

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuropathologie

Prof. Dr. med. Markus Glatzel

Der Einfluss von Präsenilinen und Präsenilin-Mutationen auf die Expression des Prionproteins

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Samer G. A. Swileh
aus Ibb

Hamburg 2015

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Markus Glatzel

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp

Prüfungsausschuss, Prüfer: Prof. Dr. Thomas Braulke

Tag der mündlichen Prüfung: 07.01.2016

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(قُلْ إِنَّ صَلَاتِي وَنُسُكِي وَمَحْيَايَ وَمَمَاتِي لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ ، لَا شَرِيكَ لَهُ وَبِذَلِكَ أُمِرْتُ وَأَنَا أَوَّلُ الْمُسْلِمِينَ)

سورة الأنعام ، الآيتان 162 و 163

Im Namen Allahs, des Allerbarmers, des Barmherzigen!

(Sprich: "Mein Gebet und meine Opferung und mein Leben und mein Tod gehören Allah, dem Herren der Welten. Er hat niemanden bei sich. Und so ist es mir geboten worden, und ich bin der Erste der Gottergebenen".)

Sura Al-Anàm (Das Vieh) 162 und 163

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Morbus Alzheimer	1
1.1.1 Geschichte und Epidemiologie	1
1.1.2 Klinisches Krankheitsbild	2
1.1.3 Ätiopathogenese und histopathologische Veränderungen	3
1.2 Die Amyloidhypothese.....	6
1.2.1 Amyloid- β -Peptid-Vorläuferprotein (<i>Amyloid Precursor Protein</i> , APP).....	9
1.2.2 α -Sekretase	13
1.2.3 β -Sekretase	14
1.2.4 γ -Sekretase	15
1.2.5 Präseniline	19
1.3 Tau-Hypothese	25
1.3.1 Tau-Protein	25
1.3.2 Tau-Pathologie	26
1.4 Diagnostik.....	29
1.5 Therapie.....	30
1.5.1 Allgemeines	30
1.5.2 Symptomatische Behandlung.....	31
1.5.3 Krankheits-modifizierende Behandlung	31
1.6 Prion-Erkrankungen	32
1.6.1 Einführung	32
1.6.2 Prion-Erkrankungen bei Tieren und Menschen	33
1.6.3 Pathologie, Transmissibilität und Speziesbarriere	36
1.7 Prionprotein (PrP^C)	37
1.8 Pathogenese von Prion-Erkrankungen.....	40
1.9 Zusammenhänge zwischen Morbus Alzheimer und Prion-Erkrankungen	42
1.10 Zusammenfassung	45
2 ZIELSETZUNG	48
3 MATERIAL UND METHODEN	49
3.1 Material	49
3.1.1 Chemikalien und Bioreagenzien	49
3.1.1.1 Chemikalien.....	49
3.1.1.2 Kommerzielle Kits und Plasmide	51

3.1.1.3	Größenmarker	51
3.1.1.4	Enzyme	52
3.1.1.5	Antikörper	52
3.1.1.6	Primer	54
3.1.2	Zelllinien	54
3.1.3	Bakterienstämme	54
3.1.4	Puffer, Lösungen und Medien	55
3.1.5	Verbrauchsmittel	58
3.1.6	Geräte	59
3.1.7	Software und Datenbanken	61
3.2	Molekularbiologische Methoden	62
3.2.1	Transformation von Bakterienzellen	62
3.2.2	Präparation von Plasmid-DNA	63
3.2.3	Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentration	64
3.2.4	DNA-Sequenzierung	64
3.2.5	Restriktionsverdau	65
3.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	66
3.2.7	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	66
3.2.8	DNA-Ligation	67
3.3	Zellbiologische Methoden	68
3.3.1	Kultivierung von Zellen	68
3.3.2	Transfektion (Lipofektion)	69
3.3.3	Transfektion (Elektroporation)	70
3.3.4	Zellernte	71
3.4	Proteinbiochemische Methoden	71
3.4.1	Proteinaufreinigung aus Zelllysaten	71
3.4.2	Immunopräzipitation	72
3.4.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	73
3.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	73
3.4.5	Western-Blot	74
3.4.6	Immundetektion von Proteinen	75
3.5	Spektroskopische Methoden	75
3.5.1	Hellfeldmikroskopie	75
3.5.2	Immunofluoreszenzfärbung	75
3.6	Statistische Tests	77
4	ERGEBNISSE	78
4.1	Herstellung der Plasmide zur Zelltransfektion	78
4.2	Austestung von Antikörpern gegen Präsenilin-1	80
4.3	Optimierung der Transfektionsbedingungen	81
4.4	Analyse der Transfektionseffizienz	82
4.5	Analyse des Prionproteins (PrP^C)	84

4.5.1	Die Expression des Prionprotein (PrP ^C) in der <i>Western Blot Analyse</i>	84
4.5.2	Der Abbau des Prionproteins (PrP ^C) in der <i>Western Blot Analyse</i>	85
4.5.3	Die PrP ^C -Expression in der qPCR (<i>RT-PCR</i>)	88
4.5.4	Die zelluläre Verteilung von PrP ^C in der Immunofluoreszenzfärbung	89
4.6	Analyse der Expression und Aktivität von p53.....	91
4.6.1	Die Expression von p53	91
4.6.2	Die Aktivität von p53.....	93
4.7	Analyse der APP-Prozessierung.....	95
4.7.1	Herstellung des APP-Konstrukts zur Zelltransfektion.....	95
4.7.2	APP-Prozessierung in der <i>Western Blot Analyse</i>	97
4.8	Analyse von β-Catenin	100
5	DISKUSSION	102
5.1	Morbus Alzheimer und Prion-Erkrankungen	102
5.2	Präseniline und die Expression des Prionproteins	106
5.3	Präseniline und die γ -Sekretase.....	109
5.4	Präseniline außerhalb des γ -Sekretase-Komplexes	110
5.5	Präseniline und die Degradation von β -Catenin.....	110
6	ZUSAMMENFASSUNG	112
7	ANHANG.....	113
7.1	Der Expresssionsvektor (pcDNA3.1 ⁺ /Zeo)	113
7.2	Die Sequenzierung von PS1WT/ PS1E280A/ PS1 Δ 9	114
7.3	Der Klonierungsektor (pCAX)	118
7.4	Der Expressionsvektor (pcDNA3.1/Neo)	119
7.5	Die Sequenzierung von APP695	120
8	LITERATURVERZEICHNIS	122
9	DANKSAGUNG.....	153
10	LEBENS LAUF	154
11	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	155

Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1 Die pathologischen Merkmale der Alzheimer-Krankheit	6
Abb. 1.2 Die Amyloidhypothese (nach Haass and Selkoe 2007)	7
Abb. 1.3 Strukturelle und funktionelle Abschnitte des Amyloid-Vorläuferproteins (APP).....	10
Abb. 1.4 Prozessierung von Amyloid-Vorläuferprotein (APP).....	12
Abb. 1.5 Schematische Darstellung von ADAMs (<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>).....	13
Abb. 1.6 Schematische Darstellung von BACE-1 (nach Dislich and Lichtenthaler 2012)	14
Abb. 1.7 Schematische Darstellung des γ-Sekretase-Komplexes	15
Abb. 1.8 Sequenzielle Proteolyse von βCTF (C99) durch γ-Sekretase und die Entstehung verschiedener Aβ-Spezies	18
Abb. 1.9 Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von PS1 und PS2	20
Abb. 1.10 Struktur der Tau-Isoformen im menschlichen Gehirn	26
Abb. 1.11 Neuropathologische Veränderungen bei Prion-Erkrankungen (nach Glatzel and Aguzzi 2001).....	36
Abb. 1.12 Struktur des Prionproteins (PrP^C)	38
Abb. 1.13 Prion-Hypothese (Heterodimer-Modell)	40
Abb. 3.1 Schematische Darstellung eines Western-Blots.....	75
Abb. 4.1 Agarose-Gelelektrophorese und <i>Western Blot Analyse</i> zum Nachweis von Präsenilin-178	
Abb. 4.2 Austestung von Antikörpern gegen PS1	80
Abb. 4.3 Optimierung der Transfektionsbedingungen	81
Abb. 4.4 Analyse der Transfektionseffizienz in der <i>Western Blot Analyse</i>	83
Abb. 4.5 Die Expression des Prionproteins (PrP^C) in der <i>Western Blot Analyse</i>	84
Abb. 4.6 Das "gheddedete" Prionprotein in der <i>Western Blot Analyse</i>	86
Abb. 4.7 ADAM10 als Substrat von γ-Sekretase in der <i>Western Blot Analyse</i>.....	87
Abb. 4.8 Die Expressionsrate des Prionproteins (PrP^C) in der qPCR.....	88
Abb. 4.9 Die zelluläre Verteilung des Prionproteins (PrP^C) in der Immunfluoreszenzfärbung	90
Abb. 4.10 Die Expression von p53.....	92
Abb. 4.11 Die Aktivität von p53	94
Abb. 4.12 Agarose-Gelelektrophorese und <i>Western Blot Analyse</i> zum Nachweis von APP695....	96
Abb. 4.13 Die Prozessierung von APP in der <i>Western Blot Analyse</i>	99
Abb. 4.14 Analyse von β-Catenin im <i>Western Blot</i>.....	101
Tab. 1 Übersicht mit den etablierten Alzheimer-Genen.....	4
Tab. 2 Prion-Erkrankungen bei Tieren (modifiziert nach Miesbauer 2009).....	33
Tab. 3 Prion-Erkrankungen bei Menschen (modifiziert nach Miesbauer 2009).....	34

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
λ	Wellenlänge
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Aβ	Amyloid-β-Peptid
Abb.	Abbildung
ABCA7	<i>ATP-binding cassette, subfamily A, member 7</i>
ACE	<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>
ACh	Acetylcholin
ACP	<i>adenomatous polyposis coli protein</i>
AD	<i>Alzheimer Disease</i>
ad.	<i>adjust</i> (justieren)
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
AG	Arbeitsgruppe
AICD	APP-intrazelluläre Domäne
AML	amyotrophe Lateralsklerose
Aph-1	<i>anterior pharynx defective-1</i>
APL-1	<i>amyloid precursor like-protein</i> (im Fadenwurm <i>Caenorhabditis elegans</i>)
APLP1/2	<i>amyloid precursor like-protein-1/2</i>
APOE	Gen des Apolipoprotein-E
APP	<i>β-Amyloid Precursor Protein</i> (Amyloid-β-Peptid-Vorläuferprotein)
APP695	Amyloid Precursor Protein mit 695 Aminosäuren
APP751	Amyloid Precursor Protein mit 751 Aminosäuren
APP770	Amyloid Precursor Protein mit 770 Aminosäuren
APPL	<i>amyloid precursor like-protein</i> (in <i>Drosophila melanogaster</i>)
AS	Aminosäure
ATXN1	Ataxin-1-Gen

BACE	<i>β-site APP Cleaving Enzyme</i>
BIN1	<i>Bridging integrator 1</i>
bp	Basenpaare
BSE	<i>bovine spongiforme encephalopathy</i>
bzw.	Beziehungsweise
C83 (α CTF)	83 AS langes, C-terminales Fragment des APPs
C99 (β CTF)	99 AS langes, C-terminales Fragment des APPs
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
CBD	Kollagen-bindende Domäne
CBP	Ein Transkriptionsfaktor
CD2AP	<i>CD2-associated protein</i>
CD33	CD33-Gen
CDK5	<i>cyclin-dependent kinase 5</i>
Cdkn1a (=p21)	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1a</i>
CDR	<i>clinical dementia rating</i>
CHO	kohlenhydratreiche Domäne
CHRN2	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal)</i>
CJD	<i>Creutzfeldt-Jakob-Disease</i>
CKE	<i>casein kinase I</i>
CLU	Clusterin-Gen
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
cPLA2	<i>cytoplasmatic phospholipase A2</i>
CR1	das Gen für <i>complement component (3b/4b) receptor 1</i>
CREB-1	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CS-GAG	Chondroitinsulfat-Glukosaminoglykan
CST3	Cystatin-c-Gen
CT	Computertomographie
CTF	C-terminales Fragment

CuBD	Kupfer-bindende Domäne
CWD	<i>chronic wasting disease</i>
CWP	<i>cotton wool plaques</i>
Cys-Domäne	Cystein-reiche Domäne
d.h.	das heißt
DAT	Demenz von Alzheimer Typ
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DYRK1A	<i>Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A</i>
E-CadICD	E-Cadherin-intrazelluläre Domäne
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EOAD	<i>Early-Onset-Alzheimer-Disease</i>
EP	Elektroporation
EPHA1	<i>EPH receptor A1</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ErbB4	<i>Receptor tyrosine-protein kinase</i>
ERK2	<i>extracellular signal-regulated kinase-2</i>
et al.	und andere
EUE	<i>exotic ungulate encephalopathy</i>
FAD	<i>familial Alzheimer Disease</i>
FFI	fatale familiar Insomnie
FL	<i>full length</i> (die volle Länge eines Proteins)
fMRT	funktionelle MRT
FSE	<i>feline spongiforme encephalopathy</i>
FTD	<i>frontotemporal dementia</i>
FTDP-17	<i>frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosom 17</i>
Fz	Frizzled (Wnt-Rezeptor)
g	Gramm
GB	Großbritannien
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>

GPF	wachstumsfördernder Faktor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSAP	γ -Sekretase-aktivierendes Protein
GSK3 β	Glykogensynthasekinase 3 β
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
GWAS	<i>genome-wide association study</i>
H ₂ O	Wasser
HBD	Heparin-bindende Domäne
HC	hydrophobischer Kern
hCG2039140	hCG2039140-Gen
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSPG	Heparan-Sulfat-Proteoglykan
IC	Immunohistochemie
ICD	intrazelluläre Domäne
IDE	Insulin-abbauendes Enzym
IF	Immunofluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IL1B	das Gen von <i>Interleukin-1 beta</i>
IP	Immunopräzipitation
IP ₃ R	<i>inositol-1,4,5-triphosphat receptor</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KPI	Kunitz Typ II Serin-Protease-Inhibitoren
LEF 1	<i>lymphoid enhancer factor 1</i>
LF	Lipofektion
LOAD	<i>Late-Onset-Alzheimer-Disease</i>
LDLR	<i>LDL-receptor-related protein</i>
LRP5/6	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6</i>
LV	Leervektor

M	molar
mA	Milliampere
MAP	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MARK	<i>microtubule-affinity regulating kinase</i>
MCI	<i>mild cognitive impairment</i>
Mdm2	<i>mouse double minute 2</i>
MEFs	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
Min	Minute/ Minuten
ml	Mililiter
MRC OX-2	Antigen auf Thrombozyten
MRT	Magnetresonanztomographie
MS4A6A/ 4E	<i>Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, members 6A and 4E</i>
MT	Mikrotubuli
n	Anzahl der Experimente
N	N-Glykolysierung
N-CadICD	N-Cadherin-intrazelluläre Domäne
Nct	Nicastrin
NEXT	<i>Notch extracellular truncation</i>
NFT	neurofibrilläre Bündels „ <i>tangles</i> “
ng	Nanogramm
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NIA	<i>National Institute on Aging</i>
NICD	Notch-intrazelluläre Domäne
nm	Nanometer
NMDA	<i>N-Methyl-D-aspartic acid</i>
ns	nicht signifikant
NTF	N-terminales Fragment
O	O-Glykolysierung
OD	optische Dichte
Okt.	Oktober

ORF	<i>open reading frame</i>
p	p-Wert
P	Phosphat-Gruppe / Phosphorylierung
p3	3kDa großes Fragment des APPs
PEN-2	<i>presenilin enhancer 2</i>
PET	Positronen-Emission-Tomographie
PHF	paarige helikale Filamente
PICALM	das Gen von <i>Phosphatidylinositolbinding clathrin assembly protein</i>
PK	Proteinkinase K
PLD1	Phospholipase D1
PM	Plasmamembran
PP2A	<i>phosphatase-2A</i>
Prion	<i>proteinaceous infectious particle</i>
PRNP	Prion-Protein-Gen
PrP ^C	<i>prion protein cellular</i>
PrP ^{Sc}	<i>prion protein scrapie</i>
PS1 / PS2	Präsenilin-1 / Präsenilin-2
PS1 Δ 9	Präsenilin-1 mit Deletion des Exons 9
PS1E208A	Präsenilin-1 mutiert (Substitution von Glutamat durch Alanin an der Position 280)
PS2N141I	Präsenilin-2 mutiert (Substitution von Asparagin durch Isoleucin an der Position 141)
PSEN1	Präsenilin-1-Gen
PSEN2	Präsenilin-2-Gen
P-tau	hyperphosphoryliertes Tau
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RAGE	<i>receptor for the advanced glycation endproducts</i>
Rer1p	<i>retrieval to endoplasmatic reticulum 1 protein</i>
RIP	regulierte intramembranöse Proteolyse
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

rpm	<i>rounds per milion</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (Echtzeit-Polymerasekettenreaktion)
RyR	<i>Ryanodine receptor</i>
s	Sekunde
s.	siehe
s. a.	siehe auch
SAD	<i>sporadic Alzheimer Disease</i>
SAF	Scrapie-assoziierten Fibrillen
sAPP α	N-terminale Ektodomäne des APPs
sAPP β	N-terminale Ektodomäne des APPs
SDLT	Demenz von Lewy-Körperchen-Typ
SERCA	<i>sarco/endoplasmatic reticulum calcium ATPase</i>
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SORCS1	<i>Sortilin-related vps10 domain containing receptor 1</i>
SORL1	<i>Sortilin-related receptor</i> -Gen
SP	Signalpeptid
s-s	Disulfidbrücke
St6Gal I	Sialyltransferase
Tab.	Tabelle
Tau	das Protein Tau (τ)
TCF	<i>T-cell factor</i>
TFAM	das Gen von <i>Transcription factor a, mitochondrial</i>
TMD	Transmembrandomäne
TME	<i>transmissible minc encephalopathy</i>
TMP-21	<i>transmembrane trafficking protein 21</i>
TNK1	das Gen von <i>Tyrosine kinase, non-receptor, 1</i>
TOMM40	<i>translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog</i>
TSE	<i>transmissible spongiforme encephalopathie</i>

u. a.	unter anderem
Ub	Ubiquitinierung
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VPSPr	variabel Protease-sensitive Prionopathie
WB	<i>Western Blot</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WT	Wildtyp
xg	x Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
ZnBD	Zink-bindende Domäne
ZNS	zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Morbus Alzheimer

1.1.1 Geschichte und Epidemiologie

Im Jahr 1907 beschrieb der deutsche Psychiater und Neurologe Alois Alzheimer (1864 – 1915) zum ersten Mal eine „eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ (Alzheimer 1907). Er beobachtete bei seiner 51-jährigen Patientin Auguste Deter aus Frankfurt a.M. Gedächtnisverlust, Halluzinationen, örtliche und zeitliche Desorientierung, Wahnvorstellungen sowie herabgesetzte Fähigkeit, alltägliche Aktivitäten durchzuführen. Nach einem schnell fortschreitenden Krankheitsverlauf war Auguste D. 1906 gestorben. In der Autopsie zeigte sich eine generalisierte Atrophie der Hirnrinde ohne makroskopische Herde, in den histologischen Präparaten waren intraneuronale Fibrillen und Ablagerungen einer „pathologischen metabolischen Substanz“ nachzuweisen. Diese brachte er mit den beobachteten Krankheitserscheinungen in Verbindung und veröffentlichte im folgenden Jahr seine Beobachtungen. Die Bezeichnung „Alzheimer-Krankheit“ wurde offiziell zum ersten Mal vom Psychiater Emil Kraepelin, bei dem A. Alzheimer in München tätig war, 1910 verwendet (Emil Kraepelin: Textbook of Psychiatry, 1910). 1997 wurden die histologischen Präparate von Auguste D. wiederentdeckt und bearbeitet (Graeber *et al.* 1997, Maurer *et al.* 1997). Es muss jedoch erwähnt werden, dass Auguste D. nicht etwa die übliche Alzheimer-Krankheitsform erlitt, sondern an einer seltenen, früh auftretenden und schnell progredienten Form erkrankt war.

Heute ist Morbus Alzheimer (*Alzheimer Disease*, AD) mit ca. 60% als die weltweit häufigste Demenzform bekannt (Demenz von Alzheimer Typ, DAT). Mit „Demenz“ lässt sich eine Gruppe von Erkrankungen beschreiben, die mit Gedächtnisstörungen, beeinträchtigtem Lern- und Denkvermögen, zunehmender Konzentrationsschwäche und herabgesetzten intellektuellen Fähigkeiten bei intaktem Bewusstsein einhergehen. Zudem können psychische und Persönlichkeitsveränderungen auftreten. Andere Demenzformen sind z.B. – der Häufigkeit nach: vaskuläre Demenz, Demenz von Lewy-Körperchen-Typ (SDLT), Frontotemporalappen-Demenz (Morbus Pick) sowie Demenz im Rahmen anderer Krankheiten entzündlicher, toxischer, metabolischer oder endokrinologischer Genese und Demenz bei normotensivem Hydrozephalus. Schätzungsweise lebten 2010 35,6 Millionen Menschen weltweit mit Demenz verschiedener Genese (World Alzheimer Report, 2009 s.

auch Ferri *et al.* 2005). Mit 7,7 Millionen Neuerkrankungen im Jahr, das entspricht einem neuen diagnostizierten Fall alle 4 Sekunden (Dementia: a public health priority, WHO 2012), und unter Einbeziehung des demographischen Wandels sowie des Fehlens effektiver Therapie und präventiver Maßnahmen erwartet man bis zum Jahr 2050 einen Anstieg auf 115,4 Millionen Demenzpatienten (Wortmann 2012, s. a. World Alzheimer Report, 2009). Die Prävalenz von Alzheimer Demenz steigt mit dem Alter an, sie liegt bei den 65-Jährigen bei 0,9 %, bei den 75-Jährigen bei 4,2 % und bei den 85-Jährigen bei 14,7 % (Brookmeyer *et al.* 2007). Es liegen jedoch kontroverse Zahlen zur Prävalenz und Inzidenz der Erkrankung vor.

Die Alzheimer-Krankheit (AD) kann unter verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden. Zum einen unterscheidet man nach dem Alter beim Auftreten ein EOAD (*Early-Onset AD*), d.h. die Betroffenen entwickeln die ersten Symptome vor dem 60. bzw. 65. Lebensjahr, von einem LOAD (*Late-Onset AD*), was bedeutet, dass die Krankheit erst nach dem 60. bzw. 65. Lebensjahr ausbricht. Zum anderen differenziert man zwischen der weitaus häufigsten sporadischen (*sporadic AD*, SAD) und der seltenen familiären (*familial AD*, FAD) Form. Man ging früher davon aus, dass die Krankheitsfälle mit frühem Ausbruch (EOAD) zum großen Teil familiär mit genetischen Ursachen sind, und dass die LOAD-Fälle eher sporadisch sind. Inzwischen weiß man, dass die Situation noch komplexer ist. Daher sind solche Einteilungen aufgrund der bislang ungeklärten Ätiologie von AD relativ willkürlich und die Literaturangaben sind uneinheitlich. Man schätzt, dass 80% der AD-Fälle genetische Komponenten haben (Gatz *et al.* 2006, zur Übersicht s. Tanzi 2012). Auf der einen Seite haben 60% der EOAD eine positive familiäre Geschichte, darunter sind nur 13% durch bekannte Mutationen bedingt (Bekris *et al.* 2010). Auf der anderen Seite haben 60 – 80% der LAOD-Patienten einen genetischen Polymorphismus als Risikofaktor (Bertram *et al.* 2010). Es gibt außerdem Fälle von EOAD ohne den Nachweis einer genetischen Übertragung, während zunehmend LOAD-Fälle mit familiärem, erblichen Muster nachgewiesen werden (Bertram *et al.* 2010). Es können auch EOAD-Fälle in Familien mit generellem LOAD auftreten (Brickell *et al.* 2006).

1.1.2 Klinisches Krankheitsbild

Die Art und das Ausmaß der Krankheitserscheinungen unterscheiden sich von einem Patienten zum anderen. Allen ist jedoch ein progredienter Verlauf gemeinsam, wobei gilt: Je früher die Krankheit auftritt, umso schneller ist ihre Progression. Somit kann man einen milden, moderaten vom schweren Verlauf unterscheiden, wobei sich diese Modalitäten sowohl auf den Verlauf des einzelnen Falls als auch auf unterschiedliche Verläufe beziehen

können. Beim milden Verlauf bzw. im frühen Stadium tauchen Gedächtnisstörungen als erstes Warnsymptom auf. Diese äußern sich anfangs durch die Unfähigkeit, sich an neulich stattgefundenen Ereignissen zu erinnern. Später findet sich der Alzheimer-Patient in einer neuen Umgebung kaum zurecht, wirkt vergesslich und zerstreut, und zeigt Lernschwäche und verminderte Merkfähigkeit. Zudem können auch Sprachprobleme eintreten, z.B. Wortfindungsschwierigkeiten und umständliche Ausdrucksweise. Ein Teil der AD-Patienten zeigt zuerst eine psychische Störung wie Stimmungsschwankungen oder Depression, was sich leicht mit anderen Erkrankungen verwechseln lässt. Außerdem sind kognitive Störungen (im Rechen-, Urteils- und Abstraktionsvermögen) typisch für das erste Stadium. Im weiteren Verlauf nehmen die Gedächtnisstörung und Lernschwäche zu. Das Langzeitgedächtnis kann betroffen sein (Galton and Hodges 1999), der Patient findet sich in vertrauter Umgebung nicht zurecht und kann auch vertraute Personen wie Familienangehörigen nicht erkennen. Daneben können Verhaltens- und Persönlichkeitsveränderungen hinzutreten. Der Patient kann verwirrt, aufgeregt oder sogar aggressiv sein. Spätestens in diesem Stadium gerät der Patient in viele Schwierigkeiten in seinem sozialen und Arbeitsumfeld, was gerade die Diagnose sowie die soziale Aufklärung unabdingbar macht. Im Endstadium erleiden die AD-Patienten die schwersten kognitiven und Gedächtnisstörungen und sind vegetativ und motorisch stark beeinträchtigt, sie entwickeln Schluckbeschwerden, Harn- und Stuhlinkontinenz. Sie sind in diesem Stadium bettlägerig und pflegebedürftig, diese Umstände erhöhen die Komorbidität v. a. die Infektanfälligkeit, letztendlich führen die Inanition, Mangelernährung und Pneumonie zum Tode (Bird 2008). Nach der Diagnose leben die Betroffenen durchschnittlich 8 – 10 Jahre (Bird 2008).

1.1.3 Ätiopathogenese und histopathologische Veränderungen

Ätiologie

Wie eingangs erwähnt sind die Ursachen für AD weitgehend unbekannt. Mittlerweile geht man davon aus, dass AD eine multifaktorielle Erkrankung ist. Neben dem Hauptrisikofaktor „Alter“ wurden bislang mehrere genetische und Umweltfaktoren diskutiert und erforscht, die für die Pathogenese von AD von Bedeutung sind. Man vermutet, dass LOAD durch ein komplexes Zusammenspiel von unbekanntem Umwelteinflüssen und genetischen Prädispositionen verursacht wird (Gatz *et al.* 2006).

Folgende Umweltfaktoren wurden als Risikofaktoren in verschiedenen Studien diskutiert: Schädel-Hirn-Trauma (SHT), Infektionen, Toxine und Noxen (z.B. Aluminium), Stoffwechselerkrankungen (Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Diabetes mellitus (Qiu and

Folstein 2006, Neumann *et al.* 2008, J *et al.* 2009), hohe Cholesterin-Werte (Crisby *et al.* 2002), Adipositas und Erkrankungen des kardiovaskulären Systems (arterielle Hypertonie (Kehoe and Wilcock 2007), Schlaganfälle) (zur Übersicht s. Ballard *et al.* 2011, Armstrong 2013). Borenstein *et al.* lieferten eine Übersicht über sechs Expositionen im Kindesalter, die Risikofaktoren für die klinische Manifestation von AD darstellen: (1) perinatale Bedingungen, (2) frühkindliche Gehirnentwicklung, (3) frühkindliche Körperentwicklung, (4) frühkindliche sozioökonomische Bedingungen, (5) Umweltbereicherung, (6) kognitive Reserve (Bildung, Intelligenz) (Borenstein *et al.* 2006).

In 80% der AD-Fälle sind genetische Komponenten nachzuweisen (Gatz *et al.*, 2006), darunter sind 1 – 6% EOAD (Bekris *et al.* 2010), wobei lediglich weniger als 1% durch definierte autosomal dominante Mutationen (in den Genen APP, PSEN1, PSEN2) bedingt sind (van der Flier *et al.* 2011). In 60 - 80% der ca. 90%-LOAD-Fälle sind Polymorphismen im APOE-Gen bekannt (Bertram and Tanzi 2004, Bertram *et al.* 2010). Tab. 1 zeigt die etablierten Alzheimer-Gene, die sowohl mit EOAD (APP, PSEN1, PSEN2) als auch mit LOAD (APOE) assoziiert sind. Interessanterweise entwickeln Personen mit Down-Syndrom (Trisomie 21) die neuropathologischen Zeichen von AD kurz nach dem 40. Lebensjahr; das liegt an der lebenslangen Überexpression vom im Chromosom 21 lokalisierten APP, was letztlich zu einer verstärkten Produktion von A β -Peptid führt (Bird 2008).

Tab. 1 Übersicht mit den etablierten Alzheimer-Genen

Die Tabelle ist modifiziert nach (Bertram 2008). (*) Quelle: AD and FTD Mutations Database; <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/> (Stand: 20. Okt. 2013) Mutationen ohne einen pathologischen Effekt bzw. unklarer Natur sind ausgeschlossen.

Gen	Protein	Lokalisation	Mutationen * (Familien)	Molekularer Phentyp
APP	<i>β-amyloid precursor protein</i>	21q21.3	33 (90)	Anstieg des A β 42/A β 40-Quotienten Anstieg der A β -Produktion Anstieg der A β -Aggregation
PSEN1	<i>Presenilin 1</i>	14q24.3	185 (405)	Anstieg des A β 42/A β 40-Quotienten
PSEN2	<i>Presenilin 2</i>	1q31 - 42	13 (22)	Anstieg des A β 42/A β 40-Quotienten
APOE	<i>Apolipoprotein ϵ4-Allel</i>	19q13.32	unbekannt	Anstieg der A β -Aggregation Verminderung der A β -Clearance γ -Sekretase-Aktivität (?)

Im Rahmen von genomweiten Assoziationsstudien (*genome-wide association studies*, GWASs) und Meta-Analysen wurden außerdem mehrere Gene und Luci identifiziert, die mit EOAD und LOAD assoziiert sind. Hier sei erwähnt: CLU, PICALM, TNK1, ACE, TFAM,

CST3, IL1B, CR1, hCG2039140, SORL1, CHRN2, SORCS1, CD33, BIN1, ABCA7, CD2AP, EPHA1, MS4A6A/ MS4A4E, ATXN1, GSK3 β , DYRK1A, Tau, TOMM40 u. a. (Bertram *et al.* 2010, Sleegers *et al.* 2010, Ballard *et al.* 2011, Tanzi 2012), eine aktualisierte Liste mit den AD-assoziierten Genen findet man unter: <http://www.alzgene.org>. In den nachfolgenden Abschnitten wird ausschließlich auf die am besten untersuchten Gene und deren molekularen Phänotypen und pathophysiologischen Mechanismen eingegangen und die mit der vorliegenden Arbeit in direkter Verbindung stehen.

Histopathologische Veränderungen

Bereits Jahrzehnte vor dem Auftreten der klinischen Symptomatik haben histopathologische Prozesse schon begonnen. Die Alzheimer-Krankheit zeichnet sich durch drei markante Merkmale aus, die schon von Alois Alzheimer (1907) beschrieben wurden (Abb. 1.1). Erstens: die hauptsächlich extrazellulär vorkommenden körnigen Eiweißablagerungen, die zum großen Teil (ca. 90%) aus fibrillärem (8-10 nm) und nicht-fibrillärem β -Amyloid-Peptid bestehen – deshalb werden sie „ β -Amyloid-Ablagerungen“ bzw. „ $A\beta$ -Plaques“ genannt (Anderton 2002, Octave 2005). Man kann lichtmikroskopisch zwei Varianten von $A\beta$ -Plaques unterscheiden, die wiederum in Subtypen eingeteilt werden können: die neuritischen (senilen) Plaques und die nichtneuritischen (diffusen) Plaques. Die neuritischen Plaques sind charakteristisch für AD und bestehen aus einem dichten Amyloid-Kern umgeben von dystrophen Neuriten, reaktiven Astrozyten und aktivierten Mikrogliazellen (Selkoe 2001, Meyer-Luehmann *et al.* 2003). Neben β -Amyloid-Peptid kommen, in geringem Maß, andere Proteinkomponenten, wie Apolipoproteine, Proteoglykane, Vitronectin und Laminin vor (Dickson 1997, Monji *et al.* 2000, Diaz-Nido *et al.* 2002). Die diffusen Plaques sind hauptsächlich im Cerebellum zu treffen und nicht charakteristisch für AD, sie enthalten keinen $A\beta$ -Kern und sind kaum von pathologischen zellulären Veränderungen begleitet (Delaere *et al.* 1991, Yamaguchi *et al.* 1998). Zweitens: die hauptsächlich intrazellulär, im somato-dendritischen oder axonalen Kompartiment von Neuronen, aber auch extrazellulär vorkommenden faserigen Eiweißablagerungen, die als neurofibrilläre Bündel „*tangles*“ bezeichnet werden. Sie bestehen hauptsächlich aus hyperphosphoryliertem Protein Tau „ τ “ (Anderton 2002, Goedert and Spillantini 2006). Drittens: der Untergang von Nervenzellen (Neurone) und Synapsen, der sich makroskopisch durch verschmälerte Gyri, verbreiterte Sulci und insgesamt verminderte Hirnmasse sichtbar macht (Sjobeck *et al.* 2005). Besonders betroffen von diesen Veränderungen ist der Neokortex, Hippocampus, das limbische System sowie der subkortikal gelegene Nucleus basalis Meynert. Diesen Hirnregionen ist gemeinsam,

dass sie an Lern- und Gedächtnisprozessen, Sprache und weiteren kognitiven Funktionen beteiligt sind.

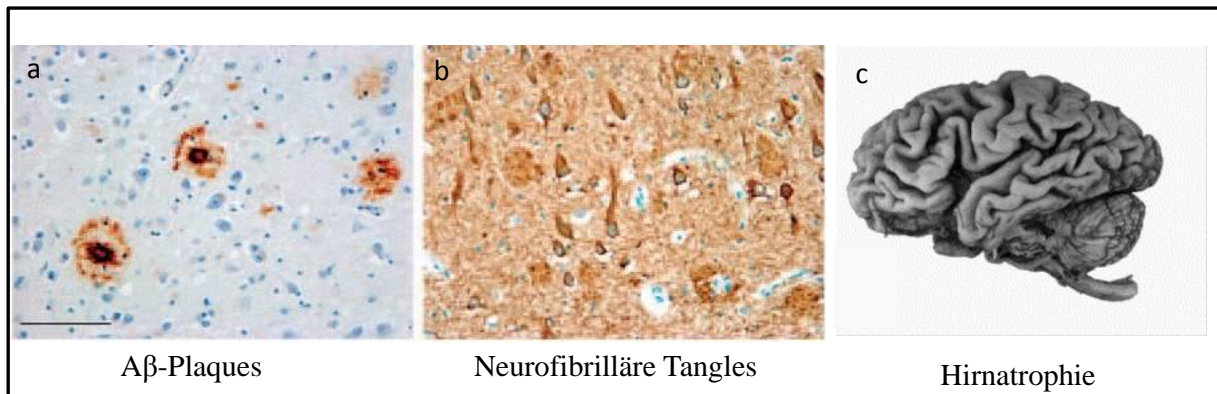


Abb. 1.1 Die pathologischen Merkmale der Alzheimer-Krankheit

(a) die hauptsächlich aus Amyloid-Peptid (β -Amyloid) bestehenden extrazellulären Eiweißablagerungen, (b) die neurofibrillären Bündel (*tangles*) in den Perikarya und Neuriten von Neuronen. (nach Haass and Selkoe 2007) (c) Hirnatrophie, erkennbar an den schmalen Windungen und verbreiterten Furchen (nach Kovari *et al.*, 2011).

Außerdem werden weitere Veränderungen beobachtet wie mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress, Störungen des intra- und interzellulären Transports, beeinträchtigte Kalzium-Homöostase, vaskuläre Prozesse wie z.B. Blut-Hirn-Schranken-Dysfunktion, immunologische Dysfunktion, Myelinscheiden-Degeneration und Degeneration cholinergischer Neurone sowie Neurone des Locus caeruleus. Ob solche Veränderungen maßgeblich charakteristisch für AD sind und in welchem Zusammenhang sie miteinander stehen, ist noch Gegenstand intensiver Forschung (zur Übersicht s. Jakob-Roetne and Jacobsen 2009, Sleegers *et al.* 2010, Armstrong 2013).

1.2 Die Amyloidhypothese

Die Amyloidhypothese ist seit den 90er Jahren der gängige Ansatz in der Alzheimer-Forschung (Abb. 1.2). Angelehnt an pathologischen, genetischen, zellbiologischen und experimentellen Beweisen besagt die Hypothese, dass die Hauptursache für die AD-Entstehung die Akkumulation von Amyloid- β -Peptid im zentralen Nervensystem ist. Im Allgemeinen kann die Akkumulation durch die Alterung, genetische Ursachen und/oder Umweltfaktoren verursacht werden. Näher betrachtet wird die A β -Akkumulation durch verstärkte A β -Produktion, Verschiebung der A β 42/40-Verhältnis zugunsten der fibrillären, aggregationsfreudigen A β 42-Form und/oder eine verminderte A β -Clearance. Dadurch oligomerisieren die A β -Peptide und bilden Aggregate, die sich extrazellulär ablagern. Als Reaktion darauf migrieren die Mikrogliazellen und die Astrozyten werden aktiviert, das löst

eine Entzündung und weitere pathologische Kaskaden aus, die letztendlich zur Neurodegeneration führen (Hardy 2006, Haass and Selkoe 2007).

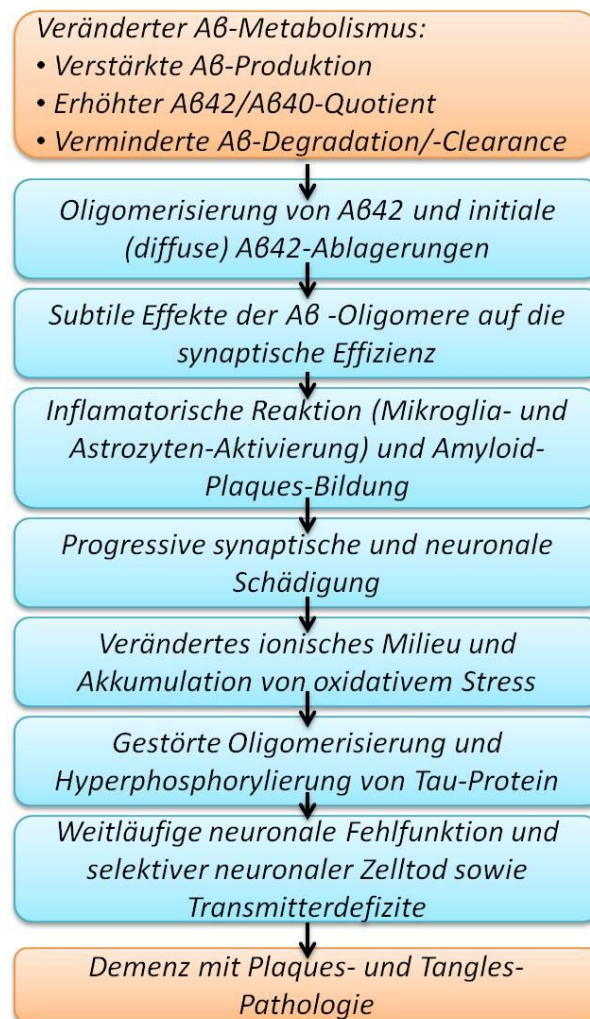


Abb. 1.2 Die Amyloidhypothese (nach Haass and Selkoe 2007)

Initial akkumulieren Aβ-Peptide aufgrund verstärkter Produktion, erhöhten Aβ42/Aβ40-Verhältnisses und/oder verminderter Beseitigung bzw. Clearance. Aβ42-Peptide oligomerisieren und bilden mikroskopisch sichtbare Ablagerungen. Das umliegende Gewebe reagiert mit Entzündung durch Mikroglia- und Astrozyten-Aktivierung. Infolgedessen werden die Neurone und Synapsen beschädigt. Im weiteren Verlauf resultiert oxidativer Stress, gestörtes Ionen-Milieu und gestörte Kinase- und Phosphatase-Aktivität, die eine Tau-Hyperphosphorylierung und somit Tangles-Bildung mit beeinträchtigtem axonalen Transport fördern. Die Endstrecke dieser Kaskade ist eine weitläufige neuronale Fehlfunktion mit Neurodegeneration und Transmitterdefiziten, resultierend in eine fortschreitende Demenz.

Bei mehr als 80% der AD-Patienten konnte postmortal eine Amyloid-Pathologie bestätigt werden, bei den restlichen 10 – 20% handelt es sich eher um falsch diagnostizierte Demenzen unterschiedlichen Ursprungs (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009). Dies liefert einen starken Beweis für die Amyloidhypothese. Allerdings bleibt daran zu kritisieren, dass keine Korrelation zwischen der Amyloidablagerungslast und der Schwere der Krankheit besteht

(Giannakopoulos *et al.* 2003), dass auch bei gesunden Menschen ausgedehnte Amyloidablagerungen nachzuweisen sind und dass der Neuronenverlust mit den A β -Plaques nicht kolokalisiert (Terry 1996, Schmitt *et al.* 2000, Priller *et al.* 2006). Die Vertreter der Amyloidhypothese interpretieren solche Beobachtungen als eine präklinische Stufe der Krankheit, in deren Verlauf die Schwere der Symptomatik durch A β -bedingte, sekundäre Pathomechanismen wie Tau-Veränderungen bestimmt wird. In „Braak-Stadien“ korreliert die Menge und Verteilung der neurofibrillären Bündel mit dem Grad des kognitiven Abbaus (Braak and Braak 1995). Außerdem zeigen neue Studien eine Korrelation zwischen den Gesamtmengen von A β 40 und A β 42 und der klinischen Demenzbewertung (CDR; *clinical dementia rating*), vor allem in frühen Krankheitsstadien (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009).

Ein weiterer Beweis für die Amyloidhypothese ist die Genetik von Alzheimer-Krankheit. Die Genmutationen, die einen frühen Ausbruch der Symptome hervorrufen (APP, PSEN1, PSEN2) d.h. EOAD bzw. der Polymorphismus, der einen zentralen Risikofaktor für LOAD darstellt (APOE), sind interessanterweise auf der einen oder anderen Art in die A β -Pathologie verwickelt. Obwohl diese Mutationen für weniger als 1% der AD-Fälle ursächlich sind, haben sie eine bedeutende Rolle für die Aufklärung der AD-Pathogenese in den vergangenen Jahren gespielt. APP-Gen kodiert für das β -Amyloid-Vorläuferprotein (APP), durch dessen Spaltung β -Amyloid-Peptid entsteht (Kang *et al.* 1987), PSEN1 und PSEN2 kodieren für die Proteine Präsenilin1 und Präsenilin2, die das katalytische Zentrum vom APP-prozessierenden Komplex „ γ -Sekretase“ bilden (Schellenberg *et al.* 1992, Levy-Lahad *et al.* 1995b, Rogaev *et al.* 1995). Zudem besitzen 50% der AD-Patienten die ϵ 4-Variante des ApoE-Gens, die für eine verstärkte Amyloidablagerung verantwortlich gemacht wird (zur Übersicht s. Corder *et al.* 1993, Bekris *et al.* 2010).

Der Hauptschwachpunkt in der Amyloidhypothese ist die fehlende Erklärung, wie A β -Ablagerungen ihre toxische Wirkung entfalten. Zusammen mit der fehlenden ermittelbaren Korrelation zwischen der A β -Menge und Verteilung auf der einen Seite und der Schwere der Krankheit auf der anderen Seite lässt das eine auszufüllende Lücke in diesem Ansatz. Durch Experimente an Tiermodellen, die einen Fortschritt in der AD-Forschung gebracht haben, wurde die Amyloidhypothese weiter modifiziert. Modifizierender Faktor in der AD-Pathogenese sind nicht mehr die mikroskopischen Plaques, sondern die kleinen, runden und löslichen A β -Oligomere (Lambert *et al.* 1998, Haass and Selkoe 2007). Dies wird unterstützt durch die Entdeckung, dass die Hemmung der Bildung von fibrillären A β -Aggregaten, nicht jedoch die Oligomerisierung, die Zelltoxizität nicht verhindert, im Gegenteil, sie ist erhöht;

das lässt sich durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der niedermolekularen Oligomere erklären (Oda *et al.* 1995). Da das lange A β 42-Peptid wegen seiner biochemischen Eigenschaften eine höhere Neigung zur Aggregatbildung mit sich und mit anderen Proteinen besitzt, spielt es eine entscheidende Rolle in der AD-Pathologie (Walsh and Selkoe 2004). Interessanterweise verursachen viele Mutationen in APP-, PSEN1- und PSEN2-Genen, die mit EOAD assoziiert sind, eine Steigerung des A β 42-Anteils (Citron *et al.* 1997). Weiterhin lässt sich im Gegensatz zu den fibrillären Aggregaten eine signifikante Korrelation zwischen den A β -Oligomeren und der kognitiven Beeinträchtigung nachweisen (Haass and Selkoe 2007).

In den nachfolgenden Abschnitten werden die an der A β -Entstehung beteiligten Proteine vorgestellt.

1.2.1 Amyloid- β -Peptid-Vorläuferprotein (*Amyloid Precursor Protein, APP*)

APP ist ein glykolysiertes Typ-I-Membranprotein, das eine große N-terminale extrazelluläre Domäne (Ektodomäne), eine Transmembrandomäne und eine kurze C-terminale intrazelluläre Domäne besitzt (Kang *et al.* 1987, zur Übersicht s. Selkoe 2001) (Abb. 1.3). Das APP-Gen ist auf dem langen Arm vom Chromosom 21 (21q21.3) lokalisiert und besteht aus 19 Exonen, bis auf Erythrozyten wird es in allen Körperzellen exprimiert. Durch alternatives Spleißen (Exone 7, 8 und 15) und verschiedene posttranslationale Modifikationen entstehen unterschiedliche APP-Isoformen, die bei der elektrophoretischen Auftrennung den Banden 110 – 140 kDa entsprechen (Selkoe 2001). Die häufigsten Isoformen sind APP695, APP751 und APP770. Die kürzeste Isoform APP695 wird fast ausschließlich in Neuronen exprimiert. Die anderen beiden Isoformen kommen vorwiegend in der Peripherie und Gliazellen vor und enthalten im Vergleich zu APP695 noch eine zusätzliche Domäne innerhalb der Ektodomäne, deren Sequenz ca. 45%ige Homologie zu den Kunitz Typ II Serin-Protease-Inhibitoren (KPI) aufweist und durch Exon 7 kodiert. Zusätzlich dazu enthält APP770 eine Domäne, die dem MRC OX-2 Antigen auf Thrombozyten ähnelt und durch Exon 8 kodiert wird (Kitaguchi *et al.* 1988, Tanzi *et al.* 1988, Wertkin *et al.* 1993, Selkoe *et al.* 2004). Alle Isoformen beinhalten die A β -Sequenz (1 – 43), 28 Aminosäuren (AS) davon sind extrazellulär, während die restlich 15 AS in der Transmembranregion lokalisiert sind (Kernekewisch 1998). Eine weitere APP-Isoform entsteht durch das Spleißen von Exon 15 und wird in peripheren Leukozyten und Mikroglia exprimiert, deshalb wird sie als Leukozyten-abgeleitetes APP (L-APP) genannt (Banati *et al.* 1993). Zur APP-Genfamilie gehören APP-ähnliche Proteine (*amyloid precursor like-proteins*) APLP1 (Wasco *et al.* 1992), APLP2 (Wasco *et al.* 1993)

sowie APPL in *Drosophila melanogaster* (Rosen *et al.* 1989) und APL-1 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Daigle and Li 1993). Diese besitzen jedoch keine A β -Region (Sandbrink *et al.* 1994).

Zu weiteren Bestandteilen von APP s. (Abb. 1.3). Als ein Membranprotein wird die APP-Synthese durch ein Signalpeptid (SP) in das endoplasmatische Retikulum (ER) eingeleitet. Während des Transports durch den Golgi-Apparat erfährt APP einige posttranslationale Modifikationen (Abb. 1.3). Der größte Anteil an APP verbleibt intrazellulär im Golgi-Apparat, während nur ein kleiner Teil verpackt in Vesikel zur Zellmembran transportiert wird. Das Membran-gebundene APP kann durch Endozytose internalisiert und abgebaut werden (Suzuki and Nakaya 2008).

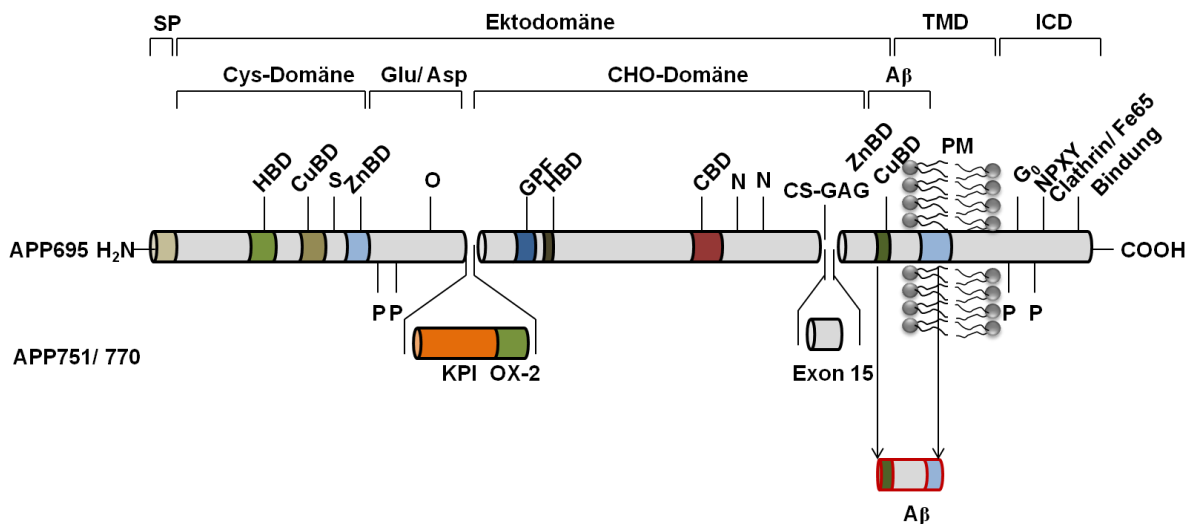


Abb. 1.3 Strukturelle und funktionelle Abschnitte des Amyloid-Vorläuferproteins (APP)

Dargestellt sind die Isoformen APP695, APP751, APP770 sowie das Exon 15. APP ist ein Typ-1-Transmembranprotein, das aus einer Ektodomäne, Transmembrandomäne (TMD) und einer intrazellulären Domäne (ICD) besteht. Das N-terminale, 17 AS-lange Signalpeptid (SP) leitet die APP-Translation ins ER ein. (PM, Plasmamembran; Cys-Domäne, Cystein-reiche Domäne; Glu/ Asp, sehr stark saure Domäne; CHO, Kohlenhydrat-Domäne; A β , Amyloid- β -Peptid; KPI, Kunitz-Serinprotease-Inhibitor-homologe Domäne; OX-2, MRC-OX-2-Antigen-homologe Domäne; HBD, Heparin-bindende Domäne; CuBD, Kupfer-bindende Domäne; ZnBD, Zink-bindende Domäne; GPF, wachstumsfördernder Faktor; CBD, Kollagen-bindende Domäne; CS-GAG, Chondroitinsulfat-Glukosaminoglykan; NPXY, NPXY-Konsensussequenz), posttranslationale Modifikationen (S, Tyrosin-Sulfatierung; O, O-Glykosylierung; N, N-Glykosylierung; P, Phosphorylierung)

Die physiologischen Funktionen von APP sind nur teilweise verstanden (zur Übersicht s. Reinhard *et al.* 2005). APP-knock-out Mäuse zeigen keine oder nur geringe Auffälligkeiten (Zheng *et al.* 1995), während Knock-out Mäuse für die gesamte APP-Familie (APP/ APLP1/ APLP2) im Rahmen von *triple knock out* Experimenten nach der Geburt nicht überleben und massive neurologische Defekte aufweisen (Herms *et al.* 2004). Das deutet auf eine essentielle

Rolle der APP-Familie in der Entwicklung von v. a. Nervensystem hin. Weitere Experimente haben eine wesentliche Rolle von APP im Zellwachstum und in der Synapsenbildung im ZNS gezeigt (Priller *et al.* 2006). Außerdem scheint APP in anderen Vorgängen wie Zelladhäsion (Soba *et al.* 2005), Zell-Zell-Interaktionen (Wang and Ha 2004), Endozytose und Hämostase (Chen *et al.* 1990, Smith *et al.* 1990, Selkoe *et al.* 2004) beteiligt zu sein. Neben seiner toxischen Wirkung wurde A β -Peptid eine physiologische Funktion bei der Lipid-Homöostase zugeschrieben (Grimm *et al.* 2005). Weiterhin ist APP bzw. seine Spaltungsprodukte vermutlich im axonalen Transport und intrazellulären Sortierungsprozess involviert, was noch umstritten ist (Lazarov *et al.* 2005). Die APP-intrazelluläre Domäne (AICD), die durch einen terminalen Spaltungsschritt entsteht, beeinflusst die Protein-Protein-Interaktionen und hat nach ihrer Translokation in den Zellkern einen Einfluss auf die Transkription einiger Gene (Cao and Sudhof 2001, von Rotz *et al.* 2004, zur Übersicht s. Pardossi-Piquard and Checler 2012).

Die Prozessierung von APP spielt eine immanente Rolle in der Alzheimer-Pathogenese, insofern das dabei entstehende A β -Peptid für die terminale Neurodegeneration und Demenz verantwortlich gemacht wird. APP kann unter Zusammenspiel von mindestens drei Enzymen (Sekretasen) auf zwei unterschiedlichen Wegen abgebaut werden; dem amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Weg (Abb. 1.4) (zur Übersicht s. Selkoe 2001, Pietrzik and Behl 2005, Dillen and Annaert 2006) . Unter physiologischen Bedingungen werden bis zu 90% der Membran-lokalisierten APPs nicht-amyloidogen prozessiert. Dabei wird APP in einem initialen Schritt durch eine α -Sekretase extrazellulär innerhalb des A β -Peptides gespalten; dadurch wird die Entstehung von A β verhindert. Durch diesen Schritt entsteht ein lösliches Fragment (sAPP α) (ca. 95 kDa) und ein intrazelluläres Fragment (C83 auch α CTF genannt; α -C-terminales Fragment) (ca. 10 kDa), das in einem zweiten Schritt von einem Enzymkomplex (γ -Sekretase) weiter in zwei Fragmente gespalten wird; das kurze Peptid (p3) (ca. 3 kDa) und den C-terminalen Rest (AICD, APP-intrazelluläre Domäne) (ca. 7 kDa).

Die amyloidogene Prozessierung findet in geringem Maß unter physiologischen und verstärkt unter pathologischen Bedingungen statt. Dabei spaltet eine β -Sekretase, auch BACE genannt (***β -site APP Cleaving Enzyme***), APP proteolytisch am N-Terminus des A β -Peptids, was in ein lösliches (sAPP β) und ein intrazelluläres Fragment (C99 auch β CTF genannt, β -C-terminales Fragment) (ca. 12 kDa) resultiert. Nachfolgend spaltet γ -Sekretase das β CTF (C99) innerhalb der Transmembrandomäne am C-Terminus des A β -Peptids, wodurch das ca. 4 kDa große A β -Peptid freigesetzt wird. Analog zur nicht-amyloidogenen Prozessierung entsteht auch eine

intrazelluläre Domäne (AICD). Da der γ -Sekretase-Komplex keine definierte Schnittstelle besitzt, entstehen unterschiedlich lange A β -Peptide (38 – 49 AS), wobei A β 40 und A β 42 die am häufigsten vorkommenden Spezies sind, in einem Verhältnis von 90% zu 10%. Bei APP-, PSEN1-, und PSEN2-Mutationen, die die familiäre Form von AD hervorrufen, kommt es zur Verschiebung der A β -Produktion zugunsten von A β 42, das eine höhere Neigung zur Aggregatbildung aufweist (Bertram 2008).

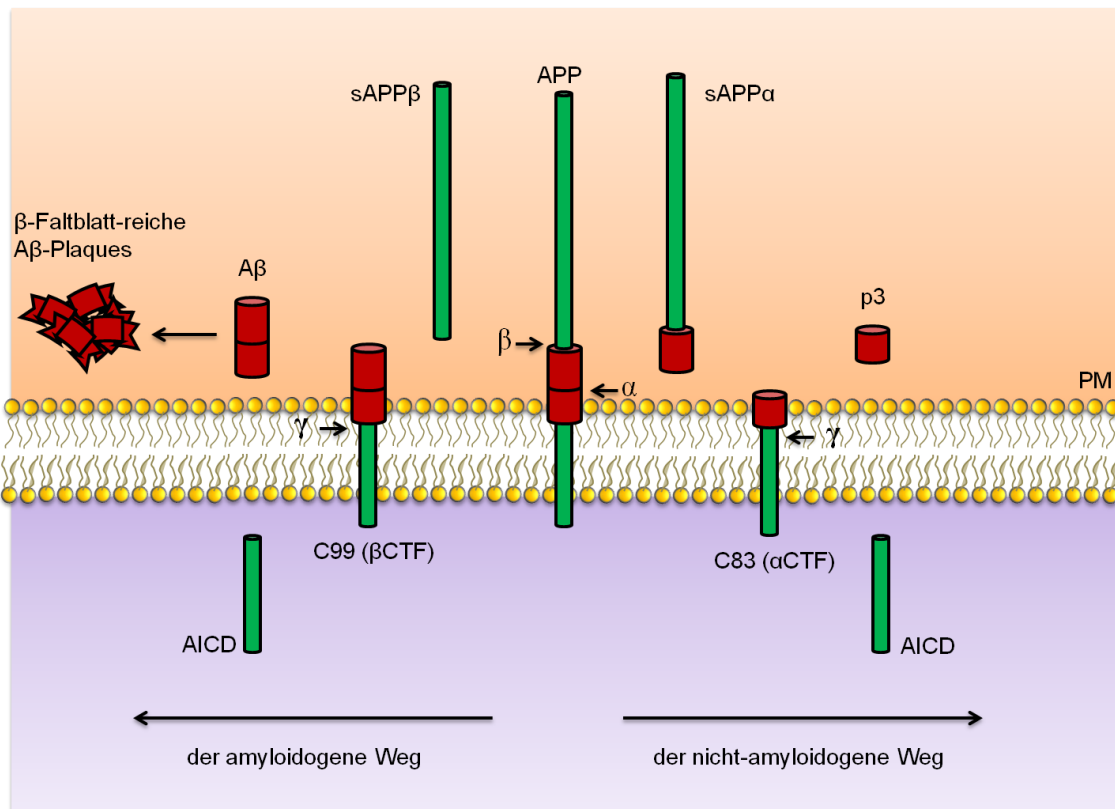


Abb. 1.4 Prozessierung von Amyloid-Vorläuferprotein (APP)

APP kann unter Bildung von A β (amyloidogen) bzw. ohne A β -Bildung (nicht-amyloidogen) prozessiert werden. Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung schneidet α -Sekretase APP innerhalb, bei der amyloidogenen schneidet die β -Sekretase APP am C-Terminus des A β -Peptids, der zweite Schritt wird bei beiden Prozessierungsarten durch die γ -Sekretase in der TMD vollendet. Durch den nicht-amyloidogenen Weg entsteht sAPP α , C83 (α CTF), p3 und AICD; durch den nicht-amyloidogenen Weg sAPP β , C99 (β CTF), A β und AICD. (PM=Plasmamembran)

APP-Mutationen, bei denen es sich meistens um Punktmutationen handelt, verursachen eine familiäre Form der Alzheimer-Krankheit (EOAD), wobei die Krankheitssymptome im Alter zwischen 45 und 65 auftreten. Bislang sind 33 Mutationen in 90 Familien bekannt (s. Tab. 1). Diese Mutationen liegen innerhalb der A β -Region oder in unmittelbarer Nähe der Sekretasen-Schnittstellen, wodurch die APP-Prozessierung beeinflusst wird. Es kommt zur verstärkten A β -Produktion und/oder Erhöhung des relativen Anteils an A β 42 (Selkoe 1996, Irie *et al.* 2005).

