergebnissen der Inkubation von VSVG-GFP Zellen mit TA), während das Zytoplasma sich schwarz darstellte (Abbildung 17).

Hieraus lässt sich schließen, dass C99-GFP mittels sekretorischer Vesikel an die PM transportiert wird. In diesen besteht jedoch keine ausreichende γ -Sekretase Aktivität, um C99-GFP effektiv zu schneiden, was in der deutlichen Anfärbung dieser Vesikel unter Inkubation mit TA deutlich wird.

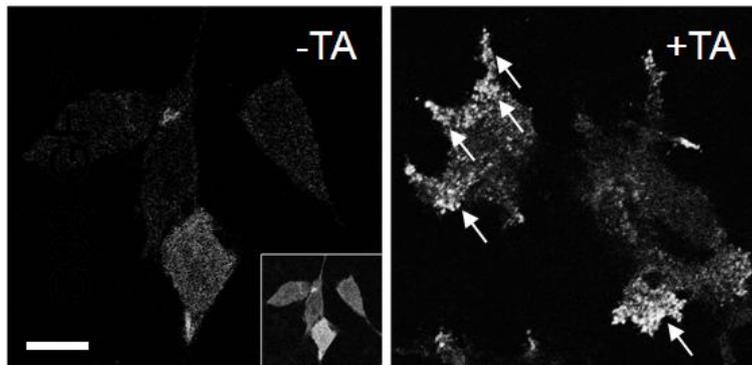


Abbildung 17: C99-GFP wird nicht in exozytotischen Vesikeln prozessiert. C99-GFP Zellen links unbehandelt mit schwacher zytoplasmatischer Anfärbung und nach 90min Inkubation mit TA (rechts) mit Akkumulation sekretorischer Vesikel nahe der PM; beide Seiten bei gleichen mikroskopischen Einstellungen aufgenommen (kleines Kästchen mit verlängerter Expositionszeit)

3.4.4 Auch in neuronalen Zellen entsteht AICD-GFP nicht in Sekretorischen Vesikeln

Um zu zeigen, dass C99-GFP nicht nur in HEK 293 Zellen nicht in Sekretorischen Vesikeln prozessiert wird, wurde die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y transient mit unserem C99-GFP Konstrukt transfiziert. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß das gleiche Ergebnis wie bei stabil transfizierten HEK 293 Zellen: eine schwache zytoplasmatische Anfärbung bei unbehandelten Zellen und eine deutliche Akkumulation sekretorischer Vesikel nahe der PM unter Behandlung der Zellen mit TA (Abbildung 18).

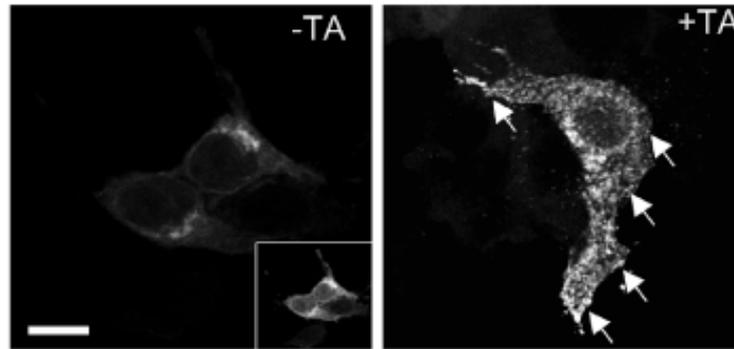


Abbildung 18: C99-GFP wird nicht in sekretorischen Vesikeln neuronaler Zellen prozessiert. Transient mit C99-GFP transfizierte SH-SY5Y Zellen unbehandelt (links) mit erwartungsgemäß schwacher, zytoplasmatischer Anfärbung und nach 90min Inkubation mit TA (rechts) mit Akkumulation sekretorischer Vesikel nahe der PM; beide Seiten bei gleichen mikroskopischen Einstellungen aufgenommen (kleines Kästchen mit verlängerter Expositionszeit)

3.4.5 Effekt von TA nicht selektiv für Prozessierung von C99-GFP

Um zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt eine Besonderheit des C99-GFP Konstruktes ist und somit möglicherweise nicht verallgemeinert werden kann, wurde eine vergleichbare Versuchsreihe mit einem anderen Substrat der γ -Sekretase durchgeführt. Notch Δ E ist ein bekanntes Substrat der γ -Sekretase [41,42], das unter Normalbedingungen effektiv geschnitten wird und dessen Produkt NICD (analog zu AICD) anschließend in den Nukleus transportiert wird [59]. Es wurde eine stabil Notch Δ E exprimierende HEK 293-Zelllinie verwendet.

Unbehandelte Notch Δ E Zellen zeigten eine starke Färbung des Nukleus durch Akkumulation von NICD. Nach Inkubation mit TA fand sich eine Anhäufung multipler, kleiner, sekretorischer Vesikel nahe der PM und der Nukleus blieb ausgespart (Abbildung 19).

Hieraus lässt sich ableiten, dass auch das von C99-GFP unabhängige γ -Sekretase- Substrat Notch Δ E erst an der PM geschnitten wird und der Effekt der TA somit nicht auf C99-GFP beschränkt ist.