1.2.2 α -Sekretase

„Sekretase“ ist ein Oberbegriff für eine Gruppe von Proteasen, die für die Prozessierung von integralen Membranproteinen zuständig ist. APP-Prozessierung durch α -Sekretase verhindert die A β -Produktion. Neuen Studien zufolge gehören α -Sekretasen zu der ADAM-Familie (*A disintegrin and metalloproteinase*), von der bis jetzt ca. 38 Mitglieder in verschiedenen Spezies bekannt sind (Vingtdeux and Marambaud 2012). ADAMs bestehen aus einem Signalpeptid, das während der Biosynthese die Einschleusung in den sekretorischen Weg einleitet, einer Prodomäne, die für die geeignete Faltung zuständig ist und einer Metallodomäne, die das katalytische Zentrum enthält. Zudem enthalten sie eine Disintegrindomäne, eine Cystein-reiche Domäne, eine EGF (*epidermal growth factor*)-ähnlichen Domäne – außer ADAM10 und ADAM17 – einer Transmembrandomäne und eine intrazellulären Domäne (Edwards *et al.* 2008) (Abb. 1.5).

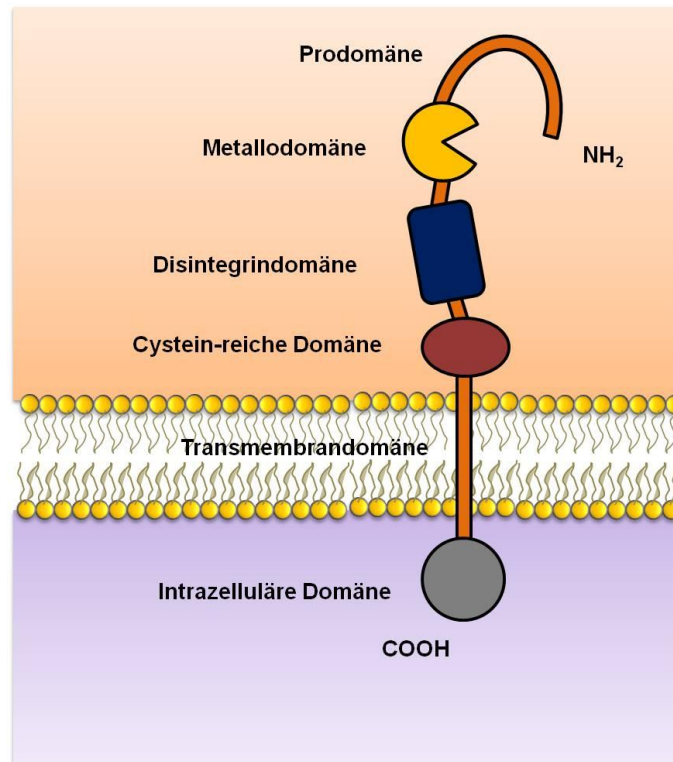


Abb. 1.5 Schematische Darstellung von ADAMs (*A disintegrin and metalloproteinase*)

Schematisch ist ein ADAM-Protein dargestellt. ADAMs sind Typ-I-Membranproteine, die aus einer Prodomäne, Metallodomäne, Disintegrindomäne, Cystein-reichen Domäne, Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne bestehen.

Zurzeit werden ADAM10, ADAM9 und ADAM17 als die APP-prozessierenden α -Sekretasen diskutiert, wobei zunehmende Beweise ADAM10 die entscheidende Rolle zuschreiben (Jorissen *et al.* 2010, Kuhn *et al.* 2010).

1.2.3 β -Sekretase

β -Sekretase, auch BACE-1 (*β -site of APP cleaving enzyme*) oder Memapsin-2 genannt, ist ein Typ-I-Membranprotein mit einer großen extrazellulären Domäne, die zwei katalytische Asparaginsäurereste enthält, einer Transmembrandomäne und einer kurzen intrazellulären Domäne (zur Übersicht s. Zacchetti *et al.* 2007, Sathya *et al.* 2012) (Abb. 1.6). Hauptsächlich wird β -Sekretase im ZNS exprimiert, aber auch in geringem Maß in der Peripherie. Eine andere Protease (BACE-2), die 64% Homologie zu BACE-1 zeigt, wurde beschrieben, die hauptsächlich in der Peripherie vorkommt und anscheinend weniger an der AD-Pathologie beteiligt ist (Yan *et al.* 1999, Jakob-Roetne and Jacobsen 2009). BACE-1 spaltet APP am N-Terminus von A β und initiiert somit die A β -Produktion. Ein Beweis dafür ist, dass in BACE-1-Knock-out-Mäusen die A β -Bildung vollständig verhindert werden konnte (Vassar 2005). Dies macht BACE-1 zu einem attraktiven Target für AD-Behandlung durch die Entwicklung von BACE-1-Inhibitoren. Außer APP hat BACE-1 andere Substrate, wie z.B. Sialyltransferase St6Gal I, P-Selectin-Glykoproteinliganden, APLP1, APLP2 und Neuregulin-1, was den Erfolg der pharmakologischen Hemmung von BACE-1 einschränkt (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009).

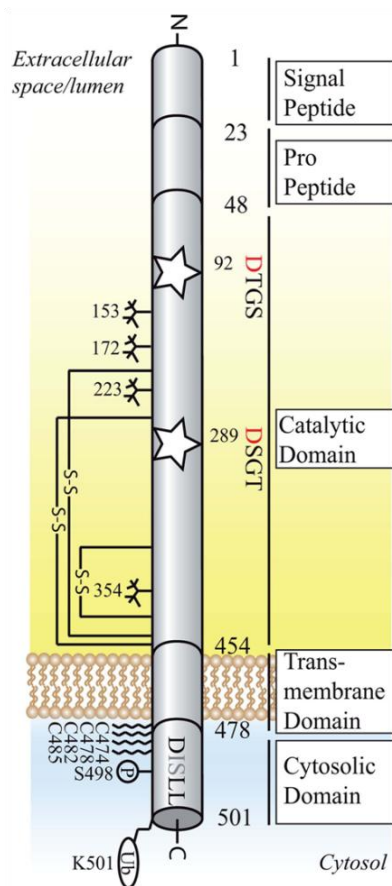


Abb. 1.6 Schematische Darstellung von BACE-1 (nach Dislich and Lichtenthaler 2012)

Die aktive, reife Form von BACE-1 besteht aus einem Propeptid, einer katalytischen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer zytosolischen Domäne. Das aktive Zentrum beinhaltet die Motive DTGS (92 – 95) und DSGT (289- 292). DISLL-Motiv in der intrazellulären Domäne dient als endosomales Targetting-Signal, als Bäume sind außerdem die Glykosylierungen angezeigt, S-S, Disulfidbrücken; P, Phosphorylierung; Ub, Ubiquitinierungsseite

1.2.4 γ -Sekretase

Die γ -Sekretase ist eine Aspartatprotease, die sich durch bestimmte Charakteristika von anderen Proteasen unterscheidet: Sie ist nämlich in der Lage, ihre Substrate in der hydrophoben Umgebung der Plasmamembran zu spalten und ist selber über mehrere Transmembrandomänen in der Zellmembran verankert (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009). Die Besonderheit beim ersten Punkt besteht darin, dass erstens für die hydrolytische Proteolyse Wassermoleküle benötigt werden und zweitens die zu spaltende Peptidbindung des Substrates der Proteolyse zuerst zugänglich gemacht werden muss; beides ist in einer hydrophoben Umgebung erschwert. Außerdem ist γ -Sekretase ein hochmolekularer Komplex bestehend aus mindestens vier unterschiedlichen Proteinen, nämlich Präsenilin 1 oder 2 (PS1 oder PS2), Nicastrin (Nct), *anterior pharynx defective-1* (Aph-1) und *presenilin enhancer 2* (PEN-2) (Abb. 1.7) (zur Übersicht s. De Strooper and Annaert 2010).

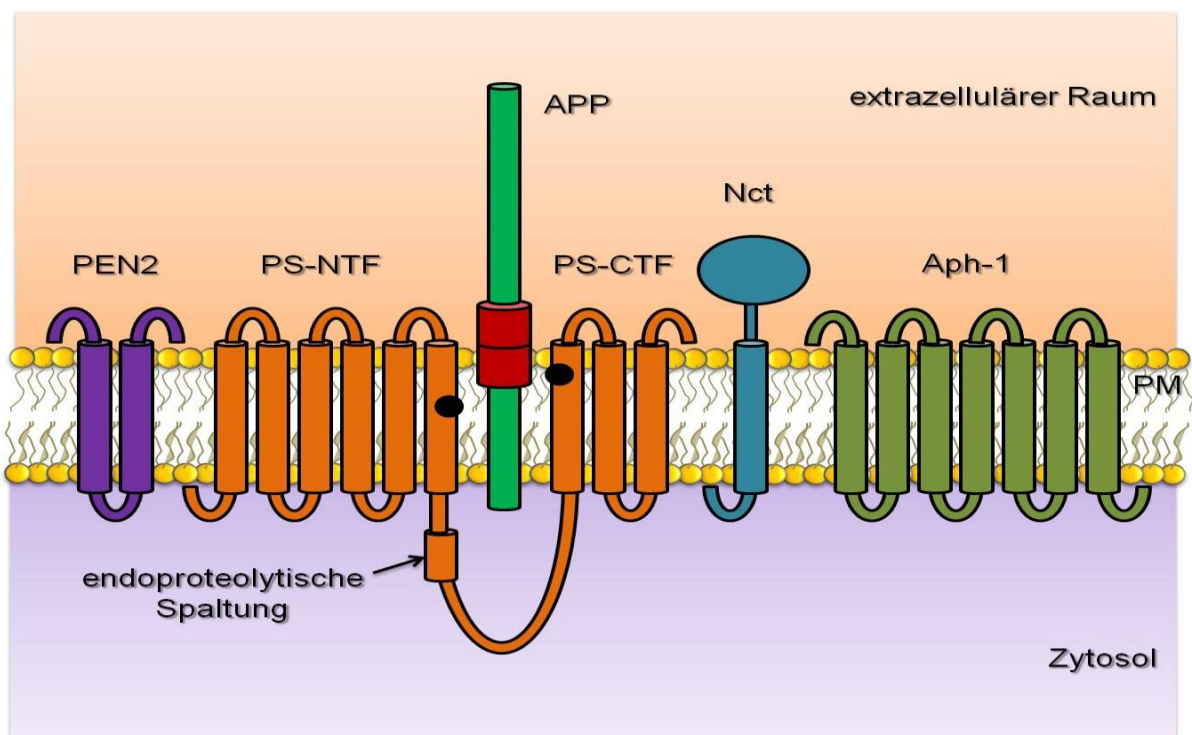


Abb. 1.7 Schematische Darstellung des γ -Sekretase-Komplexes

γ -Sekretase ist ein in der Zellmembran (PM) eingebetteter Enzymkomplex aus vier einzelnen Proteinen: Präsenilin (PS), das zu dessen Aktivierung innerhalb der zytosolischen Schleife in zwei Fragmente gespalten wird, das N-terminale Fragment (NTF) und das C-terminale Fragment (CTF), Nicastrin (Nct), *anterior pharynx defective-1* (Aph-1) und *presenilin enhancer-2* (PEN2). Die Substrate von γ -Sekretase sind typischerweise Typ-I-Membranproteine, als Beispiel ist das Amyloid-Vorläuferprotein (APP) dargestellt. Die katalytischen Aspartatreste sind durch schwarze Punkte in der sechsten und siebten Transmembrandomäne von Präsenilin markiert.

Das katalytische Zentrum wird von Präsenilin 1 oder 2 gebildet. Nicastrin (Nct) ist ein 130 kDa Typ-I-Membranprotein mit einer großen, glykosylierten, extrazellulären Ektodomäne. Es selber besitzt keine katalytische Aktivität, ist jedoch essenziell für die Zusammenlagerung und Stabilisierung vom γ -Sekretase-Komplex (Chavez-Gutierrez *et al.* 2008). Außerdem wird diskutiert, ob es als Substratrezeptor durch seine extrazelluläre Domäne fungiert (De Strooper 2005, Shah *et al.* 2005, Chavez-Gutierrez *et al.* 2008). Aph-1 („*anterior pharynx defective-1*“) ist ein ca. 30 kDa großes Protein mit sieben Transmembrandomänen (Goutte *et al.* 2002). Beim Menschen kodieren für Aph-1 zwei Gene auf den Chromosomen 1 und 15, deren Sequenz sich bis zu 56% unterscheiden; APH-1a und APH-1b. Zudem können durch alternatives Spleißen zwei Aph-1a-Formen entstehen; Aph-1a^S (für „*short*“) und Aph-1a^L (für „*long*“) (Gu *et al.* 2003). Durch seine Interaktion mit den anderen γ -Sekretase-Komponenten dient Aph-1 der Assemblierung und Stabilisierung des Komplexes (Lee *et al.* 2002, Dries and Yu 2008). PEN-2 („*presenilin enhancer-2*“) ist ein ca. 12 kDa großes Protein mit zwei Transmembrandomänen, wobei sich sowohl der C-Terminus als auch der N-Terminus extrazellulär befinden (Francis *et al.* 2002). PEN-2 ist essenziell für die γ -Sekretase-Aktivität, da es die PS-Endoproteolyse ermöglicht, die dabei entstehenden Fragmente stabilisiert und der Reifung des Komplexes dient (zur Übersicht s. Dries and Yu 2008).

Alle vier Komponenten sind notwendig und hinreichend für eine aktive γ -Sekretase, in einer Stöchiometrie von 1:1:1:1 (De Strooper 2003). Da es sich bei den vier Proteinen um Membranproteine handelt, wird ihre Translation und somit die Bildung des γ -Sekretase-Komplexes im endoplasmatischen Retikulum (ER) eingeleitet und dann im zellulären Kompartiment zwischen ER und Golgi-Apparat fortgesetzt. Als erstes bildet das unreife, teilweise glykolysierte Nct mit Aph-1 einen Subkomplex, zu dem folglich PS kommt. In diesem Triple-Protein-Komplex wird Nct vollständig glykosyliert. Durch die Bindung von PEN-2 wird eine Endoproteolyse von PS innerhalb der zytoplasmatischen Schleife zwischen dem sechsten und siebten TMD induziert. Dadurch entstehen ein C-terminales (CTF) und ein N-terminales Fragment (NTF), welche jeweils einen katalytisch aktiven Aspartatrest enthalten (Position 257 und 385). Erst an der Zellmembran wird γ -Sekretase aktiv, wobei zunehmende Beweise dafür sprechen, dass sie ihre Aktivität zum großen Teil erst im späten Endosomen-Sortierungskompartiment entfaltet, nämlich in den späten Endosomen, multivaskulären Körperchen und Lysosomen (Dries and Yu 2008, De Strooper and Annaert 2010). Während 95% aller γ -Sekretase-Komplexe zwischen ER und Golgi-Apparat pendeln, üben nur 5% ihre Aktivität an der Zellmembran bzw. im späten Endosomen-Sortierungskompartiment aus. Die γ -Sekretase-Aktivität unterliegt komplexen Regulationsmechanismen, die entweder die

Assemblierung, die endogene Aktivierung, die Lokalisation und Degradation oder die Interaktion von γ -Sekretase mit ihren Substraten beeinflussen. Daran sind sowohl γ -Sekretase-Mitglieder selbst, als auch andere Proteine wie Glykogensynthasekinase 3 β (GSK3 β), Phospholipase D1 (PLD1), γ -Sekretase-aktivierendes Protein (GSAP), *retrieval to endoplasmatic reticulum 1 protein* (Rer1p), CD147 und *transmembrane trafficking protein 21* (TMP-21) beteiligt (Dries and Yu 2008, De Strooper and Annaert 2010).

Bislang sind mindestens 60 verschiedene Substrate für γ -Sekretase bekannt, darunter APP, APLP 1 und 2, Notch, ErbB4, CD44, E- und N-Cadherine, Nectin 1 α und LDL-*receptor-related protein* (LDLR) (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009, De Strooper and Annaert 2010). Der neuartige proteolytische Mechanismus, bei dem die Protease ihre Substrate innerhalb der Zellmembran spaltet, wird als „regulierte intramembranöse Proteolyse“ (RIP) bezeichnet. Mittlerweile sind mehrere Proteasen der Klasse Metalloproteasen, Serinproteasen, Aspartatproteasen, wie γ -Sekretase, aber auch Proteasen ohne Sequenzhomologien zu den zytosolischen Proteasen, bekannt, die demselben Mechanismus folgen (Wolfe and Kopan 2004).

γ -Sekretase scheint keine definierte Sequenz für die Spaltung ihrer Substrate zu besitzen. Im Falle von APP entstehen dadurch unterschiedlich lange A β -Fragmente. Als Erklärung für dieses Verhalten wurde die durch eine Reihe von Experimenten bewiesene Tripeptid-Hypothese aufgestellt. Demzufolge wird das durch BACE-1 entstandene, 99 AS-lange β CTF (C99) durch γ -Sekretase schrittweise prozessiert (Abb. 1.8). In einem ersten und entscheidenden Schritt, dem sogenannten ϵ -Schnitt, schneidet γ -Sekretase β CTF an der Position 48 bzw. 49, dadurch entstehen A β 48 bzw. A β 49 und ihre korrespondierenden AICDs (AICD49-99 bzw. AICD50-99) (Gu *et al.* 2001). Da APP in der Zellmembran als α -Helix vorliegt und jede Windung davon aus 3,6 AS besteht, wird APP, laut der Tripeptide-Hypothese, von γ -Sekretase an jeder Windung gespalten (Yagishita *et al.* 2006). Als Resultat entstehen konsekutiv aus A β 48 und A β 49 kleinere, um drei (bzw. vier) Aminosäuren verkürzte A β -Fragmente: aus A β 48 entstehen A β 45, A β 42, A β 39/38 und aus A β 49 entstehen A β 46, A β 43, A β 40, A β 37. Der zweite Schnitt wird als ζ -Schnitt und die weiteren als γ -Schnitte bezeichnet (Takami *et al.* 2009).

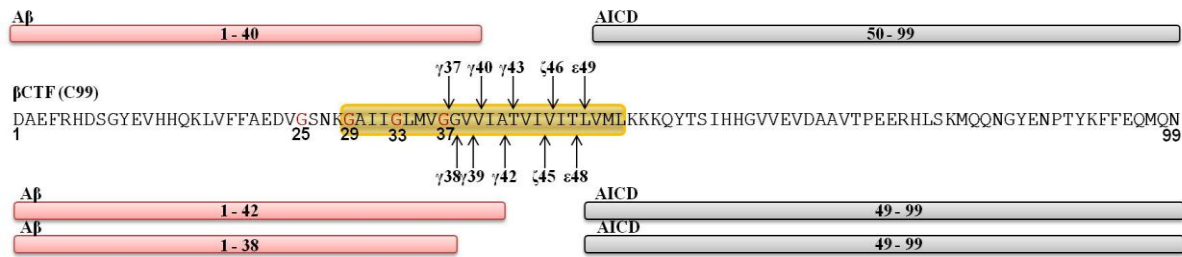


Abb. 1.8 Sequenzielle Proteolyse von β CTF (C99) durch γ -Sekretase und die Entstehung verschiedener A β -Spezies

Initial wird β CTF von γ -Sekretase an der Stelle ϵ (entweder 48 oder 49) gespalten, dadurch entstehen zwei Fragmente (A β und AICD). Dann wird A β in Abstand von drei bis vier AS von der ϵ -Stelle weiter gespalten, aus A β 49 werden A β 46, A β 43, A β 40 und A β 37, aus A β 48 A β 45, A β 42 und A β 39/38 gebildet. Die Transmembrandomäne sowie die GxxxG-Motive sind markiert.

Ein alternativer Ansatz wurde von Munter *et al.*, 2007 aufgestellt, nach dem β CTF durch ein GxxxG-Motiv dimerisiert und in einem Dimerisierungszustand von γ -Sekretase gespalten wird (Munter *et al.* 2007, Kienlen-Campard *et al.* 2008).

Wie eingangs erwähnt bedingen die Mutationen in APP-, PS1- und PS2-Genen einen früheren Ausbruch und drastischen Verlauf von AD bei den Betroffenen. Es stellt sich allerdings die zentrale Frage, die sowohl für das Verständnis als auch für das therapeutische Vorgehen von AD von essenzieller Bedeutung ist, nämlich was ist die Kinetik, durch die diese vielen, zum Teil phenotypisch unterschiedlichen Mutationen die Krankheit verursachen? Handelt es sich dabei um *gain-of-function*- oder *loss-of-function*-Mutationen? Anfangs hat die Feststellung von A β -Ablagerungen und dem relativen Anstieg von A β 42 im Vergleich zu A β 40 zur Annahme geführt, dass solche Mutation *gain-of-function* hervorbringen (Hardy and Selkoe 2002, Jakob-Roetne and Jacobsen 2009). Weitere Studien haben gezeigt, dass die Mutationen nicht notwendigerweise mit einer erhöhten A β 42-Produktion verbunden sind; sie können z.B. den A β 40-Anteil allein senken. Einige Mutationen reduzieren sogar eins oder beide Produkte. Das führte zur Gegenhypothese, nämlich, dass es sich um *loss-of-function*-Mutationen handelt, die zum einen zur Akkumulation von unprozessierten Produkten und zum anderen zur gestörten intrazellulären Signalweiterleitung führen (Shen and Kelleher 2007, Kelleher and Shen 2010). Aufbauend auf neueren Studien ging man davon aus, dass die AD-Pathogenese durch eine Kombination von *loss-of-function*-Prozessierung von APP und einer abnormalen Produktion von A β bedingt ist (De Strooper 2007, Wolfe 2007). Chavez-Gutierrez *et al.*, 2012 lieferten einen neuen, interessanten Ansatz, der besagt, dass die qualitativen Veränderungen in der A β -Produktion die übergeordnete Rolle über die quantitativen haben und somit sich von der klassischen Amyloid-Hypothese, die die quantitative Akkumulation von A β in den Vordergrund stellt, abhebt. Demzufolge

beeinflussen die Mutationen γ -Sekretase-Aktivität qualitativ auf drei Ebenen: eine variable Inhibition der initialen ε -Spaltung (Abb. 1.8), Beeinträchtigung des vierten Spaltungsschritts in beiden Prozessierungslinien (A β 49>A β 40 und A β 48>A β 38) und Verschiebung der ε -Schnittstelle durch APP-Mutationen resultierend in eine relativ verstärkte Spaltung der Linie (A β 48 > A β 38) (Chavez-Gutierrez *et al.* 2012).

1.2.5 Präseniline

Präseniline (PS1 und PS2) sind Transmembranproteine und werden auf dem Chromosom 14 (PSEN-1) bzw. 1 (PSEN-2) kodiert, sie bestehen aus 467 (PS1) bzw. 448 Aminosäuren (PS2). Mit 185 Mutationen im PSEN-1 und 13 im PSEN-2 sind die meisten Alzheimer-verursachenden Mutationen auf den PS-Genen lokalisiert, v. a. PS1 (<http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations/> ; Stand 12.2013). Präseniline bestehen aus sechs bis neun Transmembrandomänen, wobei sich zwischen dem sechsten und siebten TMD eine hydrophile, ins Zytosol gerichtete Schleife befindet (Levy-Lahad *et al.* 1995b, Rogaev *et al.* 1995, Sherrington *et al.* 1995, Doan *et al.* 1996, De Strooper *et al.* 1997, Spasic *et al.* 2006) (Abb. 1.9). Beide Präseniline sind bis zu 65% identisch, wobei das N-terminale Ende und der C-terminale Abschnitt der hydrophilen, zytosolischen Schleife schwach konserviert sind (Laudon *et al.* 2005, Spasic *et al.* 2006). Während PS1 ubiquitär exprimiert wird, kommt PS2 hauptsächlich im peripheren Gewebe und nur in geringen Mengen im Gehirn vor (Tandon and Fraser 2002). Neuere Studien zeigen, dass die Mehrzahl von γ -Sekretase sowohl im Gehirn, in der Milz als auch im Thymus PS1 beinhalten (Borgegard *et al.* 2012). Außerdem wird die A β -Produktion im ZNS überwiegend von PS1 katalysiert (De Strooper *et al.* 1998, Borgegard *et al.* 2012). Anscheinend spielt PS1 die wichtigere Rolle und sein Verlust kann nur in geringem Maß durch PS2 kompensiert werden (Brunkan and Goate 2005, Borgegard *et al.* 2012). Während Mäuse-Embryonen, denen das PS1-Gen fehlt kurz nach der Geburt sterben, da die für die embryonale Entwicklung essenzielle, durch γ -Sekretase gesteuerte Notch-Signaltransduktion gestört ist, entwickeln adulte Tiere, bei denen das PS1-Gen inaktiviert wird, Gedächtnisstörungen und Neurodegeneration (Selkoe and Kopan 2003, Saura *et al.* 2004, Elder *et al.* 2010).

Präseniline werden im ER synthetisiert und posttranslational weder glykosyliert, noch sulfatiert, noch acyliert, jedoch möglicherweise phosphoryliert (De Strooper *et al.* 1997, Seeger *et al.* 1997, Walter *et al.* 1997). Das unreife Präsenilin ist ca. 52 kDa groß und wird zum großen Teil schnell abgebaut und nur eine geringe Menge davon wird bereits im ER einer proteolytischen Prozessierung unterzogen. Diese Proteolyse findet an der α -Helix-

Struktur innerhalb der hydrophilen Schleife, zwischen dem sechsten und siebten TMD, statt; aus dem 52 kDa (*full-length* PS) großen Holoprotein entsteht ein ca. 30 kDa großes N-terminales Fragment (NTF) und ein ca. 20 kDa großes C-terminales Fragment (CTF), beide Fragmente haben eine längere Halbwertszeit. Normalerweise ist diese Endoproteolyse eine Voraussetzung für die katalytische Aktivität (Thinakaran *et al.* 1996, Podlisny *et al.* 1997, Haass and Selkoe 1998, Jacobsen *et al.* 1999, Steiner *et al.* 1999b, Zhang *et al.* 2000, Selkoe and Kopan 2003, Brunkan and Goate 2005). PS1 enthält zwei katalytische Aspartatreste (D257 und D385), die für die γ -Sekretase-Aktivität entscheidend sind. Sie katalysieren sowohl die Spaltung verschiedener γ -Sekretase-Substrate als auch ihre eigene Endoproteolyse (Haass and De Strooper 1999, Wolfe *et al.* 1999a, Wolfe *et al.* 1999b, Wolfe *et al.* 1999c, Kimberly *et al.* 2000, Li *et al.* 2000).

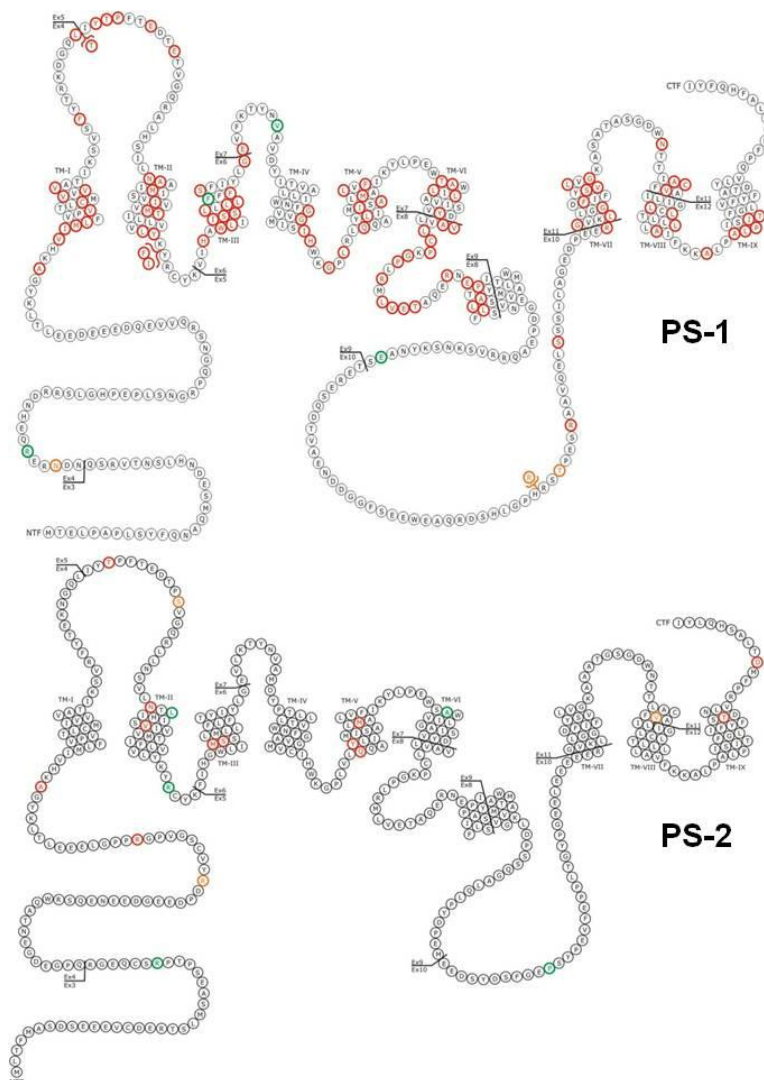


Abb. 1.9 Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von PS1 und PS2

Angezeigt ist das 9-TMD-Modell von beiden Präsenilinen (nach <http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations/>, Stand 12.2013). Die Exons-Grenzen sind markiert. In rot sind die pathologischen Mutationen angezeigt, in grün die, die keinen pathologischen Effekt haben.

Als das katalytische Zentrum des γ -Sekretase-Komplexes spielt PS die überhaupt wichtigste Rolle bei der Prozessierung folgender Proteine: Notch, APP, ErbB4, CD44, E- und N-Cadherine, LDLR und andere (Jakob-Roetne and Jacobsen 2009, De Strooper and Annaert 2010). Bei der Prozessierung solcher Proteine handelt es sich meistens um eine „regulierte intramembranöse Proteolyse“ (RIP), wobei eine Ektodomäne und eine intrazelluläre Domäne (ICD) des Membranproteins freigesetzt werden (für die Prozessierung von APP und den Prozessierungsmechanismus s. 1.2.1 oben.). Wie bei APP wird Notch zuerst durch eine Furin-ähnliche Protease extrazellulär gespalten. In diesem Zustand ist Notch in der Lage sein Ligand zu binden; nachdem der Ligand gebunden hat, wird Notch durch eine Protease der ADAM-Familie extrazellulär nah der Zellmembran nochmal gespalten. Das dadurch entstandene NEXT-Fragment (*Notch extracellular truncation*) ist dann ein direktes Substrat der γ -Sekretase. Ähnlich wie bei APP wird Notch durch γ -Sekretase schrittweise gespalten, wodurch unterschiedlich lange N β -Peptide und eine intrazelluläre Domäne (NICD) gebildet werden. NICD wandert in den Zellkern und interagiert mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die für die Transkription essentieller Gene verantwortlich sind (Selkoe and Kopan 2003, De Strooper and Annaert 2010). Deshalb sind die durch den PSEN-1-Verlust hervorgerufenen Beeinträchtigungen, vor allem in der Embryonalentwicklung, auf die gestörte Notch-Signaltransduktion zurückzuführen (Shen *et al.* 1997, Selkoe and Kopan 2003, Tournoy *et al.* 2004). Außerdem stellt die Notch-Signaltransduktion ein Limitierungsfaktor für die Dosis von γ -Sekretase-Inhibitoren in der Alzheimer-Therapie dar (Milano *et al.* 2004, Li *et al.* 2007, Borgegard *et al.* 2012).

PS1 bildet Komplexe mit E- und N-Cadherin und α - und β -Catenin und trägt dabei zu den Zellkontakten (*adherence junctions*) bei (Georgakopoulos *et al.* 1999, Baki *et al.* 2001). E-Cadherin spielt eine wichtige Rolle in Zell-Zell-Adhäsionen und Differenzierung von Zellen. Durch Apoptose oder den Einstrom von Kalzium (Ca^{2+}) spaltet γ -Sekretase E-Cadherin an der Grenze zwischen der transmembranen und intrazellulären Domäne. Dadurch wird der Zellkontakt abgebaut, E-CadICD sowie α - und β -Catenin werden intrazellulär freigesetzt (Marambaud *et al.* 2002, Ferber *et al.* 2008). In ähnlicher Weise ist N-Cadherin für die Kontakte exzitatorischer Synapsen im Hippocampus von Bedeutung. N-Cadherin-Spaltung durch γ -Sekretase wird durch NMDA-Agonisten stimuliert. Da N-Cadherin essenziell für die Struktur und Funktion von Synapsen ist, können solche proteolytische Prozesse die Langzeit-Potenzierung, Lernen und Gedächtnis beeinflussen. Auch hier werden N-CadhICD, α - und β -Catenin freigesetzt (Marambaud *et al.* 2003, Uemura *et al.* 2006). E-CadICD wurde als Regulator der p120(δ -Catenin)-Kaiso-vermittelten Signalweiterleitung in den Zellkern

beschrieben (Ferber *et al.* 2008), das N-CadICD bindet an den Transkriptionsfaktor CBP und vermittelt seinen proteosomalen Abbau, dadurch wird die CRE-abhängige Transaktivierung inhibiert. Somit dient PS1 als Repressor der CBP/CREB-vermittelten Transkription. Das lässt vermuten, dass PS1-Mutationen eine gesteigerte CBP/CREB-vermittelte Transkription nach sich zieht, was möglicherweise die Demenz verursacht (Marambaud *et al.* 2003). Zusammenfassend kann man die Effekte der Cadherine-Spaltung durch γ -Sekretase in drei Folgen betrachten; erstens Abbau der Zellkontakte, zweitens Signalweiterleitung in den Kern und drittens die Erhöhung der zytosolischen β -Catenin-Konzentrationen.

β -Catenin ist sowohl ein Teil des Cadherin-Komplexes, als eine wichtige Zelladhäsion (s. oben), als auch ein Teil des Wnt-Rezeptor-Komplexes, als ein biologisch zentraler Signalweg der Embryogenese und Entwicklung bestimmter Zellen. Zunehmende Beweise sprechen für vielfältige gegenseitige Wirkung beider Komplexe durch β -Catenin (Nelson and Nusse 2004, Heuberger and Birchmeier 2010). Während der Wnt-Signaltransduktion erfüllt β -Catenin die Aufgabe eines Second-Messengers. In Abwesenheit von Wnt ist β -Catenin an einem „Zerstörungskomplex“ gebunden, dieser Komplex besteht aus *adenomatous polyposis coli protein* (APC), Axin, *glykogen synthase kinase 3* (GSK-3) und *casein kinase I* (CKI). CKI phosphoryliert β -Catenin am Serinrest 45 (P-45); in einem zweiten Schritt wird β -Catenin durch GSK-3 an den Positionen 41, 37 und 33 (P-33/37/41) phosphoryliert. Desweiteren wird das phosphorylierte β -Catenin ubiquitiniert und proteosomal abgebaut. Wenn Wnt an seinen Rezeptor Frizzled (Fz) und Korezeptor LRP5/6 bindet, zerfällt der Komplex und β -Catenin wird freigesetzt. Ähnlich wie bei der Freisetzung von β -Catenin aus dem E-/N-Cadherin-Komplex bewirkt der erhöhte zytosolische β -Catenin-Pool seine Translokation in den Zellkern, wo es, interagiert mit *T-cell factor* und *lymphoid enhancer factor 1* (TCF/LEF1) und anderen Proteinen, bestimmte Wnt-Zielgene, wie c-Myc, MMP3, MMP7, ADAM10, Twist, Slug, Tiam1, cyclinD1, fibronectin und In5-g2 aktiviert (Cadigan and Peifer 2009, Taelman *et al.* 2010, Clevers and Nusse 2012, Fagotto 2013). Dysregulation innerhalb dieser Signalweiterleitung, wie z. B. Mutationen im APC-, Axin- oder β -Catenin-Gen, ist mit Fehldifferenzierung und Entwicklung bestimmter Tumore, vor allem im dermalen, intestinalen und hämatopoetischen System sowie in neuronalen und embryonalen Stammzellen assoziiert (Logan and Nusse 2004, Reya and Clevers 2005). PS1 kann die β -Catenin Signalweiterleitung negativ regulieren, indem es den zweiten Schritt der β -Catenin-Phosphorylierung (P-33/37/41) ermöglicht (Killick *et al.* 2001, Soriano *et al.* 2001, Xia *et al.* 2001, Kang *et al.* 2002, Prager *et al.* 2007, Dobrowolski *et al.* 2012). Zusammengefasst kann PS1 β -Catenin durch drei mögliche Wege beeinflussen; erstens PS bildet und stabilisiert den

β -Catenin enthaltenden E-/N-Cadherin-Komplex, zweitens setzt PS1 durch E-/N-Cadherin-Spaltung β -Catenin frei und drittens unterstützt PS1 den Abbau von β -Catenin in der Abwesenheit von Wnt.

Ob die oben beschriebene Interaktion zwischen PS1 und β -Catenin γ -Sekretase-abhängig ist, oder eine selbstständige Aktivität von PS1 darstellt, ist noch Gegenstand kontroverser Diskussionen. Es wurden PS weitere γ -Sekretase-unabhängige Funktionen zugeschrieben, die allerdings wie das β -Catenin-Beispiel noch umstritten sind (Brunkan and Goate 2005, De Strooper and Annaert 2010). PS1 scheint eine Rolle im Rahmen von Proteintransport und – Turnover (Esselens *et al.* 2004, Wilson *et al.* 2004) sowie bei der Reifung von der ATPase-Protonenpumpe (Lee *et al.* 2010) zu spielen. Außerdem ist PS1 in der Kalzium-Homöostase involviert. Schon bevor man die PSEN-Gene identifizieren konnte, stellte man einen dysregulierten Kalzium-Haushalt bei AD-Patienten fest (Ito *et al.* 1994). Verschiedene Mechanismen werden diskutiert, darunter die Möglichkeit, dass die A β -Oligomere die Membranpermeabilität für Ca^{2+} erhöhen und dass PS1 die am ER lokalisierten, für den Ca^{2+} -Transport zuständigen Kanäle und Transporter wie RyR (**R**yanodine **r**eceptor), IP₃R (*i*nositol-1,4,5-**t**riphosphat **r**eceptor) und SERCA (*s*arco/*e*ndoplasmatic *r*eticulum *c*alcium *A*TPase), beeinflussen kann. PS wurde sogar als ein Ionenkanal am ER beschrieben. Begleitend zu bzw. als Endergebnis von diesen Prozessen findet man funktionsgestörte Mitochondrien. Solche Mechanismen führen letztendlich zur Apoptose und somit zur Neurodegeneration, einige davon werden jedoch als kompensatorisch und neuroprotektiv angesehen (zur Übersicht s. De Strooper and Annaert 2010, Supnet and Bezprozvanny 2010).

Bei den meisten PS-Mutationen handelt es sich um die Substitution einzelner Aminosäuren (Missense-Mutationen). Es ist bemerkenswert, dass die Mutationen zum großen Teil innerhalb der TMDs, v. a. 2 und 6 sowie der hydrophilen Schleife, vorkommen (zur Übersicht: <http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations/> ; Brunkan and Goate 2005, Larner and Doran 2006, Jayadev *et al.* 2010). Wie die PS-Mutationen die Entstehung von Alzheimer-Krankheit verursachen, wird durch verschiedene Ansätze erklärt (s. oben). Grund hierfür ist, dass sich die PS-Mutationen phenotypisch und pathologisch unterschiedlich verhalten. Man kann die bis jetzt diskutierten Mechanismen wie folgt zusammenfassen:

I. *Gain-of-function* bei der Prozessierung von APP (Hardy and Selkoe 2002, Shioi *et al.* 2007, Jakob-Roetne and Jacobsen 2009, Kelleher and Shen 2010)

II. *Loss-of-function* bei der Prozessierung von APP (Bentahir *et al.* 2006, Shen and Kelleher 2007, Heilig *et al.* 2010, Kelleher and Shen 2010)

III. Konformationsänderung und veränderte Mechanik des Enzymkomplexes und dadurch abnorme A β -Produktion (Berezovska *et al.* 2005, De Strooper 2007, Wolfe 2007, Chavez-Gutierrez *et al.* 2012)

IV. Beeinträchtigung der γ -Sekretase-unabhängigen PS-Funktionen, wie Makroautophagie und Kalzium-Homöostase (Stutzmann *et al.* 2004, Tu *et al.* 2006, Lee *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2010)

Im Folgenden werden die Mutationen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorkommen, kurz dargestellt. Exemplarisch für die PS-Mutationen finden die Mutationen PS1-E280A, PS1-Delta9 und PS2-N141I in dieser Arbeit Anwendung.

Die überhaupt größte Population mit EOAD befindet sich in Antioquia, Kolumbien. Ca. 5000 Individuen besitzen dieselbe Mutation (E280A) (Sepulveda-Falla *et al.* 2012). Diese Mutation kommt aber auch an anderen Orten vor (Tanahashi *et al.* 1996, Kwok *et al.* 1997, Arango *et al.* 2001). Bei dieser Mutation wird die AS Glutamat an der Position 280, innerhalb der zytosolischen Schleife, nach der Proteolyse-Stelle, durch Alanin ersetzt (R. F. Clark 1995). Neuropathologisch beobachtet man bei den Betroffenen Hirnatrophie, schwere A β -Pathologie, bestimmte hyperphosphorylierte Tau-verwandte Pathologie und cerebelläre Schäden. Klinisch zeigen die Patienten eine gewisse Variabilität; bei den meisten kommt die Demenz zwischen dem 45. und 50. Lebensjahr zum Vorschein, bei anderen um die 30 oder 65. Die Patienten zeigen der Häufigkeit nach folgende Symptome: Gedächtnisverlust, Verhaltensanomalien, Sprachstörungen, Kopfschmerzen, Gangstörungen, Anfälle und Myokloni, cerebelläre Zeichen und Parkinsonismus (Lemere *et al.* 1996, Lopera *et al.* 1997, Sepulveda-Falla *et al.* 2012).

Eine besondere Mutation auf dem PS1-Gen ist PS1-Delta9, bei der der durch Exon 9 kodierte Bereich, der die Endoproteolyse-Stelle beinhaltet, deletiert ist. Es muss hier jedoch erwähnt werden, dass es zwei Varianten der Delta9-Mutationen gibt: die erste Variante entsteht durch einen Spleißfehler durch eine Punktmutation an der Spleißrezeptor-Seite (S290C) (Perez-Tur *et al.* 1995, Sato *et al.* 1998, Brooks *et al.* 2003), die andere Variante entsteht durch Deletion von einigen Kilobasen (4.6 – 5.9 kb) auf der DNA-Ebene (Crook *et al.* 1998, Prihar *et al.* 1999, Hiltunen *et al.* 2000) (zur Übersicht s. Larner and Doran 2006). Durch den Verlust der Endoproteolyse-Stelle akkumuliert PS1 als Holoprotein. Obwohl keine Fragmente, die normalerweise für die PS1-Aktivität vorausgesetzt werden, gebildet werden können, scheint FL-PS1 in der Lage zu sein, seine Fragmente ersetzen zu können und seine biologische Funktion, wenn auch herabgesetzt, beizubehalten. Wider Erwarten wird die pathologische

Aktivität von PS1-Delta9, wie die erhöhte A β -Produktion und die geminderte biologische Funktion, nicht dem Verlust der Endoproteolyse, sondern der Punktmutation zugeschrieben. Wenn die Punktmutation korrigiert wird (zu C290S), können die Pathologien rückgängig gemacht werden (Steiner *et al.* 1999a). Obwohl beide Mutationsformen dasselbe Endresultat haben, sind sie phenotypisch unterschiedlich; während präsenile Demenz, spastische Paraparese und „cotton wool plaques“ CWP typisch für PS1-Delta9 (S290C) sind (*variantAD*), entwickeln die Patienten mit der genomischen Deletion das typische AD-Muster (Crook *et al.* 1998, Prihar *et al.* 1999, Hiltunen *et al.* 2000, Verkkoniemi *et al.* 2001).

Im Vergleich zu PS1 sind PS2-Mutationen selten. Die häufigste und am besten untersuchte PS2-Mutation ist N141I. Mit weiter Altersspanne zeigt sich die Krankheit im Alter zwischen 39 und 75. Phenotypisch zeigt die Mutation eine hohe Penetranz, die typischen AD-Merkmale und ist mit Anfällen assoziiert. Neuropathologisch ist das A β 42/A β 40-Verhältnis erhöht (Levy-Lahad *et al.* 1995a, Walker *et al.* 2005, Jayadev *et al.* 2010).

1.3 Tau-Hypothese

1.3.1 Tau-Protein

Für das Überleben und die Funktionalität der Neurone ist der anterograde (vom Zellkörper zur Synapse) und retrograde (von der Synapse zum Zellkörper) axonale Transport essenziell. Dieser Transport ist gewährleistet durch die Mikrotubuli und Motorproteine wie Kinesine und Dyneine. Die Stabilität und Dynamik der Mikrotubuli wird durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) reguliert. Als das wichtigste MAP im Axon wird das Protein Tau (τ) angesehen.

Das Tau-Protein wird auf dem Chromosom 17 (das Gen MAPT) kodiert und im menschlichen Gehirn exprimiert. Durch alternatives Spleißen von v. a. Exon 2, 3 und 10 entstehen sechs Isoformen, die zwischen 352 und 441 Aminosäuren lang sind (Abb. 1.10) (Neve *et al.* 1986, Goedert *et al.* 1989, Andreadis *et al.* 1992). Tau-Isoformen enthalten im C-terminalen Teil drei bis vier repetitive Einheiten von je 31 Aminosäuren. Diese Einheiten und weitere benachbarte Sequenzen sind sowohl für die Bindung von Tau an Mikrotubuli als auch seine pathologische Aggregation verantwortlich (Fauquant *et al.* 2011). Tau ist sehr hydrophil und ungefalteter, es enthält in seiner Mitte eine Prolin-reiche Domäne (Sergeant *et al.* 2008, Wegmann *et al.* 2013).

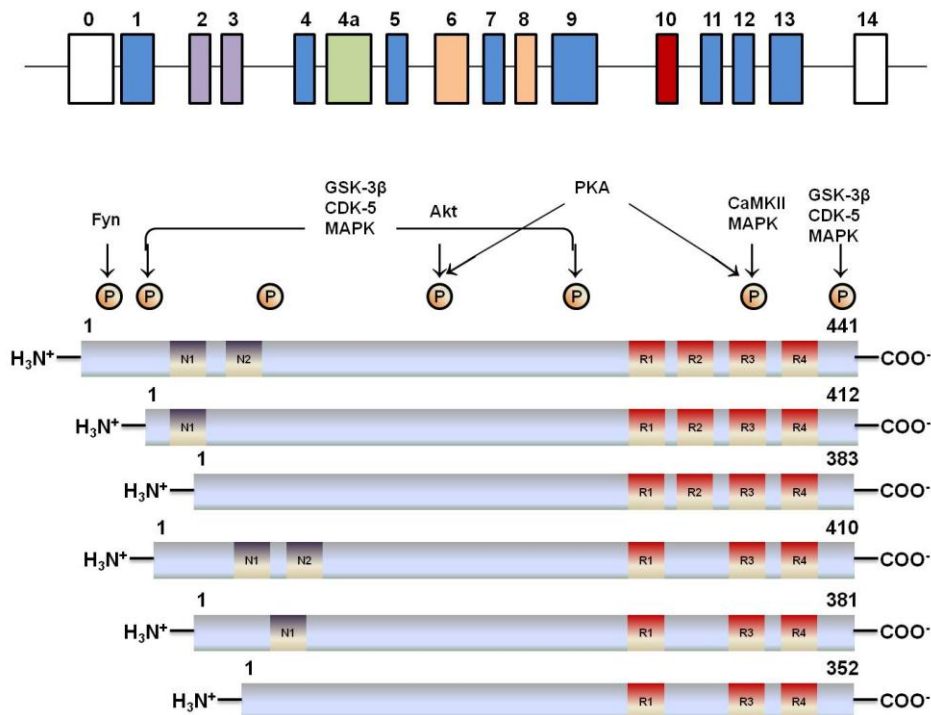


Abb. 1.10 Struktur der Tau-Isoformen im menschlichen Gehirn

Oben ist das Tau-Gen (MAPT) schematisch dargestellt. Exon 0 (weiß) ist ein Teil des Promotors, Exon 14 (weiß) befindet sich im nicht-kodierenden Bereich. Die im menschlichen Gehirn vorkommenden Isoformen werden durch alternatives Spleißen der Exone 2, 3 (violett) und 10 (rot) gemeinsam mit den anderen Exonen (blau) gebildet, Exone 6 und 8 (orange) werden im menschlichen Gehirn nicht transkribiert, Exon 4a (grün) wird nur im peripheren Nervensystem exprimiert. Unten sind die Isoformen schematisch gezeigt, im C-terminalen Teil befinden sich die repetitiven Einheiten (rot, R1 – R4), R2 wird durch Exon10 kodiert und fehlt in einigen Isoformen (die unteren drei), die N-terminalen Domänen (grau, N1 und N2) werden durch die Exone 2 und 3 kodiert und sind an dem alternativen Spleißen beteiligt. An der Isoform 441 sind außerdem einige Phosphorylierungstellen sowie die beteiligten Kinasen schematisch dargestellt.

Die positiv geladenen repetitiven Einheiten im C-Terminus interagieren mit β -Tubulin im Inneren des Mikrotubuls, während die ebenfalls positiv geladene Prolin-reiche Domäne an die negativgeladene Außenoberfläche bindet (Ballatore *et al.* 2007). Dadurch stabilisiert Tau die axonalen Mikrotubuli. Dem Protein Tau werden außerdem weitere Funktionen zugeschrieben, die die zellulären Zytoskelett-Funktionen mit der interneuronalen Signalweiterleitung verbinden. Für die Entwicklung von Axonen spielt Tau eine wichtige Rolle; es ist nämlich wichtig für die neuronale Polarisation (d.h. Bestimmung der Identität des Axons) und das Auswachsen und Myelinisierung von Axonen (Caceres and Kosik 1990, Biernat *et al.* 2002).

1.3.2 Tau-Pathologie

Das gebundene und nicht-gebundene Tau befindet sich in einem empfindlichen Gleichgewicht. Wenn die Konzentration an freiem Tau erhöht ist, tendieren die Tau-Moleküle dazu, sich zu Präfibrillen zusammenzulagern, diese lagern sich wiederum zu paarigen

helikalen Filamenten (PHF) zusammen, die eine β -Faltblattstruktur einnehmen. Anschließend bilden diese Filamente große Neurofibrillen, die letztendlich zusammen mit anderen Komponenten die für AD typischen neurofibrillären Bündeln „*tangles*“ (NFT) ausmachen. Die NFTs können hyperphosphoryliertes, aber auch unphosphoryliertes posttranslational modifiziertes und/oder verkürztes Tau, sowie andere Moleküle wie sulfatierte Glykosaminoglykane, RNA, freie Fettsäuren und Heparin enthalten (Buee *et al.* 2000, Ballatore *et al.* 2007, Spillantini and Goedert 2013). Die paarigen helikalen Filamente (PHFs) und die NFTs werden für viele neurodegenerative Erkrankungen („*Taupathien*“) verantwortlich gemacht; darunter Alzheimer-Krankheit, frontotemporale Demenz (M. Pick), amyotrophe Lateralsklerose (AML), Down-Syndrom, Gerstmann-Sträußler-Scheinker-Krankheit und andere (Spillantini and Goedert 2013).

Die Tau-Forschung dreht sich unter anderem um zwei wesentliche Fragen: Wie kommt es kausal zur Tau-Aggregation? Und was sind die Mechanismen der dabei entstehenden Neurotoxizität? Als Determinanten für die Aggregation von Tau werden aktuell die Hyperphosphorylierung von Tau, seine Verkürzung, Mutationen in seinem Gen (MAPT) und andere diskutiert.

Die Bindung von Tau an die Mikrotubuli wird durch dessen Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung an Serin- und Threonin-Resten im Bereich der repetitiven Sequenzen reguliert. In einem angemessen phosphorylierten Zustand herrscht ein Gleichgewicht zwischen dem mikrotubuligebundenem und freiem Tau, welches die Morphologie und der axonale Transport eines Neurons sichert. Dieses Gleichgewicht wird durch Kinasen, v.a. MARKs (*microtubule-affinity regulating kinases*), CDK5 (*cyclin-dependent kinase 5*), GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) und ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase-2*), und Phosphatasen, wie PP2A (*phosphatase-2A*), getragen (Sergeant *et al.* 2008, Iqbal *et al.* 2009). Laut der „*Tau-Hypothese*“ wird Tau durch ein gestörtes Gleichgewicht der Kinasen- und Phosphatasen-Aktivität hyperphosphoryliert. Der Grund hierfür ist weitgehend unbekannt, es werden allerdings genetische und Umweltfaktoren sowie hohes Alter als Ursachen vermutet (Ding and Johnson 2008, Iqbal *et al.* 2009). Das hyperphosphorylierte Tau besitzt eine geringere Affinität zu MT, es akkumuliert und bildet Aggregate (Ballatore *et al.* 2007, Ding and Johnson 2008, Iqbal *et al.* 2009).

Da man in NFTs verkürzte Tau-Moleküle nachweisen konnte, ging man davon aus, dass diese das Endergebnis der durch die Aggregation hervorgerufenen Aktivierung prozessierender Proteine darstellen. Neuere Studien haben gezeigt, dass mindestens zwei proteolytische

Prozesse im N- und C-terminalen Abschnitt von Tau der Bildung von NTFs vorhergehen (Rissman *et al.* 2004, de Calignon *et al.* 2010). Das verkürzte Tau hat eine starke Tendenz zur Kernbildung und Aggregation (Yin and Kuret 2006).

Zusätzlich zur Hyperphosphorylierung und Verkürzung des Tau-Proteins können Mutationen im Bereich der repetitiven Sequenzen die Filamentenbildung und Aggregation von Tau hervorrufen. Solche Punktmutationen und Deletionen verursachen familiäre „nicht-AD-Taupathien“, darunter FTDP-17 (*frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosom 17*) (Goedert and Jakes 2005, Spillantini and Goedert 2013). Weitere Moleküle und Prozesse, wie Heparan-Sulfat-Proteoglykan (HSPG) (Mukrasch *et al.* 2005, Fischer *et al.* 2009), die frühen zellulären Veränderungen in Lysosomen und Autophagieprozessen (Cataldo *et al.* 1994, Nixon *et al.* 2005), die Expression von ApoE4 (Caffrey *et al.* 2008) und das Verhältnis von Isoformen mit drei repetitiven Einheiten zu denen mit vier (Bhaskar *et al.* 2005, Adams *et al.* 2010, Furukawa *et al.* 2011), können durch NFT beeinflusst werden oder die Akkumulation und Aggregation von Tau induzieren (Gendreau and Hall 2013).

Die Antwort auf die zweite Frage besteht darin, dass die Neurotoxizität die Folge von *loss-of-normal function* und/oder *gain-of-toxic function* ist. Im Vordergrund steht die Depolymerisierung der Mikrotubuli mit der darauffolgenden Beeinträchtigung des axonalen Transports und dem Strukturverlust (Buee *et al.* 2000, Ballatore *et al.* 2007, Mazanetz and Fischer 2007). Die am weitesten verbreitete Hypothese besagt, dass die Oligomere in NFT für die Korrelation zwischen den neurofibrillären Läsionen und der Neurodegeneration in AD und anderen Taupathien verantwortlich sind (Arriagada *et al.* 1992, Mocanu *et al.* 2008). Die Tau-Oligomere können die Zytotoxizität vermitteln, indem sie durch Interaktionen mit polyanionischen Verbindungen wie HSPG und anderen Molekülen die Membranpermeabilität verändern, was dann mit Beeinträchtigung der Ca^{2+} -Homöostase, Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies und mitochondrialer Dysfunktion assoziiert ist (Hall *et al.* 2001, Muller *et al.* 2010, Flach *et al.* 2012, Lee *et al.* 2012). Die Fähigkeit von Tau, weitere normale Tau-Moleküle und andere MAPs (z. B. MAP1/ 2) zu binden (Alonso *et al.* 1997), erinnert an das Prionprotein. Tatsächlich vermutet man eine „prion-ähnliche“ Toxizität und Ausbreitung von Tau, Beweise dafür bleiben jedoch gering (Gendreau and Hall 2013). Weiterhin wird die Dysfunktion proteosomaler, autophagosomaler und lysosomaler Abbauwege von Molekülen und Organellen mit NFTs assoziiert (Funk and Kuret 2012).

Ein weiterer, jedoch Oligomer-unabhängiger Mechanismus der Tau-Pathologie ist die Bindung von Tau zu extrazellulären Rezeptoren, insbesondere solche, die Neurotransmitter

binden, wie Glutamat und Acetylcholin, dies vermittelt anscheinend den Einstrom von Ca^{2+} (Gomez-Ramos *et al.* 2008, Gomez-Ramos *et al.* 2009, Diaz-Hernandez *et al.* 2010) (zur Übersicht s. Gendreau and Hall 2013).

1.4 Diagnostik

Bislang ist die Diagnostik von Alzheimer-Krankheit noch eine Herausforderung. AD zu diagnostizieren und von anderen Demenz-Formen abzugrenzen gelingt erst in späten Stadien, wenn der Gedächtnisverlust und die kognitive Beeinträchtigung die Patienten schon im Alltag einschränken. Während die definitive Diagnose von AD erst post mortem durch den histopathologischen Nachweis von A β -Plaques, neurofibrillären Bündeln (NFT) und Neuronenverlust möglich ist, handelt es sich bei der klinischen Diagnose nur um eine Wahrscheinlichkeitsdiagnose (Dubois *et al.* 2007, Rockwood *et al.* 2007, Jellinger *et al.* 2008). Genaue Diagnostika sind nicht nur für die frühe Diagnosestellung wichtig, sondern auch für die Prognose, die Verlaufskontrolle, die Entwicklung von Therapeutika und das bessere Verständnis von Alzheimer-Krankheit von großer Bedeutung. Die diagnostische Sensitivität und Spezifität aktueller Marker sind niedrig vor allem in frühen Stadien der Krankheit.

Die aktuellen Leitlinien für die AD-Diagnostik beinhalten die Erhebung ausführlicher Anamnese, eine komplette neurologische und neuropsychologische Untersuchung, die Bildgebung und Liquor-Marker (Rosen *et al.* 2013). Allein mit den ersten drei kann man eine Diagnose mit 90%ger Wahrscheinlichkeit stellen (Jellinger *et al.* 2008). Laut den Leitlinien werden drei Stadien von AD unterschieden: das präklinische Stadium (Sperling *et al.* 2011), das Stadium der leichten kognitiven Beeinträchtigung („*mild cognitive impairment*“, MCI) (Albert *et al.* 2011) und das Stadium der Demenz von AD-Typ (McKhann *et al.* 2011). Diese Einteilung sowie die klinischen Kriterien und empfohlenen Methoden werden vom *National Institute on Aging* (NIA) und von der US-Alzheimer-Gesellschaft vorgeschlagen und aktualisiert (Jack *et al.* 2011). Während die Standardverfahren der Bildgebung wie Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) Anwendung in der Klinik finden, sind weiter Verfahren wie Positronen-Emission-Tomographie (PET) und funktionelle MRT (fMRT) wegen ihrer Aufwendigkeit und Kosten der Forschung vorbehalten. Im Liquor wird die totale Menge an Tau (T-tau), die hyperphosphorylierte Form von Tau (P-tau) und (A β 42) gesucht (Blennow *et al.* 2010, Rosen *et al.* 2013).

Weiterhin wird zur Zeit über weitere Alzheimer-Metaboliten wie A β -Spezies, APP-Fragmente, BACE-1 und andere Marker, wie Visinin-ähnliches Protein-1, Neurogranin und F2-Isoprostan als Biomarker im Liquor, Blut und Plasma geforscht (Jellinger *et al.* 2008, Rosen *et al.* 2013).

1.5 Therapie

1.5.1 Allgemeines

Die Alzheimer-Krankheit ist gesundheitlich, epidemiologisch und ökonomisch schwerwiegend. Trotz der intensiven Forschung nach geeigneten Therapien gibt es bis jetzt keine kausale Therapie. Aktuell versucht man die Krankheit auf verschiedenen Ebenen zu beeinflussen: die Verhinderung bzw. Verlangsamung ihrer Progression und die symptomatische und psychotherapeutische Behandlung.

Die aktive Immunisierung mit A β und einem immunologischen Adjuvanten führte bei Mäusen zur Reduktion vom zerebralen A β und Verbesserung der kognitiven Leistung (Schenk *et al.* 1999). Die Anwendung eines Impfstoffes aus A β 42 und einem Adjuvanten führte bei Patienten in der II. klinischen Testphase zu diversen Nebenwirkungen darunter aseptische Meningoenzephalitis (Gilman *et al.* 2005). Neuere Impfstoffe sind noch in Testung, einige haben eine Reduktion von A β bei Menschen gezeigt, jedoch keine Verlangsamung der Neurodegeneration (Winblad *et al.* 2012, Galimberti *et al.* 2013). Um die durch den Impfstoff verursachte aseptische Entzündung zu vermeiden, versucht man mit humanisierten Antikörpern passiv zu immunisieren, z. B. Bapineuzumab, Gantenerumab und Solanezumab, Anti-A β monoklonalen Antikörpern. Diese befinden sich noch in der klinischen Phase (Moreth *et al.* 2013). Außerdem scheint der Lebensstil einen Einfluss auf die Entwicklung und den Verlauf der Krankheit zu haben; so soll ausreichende Bewegung, ausgewogene Ernährung mit Antioxidantien-Anteil, ungesättigten Fettsäuren und B-Vitaminen, der Verzicht auf Nikotin, Ausbildung und hohe geistige Aktivitäten und die optimale Behandlung der arteriellen Hypertonie einen positiven Effekt haben.

Die psychologischen Symptome, die im Laufe der Krankheit auftreten können, wie Unruhe, Depression oder Aggressivität, können psychotherapeutisch und psychopharmakologisch behandelt werden (Cohen-Mansfield 2001).

1.5.2 Symptomatische Behandlung

Basierend auf der schon seit langem bekannten „cholinergischen Hypothese“, die den Verlust cholinergischer Neuronen während des AD-Verlaufs widerspiegelt (Bartus *et al.* 1982, Bowen *et al.* 1992), wurden verschiedene Strategien erforscht, um die Defizite im Acetylcholin-Neurotransmittersystem zu kompensieren. Ein schon in der Klinik erfolgreicher Ansatz ist die Anwendung von Acetylcholinesterase-Inhibitoren; Donepezil, Rivastigmin und Galantamin, weitere sind noch in der Entwicklung (Ghezzi *et al.* 2013). Dabei handelt es sich lediglich um eine symptomatische Therapie, außerdem haben die ACh-Esterase-Hemmer diverse Nebenwirkungen (Inglis 2002, Knowles 2006, Seow and Gauthier 2007, Cumbo and Ligori 2014).

Für die Behandlung von einem mittleren bis schweren Krankheitsbild wird außerdem Memantin, ein nicht-kompetitiver Antagonist des NMDA-Rezeptors, eingesetzt. Im Gegensatz zu den ACh-Esterase-Inhibitoren hat Memantin nicht nur einen symptomatischen Effekt, sondern auch unter bestimmten Bedingungen einen gewissen krankheitsmodifizierenden Einfluss (Bond *et al.* 2012, Clerici *et al.* 2012, Farrimond *et al.* 2012).

1.5.3 Krankheits-modifizierende Behandlung

Zu dieser Gruppe gehören Substanzen, die in die Pathogenese von A β und Tau-Protein eingreifen. Sie sind allerdings noch in der klinischen Testphase.

Zu den A β -Pathologie-beeinflussenden Substanzen und Strategien gehören die Impfstoffe aus A β und die monoklonalen Antikörper (Immuntherapie), γ -Sekretase-Inhibitoren, γ -Sekretase-Modulatoren, β -Sekretase-Inhibitoren, die Senkung der APP-Expression, die Hemmung der A β -Aggregation, die Steigerung der A β -Clearance und die direkte Blockierung der A β -Toxizität (Golde 2006, Jakob-Roetne and Jacobsen 2009, Salomone *et al.* 2012). Ähnlich wie bei A β werden bestimmte Substanzen und Methoden erforscht, die die Tau-Pathologie beeinflussen, darunter die Hemmung der Produktion, Aggregation und Phosphorylierung von Tau sowie die Steigerung seiner Clearance (Golde 2006, Salomone *et al.* 2012).

Zusätzlich werden Substanzen entwickelt, die an anderen bestimmten Schnittstellen in der AD-Pathogenese eingreifen. Zum Beispiel versucht man Enzyme zu aktivieren, die A β beseitigen, wie das Insulin abbauende Enzym (IDE) und Neprilysin (Iwata *et al.* 2001, Song and Hersh 2005), oder den *nerve growth factor* (NGF) zu den von der Degeneration betroffenen Arealen zu geben (Cattaneo *et al.* 2008). Weitere therapeutische Ziele sind

Mitochondrien (Su *et al.* 2010) und RAGE (*receptor for the advanced glycation endproducts*), welches den Effekt von A β zu den Mikroglia, Blut-Hirn-Schranke und Neuronen vermittelt (Cho *et al.* 2009, Yan *et al.* 2009). Schließlich wurde die Tiefenhirnstimulation betroffener Areale als ein alternativer, nicht-pharmakologischer Ansatz vorgeschlagen (Laxton *et al.* 2010).

1.6 Prion-Erkrankungen

1.6.1 Einführung

Das Wort „Prion“ steht für „*proteinaceous infectious particle*“. Obwohl andere infektiöse „Partikel“ wie Bakterien und Viren auch Proteine in ihrer Struktur beherbergen, soll das Wort „Prion“ betonen, dass hier das Protein allein für die Kontagiösität und Pathogenität verantwortlich ist. Prionen verursachen Erkrankungen, die zum einen übertragbar und zum anderen neurodegenerativ sind. Prionkrankheiten unterscheiden sich allerdings von den normalen Infektionen und Neurodegenerationen und das verleiht ihnen eine gewisse Einzigartigkeit.

Um eine Infektion als solche zu beschreiben und sie einem bestimmten Erreger zuzuordnen, haben sich die von Jakob Henle (1809 – 1885) und Robert Koch (1843 – 1910) entworfenen Postulate in der Mikrobiologie etabliert, sie lauten: (a) Der Erreger (Mikroorganismus) muss in allen betroffenen Geweben nachweisbar sein, (b) die Isolation und Züchtung des Erregers in reiner Zellkultur muss möglich sein, (c) der aus der Zellkultur gewonnene Erreger muss in der Lage sein, eine neue Infektion hervorzurufen, (d) – von Löffler hinzugefügt – der Erreger muss vom zweiten Wirt isoliert werden können und identisch mit dem ursprünglichen Erreger sein. Diese Postulate lassen sich nicht so strikt auf Prionen anwenden, vor allem, weil sie im Unterschied zu allen infektiösen Mikroorganismen keine genetischen Informationen in Form von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) besitzen. Sie zu kultivieren ist daher unmöglich. Prionen sind dennoch in der Lage, sich in einem selbst-katalysierten Falschaltungsprozess auszubreiten und eine Infektion zu induzieren (Walker *et al.* 2006). Außerdem können Prion-Erkrankungen, im Gegensatz zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer-Krankheit oder Morbus Parkinson, durch eine Infektion hervorgerufen werden.

Allen Prion-Erkrankungen ist eine lange Inkubationszeit und ein äußerst progressiver, tödlich endender Verlauf gemeinsam. Aufgrund ihrer Übertragbarkeit (Transmissibilität) und ihrer typischen Pathologie, schwammartige (spongiforme) Hirndegeneration, werden sie als „*transmissible spongiforme encephalopathies*“ (TSE) bezeichnet. Die Symptome sind

vielfältig und umfassen motorische, vegetative und kognitive Störungen, Gedächtnisverlust und Persönlichkeitsveränderungen (Collinge 2001, Wadsworth and Collinge 2007).

1.6.2 Prion-Erkrankungen bei Tieren und Menschen

Prion-Erkrankungen können Tiere und Menschen mit einer gewissen pathologischen Äquivalenz betreffen. Tab. 2 und Tab. 3 geben einen Überblick mit den wichtigen Informationen über die tierischen und humanen Prion-Erkrankungen.

Tab. 2 Prion-Erkrankungen bei Tieren (modifiziert nach Miesbauer 2009)

Prion-Erkrankung	Jahr und Ort der Erstbeschreibung	Referenz	Ursache	Betroffene Tierarten
Scrapie	1732, GB	(Leopoldt 1759)	unbekannt	Schaf, Ziege
Transmissible Nerz Enzephalopathie „transmissible mink encephalopathy“ (TME)	1974, USA	(Hartsough and Burger 1965)	Infektion	Nerz
Chronisch zehrende Hirschkrankheit „chronic wasting disease“ (CWD)	1980, USA	(Williams and Young 1980)	unbekannt	Hirsch
„bovine spongiforme encephalopathy“ (BSE)	1986, GB	(Wells <i>et al.</i> 1987)	Infektion	Rind
Exotische Huftier Enzephalopathie „exotic ungulate encephalopathy“ (EUE)	1986, GB	(Kirkwood <i>et al.</i> 1990)	Infektion	Rinderartiger Wieder-käuer im Zoo (Antilope)
Feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)	1990, GB	(Leggett <i>et al.</i> 1990)	Infektion	Haus- und Wildkatze

Die Prion-Erkrankungen bei Tieren haben, seit der Erstbeschreibung von Scrapie bei Schafen 1732 in Großbritannien, aus epidemiologischer und wirtschaftlicher Sicht ein großes Interesse erlangt. Die erkrankten Schafe konnten ihre Bewegungen nicht koordinieren, waren schreckhaft und hatten einen starken Juckreiz (*to scrape*, sich kratzen). Man hatte schon früh eine Übertragung vermutet (Leopoldt 1759), der Nachweis pathologischer Veränderungen in Gehirnen erkrankter Schafe gelang aber erst 1898 (Besnoit MM 1898). Durch den Export von Schafen hat sich Scrapie auch in anderen Ländern verbreitet (Hourrigan J 1979).

Im Jahr 1986 wurden ähnliche Symptome bei Rindern in Großbritannien beobachtet (Wells *et al.* 1987), „bovine spongiforme encephalopathy“ (BSE), auch als Rinderwahnsinn bekannt. In

den folgenden Jahren hat sich eine BSE-Epidemie entwickelt, die ihren Höhepunkt 1992 mit über 37 000 Fällen erreicht hat und wirtschaftliche Verluste in Milliardenhöhe verursachte. Der Grund dafür war die Verfütterung von Rindermischfutter, das Tiermehl aus Scrapie-kontaminierten Schafen enthielt und ungenügend erhitzt war (Wilesmith 1988, Wilesmith *et al.* 1992). 1987 wurde der erste Fall außerhalb Großbritanniens in Nordirland festgestellt (Denny *et al.* 1992), mittlerweile sind weitere Länder betroffen (Doherr *et al.* 1999). Trotz der Gegenmaßnahmen, Vernichtung betroffener Tiere, Tiermehl-Verbot in GB 1988 und 2001 in der ganzen EU, stieg BSE weiter an – allein in England 200 000 Fälle (Brown *et al.* 2001) – und breitete sich auf andere Länder aus; Grund hierfür ist die lange Inkubationszeit (vier bis fünf Jahre). Parallel zur BSE-Epidemie oder danach wurden TSEs bei anderen Tieren festgestellt (zur Übersicht s. Collinge 2001).

Tab. 3 Prion-Erkrankungen bei Menschen (modifiziert nach Miesbauer 2009)

Prion-Erkrankung	Jahr und Ort der Erstbeschreibung	Referenz	Ätiologie
Sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (cCJD)	1920, Deutschland	(Creutzfeldt 1920, Jakob 1921)	unbekannt
Familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJD)	1924, Deutschland	Kirschbaum, 1924	Mutation im PrP-Gen
Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS)	1928/1936, Österreich	(Gerstmann 1928, Gerstmann J 1936)	Mutation im PrP-Gen
Kuru	1957, Papua-Neuguinea	(Gajdusek and Zigas 1957)	ritueller Kannibalismus
Iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (iCJD)	1974, USA	(Duffy <i>et al.</i> 1974)	Infektion durch ärztliche Behandlung
Fatale familiäre Insomnie (FFI)	1986, Italien	(Lugaresi <i>et al.</i> 1986)	Mutation im PrP-Gen
Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD)	1996, GB	(Will <i>et al.</i> 1996)	Infektion

Mit einer Inzidenz von 1 – 2 Fälle pro eine Million pro Jahr ist Creutzfeldt-Jakob-Krankheit eine seltene Krankheit, aber zugleich die häufigste und erstbeschriebene Prionkrankheit beim Menschen. Die erste Beschreibung stammt von zwei deutschen Neurologen: Hans Creutzfeldt (Creutzfeldt 1920) und Alfons Jakob (Jakob 1921), unabhängig voneinander. Da diese Krankheit keiner bestimmten Ursache zugeordnet werden kann, wird sie als sporadisch bezeichnet. Typisch für die sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD) ist die rapide, progressive, multifokale Demenz begleitet von zerebellaren Symptomen wie Ataxie und

Myoklonus. Andere mögliche Symptome sind pyramidale oder extrapyramidale Zeichen, kortikale Blindheit, Müdigkeit, Insomnie, Depression, Gewichtsverlust, Kopfschmerzen und allgemeines Unwohlsein (Wadsworth and Collinge 2007, Aguzzi *et al.* 2008). Die Krankheit tritt im Alter zwischen 45 und 75 auf, nach einem fulminanten Verlauf sterben die Patienten wenige Wochen nach den ersten Krankheitszeichen (Collins *et al.* 2006, Aguzzi *et al.* 2008).

Auf der einen Seite vermutet man eine spontane falsche Umfaltung des Prionproteins als Ursache für sCJD (Collinge 1997), auf der anderen Seite existieren Beweise dafür, dass bestimmten sCJD-Fällen Mutationen im Prionprotein-Gen (*PRNP*) zugrunde liegen (Wadsworth *et al.* 2006). Außerdem wurde vorgeschlagen, dass es sich bei einigen sCJD-Fällen um unerkannte Infektionen handelt (Aguzzi and Glatzel 2006). Mittlerweile sind verschiedene Varianten der CJD bekannt (Tab. 3). Die familiäre Form von CJD (fCJD) sowie GSS und FFI werden durch Mutationen im *PRNP* verursacht und autosomal dominant vererbt. Interessanterweise befinden sich die meisten Mutationen im C-terminalen Bereich, zwischen dem ersten und dritten α -Helix (s. Abb. 1.12) (Wadsworth *et al.* 2006, Aguzzi *et al.* 2008). Neben der sporadischen und familiären Formen werden Prion-Erkrankungen durch Infektionen verursacht. Bei der iatrogenen CJD (iCJD) wird die Krankheit durch medizinische Prozedere, wie Kornea- oder Dura mater-Transplantation, die Gabe vom humanen Wachstumshormon bzw. Gonadotropin, die aus erkrankten Individuen entstammen, oder durch verunreinigte chirurgische Instrumente übertragen (Will 2003). Obwohl die Übertragung von BSE auf Menschen für unwahrscheinlich gehalten wurde, tauchte 1995 und 1996 eine neue Variante von CJD in GB auf, die sich klinisch vom sCJD unterscheidet und ähnliche Neuropathologie wie BSE aufweist (Will 2003). Es liegen keine direkten experimentellen Beweise für eine Übertragung der Krankheit von Rindern auf Menschen vor, die epidemiologischen, biochemischen und neuropathologischen Beweise sprechen allerdings stark dafür (Hill *et al.* 1997, Will 2003, Aguzzi *et al.* 2008). Die Kuru-Krankheit wurde Mitte der 1950er in Papua Neuguinea beschrieben, wo hauptsächlich Frauen und Kinder der Eingeborenen aus rituellen Gründen die Gehirne ihrer Verstorbenen verzehrt haben (Gajdusek and Zigas 1957). Dies hat zur endemischen Ausbreitung der Krankheit geführt, welche sich später als eine übertragbare Prion-Erkrankung mit Ähnlichkeiten zu Scrapie und CJD entpuppte (Will 2003, Aguzzi *et al.* 2008).

Zusätzlich zu den in Tab. 3 aufgeführten Prion-Erkrankungen beim Menschen wurden zwei weitere beschrieben; die sporadische fatale Insomnie (sFI) und die variabel Protease-sensitive Prionopathie (VPSPr) (Kretzschmar and Tatzelt 2013).

1.6.3 Pathologie, Transmissibilität und Speziesbarriere

Das Alter zum Zeitpunkt des Ausbruchs, die Krankheitsdauer und die Symptomatik sind unter den Prionkrankheiten variabel. Dieser Variabilität liegt eine neuropathologische und pathogenetische Variabilität zugrunde (Wadsworth and Collinge 2007). Grundsätzlich sind Prionkrankheiten durch drei pathologische Merkmale charakterisiert: Vakuolisierung des Hirngewebes, astrozytäre Gliose und Ablagerung falsch gefalteter Prionproteine (Abb. 1.11) (Glatzel and Aguzzi 2001). Die lichtmikroskopisch erkennbare Auflockerung des Hirngewebes durch optisch leere Räume verleiht dem Gewebe eine schwammartige (spongiose) Konsistenz, was für die Prionkrankheitsgruppe namensgebend ist (TSE). Begleitet wird dieses Phänomen von aktivierten und proliferierenden Astrozyten (Gliose).

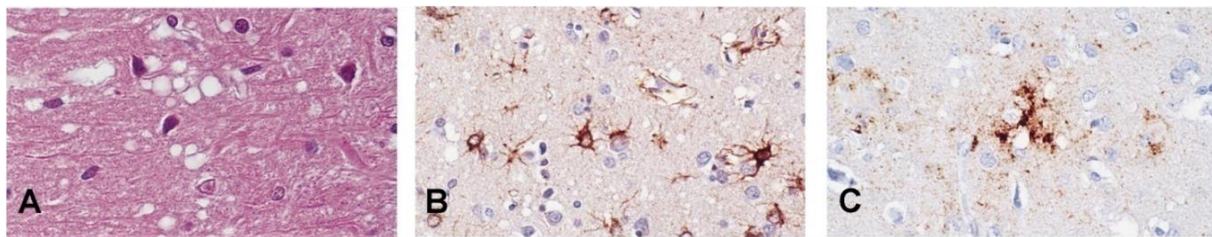


Abb. 1.11 Neuropathologische Veränderungen bei Prion-Erkrankungen (nach Glatzel and Aguzzi 2001)

Ausschnitte aus der grauen Substanz des Gehirns eines CJD-Patienten, (A) Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung zeigt die spongiosen, vakuolenähnlichen Läsionen, (B) immun-histochemische Färbung mit dem anti-GFAP „*glial fibrillary acidic protein*“-Antikörper, zeigt aktivierte und geschwollene Astrozyten, (C) immun-histochemische Färbung mit einem anti-Prionprotein-Antikörper zeigt die PrP-Ablagerungen.

Die PrP-Ablagerungen können verschiedene Strukturen annehmen, die für bestimmte Krankheitsvarianten charakteristisch sind. So sind die homogenen Kuru-Plaques für Kuru-Krankheit und zum geringen Teil für sCJD, die multizentrischen (Korkarden)-Plaques für GSS und die blühend erscheinenden Florid-Plaques (lat. *floridus* blühend) für nvCJD charakteristisch (Bresjanac *et al.* 2003, Miesbauer 2009).

Eine Reihe von Experimenten für den Nachweis der Übertragbarkeit (Transmissibilität) und Infektiösität der Prion-Erkrankungen wurden durchgeführt. Während die Übertragung innerhalb derselben Spezies erfolgreich war, scheint die Übertragung zwischen verschiedenen Spezies weniger effizient zu sein. Dies lässt sich durch die variierende i. d. R. verlängerte Inkubationszeit und geringe Anzahl an erfolgreich infizierten Individuen nach der Infektion erkennen (Pattison and Millson 1960, Pattison 1966, Hagiwara *et al.* 2013). Dieser Effekt wird als „Speziesbarriere“ bezeichnet. Die Speziesbarriere ist vermittelt durch die Aminosäuresequenz-Heterologie zwischen den verschiedenen Spezies; d.h. das

falschgefaltete, infektiöse Prionprotein (PrP^{Sc}) kann eine Infektion nur bei einer Spezies mit homologem, normalen Prionprotein (PrP^{C}) hervorrufen. Daher sind z.B. transgene Mäuse mit Hamster- PrP^{C} – nicht aber Wildtyp-Mäuse – mit Hamster- PrP^{Sc} infizierbar (Weissmann *et al.* 1994, Moore *et al.* 2005, Collinge and Clarke 2007). Interessanterweise induziert die Infektion zwischen zwei Individuen mit homologem Prionprotein, d.h. identischer Aminosäuresequenz, nicht immer denselben Phänotyp, das neu-infizierte Individuum kann andere Inkubationszeit, Symptome und neuropathologische Veränderungen aufweisen (Piening 2006, Kretzschmar and Tatzelt 2013). Dies führte zur Feststellung, dass die Transmissibilität und Speziesbarriere nicht nur durch die Aminosäuresequenz, sondern auch durch die Existenz verschiedener Prionprotein-Stämme, die aufgrund bestimmter biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften verschiedene Konformationen annehmen, determiniert wird (Collinge 2001, Hagiwara *et al.* 2013, Kretzschmar and Tatzelt 2013).

Die TSE-Übertragung von Schafen (Scrapie) auf Rinder (BSE) und von Rindern auf Menschen (nvCJD) gilt als gesichert bzw. sehr wahrscheinlich (Collinge 1997, 2001). Darum ist die Übertragung von Prion-Erkrankungen vom Tier auf den Menschen und zwischen den Menschen zu einem zentralen Forschungspunkt von Prionen geworden.

1.7 Prionprotein (PrP^{C})

Im Jahr 1984 gelang Prusiner und seinen Mitarbeitern die Aufreinigung von PrP^{Sc} und die Identifizierung eines Teils der N-terminalen Aminosäuresequenz (Prusiner *et al.* 1984). Durch diese Sequenz konnten DNA-Sonden konstruiert und das Prionprotein-Gen (*PRNP*) in Hamster- (Oesch *et al.* 1985) und Mäuse-Zellen (Chesebro *et al.* 1985, Lochter *et al.* 1986) lokalisiert und kloniert werden. Wider Erwarten stellte sich heraus, dass das Prionprotein in den Wirtszellen exprimiert wird und nicht krankheitsspezifisch ist, vielmehr wird es bei adulten Organismen ubiquitär exprimiert, wobei die höchste Expressionsrate im ZNS, v. a. in Neuronen und Gliazellen, erreicht wird (zur Übersicht s. Linden *et al.* 2008). Das ließ schlussfolgern, dass das Prionprotein in zwei Formen existiert: die normale zelluläre Form (PrP^{C} , *prion protein cellular*) und die veränderte, pathogene Form (PrP^{Sc} , *prion protein scrapie*).

Das Prionprotein wird beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 20 (20p13) (*PRNP*) und bei Mäusen auf der korrespondierenden Region von Chromosom 2 (*Prnp*) kodiert. Das Prionprotein-Gen besteht aus drei (bei Ratte, Maus, Rind, Schaf) oder zwei (bei

Hamster, Menschen, Wallaby) Exonen, wobei sich der offene Leserahmen (ORF, *open reading frame*) allein im 3`-Exon befindet (Puckett *et al.* 1991, Horiuchi *et al.* 1998, Lee *et al.* 1998).

Das humane, reife, zelluläre Prionprotein besteht aus 208 Aminosäuren und ist an der Außenseite der Zellmembran lokalisiert. PrP^C kann grob in zwei Hälften eingeteilt werden: die flexible, unstrukturierte N-terminale Hälfte und die globuläre C-terminale Hälfte, die durch einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Zellmembran gebunden ist (Wuthrich and Riek 2001) (Abb. 1.12a). In seiner detaillierten Struktur enthält PrP^C zwei positiv geladene Aminosäurenkluster (CC₁, CC₂), eine Oktapeptid-Repeat-Region (OR), einen hydrophobischen Kern (HC), drei α -Helices (H1-H3), zwei kurze, antiparallel verlaufende β -Faltblätter, eine Disulfidbrücke (S-S, zwischen AS 179 und 214) und zwei N-glykosylierte Seiten (AS 181 und 197) (Zahn *et al.* 2000, Aguzzi *et al.* 2008) (Abb. 1.12b).

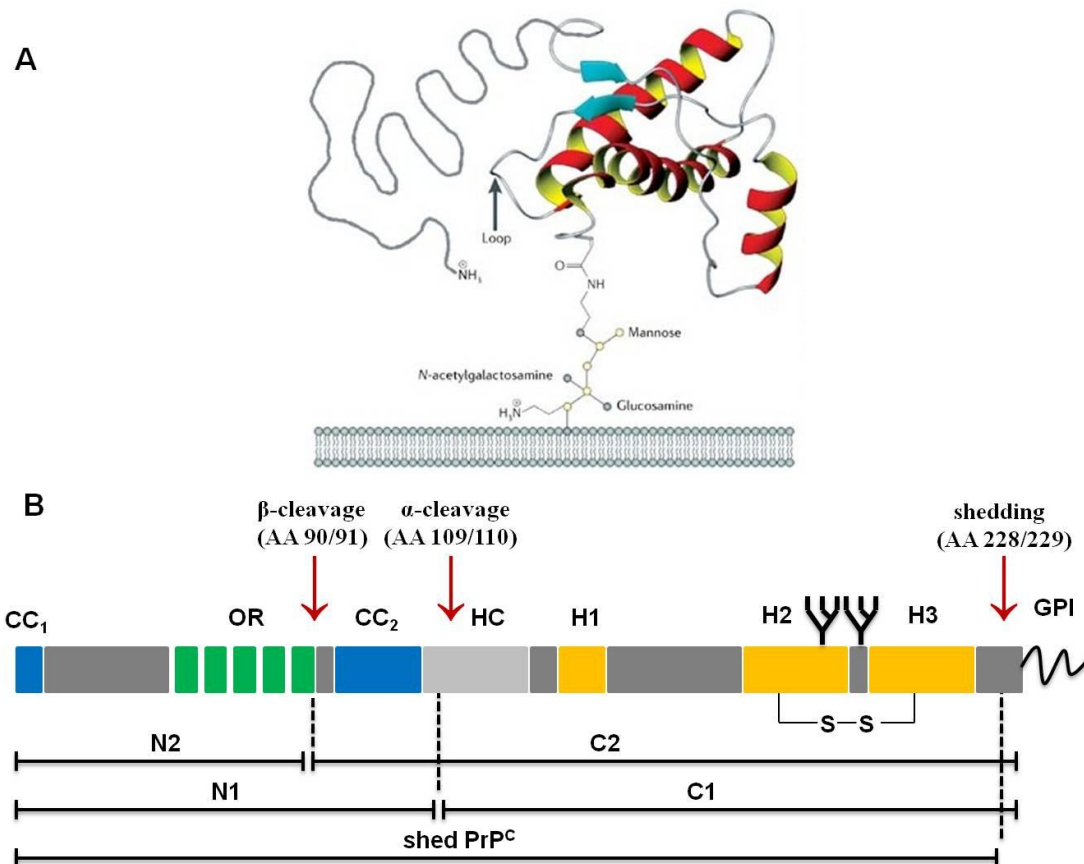


Abb. 1.12 Struktur des Prionproteins (PrP^C)

A) die dreidimensionale, tertiäre Struktur des Prionproteins (nach Aguzzi and Heikenwalder 2006) PrP^C ist durch GPI in der Zellmembran verankert und besitzt einen flexiblen N-terminalen Schwanz (grau) und eine C-terminale, globuläre Struktur, die wiederum aus drei α -Helices (rot, gelb) und zwei antiparallel verlaufenden β -Faltblatt-Strukturen (blau) zwischen der 2. und 3. α -Helix sowie zwischen der 3. α -Helix und dem N-terminalen Teil besteht. **B)** schematische Darstellung des humanen, zellulären Prionproteins PrP^C bestehend aus zwei positiv geladenen Aminosäurenklustern CC₁ und CC₂ (blau), einer Oktapeptid-Repeat-Region OR (grün), einem hydrophobischen Kern HC (hellgrau), drei

α -Helices H1-H3 (orange), einer Disulfidbrücke zwischen AS 179 und 214 und zwei N-glykosylierten Seiten an AS 181 und 197 (durch Bäumchen symbolisiert). Außerdem sind die Schnittstellen innerhalb PrP^C markiert (rote Pfeile). Während seiner Reifung wird PrP^C zuerst das Signalpeptid (22 AS) am N-terminalen Ende gespalten, dann werden weitere 23 AS am C-terminalen Ende gespalten, um die Bindung der GPI-Einheit zu ermöglichen. Das reife PrP^C unterliegt dann mindestens drei möglichen Spaltungsprozessen; unter pathologischen Bedingungen erfolgt die β -Spaltung zwischen AS 90 und 91 resultierend in zwei Fragmente N2 und C2. Durch die α -Spaltung zwischen AS 109 und 110 entstehen die Fragmente N1 und C1, durch das Shedding wird die Ektodomäne von der Zellmembran freigesetzt. Die entstehenden Fragmente können sowohl physiologische als auch pathologische Funktionen ausüben.

Als ein Oberflächenprotein wird PrP^C zuerst ins raue endoplasmatische Retikulum synthetisiert. Parallel zu seiner Synthese wird das Signalpeptid (22 AS) abgespalten, im weiteren Verlauf werden auch 23 AS vom C-terminalen Teil abgespalten, dadurch wird das Ende frei für die Bindung der GPI-Einheit (Stahl *et al.* 1987). Außerdem werden an Asparagin-Reste 181 und 197 während des Transports im ER und Golgi-Apparat zwei Mannose-haltige Polysaccharide angehängt, die im weiteren Verlauf weiter modifiziert werden. Bei der elektrophoretischen Auftrennung lassen sich sowohl zweifach-glykosylierte, einfach-glykosylierte als auch unglykosylierte PrP^C-Moleküle nachweisen, die ein Molekulargewicht von 25 – 35 kDa aufweisen (Endo *et al.* 1989, Haraguchi *et al.* 1989, Rudd *et al.* 2001). Die dreidimensionale Struktur wird weiterhin durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 179 und 214 stabilisiert (Haraguchi *et al.* 1989, Mehlhorn *et al.* 1996). Das synthetisierte PrP^C gelangt dann über Vesikel zur Zellmembran und befindet sich dann hauptsächlich in Cholesterol-reichen Membran-Domänen, die sogenannten „lipid rafts“ (Vey *et al.* 1996). Zudem konnten weitere PrP^C-Moleküle zytosolisch lokalisiert werden (Ma *et al.* 2002, Mironov *et al.* 2003, Orsi *et al.* 2006).

Ähnlich wie Membran-Rezeptoren wird PrP^C nach einer Halbwertszeit von 3 – 5 Stunden internalisiert und endosomal-lysosomal abgebaut (Borchelt *et al.* 1990, Sunyach *et al.* 2003). Dabei unterliegt es mindestens drei möglichen Spaltungsprozessen: α -Spaltung, β -Spaltung und Shedding (Abb. 1.12). Diese Spaltungen regulieren vermutlich die physiologischen Funktionen von PrP^C, produzieren funktionell aktive Fragmente und scheinen eine Rolle in der Pathogenese von Prion-Erkrankungen zu haben (Altmeyen *et al.* 2011, Altmeyen *et al.* 2012).

Die physiologische Funktion von PrP^C ist nicht befriedigend geklärt. PrP-knock-out-Mäuse (PrP^{0/0}) entwickeln sich normal und zeigen kaum Auffälligkeiten (Bueler *et al.* 1992, Manson *et al.* 1994, Aguzzi *et al.* 2008). Weitere Studien haben verschiedene Funktionen für PrP^C vorgeschlagen; so scheint PrP^C durch unterschiedliche Mechanismen, wie Hemmung der

Apoptose oder eine antioxidative Wirkung, neuroprotektiv zu agieren. Außerdem wurde dem Prionprotein eine Rolle in der Neurogenese, Synapsenbildung, Neuritenwachstum und Aufrechterhaltung der myelinisierten Axone zugeschrieben. Weiterhin spielt das zelluläre Prionprotein eine Rolle in der Zelladhäsion, Kupfer-Homöostase und Signaltransduktion (zur Übersicht s. Aguzzi and Polymenidou 2004, Aguzzi *et al.* 2008, Linden *et al.* 2008, Beland and Roucou 2012). Außerdem wird das Prionprotein im Immunsystem und anderen peripheren Organen exprimiert (Linden *et al.* 2008). Interessanterweise wird die Neurotoxizität als eine mögliche pathologische Funktion des Prionproteins diskutiert, indem es beispielsweise die Toxizität von A β -Oligomeren bei Alzheimer-Patienten vermittelt (Lauren *et al.* 2009, Resenberger *et al.* 2011, You *et al.* 2012).

1.8 Pathogenese von Prion-Erkrankungen

Lange bevor man das Prionprotein-Gen identifizieren konnte, wurde die These aufgestellt, dass die TSEs durch ein Protein, das in der Lage ist, sich autokatalytisch zu replizieren, übertragen werden (Griffith 1967). 1982 führte Prusiner den Begriff „Prion“ ein und stellte die „Prion-Hypothese“ auf (Prusiner 1982). Demnach ist der TSE-Erreger eine pathogene, falschgefaltete Form eines spezifischen Wirtsproteins, das zelluläre Prionprotein (PrP^C). Das falschgefaltete Protein (später PrP^{Sc} bezeichnet, von *Scrapie*) ist in der Lage, andere normale Moleküle (PrP^C) zu binden und ihre Konformationsänderung in einem autokatalytischen Prozess zu induzieren (Prusiner 1982, 1991) (Abb. 1.13).

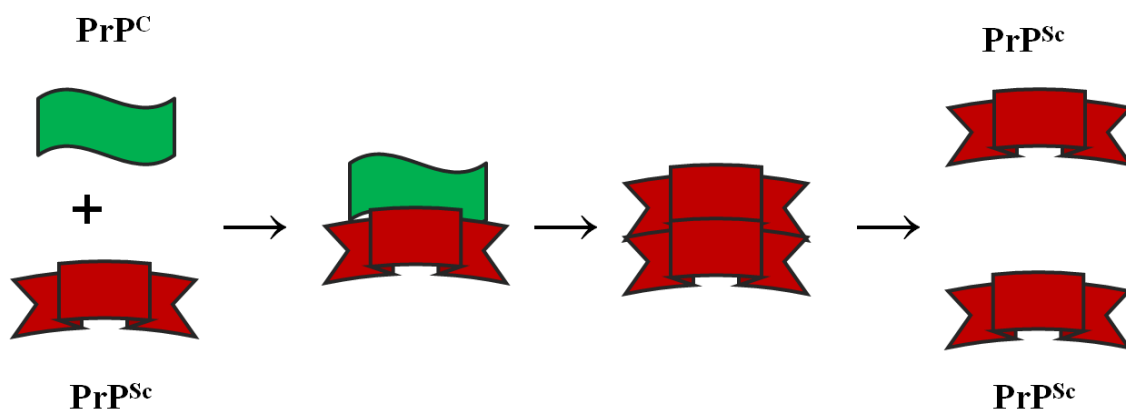


Abb. 1.13 Prion-Hypothese (Heterodimer-Modell)

Ein falschgefaltetes Prionprotein (PrP^{Sc}) trifft auf ein normales Prionprotein (PrP^C) und induziert autokatalytisch seine Umfaltung. Beide Moleküle gehen auseinander und induzieren kaskadenartig die Konformationsänderung weiterer Moleküle.

Im Vergleich zum zellulären Prionprotein (PrP^C) besitzt PrP^{Sc} einen hohen Anteil an β -Faltblättern und bildet deshalb unlösliche Aggregate (die sogenannten Scrapie-assoziierten Fibrillen, SAF, oder „prion rods“) (Bolton *et al.* 1982, Prusiner *et al.* 1983, Caughey and

Raymond 1991, Pan *et al.* 1993, Safar *et al.* 1993a). Weiterhin ist PrP^{Sc} wegen seiner biochemischen Eigenschaften resistent gegenüber Protein-abbauenden Enzymen wie Proteinase K (PK), Chemikalien und Hitzedenaturierung (McKinley *et al.* 1983, Prusiner *et al.* 1993, Safar *et al.* 1993b).

Bestätigend für die Prion-Hypothese zeigten weitere Studien, dass PrP^{0/0}-Mäuse nach zerebraler Inokulation mit PrP^{Sc} nicht infizierbar sind. Nach Wiedereinführung des Prionprotein-Gens kann die Infizierbarkeit jedoch wiederhergestellt werden (Bueler *et al.* 1992, Brandner *et al.* 1996). Dies lieferte den Nachweis dafür, dass die Anwesenheit von PrP^C für die Infektion und Neurodegeneration eine Bedingung darstellt (Pan *et al.* 1993). Zudem zeigten transgene Mäuse mit PrP Δ GPI, d. h. das Prionprotein ohne den GPI-Anker und somit ohne den Kontakt zur Plasmaembran, zwar PrP^{Sc}-Bildung, aber keine Neurodegeneration und keine klinischen Symptome (Chesebro *et al.* 2005). Das beweist, dass die Bindung von PrP^C zur Zellmembran auch eine Bedingung für die Infektion ist. Der genaue Mechanismus der Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} ist weitgehend unbekannt. Unter anderen versuchen zwei Modelle eine Erklärung dafür zu liefern; das Heterodimer-Modell nach Prusiner (Prusiner 1991) und das Nukleations-Modell nach Lansbury (Jarrett and Lansbury 1993). Während Prusiner davon ausgeht, dass ein einziges PrP^{Sc}-Molekül dazu fähig ist, dem PrP^C seine Konformation aufzuzwingen (Abb. 1.13), muss nach Lansbury zuerst ein Nukleus aus PrP^{Sc} gebildet werden, der dann als infektiöses Partikel fungiert. Das letzte lässt sich durch neuere Studien als der wahrscheinlichere Mechanismus vermuten.

Eine Herausforderung für die Prion-Hypothese stellt die Tatsache dar, dass Prion-Erkrankungen nicht nur infektiös (<1% bei CJD) bedingt sind, sondern auch sporadisch (85% bei CJD) oder vererbt (genetisch) (15% bei CJD) auftreten. Die Befürworter der Prion-Hypothese gehen davon aus, dass einerseits die *PRNP*-Mutationen die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} begünstigen und andererseits die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften von PrP^C seine spontane Konformationsänderung unter bestimmten Umständen ermöglichen. Die oben erwähnten Beobachtungen legen nahe, dass es sich beim PrP^{Sc} um einen wesentlichen Bestandteil des infektiösen Prionpartikels handelt, nicht jedoch um das toxische. Während das aus PrP^C entstehende PrP^{Sc}, ob durch eine Infektion, spontan oder vererbt, eine Infektion induzieren und Neurodegeneration verursachen kann, rufen PrP-Mutationen Neurodegeneration hervor ohne infektiös zu sein (Winklhofer *et al.* 2008).

Die Frage, ob die Neurotoxizität durch *loss-of-function* oder *gain of toxic function*, oder beides vermittelt wird, ist auch nicht ausreichend geklärt. Während einige Forscher die

Meinung vertreten, die Toxizität sei eine Folge von *loss-of-function* von PrP^C (Nazor *et al.* 2007), halten andere das *gain of toxic function* vom akkumulierten PrP^{Sc} für den wahrscheinlicheren Mechanismus (Collins *et al.* 2004, Westergard *et al.* 2007). Beide Mechanismen können aber auch kombiniert in einer komplexen Art und Weise die Neurodegeneration verursachen (Linden *et al.* 2008, Winklhofer *et al.* 2008).

1.9 Zusammenhänge zwischen Morbus Alzheimer und Prion-Erkrankungen

Trotz des großen Unterschieds in der Häufigkeit und der Vielfältigkeit der Symptome zwischen Morbus Alzheimer und Prion-Erkrankungen beobachtete man schon lange gewisse Ähnlichkeiten und Parallelitäten zwischen den beiden Krankheiten. Beide gehören zur Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen, deren Pathogenese die Missfaltung und Akkumulation von bestimmten Proteinen beinhaltet und die in Neuronenverlust enden (DeArmond 1993, Wisniewski and Sigurdsson 2007). Auch auf histopathologischer, zellulärer und molekularer Ebene lassen sich solche Ähnlichkeiten beobachten (Barnham *et al.* 2006, Taylor and Hooper 2007). Dies weckte das Interesse an möglichen molekularen Zusammenhängen zwischen den beiden Krankheitsgruppen und den daran beteiligten Mechanismen und sogar die Suche nach einer vereinheitlichenden Theorie für die neurodegenerativen Erkrankungen (Price *et al.* 1993, Bucciantini *et al.* 2002) und gemeinsamen Therapiemöglichkeiten (Wisniewski and Sigurdsson 2007). Tatsächlich zeigten neue Studien einige Verbindungen und Zusammenhänge auf der molekularen Ebene, die möglicherweise die Pathogenese beider Pathologien beeinflussen (Checler and Vincent 2002, Kellett and Hooper 2009, Morales *et al.* 2010).

Einerseits unterliegen zwei Proteine im Zentrum von Alzheimer-Krankheit und Prion-Erkrankungen, nämlich APP und PrP einem gemeinsamen Protein-Kinase C-regulierten Spaltungsprozess mitten im toxischen Bereich, A β und der hydrophobische Kern (HC 106 – 126) in der Reihenfolge, was letztendlich ihre Toxizität verhindert. Für diesen Prozess wurden Proteasen der ADAM-Familie („ *α disintegrin and metalloproteinase*“), nämlich ADAM10 und ADAM17, verantwortlich gemacht (Checler and Vincent 2002, Vincent 2004, Jorissen *et al.* 2010, Kuhn *et al.* 2010), obwohl neuere Experimente zeigen, dass ADAM10 zwar für die Freisetzung des Prionproteins (Shedding) (Abb. 1.12), nicht jedoch für das „ α -Cleavage“ verantwortlich ist (Altmeyen *et al.* 2011, Altmeyen *et al.* 2012). Andererseits fungiert PrP^C als Inhibitor bzw. Modulator für die β -Sekretase BACE1, das Enzym, das die Bildung von A β aus APP initiiert, durch direkte Interaktion in den Cholesterin-reichen Membrandomänen „*lipid rafts*“ (Parkin *et al.* 2007). Neuere Experimente zeigen jedoch, dass PrP^C mit BACE1

im frühen Kompartiment (ER und Golgi-Apparat) interagiert und seine Wanderung zur Plasmamembran und Endosomen, wo BACE1 APP hauptsächlich prozessiert, verhindert (Griffiths *et al.* 2011). Durch diesen Mechanismus kann PrP^C die A β -Produktion hemmen und AD-Pathogenese negativ beeinflussen. Daraus lässt sich schließen, dass der Funktionsverlust von PrP^C, z.B. durch Mutation oder gar Knocking-Out, einen Anstieg der A β -Produktion zur Folge hat. In der Tat lässt sich ein signifikanter Anstieg der A β -Menge in Gehirnen von PrP^{0/0}-Mäusen und Zellen, die mutiertes PrP exprimieren, nachweisen (Parkin *et al.* 2007). Außerdem lässt sich das mit weiteren Studien vereinbaren, die zeigen, dass ein Polymorphismus im PrP-Gen Codon 129, welches die Suszeptibilität zu sporadischen und iatrogenen humanen Prion-Erkrankungen erhöht (Palmer *et al.* 1991, Deslys *et al.* 1994, Lewis *et al.* 2006), auch die Suszeptibilität und Pathophysiologie von Morbus Alzheimer begünstigt (Dermaut *et al.* 2003, Riemenschneider *et al.* 2004, Del Bo *et al.* 2006, Gacia *et al.* 2006). Vollständigkeitshalber soll noch erwähnt werden, dass ein Polymorphismus im BACE1-Gen als Risikofaktor für sCJD beschrieben wurde (Calero *et al.* 2012). Zudem ist ADAM10 selbst ein Substrat von anderen Proteasen, darunter γ -Sekretase (Tousseyn *et al.*, 2009). D.h. zum einen erfüllt ADAM10 eine duale Funktion: als Protease von mehreren Proteinen und als potentielles Signaltransduktions-Glied durch seine intrazelluläre Domäne (ICD), welche durch eine andere Protease freigesetzt wird (Tousseyn *et al.* 2009) und zum anderen erhöht γ -Sekretase die amyloidogene Prozessierung von APP, indem sie ADAM10 (α -Sekretase) spaltet.

Im Gegensatz zur oben beschriebenen neuroprotektiven Rolle von PrP^C in der AD-Pathogenese berichteten zahlreiche Studien, dass PrP^C als Rezeptor für A β -Oligomere an der Zelloberfläche dient (Lauren *et al.* 2009). Dieses Bindeglied zwischen beiden Krankheitsgruppen ist allerdings nicht unumstritten (Calella *et al.* 2010). Während einige Autoren davon ausgehen, dass die A β -Neurotoxizität unabhängig von seiner Bindung zu PrP^C ist (Balducci *et al.* 2010, Kessels *et al.* 2010), gibt es zahlreiche Beweise dafür, dass PrP^C doch die Toxizität von A β vermittelt (Lauren *et al.* 2009, Chung *et al.* 2010, Gimbel *et al.* 2010, Alier *et al.* 2011, Barry *et al.* 2011, Bate and Williams 2011, Freir *et al.* 2011, Resenberger *et al.* 2011, Kudo *et al.* 2012, You *et al.* 2012). Laut Resenberger *et al.* ist PrP^C sogar in der Lage, β -Faltblatt-reiche Strukturen unterschiedlichen Ursprungs, wie A β , heterologes PrP, Hefe-Prionprotein und synthetische β -Peptide zu binden (Resenberger *et al.* 2011). Der genaue Mechanismus der Toxizität bis hin zum Zelltod ist noch ungeklärt, v. a. weil PrP^C durch einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden ist und somit theoretisch kein Signal in den intrazellulären Raum leiten kann. Einige Studien beschreiben die PrP^C-

Dimerisierung, die cPLA₂- (*cytoplasmatic phospholipase A₂*), die Fyn- und Kaspase-Aktivierung und die Beteiligung von NMDA-Rezeptoren als möglicher Mechanismus (Mouillet-Richard *et al.* 2000, Solforosi *et al.* 2004, Bate and Williams 2011, Kudo *et al.* 2012, Larson *et al.* 2012, Um *et al.* 2012). Neben dem toxischen Effekt wird die Lokalisation von PrP durch seine Bindung zu A β -Oligomeren beeinflusst; laut Caetano *et al.* erhöhen A β -Oligomere die PrP-Menge an der Zelloberfläche durch möglicherweise verschiedene Mechanismen, darunter die Hemmung der Endozytose (Caetano *et al.* 2011). Die Frage, ob die neuroprotektive und neurotoxische Funktion von PrP^C im AD-Verlauf zur gleichen Zeit existieren und wenn, was der Nettoeffekt ist, ist immer noch unbeantwortet.

Schließlich wurde berichtet, dass Präseniline die Expression von PrP^C beeinflussen (Vincent *et al.* 2009). Demnach resultiert die γ -Sekretase vermittelte, Präsenilin-abhängige Prozessierung von APP in der Freisetzung der intrazellulären Domäne (AICD), die einen Komplex mit dem Adapterprotein Fe65 und der Histon-Acetyltransferase Tip60 bildet. Dieser Komplex wandert in den Zellkern und aktiviert einige Gene, darunter das Gen des Tumorsuppressors p53. Hier sei erwähnt, dass p53 bei AD erhöht ist und als Mediator der Apoptose und somit der Neurodegeneration bei den AD-Betroffenen vorgeschlagen wurde (de la Monte *et al.* 1997, Kitamura *et al.* 1997, Ohyaig *et al.* 2005). Nach Vincent *et al.* kann p53 direkt an den Promotor von PrP^C binden und seine Expression induzieren (Kellett and Hooper 2009, Vincent *et al.* 2009). Eine andere Studie hat jedoch keinen signifikanten Effekt auf die PrP^C-Expression durch die Überexpression bzw. Knocking-down von APP-Isoformen in Zellmodellen bzw. in transgenen Mäusen oder Inhibition von γ -Sekretase feststellen können (Lewis *et al.* 2012). Bestätigend für die letzte Studie wurde zudem beobachtet, dass das PrP^C-Level bei AD-Patienten in verschiedenen Krankheitsstadien in verschiedenen Hirnregionen (Frontal-, Temporalkortex, Hippocampus) unverändert bleibt (Saijo *et al.* 2011).

1.10 Zusammenfassung

Die Alzheimer-Krankheit (AD) ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung, die sich klinisch durch Gedächtnisverlust, kognitive Beeinträchtigung, Sprachprobleme und psychische Störungen manifestiert. Neuropathologisch ist AD durch drei Merkmale charakterisiert: extrazelluläre Peptid-Ablagerungen „*A β -Plaques*“, intrazelluläre neurofibrilläre Bündel „*tangles*“ und Neuronenverlust (s. Abb. 1.1). Neben dem weitaus häufigeren sporadischen Form (*sporadic AD, SAD*) kommt die seltene familiäre Form (*familial AD, FAD*) vor. Während SAD zum großen Teil erst nach dem 60. bzw. 65 Lebensjahr auftritt (*late onset AD, LOAD*), bricht die genetisch bedingte Form schon früher aus (*early onset AD, EOAD*) und hat i. d. R. einen dramatischeren Verlauf. Obwohl die genetisch bedingten Fälle weniger als 1% der Krankheitsfälle ausmachen, hat deren Analyse einen großen Beitrag zum Verständnis der AD-Pathogenese geleistet. Vier Gene mit ca. 230 Mutationen in mehr als 500 Familien haben sich in der AD-Forschung etabliert, es handelt sich um die für die Proteine APP (*Amyloid precursor Protein*), PS1 (*presenilin-1*), PS2 (*presenilin-2*) und ApoE (*Apolipoprotein E*) kodierenden Gene, wobei bei 60 – 80% der LOAD-Fälle ein ApoE-Polymorphismus bekannt ist (s. Tab. 1).

APP ist ein Typ-I-Membranprotein und beinhaltet im transmembranen Bereich und teilweise extrazellulär das A β -Peptid (s. Abb. 1.3). APP kann durch eine α -Sekretase im A β -Bereich gespalten werden und in einem zweiten Schritt wird die intrazelluläre Domäne (AICD) durch γ -Sekretase freigesetzt, diese Prozessierung verhindert die Bildung von A β (nicht-amyloidogen). Anderenfalls wird APP am N-terminalen Ende von A β durch eine β -Sekretase (BACE1) und anschließend am C-terminalen Ende durch γ -Sekretase gespalten, wodurch A β -Peptid freigesetzt wird (amyloidogen) (s. Abb. 1.4). A β kann sich extrazellulär ablagern und eine Reihe von Prozessen induzieren, die die Neurodegeneration mit sich bringen (die Amyloidhypothese) (s. Abb. 1.2). γ -Sekretase, ein Enzymkomplex, der eine wichtige Rolle in der Prozessierung mehrerer Proteine wie APP, Notch-Rezeptor, E- und N-Cadherin spielt, besteht aus mindestens vier einzelnen Proteinen: Präsenilin 1 oder 2 (PS1/2), Nicastrin (Nct), Präsenilin-Enhancer-2 (PEN2) und „*anterior pharynx defective-1*“ (Aph-1) (s. Abb. 1.7). Das Präsenilin bildet das aktive Zentrum im Komplex, wobei Präsenilin-1 die dominante Rolle zu haben scheint, mit mehr als 180 Mutationen in PSEN-1 sind zudem die meisten AD-Mutationen auf dem PS1-Gen lokalisiert. Solche Mutationen begünstigen durch verschiedene Mechanismen die Bildung von A β -Aggregaten. Es wurden Präsenilin außerdem weitere Funktionen außerhalb des γ -Sekretase-Komplexes zugeschrieben, wie seine Beteiligung in der

β -Catenin-Homöostase, Proteintransport und -abbau, Reifung von der ATPase-Protonenpumpe und Kalzium-Homöostase; solche Prozesse sind auch im AD-Verlauf beeinträchtigt.

Das Prion (*proteinaceous infectious particle*) ist eine neue Erreger-Klasse, die im Gegensatz zu Bakterien, Pilzen und Viren keine genetische Information in Form von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) besitzt. Im Grunde wird das Prionprotein bei allen Organismen ubiquitär exprimiert, es erreicht allerdings seine höchste Expressionsrate im ZNS. Das Prionprotein ist durch einen GPI-Anker mit der Plasmamembran gebunden und ist extrazellulär lokalisiert, es besitzt eine globuläre, konservierte C-terminale Domäne und einen flexiblen, unstrukturierten Teil, der für seine Funktionen entscheidend ist (s. Abb. 1.12). Die physiologische Funktion von PrP ist nicht befriedigend geklärt, da PrP-knock-out-Mäuse kaum Auffälligkeiten zeigen; es werden ihm allerdings einige Funktionen in der Neurogenese, Synapsenbildung, Aufrechterhaltung der myelinisierten Axone, Zelladhäsion, Kupfer-Homöostase und Signaltransduktion zugeschrieben. Die Konversion des normalen, zellulären Prionprotein (PrP^{C} , aus *cellular*) in die pathogene, β -Faltblatt-reiche Form (PrP^{Sc} , aus *Scrapie*), ob spontan (sporadisch), durch eine Mutation (genetisch-bedingt) oder durch das Treffen auf ein bereits falschgefaltetes Molekül (infektiös) induziert, verursacht die neurodegenerativen Prion-Erkrankungen. Die Prion-Erkrankungen können sowohl Menschen (CJD, GSS; Kuru, FFI etc.) (s. Tab. 3) als auch Tiere (Scrapie, BSE, CWD etc.) betreffen und haben einen schnell progressiven, tödlichen Verlauf. Neuropathologisch sind sie durch eine schwammartige (spongiose) Architektur des Hirngewebes, astrozytäre Gliose und PrP-Ablagerungen charakterisiert. Daher werden die Prion-Erkrankungen unter dem Sammelbegriff „*transmissible spongiforme encephalopathies*“ (TSE) summiert.

Zwischen der Alzheimer-Krankheit und den Prion-Erkrankungen lassen sich einige Ähnlichkeiten und Parallelen auf histopathologischer, zellulärer und molekularer Ebene beobachten. Neulich wurden sogar direkte Verbindungen und Interaktionen auf der molekularen Ebene beschrieben. Einerseits wurde PrP ein neuroprotektiver Effekt auf AD zugeschrieben, indem es das $\text{A}\beta$ -produktionslimitierende Enzym (β -Sekretase, BACE1) inhibiert, andererseits zeigten zahlreiche Studien, dass PrP die $\text{A}\beta$ -Oligomere bindet und ihre Zytotoxizität vermittelt. Außerdem wurde berichtet, dass PS1 die Expression von PrP^{C} beeinflusst; so setzt die γ -Sekretase-vermittelte, PS1-abhängige Spaltung von APP die intrazelluläre Domäne (AICD) frei, die einen Komplex mit Fe65 und Tip60 bildet, der wiederum in den Zellkern wandert und Transkription einiger Gene, darunter das von p53,

induziert. p53 agiert dann als direkter Aktivator des PrP-Gens (PRNP). Dieser Einfluss von PS1 auf PrP ist jedoch noch umstritten.

2 ZIELSETZUNG

Ausgehend aus den als letztes beschriebenen Zusammenhängen zwischen Alzheimer-Krankheit und Prion-Erkrankungen – v. a. dem beschriebenen Einfluss von PS auf die PrP^C-Expression – und eigener Beobachtung im Labor, bei der sich veränderte Expression von PrP^C in verschiedenen Hirnregionen bei AD-Patienten detektieren ließ, widmet sich die vorliegende Arbeit der Erforschung des Einflusses von Präsenilinen und Präsenilin-Mutationen auf das Prionprotein hinsichtlich seiner Expression, Verteilung und seines Abbaus. Hierfür wird PrP^C in zwei unterschiedlichen Zellreihen des Zellmodells (MEF) „*Mouse Embryonic Fibroblasts*“, nämlich in transient und stabil transfizierten Zellen, analysiert. Dabei werden im Prinzip drei unterschiedliche Situationen miteinander verglichen:

- Wild Typ-Zellen (MEFs PS1/2^{+/+}) als Positivkontrolle
- Doppel-knock-out-Zellen (MEFs PS1/2^{-/-}, d.h. ihnen fehlen beide Präseniline) als Negativkontrolle
- Zellen, die mutierte Präseniline exprimieren (dafür wurden exemplarisch drei repräsentative Mutationen gewählt: PS1-E208A, PS1-Δ9 und PS2-N141I) (s. 1.2.5)

Für die Analyse des genauen Mechanismus und die bessere Interpretation werden dabei die in Betracht kommenden Mechanismen analysiert:

- die PS-abhängige γ -Sekretase-Aktivität, gemessen an der AICD-Produktion
- die möglicherweise involvierten Proteine: p53, ADAM10
- die γ -Sekretase-unabhängigen PS-Funktionen, gemessen an der Phosphorylierung von β -Catenin

Es wird also der Frage nachgegangen, ob und inwiefern Präseniline bzw. klinisch relevante Präsenilin-Mutationen die PrP^C-Expression beeinflussen. Und wenn ja, ob in einem γ -Sekretase-abhängigen Mechanismus oder nicht; und ob andere „Zwischenspieler“ diesen Einfluss vermitteln.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Bioreagenzien

3.1.1.1 Chemikalien

Produkt	Firma
0,2 % Triton X 100	ROTH, Karlsruhe
10x FastDigest [®] Puffer	Fermentas, St. Leon.Rot
10x T4 DNA Ligase Buffer	Fermentas, St. Leon.Rot
10x Reaktionspuffer	Fermentas, St. Leon.Rot
10x FastDigest Puffer Green	Fermentas, St. Leon.Rot
10x FastDigest Puffer Tango	Fermentas, St. Leon.Rot
2,2-Bis-(hydroxyethyl)-(iminotris) (hydroxymethyl)methan (Bis Tris)	Merck, Darmstadt
6x DNA Loading Dye (6x Stopppuffer)	Fermentas, St. Leon.Rot
Acetat	Merck, Darmstadt
Acrylamid	ROTH, Karlsruhe
Agarosepulver	Invitrogen, Darmstadt
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	ROTH, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserum Albumin)	BioRad, München
DAPI (4',6-Diamidin-2'- phenylindoldihydrochlorid)	Invitrogen, Darmstadt
DMEM Medium (high-glucose (4,5g/l) with L-Glutamine)	PAA, Pasching, Österreich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, München
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching, Österreich
Eserserum	DIANOVA, Hamburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Fluoromout S (Mounting-Lösung)	Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA
Foetal Calf Serum (FCS), standard quality	PAA, Pasching, Österreich
Glukose	Sigma-Aldrich, München
Glycerol	Sigma-Aldrich, München
Glycin	Sigma-Aldrich, München
Hefe	ROTH, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lipofectamine [®] 2000 Reagent	Invitrogen, Darmstadt
Magermilchpulver Reform Instant	Frema Reform, Lüneburg
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, München
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetrametylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	ROTH, Karlsruhe
Natrium-Deoxycholat	Sigma-Aldrich, München
Nonylphenolethoxylat NP-40	Sigma-Aldrich, München
NuPAGE [®] LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE [®] MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Darmstadt
Opti-MEM [®] reduced serum medium (1x)	Invitrogen, Darmstadt
Paraformaldehyd-Lösung (PFA 4%)	Electron Microscopy Sciences
Penicillin/Streptomycin (100x) (Pen/Strep)	PAA, Pasching, Österreich
Phosphatase Inhibitor (Cocktail Teblents)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Protease Inhibitor (Cocktail Tablets)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Protein G Sepharose [™] 4 Fast Flow	GE Healthcare, Freiburg
Saccharose	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, München
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, München
Sodiumdodecyl Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Tricine	Sigma-Aldrich, München
Trizma base, minimum, 99,9% titration (Tris)	Sigma-Aldrich, München

Trizma hydrochloride (Tris HCl)	Sigma-Aldrich, München
Trypsin-EDTA (1x)	PAA, Pasching, Österreich
Trypton	ROTH, Karlsruhe
Tween [®] 20	ROTH, Karlsruhe

3.1.1.2 Kommerzielle Kits und Plasmide

Name	Firma
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Fermentas, St. Leon.Rot
Invisorb [®] Spin Plasmid Mini <i>Two</i>	Invitek, Berlin
NucleoSpin RNA II Kit	Machery Nagel
Plasmid DNA Purification NucleoBond [®] Xtra Midi	MACHEREY-NAGEL, Düren
Pierce [®] ECL Western Blotting Substrate	Thermo, SCIENTIFIC, Rochester, USA
SuperSignal [®] West Femto Kit	Thermo, SCIENTIFIC, Rochester, USA
SuperSignal [®] West Pico Kit	Thermo, SCIENTIFIC, Rochester, USA
pcDNA3.1 (-)	Invitrogen, Darmstadt
PcDNA3.1 (+)	Invitrogen, Darmstadt
pCAX	addgene, USA

3.1.1.3 Größenmarker

Name	Firma
Page Ruler™, Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon.Rot
TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Darmstadt

3.1.1.4 Enzyme

Name	Firma
FastDigest [®] Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	Fermentas, St. Leon.Rot
FastDigest [®] Restriktionsenzym <i>XhoI</i>	Fermentas, St. Leon.Rot
FastDigest [®] Restriktionsenzym <i>XbaI</i>	Fermentas, St. Leon.Rot
FastDigest [®] Restriktionsenzym <i>NotI</i>	Fermentas, St. Leon.Rot
FastDigest [®] Restriktionsenzym <i>EcoRV</i>	Fermentas, St. Leon.Rot
FastDigest [®] Restriktionsenzym <i>KpnI</i>	Fermentas, St. Leon.Rot
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon.Rot

3.1.1.5 Antikörper

Primärantikörper	Antigen	Wirt	Klonalität	Verdünnung	Firma
4G8	β -Amyloid 17-24	Maus	monoklonal	WB 1:1000	COVANCE, USA
6E10	β -Amyloid 1- 16	Maus	monoklonal	WB 1:5000	COVANCE, USA
Anti-ADAM10- Antikörper	ADAM10	Kaninchen	polyklonal	WB 1:1000	P. Saftig, Kiel, Deutschland
Anti-APP-CT20	APP-C- Terminus (751- 770)	Kaninchen	polyklonal	WB 1:5000	MILLIPORE, USA
Anti- β -Aktin	β -Aktin	Maus	monoklonal	WB 1:1000	Sigma-Aldrich, München
Anti- β -Tubulin- Antikörper (E7)	β -Tubulin	Maus	monoklonal	WB 1:2000	Sigma-Aldrich, München
Anti-Presenilin 1 antibody (ab71181)	PS1 (1-100) (NTF, FL)	Kaninchen	polyklonal	WB 1:500	abcam, England
Anti-Presenilin 1 antibody [APS]. ab15456	PS1 (21-34) (NTF, FL)	Maus	monoklonal	WB 1:1000	abcam, England
Anti-Presenilin-1, loop, a.a. 263-378, C-terminus, clone PS1-loop (#MAB5232)	Präsenilin-1, intrazelluläre Schleife (CTF, LF)	Maus	monoklonal	WB (1:500) IC (1:500)	MILLIPORE, USA

β -Catenin (6B3) Rabbit mAb #9582	β -Catenin (total)	Kaninchen	monoklonal	WB 1:1000	Cell Signaling, USA
p53 Antibody (FL-393), sc6243	p53 (1-393)	Kaninchen	polyklonal	WB 1:2000	Santa Cruz Biotechnology, USA
Phospho- β -Catenin (Ser33/37/Thr41) Antibody #9561	β -Catenin- P33/37/41	Kaninchen	polyklonal	WB 1:1000	Cell Signaling, USA
Phospho- β -Catenin (Ser45) Antibody #9564	β -Catenin-P45 (Ser45)	Kaninchen	polyklonal	WB 1:1000	Cell Signaling, USA
POM1	Prionprotein (PrP)	Maus	monoclonal	WB 1:1000 IC 1:100	A. Auzzi, Zürich, Schweiz
POM2	Prionprotein (PrP)	Maus	monoklonal	IP 1:250	A. Auzzi, Zürich, Schweiz
Presenilin 1 Antibody (#3622S)	PS1 (Valin 293) (CTF, FL)	Kaninchen	polyklonal	WB 1:500	Cell Signaling, USA
Presenilin 1 (Ln-14) #sc80297	Präsenilin-1 (1-80) (NTF, FL)	Maus	monoklonal	WB 1:500	Santa Cruz Biotechnology, USA
Presenilin 2 Antibody (#2192)	PS2 (330) (CTF, FL)	Kaninchen	polyklonal	WB 1:1000 IC 1:200	Cell Signaling, USA

Sekundärantikörper	Antigen	Wirt	Verdünnung	Firma
Alexa Fluor [®] 488	Maus IgG	Esel	IC 1:500	Inviatrogen, Darmstadt
Alexa Fluor [®] 555	Kaninchen/ Ratte IgG	Esel	IC 1:500	Inviatrogen, Darmstadt
Anti-Mouse-HRP	Maus IgG	Esel	WB 1:2000	Promega, Mannheim
Anti-Rabbit-HRP	Kaninchen IgG	Esel	WB 1:2000	Promega, Mannheim

Mouse TrueBlot [®] ULTRA	Anti-Mouse IgG HRP	Ratte	WB 1:1000	Rockland, Hamburg, Deutschland
--------------------------------------	-----------------------	-------	-----------	-----------------------------------

3.1.1.6 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich geliefert.