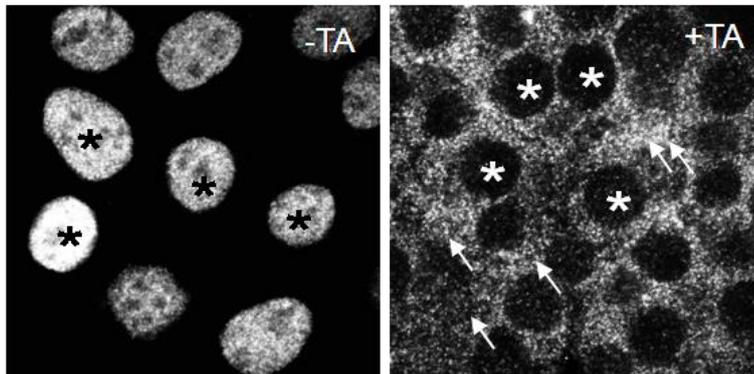


Abbildung 19: Tanninsäure inhibiert Prozessierung von Notch. Stabil Notch ΔE exprimierende Zellen unbehandelt (links) mit typischer Anfärbung des Nucleus (schwarze Sternchen) und nach Inkubation mit TA (rechts) wobei sich multiple sekretorische Vesikel (Pfeile) bilden und der Nucleus ungefärbt (weiße Sternchen) bleibt

3.5 Prozessierung von C99-GFP an der PM

In den frühen Kompartimenten des Sekretorischen Wegs, wie ER oder Golgi, konnte keine signifikante Prozessierung von C99-GFP gefunden werden. Auch sekretorische Vesikel scheinen nicht Ort ausgeprägter γ -Sekretase Aktivität zu sein. Damit verbleiben die Plasmamembran und endosomale Vesikel. Um diese voneinander unabhängig zu untersuchen, wurde die Endozytose von der PM ausgehend mit Dynamin K44A inhibiert und die Effekte auf die C99-GFP Produktion beobachtet.

3.5.1 C99-GFP wird an der PM geschnitten

Dazu wurden C99-GFP Zellen transient mit Dynamin K44A (mit HA-tag) transfiziert und mikroskopisch analysiert. Dabei ließ sich kein Unterschied zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen erkennen. Beide zeigten eine diffuse, schwache Fluoreszenz des Zytosols (Abbildung 20). Dies ist auf einen effizienten Schnitt von C99-GFP durch die γ -Sekretase an der PM trotz Inhibition der Endozytose zurückzuführen.

Auch Notch ΔE Zellen, die unbehandelt eine deutliche Anfärbung des Nukleus auszeichnet, zeigten sich nach der transienten Cotransfektion mit Dynamin K44A unverändert (Daten nicht gezeigt).

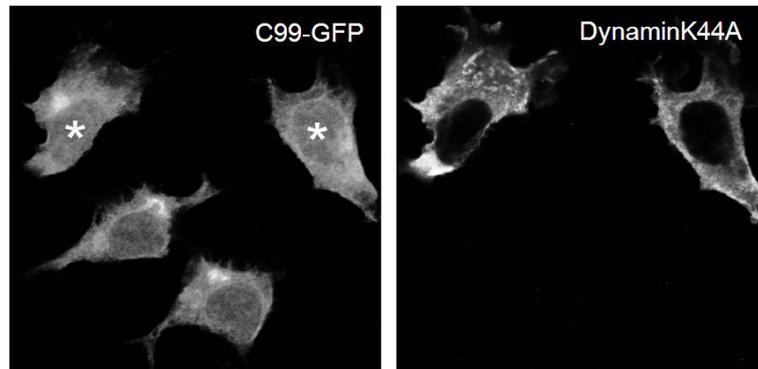


Abbildung 20: C99-GFP wird an der PM geschnitten. Links C99-GFP HEK 293 Zellen mit (Sternchen) und ohne Transfektion mit dem Endozytosehemmer Dynamin K44A (links) zeigen keinen Unterschied in der AICD-GFP-Fluoreszenz, es findet sich eine vergleichbare, diffuse Anfärbung des Zytosols; rechts Nachweis der Dynamin K44A-Expression mittels HA-tag

3.5.2 Dynamin K44A inhibiert Vesikelbildung unter DAPT

Um zu zeigen, dass Dynamin K44A tatsächlich ein effektiver Endozytoseinhibitor ist, inkubierten wir transient mit Dynamin K44A transfizierte C99-GFP Zellen zusätzlich mit DAPT, das bei Zellen ohne Cotransfektion mit Dynamin K44A normalerweise durch Hemmung der γ -Sekretase zu einer deutlichen Anreicherung von C99-GFP in endosomalen Vesikeln führt (Abbildung 6).

Die mit Dynamin K44A transfizierten Zellen zeigten nach Inkubation mit DAPT einen Anstieg der Gesamtfluoreszenz mit einer eindrücklichen Anfärbung der PM, jedoch ohne Anfärbung endosomaler Vesikel. Eine im selben Ausschnitt sichtbare untransfizierte C99-GFP Zelle zeigt dagegen eine Akkumulation von C99-GFP in endosomalen Vesikeln (Abbildung 21). Dies lässt sich auf die effektive Hemmung der Endozytose durch Dynamin K44A zurückführen.

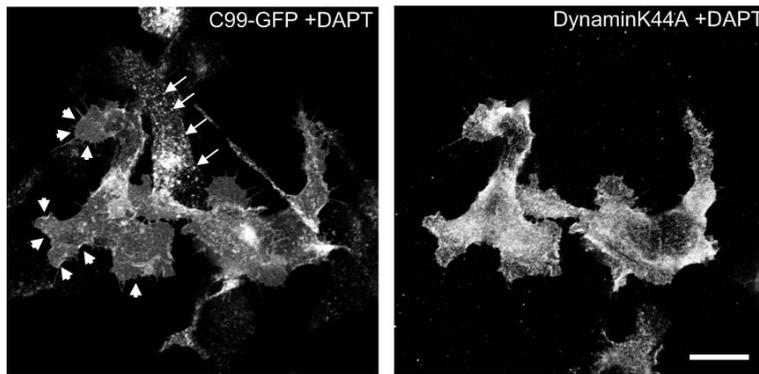


Abbildung 21: Dynamin K44A hemmt Endozytose. Links C99-GFP Färbung, die mittlere Zelle ist nicht mit Dynamin transfiziert und zeigt endosomale Vesikel (Pfeile). Die linke und die untere Zelle sind mit Dynamin K44A transfiziert und zeigen eine starke PM-Färbung (Pfeilspitzen). Rechts HA-Färbung zur Dynamin K44A Visualisierung. Zellen zusätzlich mit DAPT behandelt.

4 Diskussion

4.1 γ -Sekretase Aktivität findet sich vor allem in frühen Endosomen und an der Plasmamembran

Um die Aktivität der γ -Sekretase, also den aktiven γ -Sekretase-Komplex, nachzuweisen, wurde die Produktion von AICD als Marker verwendet. Hierzu wurden zwei an sich ähnliche Konstrukte, C99-GFP und C99-RFP, hergestellt. C99-GFP zeigte in allen Untersuchungen eine zu unmarkiertem C99 vergleichbare Prozessierung und konnte daher für die Zwecke dieser Studie weiter verwendet werden. Bei C99-RFP hingegen fand sich in allen Versuchsreihen eine starke Akkumulations- und Aggregationsneigung ohne C99-typische Prozessierung, so dass dieses Konstrukt verworfen werden musste.

Es gelang, eine stabil C99-GFP exprimierende Zelllinie herzustellen, bei der die Aktivität der γ -Sekretase durch eine diffuse zytoplasmatische Grün-Färbung durch AICD-GFP leicht darstellbar war. Kann die γ -Sekretase nicht aktiv werden, entweder aufgrund pharmakologischer Hemmung oder mangels Enzym-Substrat-Kontakt, bleibt das C99-GFP-Konstrukt ungeschnitten und somit membrangebunden. Dies führt zu einer deutlichen Fluoreszenzanhebung der entsprechenden Organelle(n), in der das Konstrukt vorkommt. Mittels pharmakologischer Hemmung des γ -Sekretase-Komplexes durch DAPT ließ sich das Vorkommen von C99-GFP erwartungsgemäß [15] in frühen Endosomen und – etwas geringer ausgeprägt – an der Plasmamembran und in späten Endosomen sowie Lysosomen nachweisen.

Im Western Blot konnte im Vergleich zur IF eine größere Menge C99-GFP detektiert werden (vgl. Abbildung 2). Dieses entspricht der Fraktion an neu synthetisiertem C99-GFP, die sich im Sekretorischen Weg auf dem Weg zur PM befindet und noch nicht fluoresziert, da GFP nach der Synthese erst eine intramolekulare Umlagerung eingehen muss, um seine fluoreszierenden

Eigenschaften zu entwickeln. Außerdem zeigt sich im Western Blot unter Hemmung der γ -Sekretase mit DAPT eine Bande, die wahrscheinlich C83-GFP entspricht. Die Ansammlung von C83-GFP entsteht, wenn durch die Substratanhäufung von C99-GFP nach Hemmung der γ -Sekretase durch DAPT eine Prozessierung von C99-GFP durch die α -Sekretase erfolgt. Für unsere Untersuchungen ist dies nur von nachrangiger Relevanz, da auch C83-GFP ein Substrat der γ -Sekretase darstellt.

Ein Versuch, den C99-N-Terminus nicht nur mittels IF sondern auch direkt mittels der Lumio-Fluoreszenz-Technologie zu visualisieren, gelang trotz verschiedenster Modifikationen der Reagenzienkonzentrationen und der Expositionszeiten nicht. Die nötige Tetracysteinsequenz ließ sich nachweislich korrekt einfügen und das Konstrukt problemlos stabil exprimieren. Durch Hinzufügen des Biarsen-Fluoreszin-Derivats sollte anschließend ein fluoreszierender Komplex mit der eingefügten Tetracysteinsequenz gebildet werden. Bisher wurde Lumio in erster Linie zur Markierung von intrazellulären Proteinen verwendet, das Nichtfunktionieren der Markierung ist somit möglicherweise auf das andersartige chemische Milieu im Extrazellulärraum zurückzuführen. Da nur ein einzelnes Kit verwendet wurde, ist aber auch ein Aktivitätsverlust der Reagenzien oder ein beschleunigtes Ausbleichen des Lumio Red Labeling Reagent unter Tageslicht [53] nicht sicher auszuschließen. Da keine Positivkontrolle erfolgte, ist eine abschließende Aussage nicht möglich. Da die Daten keinerlei Aussage zulassen, werden sie nicht gezeigt.

4.2 Inhibition des Sekretorischen Wegs führt zu Akkumulation von Substraten der γ -Sekretase

Nach gründlicher Charakterisierung des Konstruktes wurde der Transport an verschiedenen Orten des Sekretorischen Wegs blockiert, um Aufschlüsse über die Lokalisation der γ -Sekretase zu gewinnen. Hierfür verwendeten wir lang bekannte und gut erprobte zellbiologische Methoden: Pharmakologische Hemmung des Sekretorischen Wegs durch BFA, Monensin oder Tanninsäure und physikalische Blockierung des Weitertransportes im 20°C-Block. Hierbei

kam es jeweils zu einem deutlichen Fluoreszenzanstieg in der entsprechenden Organelle, von der aus der Weitertransport blockiert wurde. Dies weist auf eine mangelnde γ -Sekretase-Aktivität in der entsprechenden Organelle hin. So fanden sich im Gegensatz zu anderen Studien keine Hinweise für eine nennenswerte γ -Sekretase-Aktivität in ER [18,20,21], Golgi und TGN [21-23] sowie in sekretorischen Vesikeln [35,36].

Die gefundenen Effekte lassen sich gut verallgemeinern und sind nicht spezifisch für HEK 293Zellen, da vergleichbare phänotypische Ergebnisse auch mit Zellen neuronalen Ursprungs erzielt werden konnten. Zusätzlich besteht in diesen Ergebnissen auch eine starke Analogie zu Notch ΔE , einem anderen gut untersuchten Substrat der γ -Sekretase, welches ebenfalls nicht vor Erreichen der Plasmamembran geschnitten wird. Somit konnten sowohl Zelllinien- als auch Reporter-übergreifend kongruente Ergebnisse erfasst werden.