Sequenzierungsprimer	Basen-Sequenz
BGHR	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
APP-For	5'-ATGTGGATTCTGCTGATGCCGG-3'
APP-Rev	5'-AGAGACTGATTCATGCGCTC-3'

3.1.2 Zelllinien

Name	Beschreibung	Herkunft
MEFs	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> (WT, PS1 ^{2^{-/-}})	AG Paul Saftig Biochemisches Institut Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
MEFs	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> (WT, PS1 ^{2^{-/-}} , PS1WT, PS1E280A, PS1Δ9, PS2WT, PS2N141I) stabil transfiziert	AG Bart De Strooper Center for Human Genetics Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB) Katholieke Universiteit Leuven

3.1.3 Bakterienstämme

Name	Herkunft
DH5α-Zellen, pCAX APP 695	Addgene, USA
XL10-Gold Ultracompetent Cells	Agilent Technologies, USA

3.1.4 Puffer, Lösungen und Medien

Name	Zusammensetzung
LB-Medium	10g Trypton 5g Hefe 10g NaCl ad. 1l mit ddH ₂ O
LB-Agar	Zusammensetzung s. LB-Medium, zusätzlich 12g Agar 100µg/ml Ampicillin
NZY-Medium	Zusammensetzung s. LB-Medium, zusätzlich 12,5ml 1 M MgCl ₂ 12,5ml MgSo ₄ 10ml 2M Glucose
TAE-Puffer 50x	242g Tris 57,1ml Acetat 100ml 0,5 M EDTA (pH 8) ad. 1l mit ddH ₂ O
0,1%ige Ethidiumbromidlösung	Zusammensetzung s. TAE Puffer 50x, zusätzlich 0,1% Ethidiumbromid
Lysepuffer	10 ml RIPA-Puffer 1 Tab. Protease-Inhibitor-Cocktail ggf. 1 Tab. Phosphatase-Inhibitor-Cocktail
RIPA-Puffer	0,6g Tris Base (50mM) 0,87g NaCl (150mM) 1ml 1% Nonylphenoethoxylat NP-40 0,5g Natrium-Deoxychololat (0,5%) 0,1g SDS (0,1%) mit HCl auf pH 8,0 ad. 100ml mit ddH ₂ O
1x Trenngel-Puffer	18,78g Tris HCl (1,5M) 80ml dH ₂ O mit 5M H ₂ SO ₄ auf pH 8,8 ad. 100ml mit ddH ₂ O 0,1 % SDS (0,1g)

1x Sammelgel-Puffer	6,05g Tris HCl (0,5M) 80ml dH ₂ O mit 5M H ₂ SO ₄ auf pH 6,8 ad. 100ml mit ddH ₂ O
4x Probenpuffer (Lämmli-Puffer)	5,8g Tris Base (240mM) 16g SDS (8%) 94ml Glycerol (40%) 400µg Bromphenolblau (0.2%) 5% β-Mercaptoethanol (frisch vor Anwendung) ad. 200ml mit ddH ₂ O
4x Probenpuffer (Tricin-Gele)	0,121g Tris Base (0,1M) 2,4ml Glycerol (24%) 0,8g SDS (8%) 0,31g DTT (0,2M) 0,5ml Coomasie Blue G (0,1%) ad. 10ml mit ddH ₂ O
10x Kathoden-Puffer (Tricin-Gele)	60,57g Tris Base (1M) 89,6g Tricine (1M) 5g SDS (1%) ad. 500ml mit ddH ₂ O pH 8,25
10x Anoden-Puffer (Tricin-Gele)	60,57g Tris Base (1M) 400ml dH ₂ O mit 18,75 ml HCl (0,225M) pH 8,9 ad. 500ml mit ddH ₂ O
10x Wet-Blot-Puffer (Sandwich Buffer, Transfer Buffer)	30,3g Tris Base (250mM) 144g Glycin (1,92M) ad. 1l mit ddH ₂ O
20x Wet-Blot-Puffer (Bis-Tris-Gele)	10,2g Bicine (25mM) 13,1g Bis Tris (free base) (25mM) 0,75g EDTA(1Mm) ad. 125ml ddH ₂ O
1x Wet-Blot-Puffer	100ml 10x (bzw. 50ml) Wet-Blot-Puffer 200ml Methanol (20 %)

	ad. 1l mit ddH ₂ O
Blockingpuffer (5%ig)	5g Magermilchpulver 100ml TBST
10 x TBST	12,11g Tris Base (100mM) 81,81g NaCl (1,4M) mit HCl auf pH 7,4 10ml Tween® 20 (1%) ad. 1l mit ddH ₂ O
1x TBST	100ml 10x TBST ad 1l mit ddH ₂ O
10x CVL-Puffer	2g SDS 5ml 1M Tris HCl (pH 7.4) 5ml Mercaptoethanol 3g Saccharose ad. 20ml mit ddH ₂ O 1% Bromphenolblau pH 6,8
10x E-Puffer (Laufpuffer, Running Buffer)	30,28g Tris Base (0,25M) 144,13g Glycin (1,92M) 10g SDS (1%) ad. 1l mit ddH ₂ O
1x E-Puffer (Laufpuffer, Running Buffer)	100ml 10x E-Puffer ad. 1l mit ddH ₂ O
Nährmedium	DMEM Medium (545ml) 10% FCS (50ml) 1% Pen/Strep (5ml)
Einfriermedium	50% DMEM Medium 10% DMSO 40% FCS
Sammelgel (für zwei Gele 4%)	12,2ml ddH ₂ O 2,6ml Acrylamid 5ml Sammelgel-Puffer 200µl 10 % APS 20µl TEMED

Trenngel (für zwei Gele 12%)	6,7ml ddH ₂ O
	8ml Acrylamid
	5 ml Trenngel-Puffer
	200µl 10 % APS
	20µl TEMED

3.1.5 Verbrauchsmittel

Produkt	Firma
3kDa Filter (Amicon [®] Ultra-4) MWCO	Millipore, Schwalbach am Taunus
Cryovial [®] -Einfriertubes, PK/100, steril	ROTH, Karlsruhe
Deckgläser	Assistent, Sondheim
Einfrierbox	Nunc, Langenselbold
Kosmetiktuch 100er Box Samtess Clou Prestige	Wepa, Arnsberg-Müschede
Kunststoffküvetten UVette [®]	Eppendorf, Hamburg
Nitrozellulose Membran Immunoblot	BioRad, München
Novex [®] Tricine Gels (SDS-PAGE)	Inviatrogen, Darmstadt
Novex [®] Tris-Glycine Gels (SDS-PAGE)	Inviatrogen, Darmstadt
NuPAGE [®] Novex [®] Bis-Tris Gels (SDS- PAGE)	Inviatrogen, Darmstadt
Objektträger	ROTH, Karlsruhe
Pasteurpipette Glas 230mm, steril	ROTH, Karlsruhe
Pinzetten	Biochem, Weilburg
Pipetten Serol 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen (1 ml, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Eppendorf, Hamburg
PVDF Membran ImmunoblotTM (0,2µm)	BioRad, München
Reaktionsgefäß (Tube) 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß (Tube) 2ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen PP 15ml konisch, Cellstar [®] tubes	Greiner bio-one, Essen
Röhrchen PP 50ml konisch, Cellstar [®] tubes	Greiner bio-one, Essen
Sterile Skalpellklingen	BAYHA, Tuttlingen
Whatman [®] Gel Blot Paper 3MM (Blotting- Papier)	Whatman GmbH, Dassel

Zellkulturflaschen steril, 25cm ² und 75cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte, 12wells, steril	Nunc, Langenselbold
Zellkulturplatte, 6wells, steril	Nunc, Langenselbold
Zellkulturplatte, 96wells, steril	Nunc, Langenselbold
Zellkulturschalen, 60, 100 und 150mm	Nunc, Langenselbold
Zellschaber, 25cm	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.6 Geräte

Gerät	Firma
Absauggerät Miniport (Zellkultur)	Hassheider Medizintechnik, Köln
Autoklav (Technoclav 50)	Technorama, Fernwald
Brutschrank (Zellkultur)	Heraeus electronic, Hanau
Elektroporationsküvetten	BioRad, München
Gefrierschrank -20°	Bosch, Gerlingen
Gefrierschrank -80° UF80-450S	Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Württ
Geldokumentationsgerät Chemi Doc TM XRS	BioRad, München
Gelelektrophoresekammer (Sub-Cell)	BioRad, München
Gelschlitten	BioRad, München
Gene Pulser [®] Transfection Apparatus	BioRad, München
Gießapparatur (für Polyacrylamid-Gele)	BioRad, München
Glasplatten	BioRad, München
Kippschüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Kippschüttler Plattform Shaker STR 6	Stuart Scientific, Essex, England
Kühlschränke (4°C)	Liebherr, Kirchdorf
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Kunststoffkämme (für Agarose- und Polyacrylamid-Gele)	BioRad, München
LABOPORT [®] -Membran-Vakuumpumpe	ROTH, Karlsruhe
Laborschüttler Orbital shaker incubator	TEQ, Weinheim
Laborwaage Shinko Denshi	Vibra, Tokyo, Japan
Magnetthermorührer RCT basic IKAMAG [®]	IKA Werke GmbH&Co. KG, Staufen

Mikroskop Eclipse TS100	Nikon, Melville, USA
Mikrowelle Micromat	AEG, Frankfurt am Main
Mini PROTEAN [®] Tetra Cell-Kammer	BioRad, München
Multiwell-Spektrophotometer μ Quant	Biotek, Bad Friedrichshall
NanoDrop; 1000 Spectrophotometer	Thermo, SCIENTIFIC, Rochester, USA
Netzgerät Electrophoresis Supply, EPS 200	Pharmacia Biotech, Freiburg
Netzgerät Power Supply, Power Pac Basic	BioRad, München
Neubauer-Zählkammer, 0,1mm	Assistent, Sondheim
pH-Meter CG 840	Schott, Mainz
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipette reference 100-1000 μ l	Eppendorf, Hamburg
Pipette reference 10-100 μ l	Eppendorf, Hamburg
Pipette reference 1-10 μ l	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen
Printer P93D	Mitsubishi, Ratinge
Spektrophotometer Gene Quant RNA/DNA	Pharmacia Biotech, Freiburg
Calculator	
Sterilbank Thermo Electron Corporation	Heraeus electronic, Hanau
Herasafe	
Stickstofftank Chronos 80 Biosafe [®]	Messer, Griesheim
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Sarstedt, Nümbrecht
Überkopfschüttler (Reagenzglas-Rotator)	LabMarket, Mannheim
Vortexer	IKA Werke GmbH&Co. KG, Staufen
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft mbH, Dresden
Zeiss Axiovert 200M Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Zellkulturzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

3.1.7 Software und Datenbanken

Name	Firma/Adresse
CCDC-Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi
Gel-Doku (Gel Doc 2000)	BioRad, München
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation
µQuant	Biotek, Bad Friedrichshall
NanoDrop, ND-1000 V3.7.1	Thermo, SCIENTIFIC, Rochester, USA
NCBI-Blast-Datenbank	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome
Nucleic Acid to Amino Acid Translation	http://www.biochem.ucl.ac.uk/cgi-bin/mcdonald/cgina2aa.pl
Quantity One	BioRad, München
Revers Compliment	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
UniProt	http://www.uniprot.org/
Zeiss Axiovision v4.7	Carl Zeiss AG, Oberkochen

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Transformation von Bakterienzellen

Unter Transformation versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in prokaryotische Zellen mit dem Ziel, die Fremd-DNA (in Form von Plasmid) zu amplifizieren (Mülhardt 2013). Bestimmte Bakterienstämme, z.B. *E. coli*, können durch chemische Behandlung kompetent gemacht werden, d. h. empfänglicher für die fremde DNA. Durch einen Hitzeschock kann die die Effizienz der DNA-Aufnahme gesteigert werden. Durch plasmidkodierte Antibiotika-Resistenz werden transformierte Bakterien-Zellen selektiert.

In der vorliegenden Arbeit werden Ultrakompetente Zellen XL10-Gold[®] zum einen mit Präsenilin-1 (pcDNA3.1⁺/Zeo mit PS1WT, PS1E280A oder PS1Δ9) und zum anderen mit Amyloid-Vorläufer-Protein (APP695) (pcDNA3.1⁻/Neo mit APP695) transformiert. Davor wurde APP695 in DH5α-Zellen (Plasmid: pCAX) amplifiziert, daraus präpariert, herausgeschnitten - mittels DNA-Verdau, Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion -, und anschließend mittels Ligation in pcDNA3.1⁻/Neo eingebaut.

Die Transformation der Ultrakompetenten Zellen XL10-Gold[®] erfolgte nach dem Transformationsprotokoll des QuikChange[®] Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits der Firma Stratagene. Hierzu wurden die Zellen auf Eis langsam aufgetaut, 2µl β-Mercaptoethanol-Mix zugegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die DNA-Lösung (pcDNA3.1⁺/Zeo mit den genannten PS1-Inserten bzw. pcDNA3.1⁻/Neo mit APP695) zugegeben, das Gemisch 30 Minuten auf Eis inkubiert, ein Hitzeschock (42°C; 30s) angeschlossen und die Zellen auf Eis gekühlt. Für eine Stunde wurden die Bakterien mit bereits auf 45°C aufgewärmtem NZY-Kulturmedium geschüttelt (37 °C, 225 – 250 rpm). Zum Schluss wurden unterschiedliche Verdünnungen auf Selektionsplatten ausgestrichen und für mehr als 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

Ähnlich wie oben beschrieben wurde auch pCAX APP 695 im Bakterienstamm DH5α amplifiziert. Mit einer Pipettenspitze wurde ins Bakteriengel gepickt und in LB-Kulturmedium geimpft. Das Gemisch wurde anschließend bei 37 °C für 4 Stunden inkubiert und geschüttelt. Unterschiedliche Volumina wurden auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Minipräparation

Die Minipräparation erfolgte unter Verwendung des Invisorb® Spin Plasmid Mini *Two*-Kits von Invitex gemäß den Herstellerangaben. Zunächst wurden 2ml HSG-Selektionsmedium mit dem gewünschten Bakterien-Klon angeimpft und für ca. 24 Stunden bei 37°C unter Schütteln (500rpm) inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250µl „Solution A“ resuspendiert, anschließend mit 250µl „Solution B“ versetzt, durch Invertieren gemischt und 5 Minuten bei ca. 20°C inkubiert. In diesem Schritt wurden die Bakterienzellen unter alkalischen Bedingungen lysiert und die zelluläre RNA durch die zugesetzte RNase degradiert. Zur Neutralisation wurde 250µl „Solution C“ zugegeben, vorsichtig gemischt und für 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, wobei die Lysate von präzipitierten Proteinen, Zellresten und genomischer DNA befreit wurden. Der Überstand wurde in einen Spin-Filter überführt, der zuvor in ein neues Reaktionsgefäß gesteckt wurde, und für 1 Minute bei 10000xg zentrifugiert. Dieser Spin-Filter besitzt eine spezielle Membran, an die die Plasmid-DNA bindet. Nach einem Waschschrift mit 750µl „Wash Solution“, wodurch gewährleistet wurde, dass die DNA von bakteriellen Rückständen befreit wird, sowie zwei weiteren Zentrifugationen wurde der Spin-Filter in ein neues Reaktionsgefäß gesteckt. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute mit Elutions-Lösung des Herstellers (bzw. 30µl steriles bidest H₂O) wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugieren eluiert (10000xg; 1min).

Midipräparation

Die Midipräparation erfolgte unter Verwendung des Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi-Kits von MACHEREY-NAGEL gemäß den Herstellerangaben. Zunächst wurden 100ml HSG-Selektionsmedium mit dem gewünschten Bakterien-Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (200rpm) inkubiert. Am Folgetag wurden die Bakterienzellen durch einen Zentrifugationsschritt (5000xg; länger als 10min; 4 °C) pelletiert. Dieses Zellpellet wurde vollständig in 8ml Resuspensionspuffer resuspendiert und durch RNase A, welche in dem Puffer enthalten ist, von störender RNA befreit. Im nächsten Schritt wurden die Bakterienzellen mit 8ml Lysispuffer vorsichtig gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wurden der Suspension 8ml Neutralisationspuffer zugegeben und invertierend gemischt. Das Lysat wurde durch den eingesetzten Filter auf die äquilibrierte Säulenmatrix gegeben. Hierbei bindet die Plasmid-DNA an die Matrix und wird von Zellresten, präzipitierten Proteinen und genomischer DNA

getrennt. Nach erneutem Äquilibrieren des Filters und der Säule wurde der Filter entfernt und die Säule mit 8ml Waschpuffer gewaschen, damit die DNA von allen bakteriellen Rückständen befreit werden konnte. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch 5ml Elutionspuffer eluiert. Danach wurde 3,5ml Isopropanol zugegeben, gründlich durch vortexen gemischt und die Plasmid-DNA präzipitiert. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 15000xg und 4°C wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das DNA-Pellet mit ca. 20°C-warmem 70%igen Ethanol (2ml) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5min; 15000xg; RT) wurde das Ethanol vollständig entfernt und das DNA-Pellet bei ca. 20°C getrocknet. Zum Schluss wurde die Plasmid-DNA in 300µl sterilem bidest H₂O gelöst und bei 4 °C gelagert.

3.2.3 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentration

Die Konzentration der in sterilem bidest. Wasser über Nacht bei 4°C aufgelösten DNA-Probe wurde mit Hilfe einer photometrischen Messung mit dem Spektrophotometer Gene Quant RNA/DNA Calculator (PharmaciaBiotech) bzw. NanoDrop; 1000 Spectrophotometer (Thermo, SCIENTIFIC) bei einer Wellenlänge (λ) von 260nm bestimmt. Die Messung wurde in Kunststoffküvetten gegen destilliertes Wasser als Nullwert durchgeführt. Um die Reinheit der DNA zu berechnen, wurde die Probe zusätzlich bei $\lambda=280$ nm gemessen. Der Quotient aus beiden Extinktionen (optische Dichten; OD) von $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm dient der Reinheitsbestimmung der Probe. Dabei weist reine DNA einen $OD_{\lambda 260/\lambda 280}$ Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 auf. Ein Wert unter 1,8 spricht für eine Kontamination der DNA-Probe mit Proteinen und Werte über 2,0 deuten auf eine Verunreinigung mit RNA hin (Lottspeich *et al.* 2012).

3.2.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA-Proben wurde von der Firma SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen) durchgeführt. Hierbei wird die Basenabfolge in einem DNA-Molekül mit Hilfe von Primern und DNA-Polymerasen bestimmt (Mülhardt 2013). Nach photometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration (s. 3.2.3) wurden 650-700ng der Plasmid-DNA zusammen mit 2µl (= 20 pmol) der entsprechenden Primer („forward“- oder „reverse“-Primer) mit sterilem bidest. H₂O auf ein Endvolumen von 7µl gebracht und zur Analyse gegeben. Für die Sequenzierung von pcDNA3.1^{+/Zeo}-PSs wurden die Primer T7 und BGH verwendet. Da APP695 mit 2088bp ein relativ großes Gen darstellt, kann seine Sequenzierung anhand der beiden Primer methodisch bedingt nicht abgedeckt werden. Darum

wurden zwei weitere Primer entworfen, die die Sequenzierung des mittleren Teils ermöglichen. Für den „forward-Primer“ (APP-For) wurde eine APP-Sequenz nach ca. 500bp gewählt, für den „reverse-Primer“ wurde eine APP-Sequenz vor den letzten 500bp gewählt, revers umgeschrieben und anschließend das Komplement dazu angegeben. Die entworfenen Primer wurden bei der Sigma-Aldrich, München bestellt. Die Auswertung der Sequenzanalyse erfolgte über die online verfügbare NCBI-Blast-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) mit Zuhilfenahme von weiteren online verfügbaren Programmen und Datenbanken (CCDC Database, Revers Compliment, Nucleic Acid to Amino Acid Translation).

3.2.5 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau diene zum einen dem Überprüfen, ob die Plasmid-DNA das gewünschte Insert (PS1 bzw. APP965) besitzt, und zum anderen dem Herausschneiden des Inserts (APP965) mit dem Ziel es in ein anderes Plasmid einzubauen (ligieren). Beim Restriktionsverdau wird die DNA *in vitro* mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzymen) gespalten. Diese sind ursprünglich bakterielle DNA-Hydrolasen, die in Bakterien zur Zerstörung von Fremd-DNA dienen. Sie spalten die Phosphodiesterbindungen doppelsträngiger DNA spezifisch an kurzen, meist palindromischen Sequenzen oder in deren Nähe, sodass DNA-Fragmente mit entweder „klebrigen“ („sticky“) oder „stumpfen“ („blunt“) Enden entstehen (Mülhardt 2013).

In dieser Arbeit wurden zum Herausschneiden von PS1 aus pcDNA3.1⁺/Zeo die zwei FastDigest[®] Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* (10U/μl; Fermentas), die beide „klebrige“ Enden erzeugen, gemäß den Herstellerinformation eingesetzt. Zum Herausschneiden von APP695 aus pCAX wurden die FastDigest[®] Restriktionsenzyme *XbaI* und *NotI*, und zum Herausschneiden von APP695 aus pcDNA3.1/Neo die FastDigest[®] Restriktionsenzyme *XbaI* und *EcoRI* verwendet. Hier sei erwähnt, dass die Insert-Lokalisation von APP695 im Vektor (pCAX) nicht der vom Hersteller angegebenen Lokalisation (zwischen den Schnittstellen von *EcoRI* und *NotI*) entsprach, sodass zunächst mehrere Verdau-Kombinationen getestet werden mussten, um die Insert-Lokalisation zwischen den Schnittstellen von *KpnI* und *EcoRV* eingrenzen zu können (s. Anhang 7.3).

Dieser Verdau erfolgte mit 1μg der Plasmid-DNA, 1μl der jeweiligen Restriktionsenzyme und 2μl des 10x FastDigest[®] Puffers. Dieser Reaktionsansatz wurde mit sterilem bidest H₂O auf ein Endvolumen von 20μl gebracht und dann für 7 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend

wurde den Proben DNA Loading Dy (Stopppuffer) zugeführt und der Verdau gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Für die präparative Trennung und zur Analyse unterschiedlich großer DNA-Fragmente wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierbei werden die DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt. Dies erfolgt innerhalb eines elektrischen Feldes (10-20 Volt/cm). DNA-Moleküle sind aufgrund der Zucker-Phosphatgruppen in ihrem Rückgrat bei allen pH-Werten negativ geladen, weshalb sie durch die Agarose-Gelmatrix in Richtung Anode wandern. Dabei können kleinere Fragmente sich schneller durch das Gel bewegen als größere, wodurch die Trennung unterschiedlich großer DNA-Fragmente erfolgt (Mülhardt 2013).

Entsprechend der Größe der zu analysierenden Fragmente wurden 1%ige Agarose-Gele hergestellt. Die entsprechende Menge an Agarosepulver (1,5g) wurde in 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (150ml) aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Diese Lösung wurde dann in einen abgedichteten Gelschlitten gegossen, wobei die Probenaschen mit Hilfe eines Kamms freigehalten wurden. Nachdem die Agarose erstarrt war, wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer (BioRad) gesetzt, mit Elektrophoresepuffer (1x TAE-Puffer) bedeckt und der Kamm herausgezogen. Anschließend wurden die Proben, die in 6x Stopppuffer aufgenommen wurden, in die Taschen pipettiert. Zur Ermittlung der Molekülgröße wurde ein 1Kb-Marker (1Kb Plus DNA Ladder von TrackIt™) mitgeführt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel in eine 0,1%ige Ethidiumbromidlösung für 10-30 Minuten gelegt. Die zwischen den Basen der Nukleinsäuren interkalierten Ethidiumbromid-Moleküle wurden anschließend durch UV-Licht (254nm) angeregt (Mülhardt 2013) und mit Hilfe einer Kamera die daraus resultierende Fluoreszenz dokumentiert.

3.2.7 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Nach dem Restriktionsverdau von pCAX APP695 mittels *XbaI* und *NotI* und der darauffolgenden gelelektrophoretischen Trennung wurde das gewählte DNA-Fragment, nämlich APP695 mit ca. 2088bp unter UV-Licht (254nm) mit einem Skalpell herausgeschnitten. Dabei ist zu beachten zügig zu arbeiten, da die DNA sonst durch die lange UV-Bestrahlung beschädigt wird, sodass z.B. Strangbrüche auftreten können oder es zur Bildung von Basendimeren kommen kann (Mülhardt 2013).

Die Agarosegelstückchen wurden dann in ein Reaktionsgefäß (1,5 – 2ml) überführt und per Differenzwiegung gewogen. Zur Extraktion der DNA aus dem Gelstückchen wurde das GeneJET™ Gel Extraction Kit nach den Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde zuerst zum Gelstückchen Bindepuffer im Verhältnis von 1:1 (Volumen/Gewicht) gegeben und für 10 Min. bei 50-60°C inkubiert. Ab und zu wurde das Gemisch invertierend gemischt. Anschließend wurde die Lösung in die Reinigungssäule überführt und für 1 Min. bei RT und 13000 rpm zentrifugiert. Dadurch wird die DNA an die Membran der Filterkartuschen gebunden. Dann wurde die Säule nochmal mit 100µl Bindepuffer gewaschen (1 Min.; RT; 13000 rpm). Anschließend wurde die Säule mit 700µl Waschpuffer gewaschen (1 Min.; RT; 13000 rpm) und für eine weitere Minute zentrifugiert, um die Reste der Waschlösung von der Filterkartusche zu entfernen. Im letzten Schritt wurde die Filterkartusche für die Elution der DNA in ein neues Reaktionsgefäß (1,5ml) gesteckt, mit Elutionspuffer (50µl) beladen und die DNA anschließend durch Zentrifugation (13000 rpm; 1min) eluiert. Die DNA-Konzentration wurde danach bestimmt (s. 3.2.3).

3.2.8 DNA-Ligation

Nachdem APP695 anhand der Restriktionsenzyme *XbaI* und *NotI* aus pCAX herausgeschnitten wurde, nach der darauffolgenden gelelektrophoretischen Trennung und der anschließenden Extraktion von APP695 aus dem Agarosegel, war das Ziel, APP695 in pcDNA3.1/Neo als ein geeigneter Expressionsvektor einzubauen (zu ligieren). Dafür wurden Vektor und Insert im Verhältnis von 1:3 bzw. 1:5 eingesetzt. Es wurden 100ng Vektor verwendet und die Insert-Menge anhand der folgenden Formel kalkuliert:

$$\text{Insert-Menge (ng)} = \frac{\text{Vektor (ng)} \times \text{Insert-Sequenzlänge (Kb)}}{\text{Vektor-Sequenzlänge (Kb)}} \times \left(\text{Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \right)$$

Zur Reaktionslösung wurden weiterhin T4 DNA Ligase-Puffer und T4 DNA Ligase zugegeben und das Ganze mit bidest. H₂O auf ein Endvolumen von 15µl gebracht. Anschließend wurde der Ansatz bei 4°C über Nacht inkubiert. Zur Kontrolle wurde das neu entstehende Konstrukt (pcDNA3.1/Neo-APP695) in XL10-Gold-Zellen amplifiziert, präpariert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.2.5 und 3.2.6), DNA-Sequenzierung (s. 3.2.4) und Transfektion (s. 3.3.2) analysiert.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Zellen

In der vorliegenden Arbeit kam eine eukaryotische Zelllinie zum Einsatz: *Mouse Embryonic Fibroblasts* (MEFs). Diese wachsen *in vitro* adhärent und bilden auf dem Boden der Kulturgefäße einen konfluenten Zellrasen (Monolayer) aus. Die Kultur der Zelllinien erfolgt in halbsynthetischen Wachstumsmedien. Diese Zellkulturmedien versorgen die Zelle mit allen wichtigen Nährstoffen und sind gleichzeitig gepuffert, um den pH-Wert zu regulieren (Schmitz 2011). Das Wachstumsmedium setzt sich aus DMEM Medium (high-glucose, 4,5g/l, mit L-Glutamine), 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS) und 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 100 U/ml Penicillin G, 100µg/ml Streptomycin) zusammen. Das Kälberserum versorgt die Zellen mit den notwendigen Wachstumsfaktoren, Hormonen etc., während die Antibiotika das Wachstum von bakteriellen Kontaminationen unterdrücken (Schmitz 2011). Die Zellen wurden in einem Brutschrank mit einer Temperatur von 37°C, einer 5%igen CO₂-Konzentration und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% inkubiert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Raumwerkbank durchgeführt, welche in regelmäßigen Abständen mittels einer UV-Lampe bestrahlt und gereinigt wurde. Zudem wurden alle eingesetzten Materialien zuvor gereinigt und autoklaviert.

Auftauen von Zellen

Um die bei -80 bzw. -120°C gelagerten Zellen zu kultivieren, wurde zunächst das entsprechende Kryo-Röhrchen (ca. 2ml kryokonservierte Zellen) zügig bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und in einer T75er-Flasche ausgesät. Am nächsten Tag, nach Ab- und Festsetzen der Zellen, wurde der DMSO-haltige Überstand abgesaugt und neues Kulturmedium hinzugegeben.

Passagieren von Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Zunächst wurde das Wachstum der Kulturen unter einem Mikroskop bewertet. Waren die Zellen zu etwa 90% konfluent, so wurden sie passagiert, ansonsten wurde ein Wechsel des Kulturmediums durchgeführt. Bei der Passage wurde das alte Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und im Anschluss wurden die Zellen mit Trypin-EDTA (1x 0.5ml) bei 37°C im

Brutschrank inkubiert. Durch die Serinprotease Trypsin und den Calcium-Chelator EDTA werden Peptidbindungen gelöst (Schmitz 2011), sodass sich die Zellen vereinzeln und vom Boden des Kulturgefäßes ablösen. Dies wurde mit einem Lichtmikroskop kontrolliert. Nach erfolgtem Ablösen wurden die Zellen in neuem Medium resuspendiert und ein Teil entsprechend ihrer Umsetzrate erneut ausgesät und mit neuem Medium versorgt (z.B. 0.5ml resuspendierte Zellen in 13ml neuem Medium).

Kryokonservierung von Zellen

Die Lagerung eukaryotischer Zellen erfolgte durch Kryokonservierung bei -80°C für einen Zeitraum von bis zu einem Jahr oder in flüssigem Stickstoff bei längeren Lagerzeiten. Zunächst wurden die konfluenten Zellen mit Trypsin-EDTA (1x) vom Kulturgefäß gelöst und in neuem Medium resuspendiert. Während ein Teil der Zellen in Kultur verblieb, wurde der andere Teil bei $300\times g$ und 20°C für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Einfriermedium, bestehend aus 50% DMEM, 40% FCS und 10% DMSO, aufgenommen und auf Kryoröhrchen verteilt. Nach einer einstündiger Lagerung in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierbox, in der die Zellen langsam auf -80°C abkühlen konnten, wurden sie weiterhin bei -80°C gelagert oder in einen Stickstofftank überführt.

Zellzählung kultivierter Zellen

Die Zellzählung dient dem Ausgleich verschiedener Proben beim Initiieren einer Transfektion, Proteinisolierung bzw. immunofluoreszenten Markierung. Die Bestimmung der Zellzahl aus einer Zellsuspension erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer. Zunächst wurde die Zählkammer gründlich mit 70%igem Ethanol gereinigt. Auf die angefeuchteten Stege wurde das Deckgläschen gepresst, bis Newtonringe erkennbar waren. Mit Hilfe einer Pipette wurden $20\mu\text{l}$ der Zellsuspension aufgebracht. Dann wurden unter dem Lichtmikroskop die Zellzahl von vier Großquadraten (jeweils aus 16 Quadraten bestehend) bestimmt und der Mittelwert gebildet. Die Multiplikation dieses Mittelwertes mit dem Faktor 10^4 sowie dem Verdünnungsfaktor ergibt die Zellzahl pro ml.

3.3.2 Transfektion (Lipofektion)

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in Form eines Plasmids in eine eukaryotische Zelle (Mülhardt 2013). Die Transfektion von MEFs erfolgte mit dem Transfektions-Kit LipofectamineTM 2000 (LFA, Invitrogen) nach den Angaben des

Herstellers. Hierzu wurde am Vortag die gleiche Menge an Zellen von allen Proben in 60mm-Zellkulturschalen ausplattiert. Dieser Schritt dient dazu, am Folgetag Kulturen in der für die Transfektion optimalen Dichte (80-90%) zu erhalten. Unmittelbar vor der Transfektion wurden 8µg der Plasmid-DNA in serumfreien Medium (Opti-MEM®) auf ein Endvolumen von 500µl verdünnt und vermischt. Parallel dazu wurden auch 20µl Lipofectamine™ 2000 mit Opti-MEM auf ein Endvolumen von 500µl gebracht. Beide Ansätze wurden bei Raumtemperatur für 5 Min. inkubiert und anschließend zusammengebracht und für weitere 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde das Wachstumsmedium der Zellen gegen ein Antibiotika-freies Medium ausgetauscht. Anschließend wurde das Gemisch (1ml) tropfenweise auf die ausplattierten, konfluenten Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach ca. 5 Stunden wurde das Antibiotika-freie Medium mit dem Transfektionsansatz abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dazu ein vorgewärmtes Vollmedium gegeben. Im letzten Schritt wurden die transfizierten Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.3.3 Transfektion (Elektroporation)

Die Elektroporation ist eine weitere Methode, um Fremd-DNA in eukaryotische Zellen einzubringen. Hierbei wird die Zellmembran mittels eines elektrischen Pulses vorübergehend permeabel gemacht, sodass die Zellen Fremd-DNA in Form von Plasmid aufnehmen können. Um MEFs zu transfizieren wurde Gene Pulser® Transfection Aparatur von Bio-Rad entsprechend dem Hersteller-Protokoll verwendet.

Im ersten Schritt wurde am Vortag die gleiche Menge an Zellen von allen Proben in T75-Zellkulturflaschen ausplattiert. Dieser Schritt dient dazu, am Folgetag Kulturen in der für die Transfektion optimalen Dichte (80-90%) zu erhalten. Am nächsten Tag wurden die Zellen beurteilt, das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 Trypsin-EDTA vom Kulturgefäß gelöst und in 4,5ml Antibiotika-freies Medium resuspendiert. Durch langsames auf- und abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und in ein steriles 15ml-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden dann bei Raumtemperatur und 300xg für 5 Min. zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und verworfen und das Zellsediment in 2ml PBS resuspendiert. Um die richtige und gleiche Menge an Zellen einzusetzen, was für die Transfektionseffizienz entscheidend ist, wurden die Zellen mithilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt. Das Volumen an Zellen mit der entsprechenden Zellzahl (1×10^6 Zellen) wurde in 2ml-Röhrchen überführt und bei 900xg für 5 Min. zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und verworfen und das Zellsediment in 1ml Antibiotika-freies Medium resuspendiert. Anschließend wurden 20µg der DNA-Lösung

zur Zellsuspension gegeben. Nach 10 Min. Inkubationszeit im Eis wurden 600µl des Ansatzes in eine 0,4 Elektroporations-Küvette überführt, die Küvette in die Elektroporationskammer gesteckt und ein elektrischer Puls von 960µF und 220 V abgegeben. Die elektroporierten Zellen wurden dann in 2ml-Röhrchen überführt, vorsichtig gemischt und für 10 Min. im Eis inkubiert. Schließlich wurden die transfizierten Zellen in 6-Well-Platten mit Antibiotikafreiem, vorgewärmten Medium überführt und durch Schwenken verteilt. Um den Zellen die Zeit und Bedingungen für das Wachstum und die Proteinexpression zu geben, wurden die transfizierten Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.3.4 Zellernte

Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion geerntet. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und, da die Zellernte mit der Zellyse und Proteinaufreinigung sofort fortgesetzt wurde, in RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren und ggf. Phosphatase-Inhibitoren versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Lyse-Puffer mittels eines Zellschabers abgeschabt, in 1,5ml-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. (Für die weitere Beschreibung der Zellyse und Proteinaufreinigung s. 3.4.1)

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Proteinaufreinigung aus Zelllysaten

Nachdem die transfizierten Zellen, ob transient oder stabil, für mindestens 24 Stunden bei 37°C und 25% CO₂ inkubiert wurden – dabei hatten sie die Möglichkeit zu wachsen und die Zielproteine zu synthetisieren –, wurden sie zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde jede Probe (z.B. 60mm-Schale) mit kaltem, ionischem Lysepuffer (RIPA, 100µl) beschichtet, welchem Protease-Inhibitor und ggf. Phosphatase-Inhibitor frisch zugegeben wurde. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit dem Lysepuffer mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein 1,5ml-Röhrchen überführt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis (ca. 4 °C) und gelegentlichem Vortexen und starkem Mischen wurden die Proben bei 13000rpm und 4 °C für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand, welcher die Zellproteine enthält, wurde dann in ein neues 1,5ml-Röhrchen überführt und entweder für die SDS-Gelelektrophorese vorbereitet oder für den weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Immunopräzipitation

Bei der Immunopräzipitation (IP) wird ein bestimmtes Antigen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers aus der Vielzahl von Antigenen einer Lösung isoliert (Rehm and Letzel, 2009). In einem zweiten Schritt werden die Protein-Antikörper-Komplexe, z.B. mit Protein-G-Sepharose-Beads aus der Lösung präzipitiert. Dabei bindet das Protein-G, ein Zellwandbestandteil aus *Streptococcus* sp., spezifisch an den Fc-Teil der Antikörper (Rehm and Letzel 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Immunopräzipitation zur Isolation vom gescheddeten Prionprotein (shed PrP^C, s. Abb. 1.12 und 4.5.2) aus Zellkulturüberständen verwendet. Nach 16-stündiger Inkubation wurde der Zellkulturüberstand in ein 15ml-Röhrchen aufgenommen und dazu eine Tablette Protease-Inhibitor-Cocktail und 100µl PMSF gegeben. Anschließend wurde der Ansatz bei 3000xg und 4 °C für 5 Min. zentrifugiert, um abgestorbene Zellen und Zellresten zu beseitigen. Um einerseits die Proben zu konzentrieren und andererseits sie gegeneinander auszugleichen – die verschiedenen Zellproben wachsen unterschiedlich schnell und synthetisieren dementsprechend unterschiedliche Mengen desselben Proteins –, wurden die verschiedenen Proben nach dem Bradford-Ergebnis von den entsprechenden Zelllysaten mit dem Lysepuffer (RIPA mit Protease-Inhibitor) ausgeglichen und auf ein Endvolumen von 5000µl gebracht. Anschließen wurden die resultierenden Volumina mit dem nun gleichen Proteingehalt in ein Amicon ultra centrifugal filter 3kD MWCO überführt und bei 5000xg und 4 °C so weit zentrifugiert, dass ein Volumen von 625µl zurückbleibt (das entspricht einer 8-fachen Konzentrierung), die abzentrifugierte Lösung wird verworfen. 500µl des konzentrierten Überstands wurden dann in ein 1,5ml-Tube überführt und dazu 1,5µl des PrP^C-spezifischen Antikörpers (POM2) in der vom Hersteller für IP vorgeschlagenen Verdünnung gegeben. Die Proben wurden dann für 16 Stunden bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert.

Danach wurden zunächst die Protein-G-Sepharose-Beads (Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow; GE Healthcare) dreimal mit RIPA-PI-Puffer (RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitor (PI)) gewaschen und anschließend in einem 50:50 Verhältnis in RIPA-PI-Puffer aufgenommen. Von dieser Suspension wurden 50µl zu jeder Probe gegeben und für 60 Minuten bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach kurzem, vorsichtigem (30 sec., 4°C, 2500xg) Zentrifugieren der Protein-G-Sepharose-Beads wurde der Überstand vorsichtig abgezogen und die Beads viermal mit RIPA-PI-Puffer gewaschen. Schließlich wurden die Beads in 2x Wiltfang-Proben-Puffer (mit 50mM DTT) aufgenommen, vorsichtig gemischt und für 10

Minuten bei 95°C erhitzt, wobei sich die gebundenen Proteine von den Protein-G-Sepharose-Beads ablösen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 10.000xg zum Pelletieren der Beads wurde der Überstand direkt auf ein SDS-Gel zur anschließenden Elektrophorese aufgetragen bzw. bei -20°C für den weiteren Gebrauch gelagert.

3.4.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Nach der Zellyse wurde die Gesamtproteinmenge des Zellysats mit Hilfe des Protein Assay Kits nach der Methode von Bradford entsprechend den Angaben des Herstellers Bio-Rad bestimmt. Hierzu wurde 1µl des Zellysats mit 9µl bidesH₂O versetzt und als Standard bidesH₂O und BSA (1:1, Endvolumen 10µl) in absteigender Konzentration (2; 1,5; 1; 0,5; 0,25µg) eingesetzt, eine Probe von 10µl bidesH₂O diente als Leerwert. Im Anschluss wurden 200µl Bradford-Reagenz dazu gegeben und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595nm in einem Spectrophotometer Typ Ultrospec 3000 (Amersham Biosciences, Freiburg) fotometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration konnte anschließend anhand einer Eichkurve aus den definierten BSA-Konzentrationen ermittelt werden. Es wurden in der Regel Proteinkonzentrationen von 1-10 µg/µl gemessen.

3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Molmasse in einem elektrischen Feld auftrennen (Laemmli 1970). In der vorliegenden Arbeit wurde die Technik der SDS-PAGE nach Laemmli zur Detektion von Proteinen und Proteinfragmenten aus Zellysaten verwendet. Zum Einsatz kamen sowohl Novex[®] Tris-Glycin Gele (SDS-PAGE), Novex[®] Tricin-Gele als auch NuPAGE[®] Novex[®] Bis-Tris Gele (SDS-PAGE), sie wurden nach den Angaben des Herstellers (Invitrogen, Darmstadt) verwendet, wobei die einfachen Gele selber nach den oben unter "Materialien" erwähnten Rezepten hergestellt wurden, während die Gradientengele fertig bestellt wurden.

Zunächst wurden die gewünschten Volumina und Konzentrationen von den Proben entsprechend den durch Bradford ermittelten Konzentrationen hergestellt. Hierfür wurde einem bestimmten Volumen einer Probe das geeignete Probenpuffer-Volumen zugegeben und es wurde mit bidesH₂O auf das Endvolumen gebracht. Anschließend wurden die Proben je nach Protokoll bei 70-95°C für 5-10 Min. erhitzt und somit denaturiert.

Bei der Herstellung von Gelen werden als letztes die Reagenzien APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (N,N,N',N''-Tetramethylethyldiamin) zugegeben. Hierdurch wird der Start der Polymerisation des Acrylamids initiiert. Es entsteht eine starre, netzartige Gelmatrix, die für die Proteine verschiedener Massen einen unterschiedlichen Widerstand darstellt und somit deren Auftrennung gewährleistet. Unmittelbar nach der Zugabe von APS und TEMED wurde die Trenngellösung zwischen zwei Glasplatten gegossen, die zuvor mit Ethanol gereinigt und in einer Gießapparatur fixiert wurden. Um eine ebene Oberfläche zu erhalten, wurde das Trenngel mit Isopropanol beschichtet. Nach vollendeter Polymerisation wurde das Isopropanol wieder entfernt und das Sammelgel, nach Zugabe von APS und TEMED, auf das Trenngel gegossen, wobei die Probenaschen mit einem Kunststoffkamm freigehalten wurden. Nach der Polymerisation wurden die Gele in die „Mini PROTEAN® Tetra Cell“-Kammer von BioRad eingesetzt. Die Kammer wurde mit 1x E-Puffer (Elektrophorese-Puffer) befüllt. Anschließend wurde der Kamm vorsichtig aus dem Sammelgel entfernt und die Proben (45µl) sowie 5µl eines Markers (PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas) zur Ermittlung der molaren Masse aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei der vom Hersteller vorgeschlagenen Spannung und Stromstärke. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die gewünschte Trennung erreicht wurde bzw. sich die unterste Bande des Markers am unteren Rand des Gels befand.

3.4.5 Western-Blot

Die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden durch das Nassblot-Verfahren (nach Rehm and Letzel 2009) mit Hilfe elektrischer Spannung auf eine Nitrozellulose- bzw. PVDF-Membran transferiert. Diese PVDF-Membran wurde zuvor in Methanol aktiviert und im Anschluss durch 1x Wet-Blot-Puffer äquilibriert. Desweiteren wurden zwei poröse Schwämme und zwei Whatmanpaper kurz in 1x Wet-Blot-Puffer äquilibriert. Das Polyacrylamid-Gel wurde zusammen mit der Membran, den porösen Schwämmen und den Whatmanpapern in eine vertikale, mit 1x Wet-Blot-Puffer befüllte Blotkammer von BioRad gegeben. Abb. 3.1 zeigt den genauen Aufbau des Blots. Der Proteintransfer erfolgte anschließend unter kontinuierlichem Kühlen der Apparatur bei konstantem Stromfluss. Die Blot-Zeit, das Blot-Puffer sowie die Stromstärke variieren je nach dem verwendeten Gel.

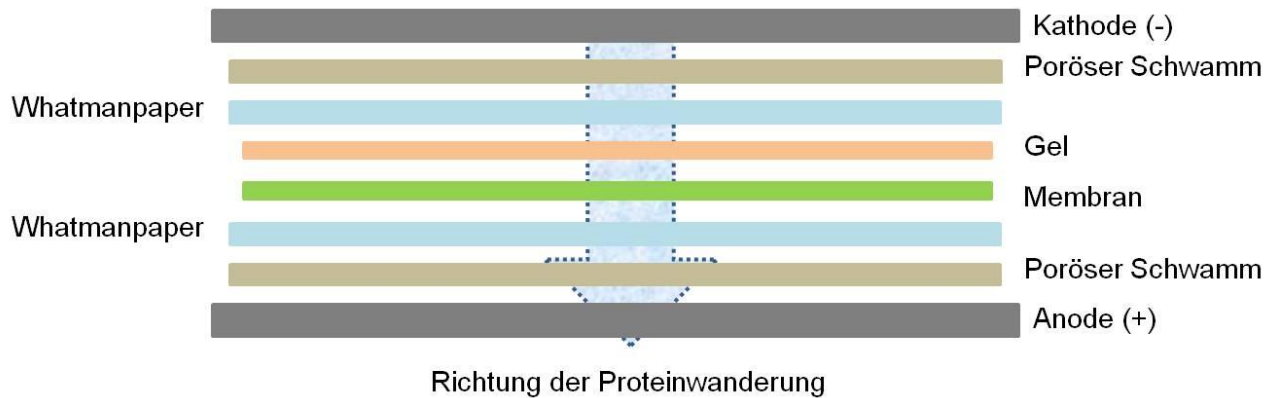


Abb. 3.1 Schematische Darstellung eines Western-Blots

3.4.6 Immundetektion von Proteinen

Die Membranen des Western-Blots wurden zunächst für mindestens eine Stunde in einem 5%igen Blockingpuffer (Magermilchpulver in 1x TBST) zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen inkubiert. Anschließend wurde der in Blockingpuffer verdünnte Primärantikörper, der spezifisch an das zu detektierende Antigen bindet, über Nacht zugegeben. Die Membranen wurden danach zur Entfernung von nicht gebundenen Antikörpern dreimal für jeweils 15 Minuten, in Blockingpuffer gewaschen und eine weitere Stunde mit dem jeweiligen Sekundärantikörper, der in Blockingpuffer verdünnt wurde, inkubiert. Nach erneutem sechsmaligem Waschen in 1xTBST für jeweils 5 Minuten, erfolgte die Detektion der Proteinbanden mittels Chemiluminescence (Enhanced Chemiluminescence; ECL) (nach Rehm and Letzel 2009) bzw. „SuperSignal® West Femto Kit“ (Thermo SCIENTIFIC) und mit Hilfe des Belichtungs-Gerätes Chemidoc und der Software „Quantity One“ (beides von BioRad).

3.5 Spektroskopische Methoden

3.5.1 Hellfeldmikroskopie

Die Hellfeldmikroskopie erfolgte mit dem Mikroskop Eclipse TS100 (Nikon, Melville, USA) in unterschiedlicher Vergrößerung und diente der Zellbeurteilung und Zellzählung.

3.5.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung diente der Darstellung von Präsenilin-1 und 2 sowie Prionprotein in permeabilisierten und unpermeabilisierten Zellen, um mögliche Veränderung in der Prionprotein-Expression und -Lokalisation in Abhängigkeit von den Präsenilinen aufzudecken. Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zielproteine (PS1,

PS2, PrP) in den Zellen zuerst mit primären spezifischen Antikörpern markiert und dann mit sekundären fluoreszenz-markierten Antikörpern sichtbar gemacht. Zusätzlich wurden die Zellkerne, zur besseren Orientierung beim späteren Mikroskopieren, mit DAPI gefärbt.

Zunächst wurden die verschiedenen Zellen in unterschiedlichen Verdünnungen in 12-Well-Platten auf mehreren Deckgläschen (\varnothing 10mm) ausgesät. Dies diente dazu, am Folgetag die für die Immunfluoreszenzfärbung benötigte Deckgläschen mit der optimalen Dichte an Zellen (30-60%) zu erhalten. Die Markierung des Prionproteins erfolgte zum einen an unpermeabilisierten Zellen, um allein die Proteinmoleküle an der Zelloberfläche darzustellen und zum anderen an permeabilisierten Zellen, um die Gesamtmenge an Prionprotein in der Zelle zu zeigen. Die unpermeabilisierten Zellen wurden zunächst mit dem primären Antikörper, dann mit dem sekundären Antikörper inkubiert und erst dann fixiert, um die potentielle Permeabilisierung durch die Fixierung zu umgehen. Das weitere Vorgehen bei beiden Probenreihen ist identisch.

Die am Deckgläschen haftenden Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) bei Raumtemperatur für 20 Minuten fixiert und dann zweimal mit PBS gewaschen. Um die weitere toxische Wirkung von PFA zu beheben wurden die Zellen für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1M Glycin inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die zu permeabilisierende Zellreihe wurde dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,2%igem Triton-X100 behandelt und zweimal mit PBS gewaschen. Alle folgenden Schritte erfolgten in einer vor Lichteinfall geschützten, feuchten Kammer bei ca. 20°C. Zuerst wurden die Zellen zur Blockierung unspezifischer Protein-Bindungsstellen in 50 μ l Eseserum (1:50 in 1x PBS) für 20 Minuten inkubiert und anschließend mit der Erstantikörperlösung (1:500/200/100 in 1x PBS) für eine Stunde bei 4°C behandelt. Nachdem die Deckgläschen für 15 Minuten unter langsamen Schütteln in 1x PBS gewaschen wurden, wurde der zweite, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper (1:500 in 1x PBS) auf die Zellen gegeben. Es folgte ein weiterer Waschschrift der Deckgläschen mit 1x PBS für 10-30 Minuten auf dem Schüttler. Im Anschluss wurden die Zellen mit in 1x PBS verdünntem DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) (1:20000) inkubiert. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Zellkernfärbung dient. Zum Schluss wurden die Deckgläschen kurz in dest. H₂O getaucht, auf einem Papiertuch abgetropft und in Mounting-Lösung (Fluoromount G) auf einen Objektträger eingebettet. Nach dem Aushärten wurden die Präparate im Dunkeln bei 4°C gelagert. Zum Schluss konnten die Zellen mit dem Mikroskop

Zeiss Axiovert 200M, dessen Kamera ApoTome und der Software Axiovision 4.7 ausgewertet und Bilder aufgenommen werden.

3.6 Statistische Tests

Die statistische Bearbeitung und Auswertung von Western-Blots erfolgte mit Quantity One, Excel Microsoft 2007 und GraphPad Prism 5. Zunächst wurden die durch die Immundetektion leuchtenden Proteinbanden mit Quantity One quantifiziert, anschließend wurde der Hintergrund davon abgezogen. Mithilfe von Excel Microsoft 2007 wurden im Anschluss die Proteinbanden gegen Aktin normalisiert und mit dem Wildtyp, welcher den Wert 1 darstellt, verglichen. Mit GraphPad Prism 5 wurden die Mittelwerte aus einer Versuchsreihe ermittelt und ein „Paired t test“ der jeweiligen Probe gegen den Wildtyp mit einem Konfidenzintervall von 95% durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem P-Wert ausgedrückt, wobei $p \leq 0,05$ mit (*), $p \leq 0,01$ mit (**) und $p \leq 0,001$ mit (***) symbolisiert wurde.

4 ERGEBNISSE

4.1 Herstellung der Plasmide zur Zelltransfektion

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die für die Zelltransfektion notwendigen Plasmide hergestellt. Die kodierenden Sequenzen des Wildtyp-Präsenilin-1 sowie die der PS1E280A und PS1 Δ 9 Mutationen (s. 1.2.5) lagen bereits jeweils im Expressionsvektor pcDNA3.1⁺/Zeo, zwischen den Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in 3'→5' Richtung (s. Anhang 7.1), vor. Diese Konstrukte wurden freundlicherweise von Herrn Alvaro Andres Barrera Ocampo zur Verfügung gestellt, sie wurden mit Hilfe einer Transformation im Ultrakompetenten Bakterienstamm XL10-Gold[®] amplifiziert (s. 3.2.1) und anschließend mit Hilfe einer Mini- bzw. Midipräparation (s. 3.2.2) gewonnen. Nachdem die Menge der gewonnenen Plasmid-DNA photometrisch bestimmt wurde (s. 3.2.3), wurde der Erfolg der Transformation sowie der der Präparation in dreifacher Weise kontrolliert: erstens durch einen Restriktionsverdau und anschließende Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.2.5 und 3.2.6), zweitens durch eine DNA-Sequenzierung (s. 3.2.4) und drittens durch eine Zelltransfektion (s. 3.3.2) mit anschließendem *Western Blot* und Immundetektion der exprimierten Präsenilinen (s. 3.4). Die Ergebnisse sind in der Abb. 4.1 dargestellt.

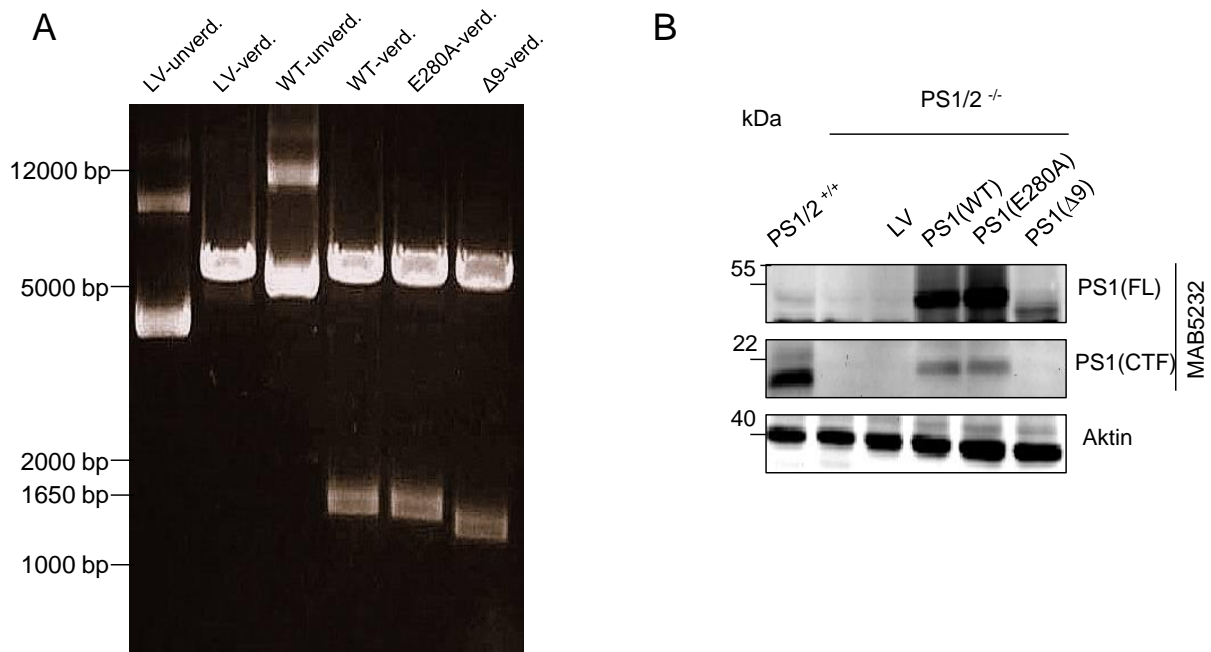


Abb. 4.1 Agarose-Gelelektrophorese und *Western Blot* Analyse zum Nachweis von Präsenilin-1
 (A) Nach der DNA-Präparation und der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde ein Restriktionsverdau nach dem in der Abbildung (A) dargestellten Schema vorgenommen. Als Kontrolle wurde sowohl ein verdauter (verd) als auch ein unverdauter (unverd) Leervektor (LV) aufgetragen. Gefolgt wurde die Kontrolle von einem PS1-WT und zwei PS1-Mutationen (E280A und Δ 9). Für den

DNA-Verdau wurden die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* verwendet. (B) Durch eine Transfektion der Zelllinie MEF (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) mit den gewonnenen Konstrukten und die anschließende *Western Blot Analyse* wurde Präsenilin-1 mit dem Antikörper (MAB5232) detektiert. Als Kontrolle dienen der WT (PS1/2^{+/+}), die untransfizierten PS1- und PS2-Knockout Zellen (PS1/2^{-/-}) und die mit einem Leervektor (LV = pcDNA3.1⁺/Zeo) transfizierten Zellen (MEFs).

Mit einer Länge von ca. 5,0 Kb zeigt sich das ungeschnittene Plasmid pcDNA3.1⁺/Zeo, das bedingt durch die Linearisierung eine kürzere Strecke wandert, wie es auf der zweiten Spalte von links zu sehen ist (Abb. 4.1A). Das PS1-WT enthaltene Plasmid mit einer Länge von ca. 6,4 Kb (Plasmid 5,0 Kb und PS1 ca. 1,4 Kb) wandert dementsprechend höher als der LV. Nachdem die PS1-Sequenz aus dem Plasmid mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* ausgeschnitten wurde, befindet sie sich der Fragmentlänge entsprechend auf der Höhe von ca. 1400 bp, ähnlich verhält sich das an der Position 280 mutierte PS1. Anders als diese beiden ist PS1Δ9 durch eine verkürzte Fragmentlänge charakterisiert, da es sich hierbei um eine Deletion von Exon 9 handelt.