4.3 Keine Aktivität der γ -Sekretase in den frühen Kompartimenten des Sekretorischen Wegs

Die γ -Sekretase-Aktivität ist in den verwendeten Zellen so hoch, dass unter normalen Umständen das vorhandene Substrat praktisch vollständig prozessiert wird. Dies zeigt sich an der diffusen zytoplasmatischen Fluoreszenz.

Sollte diese Prozessierung während des Transportes zur Plasmamembran stattfinden - wie beispielsweise in der Vergangenheit angenommen in ER, Golgi, TGN und sekretorischen post-Golgi Vesikeln - muss postuliert werden, dass die in den Organellen vorhandene γ -Sekretase-Aktivität ausreicht, um praktisch die gesamte Substratmenge zu schneiden. Andernfalls müsste man das Substrat im jeweiligen Organell detektieren können. Gleichzeitig besteht jedoch nur eine kurze Aufenthaltsdauer des Substrats C99-GFP im jeweiligen Organell, da es sich gerade im Transit befindet. Bei einer Hemmung des Weitertransportes und somit Akkumulation des Substrates bei deutlich verlängerter Aufenthaltsdauer in dem jeweiligen Kompartiment, müsste die Prozessierung des Substrats jedoch noch effektiver werden. Dies steht in einem

deutlichen Gegensatz zu unseren Untersuchungsergebnissen, die nach Transporthemmung eindeutig eine steigende membrangebundene Fluoreszenz zeigen. Selbst eine sehr geringe γ -Sekretase-Aktivität sollte unter diesen Umständen für eine effektive Prozessierung ausreichend sein. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Insgesamt kann aus den Ergebnissen gefolgert werden, dass ER, Golgi, TGN und die sekretorischen post-Golgi Vesikel keine Orte wesentlicher Aktivität der γ -Sekretase sind. Eine minimale Restaktivität kann nicht ausgeschlossen werden.

4.3.1 Gründe fehlender Prozessierung entlang des Sekretorischen Wegs

Es gibt drei mögliche Erklärungen, warum entlang des Sekretorischen Wegs keine oder nur sehr geringe γ -Sekretase-Aktivität vorhanden ist: entweder ist die γ -Sekretase kaum oder gar nicht aktiv, im entsprechenden Kompartiment nicht vorhanden oder das Zusammenfinden von Substrat und Enzym wird durch Vorkommen in verschiedenen Mikrodomänen verhindert. Auch wenn eine eindeutige Unterscheidung dieser Möglichkeiten derzeit nicht getroffen werden kann, scheint aufgrund folgender Überlegungen die mangelnde γ -Sekretase-Aktivität die wahrscheinlichere Erklärung zu sein.

4.3.2 Substrate der γ -Sekretase sind Oberflächenproteine

Alle bisher beschriebenen Substrate der γ -Sekretase – zusätzlich zu APP und Notch, auch Delta, ErbB4, CD44 und die Cadherine – sind Proteine der Zelloberfläche und keines davon hat eine bekannte Lokalisation oder Funktion in ER, Golgi, TGN oder in den sekretorischen Vesikeln [51]. Dies legt nahe, dass auch die γ -Sekretase keine wesentliche Aktivität in den frühen Kompartimenten des Sekretorischen Wegs hat. Damit stellen unsere Ergebnisse auch die Hypothese in Frage, dass APP in axonalen post-Golgi Vesikeln geschnitten wird [35].

4.3.3 Hemmung der Endozytose stört die Aktivität der γ -Sekretase nicht

Durch Hemmung der Endozytose von C99-GFP in unseren Versuchen wird der Schnitt von C99-GFP durch die γ -Sekretase nicht gestört. Dies lässt eine effektive γ -Sekretase-Aktivität an der Plasmamembran vermuten, analog zu den Ergebnissen anderer Arbeiten [29,31].

4.3.4 Ungünstiges Verhältnis von aktivem γ -Sekretase-Komplex zu Substrat in sekretorischen Vesikeln

Eine nennenswerte Aktivität der γ -Sekretase in sekretorischen Vesikeln scheint eher unwahrscheinlich, da diese nur über eine geringe Lebensdauer verfügen (Halbwertszeit ca. 20-30min [48]) und hauptsächlich neu synthetisierte Proteine und Lipide an die Zelloberfläche transportieren. Der Durchsatz der γ -Sekretase ist mit einer Halbwertszeit von mehr als 24 Stunden im Verhältnis zu APP oder C99 mit einer Halbwertszeit von unter 1 Stunde sehr gering. Daher ist in sekretorischen Vesikeln die Menge an transportiertem, also neu synthetisiertem, aktivem γ -Sekretase-Komplex im Verhältnis zu der Substratmenge im besten Fall minimal. Hierzu passend ließ sich in einer anderen Studie auch nach 4-stündigem 20°C-Block keine der voll funktionsfähigen GFP-markierten Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes – PS1, PEN2 und Nct – in Golgi und TGN darstellen [63].

Nicht bekannt ist, in welchem Vesikeltyp die γ -Sekretase bzw. ihre Substrate zur Oberfläche transportiert werden. Auch in nicht-polarisierten Zellen gibt es mehrere Typen von post-Golgi Vesikeln [64], möglicherweise werden γ -Sekretase und Substrate auch in verschiedenen Vesikeln transportiert.

4.3.5 Kein aktiver γ -Sekretase-Komplex in Golgi und TGN

Passend zu unseren Ergebnissen konnte auch in einer immunelektronenmikroskopischen Studie weder im Golgi noch im TGN Presenilin, die katalytisch aktive Untereinheit der γ -Sekretase, nachgewiesen werden [62].

4.3.6 Minimales Vorkommen von aktiver γ -Sekretase im ER

Die γ -Sekretase wird zwar im ER zusammengefügt [45,46], anschließend jedoch rasch weitertransportiert, wie der kleine Anteil an vollständig zusammengefügtem γ -Sekretase-Komplex mit unreifem Nct zeigt [66]. Daher ist von einem nur sehr geringen Vorkommen an funktionsfähigem γ -Sekretase-Komplex im ER auszugehen.

4.3.7 Einfluss der Membran-Zusammensetzung auf die γ -Sekretase

Eine verminderte oder mangelnde γ -Sekretase-Aktivität in einigen Zellkompartimenten könnte an der Zusammensetzung der Membran oder dem Vorkommen von Enzym und Substrat in unterschiedlichen Mikrodomänen liegen. Dies scheint jedoch eher unwahrscheinlich, da Untersuchungen zum Effekt der Mikrozusammensetzung von Membranen auf die γ -Sekretase-Aktivität [67] eine robuste Schnittaktivität der γ -Sekretase an allen untersuchten Membran-Zusammensetzungen mit einer deutlichen Anhebung der Aktivität in sogenannten „Lipid rafts“ zeigten.

4.4 Zusammenfassung

In der Vergangenheit waren ER, Golgi und TGN mehrfach als Haupt-Aktivitäts-Lokalisation der γ -Sekretase postuliert worden [21,22,68], unsere Versuchsergebnisse mit Monensin, 20°C-Block und Tanninsäure zeichnen jedoch ein anderes Bild. Insgesamt zeigt diese Arbeit, dass ER, Golgi, TGN und die sekretorischen post-Golgi Vesikel nicht Hauptwirkungsort der γ -Sekretase sind, sondern diese vor allem an der Plasmamembran und/oder in frühen Endosomen proteolytisch aktiv ist. Somit wird AICD im Rahmen regulierter Intramembran-Proteolyse [69] an der Plasmamembran und/oder in frühen Endosomen gebildet. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen ein Vorkommen des aktiven γ -Sekretase-Komplexes – nachgewiesen anhand der Produktion von AICD – an der Plasmamembran und/oder in frühen Endosomen

nahe. Für ER, Golgi und TGN als Orte des aktiven γ -Sekretase-Komplexes konnten keine Hinweise gefunden werden.

Außerdem stellt die stabil C99-GFP-exprimierende HEK293-Zellreihe einen einfachen Test zum Nachweis der proteolytischen Aktivität des γ -Sekretase-Komplexes dar [60].

4.5 Bedeutung dieser Arbeit für die Entwicklung von Therapeutika zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung

Um die Alzheimer-Erkrankung zu behandeln, stellt die pharmakologische Inhibierung der γ -Sekretase zur Reduktion der A β -Entstehung nach der Amyloid-Hypothese einen möglichen Therapieansatz dar. Derzeit laufen mehrere klinische Studien mit unterschiedlichen γ -Sekretase Inhibitoren [70].

Viel versprechend erscheinen die Wirkstoffe BMS-708163 (Bristol-Myers Squibb) und GSI-953 (Wyeth) [71]. Beide inhibieren die γ -Sekretase nahezu selektiv für APP, wobei der genaue Mechanismus letztendlich nicht geklärt ist. Bei BMS-708163 wird Notch als Substrat der γ -Sekretase erst bei 190fach höherer Konzentration nennenswert beeinflusst. Bereits in der klinischen Phase I Studie zeigte BMS-708163 eine signifikante, dosisabhängige Reduktion von A β im Liquor freiwilliger Probanden. In klinischen Studien mit weniger selektiven Stoffen wie LY-450139 (Eli Lilly, aktuell klinische Phase III Studie) fanden sich zwar ebenfalls signifikante Senkungen der A β -Spiegels, aber neben anderen vor allem gastrointestinale Nebenwirkungen sowie eine signifikante Reduktion der CD 19 Zellen [72]. APP-selektive γ -Sekretase Inhibitoren könnten deutlich geringere Nebenwirkungsraten aufweisen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit wäre alternativ zu einer APP-selektiven Inhibition der γ -Sekretase auch ein Wirkstoff zur Inhibition des aktiven Komplexes nur an der Zelloberfläche - ohne Penetration des Wirkstoffes in das Innere der Zelle - interessant. Ein solcher Wirkstoff könnte möglicherweise ebenfalls nebenwirkungsarm und effektiv zu einer Reduktion der cerebralen A β -Menge führen.

5 Anhang: Vektorkarten

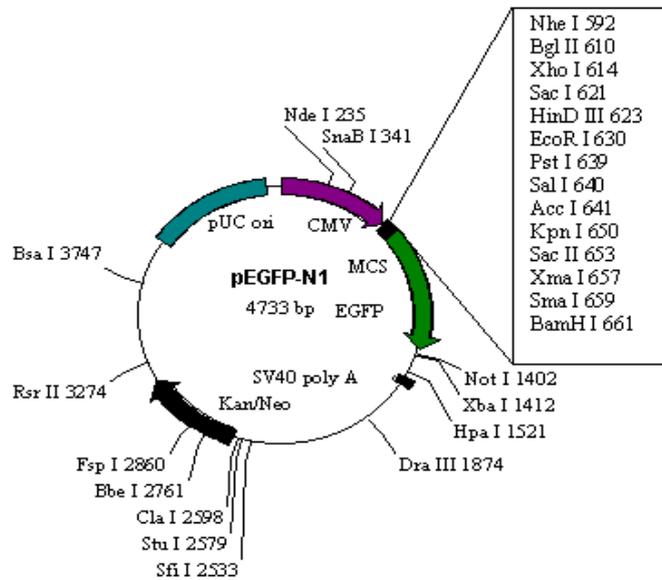


Abbildung 22: Vektor pEGFP-N1 (Clontech) [73]