Zudem wurden die erhaltenen Konstrukte in die Zelllinie MEF transfiziert. Im Anschluss an die Zellernte, Proteinaufreinigung und die Bestimmung der Proteinkonzentration (s. 3.3.4, 3.4.1 und 3.4.3) erfolgte eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese sowie eine *Western Blot Analyse* (s. 3.4.4 und 3.4.5) mit anschließender Immundetektion des Präsenilin-1 mit Hilfe des Antikörpers (MAB5323) (s. 3.4.6). Da der Antikörper MAB5323 an der zytosolischen Schleife des Präsenilin-1 bindet, ist er in der Lage sowohl das gesamte PS1 (FL) als auch das C-terminale Fragment (CTF) zu erkennen (s. 1.2.5). Dies wird in der Abb. 4.1B bei den Proben PS1/2^{+/+}, PS1WT und PS1280A demonstriert. Da die Deletion des Exon 9 bei PS1Δ9 zum Verlust der Proteolyse-Stelle führt, kommt es folglich zu keiner Bildung von C- und N-terminalen Fragmenten. Dies stellt sich in der Abb. 4.1B durch das fehlende CTF und die tiefer laufende PS1Δ9-FL-Bande dar.

Außerdem wurden die Präsenilin-1-Sequenzen (PS1WT, PS1E280A, PS1Δ9) bei der Firma Seqlab (Sequence Laboratories Göttingen) sequenziert, die dazu benötigten Primer wurden bei der Firma Sigma-Aldrich bestellt (s. 3.2.4). Die Sequenzierungsergebnisse sind im Anhang (7.2) dargestellt.

4.2 Austestung von Antikörpern gegen Präsenilin-1

Um die durch den *Western Blot* nach erfolgter SDS-Elektrophorese gewonnenen PS1-Banden identifizieren zu können, wurden verschiedene Antikörper von verschiedenen Herstellern auf ihre Fähigkeit getestet, sowohl die unterschiedlichen PS1-Fragmente als auch das mutierte PS1 zu binden und optimal darzustellen. Die Abb. 4.2 zeigt einen Vergleich der getesteten Antikörper. (Für mehr Details über die Antikörper s. 3.1.1.5.)

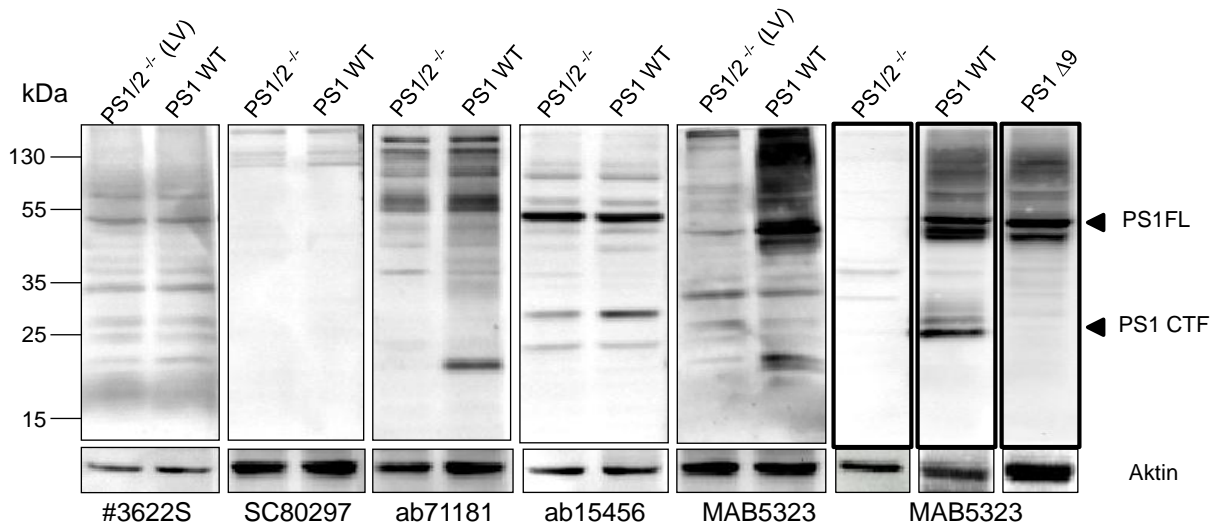


Abb. 4.2 Austestung von Antikörpern gegen PS1

Hierfür wurden verschiedene Antikörper gegen PS1 getestet. Es wurde jeweils eine mit PS1WT transfizierte Probe mit einer PS1/2^{-/-}-Probe, teilweise zusätzlich mit einer LV transfizierten Probe, verglichen. Zudem wurde PS1Δ9 mit dem Antikörper MAB5323 detektiert.

In einer Zelle befindet sich Präsenilin in drei Formen (s. 1.2.5), als *unreifes*, d.h. unprozessiertes Holoprotein (*full-length-PS*) von ca. 52 kDa, und in Form von zwei Fragmenten, die durch eine proteolytische Spaltung entstehen, ein ca. 30 kDa großes NTF und ein ca. 20 kDa großes CTF. Während die Antikörper (ab71181, ab15456 und SC80297) das PS1FL und PS1NTF und die Antikörper (#3622S und MAB5323) das PS1FL und PS1CTF erkennen sollten, stellten sich anfangs zwei Schwierigkeiten heraus; zum einen erschwerten bei manchen Antikörpern die unspezifischen Banden die Beurteilung von PS1-Banden und zum anderen waren einige Antikörper nicht in der Lage, PS1Δ9 (hier nicht dargestellt) zu binden, was vermutlich durch eine Deletions-bedingte Konformationsänderung zustande kam, die das Protein dem Antikörper unzugänglich machte. Dennoch konnte man eine optimale Darstellung von PS1FL, PS1CTF sowie PS1Δ9 durch den Antikörper MAB5323 feststellen, weshalb dieser in den weiteren Experimenten bevorzugt zum Einsatz kam.

4.3 Optimierung der Transfektionsbedingungen

Für die Transfektion von MEFs mit den Konstrukten (PS1WT, PS1E280A und PS1Δ9) wurden zwei verschiedene Ansätze im Vergleich getestet und an unterschiedlichen Parametern geändert, um die geeignete Methode und die optimalen Bedingungen für die Transfektion zu schaffen. Die zwei gängigen Transfektionsmethoden, nämlich die Lipofektion und die Elektroporation (s. 3.3.2 und 3.3.3), wurden überprüft und miteinander verglichen. Anschließend wurden Parameter, wie z.B. das Plasmid-Lipofectamine-Verhältnis, das Plasmid-Zellen-Verhältnis, die Transfektionszeit, die Pulsstärke etc. (hier nur teilweise dargestellt) so systematisch verändert, dass man die optimalen Transfektionsbedingungen für eine maximale Effizienz erhielt.

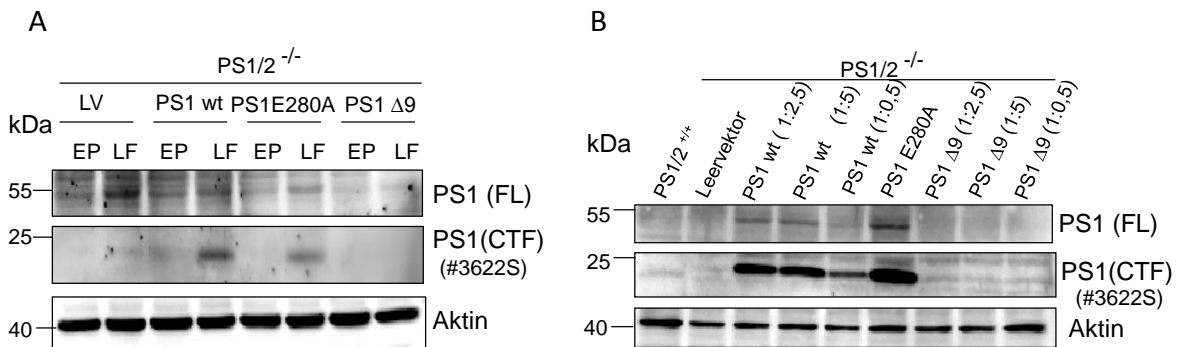


Abb. 4.3 Optimierung der Transfektionsbedingungen

(A) Vergleich zwischen der Elektroporation (EP) und Lipofektion (LF), wobei die Konstrukte (PS1WT, PS1E280A und PS1Δ9) jeweils durch EP und LF in die MEFs transfiziert wurden. Als Kontrolle wurde ein Leervektor (LV) ebenfalls transfiziert. Die Präsenilin-Fragmente wurden mit dem Antikörper (#3622S) detektiert. (B) Bei der Lipofektion wurden verschiedene Plasmid-Lipofectamine-Verhältnisse (1:2,5 ; 1:5 und 1:0,5) getestet und die Transfektionseffizienz mittels *Western Blot* und Immundetektion mit dem Antikörper (#3622S) überprüft.

Abb. 4.3A zeigt, dass die Lipofektion in der Effizienz der Elektroporation überlegen ist, weshalb die Lipofektion im weiteren Verlauf als Standardmethode eingesetzt wurde. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass zu wenig Lipofectamine die Transfektionseffizienz senkt und zu viel davon toxisch auf die Zellen wirkt, wurden für die Lipofektion unterschiedliche Plasmid-Lipofectamine-Verhältnisse geprüft. In der Abb. 4.3B sind PS1WT und PS1Δ9 von dieser Variation betroffen. Als Ergebnis ist festzustellen, dass ein Plasmid-Lipofectamine-Verhältnis von 1:0,5 weniger effektiv als die beiden gleichwertigen Verhältnisse (1:2,5 und 1:5) ist. Deshalb wurde in den weiteren Experimenten das Verhältnis 1:2,5 verwendet, was außerdem mit den Literaturangaben übereinstimmt. Dass PS1Δ9 sowohl beim EP-LF-Vergleich als auch bei der Verhältnistestung nicht detektierbar ist, liegt möglicherweise an

dem oben (s. 4.2) beschriebenen Mechanismus, nämlich die Unzugänglichkeit des Präsenilins für den Antikörper (#3622S) durch eine Deletions-bedingte Konformationsänderung.

4.4 Analyse der Transfektionseffizienz

Für die Bearbeitung der zentralen Frage der vorliegenden Arbeit, nämlich der Einfluss von Präsenilinen bzw. Präsenilin-Mutationen auf die Expression des Prionproteins (PrP^C), wurden unter anderem drei *Western Blot*-Experimentreihen durchgeführt. Die chronologische Folge dieser Experimentreihen war einerseits durch technische Bedingungen und andererseits durch neu aufgetretene Fragen bestimmt. Zusammenfassend wollte man dadurch folgende Ziele verfolgen:

- Die Abklärung des PS1WT-Einflusses auf die PrP^C-Expression durch die Transfektion von PS1/2^{-/-}-Zellen (MEFs) mit dem humanen PS1WT im Vergleich mit den WT-Zellen (PS1/2^{+/+}) und den zweifach Knockout-Zellen (PS1/2^{-/-}).
- Überprüfen der Wirkung von zwei exemplarischen PS1-Mutationen, PS1E280A und PS1Δ9, auf die Expression von PrP^C im Vergleich zum WT.
- Untersuchung der PS2-Rolle sowie der exemplarischen PS2-Mutation, PS2N141I, im Vergleich zu PS1-WT und PS1-Mutationen. Dabei werden neue Studien in Betracht gezogen, die im Gegensatz zur früheren Vermutung einen gewissen Funktionsunterschied zwischen PS1 und PS2 unterstreichen (vgl. 1.2.5).
- Untersuchung des Einflusses von PS1WT und PS2WT separat und dann gemeinsam im Vergleich zu den Kontrollen (PS1/2^{+/+}, PS1/2^{-/-}).

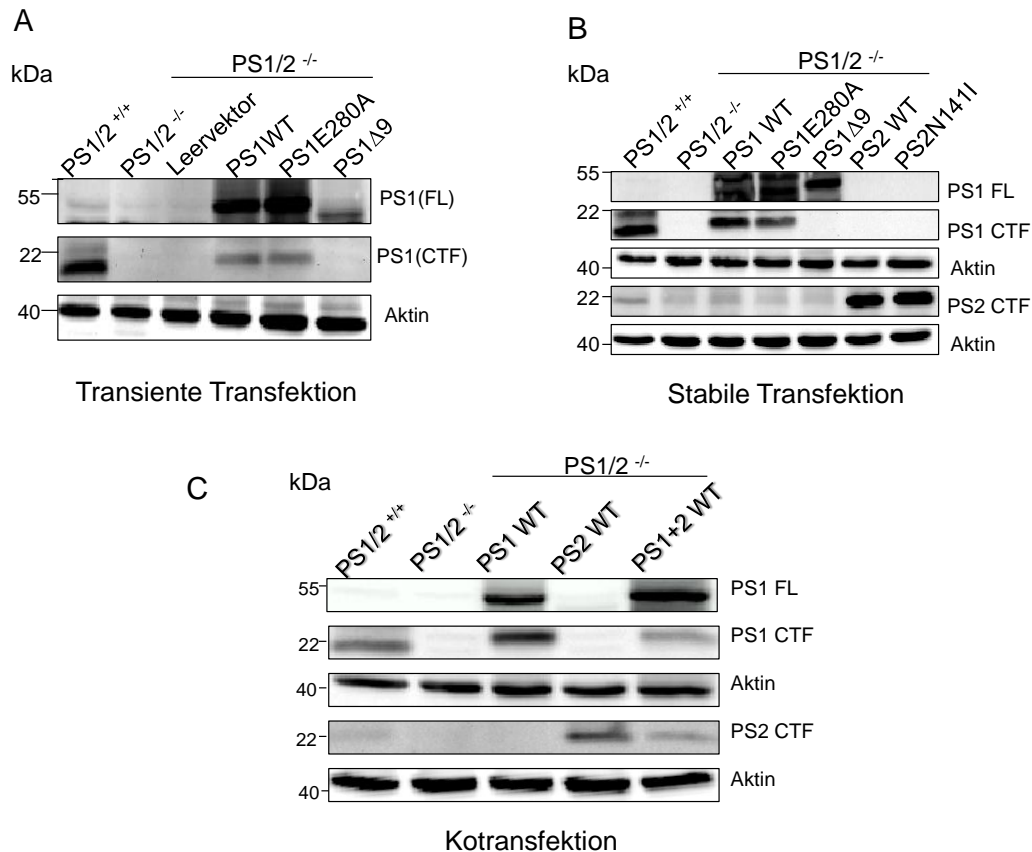


Abb. 4.4 Analyse der Transfektionseffizienz in der *Western Blot Analyse*

(A) Die Konstrukte (LV, PS1WT, PS1E280A und PS1 Δ 9) wurden in PS1/2-knockout-Zellen (MEFs) transient transfiziert. Nach der Proteinisolierung und dem anschließenden *Western Blot* wurde PS1 durch den Antikörper (MAB5323) detektiert, wobei das Holoprotein (PS1FL) und CTF nachgewiesen wurden. (B) Die stabil transfizierten Zellen wurden lysiert, die Proteine aufgereinigt und in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, durch das Blotten und die Immundetektion wurden die zu den transfizierten Sequenzen gehörenden, exprimierten Proteine (PS1WT, PS1E280A, PS1 Δ 9, PS2WT, PS2N141I) dargestellt. (C) Während Zellproben, die mit PS1WT bzw. PS2WT stabil transfiziert sind, zur Verfügung standen, wurden die mit PS2WT stabil transfizierten Zellen mit PS1WT-Konstrukt transient transfiziert, um einen Kotransfektionszustand zu erreichen, der sich mit den anderen Proben vergleichen lässt.

Die ersten zwei Ziele wurden sowohl durch eine transiente Transfektion als auch durch eine stabile Transfektion von jeweils einer Zellreihe desselben Zellmodells (MEFs) verfolgt. In der zweiten Experimentreihe, die der stabil transfizierten MEFs, wurde zusätzlich der dritte Punkt untersucht. Die dritte Experimentreihe diente dazu, den vierten Punkt zu ermitteln. Durch den Wiederholungseffekt in den drei Experimentreihen soll eine bessere Vergleichbarkeit sowie eine höhere Sicherheit der Ergebnisse gewährleistet werden. Zur Verfügung wurde die erste Zellreihe freundlicherweise von AG Paul Saftig, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, und die stabil transfizierte Zellreihe von AG Bart De Strooper, Center for Human Genetics, Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB), Katholieke Universiteit Leuven, Belgien. In der Abb. 4.4 sind die drei Experimentreihen demonstriert. Wie angezeigt konnten

die Proteine der transfizierten Konstrukte dargestellt werden, was den Erfolg der Transfektion bestätigt und den Beweis dafür liefert, dass die Zellen in der Lage waren, die DNA-Sequenz zu integrieren und das entsprechende Protein zu synthetisieren. Dies dient als Kontrolle für die nachfolgenden Analysen.

4.5 Analyse des Prionproteins (PrP^C)

4.5.1 Die Expression des Prionprotein (PrP^C) in der Western Blot Analyse

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von Präsenilinen und Präsenilin-Mutationen auf die Expression des Prionproteins (PrP^C). In den bisherigen Ergebnissen wurde das methodische Vorgehen etabliert, nun wird das PrP^C als abhängige Variable auf verschiedenen Ebenen analysiert. Mit Hilfe des *Western Blots* wurde die Menge des exprimierten Prionproteins in Abhängigkeit von den Präsenilinen dargestellt. Abb. 4.5 zeigt den *Western Blot* der drei Experimentreihen von PrP^C.

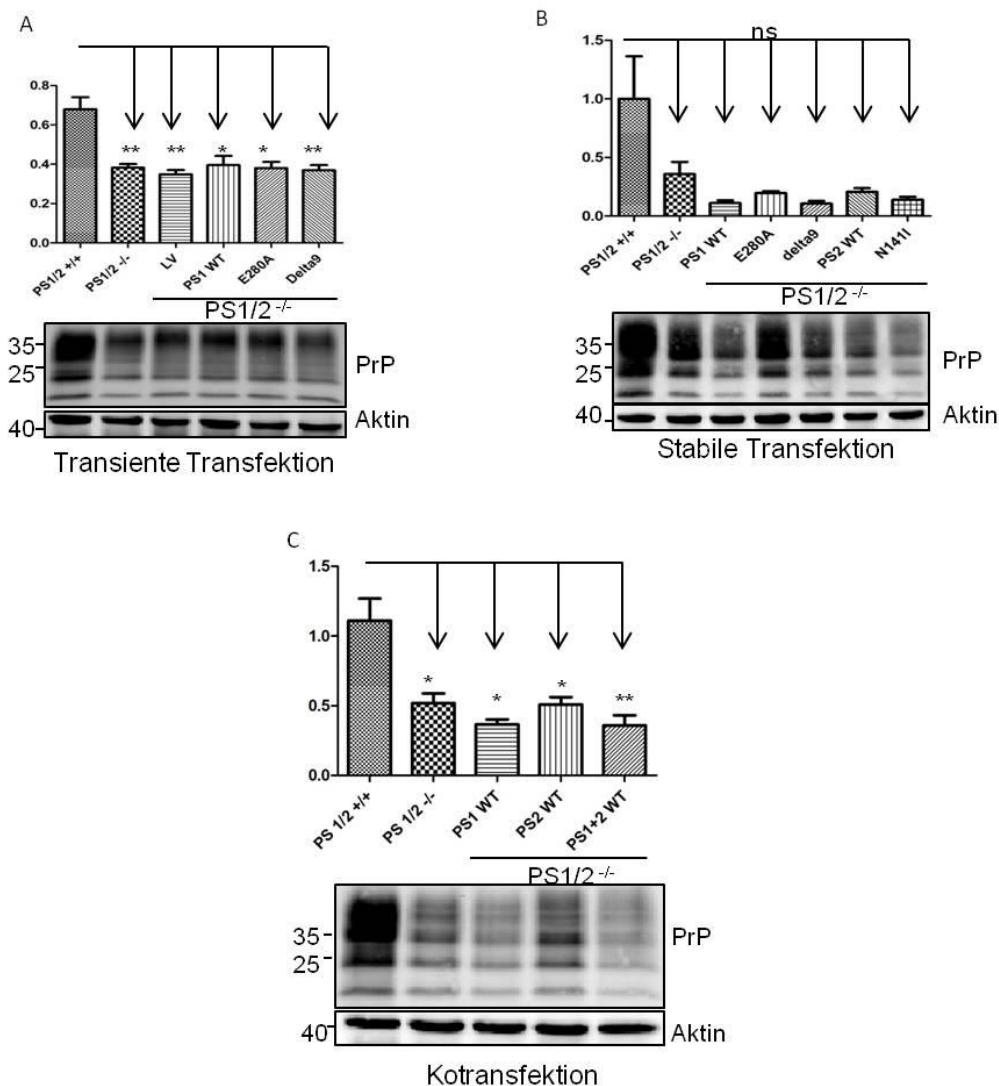


Abb. 4.5 Die Expression des Prionproteins (PrP^C) in der Western Blot Analyse

Western Blot von PrP^C aus Lysaten transient bzw. stabil transfizierter Zellen (MEFs), die PS-Expression derselben Experimente ist in der Abb. 4.4 gezeigt. (A) In einer Reihe von fünf unabhängigen Experimenten (n=5) wurde das Prionprotein der mit den angezeigten Konstrukten transient transfizierten Zellen mit WB quantifiziert. (B) Eine Reihe von drei Experimenten der stabil transfizierten Zellen (n=3) (C) In einer Reihe von stabil transfizierten Zellen wurde zusätzlich PS1WT in den bereits mit PS2WT stabil transfizierten Zellen transient eingebracht (eine Kotransfektion) (n=3). (*) p<0,05 (**) p<0,01

Wie aus der Abb. 4.5A hervorgeht, weisen die PS1/2-knockout Zellen signifikant weniger Prionprotein als die Wildtyp-Zellen auf, d. h. umgekehrt, dass die Anwesenheit von Präsenilin für die PrP^C-Expression relevant ist. Interessanterweise ist dieser Effekt durch das Einbringen von PS1WT bzw. mutiertem PS1 nicht zu beheben. Hier stellt sich die Frage, ob PS2, nicht jedoch PS1, für die PrP^C-Expression die wichtigere Rolle spielt, sodass sein Fehlen durch PS1 nicht kompensiert werden kann. In der zweiten Experimentreihe (Abb. 4.5B) wurden deshalb zusätzlich PS2WT und PS2N141I eingeführt. Obwohl sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen WT und PS1/2^{-/-} zeigt, kann man einen ähnlichen Trend wie in der ersten Experimentreihe beobachten, der sich jedoch sehr wahrscheinlich technisch-bedingt – durch starkes Schwanken der WT-Bandenintensität – die Signifikanzspiegel nicht erreicht. Diese Signifikanz bestätigt sich allerdings in der dritten Reihe (Abb. 4.5C), bei der PS1/2^{-/-}-Zellen signifikant weniger PrP^C als der WT aufweisen, wobei sich dieser Effekt weder durch die Transfektion von PS1WT noch PS2WT allein beheben ließ. Es wäre in diesem Fall vertretbar, dass die Anwesenheit beider Präseniline eine Voraussetzung für eine normale PrP^C-Expression ist. Mit dem Ziel, dies zu verifizieren, wurden deshalb beide Präseniline gleichzeitig transfiziert (Abb. 4.5C). Aber auch dadurch gelangt man nicht zur Ausgangssituation (PS1/2^{+/+}) zurück. Diesem Sachverhalt wird im weiteren Verlauf dieser Abhandlung nachgegangen.

4.5.2 Der Abbau des Prionproteins (PrP^C) in der *Western Blot Analyse*

Es wäre in diesem Zusammenhang auch denkbar, dass Präseniline das Prionprotein auf der Abbau-Ebene beeinflussen, indem sie z. B. den Abbau von PrP^C hemmen und es deshalb zu einem verstärkten PrP^C-Abbau in Abwesenheit von PS1 und PS2 kommt. PrP^C unterliegt mindestens drei möglichen Spaltungsprozessen: α -Spaltung, β -Spaltung und Shedding (vgl. 1.7). Diese Spaltungen regulieren die physiologische Funktion von PrP^C, produzieren funktionell aktive Fragmente und scheinen eine Rolle in der Pathogenese von Prion-Erkrankungen zu haben (Altmeppen *et al.* 2011, Altmeppen *et al.* 2012). Während des Sheddings wird das Prionprotein von der Zellmembran in den extrazellulären Raum freigesetzt. Um einen möglichen Einfluss auf den PrP^C-Abbau durch die Präseniline

aufzudecken, wurde der Zellkulturüberstand, der das gesheddete PrP^C enthält, aufgenommen, immunopräzipitiert (s. 3.4.2) und anschließend im *Western Blot* dargestellt.

Gemessen an der absoluten gesheddeten PrP^C-Menge (s. oben) zeigt sich kein Unterschied zwischen dem WT und PS1/2^{-/-}, was als unveränderter PrP^C-Abbau aufgefasst werden kann. Eine Änderung des PrP^C-Abbaus durch Präsenilin würde sich als Akkumulation des gesheddeten Prionproteins im Überstand der PS-knockout-Zellen zeigen. Im Gegensatz dazu verhält sich das Shed-PrP^C in ähnlicher Weise wie das exprimierte PrP^C in den Zelllysaten (vgl. Abb. 4.5C), was wiederum die Ansicht bestätigt, dass der PS-Einfluss auf PrP^C eher auf der Expressionsebene als auf der Abbau-Ebene stattfindet.

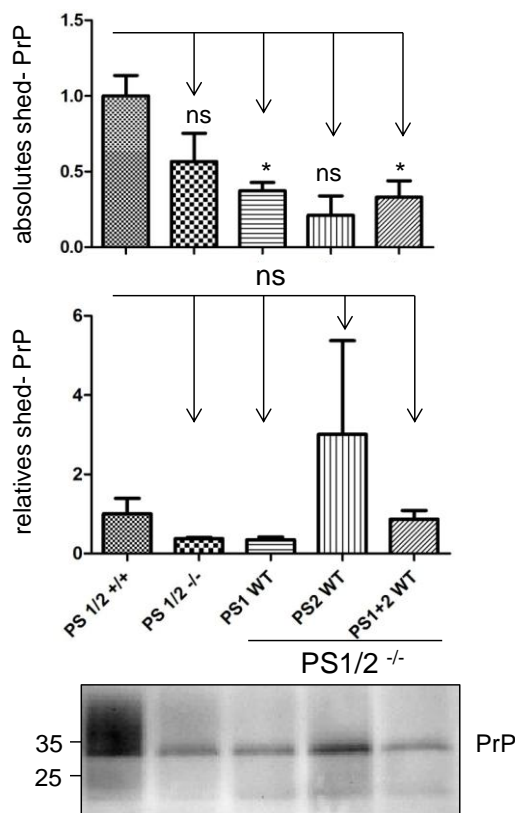


Abb. 4.6 Das "gescheddete" Prionprotein in der *Western Blot* Analyse

Es wurde die absolute Menge des gesheddeten Prionproteins im Zellkulturüberstand gemessen (oben). Da sich aber keine signifikante Änderung der gesheddeten PrP^C-Menge zeigt - im Gegenteil, das Verhalten ähnelt dem des ungescheddeten PrP^C in den Zelllysaten - , wurde das Shed-PrP^C mit dem exprimierten PrP^C (Abb. 4.5C) korrigiert (unten), sodass man hier eine Aussage über das PrP^C-Shedding unabhängig von der exprimierten PrP^C-Menge treffen kann. (*) p < 0,05 , (ns) nicht signifikant

Wenn man davon ausgeht, dass die beobachtete Abnahme der PrP^C-Menge durch die PS-Abwesenheit der Ausdruck einer Regulation auf der Expressionsebene ist, kann man durch das Beziehen des Shed-PrP^C auf die gesamte exprimierte PrP^C-Menge (Abb. 4.5C) (relatives shed-PrP^C, s. unten) das Shedding isoliert von der Expression beurteilen. Hiermit wird noch klarer, dass der PrP^C-Abbau im Hinblick auf Präseniline unverändert bleibt.

In diesem Zusammenhang wurde außerdem berichtet, dass ADAM10, eine Protease, die die das PrP^C extrazellulär freisetzt (Altmeyen *et al.* 2011, Altmeyen *et al.* 2012), selbst ein Substrat von γ -Sekretase ist (Tousseyn *et al.* 2009). Demzufolge wird zunächst die

Ektodomäne von ADAM10 durch eine bestimmte Protease, z. B. ADAM9 oder ADAM15 freigesetzt und das verbleibende CTF wird anschließend durch γ -Sekretase gespalten, wodurch eine ICD entsteht, die eine transkriptionelle Aktivität ausübt. Wenn man davon ausgeht, dass ADAM10 seine Aktivität als Protease dadurch verliert, würde sich eine Störung der γ -Sekretase-Aktivität, z.B. durch das Fehlen von Präsenilin oder durch Präsenilin-Mutationen, auf ADAM10 und somit auf den Abbau des Prionproteins auswirken. Eine verminderte γ -Sekretase-Aktivität würde zu einer erhöhten ADAM10-Aktivität führen, was wiederum in einen verstärkten Abbau des Prionprotein resultieren würde, d.h. PS1/2^{-/-} würden weniger PrP^C enthalten, während PrP^C in den PS1E280A-Zellen – im Sinne einer *gain-of-function*-Mutation – akkumuliert. Das ist vereinbar mit der zuvor beschriebenen Beobachtung (4.5.1), wobei jedoch keine Akkumulation des Prionproteins in der Probe PS1E280A festzustellen ist.

Um die Wirkung von γ -Sekretase auf ADAM10 zu untersuchen, wurde außerdem ADAM10 im *Western Blot* analysiert (Abb. 4.7).

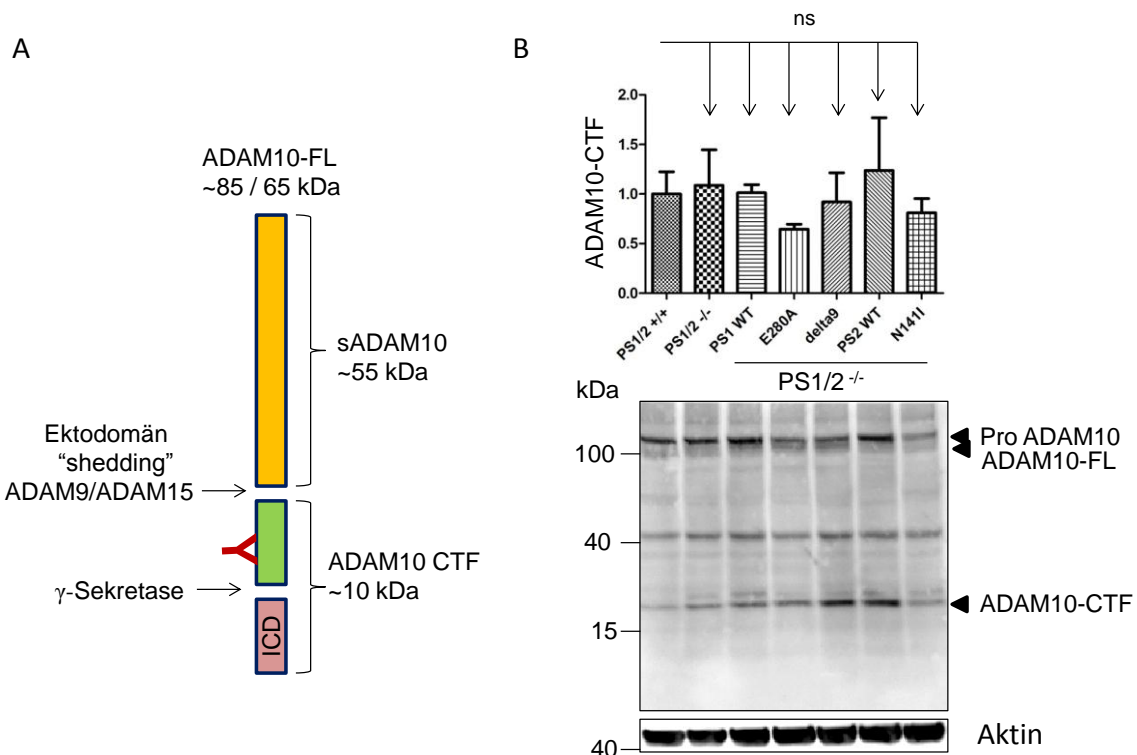


Abb. 4.7 ADAM10 als Substrat von γ -Sekretase in der *Western Blot* Analyse

(A) ADAM10 ist schematisch dargestellt, die beiden Schnittstellen sind markiert. Außerdem ist die Bindungsstelle des Antikörpers bei der Immundetektion angezeigt. (B) In einer Reihe von drei unabhängigen Experimenten wurde ADAM10 mit WB dargestellt. Der Antikörper erkennt sowohl das gesamte und unreife Protein (Pro ADAM10, ADAM10-FL) als auch das C-terminale Fragment (CTF).

Vermutlich technisch bedingt konnte der von Tousseyn *et al.* beschriebene Sachverhalt nicht signifikant reproduziert werden. Eine Akkumulation von ADAM10-CTF wäre im Falle einer

γ -Sekretase-Aktivitätsminderung (PS1/2^{-/-}) zu erwarten, während eine CTF-Verminderung eine verstärkte γ -Sekretase-Aktivität (PS1E280A als *gain-of-function*-Mutation) repräsentieren würde. Dieser Trend lässt sich oben (Abb. 4.7) beobachten, der allerdings – technisch-bedingt – nicht signifikant ist.

4.5.3 Die PrP^C-Expression in der qPCR (RT-PCR)

Die oben dargestellten Beobachtungen legen nahe, dass die Präseniline das Prionprotein (PrP^C) auf der Expressionsebene beeinflussen. Um dies mit hoher Aussagekraft zu verifizieren, wurde die Expressionsrate von PrP^C, d.h. die Menge an mRNA, mit Hilfe von qPCR (quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion, *RT-PCR*) bestimmt. Sämtliche qPCR-Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Florian Wegwitz, Institut für Tumorbologie, Zentrum für Experimentelle Medizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), durchgeführt.

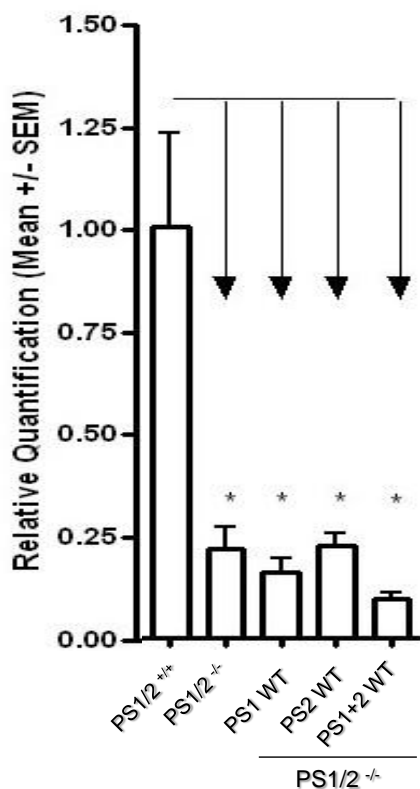


Abb. 4.8 Die Expressionsrate des Prionproteins (PrP^C) in der qPCR

Während PS1WT und PS2WT stabil in die Zellen (MEFs) transfiziert sind, wurde PS1WT zusätzlich transient in die bereits mit PS2WT stabil transfizierten Zellen transfiziert (PS1+2WT). Nach einer Inkubationszeit wurden die Zellen aufgenommen und die RNA wurde isoliert, aus dem anschließend die Erststrang-cDNA synthetisiert wurde. Die synthetisierte cDNA wurde dann mit den entsprechenden Primern von PrP^C der PCR zugeführt. Die Expression von PrP^C wurde mit der von Hspa8 als Referenz verglichen.

Analog zu den WB-Ergebnissen ist die Transkription von PrP^C, gemessen an mRNA, in den PS1/2^{-/-}-Zellen deutlich niedriger als im WT (s. Abb. 4.8). Dementsprechend bestätigt sich die Beobachtung, dass Präseniline das Prionprotein (PrP^C) auf der Expressionsebene beeinflussen. Aber auch hier gelingt es durch das Wiedereinbringen von PS1WT, PS2WT oder beides gemeinsam nicht, die Expression von PrP^C auf die Ausgangssituation (PS1/2^{+/+}) zu erhöhen. Das wird im weiteren Verlauf näher untersucht.

4.5.4 Die zelluläre Verteilung von PrP^C in der Immunofluoreszenzfärbung

Die Wechselwirkungen zwischen dem Prionprotein und A β wurden auf unterschiedlichen Ebenen studiert (s. 1.9). A β entsteht aus APP durch eine proteolytische Prozessierung, an der γ -Sekretase beteiligt ist, deren aktives Zentrum von Präsenilin gebildet wird (vgl. 1.2.1). Caetano *et al.*, zeigten, dass A β -Oligomere die Lokalisation von PrP^C an der Zelloberfläche erhöhen (Caetano *et al.* 2011). Demnach hemmen die A β -Oligomere die Endozytose von PrP^C, was letztendlich in einer Akkumulation des Prionproteins resultiert. Durch Darstellen des Prionproteins in der Zellmembran und im Zytoplasma separat voneinander mit Hilfe von Immunofluoreszenzfärbung sollte ein Einfluss der Präsenilinen auf die Prionprotein-Lokalisation – vermittelt durch A β – sichtbar gemacht werden. Abb. 4.9 zeigt das Ergebnis der Immunofluoreszenzfärbung.

Um das Prionprotein an der Zelloberfläche zu zeigen, wurden die Zellen in einem unpermeabilisierten Zustand mit den entsprechenden Antikörpern behandelt, das zytosolische PrP^C wurde nach der Permeabilisierung mit Antikörpern inkubiert (s. 3.5.2). Die primäre Analyse ergab Folgendes:

- Sowohl in PS1/2^{-/-} als auch in den Kontrollen – das sind Zellen, die nur mit dem sekundären Antikörper behandelt wurden – zeigt sich ein unspezifisches Signal, was eine vernünftige Interpretation des Experiments unmöglich macht.
- Die unpermeabilisierten Zellen erscheinen kleiner als die permeabilisierten. Das mag daran liegen, dass die unpermeabilisierten Zellen erst fixiert wurden, nachdem sie mit den Antikörpern behandelt wurden. Dadurch wollte man eine potentielle Permeabilisierung durch die Fixierung vermeiden.
- Das Signal von PS2 in PS1/2^{+/+} ist sehr schwach. Das liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an der verminderten Fähigkeit des primären Antikörpers, PS2 zu binden. Dasselbe Verhalten zeigt der Antikörper auch im WB (vgl. Abb. 4.4 B und C).
- Ungeachtet der Wertigkeit des Experiments zeigt sich keine markante Akkumulation des Prionproteins in Zellen mit A β -Pathologie, wie z.B. PS1E280A oder PS2N141I im Vergleich zum WT oder PS1/2^{-/-}.

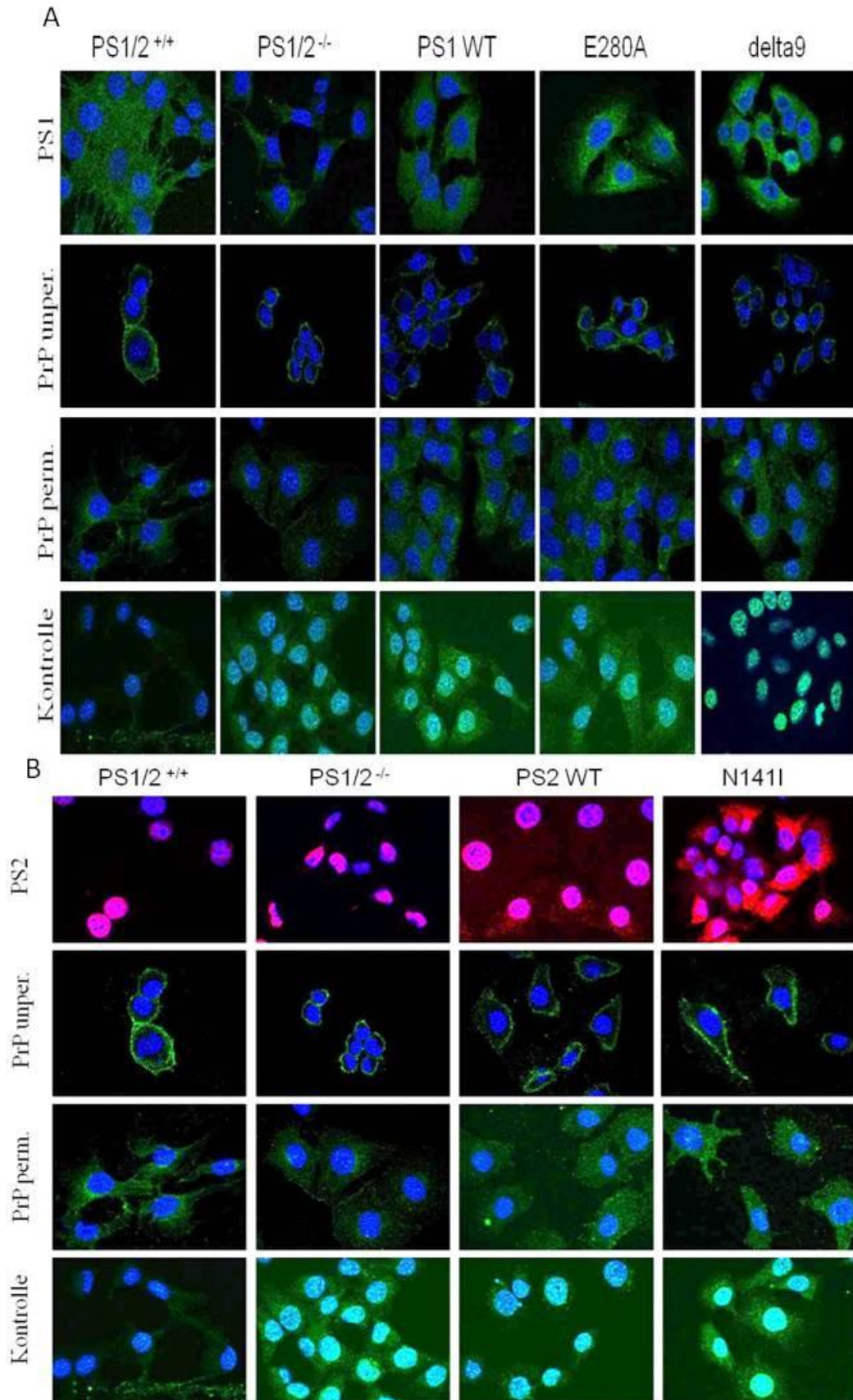


Abb. 4.9 Die zelluläre Verteilung des Prionproteins (PrP^C) in der Immunfluoreszenzfärbung
 Dargestellt wurden die Präseniline, (A) mit PS1 und (B) mit PS2, und das Prionprotein, an der Zelloberfläche (unper. =unpermeabilisiert) sowie zytosolisch (per. =permeabilisiert), als Kontrollen wurden Zellen dargestellt, die nur mit sekundären Antikörpern behandelt wurden.

Da, laut Caetano *et al.*, A β -Oligomere, nicht jedoch A β -Monomere, die Lokalisation von PrP^C an der Zelloberfläche erhöhen, würde man eine Akkumulation des Prionproteins in den Zellmembranen von Zellen mit A β -Pathologie, wie z. B. PS1E280A, PS1 Δ 9 oder PS2N141I, nicht aber im WT oder PS1/2^{-/-}, erwarten. Diese Akkumulation würde sich außerdem auf die PrP^C-Gesamtmenge in der Zelle auswirken, was aber im WB nicht zu beobachten ist (s. Abb. 4.5). Daraus ist zu schließen, dass A β -Oligomere entweder nicht zu einer Akkumulation des Prionproteins in der Zellmembran führen, zumindest nicht zu einer messbaren Verschiebung der absoluten Gesamtmenge von PrP^C in der Zelle, oder dass die A β -Pathologie im verwendeten Zellmodell (MEFs) nicht so stark ausgeprägt ist. Diese Schlussfolgerung lässt einen Einfluss von Präsenilinen auf PrP^C auf der Expressionsebene konsequenter vermuten.

4.6 Analyse der Expression und Aktivität von p53

4.6.1 Die Expression von p53

Wie oben beschrieben, erhöhen die Präseniline die Expression des Prionproteins, während sein Abbau unabhängig davon zu sein scheint. Da die Präseniline an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind (vgl. 1.2.5), stellt sich die Frage, durch welchen Mechanismus sie ihren Einfluss auf das Prionprotein ausüben. Berichtet wurde, dass die intrazelluläre Domäne von APP (AICD), welche durch die Spaltung von APP durch u. a. γ -Sekretase generiert wird, die Transkription vom Tumorsuppressor p53 induziert, der wiederum die Transkription des Prionproteins steigert (Vincent *et al.* 2009). Darum wurde der Tumorsuppressor p53 als ein potenzieller Vermittler zwischen Präsenilin und der Expression von PrP^C untersucht. Zunächst wurde die Expression von p53 analog zu PrP^C (s. 4.5.1) in drei verschiedenen Experimentreihen proteinbiochemisch (*Western Blot*) analysiert. Im Anschluss daran wurde die Expressionsrate von p53 mittels qPCR ermittelt (s. Abb. 4.10).

In der ersten Experimentreihe wurde p53 in transient transfizierten Zellen untersucht (Abb. 4.10A). Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT und PS1/2^{-/-} im Hinblick auf die p53-Expression, was sich auch über die transfizierten PS1/2^{-/-}-Zellen hinaus fortsetzt. Man beobachtet allerdings den Trend einer Zunahme der p53-Spiegel in den Knockout- sowie den transfizierten Zellen im Vergleich zum WT, dieser Trend wird sogar in den PS1WT- und PS1E280A-transfizierten Zellen signifikant. In der zweiten Experimentreihe, die der stabil-transfizierten Zellen (Abb. 4.10B), beobachtet man jedoch den umgekehrten Trend. Dies liegt vermutlich an den technisch-methodischen Bedingungen; es ließ sich feststellen, dass die PS1/2^{-/-}-Zellen generell eine höhere Wachstumsrate aufweisen

als der WT (hier nicht dargestellt). Wenn die Zellen für die Transfektion am Vortag ausgesät, für 5 Stunden transfiziert und anschließend nach 24 Stunden geerntet werden (s. 3.3.2 u. 3.3.4), entsteht innerhalb dieser ziemlich langen Zeit eine hohe Zelldichte in den Zellkulturschalen. Unter diesen Bedingungen werden Apoptose-Signalwege, darunter p53, aktiviert. Zudem stellen die Transfektionsreagenzien einen Stressfaktor für die Zellen dar. Beides – die lange Transfektionszeit und die Reagenzien – entfallen bei den stabil transfizierten Zellen, denn sie wurden lediglich ausgesät und nach 16 Stunden geerntet.

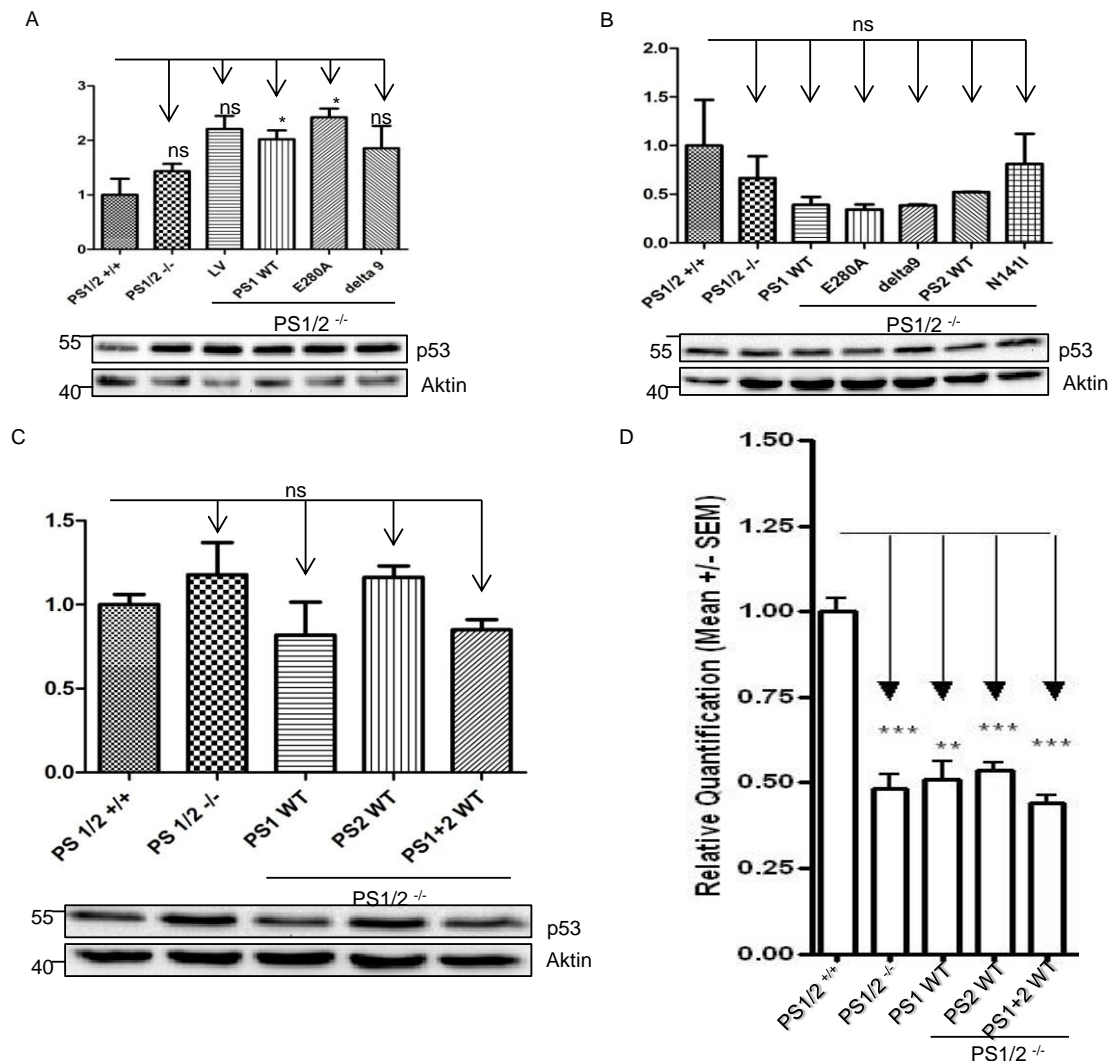


Abb. 4.10 Die Expression von p53

(A) In einer Reihe von 6 unabhängigen Experimenten (n=6) wurde p53 aus transient transfizierten Zellen im WB nachgewiesen und quantifiziert. (B) In einer Reihe von 3 unabhängigen Experimenten (n=3) wurde p53 aus stabil transfizierten Zellen im WB nachgewiesen und quantifiziert. (C) In einer Reihe von 3 unabhängigen Experimenten (n=3) wurde p53 aus stabil transfizierten Zellen im WB nachgewiesen und quantifiziert, wobei zusätzlich zu den mit PS2WT stabil transfizierten Zellen PS1WT transient kotransfiziert wurde. (D) In einer Reihe von 3 unabhängigen Experimenten (n=3) wurde die Expressionsrate von p53 durch qPCR ermittelt und unter den verschiedenen Proben verglichen. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$

Zwar kann man keine signifikante Änderung der p53-Expression in den stabil-transfizierten Zellen (Abb. 4.10B) unter den verschiedenen Proben erkennen – was möglicherweise technisch bedingt ist, erkennbar am hohen Standardfehler, SEM, des WT (PS1/2^{+/+}) – man erkennt aber eine Tendenz der Knockout-Zellen (PS1/2^{-/-}), weniger p53 zu bilden, ein Effekt, der in den weiteren Proben anhält. Dies würde sich mit dem WB von PrP^C (Abb. 4.5) abdecken und wäre mit den Beobachtungen von Vincent *et al.*, vereinbar. In der dritten Experimentreihe, bei der beide Präseniline kotransfiziert wurden (Abb. 4.10C), ist kein signifikanter Effekt zu erkennen.

Da p53 an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist (Vogelstein *et al.* 2000), ist es – als ein reifes funktionsfähiges Protein – anfällig für jede Manipulation am zellulären System. Um diesen Effekt zu verringern und um das oben vermutete Verhalten (Abb. 4.10B) zu verifizieren, wurde die Expressionsrate von p53 mit Hilfe von qPCR ermittelt (Abb. 4.10D). Wie angezeigt experimentieren die PS1/2^{-/-}-Zellen, bestätigend für Abb. 4.10C u. Abb. 4.5 und übereinstimmend mit Vincent *et al.*, 2009, weniger p53 als WT (SP1/2^{+/+}). Dieser Effekt lässt sich durch die Transfektion mit PS1WT, PS2WT bzw. beides, analog zum PrP^C (Abb. 4.5), nicht beheben. Zusammenfassend lässt sich nachweisen, dass Präseniline die Expression von PrP^C und p53 gleichermaßen erhöhen. Dementsprechend experimentieren PS1/2^{-/-}-Zellen weniger PrP^C und p53, in beiden Fällen lässt sich dieser Effekt durch eine Transfektion mit den Präsenilinen nicht korrigieren.

4.6.2 Die Aktivität von p53

Nicht nur die absolute Menge an p53, sondern auch sein Aktivitätsgrad ist für viele Prozesse entscheidend. Eins oder beides unterliegt dem Einfluss von Präsenilin. Als Marker für die Aktivität von p53 wurden zwei Proteine durch qPCR bestimmt, die p53 im Signalweg nachgeschaltet sind, p21 (=Cdkn1a, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1a*) und Mdm2 (*mouse double minute 2*). Die Aktivierung von p21 durch p53 führt zu einem Wachstumsarrest, während Mdm2 p53 – im Sinne einer negativen Rückkopplung – hemmt (Vogelstein *et al.* 2000). Durch dieses Vorgehen kann einerseits die p53-Aktivität ungeachtet seiner absoluten Menge bestimmt werden, und zum anderen wird die Expression von p21 und Mdm2 explizit ermittelt. Abb. 4.11 zeigt die dabei erhaltenen Ergebnisse.

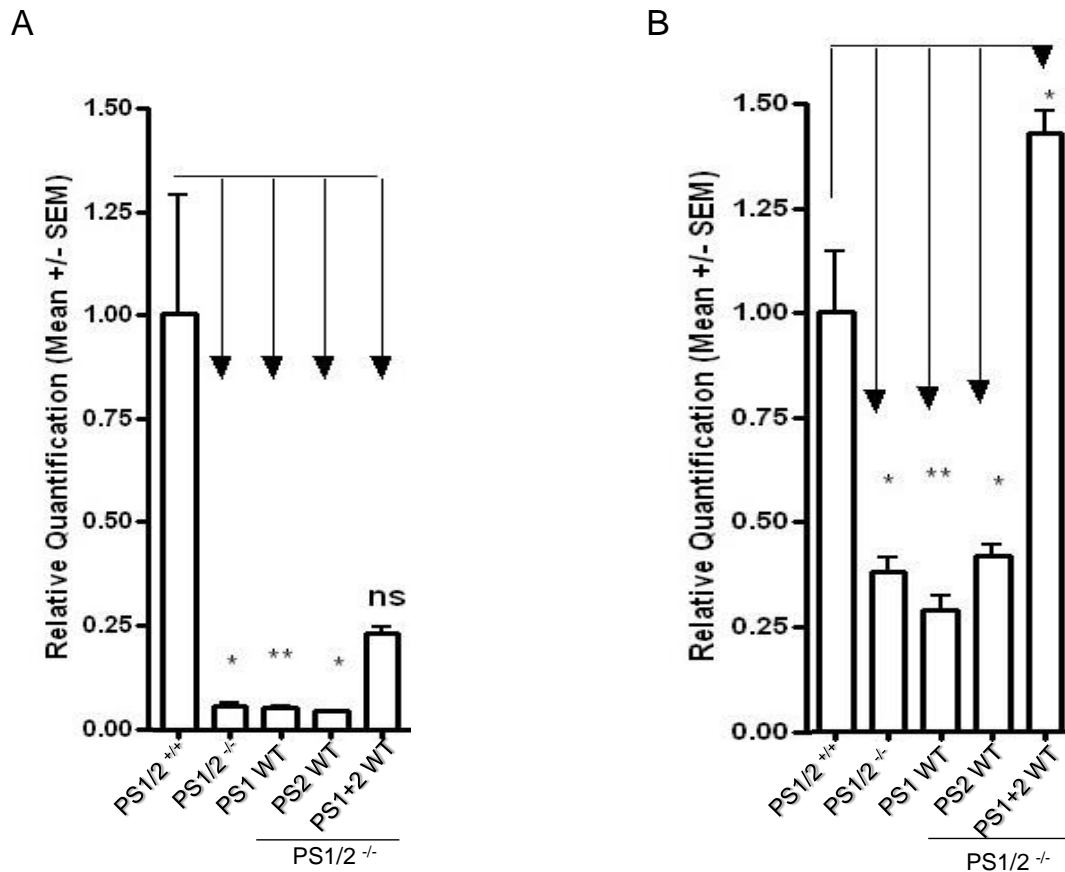


Abb. 4.11 Die Aktivität von p53

Die Aktivität von p53 wurde durch Bestimmung der Expressionsrate von p21 und Mdm2 durch qPCR ermittelt. Beide Proteine sind p53 nachgeschaltet und repräsentieren seine Funktion auf der Expressionsebene. (*) p < 0,05 , (**) p < 0,01, (ns) nicht signifikant

Analog zu PrP^C (Abb. 4.5) und p53 (Abb. 4.10) weisen die PS1/2^{-/-}-Zellen für die beiden Proteine (p21 und Mdm2) eine Abnahme der Transkription vergleichbar mit dem WT (PS1/2^{+/+}) auf. Die alleinige Transfektion mit PS1WT bzw. PS2WT reicht nicht aus, die Expression von p21 und Mdm2 auf den Ausgangszustand (PS1/2^{+/+}) zu erhöhen. Im Gegensatz zu PrP^C und p53 gelingt es durch die Kotransfektion von PS1WT und PS2WT, die Transkription von p21 und Mdm2 wieder zu erhöhen, im Falle von Mdm2 sogar signifikant höher als der WT (PS1/2^{+/+}). Auf das letztere wird in der Diskussion eingegangen.

4.7 Analyse der APP-Prozessierung

4.7.1 Herstellung des APP-Konstrukts zur Zelltransfektion

Zuvor wurde festgestellt, dass Präseniline für die Expression von PrP^C und p53 relevant sind, sodass deren Fehlen eine Abnahme der PrP^C- und p53-Expression nach sich zieht. Theoretisch können die Präseniline diesen Einfluss als Bestandteil der γ -Sekretase oder unabhängig davon ausüben (vgl. 1.2.5). Von Vincent *et al.* wurde AICD als Vermittler zwischen Präsenilin und der Expression von p53 vorgeschlagen, das unmittelbar daraufhin die Expression von PrP^C erhöht (Vincent *et al.* 2009). AICD entsteht durch die konsekutive Spaltung von APP durch γ -Sekretase. Um zu überprüfen, ob die Präseniline das Prionprotein (PrP^C) γ -Sekretase-abhängig bzw. -unabhängig beeinflussen, wurde sowohl eine γ -Sekretase-abhängige – die Produktion von AICD aus APP – als auch eine γ -Sekretase-unabhängige – die Degradation von β -Catenin – Funktion der Präseniline analysiert. Zunächst wurde die AICD-Produktion aus APP durch γ -Sekretase im WB analysiert. Hierbei konnte die AICD-Bande in keinem der WB-Experimente nachgewiesen werden (hier nicht dargestellt). Von Kooperationspartnern, die auch mit demselben Zellmodell (MEFs) arbeiten, wurde diese Schwierigkeit ebenfalls berichtet.

Als eine mögliche Ursache dafür wurde eine verminderte Expression von APP in den *Mouse Embryonic Fibroblasts* (MEFs) vermutet, weshalb eine Transfektion des Zellmodells mit dem humanen APP695 vorgenommen wurde. APP695 ist die kürzeste Isoform und wird fast ausschließlich in den Neuronen exprimiert (vgl. 1.2.1). Aufgrund dessen und weil die AICD-Produktion vorwiegend daraus entsteht (Wertkin *et al.* 1993, Nalivaeva and Turner 2013), wurde diese Isoform ausgewählt. Dadurch soll zudem die APP-Prozessierung im zentralen Nervensystem (ZNS) am ähnlichsten simuliert werden. Hierfür wurde die APP695-Sequenz eingebettet im Vektor (pCAX, s. Anhang 7.3) und transformiert im Bakterienstamm (DH5 α) vom Hersteller (addgene, USA) geliefert. Zunächst wurde APP695 in DH5 α -Zellen (Plasmid: pCAX) amplifiziert, daraus präpariert und anschließend durch DNA-Verdau mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Not*I herausgeschnitten. Hier soll darauf hingewiesen werden, dass die Insert-Lokalisation von APP695 im Vektor (pCAX) nicht der vom Hersteller angegebenen Lokalisation (zwischen den Schnittstellen von *Eco*RI und *Not*I) entsprach, sodass zunächst mehrere Verdau-Kombinationen getestet werden mussten (hier nicht dargestellt), um letztendlich die Insert-Lokalisation zwischen den Schnittstellen von *Kpn*I und *Eco*RV eingrenzen zu können. Nachdem das verdaute Plasmid in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt wurde, wurde die APP695-Bande aus dem Gel

herausgeschnitten und mit Hilfe eines Extraktions-Kits aufgereinigt (s.3.2.7). Nachfolgend wurde APP695 mittels Ligation in den Expressionsvektor pcDNA3.1/Neo (s. Anhang 7.4) eingebaut (s. 3.2.8). Das neue Plasmid (pcDNA3.1/Neo + APP695) wurde dann im Bakterienstamm XL10-Gold® amplifiziert und daraus präpariert. Der Erfolg der Umklonierung von APP695 aus pCAX in pcDNA3.1/Neo sowie seiner Amplifikation wurde in dreifacher Weise kontrolliert; durch Restriktionsverdau, Sequenzierung und durch Transfektion von MEFs mit anschließendem WB und Immundetektion. Abb. 4.12 repräsentiert die Kontrollen der APP695-Klonierung.