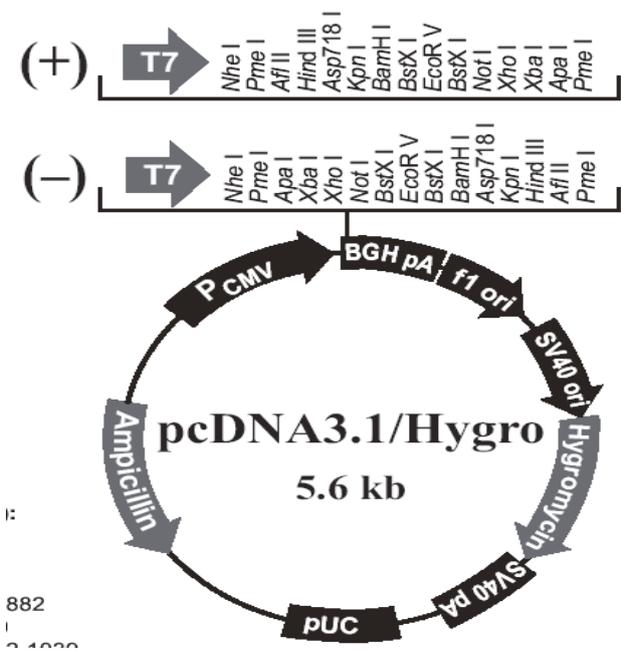


Abbildung 23: Vektor pcDNA3.1/Hygro (+) (Invitrogen) [74]

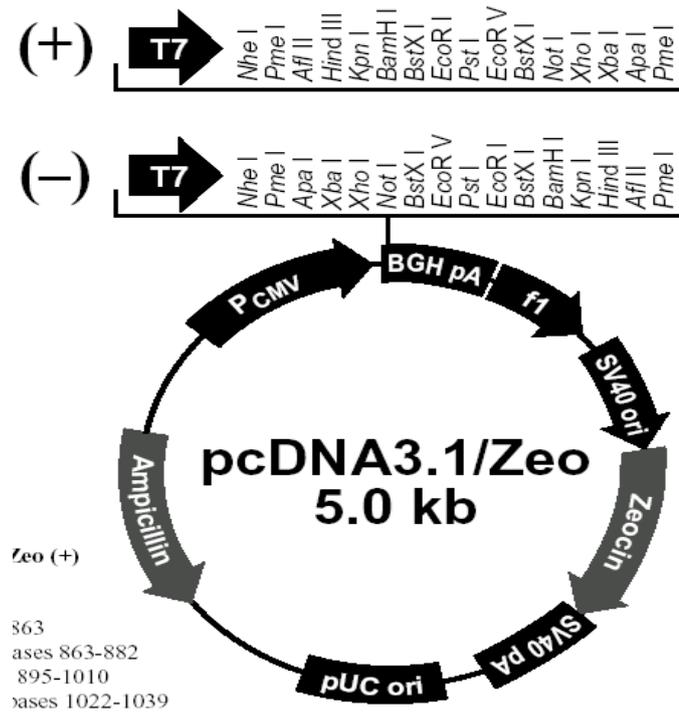


Abbildung 24: Vektor pCDNA3.1(+) Zeo (Invitrogen) [75]

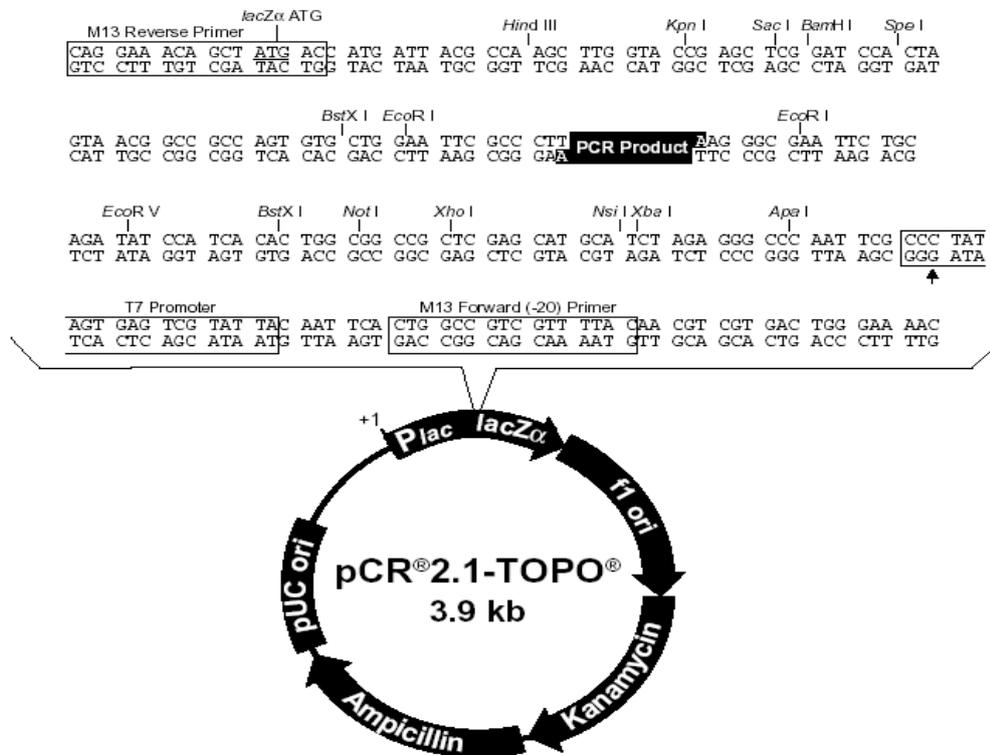


Abbildung 25: Vektor pCR2.1 TOPO (Invitrogen) [76]

6 Literaturverzeichnis und Quellenangaben

1. **Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V.** Berlin, Fact Sheets Epidemiologie und Genetik, www.deutschealzheimer.de, 11.3.2009
2. **Selkoe DJ.** Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol. Rev.* 2001 81:741-766.
3. **Corder EH, Saunders AM et al.** Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 1993 Aug 13;261(5123):921-3.
4. **Blacker D, Wilcox MA, Laird NM et al.** Alpha-2-macroglobulin is genetically associated with Alzheimer's disease. *Nature Gen.* 1998 19:357-360.
5. **Lambert JC, Heath S, et al.** Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Gen.* 2009 Oct;41(10):1094-9.
6. **Harold D, Abraham R, et al.** Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Gen.* 2009 Oct;41(10):1088-93.
7. **Böcker, Denk, Heinz.** Pathologie. Urban und Fischer Verlag. 2.Auflage 2001
8. **Selkoe DJ.** Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 1999;399:A23-31
9. **Hardy J., Selkoe DJ** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297(5580):353-6
10. **De Strooper B., Annaert W.** Proteolytic processing and cell biological functions of Alzheimer precursor protein. *J. of Cell Science* 2000;113;1857-70
11. **Koo EH.** The beta-amyloid precursor protein (APP) and Alzheimer's disease: does the tail wag the dog? *Traffic* 2002;3:763-70.
12. **Haass C.** Take five—BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.* 2004;23:483-8.
13. **Steiner H.** Uncovering gamma-secretase. *Curr Alzheimer Res* 2004;1:175-81.
14. **Fortini ME.** Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:673-84.
15. **Dries D, Yu G** Assembly, maturation, and trafficking of the γ -sekretase complex in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2008 5(2):132-146
16. **Haass C.** Take five—BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *Embo J.*2004;23(3);483-8
17. **Shah S, Lee SF, et al.** Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell.* 2005 Aug 12;122(3):435-47.
18. **Hartmann T, Bieger SC, Bruhl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, et al.** Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med* 1997;3:1016-20.
19. **Cupers P, Bentahir M, et al.** The discrepancy between presenilin subcellular localization and gamma-secretase processing of amyloid precursor protein. *J Cell Biol.* 2001 Aug 20;154(4):731-40
20. **Cook DG, Forman MS, Sung JC, Leight S, Kolson DL, Iwatsubo T, et al.** Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat Med* 1997;3:1021-3.
21. **Greenfield JP, Xu H, Greengard P, Gandy S, Seeger M.** Generation of the amyloid-beta peptide N terminus in *Saccharomyces cerevisiae* expressing human Alzheimer's amyloid-beta precursor protein. *J Biol Chem* 1999;274:33843-6.

22. **Xu H, Sweeney D, Wang R, Thinakaran G, Lo AC, Sisodia SS, et al.** Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3748-52.
23. **Khvotchev M, Sudhof TC.** Proteolytic processing of amyloid-beta precursor protein by secretases does not require cell surface transport. *J Biol Chem* 2004;27:47101-8.
24. **Koo EH, Squazzo SL.** Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 1994;269:17386-9.
25. **Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, et al.** Muta-genesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J Biol Chem* 1999;274:18851-6.
26. **Mathews PM, Guerra CB, Jiang Y, Grbovic OM, Kao BH, Schmidt SD, et al.** Alzheimer's disease-related overexpression of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor increases Abeta secretion: role for altered lysosomal hydrolase distribution in beta-amyloidogenesis. *J Biol Chem* 2002;277:5299-307.
27. **Grbovic OM, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Dinakar R, Summers-Terio NB, et al.** Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Abeta production. *J Biol Chem* 2003;278:31261-8.
28. **Yu WH, Kumar A, Peterhoff C, Shapiro Kulnane L, Uchiyama Y, Lamb BT, et al.** Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2531-40.
29. **Chyung JH, Selkoe DJ.** Inhibition of receptor-mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid beta-protein at the cell surface. *J Biol Chem* 2003;278:51035-43.
30. **Tarassishin L, Yin YI, Bassit B, Li YM.** Processing of Notch and amyloid precursor protein by gamma-secretase is spatially distinct. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:17050-5.
31. **Chyung JH, Raper DM, Selkoe DJ.** Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J Biol Chem* 2005;280:4383-92.
32. **Maltese WA, Wilson S, Tan Y, Suomensaari S, Sinha S, Barbour R, et al.** Retention of the Alzheimer's amyloid precursor fragment C99 in the endoplasmic reticulum prevents formation of amyloid beta-peptide. *J Biol Chem* 2001;276:20267-79.
33. **Cupers P, Bentahir M, Craessaerts K, Orlans I, Vanderstichele H, Saftig P, et al.** The discrepancy between presenilin subcellular localization and gamma-secretase processing of amyloid precursor protein. *J Cell Biol* 2001;154:731-40.
34. **Grimm HS, Behr D, Lichtenthaler SF, Shearman MS, Beyreuther K, Hartmann T.** gamma-Secretase cleavage site specificity differs for intracellular and secretory amyloid beta. *J Biol Chem* 2003;278:13077-85.
35. **Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS.** Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 2001;414:643-8.
36. **Lazarov O, Morfini GA, Lee EB, Farah MH, Szodorai A, DeBoer SR, et al.** Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus: revisited. *J Neurosci* 2005;25:2386-95.
37. **Bergman A, Religa D, Karlstrom H, Laudon H, Winblad B, Lannfelt L, et al.** APP intracellular domain formation and unaltered signaling in the presence of familial Alzheimer's disease mutations. *Exp Cell Res* 2003;287:1-9.
38. **Pasternak SH, Callahan JW, Mahuran DJ.** The role of the endosomal/lysosomal system in amyloid-beta production and the pathophysiology of Alzheimer's disease: reexamining the spatial paradox from a lysosomal perspective. *J Alz Dis* 2004;6:53-65.
39. **Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, et al.** Mutation of the b-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases b-protein production. *Nature* 1992;360:672-4.
40. **Dyrks T, Dyrks E, Masters C, Beyreuther K.** Membrane inserted APP fragments containing the beta A4 sequence of Alzheimer's disease do not aggregate. *FEBS Lett* 1992;309:20-4.
41. **Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R.** Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 1998;393:382-6.