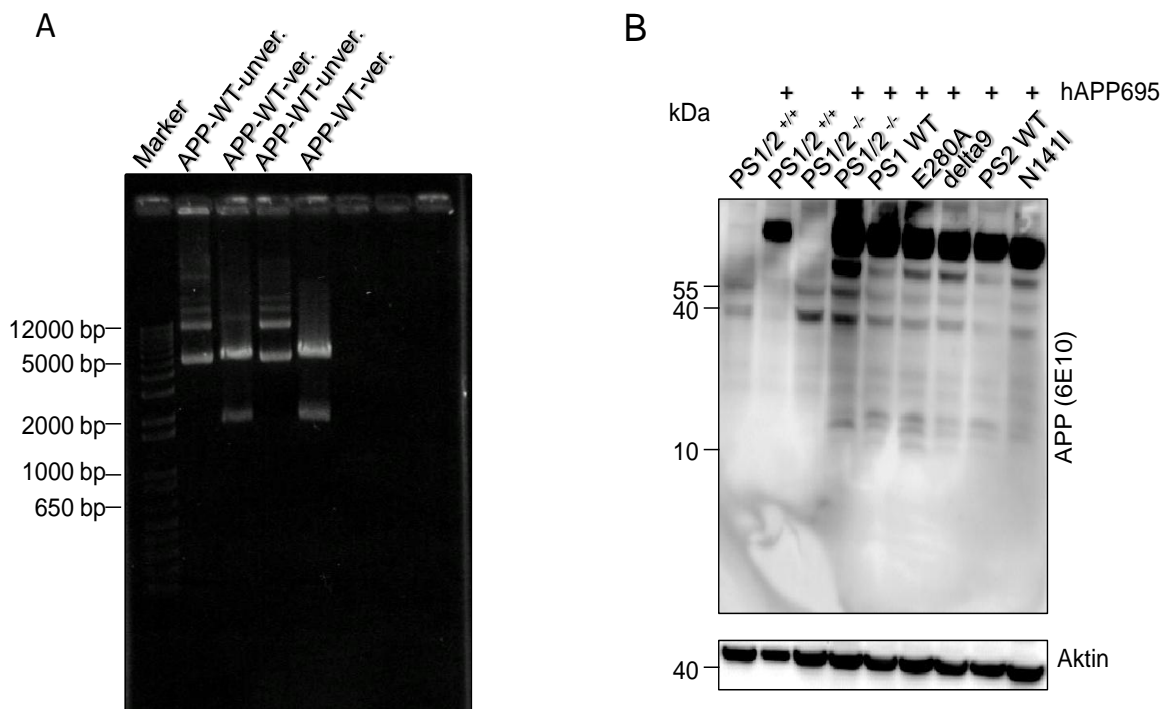


Abb. 4.12 Agarose-Gelelektrophorese und Western Blot Analyse zum Nachweis von APP695

Das durch Klonierung gewonnene APP-Konstrukt wurde elektrophoretisch aufgetrennt (A). Hierfür wurden die unverdauten (unver.) und die verdauten (ver.) Proben jeweils zweimal aufgetragen. Das unverdaute Plasmid liegt bei ca. 6.0 Kb, das linearisierte etwas höher und das APP-Fragment bei ca. 2 Kb. (B) Die MEFs, die stabil mit verschiedenen PS-Sequenzen transfiziert sind, wurden mit APP695 transient transfiziert und im WB analysiert. Als Kontrolle wurden Lysate aus jeweils untransfizierten PS1/2^{+/+}- und PS1/2^{-/-}-Zellen aufgetragen. Für die Immundetektion kam der Antikörper (6E10) zum Einsatz, welcher ans A β -Peptid bindet und deshalb in der Lage ist, FL-APP, sAPP α , C99 (= β CTF) und A β darzustellen (Abb. 1.4)

Das Plasmid (pcDNA3.1/Neo + APP695) wurde mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Eco*RI verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Das unverdaute Plasmid weist eine Länge von ca. 6.0 Kb (Vektor+Insert) auf. Im verdauten Ansatz wandert die Vektor-Bande – bedingt durch die Linealisierung – eine kürzere Strecke. Die APP695-Bande zeigt eine Länge von ca. 2.0 Kb (695 AS * 3 = 2085bp) und ist auf dem Agarosegel entsprechend identifizierbar. Zusätzlich wurde der APP695-Insert bei der Firma SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen)

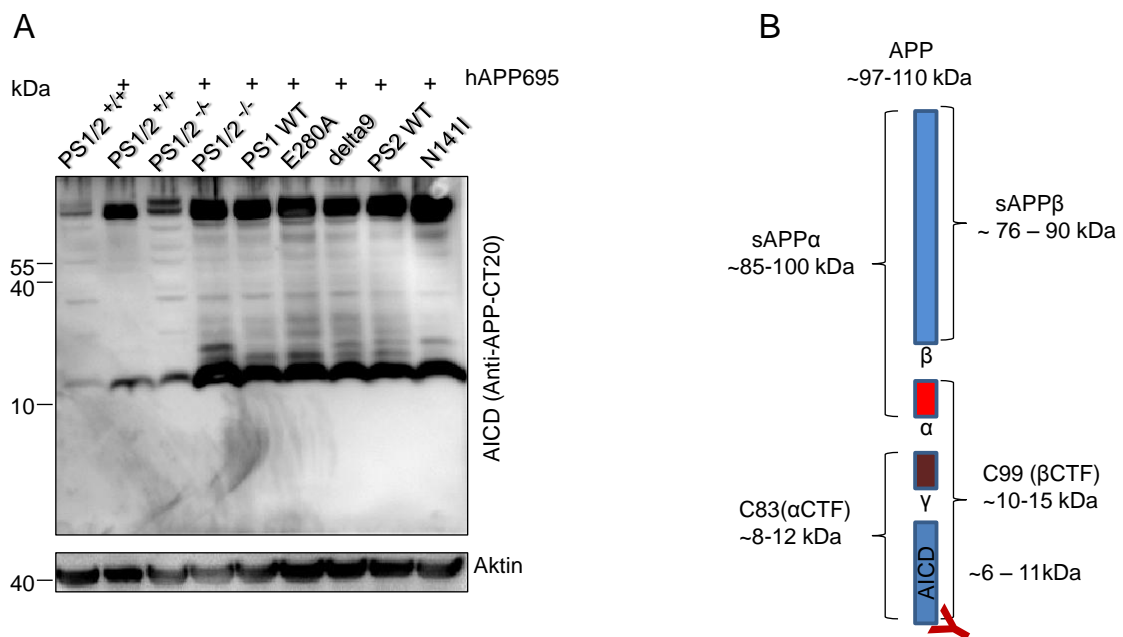
sequenziert, die dazu benötigten Primer wurden bei der Firma Sigma-Aldrich bestellt (s. 3.2.4). Da es sich bei APP695 mit 2088bp um ein relativ großes Gen handelt, kann die ganze Sequenz allein anhand der beiden Primer (T7 und BGH) methodisch-bedingt nicht abgedeckt werden. Darum wurden zwei weitere Primer entworfen, die die Sequenzierung des mittleren Teils ermöglichen. Für den „forward-Primer“ (APP-For) wurde eine APP-Sequenz nach ca. 500bp gewählt, für den „reverse-Primer“ wurde eine APP-Sequenz vor den letzten 500bp gewählt, revers umgeschrieben und anschließend das Komplement dazu angegeben. Die Sequenzierungsergebnisse sind im Anhang 7.5 dargestellt.

Nachdem das gewonnene Konstrukt durch DNA-Verdau und Sequenzierung kontrolliert wurde, wurde es in die MEFs transient transfiziert und anschließend durch *Western Blot* und Immundetektion von APP695 analysiert. Wie aus Abb. 4.12B ersichtlich wird, exprimieren die transfizierten Zellen deutlich mehr APP als die untransfizierten, was sowohl den Erfolg der Klonierung als auch den der Transfektion bestätigt. Während die FL-APP-Bande deutlich erkennbar ist, sind die weiteren APP-Fragmente (sAPP α , C99 und A β) schwach bzw. kaum erkennbar. Dies liegt vermutlich an der geringen A β -Produktion bzw. an der verminderten Fähigkeit des Antikörpers solche (sAPP α und C99) zu binden.

4.7.2 APP-Prozessierung in der *Western Blot Analyse*

Um AICD, das vorgeschlagene Bindeglied zwischen den Präsenilinen und p53, darstellen zu können, wurden die Zellen (MEFs) mit APP695 transient transfiziert und im WB analysiert (Abb. 4.13A). Für die Immundetektion wurde der Antikörper (Anti-APP-CT20) verwendet, der gegen die letzten 20 Aminosäuren des C-terminalen Endes von APP gerichtet ist. Dementsprechend kann dieser Antikörper mehrere APP-Fragmente darstellen (FL-APP, C99, C83 und AICD). Zur Veranschaulichung ist APP in der Abb. 4.13B schematisch dargestellt, die Schnittstellen (α , β und γ) sind markiert und die ungefähren Fragmentlängen sind gemäß den Literaturangaben gezeigt. In Abb. 4.13A sind zwei große Banden zu erkennen, die obere repräsentiert das FL-APP – die Banden der verschiedenen Isoformen sind darin enthalten, was auf die schwache Trennung zurückzuführen ist (Bis-Tris-Gradientengel 4-12%) und die Bande dicker erscheinen lässt –, die untere Bande stellt eine Verschmelzung der C99- und C83-Banden dar. Trotz der Transfektion mit APP695, die eine deutliche Überexpression von APP ergab, ist keine AICD-Bande sichtbar. Dies mag wiederum an der geringen AICD-Produktion in diesem Zellmodell oder der kurzen Expositionszeiten der Blot-Membranen liegen.

Als indirekter Marker für die AICD-Produktion wurde stattdessen die Spaltung vom APP-CTF (C99/C83) quantifiziert (Abb. 4.13C), denn eine hohe AICD-Produktion zeigt sich durch eine geringe Menge an APP-CTF und umgekehrt führt eine schwache γ -Sekretase-Aktivität zu einer Akkumulation von APP-CTF. Tatsächlich enthalten PS1/2^{-/-}-Zellen, wo γ -Sekretase-Aktivität fehlt, deutlich mehr APP-CTF als PS1WT-Zellen, wo die γ -Sekretase-Funktion wiederhergestellt ist. Die γ -Sekretase-Aktivität ist über die weiteren Proben (E280A, $\Delta 9$, PS2WT, N141I) erhalten und sogar bei der Mutation E280A erhöht, was den *gain-of-function*-Effekt dieser Mutation widerspiegelt. Durch das starke Schwanken der Bandenintensität von PS1/2^{+/+} - erkennbar am Standardfehler – ist der Unterschied zu PS1/2^{-/-} nicht signifikant, dennoch erkennt man eine Tendenz, die mit dem Rest vereinbar ist, nämlich eine höhere γ -Sekretase-Aktivität in PS1/2^{+/+} als in PS1/2^{-/-}. Die Beobachtung, dass die γ -Sekretase-Aktivität durch Knocking-Out von PS1 und PS2 aufgehoben ist und durch die Transfektion wiederhergestellt wird – bezogen auf die Prozessierung von APP –, wurde auch von Kooperationspartnern bestätigt, die auch dasselbe Zellmodell (MEFs) verwendeten (Nyabi *et al.* 2003, Hebert *et al.* 2006).



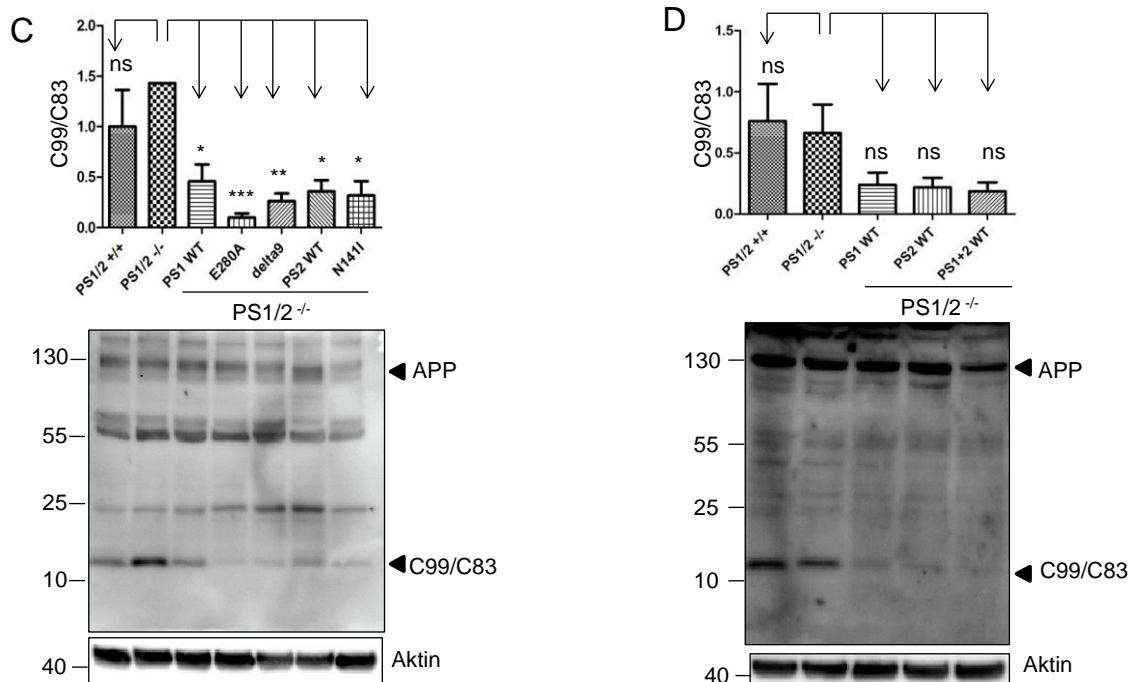


Abb. 4.13 Die Prozessierung von APP in der Western Blot Analyse

(A) APP695 wurde in die MEFs transfiziert und im WB dargestellt. (B) Schematische Darstellung von APP. α , β und γ markieren die Schnittstellen von α -, β - und γ -Sekretase (vgl. Abb. 1.4), die entsprechenden Fragmente sind benannt und deren Länge gemäß der Literaturangaben gezeigt. Außerdem ist die Bindungsstelle des Antikörpers (Anti-APP-CT20) am APP symbolisch markiert. (C) APP im WB ohne Überexpression. (D) APP im WB unter der Kotransfektion von PS1 und PS2.

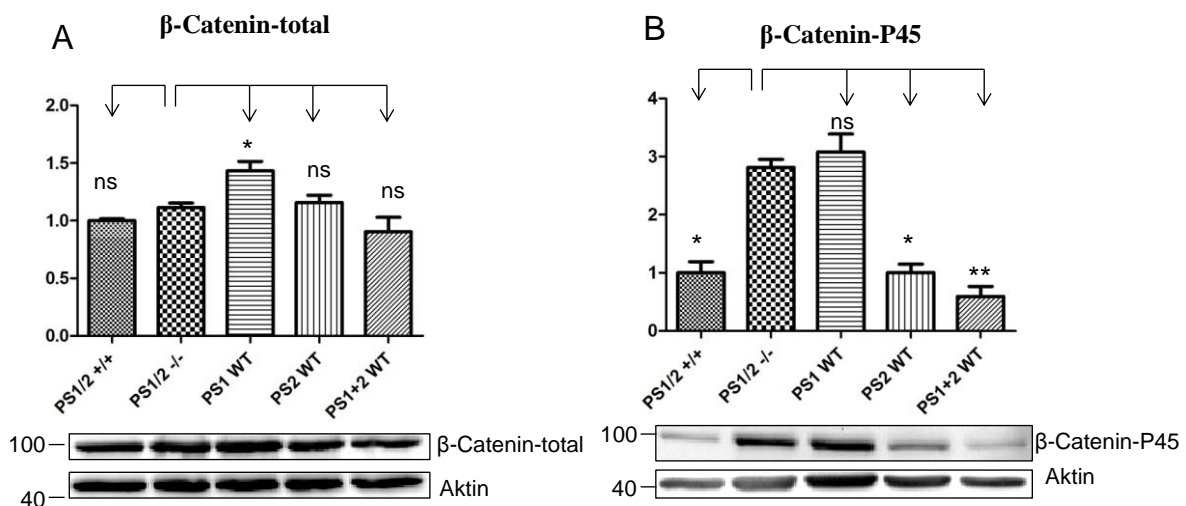
In Abb. 4.13D wurden nochmal die APP-Fragmente auch unter der Kotransfektion von PS1WT und PS2WT im WB dargestellt. Dabei konnten die Ergebnisse von vorher – vermutlich technisch bedingt – nicht signifikant reproduziert werden.

Eine Reduktion von PrP^C, p53, p21 und Mdm2 in Abwesenheit der Präseniline wurde beobachtet (s. Abb. 4.5, Abb. 4.8, Abb. 4.10 und Abb. 4.11), die allerdings unter der Transfektion mit den Präsenilinen nicht behoben werden konnte. Hingegen wurde die γ -Sekretase-Aktivität durch die Transfektion mit den Präsenilinen wiederhergestellt. Beides weist auf zwei unterschiedliche Zusammenhänge bzw. Mechanismen hin (mehr dazu in der Diskussion).

4.8 Analyse von β -Catenin

Oben wurde eine γ -Sekretase-abhängige Funktion von Präsenilin – die Prozessierung von APP – im Zellmodell (MEF) analysiert. Im Folgenden wird eine γ -Sekretase-unabhängige Funktion der Präsenilone untersucht, nämlich seine Interaktion mit β -Catenin. Dadurch soll ermittelt werden, welchem Weg bzw. ob überhaupt der beobachtete Einfluss von Präsenilin auf das Prionprotein einem der beiden Wege folgt.

β -Catenin ist ein Teil des E/N-Cadherin- und Wnt-Rezeptor-Komplexes, in den beiden Komplexen wird es durch Präsenilin beeinflusst. Durch eine γ -Sekretase-Spaltung von Cadherin wird β -Catenin intrazellulär freigesetzt, es beeinflusst dann die Transkription einiger Gene im Zellkern. Im Wnt-Rezeptor-Komplex erfüllt β -Catenin die Funktion eines Second-Messengers; wenn Wnt an den Rezeptor bindet, zerfällt der Rezeptor und β -Catenin wandert in den Zellkern und aktiviert die Transkription bestimmter Gene. In Abwesenheit von Wnt ist β -Catenin an dem Wnt-Rezeptor-Komplex bestehend aus ACP, Axin, GSK-3 und CKI gebunden. CKI phosphoryliert β -Catenin am Serinrest 45 (P-45); in einem zweiten Schritt wird β -Catenin durch GSK-3 an den Positionen 41, 37 und 33 (P-33/37/41) phosphoryliert. Desweiteren wird das phosphorylierte β -Catenin ubiquitiniert und proteosomal abgebaut. Präsenilin kann die β -Catenin Signalweiterleitung negativ regulieren, indem es den zweiten Schritt der β -Catenin-Phosphorylierung (P-33/37/41) ermöglicht (für mehr Details s. 1.2.5). Dieser Prozess findet unabhängig von der γ -Sekretase-Aktivität statt. In Abwesenheit von Präsenilin würde somit β -Catenin intrazellulär akkumulieren. Genauer betrachtet würde sich β -Catenin-P45 im Verhältnis zur totalen Menge vom intrazellulären β -Catenin erhöhen. In Abb. 4.14 sind die Ergebnisse der Detektion von den verschiedenen β -Catenin-Spezies im WB dargestellt.



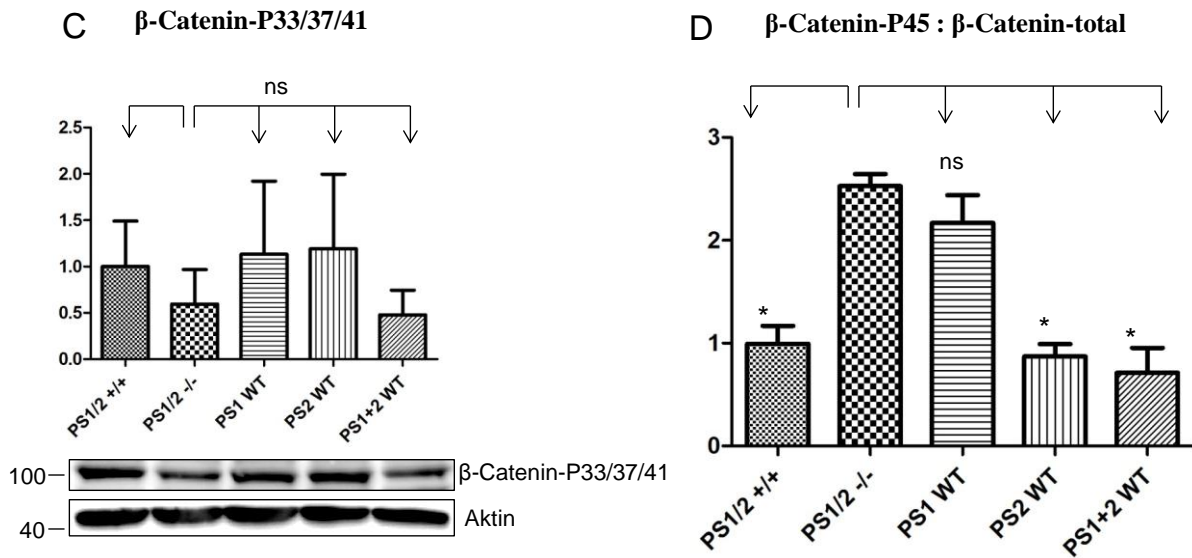


Abb. 4.14 Analyse von β -Catenin im Western Blot

β -Catenin-total (A), β -Catenin-P45 (B) und β -Catenin-P33/37/41 (C) wurden jeweils im WB gezeigt, dazu wurden Antikörper verwendet, die nur die jeweilige Spezies erkennt. Anschließend wurde das Verhältnis von β -Catenin-P45 zu β -Catenin-total rechnerisch ermittelt und graphisch dargestellt (D). (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (ns) nicht signifikant

Da mehrere Vorgänge zum gesamten intrazellulären Pool von β -Catenin beitragen, ist es unwahrscheinlich, eine Veränderung der Gesamtmenge von β -Catenin in Abhängigkeit von den Präsenilinen zu beobachten. Dies ist auch im WB (Abb. 4.14A) wiedergegeben. Eine gestörte PS-Funktion führt zu einer Abnahme von β -Catenin-P33/37/41 im Vergleich zum WT (PS1/2^{+/+}). Da aber das vierfach phosphorylierte β -Catenin im WT sofort proteosomal abgebaut wird, ist es auch unwahrscheinlich, einen Unterschied im β -Catenin-P33/37/41-Spiegel zwischen WT- und Knockout-Zellen festzustellen. Dies wird auch im WB wiedergegeben (Abb. 4.14C). Ein sensitiver Marker für die PS-Funktion in diesem Zusammenhang ist β -Catenin-P45. In der Tat akkumuliert β -Catenin-P45 in den Zellen, denen Präseniline fehlen (PS1/2^{-/-}) (Abb. 4.14B). Durch die Transfektion mit PS1WT kann β -Catenin-P45 nicht wieder abgebaut werden wie im WT, erst durch die Transfektion mit PS2WT (die Proben PS2WT und PS1+2WT) kann die Ausgangssituation (PS1/2^{+/+}) wiederhergestellt werden. Dadurch wird ein starker Beweis dafür geliefert, dass nicht PS1 sondern PS2 für die Phosphorylierung und damit für die Degradation von β -Catenin aus dem Wnt-Rezeptor-Komplex relevant ist. Bislang ging man davon aus, dass beide Präseniline durcheinander ersetzbar sind (s. Diskussion). Schließlich wurde β -Catenin-P45 auf die totale Menge an β -Catenin in der Zelle bezogen (Abb. 4.14D). Auch hier zeigt sich ein Verhalten wie das der absoluten β -Catenin-P45-Menge (Abb. 4.14B), was die Aussagekraft der Schlussfolgerung erhärtet, dass PS2, nicht aber PS1, für den Abbau von β -Catenin durch Ermöglichung der Phosphorylierung an den Positionen 33, 37 und 41 zuständig ist.

5 DSKUSSION

5.1 Morbus Alzheimer und Prion-Erkrankungen

Schätzungsweise lebten 2010 35,6 Millionen Menschen weltweit mit Demenz verschiedener Genese (World Alzheimer Report, 2009, s. a. Ferri *et al.* 2005). Mit ca. 60% ist Morbus Alzheimer (*Alzheimer Disease*, AD) die häufigste Demenzform und nimmt mit dem Alter zu (Brookmeyer *et al.* 2007). Makroskopisch und histopathologisch ist Morbus Alzheimer durch generalisierte Hirnatrophie, extrazelluläre Eiweißablagerungen „*A β -Plaques*“ und hauptsächlich intrazellulär vorkommende neurofibrilläre Bündel „*tangles*“ charakterisiert (Anderton 2002, Octave 2005, Sjoberg *et al.* 2005, Goedert and Spillantini 2006). Obwohl die Mehrzahl der AD-Fälle sporadisch auftreten, konnte eine genetische Komponente bei ca. 80% der Fälle nachgewiesen werden, wobei lediglich weniger als 1% durch definierte autosomal-dominante Mutationen bedingt sind (Gatz *et al.* 2006, van der Flier *et al.* 2011). Diverse Gene können davon betroffen sein, die am häufigsten und zugleich am besten untersuchten Mutationen befinden sich in den Genen APP, PSEN1 und PSEN2 (zur Übersicht s. Bertram *et al.* 2010, Ballard *et al.* 2011, Tanzi 2012).

Das APP-Gen kodiert für das gleichnamige Typ-I-Membranprotein APP (*Amyloid Precursor Protein*) (Selkoe 2001). APP scheint u. a. eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems, Synapsenbildung, Zell-Zell-Interaktionen und im Zellwachstum zu spielen (Herms *et al.* 2004, Wang and Ha 2004, Priller *et al.* 2006). Die Prozessierung von APP ist ein zentraler Prozess in der AD-Pathogenese (vgl. Abb. 1.4). Unter physiologischen Bedingungen wird APP zunächst durch eine α -Sekretase mitten im A β -Peptid gespalten und anschließend wird das C-terminale Fragment (C83, α CTF) durch den Enzymkomplex γ -Sekretase in zwei Fragmente (p3 und AICD) weitergespalten. Selten unter physiologischen und verstärkt unter pathologischen Bedingungen wird APP unter der Bildung von A β -Peptid prozessiert. Dabei spaltet eine β -Sekretase APP proteolytisch am N-Terminus des A β -Peptids, was in ein lösliches (sAPP β) und ein intrazelluläres Fragment (C99, β CTF) ergibt. Folglich spaltet γ -Sekretase das β CTF (C99) innerhalb der Transmembrandomäne am C-Terminus des A β -Peptids, wodurch das ca. 4 kDa große A β -Peptid freigesetzt wird. Auch hier entsteht eine intrazelluläre Domäne (AICD). Die erhöhte A β -Produktion und die Erhöhung des A β 42/A β 40-Verhältnisses werden u.a. für den Neuronenverlust bei AD verantwortlich gemacht (zur Übersicht s. Selkoe 2001, Pietrzik and Behl 2005, Dillen and Annaert 2006, Bertram 2008).

γ -Sekretase, der Enzymkomplex, der den zweiten Spaltungsschritt sowohl beim „non-amyloidogenen“ als auch beim „amyloidogenen“ Weg vollendet, setzt sich aus mindestens vier Proteinen zusammen: Präsenilin-1 oder 2 (PS1, PS2), Nicastrin (Nct), *anterior pharynx defective-1* (Aph-1) und *presenilin enhancer 2* (PEN-2) (vgl. Abb. 1.7) (De Strooper and Annaert 2010). Präsenilin-1 (bzw. 2) bildet das katalytische Zentrum von γ -Sektetase, mit 185 in PSEN1 und 30 in PSEN2 sind die meisten AD-verursachenden Mutationen auf den PS-Genen lokalisiert (<http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations/> ; Stand 12.2013). Außerdem besitzen die Präseniline weitere Funktionen außerhalb des γ -Sekretase-Komplexes, wie Zelladhäsion durch Cadherin-Komplexe, die Degradation von β -Catenin, die Beteiligung am Proteintransport, Reifung der ATPase-Protonenpumpe und Kalzium-Homöostase. Diese sind allerdings nicht unumstritten. (Baki *et al.* 2001, Killick *et al.* 2001, Kang *et al.* 2002, Esselens *et al.* 2004, Wilson *et al.* 2004, Ferber *et al.* 2008, De Strooper and Annaert 2010, Lee *et al.* 2010, Supnet and Bezprozvanny 2010, Dobrowolski *et al.* 2012).

Im Vergleich zum Morbus Alzheimer sind Prion-Erkrankungen viel seltener, dennoch sind sie durch einen äußerst progressiven und tödlich endenden Verlauf gekennzeichnet. Aufgrund ihrer Übertragbarkeit (Transmissibilität) und ihrer typischen Pathologie – schwammartige (spongiforme) Hirndegeneration – werden sie als „*transmissible spongiforme encephalopathies*“ (TSE) bezeichnet. Sie können sowohl Menschen (wie. z. B. Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, CJD) als auch Tiere (wie z. B. *bovine spongiforme encephalopathy*, BSE, „Rinderwahnsinn“) betreffen. Prion-Erkrankungen stellen eine besondere Gruppe dar; sie zählen einerseits zu den neurodegenerativen Erkrankungen und andererseits können sie durch eine Infektion hervorgerufen werden. Sie unterscheiden sich allerdings von anderen Infektionskrankheiten dadurch, dass sie nicht durch Erbmaterial-beladene (DNA oder RNA) Mikroorganismen verursacht werden. Prionen „*proteinaceous infectious particle*“ sind falschgefaltete Proteine, die sich in einem selbst-katalysierten Falschfaltungsprozess ausbreiten und eine Infektion induzieren können.

Das humane, zelluläre Prion-Protein (PrP^C) wird auf dem Chromosom 20 kodiert und besteht aus 208 Aminosäuren. PrP^C befindet sich extrazellulär und ist in der Zellmembran durch eine Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Einheit verankert. Strukturell kann das PrP^C in zwei Hälften eingeteilt werden; eine flexible, unstrukturierte N-terminale Hälfte und eine globuläre C-terminale Hälfte, die in den GPI-Anker übergeht (Wuthrich and Riek 2001, Aguzzi *et al.* 2008). Laut der „Prion-Hypothese“ ist der TSE-Erreger eine pathogene, falschgefaltete Form eines spezifischen Wirtproteins, das zelluläre Prionprotein (PrP^C). Das falschgefaltete Protein

(später PrP^{Sc} bezeichnet, von *Scrapie*) ist in der Lage, andere normale Moleküle (PrP^C) zu binden und ihre Konformationsänderung in einem autokatalytischen Prozess zu induzieren (Prusiner 1982, 1991) (vgl. Abb. 1.13).

Zwischen Morbus Alzheimer und den Prion-Erkrankungen beobachtete man gewisse Ähnlichkeiten, so gehören beide zur Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen, deren Pathogenese die Missfaltung und Akkumulation von bestimmten Proteinen beinhaltet und die in Neuronenverlust enden (DeArmond 1993, Wisniewski and Sigurdsson 2007). Diese Ähnlichkeiten und Parallelitäten, die sich auch auf histopathologischer und zellulärer Ebene nachweisen lassen, wurden ebenfalls in zahlreichen Studien auf molekularer Ebene bestätigt (Barnham *et al.* 2006, Taylor and Hooper 2007). Dies ermutigte sogar zur Suche nach einer vereinheitlichenden Theorie für die neurodegenerativen Erkrankungen (Price *et al.* 1993, Bucciantini *et al.* 2002) und gemeinsamen Therapiemöglichkeiten (Wisniewski and Sigurdsson 2007). Zusammengefasst lassen sich folgende Zusammenhänge beschreiben:

Erstens: Zwei Proteine im Zentrum der Alzheimer-Krankheit und von Prion-Erkrankungen, nämlich APP und PrP^C, unterliegen einem gemeinsamen Protein-Kinase-C-regulierten Spaltungsprozess mitten im toxischen Bereich, A β und der hydrophobische Kern (HC 106 – 126) in der Reihenfolge, was letztendlich die Bildung beider Peptide verhindert, die eine zentrale Rolle in der Pathogenese beider Erkrankungen spielen. Für diesen Prozess wurden Proteasen der ADAM-Familie („*a disintegrin and metalloproteinase*“), nämlich ADAM10 und ADAM17, verantwortlich gemacht (Checler and Vincent 2002, Vincent 2004, Jorissen *et al.* 2010, Kuhn *et al.* 2010), obwohl neuere Experimente zeigen, dass ADAM10 zwar für die Freisetzung von PrP (Shedding) (Abb. 1.12), nicht jedoch für das „ α -Cleavage“ verantwortlich ist (Altmeyen *et al.* 2011, Altmeyen *et al.* 2012). Außerdem ist ADAM10 die Haupt- α -Sekretase von APP (Jorissen *et al.* 2010, Kuhn *et al.* 2010).

Zweitens: PrP^C fungiert als Inhibitor bzw. Modulator für die β -Sekretase BACE1 – das Enzym, das die Bildung von A β aus APP initiiert – durch direkte Interaktion in den Cholesterin-reichen Membrandomänen „*lipid rafts*“ (Parkin *et al.* 2007). Neuere Experimente zeigen jedoch, dass PrP^C mit BACE1 im frühen Kompartiment des sekretorischen Pathways (ER und Golgi-Apparat) interagiert und seine Wanderung zur Plasmamembran und zu Endosomen, wo BACE1 APP hauptsächlich prozessiert, verhindert (Griffiths *et al.* 2011). Durch diesen Mechanismus kann PrP^C die A β -Produktion hemmen und die AD-Pathogenese negativ beeinflussen. Daraus lässt sich schließen, dass der Funktionsverlust von PrP^C, z.B. durch Mutation oder gar Knocking-Out, einen Anstieg der A β -Produktion zur Folge hat. In

der Tat lässt sich ein signifikanter Anstieg der A β -Menge in Gehirnen von PrP^{0/0}-Mäusen und Zellen, die mutiertes PrP exprimieren, nachweisen (Parkin *et al.* 2007). Außerdem lässt sich das mit weiteren Studien vereinbaren, die zeigen, dass ein Polymorphismus im PrP-Gen Codon 129, welches die Suszeptibilität zu sporadischen und iatrogenen humanen Prion-Erkrankungen erhöht (Palmer *et al.* 1991, Deslys *et al.* 1994, Lewis *et al.* 2006), auch die Suszeptibilität und Pathophysiologie von Morbus Alzheimer begünstigt (Dermaut *et al.* 2003, Riemenschneider *et al.* 2004, Del Bo *et al.* 2006, Gacia *et al.* 2006).

Drittens: Zahlreiche Studien berichteten, dass PrP^C als Rezeptor für A β -Oligomere an der Zelloberfläche dient (Lauren *et al.* 2009). Dieses Bindeglied zwischen beiden Krankheitsgruppen ist allerdings nicht unumstritten (Caella *et al.* 2010). Während einige Autoren davon ausgehen, dass die A β -Neurotoxizität unabhängig von seiner Bindung zu PrP^C ist (Balducci *et al.* 2010, Kessels *et al.* 2010), gibt es zahlreiche Beweise dafür, dass PrP^C doch die Toxizität von A β vermittelt (Lauren *et al.* 2009, Chung *et al.* 2010, Gimbel *et al.* 2010, Alier *et al.* 2011, Barry *et al.* 2011, Bate and Williams 2011, Freir *et al.* 2011, Resenberger *et al.* 2011, Kudo *et al.* 2012, You *et al.* 2012). Laut Resenberger *et al.* ist PrP^C sogar in der Lage, β -Faltblatt-reiche Strukturen unterschiedlichen Ursprungs, wie A β , heterologes PrP, Hefe-Prionprotein und synthetische β -Peptide zu binden (Resenberger *et al.* 2011). Der genaue Mechanismus der Toxizität bis hin zum Zelltod ist noch ungeklärt, v. a. weil PrP^C durch einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden ist und somit theoretisch kein Signal in den intrazellulären Raum leiten kann. Einige Studien beschreiben die PrP^C-Dimerisierung, die cPLA2- (*cytoplasmatic phospholipase A2*), Fyn-Aktivierung und Kaspase-Aktivierung und die Beteiligung von NMDA-Rezeptoren als möglicher Mechanismus (Mouillet-Richard *et al.* 2000, Solforosi *et al.* 2004, Bate and Williams 2011, Kudo *et al.* 2012, Larson *et al.* 2012, Um *et al.* 2012). Neben dem toxischen Effekt wird die Lokalisation von PrP durch seine Bindung zu A β -Oligomeren beeinflusst; laut Caetano *et al.* erhöhen A β -Oligomere die PrP-Menge an der Zelloberfläche durch möglicherweise verschiedene Mechanismen, darunter die Hemmung der Endozytose (Caetano *et al.* 2011). Die Frage, ob die neuroprotektive und neurotoxische Funktion von PrP^C im AD-Verlauf zur gleichen Zeit existieren und wenn, was der Nettoeffekt ist, ist immer noch unbeantwortet.

Viertens: Schließlich wurde berichtet, dass Preseniline die Expression von PrP^C beeinflussen (Vincent *et al.* 2009). Demnach resultiert die γ -Sekretase vermittelte, Präsenilin-abhängige Prozessierung von APP in der Freisetzung der intrazellulären Domäne (AICD), die einen Komplex mit dem Adapterprotein Fe65 und der Histon-Acetyltransferase Tip60 bildet. Dieser

Komplex wandert in den Zellkern und aktiviert einige Gene, darunter das Gen des Tumorsuppressors p53. Hier sei erwähnt, dass p53 bei AD erhöht ist und als Mediator der Apoptose und somit der Neurodegeneration bei den AD-Betroffenen vorgeschlagen wurde (de la Monte *et al.* 1997, Kitamura *et al.* 1997, Ohyagi *et al.* 2005). Nach Vincent *et al.* kann p53 direkt an den Promotor von PrP^C binden und seine Expression induzieren (Kellett and Hooper 2009, Vincent *et al.* 2009). Eine andere Studie hat jedoch keinen signifikanten Effekt auf die PrP^C-Expression durch die Überexpression bzw. Knocking-down von APP-Isoformen in Zellmodellen bzw. in transgenen Mäusen oder Inhibition von γ -Sekretase feststellen können (Lewis *et al.* 2012). Bestätigend für die letzte Studie wurde zudem beobachtet, dass das PrP^C-Level bei AD-Patienten in verschiedenen Krankheitsstadien in verschiedenen Hirnregionen (frontal, temporal, Hippocampus) unverändert bleibt (Saijo *et al.* 2011).

5.2 Präseniline und die Expression des Prionproteins

Ausgehend von den Studien, die einen Einfluss von Präsenilin auf die Expression des Prionproteins bestätigen (Vincent *et al.* 2009) bzw. widerlegen (Saijo *et al.* 2011, Lewis *et al.* 2012) und aus eigener Beobachtung im Labor, durch die sich eine veränderte Expression von PrP^C in verschiedenen Hirnregionen bei AD-Patienten detektieren ließ, wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Präsenilin bzw. Präsenilin-Mutationen auf das Prionprotein hinsichtlich seiner Expression, Verteilung und seines Abbaus untersucht.

Im ersten Teil der hier vorgelegten Arbeit wurden die benötigten Materialien und angewandten Methoden etabliert (s. 4.1 – 4.4), im zweiten Teil wurde das Prionprotein auf verschiedenen Ebenen analysiert (s. 4.5) und im dritten Teil wurden Mechanismen untersucht, die zum einen die Integrität des Zellmodells nachweisen und zum anderen den Einfluss der Präseniline auf das PrP^C vermitteln können (s. 4.6 – 4.8).

In den ersten Experimenten konnte eine Abnahme der PrP^C-Menge in der *Western Blot Analyse* durch das Fehlen beider Präseniline (PS1/2^{-/-}) nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.5). Dies wurde durch eine *RT-PCR*-Bestimmung der Expressionsrate von PrP^C bestätigt (vgl. Abb. 4.8). Dadurch wurde außerdem der Nachweis dafür geliefert, dass die Präseniline das PrP^C auf der Expressionsebene regulieren. Dies stimmt prinzipiell mit der Beobachtung von Vincent *et al.*, 2009 überein. Durch die Transfektion der knockout-Zellen mit PS1 und PS2 separat und anschließend zusammen, konnte diese Abnahme nicht behoben werden. Als mögliche Ursache wurde vermutet, dass entweder die Transfektion ineffizient war oder die Integrität des Zellmodells insgesamt gestört ist. Ersteres wurde kontrolliert (s. Abb. 4.4),

dabei waren die Zellen in der Lage, die transfizierten Präseniline einwandfrei zu synthetisieren. Das Zweite veranlasste zur Durchführung weiterer Experimente (s. 5.3 und 5.4).

Trotz der Bestätigung, dass Präseniline das Prionprotein auf der Expressionsebene regulieren, ist immer noch denkbar, dass der PrP^C-Abbau davon betroffen sein könnte. Darum wurde das „gesheddete“ Prionprotein ermittelt. Das sind PrP^C-Moleküle, die durch das „Shedding“ aus der Zellmembran extrazellulär freigesetzt wird. Hierzu wurde der Zellkulturüberstand aufgenommen, immunopräzipitiert und das „shed-PrP^C“ im WB dargestellt. Dabei konnte keine Veränderung des PrP^C-Abbaus festgestellt werden (s. Abb. 6.4), vielmehr spiegelte die „gesheddete“ PrP^C-Menge die im WB exprimierte PrP^C-Spiegel wider. Im Zuge dieser Untersuchung wurde die Protease ADAM10 im WB analysiert. ADAM10 zählt zu den α -Sekretasen und wurde für das Shedding von PrP^C verantwortlich gemacht (Altmeppen et al., 2011; Altmeppen et al., 2012). ADAM10 selbst unterliegt einem Spaltungsprozess, an dem – interessanterweise – γ -Sekretase beteiligt ist (Tousseyn *et al.* 2009). Demnach wäre es denkbar, dass γ -Sekretase den PrP^C-Abbau über ADAM10 reguliert. In der WB-Analyse von ADAM10 konnte der von Tousseyn et al. beschriebenen Sachverhalt nicht reproduziert werden (vgl. Abb. 4.7). Aus zwei Gründen ist eine Regulierung des PrP^C-Abbaus durch γ -Sekretase dennoch unwahrscheinlich: erstens, auch wenn man davon ausgeht, dass ADAM10 im CTF durch γ -Sekretase gespalten wird, ist das noch kein Beweis dafür, denn entscheidend für den Abbau von ADAM10 ist vielmehr der initiale Spaltungsschritt extrazellulär durch eine andere α -Sekretase und zweitens würde eine fehlende γ -Sekretase-Aktivität zur Akkumulation des Prionproteins führen, tatsächlich wurde das Gegenteil festgestellt; der PrP^C-Spiegel ist in PS-knockout-Zellen – wo γ -Sekretase-Aktivität fehlt – niedriger als im WT (s. Abb. 4.5).

Ein weiterer Mechanismus wurde von Caetano et al. beschrieben. Demzufolge können A β -Oligomere die Lokalisation des Prionproteins an der Zelloberfläche erhöhen (Caetano *et al.* 2011). In einer Immunofluoreszenzfärbung konnte dies – eingeschränkt beurteilbar – nicht reproduziert werden (s. Abb. 4.9), denn wenigstens in den Proben mit hoher A β -Produktion (z. B. PS1E280A) sollte eine Akkumulation des Prionproteins an der Zelloberfläche nachzuweisen sein. Da die Erhöhung der PrP^C-Lokalisation auf der Zelloberfläche, laut Caetano et al., durch Hemmung der Endozytose erklärbar wäre, würde sie sich auf die PrP^C-Gesamtmenge in der Zelle auswirken, was aber im WB nicht zu beobachten ist (s. Abb. 4.5). Daraus ist zu schließen, dass entweder A β -Oligomere nicht zu Akkumulation des Prionproteins in der Zellmembran führen, zumindest nicht zu einer messbaren Verschiebung

der absoluten Gesamtmenge von PrP^C in der Zelle, oder dass die A β -Pathologie im verwendeten Zellmodell (MEFs) nicht so stark ausgeprägt ist.

Somit fehlen die befriedigenden Beweise dafür, dass der PrP^C-Abbau durch Präseniline, ob als Bestandteil der γ -Sekretase oder unabhängig davon, reguliert ist, während zunehmende Nachweise eine Regulation auf der Expressionsebene bestätigen.

Zudem wurde berichtet, dass die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) die Transkription vom Tumorsuppressor p53 induziert, der wiederum die Transkription des Prionproteins steigert (Vincent *et al.* 2009). Darum wurde der Tumorsuppressor p53 als ein potenzieller Vermittler zwischen Präsenilin und der Expression von PrP^C sowohl im WB als auch in der RT-PCR untersucht (vgl. Abb. 4.10). In der *Western Blot Analyse* ist zwar keine signifikante Änderung der p53-Spiegel unter den verschiedenen Proben festzustellen, jedoch erkennt man einen Trend, dass PS1/2^{-/-} weniger p53 exprimieren als der WT (s. Abb. 4.10B), dieser Trend bleibt in den weiteren Proben annähernd gleich. In der *RT-PCR* ist dieser Trend signifikant zu sehen. Dies ähnelt der Expression von PrP^C im WB und in der *RT-PCR*. Weiterhin wurde die p53-Aktivität durch die Messung von p21 und Mdm2 ermittelt (s. Abb. 4.11). Beide Proteine unterliegen dem p53-Einfluss und repräsentieren daher seinen Aktivitätsgrad. Auch in diesem Ansatz lässt sich eine Abnahme der p21/Mdm2-Expression in den PS1/2^{-/-}-Zellen im Vergleich zum WT nachweisen. Allein durch die Transfektion mit PS1 bzw. PS2 wird kein Wiederanstieg der p21/Mdm2-Expression erreicht. Das entspricht dem beobachteten Effekt beim PrP^C und p53, im Gegensatz zu den beiden Ansätzen wird aber eine normale p21/Mdm2-Expression unter der Transfektion mit den beiden Präsenilinen wiederhergestellt (vgl. Abb. 4.11).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Präseniline die Expression von PrP^C und p53 gleichermaßen beeinflussen, was auf einen Zusammenhang zwischen diesen drei Elementen hinweist. Die Präseniline sind für eine normale Expression von PrP^C und p53 relevant, sodass deren Fehlen eine Abnahme der PrP^C- und p53-Expression hinter sich zieht. Die Anwesenheit eines der beiden Präseniline allein reicht nicht aus, diesen Effekt rückgängig zu machen. Aber auch die Kotransfektion beider Präseniline kann, bis auf die p53-Aktivität, die Ausgangssituation (PS1/2^{+/+}) nicht wiederherstellen. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass eventuell die Integrität des Zellmodells (MEFs) durch das Knocking-Out der Präseniline zerstört ist, sodass die Transfektion – wenn auch effizient – einige verlorene Prozesse nicht wiederherstellen kann, oder, dass ein Mechanismus vorliegt, der Präseniline, PrP^C und p53 verbindet und der dennoch trotz erhaltener Zellintegrität aus anderen Gründen

nicht wiederherstellbar – oder nur teilweise – ist. Die Integrität des Zellmodells wurde im weiteren Verlauf überprüft.

5.3 Präseniline und die γ -Sekretase

Weiterhin wurde die APP-Prozessierung als ein Marker für die γ -Sekretase-Aktivität untersucht (s. Abb. 4.13). Dadurch wurde einerseits die Integrität des Zellmodells überprüft und andererseits ein potenzieller Mechanismus, wie Präseniline die Expression von PrP^C beeinflussen, untersucht. Denn die intrazelluläre Domäne, die während der APP-Spaltung durch γ -Sekretase entsteht (AICD), wurde als Vermittler zwischen Präsenilin – als γ -Sekretase aktives Zentrum – und der Expression des Prionproteins vorgeschlagen (Vincent *et al.* 2009).

Auch durch APP-Überexpression konnte AICD nicht detektiert werden. Dies mag an der geringen AICD-Produktion in diesem Zellmodell oder der kurzen Expositionszeiten der Blot-Membranen liegen. Von Kooperationspartnern, die auch dasselbe Zellmodell (MEFs) verwendeten, wurde diese Schwierigkeit ebenfalls berichtet. Als indirekter Marker für die AICD-Produktion wurde stattdessen die Spaltung vom APP-CTF (C99/C83) quantifiziert (Abb. 4.13C), denn eine hohe AICD-Produktion zeigt sich durch eine geringe Menge an APP-CTF und umgekehrt führt eine schwache γ -Sekretase-Aktivität zu einer Akkumulation von APP-CTF. Tatsächlich enthalten PS1/2^{-/-}-Zellen, wo die γ -Sekretase-Aktivität fehlt, deutlich mehr APP-CTF als PS1WT-Zellen, wo die γ -Sekretase-Funktion wiederhergestellt ist. Die γ -Sekretase-Aktivität ist über die weiteren Proben (E280A, Δ 9, PS2WT, N141I) erhalten und sogar bei der Mutation E280A erhöht, was den *gain-of-function*-Effekt dieser Mutation widerspiegelt. Durch das starke Schwanken der Bandenintensität von PS1/2^{+/+} - erkennbar am Standardfehler – ist der Unterschied zu PS1/2^{-/-} nicht signifikant, dennoch erkennt man eine Tendenz, die mit dem Rest vereinbar ist, nämlich eine höhere γ -Sekretase-Aktivität in PS1/2^{+/+} als in PS1/2^{-/-}. Die Beobachtung, dass die γ -Sekretase-Aktivität durch Knocking-Out von PS1 und PS2 aufgehoben und durch die Transfektion wiederhergestellt wird – bezogen auf die Prozessierung von APP –, wurde auch von Kooperationspartnern bestätigt, die auch dasselbe Zellmodell (MEFs) verwendeten (Nyabi *et al.* 2003, Hebert *et al.* 2006).

Dieses Experiment – unterstützt von den Berichten unserer Kooperationspartner – liefert den starken Beweis dafür, dass die Zellintegrität erhalten ist und dass die γ -Sekretase-Aktivität durch die Transfektion sowohl mit einem der Präseniline als auch mit beiden Präsenilinen wiederhergestellt werden kann. Da dies aber auf die Expression des Prionproteins bzw. die

von p53 nicht übertragbar ist, ist davon auszugehen, dass die Präseniline diese – PrP^C- und p53-Expression – unabhängig von der γ -Sekretase-Aktivität beeinflussen. Das widerlegt die These, dass die γ -Sekretase-abhängige Produktion von AICD die Expression von p53 und dadurch die von PrP^C induziert.

5.4 Präseniline außerhalb des γ -Sekretase-Komplexes

Da der Einfluss der Präseniline auf die Expression des Prionproteins unabhängig von der γ -Sekretase zu sein scheint, kann dieser Einfluss einer PS-Funktion außerhalb des γ -Sekretase-Komplexes zugeschrieben werden. Wie eingangs erwähnt, wurden den Präsenilinen einige Funktionen zugeordnet, für die der γ -Sekretase-Komplex nicht notwendig ist, beispielsweise die Zelladhäsion durch Cadherin-Komplexe, die Degradation von β -Catenin, die Beteiligung am Proteintransport, die Reifung der ATPase-Protonenpumpe und die Kalzium-Homöostase. Um zu überprüfen, inwiefern die γ -Sekretase-unabhängigen PS-Funktionen im Zellmodell betroffen sind, wurde dafür ein repräsentatives Beispiel analysiert, nämlich die Phosphorylierung von β -Catenin im Rahmen seiner Degradation (vgl. Abb. 4.14). Als ein sensitiver Marker für die PS-Aktivität in der β -Catenin-Phosphorylierung wurde das β -Catenin-P45 gemessen. In der Tat akkumuliert β -Catenin-P45 in den Zellen, denen Präseniline fehlen (PS1/2^{-/-}) (Abb. 4.14B). Durch die Transfektion mit PS1WT kann β -Catenin-P45 nicht wieder abgebaut werden wie im WT, erst durch die Transfektion mit PS2WT (die Proben PS2WT und PS1+2WT) kann die Ausgangssituation (PS1/2^{+/+}) wiederhergestellt werden.

Somit wird erstens ein zweiter Nachweis dafür geliefert, dass die Integrität des Zellmodells erhalten ist und zweitens, dass der Einfluss der Präseniline auf die PrP^C-Expression diesem Beispiel der γ -Sekretase-unabhängigen PS-Funktion nicht folgt. Weiterhin wurde die Kalzium-Homöostase als eine γ -Sekretase-unabhängige PS-Funktion im selben Zellmodell in weiteren Arbeiten analysiert (Tu *et al.* 2006). Dabei war die durch das Fehlen der Präseniline verursachte Ca²⁺-Homöostase-Störung durch die Transfektion mit PS1 bzw. PS2 zu beheben. Dies steht in Übereinstimmung mit unserer Beobachtung.

5.5 Präseniline und die Degradation von β -Catenin

Präseniline ermöglichen die Weiterphosphorylierung von β -Catenin-P54 an den Positionen 33, 37 und 41 durch die GSK-3 am Wnt-Rezeptor-Komplex. Das vierfach phosphorylierte β -Catenin wird im Anschluss daran abgebaut (Killick *et al.* 2001, Soriano *et al.* 2001, Xia *et al.* 2001, Kang *et al.* 2002, Prager *et al.* 2007, Dobrowolski *et al.* 2012). Der genaue

Mechanismus ist allerdings weitgehend unklar. Während in den früheren Arbeiten keine Differenzierung zwischen Präsenilin-1 und 2 gemacht wurde, demonstriert die vorliegende Arbeit, dass ausschließlich Präsenilin-2 den β -Catenin-Metabolismus reguliert (vgl. Abb. 4.14). Denn allein durch die Transfektion mit Präsenilin-1 konnte kein β -Catenin-Abbau wie im WT erreicht werden. Das betont die Beobachtung, die in weiteren Studien berichtet wurde und die besagt, dass ein erheblicher funktioneller Unterschied zwischen PS1 und P2 besteht. Während z. B. PS1 ubiquitär exprimiert wird, kommt PS2 hauptsächlich im peripheren Gewebe und nur in geringen Mengen im Gehirn vor (Tandon and Fraser 2002). Neuere Studien zeigen, dass die Mehrzahl von γ -Sekretase sowohl im Gehirn, in der Milz als auch im Thymus PS1 beinhalten (Borgegard *et al.* 2012). Außerdem wird die A β -Produktion im ZNS überwiegend von PS1 katalysiert (De Strooper *et al.* 1998, Borgegard *et al.* 2012). Anscheinend spielt PS1 die wichtigere Rolle und sein Verlust kann nur in geringem Maß durch PS2 kompensiert werden (Brunkan and Goate 2005, Borgegard *et al.* 2012), wohingegen für den β -Catenin-Metabolismus PS2 die dominante Rolle spielt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

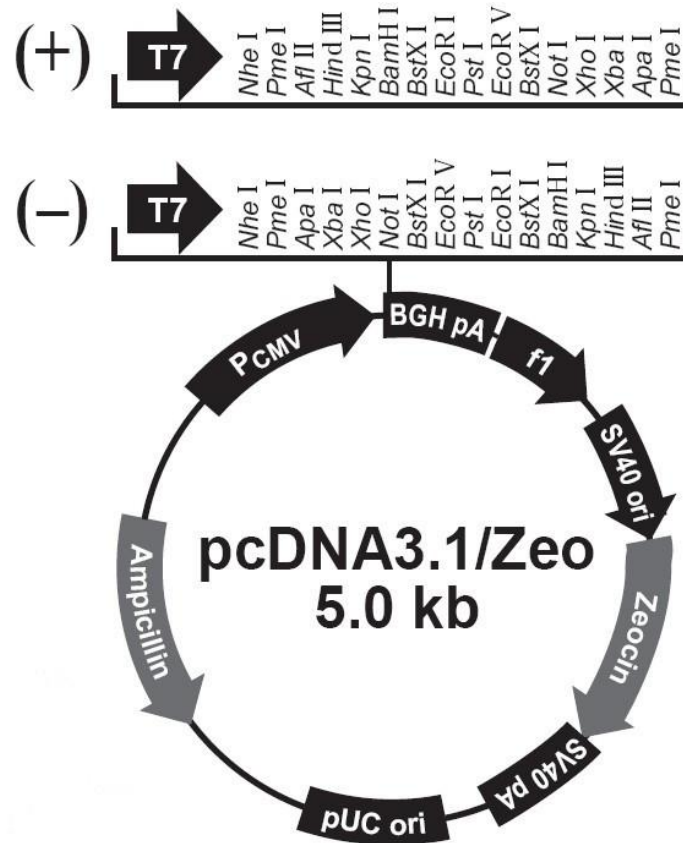
Die Neurodegeneration ist der gemeinsame Nenner verschiedener Krankheiten unterschiedlicher Genese. Zahlreiche Studien untersuchen potentielle Zusammenhänge zwischen den neurodegenerativen Erkrankungen mit der Hoffnung einen gemeinsamen Pathomechanismus feststellen und eine grundlegende Therapie entwickeln zu können. Im Zuge der Untersuchung solcher Zusammenhänge zwischen Morbus Alzheimer und den Prion-Erkrankungen liefert die vorliegende Arbeit den Beweis dafür, dass das Prionprotein durch die Präseniline – zwei Proteine im Zentrum der Alzheimer-Krankheit – auf der Expressionsebene beeinflusst wird. Für die Expression des Prionproteins scheinen die Präseniline eine wichtige Rolle zu spielen, sodass PS1/2^{-/-}-Zellen weniger PrP^C exprimieren als der WT. Durch die Transfektion mit PS1, PS2 bzw. beiden kann dieser Effekt nicht behoben werden. Hingegen sind die APP-Spaltung – als γ -Sekretase-abhängige PS-Funktion – und die Phosphorylierung von β -Catenin – als eine γ -Sekretase-unabhängige PS-Funktion – im verwendeten Zellmodell intakt. Das führt zur Annahme, dass die Präseniline die PrP^C-Expression durch einen dritten Mechanismus regulieren, der weitgehend unabhängig von der γ -Sekretase-Aktivität ist. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass AICD als ein schwacher Transkriptionsstimulator beschrieben wurde (Hebert *et al.* 2006).

In Übereinstimmung mit der PrP^C-Veränderung weisen PS1/2^{-/-}-Zellen einen niedrigen p53-, p21- und Mdm2-Spiegel im Vergleich zum WT auf, dieser Spiegel bleibt auch durch die Transfektion mit PS1 bzw. PS2 unverändert. Das deutet darauf hin, dass sämtliche Proteine gleichermaßen durch die Präseniline in ihrer Expression beeinflusst werden oder dass sie im selben Mechanismus verwickelt sind. Zusätzlich zum Vergleich der beiden Ansätze (PS1/2^{+/+} und PS1/2^{-/-}) wurden exemplarische PS-Mutationen untersucht. Die untersuchten PS-Mutationen (PS1E280A, PS1 Δ 9 und PS2N141I) zeigen bezogen auf die PrP^C- und p53-Expression keinen Unterschied zu den PS1/2^{-/-}-Zellen. Hingegen zeigen sie eine intakte γ -Sekretase-Aktivität in der APP-Analyse. Weiterhin wurde dargestellt, dass für die Phosphorylierung und damit für die Degradation von β -Catenin Präsenilin-2, nicht jedoch Präsenilin-1, die wichtige Rolle spielt.

Zusammenfassend zeigt die vorgelegte Arbeit, dass die Präseniline das Prionprotein auf der Expressionsebene unabhängig von der γ -Sekretase-Aktivität und von β -Catenin regulieren. Diese Regulation erfolgt anscheinend durch einen anderen der von den Präsenilinen regulierten Prozesse, der den Tumorsuppressor p53 einbezieht.

7 ANHANG

7.1 Der Expressionsvektor (pcDNA3.1⁺/Zeo)



Comments for pcDNA3.1/Zeo (+) 5015 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863

T7 promoter priming site: bases 863-882

Multiple cloning site: bases 895-1010

BGH reverse priming site: bases 1022-1039

BGH polyadenylation signal: bases 1021-1235

f1 origin: bases 1298-1711

SV40 promoter and origin: bases 1776-2101

EM7 promoter: bases 2117-2183

ZeocinTM resistance gene: bases 2184-2558

SV40 polyadenylation: bases 2688-2817

pUC origin: bases 3201-3874 (C)

bla promoter: bases 4880-4978 (C)

Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 4019-4879 (C)

7.2 Die Sequenzierung von PS1WT/ PS1E280A/ PS1Δ9

PS1WT-Sequenz nach der Datenbank CCDS:

Nucleotide Sequence (1404 nt):

```

ATGACAGAGTTACCTGCACCGTTGTCCTACTTCCAGAATGCACAGATGTCTGAGGACAACCACCTGAGCAATACT
GTACGTAGCCAGAATGACAATAGAGAACGGCAGGAGCACAACGACAGACGGAGCCTTGCCACCCCTGAGCCATTA
TCTAATGGACGACCCCAGGGTAACTCCCGGCAGGTGGTGGAGCAAGATGAGGAAGAAGATGAGGAGCTGACATTG
AAATATGGCGCCAAGCATGTGATCATGCTCTTTGTCCCTGTGACTCTCTGCATGGTGGTGGTTCGTGGCTACCATT
AAGTCAGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATACCCCATTCACAGAAGATACCGAGACTGTG
GGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATTCTGAATGCTGCCATCATGATCAGTGTCAATTGTTGTCATGACTATCCTCCTG
GTGGTCTGTATAAATACAGGTGCTATAAGGTCATCCATGCCTGGCTTATTATATCATCTCTATTGTTGCTGTTT
TTTTTTTCATTCATTTACTTGGGGGAAGTGTAAAACCTATAACGTTGCTGTGGACTACATTACTGTTGCACTC
CTGATCTGGAATTTGGTGTGGTGGGAATGATTTCCATTCCTGAAAGGTCCACTTCGACTCCAGCAGGCATAT
CTCATTATGATTAGTGCCTCATGGCCCTGGTGTATCAAGTACCTCCCTGAATGGACTGCGTGGCTCATCTTG
GCTGTGATTTTCAGTATATGATTTAGTGGCTGTTTTGTGTCCGAAAGGTCCACTTCGTATGCTGGTTGAAACAGCT
CAGGAGAGAAATGAAACGCTTTTTCCAGCTCTCATTTACTCCTCAACAATGGTGTGGTTGGTGAATATGGCAGAA
GGAGACCCGGAAGCTCAAAGGAGAGTATCCAAAAATCCAAGTATAATGCAGAAAGCACAGAAAGGGAGTCACAA
GACACTGTTGCAGAGAATGATGATGGCGGGTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCCAGAGGGACAGTCATCTAGGGCCT
CATCGCTCTACACCTGAGTCACGAGCTGCTGTCCAGGAACCTTCCAGCAGTATCCTCGCTGGTGAAGACCCAGAG
GAAAGGGGAGTAAAACCTGGATTGGGAGATTCATTTTCTACAGTGTCTGGTTGGTAAAGCCTCAGCAACAGCC
AGTGGAGACTGGAACACAACCATAGCCTGTTTCGTAGCCATATTAATTGGTTTGTGCCTTACATTATTACTCCTT
GCCATTTTCAAGAAAGCATTGCCAGCTCTTCCAATCTCCATCACCTTTGGGCTTGTCTTCTACTTTGCCACAGAT
TATCTTGTACAGCCTTTTATGGACCAATTAGCATTCCATCAATTTTATATCTAG
  
```

In Gelb ist der Sequenzabschnitt von PS1WT markiert, der durch die Sequenzierung (s.u.) abgedeckt ist.

Sequenz (PS1 WT mit dem Primer T7) « reverse Complement »

```

CACCTTTGGGCATATTTAATGCCAATAGGAGAACGCCGGAGCCAAAAGCCGGAGGGAGCCTTGCCCCCCTGAG
CCCTTTTTTTAAAGGGAGACCCCAAGGGAAATTCGGCCAGGTGGTGGGCCAAGTTGGGGAAAGATTGGGGAGC
TGACATTGAAATAGGGGCCCAAGCATGGGATCATGCTCTTTGTCCCTGGGACTTTTTGCATGGTGGTGGTTCGTGG
CTACCATTAAGTCAGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATACCCCATTCACAGAAGATACCG
AGACTGTGGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATTCTGAATGCTGCCATCATGATCAGTGTCAATTGTTGTCATGACTA
TCCTCCTGGTGGTCTGTATAAATACAGGTGCTATAAGGTCATCCATGCCTGGCTTATTATATCATCTCTATTGTT
TGCTGTTCTTTTTTTCATTCATTTACTTGGGGGAAGTGTAAAACCTATAACGTTGCTGTGGACTACATTACTG
TTGCACTCCTGATCTGGAATTTGGTGTGGTGGGAATGATTTCCATTCCTGAAAGGTCCACTTCGACTCCAGC
AGGCATATCTCATTATGATTAGTGCCTCATGGCCCTGGTGTATCAAGTACCTCCCTGAATGGACTGCGTGGC
TCATCTTGGCTGTGATTTTCAGTATATGATTTAGTGGCTGTTTTGTGTCCGAAAGGTCCACTTCGTATGCTGGTTG
AAACAGCTCAGGAGAGAAATGAAACGCTTTTTCCAGCTCTCATTTACTCCTCAACAATGGTGTGGTTGGTGAATA
TGGCAGAAGGAGACCCGGAAGCTCAAAGGAGAGTATCCAAAAATCCAAGTATAATGCAGAAAGCACAGAAAGGG
AGTCACAAGACACTGTTGCAGAGAATGATGATGGCGGGTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCCAGAGGGACAGTCATC
TAGGGCCTCATCGCTCTACACCTGAGTCACGAGCTGCTGTCCAGGAACCTTCCAGCAGTATCCTCGCTGGTGAAG
ACCCAGAGGAAAGGGGAGTAAAACCTGGATTGGGAGATTCATTTTCTACAGTGTCTGGTTGGTAAAGCCTCAG
CAACAGCCAGTGGAGACTGGAACACAACCATAGCCTGTTTCGTAGCCATATTAATTGGTTTGTGCCTTACATTAT
TACTCCTTGCATTTTCAAGAAAGCATTGCCAGCTCTTCCAATCTCCATCACCTTTGGGCTTGTCTTCTACTTTG
CCACAGATTATCTTGTACAGCCTTTTATGGACCAATTAGCATTCCATCAATTTTATATCTAGCTCGAGTGC GGCC
GCAACCCAGCTTTCTGTACAAAGTGGTATCGCGGCTGGTTTCGGAAAAAA
  
```

In Rot sind zwei „silent mutations“ hervorgehoben, d.h. einzelne Basen, die vom WT abweichen, die jedoch zur Bildung derselben Aminosäure führen.

PS1E280A-Sequenz nach der Datenbank CCDS:

Nucleotide Sequence (1404 nt):

```

ATGACAGAGTTACCTGCACCGTTGTCCTACTTCCAGAATGCACAGATGTCTGAGGACAACCACCTGAGCAATACT
GTACGTAGCCAGAATGACAATAGAGAACGGCAGGAGCACAACGACAGACGGAGCCTTGGCCACCCTGAGCCATTA
TCTAATGGACGACCCAGGGTAACCTCCCGCAGGTGGTGGAGCAAGATGAGGAAGAAGATGAGGAGCTGACATTG
AAATATGGCGCCAAGCATGTGATCATGCTCTTTGTCCTGTGACTCTGTGCATGGTGGTGGTGGTGGCTACCATT
AAGTCAGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATACCCATTACAGAAGATACCGAGACTGTG
GGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATTCTGAATGCTGCCATCATGATCAGTGTCAATTGTTGTCATGACTATCCTCCTG
GTGGTCTGTATAAATACAGGTGCTATAAGGTCATCCATGCCTGGCTTATTATATCATCTCTATTGTTGCTGTTT
TTTTTTTCATTCATTTACTTGGGGGAAGTGTAAAACCTATAACGTTGCTGTGGACTACATTACTGTTGCACTC
CTGATCTGGAATTTTGGTGTGGTGGGAATGATTTCCATTCCTGAAAGGTCCACTTCGACTCCAGCAGGCATAT
CTCATTATGATTAGTGCCTCATGGCCCTGGTGTATCAAGTACCTCCCTGAATGGACTGCGTGGCTCATCTTG
GCTGTGATTTTCAGTATATGATTTAGTGGCTGTTTTGTGTCCGAAAGGTCCACTTCGTATGCTGGTTGAAACAGCT
CAGGAGAGAAATGAAACGCTTTTTCCAGCTCTCATTACTCCTCAACAATGGTGTGGTGGTGAATATGGCAGAA
GGAGACCCGGAAGCTCAAAGGAGAGTATCCAAAATTCGAAGTATAATGCAGAAAGCACAGAAAGGGAGTCACAA
GACACTGTTGCAGAGAATGATGATGGCGGGTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCCAGAGGGACAGTCATCTAGGGCCT
CATCGCTCTACACCTGAGTCACGAGCTGCTGTCCAGGAACCTTCCAGCAGTATCCTCGCTGGTGAAGACCCAGAG
GAAAGGGGAGTAAAACCTTGGATTGGGAGAATTCATTTTCTACAGTGTCTGGTGGTAAAGCCTCAGCAACAGCC
AGTGGAGACTGGAACACAACCATAGCCTGTTTCGTAGCCATATTAATTGGTTTGTGCCTTACATTATTACTCCTT
GCCATTTTCAAGAAAGCATTGCCAGCTCTTCCAATCTCCATCACCTTTGGGCTTGTTTTCTACTTTGCCACAGAT
TATCTTGTACAGCCTTTTATGGACCAATTAGCATTCCATCAATTTTATATCTAG

```

In Gelb ist der Sequenzabschnitt von PS1E280A markiert, der durch die Sequenzierung (s.u.) abgedeckt ist. Mit Grau ist die Mutation E280A hervorgehoben.

Sequenz (PS1 E280A mit dem Primer T7) „Reverse Complement“

```

TAATCCCCGGCCAAGTGGTGGACCAAAAATAGGGGAAGAAGATGAGGAGCTGCATTGAAATATGGCGCCAAGCATG
TGATCATGCTCTTTGTCCTGTGACTCTGTGCATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
CCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATACCCATTACAGAAGATACCGAGACTGTGGCCAGAGAGCCCTGCACT
CAATTCTGAATGCTGCCATCATGATCAGTGTCAATTGTTGTCATGACTATCCTCCTGGTGGTCTGTATAAATACA
GGTGTGCTATAAGGTCATCCATGCCTGGCTTATTATATCATCTCTATTGTTGCTGTTCTTTTTTTTCATTCATTTACT
TGGGGGAAGTGTAAAACCTATAACGTTGCTGTGGACTACATTACTGTTGCACTCCTGATCTGGAATTTTGGTG
TGGTGGGAATGATTTCCATTCCTGAAAGGTCCACTTCGACTCCAGCAGGCATATCTCATTATGATTAGTGCC
TCATGGCCCTGGTGTATCAAGTACCTCCCTGAATGGACTGCGTGGCTCATCTTGGCTGTGATTTTCAGTATATG
ATTTAGTGGCTGTTTTGTGTCCGAAAGGTCCACTTCGTATGCTGGTTGAAACAGCTCAGGAGAGAAATGCAACGC
TTTTTCCAGCTCTCATTACTCCTCAACAATGGTGTGGTGGTGAATATGGCAGAAGGAGACCCGGAAGCTCAA
GGAGAGTATCCAAAATTCGAAGTATAATGCAGAAAGCACAGAAAGGGAGTCACAAGACACTGTTGCAGAGAATG
ATGATGGCGGGTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCCAGAGGGACAGTCATCTAGGGCCTCATCGCTCTACACCTGAGT
CACGAGCTGCTGTCCAGGAACCTTCCAGCAGTATCCTCGCTGGTGAAGACCCAGAGGAAAGGGGAGTAAAACCTT
GATTGGGAGAATTCATTTTCTACAGTGTCTGGTGGTAAAGCCTCAGCAACAGCCAGTGGAGACTGGAACACAA
CCATAGCCTGTTTCGTAGCCATATTAATTGGTTTGTGCCTTACATTATTACTCCTTGCCATTTTCAAGAAAGCAT
TGCCAGCTCTTCCAATCTCCATCACCTTTGGGCTTGTTTTCTACTTTGCCACAGATTATCTTGTACAGCCTTTTA
TGGACCAATTAGCATTCCATCAATTTTATATCTAGCTCGAGTGGCGCCGCAACCCAGCTTCTGTCCAAGTGTAT
CGGGCTCGTTCTTAAAA

```

In Rot sind zwei „silent mutaions“ hervorgehoben, d.h. einzelne Basen, die vom WT abweichen, die jedoch zur Bildung derselben Aminosäure führen.

PS1WT-Sequenz nach der Datenbank CCDS: in Violett ist Exon 9 hervorgehoben.

Nucleotide Sequence (1404 nt):

ATGACAGAGTTACCTGCACCGTTGTCCTACTTCCAGAATGCACAGATGTCTGAGGACAACCACCTGAGCAATACT
GTACGTAGCCAGAATGACAATAGAGAACGGCAGGAGCACAACGACAGACGGAGCCTTGGCCACCCTGAGCCATTA
TCTAATGGACGACCCCAGGGTAACTCCCAGGAGGTTGGAGCAAGATGAGGAAGAAGATGAGGAGCTGACATTG
AAATATGGCGCCAAGCATGTGATCATGCTCTTTGTCCCTGTGACTCTCTGCATGGTGGTGGTCTGGCTACCATT
AAGTCAGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATACCCCATTCACAGAAGATACCGAGACTGTG
GGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATTCTGAATGCTGCCATCATGATCAGTGTCAATTGTTGTCATGACTATCCTCCTG
GTGGTTCTGTATAAATACAGGTGCTATAAGGTCATCCATGCCTGGCTTATTATATCATCTCTATTGTTGCTGTTT
TTTTTTTCATTCATTTACTTGGGGGAAGTGTTAAAACCTATAACGTTGCTGTGGACTACATTACTGTTGCACTC
CTGATCTGGAATTTTGGTGTGGTGGGAATGATTTCCATTCCTGAAAGGTCCACTTCGACTCCAGCAGGCATAT
CTCATTATGATTAGTGCCTCATGGCCCTGGTGTATCAAGTACCTCCCTGAATGGACTGCGTGGCTCATCTTG
GCTGTGATTTTCAAGTATATGATTTAGTGGCTGTTTTGTGTCCGAAAGGTCCACTTCGATGCTGGTTGAAACAGCT
CAGGAGAGAAATGAAACGCTTTTTCCAGCTCTCATTACTCCTCAACAATGGTGTGGTTGGTGAATATGGCAGAA
GGAGACCCGGAAGCTCAAAGGAGAGTATCCAAAATTCCAAGTATAATGCAGAAA GCACAGAAAAGGGAGTCACAA
GACACTGTTGAGAGAAATGATGATGGCGGGTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCAGAGGGACAGTCATCTAGGGCCT
CATCGCTCTACACCTGAGTCACGAGCTGCTGTCCAGGAACCTTCCAGCAGTATCCTCGCTGGTGAAGACCAGAG
GAAAGGGGAGTAAAACCTTGGATTGGGAGATTTCAATTTCTACAGTGTCTGGTTGGTAAAGCCTCAGCAACAGCC
AGTGGAGACTGGAACACAACCATAGCCTGTTTCGTAGCCATATTAATTGGTTTGTGCTTACATTATTACTCCTT
GCCATTTTCAAGAAAGCATTGCCAGCTCTTCCAATCTCCATCACCTTTGGGCTTGTTTTCTACTTTGCCACAGAT
TATCTTGTACAGCCTTTTATGGACCAATTAGCATTCCATCAATTTTATATCTAG

PS1(Δ9) (1317 nt):

ATGACAGAGTTACCTGCACCGTTGTCCTACTTCCAGAATGCACAGATGTCTGAGGACAACCACCTGAGCAATACT
GTACGTAGCCAGAATGACAATAGAGAACGGCAGGAGCACAACGACAGACGGAGCCTTGGCCACCCTGAGCCATTA
TCTAATGGACGACCCCAGGGTAACTCCCAGGAGGTTGGAGCAAGATGAGGAAGAAGATGAGGAGCTGACATTG
AAATATGGCGCCAAGCATGTGATCATGCTCTTTGTCCCTGTGACTCTCTGCATGGTGGTGGTCTGGCTACCATT
AAGTCAGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATACCCCATTCACAGAAGATACCGAGACTGTG
GGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATTCTGAATGCTGCCATCATGATCAGTGTCAATTGTTGTCATGACTATCCTCCTG
GTGGTTCTGTATAAATACAGGTGCTATAAGGTCATCCATGCCTGGCTTATTATATCATCTCTATTGTTGCTGTTT
TTTTTTTCATTCATTTACTTGGGGGAAGTGTTAAAACCTATAACGTTGCTGTGGACTACATTACTGTTGCACTC
CTGATCTGGAATTTTGGTGTGGTGGGAATGATTTCCATTCCTGAAAGGTCCACTTCGACTCCAGCAGGCATAT
CTCATTATGATTAGTGCCTCATGGCCCTGGTGTATCAAGTACCTCCCTGAATGGACTGCGTGGCTCATCTTG
GCTGTGATTTTCAAGTATATGATTTAGTGGCTGTTTTGTGTCCGAAAGGTCCACTTCGATGCTGGTTGAAACAGCT
CAGGAGAGAAATGAAACGCTTTTTCCAGCTCTCATTACTCCTGCACAGAAAGGGAGTCACAAGACTGTTGCA
GAGAATGATGATGGCGGGTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCAGAGGGACAGTCATCTAGGGCCTCATCGCTCTACA
CCTGACTCACGAGCTGCTGTCCAGGAACCTTCCAGCAGTATCCTCGCTGGTGAAGACCCA GAGGAAAGGGGAGTA
AAACTTGGATTGGGAGATTTCAATTTCTACAGTGTCTGGTTGGTAAAGCCTCAGCAACAGCCAGTGGAGACTGG
AACACAACCATAGCCTGTTTCGTAGCCATATTAATTGGTTTGTGCTTACATTATTACTCCTTGCCATTTTCAAG
AAAGCATTGCCAGCTCTTCCAATCTCCATCACCTTTGGGCTTGTTTTCTACTTTGCCACAGATTATCTTGTACAG
CCTTTTATGGACCAATTAGCATTCCATCAATTTTATATCTAG

In Gelb ist der Sequenzabschnitt von PS1Δ9 markiert, der durch die Sequenzierung (s.u.)
abgedeckt ist.

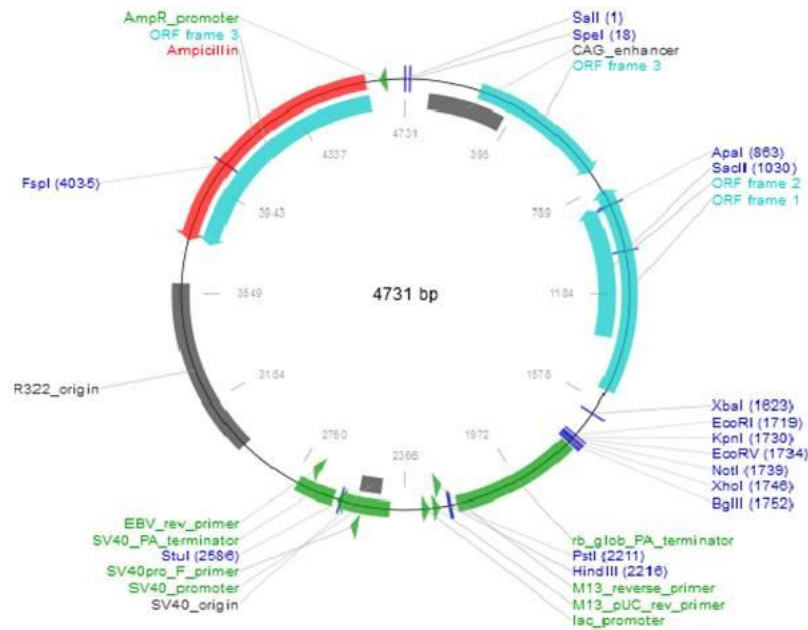
Sequenz (PS1Δ9 mit dem Primer T7)

TTGGGCACGCACGTTACTTAGCTTGGTACGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATCTGCAGATCGAA
CCATGACAGAGTTACCTGCACCGTTGTCCTACTTCCAGAATGCACAGATGTCTGAGGACAACCACCTGAGCAATA
CTAATGACAATAGAGAACGGCAGGAGCACAACGACAGACGGAGCCTTGGCCACCCTGAGCCATTAATGAGC
GACCCCAGGGTAACTCCCAGGAGGTTGGAGCAAGATGAGGAAGAAGATGAGGAGCTGACATTGAAATATGGCG
CCAAGCATGTGATCATGCTCTTTGTCCCTGTGACTCTCTGCATGGTGGTGGTCTGGCTACCATTAAAGTCAGTCA
GCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATACCCCATTCACAGAAGATACCGAGACTGTGGCCAGAGAG
CCCTGCACTCAATTCTGAATGCTGCCATCATGATCAGTGTCAATTGTTGTCATGACTATCCTCCTGGTGGTCTGT
ATAAATACAGGTGCTATAAGGTCATCCATGCCTGGCTTATTATATCATCTCTATTGTTGCTGTTCTTTTTTTCAT
TCATTTACTTGGGGGAAGTGTTAAAACCTATAACGTTGCTGTGGACTACATTACTGTTGCACTCCTGATCTGGA
ATTTTGGTGTGGTGGGAATGATTTCCATTCCTGAAAGGTCCACTTCGACTCCAGCAGGCATATCTCATTATGA
TTAGTGCCTCATGGCCCTGGTGTATCAAGTACCTCCCTGAATGGACTGCGTGGCTCATCTTGGCTGTGATTT
CAGTATATGATTTAGTGGCTGTTTTGTGTCCGAAAGGTCCACTTCGATGCTGGTTGAAACAGCTCAGGAGAGAA
ATGAAACGCTTTTTCCAGCTCTCATTACTCCTGCACAGAAAGGGAGTCACAAGACTGTTGAGAGAAATGATG
ATGGCGGGTTCAGTGAGGAATGGGAAGCCAGAGGGACAGTCATCTAGGGCCTCATCGCTCTACACCTGAAATCAC

GAGCTGCTGTCCAGGAACCTTCCAGCAGTATCCTCGCTGGTGAAGACCCA AAGGAAAGGGGAATAAACTTGGAT
TGGGAAACTTTCATTTTCTACAGTGTCTGGTTGGTAAAGCCTCAGCAACAGCCAGTGGAGACTGGAACCCACCCA
TACCCTGTTTCGTAACCCTAATAAATTGGTTTTGGGCCCTAACATATTAACCCCTTGCCATTTTCAAAAAAGCATT
TGCCAGGCTCTTCAAATCCCCTCCACCTTTGGGCTTGTTTTTCACTTTGGCACAAATTATTCTGGTAACGCCTTT
TTTGGGCGCATTAACTTCCCCAATTTTTATTCCGCGCCCGGATCTAAAGGGCCCGTTTAAACCCCTAATACG
CCCCAGTGGGCTCCTAAATGTGCGCGCCCCTTTTTTTTTTGCCCTCTCCCC

In Rot sind zwei „silent mutaions“ hervorgehoben, d.h. einzelne Basen, die vom WT abweichen, die jedoch zur Bildung derselben Aminosäure führen.

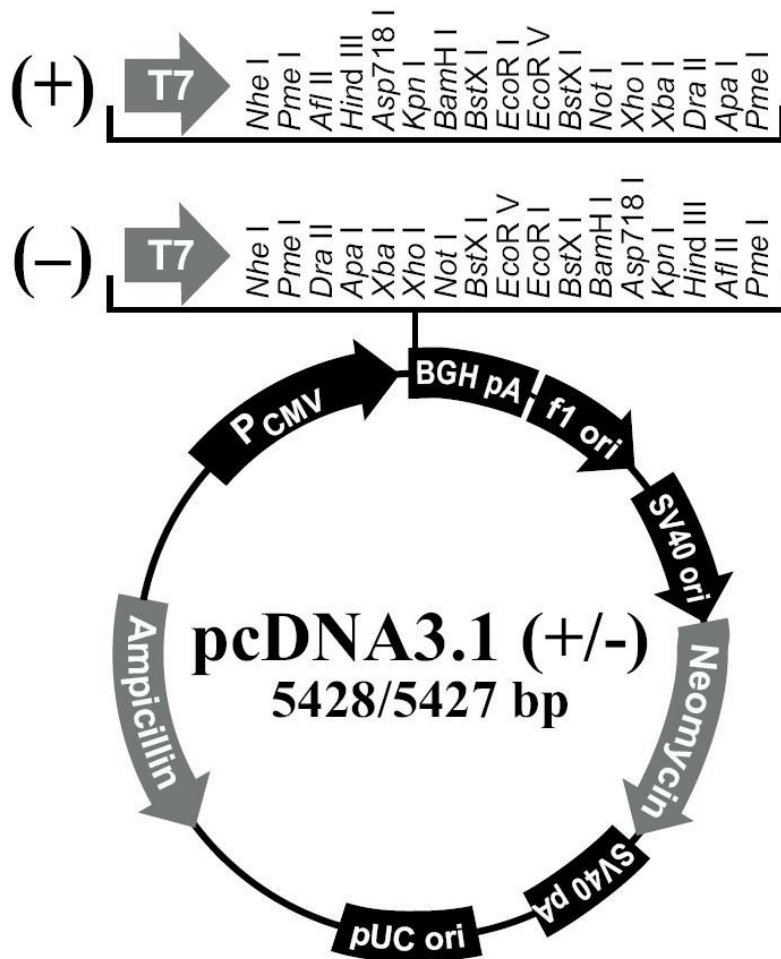
7.3 Der Klonierungsektor (pCAX)



Analyze:	Sequence	ORF	Start	End	Feature Name	Start	End
Plasmid Type:	Mammalian Expression	ORF frame 3	255	734	CAC_enhancer	84	371
Cloning Method:	Unknown	ORF frame 1	1533	802	rb_glob_PA_terminator	1759	2188
Size:	4731	ORF frame 2	1346	843	M13_reverse_primer	2248	2230
5' Sequencing 1 Primer:	pCAX-F, pCAX-R	ORF frame 3	4600	3740	M13_pUC_rev_primer	2269	2247
5' Sequencing 1 Primer Sequence:	CAGCTCCTGGGCAACGTGC, TAGCCAGAAGTCAGATGC	Enzyme Name	Cut		lac_promoter	2312	2283
Bacterial Resistance:	Ampicillin	Sall	1		SV40_promoter	2418	2597
Notes:	Modified pCAGGs	SpeI	18		SV40_origin	2453	2530
Stable:	Unspecified	Apal	863		SV40pro_F_primer	2515	2534
Constitutive:	Unspecified	SacII	1030		SV40_PA_terminator	2611	2742
Viral/Non-Viral:	Unspecified	XbaI	1623		EBV_rev_primer	2699	2718
		EcoRI	1719		pBR322_origin	3585	2966
		KpnI	1730		Ampicillin	4600	3740
		EcoRV	1734		AmpR_promoter	4670	4642
		NotI	1739				
		XhoI	1746				
		BglII	1752				
		PstI	2211				
		HindIII	2216				
		StuI	2586				
		FspI	4035				

Quelle: <http://www.addgene.org/vector-database/2062/> (Stand: 22.12.2014)

7.4 Der Expressionsvektor (pcDNA3.1[±]/Neo)



Comments for pcDNA3.1 (+)

5428 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819

T7 promoter/priming site: bases 863-882

Multiple cloning site: bases 895-1010

pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039

BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252

f1 origin: bases 1298-1726

SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074

Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930

SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234

pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)

Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)

ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)

Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)

bla promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)

7.5 Die Sequenzierung von APP695

APP695-Sequenz nach der Datenbank CCDS

Nucleotide Sequence (2088nt):

ATGCTGCCCGGTTTTGGCACTGCTCCTGCTGGCCGCTGGACGGCTCGGGCGCTGGAGGTACCCACTGATGGTAAT
 GCTGGCCTGCTGGCTGAACCCAGATTGCCATGTTCTGTGGCAGACTGAACATGCACATGAATGTCCAGAATGGG
 AAGTGGGATTCCAGATCCATCAGGGACCAAAACCTGCATTGATACCAAGGAAGGCATCCTGCAGTATTGCCAAGAA
 GTCTACCCTGAACTGCAGATCACCAATGTGGTAGAAGCCAACCAACCAGTGACCATCCAGAACTGGTGCAAGCGG
GGCCGCAAGCAGTGCAAGACCCATCCCCACTTTGTGATTCCCTACCGCTGCTTAGTTGGTGAGTTTGTAAAGTGAT
GCCCTTCTCGTTCCTGACAAGTGCAAATTCCTACACCAGGAGAGGATGGATGTTTGCGAAACTCATCTTCACTGG
CACACCGTCGCCAAGAGACATGCAGTGAGAAGAGTACCAACTTGCATGACTACGGCATGTTGCTGCCCTGCCGA
ATTGACAAGTTCCGAGGGGTAGAGTTTGTGTGTTGCCACTGGCTGAAGAAAGTGACAATGTGGATTCTGCTGAT
GCCGAGGAGGATGACTCGGATGTCTGGTGGGGCGGAGCAGACACAGACTATGCAGATGGGAGTGAAGACAAAAGTA
 GTAGAAGTAGCAGAGGAGGAAGAAGTGGCTGAGGTGGAAGAAGAAGAAGCCGATGATGACGAGGACGATGAGGAT
 GGTGATGAGGTAGAGGAAGAGGCTGAGGAACCCTACGAAGAAGCCACAGAGAGAACCACCAGCATTGCCACCACC
 ACCACCACCACCACAGAGTCTGTGGAAGAGGTGGTTCGAGTTCCTACAACAGCAGCCAGTACCCCTGATGCCGTT
 GACAAGTATCTCGAGACACCTGGGGATGAGAATGAACATGCCATTTCCAGAAAGCCAAAGAGAGGCTTGAGGCC
 AAGCACCGAGAGAGAATGTCCCAGGTCATGAGAGAATGGGAAGAGGCAGAACGTC AAGCAAAGA AACTTGCC TAAA
 GCTGATAAGAAGGCAGTTATCCAGCATTTCAGGAGAAAGTGAATCCTTTGGAACAGGAAGCAGCCAACGAGAGA
 CAGCAGCTGGTGGAGACACACATGGCCAGAGTGGAAAGCCATGCTCAATGACCGCCGCCCTGGCCCTGGAGAAC
 TACATCACCGCTCTGCAGGCTGTTCCCTCGGCCTCGTCACGTGTTCAATATGCTAAAAGAAGTATGTCCGCGCA
 GAACAGAAGGACAGACAGCACACCCTAAAGCATTTCGAGCATGTGCGCATGGTGGATCCCAAGAAAGCCGCTCAG
 ATCCGGTCCCAGGTTATGACACACCTCCGTGTGATTTATGAGCGCATGAATCAGTCTCTCTCCCTGCTCTACAAC
GTGCCTGCAGTGGCCGAGGAGATTGAGGATGAAGTTGATGAGCTGCTTCAGAAAGAGCAAAACTATTCAGATGAC
GTCTTGGCCAACATGATTAGTGAACCAAGGATCAGTTACGGAAACGATGCTCTCATGCCATCTTTGACCGAAACG
AAAACCACCGTGGAGCTCCTTCCCCTGAATGGAGAGTTCAGCCTGGACGATCTCCAGCCGTGGCATTCTTTTGGG
GCTGACTCTGTGCCAGCCAACACAGAAAACGAAGTTGAGCCTGTTGATGCCCCGCCCTGCTGCCGACCGAGGACTG
ACCCTCGACCAGGTTCTGGGTTGACAAATATCAAGACGGAGGAGATCTCTGAAGTGAAGATGGATGCAGAATTC
 CGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAAATTGGTGTTCCTTTGCAGAAGATGTGGGTTCAAACAAGGT
 GCAATCATTGGACTCATGGTGGGCGGTGTTGTCATAGCGACAGTGATCGTCATCACCTTGGTGATGCTGAAGAAG
 AAACAGTACACATCCATTCATCATGGTGTGGTGGAGGTTGACGCCGCTGTCACCCAGAGGAGCGCCACCTGTCC
 AAGATGCAGCAGAACGGCTACGAAAATCCAACCTACAAGTTCTTTGAGCAGATGCAGAAGTAG

In Blau ist der mit dem Primer (APP-Rev) sequenzierte Abschnitt hervorgehoben

In Grün ist der mit dem Primer (APP-For) sequenzierte Abschnitt hervorgehoben

In Grau ist der mit den beiden Primern sequenzierte Abschnitt hervorgehoben

Unterstrichen sind die zu den beiden entworfenen Primern gehörigen Sequenzen

(die Sequenzierung mit den Primern T7 und BGH hat keine Übereinstimmung mit der Original-Sequenz gebracht.)

Sequenz (APP695 mit dem Primer „APP-For“)

TTTGTATTTTTTTTTTCCGGACTGAGCTGGGGGGCGGACAGACC GACTATGCAGATGGGAGTGAAGACAAAGTAGT
 AGAAGTAGCAGAGGAGGAAGAAGTGGCTGAGGTGGAAGAAGAAGGCCGATGATGACGAGGACGATGAGGATGG
 TGATGAGGTAGAGGAAGAGGCTGAGGAACCCTACGAAGAAGCCACAGAGAGAACCACCAGCATTGCCACCACCAC
 CACCACCACCACAGAGTCTGTGGAAGAGGTGGTTTCGAGTTCCTACAACAGCAGCCAGTACCCCTGATGCCGTTGA
 CAAGTATCTCGAGACACCTGGGGATGAGAATGAACATGCCCATTTCCAGAAAGCCAAAGAGAGGCTTGAGGCCAA
 GCACCGAGAGAGAATGTCCCAGGTCATGAGAGAATGGGAAGAGGCAGAACGTCAAGCAAAGAACTTGCCATAAGC
 TGATAAGAAGGCAGTTATCCAGCATTTCCAGGAGAAAGTGAATCTTTGGAACAGGAAGCAGCCAACGAGAGACA
 GCAGCTGGTGGAGACACACATGGCCAGAGTGGAAAGCCATGCTCAATGACCGCCGCCCTGGCCCTGGAGAACTA
 CATCACCGCTCTGCAGGCTGTTCTCCTCGGCCTCGTCACGTGTTCAATATGCTAAAAGAAAGTATGTCCGCGCAGA
 ACAGAAGGACAGACAGCACACCCTAAAGCATTTTCGAGCATGTGCGCATGGTGGATCCCCAAGAAAGCCGCTCAGAT
 CCGGTCCCAGGTTATGACACACCTCCGTGTGATTTATGAGCGCATGAATCAGTCTCTCTCCCTGCTCTACAACGT
 GCCTGCAGTGGCCGAGGAGATTCAGGATGAAGTTGATGAGCTGCTTCAGAAAGAGCAAACTATTCAGATGACGT
 CTTGGCCAACATGATTAGTGAACCAAGGATCAGTTACGGAAACGATGCTCTCATGCCATCTTTGACCGAAACGAA
 AACCACCGTGGAGCTCCTTCCCCTGAATGGAGAGTTCAGCCTGGACGATCTCCAGCCGTGGCATTCTTTTGGGGC
 TGACTCTGTGCCAGCCAACACAGAAAACGAAGTTGAGCCTGTTGATGCCCCCCTGCTGCCGACCGAGGACTGAC
 CACTCGACCAGGTTCTGGGTTGACAAATATCAAGACGGAGGA AATCCCTGAATTGAAAATGGATGCAGAATTCCG
 ACTTGACTCGGGATTTGAAGTTCATCCTCCAAAATTTGGGTGTCTTTGCCAAAAAATTTGGGTTCAAACAAAAG
 TTGCAACCATTGGACCCTTGGGTGGGCCGGGTGTGTCTAAACCGCCAGTGAATCTCTTCCCTTGGGGAAATCT

In Gelb ist der Bereich markiert, der sich mit einem entsprechenden Bereich in der APP695-
 Sequenz laut CCDS

Sequenz (APP695 mit dem Primer „APP-Rev“) reverse Complement

ATGGGAAGTGGGGATTTCAGATCCCTTCCAGGAACCAAAACCTTGCATTGATTCCCAAGGAAGGCATCCTTGCAGT
 ATTGCCAAGGAAGTCTACCCTGAACTGCAGATCACCCAATGTGGTAGAAGCCAACCA ACCAGTGACCATCCAGA
 ACTGGTGAAGCGGGGCCGCAAGCAGTGAAGACCCATCCCCACTTTGTGATTCCCTACCCTGCTTAGTTGGTG
 AGTTTGAAGTATGCCCTTCTCGTTCCTGACAAGTGCAAATCTTACACCAGGAGAGGATGGATGTTTGCAGAA
 CTCATCTTCACTGGCACACCCTCGCCAAAGAGACATGCAGTGAAGAGTACCAACTTGCATGACTACGGCATGT
 TGCTGCCCTGCGGAATTGACAAGTTCCGAGGGGTAGAGTTTGTGTGTTGCCCACTGGCTGAAGAAAGTGAACAATG
 TGGATTCTGCTGATGCGGAGGAGGATGACTCGGATGTCTGGTGGGGCGGAGCAGACACAGACTATGCAGATGGGA
 GTGAAGACAAAGTAGTAGAAGTAGCAGAGGAGGAAGAAGTGGCTGAGGTGGAAGAAGAAGGCCGATGATGACG
 AGGACGATGAGGATGGTGTGATGAGGTAGAGGAAGAGGCTGAGGAACCCTACGAAGAAGCCACAGAGAGAACCACCA
 GCATTGCCACCACCACCACCACCACAGAGTCTGTGGAAGAGGTGGTTCGAGTTCCTACAACAGCAGCCAGTA
 CCCCTGATGCCGTTGACAAGTATCTCGAGACACCTGGGGATGAGAATGAACATGCCCATTTCCAGAAAGCCAAAG
 AGAGGCTTGAGGCCAAGCACCAGAGAGAGAATGTCCCAGGTCATGAGAGAATGGGAAGAGGCAGAACGTCAAGCAA
 AGAAGTTCCTAAAGCTGATAAGAAGGCAGTTATCCAGCATTTCCAGGAGAAAGTGAATCTTTGGAACAGGAAG
 CAGCCAACGAGAGACAGCAGCTGGTGGAGACACACATGGCCAGAGTGGAAAGCCATGCTCAATGACCGCCGCC
 TGCCCTGGAGAACTACATCACCGCTCTGCAGGCTGTTCTCCTCGGCCTCGTCACGTGTTCAATATGCTAAAAG
 AGTATGTCCGCGCAGAACAGAAGGACAGACAGCACACCCTAAAGCATTTTCGAGCATGTGCGCATGGTGGATCCCCA
 AGAAAGCCGCTCAGATCCG TCCCAGTATACCCCTATTAATAAAAAAAAAACTTA

In Gelb ist der Bereich markiert, der sich mit einem entsprechenden Bereich in der APP695-
 Sequenz laut CCDS.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, S.J., Deture, M.A., McBride, M., Dickson, D.W., Petrucelli, L., 2010. Three repeat isoforms of tau inhibit assembly of four repeat tau filaments. *PLoS One* 5 (5), e10810.
- Aguzzi, A., Baumann, F., Bremer, J., 2008. The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* 31, 439-77.
- Aguzzi, A., Glatzel, M., 2006. Prion infections, blood and transfusions. *Nat Clin Pract Neurol* 2 (6), 321-9.
- Aguzzi, A., Heikenwalder, M., 2006. Pathogenesis of prion diseases: Current status and future outlook. *Nat Rev Microbiol* 4 (10), 765-75.
- Aguzzi, A., Polymenidou, M., 2004. Mammalian prion biology: One century of evolving concepts. *Cell* 116 (2), 313-27.
- Albert, M.S., Dekosky, S.T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H.H., Fox, N.C., Gamst, A., Holtzman, D.M., Jagust, W.J., Petersen, R.C., Snyder, P.J., Carrillo, M.C., Thies, B., Phelps, C.H., 2011. The diagnosis of mild cognitive impairment due to alzheimer's disease: Recommendations from the national institute on aging-alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7 (3), 270-9.
- Alier, K., Ma, L., Yang, J., Westaway, D., Jhamandas, J.H., 2011. Abeta inhibition of ionic conductance in mouse basal forebrain neurons is dependent upon the cellular prion protein prpc. *J Neurosci* 31 (45), 16292-7.
- Alonso, A.D., Grundke-Iqbal, I., Barra, H.S., Iqbal, K., 1997. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of alzheimer neurofibrillary degeneration: Sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1), 298-303.
- Altmepfen, H.C., Prox, J., Puig, B., Kluth, M.A., Bernreuther, C., Thurm, D., Jorissen, E., Petrowitz, B., Bartsch, U., De Strooper, B., Saftig, P., Glatzel, M., 2011. Lack of a-disintegrin-and-metalloproteinase adam10 leads to intracellular accumulation and loss of shedding of the cellular prion protein in vivo. *Mol Neurodegener* 6, 36.
- Altmepfen, H.C., Puig, B., Dohler, F., Thurm, D.K., Falker, C., Krasemann, S., Glatzel, M., 2012. Proteolytic processing of the prion protein in health and disease. *Am J Neurodegener Dis* 1 (1), 15-31.
- Alzheimer, A., 1907. Über eine eigenartige erkrankung der hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin* 64, 146-148.
- Anderton, B.H., 2002. Ageing of the brain. *Mech Ageing Dev* 123 (7), 811-7.
- Andreadis, A., Brown, W.M., Kosik, K.S., 1992. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31 (43), 10626-33.

- Arango, D., Cruts, M., Torres, O., Backhovens, H., Serrano, M.L., Villareal, E., Montanes, P., Matallana, D., Cano, C., Van Broeckhoven, C., Jacquier, M., 2001. Systematic genetic study of alzheimer disease in latin america: Mutation frequencies of the amyloid beta precursor protein and presenilin genes in colombia. *Am J Med Genet* 103 (2), 138-43.
- Armstrong, R.A., 2013. What causes alzheimer's disease? *Folia Neuropathol* 51 (3), 169-88.
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Hyman, B.T., 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of alzheimer's disease. *Neurology* 42 (3 Pt 1), 631-9.
- Baki, L., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Georgakopoulos, A., Wen, P., Cui, W., Shioi, J., Koo, E., Ozawa, M., Friedrich, V.L., Jr., Robakis, N.K., 2001. Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (5), 2381-6.
- Balducci, C., Beeg, M., Stravalaci, M., Bastone, A., Scip, A., Biasini, E., Tapella, L., Colombo, L., Manzoni, C., Borsello, T., Chiesa, R., Gobbi, M., Salmona, M., Forloni, G., 2010. Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (5), 2295-300.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., Jones, E., 2011. Alzheimer's disease. *Lancet* 377 (9770), 1019-31.
- Ballatore, C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2007. Tau-mediated neurodegeneration in alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8 (9), 663-72.
- Banati, R.B., Gehrman, J., Czech, C., Monning, U., Jones, L.L., Konig, G., Beyreuther, K., Kreutzberg, G.W., 1993. Early and rapid de novo synthesis of alzheimer beta a4-amyloid precursor protein (app) in activated microglia. *Glia* 9 (3), 199-210.
- Barnham, K.J., Cappai, R., Beyreuther, K., Masters, C.L., Hill, A.F., 2006. Delineating common molecular mechanisms in alzheimer's and prion diseases. *Trends Biochem Sci* 31 (8), 465-72.
- Barry, A.E., Klyubin, I., Mc Donald, J.M., Mably, A.J., Farrell, M.A., Scott, M., Walsh, D.M., Rowan, M.J., 2011. Alzheimer's disease brain-derived amyloid-beta-mediated inhibition of ltp in vivo is prevented by immunotargeting cellular prion protein. *J Neurosci* 31 (20), 7259-63.
- Bartus, R.T., Dean, R.L., 3rd, Beer, B., Lippa, A.S., 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217 (4558), 408-14.
- Bate, C., Williams, A., 2011. Amyloid-beta-induced synapse damage is mediated via cross-linkage of cellular prion proteins. *J Biol Chem* 286 (44), 37955-63.
- Bekris, L.M., Yu, C.E., Bird, T.D., Tsuang, D.W., 2010. Genetics of alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23 (4), 213-27.
- Beland, M., Roucou, X., 2012. The prion protein unstructured n-terminal region is a broad-spectrum molecular sensor with diverse and contrasting potential functions. *J Neurochem* 120 (6), 853-68.

- Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horre, K., Wiltfang, J., Esselmann, H., De Strooper, B., 2006. Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* 96 (3), 732-42.
- Berezovska, O., Lleo, A., Herl, L.D., Frosch, M.P., Stern, E.A., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., 2005. Familial alzheimer's disease presenilin 1 mutations cause alterations in the conformation of presenilin and interactions with amyloid precursor protein. *J Neurosci* 25 (11), 3009-17.
- Bertram, L., 2008. The genetics of alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol* 89, 223-32.
- Bertram, L., Lill, C.M., Tanzi, R.E., 2010. The genetics of alzheimer disease: Back to the future. *Neuron* 68 (2), 270-81.
- Bertram, L., Tanzi, R.E., 2004. Alzheimer's disease: One disorder, too many genes? *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1, R135-41.
- Besnoit Mm, M.C., 1898. Note sur les lésions nerveuses de la tremblante du mouton. *Revue Vétérinaire* 23, 397-400.
- Bhaskar, K., Yen, S.H., Lee, G., 2005. Disease-related modifications in tau affect the interaction between fyn and tau. *J Biol Chem* 280 (42), 35119-25.
- Biernat, J., Wu, Y.Z., Timm, T., Zheng-Fischhofer, Q., Mandelkow, E., Meijer, L., Mandelkow, E.M., 2002. Protein kinase mark/par-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell* 13 (11), 4013-28.
- Bird, T.D., 2008. Genetic aspects of alzheimer disease. *Genet Med* 10 (4), 231-9.
- Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., Zetterberg, H., 2010. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6 (3), 131-44.
- Bolton, D.C., Mckinley, M.P., Prusiner, S.B., 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218 (4579), 1309-11.
- Bond, M., Rogers, G., Peters, J., Anderson, R., Hoyle, M., Miners, A., Moxham, T., Davis, S., Thokala, P., Wailoo, A., Jeffreys, M., Hyde, C., 2012. The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of alzheimer's disease (review of technology appraisal no. 111): A systematic review and economic model. *Health Technol Assess* 16 (21), 1-470.
- Borchelt, D.R., Scott, M., Taraboulos, A., Stahl, N., Prusiner, S.B., 1990. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* 110 (3), 743-52.
- Borenstein, A.R., Copenhaver, C.I., Mortimer, J.A., 2006. Early-life risk factors for alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 20 (1), 63-72.
- Borgegard, T., Gustavsson, S., Nilsson, C., Parpal, S., Klintonberg, R., Berg, A.L., Rosqvist, S., Serneels, L., Svensson, S., Olsson, F., Jin, S., Yan, H., Wanngren, J., Jureus, A., Ridderstad-Wollberg, A., Wollberg, P., Stockling, K., Karlstrom, H., Malmberg, A., Lund, J., Arvidsson, P.I., De Strooper, B., Lendahl, U., Lundkvist, J., 2012.

- Alzheimer's disease: Presenilin 2-sparing gamma-secretase inhibition is a tolerable abeta peptide-lowering strategy. *J Neurosci* 32 (48), 17297-305.
- Bowen, D.M., Francis, P.T., Pangalos, M.N., Stephens, P.H., Procter, A.W., 1992. Treatment strategies for alzheimer's disease. *Lancet* 339 (8785), 132-3.
- Braak, H., Braak, E., 1995. Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* 16 (3), 271-8; discussion 278-84.
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C., Aguzzi, A., 1996. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379 (6563), 339-43.
- Bresjanac, M., Smid, L.M., Vovko, T.D., Petric, A., Barrio, J.R., Popovic, M., 2003. Molecular-imaging probe 2-(1-[6-[(2-fluoroethyl)(methyl) amino]-2-naphthyl]ethylidene) malononitrile labels prion plaques in vitro. *J Neurosci* 23 (22), 8029-33.
- Brickell, K.L., Steinbart, E.J., Rumbaugh, M., Payami, H., Schellenberg, G.D., Van Deerlin, V., Yuan, W., Bird, T.D., 2006. Early-onset alzheimer disease in families with late-onset alzheimer disease: A potential important subtype of familial alzheimer disease. *Arch Neurol* 63 (9), 1307-11.
- Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., Arrighi, H.M., 2007. Forecasting the global burden of alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 3 (3), 186-91.
- Brooks, W.S., Kwok, J.B., Kril, J.J., Broe, G.A., Blumbergs, P.C., Tannenberg, A.E., Lamont, P.J., Hedges, P., Schofield, P.R., 2003. Alzheimer's disease with spastic paraparesis and 'cotton wool' plaques: Two pedigrees with ps-1 exon 9 deletions. *Brain* 126 (Pt 4), 783-91.
- Brown, P., Will, R.G., Bradley, R., Asher, D.M., Detwiler, L., 2001. Bovine spongiform encephalopathy and variant creutzfeldt-jakob disease: Background, evolution, and current concerns. *Emerg Infect Dis* 7 (1), 6-16.
- Brunkan, A.L., Goate, A.M., 2005. Presenilin function and gamma-secretase activity. *J Neurochem* 93 (4), 769-92.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., Stefani, M., 2002. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 416 (6880), 507-11.
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R., 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33 (1), 95-130.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., Dearmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., Weissmann, C., 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface prp protein. *Nature* 356 (6370), 577-82.
- Caceres, A., Kosik, K.S., 1990. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343 (6257), 461-3.

- Cadigan, K.M., Peifer, M., 2009. Wnt signaling from development to disease: Insights from model systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (2), a002881.
- Caetano, F.A., Beraldo, F.H., Hajj, G.N., Guimaraes, A.L., Jurgensen, S., Wasilewska-Sampaio, A.P., Hirata, P.H., Souza, I., Machado, C.F., Wong, D.Y., De Felice, F.G., Ferreira, S.T., Prado, V.F., Rylett, R.J., Martins, V.R., Prado, M.A., 2011. Amyloid-beta oligomers increase the localization of prion protein at the cell surface. *J Neurochem* 117 (3), 538-53.
- Caffrey, T.M., Joachim, C., Wade-Martins, R., 2008. Haplotype-specific expression of the n-terminal exons 2 and 3 at the human *mapt* locus. *Neurobiol Aging* 29 (12), 1923-9.
- Calella, A.M., Farinelli, M., Nuvolone, M., Mirante, O., Moos, R., Falsig, J., Mansuy, I.M., Aguzzi, A., 2010. Prion protein and abeta-related synaptic toxicity impairment. *EMBO Mol Med* 2 (8), 306-14.
- Calero, O., Bullido, M.J., Clarimon, J., Frank-Garcia, A., Martinez-Martin, P., Lleo, A., Rey, M.J., Sastre, I., Rabano, A., De Pedro-Cuesta, J., Ferrer, I., Calero, M., 2012. A common *bace1* polymorphism is a risk factor for sporadic creutzfeldt-jakob disease. *PLoS One* 7 (8), e43926.
- Cao, X., Sudhof, T.C., 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of app with fe65 and histone acetyltransferase tip60. *Science* 293 (5527), 115-20.
- Cataldo, A.M., Hamilton, D.J., Nixon, R.A., 1994. Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in alzheimer disease. *Brain Res* 640 (1-2), 68-80.
- Cattaneo, A., Capsoni, S., Paoletti, F., 2008. Towards non invasive nerve growth factor therapies for alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 15 (2), 255-83.
- Caughey, B., Raymond, G.J., 1991. The scrapie-associated form of prp is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* 266 (27), 18217-23.
- Chavez-Gutierrez, L., Bammens, L., Benilova, I., Vandersteen, A., Benurwar, M., Borgers, M., Lismont, S., Zhou, L., Van Cleynenbreugel, S., Esselmann, H., Wiltfang, J., Serneels, L., Karran, E., Gijzen, H., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Broersen, K., De Strooper, B., 2012. The mechanism of gamma-secretase dysfunction in familial alzheimer disease. *EMBO J* 31 (10), 2261-74.
- Chavez-Gutierrez, L., Tolia, A., Maes, E., Li, T., Wong, P.C., De Strooper, B., 2008. Glu(332) in the nicastrin ectodomain is essential for gamma-secretase complex maturation but not for its activity. *J Biol Chem* 283 (29), 20096-105.
- Checler, F., Vincent, B., 2002. Alzheimer's and prion diseases: Distinct pathologies, common proteolytic denominators. *Trends Neurosci* 25 (12), 616-20.
- Chen, W.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1990. Npxy, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 265 (6), 3116-23.

- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J.M., Et Al., 1985. Identification of scrapie prion protein-specific mrna in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315 (6017), 331-3.
- Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., Lacasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., Caughey, B., Masliah, E., Oldstone, M., 2005. Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308 (5727), 1435-9.
- Cho, H.J., Son, S.M., Jin, S.M., Hong, H.S., Shin, D.H., Kim, S.J., Huh, K., Mook-Jung, I., 2009. Rage regulates bace1 and abeta generation via nfat1 activation in alzheimer's disease animal model. *FASEB J* 23 (8), 2639-49.
- Chung, E., Ji, Y., Sun, Y., Kascsak, R.J., Kascsak, R.B., Mehta, P.D., Strittmatter, S.M., Wisniewski, T., 2010. Anti-prpc monoclonal antibody infusion as a novel treatment for cognitive deficits in an alzheimer's disease model mouse. *BMC Neurosci* 11, 130.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P., Selkoe, D.J., 1997. Mutant presenilins of alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 3 (1), 67-72.
- Clerici, F., Vanacore, N., Elia, A., Spila-Alegiani, S., Pomati, S., Da Cas, R., Raschetti, R., Mariani, C., Memantine Lombardy Study, G., 2012. Memantine effects on behaviour in moderately severe to severe alzheimer's disease: A post-marketing surveillance study. *Neurol Sci* 33 (1), 23-31.
- Clevers, H., Nusse, R., 2012. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149 (6), 1192-205.
- Cohen-Mansfield, J., 2001. Nonpharmacologic interventions for inappropriate behaviors in dementia: A review, summary, and critique. *Am J Geriatr Psychiatry* 9 (4), 361-81.
- Collinge, J., 1997. Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (bse). *Hum Mol Genet* 6 (10), 1699-705.
- Collinge, J., 2001. Prion diseases of humans and animals: Their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 24, 519-50.
- Collinge, J., Clarke, A.R., 2007. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* 318 (5852), 930-6.
- Collins, S.J., Lawson, V.A., Masters, C.L., 2004. Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* 363 (9402), 51-61.
- Collins, S.J., Sanchez-Juan, P., Masters, C.L., Klug, G.M., Van Duijn, C., Poggi, A., Pocchiari, M., Almonti, S., Cuadrado-Corrales, N., De Pedro-Cuesta, J., Budka, H., Gelpi, E., Glatzel, M., Tolnay, M., Hewer, E., Zerr, I., Heinemann, U., Kretschmar, H.A., Jansen, G.H., Olsen, E., Mitrova, E., Alperovitch, A., Brandel, J.P., Mackenzie, J., Murray, K., Will, R.G., 2006. Determinants of diagnostic investigation sensitivities

- across the clinical spectrum of sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Brain* 129 (Pt 9), 2278-87.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., 1993. Gene dose of apolipoprotein e type 4 allele and the risk of alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261 (5123), 921-3.
- Creutzfeldt, H., 1920. Über eine eigenartige herdförmige erkrankung des zentralnervensystems. *Z Gesamte Neurol Psychiatrie* 57, 1-18.
- Crisby, M., Carlson, L.A., Winblad, B., 2002. Statins in the prevention and treatment of alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 16 (3), 131-6.
- Crook, R., Verkkoniemi, A., Perez-Tur, J., Mehta, N., Baker, M., Houlden, H., Farrer, M., Hutton, M., Lincoln, S., Hardy, J., Gwinn, K., Somer, M., Paetau, A., Kalimo, H., Ylikoski, R., Poyhonen, M., Kucera, S., Haltia, M., 1998. A variant of alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med* 4 (4), 452-5.
- Cumbo, E., Ligori, L.D., 2014. Differential effects of current specific treatments on behavioral and psychological symptoms in patients with alzheimer's disease: A 12-month, randomized, open-label trial. *J Alzheimers Dis* 39 (3), 477-85.
- Daigle, I., Li, C., 1993. Apl-1, a caenorhabditis elegans gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (24), 12045-9.
- De Calignon, A., Fox, L.M., Pitstick, R., Carlson, G.A., Bacskai, B.J., Spires-Jones, T.L., Hyman, B.T., 2010. Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* 464 (7292), 1201-4.
- De La Monte, S.M., Sohn, Y.K., Wands, J.R., 1997. Correlates of p53- and fas (cd95)-mediated apoptosis in alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 152 (1), 73-83.
- De Strooper, B., 2003. Aph-1, pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active gamma-secretase complex. *Neuron* 38 (1), 9-12.
- De Strooper, B., 2005. Nicastrin: Gatekeeper of the gamma-secretase complex. *Cell* 122 (3), 318-20.
- De Strooper, B., 2007. Loss-of-function presenilin mutations in alzheimer disease. Talking point on the role of presenilin mutations in alzheimer disease. *EMBO Rep* 8 (2), 141-6.
- De Strooper, B., Annaert, W., 2010. Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26, 235-60.
- De Strooper, B., Beullens, M., Contreras, B., Levesque, L., Craessaerts, K., Cordell, B., Moechars, D., Bollen, M., Fraser, P., George-Hyslop, P.S., Van Leuven, F., 1997. Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the alzheimer's disease-associated presenilins. *J Biol Chem* 272 (6), 3590-8.

- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., Van Leuven, F., 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391 (6665), 387-90.
- Dearmond, S.J., 1993. Alzheimer's disease and creutzfeldt-jakob disease: Overlap of pathogenic mechanisms. *Curr Opin Neurol* 6 (6), 872-81.
- Del Bo, R., Scarlato, M., Ghezzi, S., Martinelli-Boneschi, F., Fenoglio, C., Galimberti, G., Galbiati, S., Virgilio, R., Galimberti, D., Ferrarese, C., Scarpini, E., Bresolin, N., Comi, G.P., 2006. Is m129v of prnp gene associated with alzheimer's disease? A case-control study and a meta-analysis. *Neurobiol Aging* 27 (5), 770.e1-770.e5.
- Delaere, P., Duyckaerts, C., He, Y., Piette, F., Hauw, J.J., 1991. Subtypes and differential laminar distributions of beta a4 deposits in alzheimer's disease: Relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol* 81 (3), 328-35.
- Denny, G.O., Wilesmith, J.W., Clements, R.A., Hueston, W.D., 1992. Bovine spongiform encephalopathy in northern ireland: Epidemiological observations 1988-1990. *Vet Rec* 130 (6), 113-6.
- Dermaut, B., Croes, E.A., Rademakers, R., Van Den Broeck, M., Cruts, M., Hofman, A., Van Duijn, C.M., Van Broeckhoven, C., 2003. Prnp val129 homozygosity increases risk for early-onset alzheimer's disease. *Ann Neurol* 53 (3), 409-12.
- Deslys, J.P., Marce, D., Dormont, D., 1994. Similar genetic susceptibility in iatrogenic and sporadic creutzfeldt-jakob disease. *J Gen Virol* 75 (Pt 1), 23-7.
- Diaz-Hernandez, M., Gomez-Ramos, A., Rubio, A., Gomez-Villafuertes, R., Naranjo, J.R., Miras-Portugal, M.T., Avila, J., 2010. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau. *J Biol Chem* 285 (42), 32539-48.
- Diaz-Nido, J., Wandosell, F., Avila, J., 2002. Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases. *Peptides* 23 (7), 1323-32.
- Dickson, D.W., 1997. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56 (4), 321-39.
- Dillen, K., Annaert, W., 2006. A two decade contribution of molecular cell biology to the centennial of alzheimer's disease: Are we progressing toward therapy? *Int Rev Cytol* 254, 215-300.
- Ding, H., Johnson, G.V., 2008. The last tangle of tau. *J Alzheimers Dis* 14 (4), 441-7.
- Dislich, B., Lichtenthaler, S.F., 2012. The membrane-bound aspartyl protease bace1: Molecular and functional properties in alzheimer's disease and beyond. *Front Physiol* 3, 8.
- Doan, A., Thinakaran, G., Borchelt, D.R., Slunt, H.H., Ratovitsky, T., Podlisny, M., Selkoe, D.J., Seeger, M., Gandy, S.E., Price, D.L., Sisodia, S.S., 1996. Protein topology of presenilin 1. *Neuron* 17 (5), 1023-30.