42. **Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, Condron MM, et al.** Presenilin dependent gamma-secretase processing of β -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Reports* 2001;2:835-41.
43. **Toomre D, Keller P, White J, Olivo JC, Simons K.** Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *J Cell Sci* 1999;21:33.
44. **van der Bliek AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, Schmid SL.** Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol* 1993;122:553-63.
45. **Maniatis S.** *Molecular Cloning, a Laboratory Handbook.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, second edition 1989
46. **Steiner H, Kostka M, Romig H, Basset G, Pesold B, Hardy J, et al.** Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in polytopic bacterial aspartyl proteases. *Nature Cell Biol* 2000;2:848-51.
47. **Steiner H, Duff K, Capell A, Romig H, Grimm M G, Lincoln S et al.** A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling. *J Biol Chem.* 1999;274(40):28669-73.
48. **Wacker I, Kaether C, Kromer A, Migala A, Almers W, Gerdes HH.** Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein. *J Cell Sci* 1997;110:1453-63.
49. **Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, de Saint Andrieu P, Fang LY, et al.** Functional g-secretase inhibitors reduce b-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem* 2001;76:173-81.
50. **Mohler KM, Sleath PR, Fitzner JN, Cerretti DP, Alderson M, Kerwar SS, et al.** Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature* 1994;370:218-20.
51. **Lippincott-Schwartz J, Yuan LC, Bonifacino JS, Klausner RD.** Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with Brefeldin A: Evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 1989;56:801-813.
52. **Tartakoff A, Vassalli P, Detraz M.** Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins. *J Cell Biol* 1978;79:694-707.
53. **Lumio In-Cell Labeling Kits, Instruction Manual,** Version A 2003, Invitrogen
54. **Polishchuk R, Di Pentima A, Lippincott-Schwartz J.** Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway. *Nat Cell Biol* 2004;6:297-307.
55. **Matlin KS, Simons K.** Reduced temperature prevents transfer of a membran glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation. *Cell* 1983;34:233-243.
56. **Bonifacino JS.** Metabolic labeling with amino acids. *Curr Protoc Protein Sci.* 2001;Chapter 3:Unit 3.7
57. **Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C.** Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 2003;5:486-8.
58. **Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, et al.** The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta- secretase cleavage within the Sekretorischer Weg. *Nat Med* 1995;1:1291-6.
59. **Song W, Nadeau P, Yuan M, Yang X, Shen J, Yankner BA.** Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6959-63.
60. **Kaether C, Schmitt S, Willem M, Haass C.** Amyloid precursor protein and Notch intracellular domain are generated after transport of their precursors to the cell surface. *Traffic* 2006; 7: 408-415
61. **Koo EH, Kopan R.** Potential role of presenilin-regulated signaling pathways in sporadic neurodegeneration. *Nat Med* 2004;10 Suppl:S26-33.
62. **Rechards M, Xia W, Oorschot VM, Selkoe DJ, Klumperman J.** Presenilin-1 exists in both pre- and post-Golgi compartments and recycles via COPI-coated membranes. *Traffic* 2003;4:553-65.
63. **Kaether C, Lammich S, Edbauer D, Ertl M, Rietdorf J, Capell A, et al.** Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J Cell Biol* 2002;158:551-61.

64. **Müsch A, Xu H, Shields D, Rodriguez-Boulan E** Transport of vesicular stomatitis virus G protein to the cell surface is signal mediated in polarized and nonpolarized cells. *J Cell Biol* 1996;133:543-58.
65. **Kim SH, Yin YI, Li YM, Sisodia SS.** Evidence that assembly of an active gamma-secretase complex occurs in the early compartments of the Sekretorischer Weg. *J Biol Chem* 2004;279:48615-9.
66. **Capell A, Beher D, Prokop S, Steiner H, Kaether C, Shearman MS, et al.** Gamma-secretase complex assembly within the early Sekretorischer Weg. *J Biol Chem* 2005;280:6471-8.
67. **Osenkowski P, Wenjuan Y, et al.** Direkt and potent regulation of γ -Sekretase by its lipid microenvironment. *J Biol Chem* 2008; 33:22529-2254059.
68. **Siman R, Velji J.** Localization of presenilin-nicastrin complexes and gamma-secretase activity to the trans-Golgi network. *J Neurochem* 2003;84:1143-53.
69. **Weihofen A, Martoglio B.** Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol* 2003;13:71-8.
70. **Imimbo B. Alzheimer's disease: γ -secretase Inhibitors.** *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 2008;5:169-175
71. **Quelle:** <http://www.alzforum.org/new/detail.asp?id=1992>, 1.6.2010
72. **Quelle:** <http://www.alzforum.org/new/detail.asp?id=1607>, 1.6.2010
73. **Quelle:** <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/peranen/Kotisivunlinkit/Vectors/pEGFP-N1.htm>, 24.4.2008
74. **Quelle:** <http://tools.invitrogen.com/search/index.cfm?searchterm=pcdna3.1+hygro&fuseaction=search.simplesearch&navFilter=>, 24.4.2008
75. **Quelle:** <http://tools.invitrogen.com/search/index.cfm?searchterm=pcdna3.1+zeo&fuseaction=search.simplesearch&navFilter=>, 25.4.2008
76. **Quelle:** <http://tools.invitrogen.com/search/index.cfm?searchterm=pcr2.1-topo&fuseaction=search.simplesearch&navFilter=>, 24.4.2008