- Dobrowolski, R., Vick, P., Ploper, D., Gumper, I., Snitkin, H., Sabatini, D.D., De Robertis, E.M., 2012. Presenilin deficiency or lysosomal inhibition enhances wnt signaling through relocalization of gsk3 to the late-endosomal compartment. *Cell Rep* 2 (5), 1316-28.
- Doherr, M.G., Heim, D., Vandeveld, M., Fatzer, R., 1999. Modelling the expected numbers of preclinical and clinical cases of bovine spongiform encephalopathy in switzerland. *Vet Rec* 145 (6), 155-60.
- Dries, D.R., Yu, G., 2008. Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 5 (2), 132-46.
- Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., Dekosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P.J., Scheltens, P., 2007. Research criteria for the diagnosis of alzheimer's disease: Revising the nincds-adrda criteria. *Lancet Neurol* 6 (8), 734-46.
- Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., Devoe, A.G., Streeten, B., Cowen, D., 1974. Letter: Possible person-to-person transmission of creutzfeldt-jakob disease. *N Engl J Med* 290 (12), 692-3.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M., Pennington, C.J., 2008. The adam metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29 (5), 258-89.
- Elder, G.A., Gama Sosa, M.A., De Gasperi, R., Dickstein, D.L., Hof, P.R., 2010. Presenilin transgenic mice as models of alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* 214 (2-3), 127-43.
- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S.B., Kobata, A., 1989. Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28 (21), 8380-8.
- Esselens, C., Oorschot, V., Baert, V., Raemaekers, T., Spittaels, K., Serneels, L., Zheng, H., Saftig, P., De Strooper, B., Klumperman, J., Annaert, W., 2004. Presenilin 1 mediates the turnover of telencephalin in hippocampal neurons via an autophagic degradative pathway. *J Cell Biol* 166 (7), 1041-54.
- Fagotto, F., 2013. Looking beyond the wnt pathway for the deep nature of beta-catenin. *EMBO Rep* 14 (5), 422-33.
- Farrimond, L.E., Roberts, E., Mcshane, R., 2012. Memantine and cholinesterase inhibitor combination therapy for alzheimer's disease: A systematic review. *BMJ Open* 2 (3).
- Fauquant, C., Redeker, V., Landrieu, I., Wieruszeski, J.M., Verdegem, D., Laprevote, O., Lippens, G., Gigant, B., Knossow, M., 2011. Systematic identification of tubulin-interacting fragments of the microtubule-associated protein tau leads to a highly efficient promoter of microtubule assembly. *J Biol Chem* 286 (38), 33358-68.
- Ferber, E.C., Kajita, M., Wadlow, A., Tobiansky, L., Niessen, C., Ariga, H., Daniel, J., Fujita, Y., 2008. A role for the cleaved cytoplasmic domain of e-cadherin in the nucleus. *J Biol Chem* 283 (19), 12691-700.

- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E., Sczufca, M., Alzheimer's Disease, I., 2005. Global prevalence of dementia: A delphi consensus study. *Lancet* 366 (9503), 2112-7.
- Fischer, D., Mukrasch, M.D., Biernat, J., Bibow, S., Blackledge, M., Griesinger, C., Mandelkow, E., Zweckstetter, M., 2009. Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochemistry* 48 (42), 10047-55.
- Flach, K., Hilbrich, I., Schiffmann, A., Gartner, U., Kruger, M., Leonhardt, M., Waschipky, H., Wick, L., Arendt, T., Holzer, M., 2012. Tau oligomers impair artificial membrane integrity and cellular viability. *J Biol Chem* 287 (52), 43223-33.
- Francis, R., Mcgrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., Parks, A.L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R.L., Himes, C.S., Hiebsch, R., Ruble, C., Nye, J.S., Curtis, D., 2002. Aph-1 and pen-2 are required for notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaapp, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 3 (1), 85-97.
- Freir, D.B., Nicoll, A.J., Klyubin, I., Panico, S., Mc Donald, J.M., Risse, E., Asante, E.A., Farrow, M.A., Sessions, R.B., Saibil, H.R., Clarke, A.R., Rowan, M.J., Walsh, D.M., Collinge, J., 2011. Interaction between prion protein and toxic amyloid beta assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. *Nat Commun* 2, 336.
- Funk, K.E., Kuret, J., 2012. Lysosomal fusion dysfunction as a unifying hypothesis for alzheimer's disease pathology. *Int J Alzheimers Dis* 2012, 752894.
- Furukawa, Y., Kaneko, K., Nukina, N., 2011. Tau protein assembles into isoform- and disulfide-dependent polymorphic fibrils with distinct structural properties. *J Biol Chem* 286 (31), 27236-46.
- Gacia, M., Safranow, K., Styczynska, M., Jakubowska, K., Peplonska, B., Chodakowska-Zebrowska, M., Przekop, I., Slowik, A., Golanska, E., Hulas-Bigoszewska, K., Chlubek, D., Religa, D., Zekanowski, C., Barcikowska, M., 2006. Prion protein gene m129 allele is a risk factor for alzheimer's disease. *J Neural Transm* 113 (11), 1747-51.
- Gajdusek, D.C., Zigas, V., 1957. Degenerative disease of the central nervous system in new guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* 257 (20), 974-8.
- Galimberti, D., Ghezzi, L., Scarpini, E., 2013. Immunotherapy against amyloid pathology in alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 333 (1-2), 50-4.
- Galton, C.J., Hodges, J.R., 1999. The spectrum of dementia and its treatment. *J R Coll Physicians Lond* 33 (3), 234-9.
- Gatz, M., Reynolds, C.A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J.A., Berg, S., Fiske, A., Pedersen, N.L., 2006. Role of genes and environments for explaining alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 63 (2), 168-74.

- Gendreau, K.L., Hall, G.F., 2013. Tangles, toxicity, and tau secretion in ad - new approaches to a vexing problem. *Front Neurol* 4, 160.
- Georgakopoulos, A., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Shioi, J., Cui, W., Li, H.C., Schutte, M., Gordon, R., Holstein, G.R., Martinelli, G., Mehta, P., Friedrich, V.L., Jr., Robakis, N.K., 1999. Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts. *Mol Cell* 4 (6), 893-902.
- Gerstmann, J., 1928. Über ein noch nicht beschriebenes reflexphanomen bei einer erkrankung des zerebellaren systems. *Wien. Medizin Wochenschr.* 78, 906 - 908.
- Gerstmann J, S.E., Scheinker I, 1936. Über eine eigenartige hereditär-familiäre erkrankung des zentralnervensystems. Zugleich ein beitrag zur frage des vorzeitigen lokalen alterns. *Z. Neurol.* 154, 736-62.
- Ghezzi, L., Scarpini, E., Galimberti, D., 2013. Disease-modifying drugs in alzheimer's disease. *Drug Des Devel Ther* 7, 1471-8.
- Giannakopoulos, P., Herrmann, F.R., Bussiere, T., Bouras, C., Kovari, E., Perl, D.P., Morrison, J.H., Gold, G., Hof, P.R., 2003. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in alzheimer's disease. *Neurology* 60 (9), 1495-500.
- Gilman, S., Koller, M., Black, R.S., Jenkins, L., Griffith, S.G., Fox, N.C., Eisner, L., Kirby, L., Rovira, M.B., Forette, F., Orgogozo, J.M., Team, A.N.S., 2005. Clinical effects of abeta immunization (an1792) in patients with ad in an interrupted trial. *Neurology* 64 (9), 1553-62.
- Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Coffey, E.E., Gunther, E.C., Lauren, J., Gimbel, Z.A., Strittmatter, S.M., 2010. Memory impairment in transgenic alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci* 30 (18), 6367-74.
- Glatzel, M., Aguzzi, A., 2001. The shifting biology of prions. *Brain Res Brain Res Rev* 36 (2-3), 241-8.
- Goedert, M., Jakes, R., 2005. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739 (2-3), 240-50.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., 2006. A century of alzheimer's disease. *Science* 314 (5800), 777-81.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A., 1989. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: Sequences and localization in neurofibrillary tangles of alzheimer's disease. *Neuron* 3 (4), 519-26.
- Golde, T.E., 2006. Disease modifying therapy for ad? *J Neurochem* 99 (3), 689-707.
- Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Rubio, A., Diaz-Hernandez, J.I., Miras-Portugal, M.T., Avila, J., 2009. Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein. *Eur Neuropsychopharmacol* 19 (10), 708-17.

- Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Rubio, A., Miras-Portugal, M.T., Avila, J., 2008. Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through m1 and m3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 37 (4), 673-81.
- Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V.A., Priess, J.R., 2002. Aph-1 is a multipass membrane protein essential for the notch signaling pathway in *caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2), 775-9.
- Graeber, M.B., Kosel, S., Egensperger, R., Banati, R.B., Muller, U., Bise, K., Hoff, P., Moller, H.J., Fujisawa, K., Mehraein, P., 1997. Rediscovery of the case described by alois alzheimer in 1911: Historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics* 1 (1), 73-80.
- Griffith, J.S., 1967. Self-replication and scrapie. *Nature* 215 (5105), 1043-4.
- Griffiths, H.H., Whitehouse, I.J., Baybutt, H., Brown, D., Kellett, K.A., Jackson, C.D., Turner, A.J., Piccardo, P., Manson, J.C., Hooper, N.M., 2011. Prion protein interacts with bace1 protein and differentially regulates its activity toward wild type and swedish mutant amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 286 (38), 33489-500.
- Grimm, M.O., Grimm, H.S., Patzold, A.J., Zinser, E.G., Halonen, R., Duering, M., Tschape, J.A., De Strooper, B., Muller, U., Shen, J., Hartmann, T., 2005. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol* 7 (11), 1118-23.
- Gu, Y., Chen, F., Sanjo, N., Kawarai, T., Hasegawa, H., Duthie, M., Li, W., Ruan, X., Luthra, A., Mount, H.T., Tandon, A., Fraser, P.E., St George-Hyslop, P., 2003. Aph-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.Nicastrin complexes. *J Biol Chem* 278 (9), 7374-80.
- Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., Ihara, Y., 2001. Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of notch. *J Biol Chem* 276 (38), 35235-8.
- Haass, C., De Strooper, B., 1999. The presenilins in alzheimer's disease--proteolysis holds the key. *Science* 286 (5441), 916-9.
- Haass, C., Selkoe, D.J., 1998. Alzheimer's disease. A technical ko of amyloid-beta peptide. *Nature* 391 (6665), 339-40.
- Haass, C., Selkoe, D.J., 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2), 101-12.
- Hagiwara, K., Hara, H., Hanada, K., 2013. Species-barrier phenomenon in prion transmissibility from a viewpoint of protein science. *J Biochem* 153 (2), 139-45.
- Hall, G.F., Lee, V.M., Lee, G., Yao, J., 2001. Staging of neurofibrillary degeneration caused by human tau overexpression in a unique cellular model of human tauopathy. *Am J Pathol* 158 (1), 235-46.
- Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., Borchelt, D.R., Teplow, D., Hood, L., Burlingame, A., Et Al., 1989. Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* 274 (1), 1-13.

- Hardy, J., 2006. Has the amyloid cascade hypothesis for alzheimer's disease been proved? *Curr Alzheimer Res* 3 (1), 71-3.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297 (5580), 353-6.
- Hartsough, G.R., Burger, D., 1965. Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis* 115 (4), 387-92.
- Hebert, S.S., Serneels, L., Tolia, A., Craessaerts, K., Derks, C., Filippov, M.A., Muller, U., De Strooper, B., 2006. Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO Rep* 7 (7), 739-45.
- Heilig, E.A., Xia, W., Shen, J., Kelleher, R.J., 3rd, 2010. A presenilin-1 mutation identified in familial alzheimer disease with cotton wool plaques causes a nearly complete loss of gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 285 (29), 22350-9.
- Hermes, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretzschmar, H., Sisodia, S., Muller, U., 2004. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three app family members. *EMBO J* 23 (20), 4106-15.
- Heuberger, J., Birchmeier, W., 2010. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (2), a002915.
- Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L.J., Lantos, P., 1997. The same prion strain causes vscjd and bse. *Nature* 389 (6650), 448-50, 526.
- Hiltunen, M., Helisalme, S., Mannermaa, A., Alafuzoff, I., Koivisto, A.M., Lehtovirta, M., Pirskanen, M., Sulkava, R., Verkkoniemi, A., Soininen, H., 2000. Identification of a novel 4.6-kb genomic deletion in presenilin-1 gene which results in exclusion of exon 9 in a finnish early onset alzheimer's disease family: An alu core sequence-stimulated recombination? *Eur J Hum Genet* 8 (4), 259-66.
- Horiuchi, M., Ishiguro, N., Nagasawa, H., Toyoda, Y., Shinagawa, M., 1998. Genomic structure of the bovine prp gene and complete nucleotide sequence of bovine prp cDNA. *Anim Genet* 29 (1), 37-40.
- Hourigan J, K., A., Clark, W. And De Camp, M., 1979. Epidemiology of scrapie in the united states. *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, New York, Academy Press 1, 339-343.
- Inglis, F., 2002. The tolerability and safety of cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *Int J Clin Pract Suppl* (127), 45-63.
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.X., Alonso Adel, C., Grundke-Iqbal, I., 2009. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 118 (1), 53-69.
- Irie, K., Murakami, K., Masuda, Y., Morimoto, A., Ohigashi, H., Ohashi, R., Takegoshi, K., Nagao, M., Shimizu, T., Shirasawa, T., 2005. Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: Implications for the pathogenesis of alzheimer's disease. *J Biosci Bioeng* 99 (5), 437-47.

- Ito, E., Oka, K., Etcheberrigaray, R., Nelson, T.J., Mcphie, D.L., Tofel-Grehl, B., Gibson, G.E., Alkon, D.L., 1994. Internal Ca^{2+} mobilization is altered in fibroblasts from patients with alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (2), 534-8.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H.J., Saido, T.C., 2001. Metabolic regulation of brain abeta by neprilysin. *Science* 292 (5521), 1550-2.
- J, S.R.-F., Sa-Roriz, T.M., Rosset, I., Camozzato, A.L., Santos, A.C., Chaves, M.L., Moriguti, J.C., Roriz-Cruz, M., 2009. (pre)diabetes, brain aging, and cognition. *Biochim Biophys Acta* 1792 (5), 432-43.
- Jack, C.R., Jr., Albert, M.S., Knopman, D.S., Mckhann, G.M., Sperling, R.A., Carrillo, M.C., Thies, B., Phelps, C.H., 2011. Introduction to the recommendations from the national institute on aging-alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7 (3), 257-62.
- Jacobsen, H., Reinhardt, D., Brockhaus, M., Bur, D., Kocyba, C., Kurt, H., Grim, M.G., Baumeister, R., Loetscher, H., 1999. The influence of endoproteolytic processing of familial alzheimer's disease presenilin 2 on abeta42 amyloid peptide formation. *J Biol Chem* 274 (49), 35233-9.
- Jakob-Roetne, R., Jacobsen, H., 2009. Alzheimer's disease: From pathology to therapeutic approaches. *Angew Chem Int Ed Engl* 48 (17), 3030-59.
- Jakob, A., 1921. Über eigenartige erkrankungen des zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen befunde (spastische pseudosklerose-encephalomyelopathie mit disseminierten degenerationsherden). *Z Gesamte Neurol Psychiatrie* 64, 147-228.
- Jarrett, J.T., Lansbury, P.T., Jr., 1993. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: A pathogenic mechanism in alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73 (6), 1055-8.
- Jayadev, S., Leverenz, J.B., Steinbart, E., Stahl, J., Klunk, W., Yu, C.E., Bird, T.D., 2010. Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain* 133 (Pt 4), 1143-54.
- Jellinger, K.A., Janetzky, B., Attems, J., Kienzl, E., 2008. Biomarkers for early diagnosis of alzheimer disease: 'Alzheimer associated gene'--a new blood biomarker? *J Cell Mol Med* 12 (4), 1094-117.
- Jorissen, E., Prox, J., Bernreuther, C., Weber, S., Schwanbeck, R., Serneels, L., Snellinx, A., Craessaerts, K., Thathiah, A., Tesseur, I., Bartsch, U., Weskamp, G., Blobel, C.P., Glatzel, M., De Strooper, B., Saftig, P., 2010. The disintegrin/metalloproteinase adam10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci* 30 (14), 4833-44.
- Kang, D.E., Soriano, S., Xia, X., Eberhart, C.G., De Strooper, B., Zheng, H., Koo, E.H., 2002. Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: Implications for beta-catenin activation in tumorigenesis. *Cell* 110 (6), 751-62.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Muller-Hill, B., 1987. The precursor of alzheimer's

- disease amyloid a4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325 (6106), 733-6.
- Kehoe, P.G., Wilcock, G.K., 2007. Is inhibition of the renin-angiotensin system a new treatment option for alzheimer's disease? *Lancet Neurol* 6 (4), 373-8.
- Kelleher, R.J., 3rd, Shen, J., 2010. Genetics. Gamma-secretase and human disease. *Science* 330 (6007), 1055-6.
- Kellett, K.A., Hooper, N.M., 2009. Prion protein and alzheimer disease. *Prion* 3 (4), 190-4.
- Kernekevisch, M., 1998. Untersuchungen zur expression des interzellulären adhäsionsmoleküls icam-1 und zur prozessierung des amyloid-vorläuferproteins app in astrozyten. Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.
- Kessels, H.W., Nguyen, L.N., Nabavi, S., Malinow, R., 2010. The prion protein as a receptor for amyloid-beta. *Nature* 466 (7308), E3-4; discussion E4-5.
- Kienlen-Campard, P., Tasiaux, B., Van Hees, J., Li, M., Huysseune, S., Sato, T., Fei, J.Z., Aimoto, S., Courtoy, P.J., Smith, S.O., Constantinescu, S.N., Octave, J.N., 2008. Amyloidogenic processing but not amyloid precursor protein (app) intracellular c-terminal domain production requires a precisely oriented app dimer assembled by transmembrane gxxxg motifs. *J Biol Chem* 283 (12), 7733-44.
- Killick, R., Pollard, C.C., Asuni, A.A., Mudher, A.K., Richardson, J.C., Rupniak, H.T., Sheppard, P.W., Vardell, I.M., Brion, J.P., Levey, A.I., Levy, O.A., Vestling, M., Cowburn, R., Lovestone, S., Anderton, B.H., 2001. Presenilin 1 independently regulates beta-catenin stability and transcriptional activity. *J Biol Chem* 276 (51), 48554-61.
- Kimberly, W.T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J., 2000. The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem* 275 (5), 3173-8.
- Kirkwood, J.K., Wells, G.A., Wilesmith, J.W., Cunningham, A.A., Jackson, S.I., 1990. Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*oryx leucoryx*) and a greater kudu (*tragelaphus strepsiceros*). *Vet Rec* 127 (17), 418-20.
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., Ito, H., 1988. Novel precursor of alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331 (6156), 530-2.
- Kitamura, Y., Shimohama, S., Kamoshima, W., Matsuoka, Y., Nomura, Y., Taniguchi, T., 1997. Changes of p53 in the brains of patients with alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 232 (2), 418-21.
- Knowles, J., 2006. Donepezil in alzheimer's disease: An evidence-based review of its impact on clinical and economic outcomes. *Core Evid* 1 (3), 195-219.
- Kretschmar, H., Tatzelt, J., 2013. Prion disease: A tale of folds and strains. *Brain Pathol* 23 (3), 321-32.

- Kudo, W., Lee, H.P., Zou, W.Q., Wang, X., Perry, G., Zhu, X., Smith, M.A., Petersen, R.B., Lee, H.G., 2012. Cellular prion protein is essential for oligomeric amyloid-beta-induced neuronal cell death. *Hum Mol Genet* 21 (5), 1138-44.
- Kuhn, P.H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Rossner, S., Lichtenthaler, S.F., 2010. Adam10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29 (17), 3020-32.
- Kwok, J.B., Taddei, K., Hallupp, M., Fisher, C., Brooks, W.S., Broe, G.A., Hardy, J., Fulham, M.J., Nicholson, G.A., Stell, R., St George Hyslop, P.H., Fraser, P.E., Kakulas, B., Clarnette, R., Relkin, N., Gandy, S.E., Schofield, P.R., Martins, R.N., 1997. Two novel (m233t and r278t) presenilin-1 mutations in early-onset alzheimer's disease pedigrees and preliminary evidence for association of presenilin-1 mutations with a novel phenotype. *Neuroreport* 8 (6), 1537-42.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 227 (5259), 680-5.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L., 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (11), 6448-53.
- Larner, A.J., Doran, M., 2006. Clinical phenotypic heterogeneity of alzheimer's disease associated with mutations of the presenilin-1 gene. *J Neurol* 253 (2), 139-58.
- Larson, M., Sherman, M.A., Amar, F., Nuvolone, M., Schneider, J.A., Bennett, D.A., Aguzzi, A., Lesne, S.E., 2012. The complex prp(c)-fyn couples human oligomeric abeta with pathological tau changes in alzheimer's disease. *J Neurosci* 32 (47), 16857-71a.
- Laudon, H., Hansson, E.M., Melen, K., Bergman, A., Farmery, M.R., Winblad, B., Lendahl, U., Von Heijne, G., Naslund, J., 2005. A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem* 280 (42), 35352-60.
- Lauren, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W., Strittmatter, S.M., 2009. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457 (7233), 1128-32.
- Laxton, A.W., Tang-Wai, D.F., McAndrews, M.P., Zumsteg, D., Wennberg, R., Keren, R., Wherrett, J., Naglie, G., Hamani, C., Smith, G.S., Lozano, A.M., 2010. A phase i trial of deep brain stimulation of memory circuits in alzheimer's disease. *Ann Neurol* 68 (4), 521-34.
- Lazarov, O., Morfini, G.A., Lee, E.B., Farah, M.H., Szodorai, A., Deboer, S.R., Koliatsos, V.E., Kins, S., Lee, V.M., Wong, P.C., Price, D.L., Brady, S.T., Sisodia, S.S., 2005. Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus: Revisited. *J Neurosci* 25 (9), 2386-95.
- Lee, I.Y., Westaway, D., Smit, A.F., Wang, K., Seto, J., Chen, L., Acharya, C., Ankener, M., Baskin, D., Cooper, C., Yao, H., Prusiner, S.B., Hood, L.E., 1998. Complete genomic

- sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res* 8 (10), 1022-37.
- Lee, J.H., Yu, W.H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P.S., Peterhoff, C.M., Wolfe, D.M., Martinez-Vicente, M., Massey, A.C., Sovak, G., Uchiyama, Y., Westaway, D., Cuervo, A.M., Nixon, R.A., 2010. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by alzheimer-related ps1 mutations. *Cell* 141 (7), 1146-58.
- Lee, S., Kim, W., Li, Z., Hall, G.F., 2012. Accumulation of vesicle-associated human tau in distal dendrites drives degeneration and tau secretion in an in situ cellular tauopathy model. *Int J Alzheimers Dis* 2012, 172837.
- Lee, S.F., Shah, S., Li, H., Yu, C., Han, W., Yu, G., 2002. Mammalian aph-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and notch. *J Biol Chem* 277 (47), 45013-9.
- Leggett, M.M., Dukes, J., Pirie, H.M., 1990. A spongiform encephalopathy in a cat. *Vet Rec* 127 (24), 586-8.
- Lemere, C.A., Lopera, F., Kosik, K.S., Lendon, C.L., Ossa, J., Saido, T.C., Yamaguchi, H., Ruiz, A., Martinez, A., Madrigal, L., Hincapie, L., Arango, J.C., Anthony, D.C., Koo, E.H., Goate, A.M., Selkoe, D.J., Arango, J.C., 1996. The e280a presenilin 1 alzheimer mutation produces increased a beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med* 2 (10), 1146-50.
- Leopoldt, J., 1759. Von denen mancherley krankheiten des schaafviehes, und was vor euren damit vorgenommen werden. In nützliche und auf die erfahrung gegründete einleitung zu der landwirthschaft. Berlin und Glogau: Christian Friedrich Günthern Fünf Theile, 344-360.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., Et Al., 1995a. Candidate gene for the chromosome 1 familial alzheimer's disease locus. *Science* 269 (5226), 973-7.
- Levy-Lahad, E., Wijsman, E.M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K.A., Weber, J.L., Bird, T.D., Schellenberg, G.D., 1995b. A familial alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269 (5226), 970-3.
- Lewis, P.A., Tattum, M.H., Jones, S., Bhelt, D., Batchelor, M., Clarke, A.R., Collinge, J., Jackson, G.S., 2006. Codon 129 polymorphism of the human prion protein influences the kinetics of amyloid formation. *J Gen Virol* 87 (Pt 8), 2443-9.
- Lewis, V., Whitehouse, I.J., Baybutt, H., Manson, J.C., Collins, S.J., Hooper, N.M., 2012. Cellular prion protein expression is not regulated by the alzheimer's amyloid precursor protein intracellular domain. *PLoS One* 7 (2), e31754.
- Li, T., Wen, H., Brayton, C., Laird, F.M., Ma, G., Peng, S., Placanica, L., Wu, T.C., Crain, B.J., Price, D.L., Eberhart, C.G., Wong, P.C., 2007. Moderate reduction of gamma-secretase attenuates amyloid burden and limits mechanism-based liabilities. *J Neurosci* 27 (40), 10849-59.

- Li, Y.M., Lai, M.T., Xu, M., Huang, Q., Dimuzio-Mower, J., Sardana, M.K., Shi, X.P., Yin, K.C., Shafer, J.A., Gardell, S.J., 2000. Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (11), 6138-43.
- Linden, R., Martins, V.R., Prado, M.A., Cammarota, M., Izquierdo, I., Brentani, R.R., 2008. Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88 (2), 673-728.
- Locht, C., Chesebro, B., Race, R., Keith, J.M., 1986. Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (17), 6372-6.
- Logan, C.Y., Nusse, R., 2004. The wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810.
- Lopera, F., Ardilla, A., Martinez, A., Madrigal, L., Arango-Viana, J.C., Lemere, C.A., Arango-Lasprilla, J.C., Hincapie, L., Arcos-Burgos, M., Ossa, J.E., Behrens, I.M., Norton, J., Lendon, C., Goate, A.M., Ruiz-Linares, A., Rosselli, M., Kosik, K.S., 1997. Clinical features of early-onset Alzheimer disease in a large kindred with an e280a presenilin-1 mutation. *JAMA* 277 (10), 793-9.
- Lottspeich, F., Engels, J.W., Solodkoff, Z.L., 2012. *Bioanalytik Spektrum Akademischer Verlag*.
- Lugaresi, E., Medori, R., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., Lugaresi, A., Tinuper, P., Zucconi, M., Gambetti, P., 1986. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* 315 (16), 997-1003.
- Ma, J., Wollmann, R., Lindquist, S., 2002. Neurotoxicity and neurodegeneration when prp accumulates in the cytosol. *Science* 298 (5599), 1781-5.
- Manson, J.C., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Aitchison, L., McConnell, I., Hope, J., 1994. 129/ola mice carrying a null mutation in prp that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 8 (2-3), 121-7.
- Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T., Robakis, N.K., 2002. A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the e-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J* 21 (8), 1948-56.
- Marambaud, P., Wen, P.H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R., Robakis, N.K., 2003. A cbp binding transcriptional repressor produced by the ps1/epsilon-cleavage of n-cadherin is inhibited by ps1 fad mutations. *Cell* 114 (5), 635-45.
- Maurer, K., Volk, S., Gerbaldo, H., 1997. Auguste d and Alzheimer's disease. *Lancet* 349 (9064), 1546-9.
- Mazanetz, M.P., Fischer, P.M., 2007. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 6 (6), 464-79.
- Mckhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack, C.R., Jr., Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J., Mayeux, R., Mohs, R.C., Morris, J.C., Rossor, M.N., Scheltens, P., Carrillo, M.C., Thies, B., Weintraub, S., Phelps, C.H., 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from

- the national institute on aging-alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7 (3), 263-9.
- Mckinley, M.P., Bolton, D.C., Prusiner, S.B., 1983. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35 (1), 57-62.
- Mehlhorn, I., Groth, D., Stockel, J., Moffat, B., Reilly, D., Yansura, D., Willett, W.S., Baldwin, M., Fletterick, R., Cohen, F.E., Vandlen, R., Henner, D., Prusiner, S.B., 1996. High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry* 35 (17), 5528-37.
- Meyer-Luehmann, M., Stalder, M., Herzig, M.C., Kaeser, S.A., Kohler, E., Pfeifer, M., Boncristiano, S., Mathews, P.M., Mercken, M., Abramowski, D., Staufenbiel, M., Jucker, M., 2003. Extracellular amyloid formation and associated pathology in neural grafts. *Nat Neurosci* 6 (4), 370-7.
- Miesbauer, M., 2009. Translokation des prion-proteins ins endoplasmatische retikulum: Die rolle intrinsischer und zellulärer faktoren. LMU München: Fakultät für Chemie und Pharmazie.
- Milano, J., Mckay, J., Dagenais, C., Foster-Brown, L., Pognan, F., Gadiant, R., Jacobs, R.T., Zacco, A., Greenberg, B., Ciaccio, P.J., 2004. Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol Sci* 82 (1), 341-58.
- Mironov, A., Jr., Latawiec, D., Wille, H., Bouzamondo-Bernstein, E., Legname, G., Williamson, R.A., Burton, D., Dearmond, S.J., Prusiner, S.B., Peters, P.J., 2003. Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci* 23 (18), 7183-93.
- Mocanu, M.M., Nissen, A., Eckermann, K., Khlistunova, I., Biernat, J., Drexler, D., Petrova, O., Schonig, K., Bujard, H., Mandelkow, E., Zhou, L., Rune, G., Mandelkow, E.M., 2008. The potential for beta-structure in the repeat domain of tau protein determines aggregation, synaptic decay, neuronal loss, and coassembly with endogenous tau in inducible mouse models of tauopathy. *J Neurosci* 28 (3), 737-48.
- Monji, A., Yoshida, I., Tashiro, K., Hayashi, Y., Matsuda, K., Tashiro, N., 2000. Inhibition of a beta fibril formation and a beta-induced cytotoxicity by senile plaque-associated proteins. *Neurosci Lett* 278 (1-2), 81-4.
- Moore, R.A., Vorberg, I., Priola, S.A., 2005. Species barriers in prion diseases--brief review. *Arch Virol Suppl* (19), 187-202.
- Morales, R., Estrada, L.D., Diaz-Espinoza, R., Morales-Scheihing, D., Jara, M.C., Castilla, J., Soto, C., 2010. Molecular cross talk between misfolded proteins in animal models of alzheimer's and prion diseases. *J Neurosci* 30 (13), 4528-35.
- Moreth, J., Mavoungou, C., Schindowski, K., 2013. Passive anti-amyloid immunotherapy in alzheimer's disease: What are the most promising targets? *Immun Ageing* 10 (1), 18.
- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J.L., Lehmann, S., Launay, J.M., Kellermann, O., 2000. Signal transduction through prion protein. *Science* 289 (5486), 1925-8.

- Mukrasch, M.D., Biernat, J., Von Bergen, M., Griesinger, C., Mandelkow, E., Zweckstetter, M., 2005. Sites of tau important for aggregation populate β -structure and bind to microtubules and polyanions. *J Biol Chem* 280 (26), 24978-86.
- Mülhardt, C., 2013. *Der experimentator molekularbiologie / genomics* Springer Berlin Heidelberg.
- Muller, W.E., Eckert, A., Kurz, C., Eckert, G.P., Leuner, K., 2010. Mitochondrial dysfunction: Common final pathway in brain aging and alzheimer's disease--therapeutic aspects. *Mol Neurobiol* 41 (2-3), 159-71.
- Munter, L.M., Voigt, P., Harmeier, A., Kaden, D., Gottschalk, K.E., Weise, C., Pipkorn, R., Schaefer, M., Langosch, D., Multhaup, G., 2007. Gxxxg motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of abeta42. *EMBO J* 26 (6), 1702-12.
- Nalivaeva, N.N., Turner, A.J., 2013. The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett* 587 (13), 2046-54.
- Nazor, K.E., Seward, T., Telling, G.C., 2007. Motor behavioral and neuropathological deficits in mice deficient for normal prion protein expression. *Biochim Biophys Acta* 1772 (6), 645-53.
- Nelson, W.J., Nusse, R., 2004. Convergence of wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303 (5663), 1483-7.
- Neumann, K.F., Rojo, L., Navarrete, L.P., Farias, G., Reyes, P., Maccioni, R.B., 2008. Insulin resistance and alzheimer's disease: Molecular links & clinical implications. *Curr Alzheimer Res* 5 (5), 438-47.
- Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., Donlon, T.A., 1986. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res* 387 (3), 271-80.
- Nixon, R.A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W.H., Peterhoff, C., Cataldo, A., Cuervo, A.M., 2005. Extensive involvement of autophagy in alzheimer disease: An immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 64 (2), 113-22.
- Nyabi, O., Bentahir, M., Horre, K., Herreman, A., Gottardi-Littell, N., Van Broeckhoven, C., Merchiers, P., Spittaels, K., Annaert, W., De Strooper, B., 2003. Presenilins mutated at asp-257 or asp-385 restore pen-2 expression and nicastrin glycosylation but remain catalytically inactive in the absence of wild type presenilin. *J Biol Chem* 278 (44), 43430-6.
- Octave, J.N., 2005. [alzheimer disease: Cellular and molecular aspects]. *Bull Mem Acad R Med Belg* 160 (10-12), 445-9; discussion 450-1.
- Oda, T., Wals, P., Osterburg, H.H., Johnson, S.A., Pasinetti, G.M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Stine, W.B., Snyder, S.W., Holzman, T.F., Et Al., 1995. Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (a beta 1-42) and forms slowly sedimenting a beta complexes that cause oxidative stress. *Exp Neurol* 136 (1), 22-31.

- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., Mckinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., Et Al., 1985. A cellular gene encodes scrapie prp 27-30 protein. *Cell* 40 (4), 735-46.
- Ohyagi, Y., Asahara, H., Chui, D.H., Tsuruta, Y., Sakae, N., Miyoshi, K., Yamada, T., Kikuchi, H., Taniwaki, T., Murai, H., Ikezoe, K., Furuya, H., Kawarabayashi, T., Shoji, M., Checler, F., Iwaki, T., Makifuchi, T., Takeda, K., Kira, J., Tabira, T., 2005. Intracellular abeta42 activates p53 promoter: A pathway to neurodegeneration in alzheimer's disease. *FASEB J* 19 (2), 255-7.
- Orsi, A., Fioriti, L., Chiesa, R., Sitia, R., 2006. Conditions of endoplasmic reticulum stress favor the accumulation of cytosolic prion protein. *J Biol Chem* 281 (41), 30431-8.
- Palmer, M.S., Dryden, A.J., Hughes, J.T., Collinge, J., 1991. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Nature* 352 (6333), 340-2.
- Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E., Et Al., 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (23), 10962-6.
- Pardossi-Piquard, R., Checler, F., 2012. The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain acid. *J Neurochem* 120 Suppl 1, 109-24.
- Parkin, E.T., Watt, N.T., Hussain, I., Eckman, E.A., Eckman, C.B., Manson, J.C., Baybutt, H.N., Turner, A.J., Hooper, N.M., 2007. Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (26), 11062-7.
- Pattison, I.H., 1966. The relative susceptibility of sheep, goats and mice to two types of the goat scrapie agent. *Res Vet Sci* 7 (2), 207-12.
- Pattison, I.H., Millson, G.C., 1960. Further observations on the experimental production of scrapie in goats and sheep. *J Comp Pathol* 70, 182-93.
- Perez-Tur, J., Froelich, S., Prihar, G., Crook, R., Baker, M., Duff, K., Wragg, M., Busfield, F., Lendon, C., Clark, R.F., Et Al., 1995. A mutation in alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene. *Neuroreport* 7 (1), 297-301.
- Piening, N., 2006. Molekulare mechanismen der prionpropagation: Die rolle der primärsequenz und der proteinkonformation für die speziesbarriere. Dissertation LMU München: Fakultät für Biologie, 14-16
- Pietrzik, C., Behl, C., 2005. Concepts for the treatment of alzheimer's disease: Molecular mechanisms and clinical application. *Int J Exp Pathol* 86 (3), 173-85.
- Podlisny, M.B., Citron, M., Amarante, P., Sherrington, R., Xia, W., Zhang, J., Diehl, T., Levesque, G., Fraser, P., Haass, C., Koo, E.H., Seubert, P., St George-Hyslop, P., Teplow, D.B., Selkoe, D.J., 1997. Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between thr291 and ala299 and occur as stable n- and c-terminal fragments in normal and alzheimer brain tissue. *Neurobiol Dis* 3 (4), 325-37.

- Prager, K., Wang-Eckhardt, L., Fluhrer, R., Killick, R., Barth, E., Hampel, H., Haass, C., Walter, J., 2007. A structural switch of presenilin 1 by glycogen synthase kinase 3 β -mediated phosphorylation regulates the interaction with beta-catenin and its nuclear signaling. *J Biol Chem* 282 (19), 14083-93.
- Price, D.L., Borchelt, D.R., Sisodia, S.S., 1993. Alzheimer disease and the prion disorders amyloid beta-protein and prion protein amyloidoses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (14), 6381-4.
- Prihar, G., Verkkoniemi, A., Perez-Tur, J., Crook, R., Lincoln, S., Houlden, H., Somer, M., Paetau, A., Kalimo, H., Grover, A., Myllykangas, L., Hutton, M., Hardy, J., Haltia, M., 1999. Alzheimer disease ps-1 exon 9 deletion defined. *Nat Med* 5 (10), 1090.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H.A., Herms, J., 2006. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 26 (27), 7212-21.
- Prusiner, S.B., 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216 (4542), 136-44.
- Prusiner, S.B., 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252 (5012), 1515-22.
- Prusiner, S.B., Groth, D., Serban, A., Stahl, N., Gabizon, R., 1993. Attempts to restore scrapie prion infectivity after exposure to protein denaturants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (7), 2793-7.
- Prusiner, S.B., Groth, D.F., Bolton, D.C., Kent, S.B., Hood, L.E., 1984. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 38 (1), 127-34.
- Prusiner, S.B., Mckinley, M.P., Bowman, K.A., Bolton, D.C., Bendheim, P.E., Groth, D.F., Glenner, G.G., 1983. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35 (2 Pt 1), 349-58.
- Puckett, C., Concannon, P., Casey, C., Hood, L., 1991. Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet* 49 (2), 320-9.
- Qiu, W.Q., Folstein, M.F., 2006. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in alzheimer's disease: Review and hypothesis. *Neurobiol Aging* 27 (2), 190-8.
- R. F. Clark, M.H.R.a.F., ... , A. Goate, 1995. The structure of the presenilin 1 (s182) gene and identification of six novel mutations in early onset ad families. *Nat Genet* 11 (2), 219-22.
- Rehm, H., Letzel, T., 2009. *Der experimentator: Proteinbiochemie/proteomics Spektrum Akademischer Verlag.*
- Reinhard, C., Hebert, S.S., De Strooper, B., 2005. The amyloid-beta precursor protein: Integrating structure with biological function. *EMBO J* 24 (23), 3996-4006.
- Resenberger, U.K., Harmeier, A., Woerner, A.C., Goodman, J.L., Muller, V., Krishnan, R., Vabulas, R.M., Kretschmar, H.A., Lindquist, S., Hartl, F.U., Multhaup, G., Winklhofer, K.F., Tatzelt, J., 2011. The cellular prion protein mediates neurotoxic

- signalling of beta-sheet-rich conformers independent of prion replication. *EMBO J* 30 (10), 2057-70.
- Reya, T., Clevers, H., 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434 (7035), 843-50.
- Riemenschneider, M., Klopp, N., Xiang, W., Wagenpfeil, S., Vollmert, C., Muller, U., Forstl, H., Illig, T., Kretschmar, H., Kurz, A., 2004. Prion protein codon 129 polymorphism and risk of alzheimer disease. *Neurology* 63 (2), 364-6.
- Rissman, R.A., Poon, W.W., Blurton-Jones, M., Oddo, S., Torp, R., Vitek, M.P., Laferla, F.M., Rohn, T.T., Cotman, C.W., 2004. Caspase-cleavage of tau is an early event in alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest* 114 (1), 121-30.
- Rockwood, K., Bouchard, R.W., Camicioli, R., Leger, G., 2007. Toward a revision of criteria for the dementias. *Alzheimers Dement* 3 (4), 428-40.
- Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., Et Al., 1995. Familial alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376 (6543), 775-8.
- Rosen, C., Hansson, O., Blennow, K., Zetterberg, H., 2013. Fluid biomarkers in alzheimer's disease - current concepts. *Mol Neurodegener* 8, 20.
- Rosen, D.R., Martin-Morris, L., Luo, L.Q., White, K., 1989. A drosophila gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (7), 2478-82.
- Rudd, P.M., Wormald, M.R., Wing, D.R., Prusiner, S.B., Dwek, R.A., 2001. Prion glycoprotein: Structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry* 40 (13), 3759-66.
- Safar, J., Roller, P.P., Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., Jr., 1993a. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem* 268 (27), 20276-84.
- Safar, J., Roller, P.P., Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., Jr., 1993b. Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci* 2 (12), 2206-16.
- Saijo, E., Scheff, S.W., Telling, G.C., 2011. Unaltered prion protein expression in alzheimer disease patients. *Prion* 5 (2), 109-16.
- Salomone, S., Caraci, F., Leggio, G.M., Fedotova, J., Drago, F., 2012. New pharmacological strategies for treatment of alzheimer's disease: Focus on disease modifying drugs. *Br J Clin Pharmacol* 73 (4), 504-17.
- Sandbrink, R., Masters, C.L., Beyreuther, K., 1994. App gene family: Unique age-associated changes in splicing of alzheimer's beta4-amyloid protein precursor. *Neurobiol Dis* 1 (1-2), 13-24.

- Sathya, M., Premkumar, P., Karthick, C., Moorthi, P., Jayachandran, K.S., Anusuyadevi, M., 2012. Bace1 in alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* 414, 171-8.
- Sato, S., Kamino, K., Miki, T., Doi, A., Ii, K., St George-Hyslop, P.H., Ogihara, T., Sakaki, Y., 1998. Splicing mutation of presenilin-1 gene for early-onset familial alzheimer's disease. *Hum Mutat Suppl* 1, S91-4.
- Saura, C.A., Choi, S.Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S., Kelleher, R.J., 3rd, Kandel, E.R., Duff, K., Kirkwood, A., Shen, J., 2004. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* 42 (1), 23-36.
- Schellenberg, G.D., Bird, T.D., Wijsman, E.M., Orr, H.T., Anderson, L., Nemens, E., White, J.A., Bonnycastle, L., Weber, J.L., Alonso, M.E., Et Al., 1992. Genetic linkage evidence for a familial alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258 (5082), 668-71.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandever, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., Seubert, P., 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates alzheimer-disease-like pathology in the pdapp mouse. *Nature* 400 (6740), 173-7.
- Schmitt, F.A., Davis, D.G., Wekstein, D.R., Smith, C.D., Ashford, J.W., Markesbery, W.R., 2000. "Preclinical" ad revisited: Neuropathology of cognitively normal older adults. *Neurology* 55 (3), 370-6.
- Schmitz, S., 2011. *Der experimentator: Zellkultur Spektrum Akademischer Verlag*.
- Seeger, M., Nordstedt, C., Petanceska, S., Kovacs, D.M., Gouras, G.K., Hahne, S., Fraser, P., Levesque, L., Czernik, A.J., George-Hyslop, P.S., Sisodia, S.S., Thinakaran, G., Tanzi, R.E., Greengard, P., Gandy, S., 1997. Evidence for phosphorylation and oligomeric assembly of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (10), 5090-4.
- Selkoe, D., Kopan, R., 2003. Notch and presenilin: Regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26, 565-97.
- Selkoe, D.J., 1996. Amyloid beta-protein and the genetics of alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271 (31), 18295-8.
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81 (2), 741-66.
- Selkoe, D.J., American College Of, P., American Physiological, S., 2004. Alzheimer disease: Mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med* 140 (8), 627-38.
- Seow, D., Gauthier, S., 2007. Pharmacotherapy of alzheimer disease. *Can J Psychiatry* 52 (10), 620-9.
- Sepulveda-Falla, D., Glatzel, M., Lopera, F., 2012. Phenotypic profile of early-onset familial alzheimer's disease caused by presenilin-1 e280a mutation. *J Alzheimers Dis* 32 (1), 1-12.

- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M.L., Grognet, P., Bombois, S., Blum, D., Delacourte, A., Pasquier, F., Vanmechelen, E., Schraen-Maschke, S., Buee, L., 2008. Biochemistry of tau in alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics* 5 (2), 207-24.
- Shah, S., Lee, S.F., Tabuchi, K., Hao, Y.H., Yu, C., Laplant, Q., Ball, H., Dann, C.E., 3rd, Sudhof, T., Yu, G., 2005. Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122 (3), 435-47.
- Shen, J., Bronson, R.T., Chen, D.F., Xia, W., Selkoe, D.J., Tonegawa, S., 1997. Skeletal and cns defects in presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89 (4), 629-39.
- Shen, J., Kelleher, R.J., 3rd, 2007. The presenilin hypothesis of alzheimer's disease: Evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2), 403-9.
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J.F., Bruni, A.C., Montesi, M.P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R.J., Wasco, W., Da Silva, H.A., Haines, J.L., Perikicak-Vance, M.A., Tanzi, R.E., Roses, A.D., Fraser, P.E., Rommens, J.M., St George-Hyslop, P.H., 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial alzheimer's disease. *Nature* 375 (6534), 754-60.
- Shioi, J., Georgakopoulos, A., Mehta, P., Kouchi, Z., Litterst, C.M., Baki, L., Robakis, N.K., 2007. Fad mutants unable to increase neurotoxic abeta 42 suggest that mutation effects on neurodegeneration may be independent of effects on abeta. *J Neurochem* 101 (3), 674-81.
- Sjoberg, M., Haglund, M., Englund, E., 2005. Decreasing myelin density reflected increasing white matter pathology in alzheimer's disease--a neuropathological study. *Int J Geriatr Psychiatry* 20 (10), 919-26.
- Slegers, K., Lambert, J.C., Bertram, L., Cruts, M., Amouyel, P., Van Broeckhoven, C., 2010. The pursuit of susceptibility genes for alzheimer's disease: Progress and prospects. *Trends Genet* 26 (2), 84-93.
- Smith, R.P., Higuchi, D.A., Broze, G.J., Jr., 1990. Platelet coagulation factor xia-inhibitor, a form of alzheimer amyloid precursor protein. *Science* 248 (4959), 1126-8.
- Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C.L., Muller, U., Kins, S., Beyreuther, K., 2005. Homo- and heterodimerization of app family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J* 24 (20), 3624-34.
- Solforosi, L., Criado, J.R., McGavern, D.B., Wirz, S., Sanchez-Alavez, M., Sugama, S., Degiorgio, L.A., Volpe, B.T., Wiseman, E., Abalos, G., Masliah, E., Gilden, D., Oldstone, M.B., Conti, B., Williamson, R.A., 2004. Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science* 303 (5663), 1514-6.
- Song, E.S., Hersh, L.B., 2005. Insulysin: An allosteric enzyme as a target for alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 25 (3), 201-6.

- Soriano, S., Kang, D.E., Fu, M., Pestell, R., Chevallier, N., Zheng, H., Koo, E.H., 2001. Presenilin 1 negatively regulates beta-catenin/t cell factor/lymphoid enhancer factor-1 signaling independently of beta-amyloid precursor protein and notch processing. *J Cell Biol* 152 (4), 785-94.
- Spasic, D., Tolia, A., Dillen, K., Baert, V., De Strooper, B., Vrijens, S., Annaert, W., 2006. Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway. *J Biol Chem* 281 (36), 26569-77.
- Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack, C.R., Jr., Kaye, J., Montine, T.J., Park, D.C., Reiman, E.M., Rowe, C.C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M.C., Thies, B., Morrison-Bogorad, M., Wagster, M.V., Phelps, C.H., 2011. Toward defining the preclinical stages of alzheimer's disease: Recommendations from the national institute on aging-alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7 (3), 280-92.
- Spillantini, M.G., Goedert, M., 2013. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol* 12 (6), 609-22.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., Prusiner, S.B., 1987. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51 (2), 229-40.
- Steiner, H., Romig, H., Grim, M.G., Philipp, U., Pesold, B., Citron, M., Baumeister, R., Haass, C., 1999a. The biological and pathological function of the presenilin-1 delta exon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J Biol Chem* 274 (12), 7615-8.
- Steiner, H., Romig, H., Pesold, B., Philipp, U., Baader, M., Citron, M., Loetscher, H., Jacobsen, H., Haass, C., 1999b. Amyloidogenic function of the alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis. *Biochemistry* 38 (44), 14600-5.
- Stutzmann, G.E., Caccamo, A., Laferla, F.M., Parker, I., 2004. Dysregulated ip3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated ca²⁺ signals and altered membrane excitability. *J Neurosci* 24 (2), 508-13.
- Su, B., Wang, X., Bonda, D., Perry, G., Smith, M., Zhu, X., 2010. Abnormal mitochondrial dynamics--a novel therapeutic target for alzheimer's disease? *Mol Neurobiol* 41 (2-3), 87-96.
- Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K.T., Frobert, Y., Grassi, J., Mccaffrey, M.W., Morris, R., 2003. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J* 22 (14), 3591-601.
- Supnet, C., Bezprozvanny, I., 2010. The dysregulation of intracellular calcium in alzheimer disease. *Cell Calcium* 47 (2), 183-9.
- Suzuki, T., Nakaya, T., 2008. Regulation of amyloid beta-protein precursor by phosphorylation and protein interactions. *J Biol Chem* 283 (44), 29633-7.

- Taelman, V.F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J.L., Fuentealba, L.C., Vorwald, P.P., Gumper, I., Sabatini, D.D., De Robertis, E.M., 2010. Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* 143 (7), 1136-48.
- Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., Ihara, Y., 2009. Gamma-secretase: Successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *J Neurosci* 29 (41), 13042-52.
- Tanahashi, H., Kawakatsu, S., Kaneko, M., Yamanaka, H., Takahashi, K., Tabira, T., 1996. Sequence analysis of presenilin-1 gene mutation in japanese alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 218 (2), 139-41.
- Tandon, A., Fraser, P., 2002. The presenilins. *Genome Biol* 3 (11), reviews3014.
- Tanzi, R.E., 2012. The genetics of alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 (10).
- Tanzi, R.E., Mcclatchey, A.I., Lamperti, E.D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J.F., Neve, R.L., 1988. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mrna associated with alzheimer's disease. *Nature* 331 (6156), 528-30.
- Taylor, D.R., Hooper, N.M., 2007. Role of lipid rafts in the processing of the pathogenic prion and alzheimer's amyloid-beta proteins. *Semin Cell Dev Biol* 18 (5), 638-48.
- Terry, R.D., 1996. The pathogenesis of alzheimer disease: An alternative to the amyloid hypothesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 55 (10), 1023-5.
- Thinakaran, G., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., Hardy, J., Levey, A.I., Gandy, S.E., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L., Sisodia, S.S., 1996. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17 (1), 181-90.
- Tournoy, J., Bossuyt, X., Snellinx, A., Regent, M., Garmyn, M., Serneels, L., Saftig, P., Craessaerts, K., De Strooper, B., Hartmann, D., 2004. Partial loss of presenilins causes seborrhic keratosis and autoimmune disease in mice. *Hum Mol Genet* 13 (13), 1321-31.
- Tousseyn, T., Thathiah, A., Jorissen, E., Raemaekers, T., Konietzko, U., Reiss, K., Maes, E., Snellinx, A., Serneels, L., Nyabi, O., Annaert, W., Saftig, P., Hartmann, D., De Strooper, B., 2009. Adam10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of notch and other proteins, is processed by adams-9, adams-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem* 284 (17), 11738-47.
- Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S.F., Hao, Y.H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G., Bezprozvanny, I., 2006. Presenilins form er ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* 126 (5), 981-93.
- Uemura, K., Kihara, T., Kuzuya, A., Okawa, K., Nishimoto, T., Ninomiya, H., Sugimoto, H., Kinoshita, A., Shimohama, S., 2006. Characterization of sequential n-cadherin cleavage by adam10 and ps1. *Neurosci Lett* 402 (3), 278-83.

- Um, J.W., Nygaard, H.B., Heiss, J.K., Kostylev, M.A., Stagi, M., Vortmeyer, A., Wisniewski, T., Gunther, E.C., Strittmatter, S.M., 2012. Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates fyn to impair neurons. *Nat Neurosci* 15 (9), 1227-35.
- Van Der Flier, W.M., Pijnenburg, Y.A., Fox, N.C., Scheltens, P., 2011. Early-onset versus late-onset alzheimer's disease: The case of the missing apoe varepsilon4 allele. *Lancet Neurol* 10 (3), 280-8.
- Vassar, R., 2005. Beta-secretase, app and abeta in alzheimer's disease. *Subcell Biochem* 38, 79-103.
- Verkkoniemi, A., Kalimo, H., Paetau, A., Somer, M., Iwatsubo, T., Hardy, J., Haltia, M., 2001. Variant alzheimer disease with spastic paraparesis: Neuropathological phenotype. *J Neuropathol Exp Neurol* 60 (5), 483-92.
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., Dearmond, S.J., Smart, E.J., Anderson, R.G., Taraboulos, A., Prusiner, S.B., 1996. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (25), 14945-9.
- Vincent, B., 2004. Adam proteases: Protective role in alzheimer's and prion diseases? *Curr Alzheimer Res* 1 (3), 165-74.
- Vincent, B., Sunyach, C., Orzechowski, H.D., St George-Hyslop, P., Checler, F., 2009. P53-dependent transcriptional control of cellular prion by presenilins. *J Neurosci* 29 (20), 6752-60.
- Vingtdeux, V., Marambaud, P., 2012. Identification and biology of alpha-secretase. *J Neurochem* 120 Suppl 1, 34-45.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J., 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408 (6810), 307-10.
- Von Rotz, R.C., Kohli, B.M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R.M., Konietzko, U., 2004. The app intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci* 117 (Pt 19), 4435-48.
- Wadsworth, J.D., Collinge, J., 2007. Update on human prion disease. *Biochim Biophys Acta* 1772 (6), 598-609.
- Wadsworth, J.D., Joiner, S., Linehan, J.M., Cooper, S., Powell, C., Mallinson, G., Buckell, J., Gowland, I., Asante, E.A., Budka, H., Brandner, S., Collinge, J., 2006. Phenotypic heterogeneity in inherited prion disease (p102l) is associated with differential propagation of protease-resistant wild-type and mutant prion protein. *Brain* 129 (Pt 6), 1557-69.
- Walker, E.S., Martinez, M., Brunkan, A.L., Goate, A., 2005. Presenilin 2 familial alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in abeta 42/40 ratios. *J Neurochem* 92 (2), 294-301.
- Walker, L., Levine, H., Jucker, M., 2006. Koch's postulates and infectious proteins. *Acta Neuropathol* 112 (1), 1-4.

- Walsh, D.M., Selkoe, D.J., 2004. Deciphering the molecular basis of memory failure in alzheimer's disease. *Neuron* 44 (1), 181-93.
- Walter, J., Grunberg, J., Capell, A., Pesold, B., Schindzielorz, A., Citron, M., Mendla, K., George-Hyslop, P.S., Multhaup, G., Selkoe, D.J., Haass, C., 1997. Proteolytic processing of the alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase c. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (10), 5349-54.
- Wang, Y., Ha, Y., 2004. The x-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein e2 domain. *Mol Cell* 15 (3), 343-53.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J.F., Tanzi, R.E., Solomon, F., 1992. Identification of a mouse brain cdna that encodes a protein related to the alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (22), 10758-62.
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M.D., Romano, D.M., Sisodia, S.S., Hyman, B.T., Neve, R.L., Tanzi, R.E., 1993. Isolation and characterization of aplp2 encoding a homologue of the alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* 5 (1), 95-100.
- Wegmann, S., Medalsy, I.D., Mandelkow, E., Muller, D.J., 2013. The fuzzy coat of pathological human tau fibrils is a two-layered polyelectrolyte brush. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (4), E313-21.
- Weissmann, C., Bueler, H., Fischer, M., Sauer, A., Aguet, M., 1994. Susceptibility to scrapie in mice is dependent on prpc. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 343 (1306), 431-3.
- Wells, G.A., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M., Bradley, R., 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121 (18), 419-20.
- Wertkin, A.M., Turner, R.S., Pleasure, S.J., Golde, T.E., Younkin, S.G., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 1993. Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or a4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (20), 9513-7.
- Westergard, L., Christensen, H.M., Harris, D.A., 2007. The cellular prion protein (prp(c)): Its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772 (6), 629-44.
- Wilesmith, J.W., 1988. Bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 122 (25), 614.
- Wilesmith, J.W., Ryan, J.B., Hueston, W.D., 1992. Bovine spongiform encephalopathy: Case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates. *Res Vet Sci* 52 (3), 325-31.
- Will, R.G., 2003. Acquired prion disease: Iatrogenic cjd, variant cjd, kuru. *Br Med Bull* 66, 255-65.
- Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousens, S.N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., Smith, P.G., 1996. A new variant of creutzfeldt-jakob disease in the uk. *Lancet* 347 (9006), 921-5.

- Williams, E.S., Young, S., 1980. Chronic wasting disease of captive mule deer: A spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis* 16 (1), 89-98.
- Wilson, C.A., Murphy, D.D., Giasson, B.I., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2004. Degradative organelles containing mislocalized alpha-and beta-synuclein proliferate in presenilin-1 null neurons. *J Cell Biol* 165 (3), 335-46.
- Winblad, B., Andreasen, N., Minthon, L., Floesser, A., Imbert, G., Dumortier, T., Maguire, R.P., Blennow, K., Lundmark, J., Staufenbiel, M., Orgogozo, J.M., Graf, A., 2012. Safety, tolerability, and antibody response of active abeta immunotherapy with cad106 in patients with alzheimer's disease: Randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *Lancet Neurol* 11 (7), 597-604.
- Winklhofer, K.F., Tatzelt, J., Haass, C., 2008. The two faces of protein misfolding: Gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J* 27 (2), 336-49.
- Wisniewski, T., Sigurdsson, E.M., 2007. Therapeutic approaches for prion and alzheimer's diseases. *FEBS J* 274 (15), 3784-98.
- Wolfe, M.S., 2007. When loss is gain: Reduced presenilin proteolytic function leads to increased abeta42/abeta40. Talking point on the role of presenilin mutations in alzheimer disease. *EMBO Rep* 8 (2), 136-40.
- Wolfe, M.S., De Los Angeles, J., Miller, D.D., Xia, W., Selkoe, D.J., 1999a. Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of alzheimer's disease. *Biochemistry* 38 (35), 11223-30.
- Wolfe, M.S., Kopan, R., 2004. Intramembrane proteolysis: Theme and variations. *Science* 305 (5687), 1119-23.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Moore, C.L., Leatherwood, D.D., Ostaszewski, B., Rahmati, T., Donkor, I.O., Selkoe, D.J., 1999b. Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry* 38 (15), 4720-7.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., Selkoe, D.J., 1999c. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398 (6727), 513-7.
- Wortmann, M., 2012. Dementia: A global health priority - highlights from an adi and world health organization report. *Alzheimers Res Ther* 4 (5), 40.
- Wuthrich, K., Riek, R., 2001. Three-dimensional structures of prion proteins. *Adv Protein Chem* 57, 55-82.
- Xia, X., Qian, S., Soriano, S., Wu, Y., Fletcher, A.M., Wang, X.J., Koo, E.H., Wu, X., Zheng, H., 2001. Loss of presenilin 1 is associated with enhanced beta-catenin signaling and skin tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (19), 10863-8.
- Yagishita, S., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Ishiura, S., Ihara, Y., 2006. Dapt-induced intracellular accumulations of longer amyloid beta-proteins: Further implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *Biochemistry* 45 (12), 3952-60.

- Yamaguchi, H., Sugihara, S., Ogawa, A., Saido, T.C., Ihara, Y., 1998. Diffuse plaques associated with astroglial amyloid beta protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta Neuropathol* 95 (3), 217-22.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., Carter, D.B., Tomasselli, A.G., Parodi, L.A., Heinrikson, R.L., Gurney, M.E., 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402 (6761), 533-7.
- Yan, S.D., Bierhaus, A., Nawroth, P.P., Stern, D.M., 2009. Rage and alzheimer's disease: A progression factor for amyloid-beta-induced cellular perturbation? *J Alzheimers Dis* 16 (4), 833-43.
- Yin, H., Kuret, J., 2006. C-terminal truncation modulates both nucleation and extension phases of tau fibrillization. *FEBS Lett* 580 (1), 211-5.
- You, H., Tsutsui, S., Hameed, S., Kannanayakal, T.J., Chen, L., Xia, P., Engbers, J.D., Lipton, S.A., Stys, P.K., Zamponi, G.W., 2012. Abeta neurotoxicity depends on interactions between copper ions, prion protein, and n-methyl-d-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (5), 1737-42.
- Zacchetti, D., Chierigatti, E., Bettegazzi, B., Mihailovich, M., Sousa, V.L., Grohovaz, F., Meldolesi, J., 2007. Bace1 expression and activity: Relevance in alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 4 (2-3), 117-26.
- Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., Von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G., Wuthrich, K., 2000. Nmr solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (1), 145-50.
- Zhang, H., Sun, S., Herreman, A., De Strooper, B., Bezprozvanny, I., 2010. Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis. *J Neurosci* 30 (25), 8566-80.
- Zhang, Z., Nadeau, P., Song, W., Donoviel, D., Yuan, M., Bernstein, A., Yankner, B.A., 2000. Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-app and transmembrane cleavage of notch-1. *Nat Cell Biol* 2 (7), 463-5.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M.E., Sirinathsinghji, D.J., Hopkins, R., Smith, D.W., Heavens, R.P., Dawson, G.R., Boyce, S., Conner, M.W., Stevens, K.A., Slunt, H.H., Sisoda, S.S., Chen, H.Y., Van Der Ploeg, L.H., 1995. Beta-amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81 (4), 525-31.

9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. Markus Glatzel für die interessante Themenstellung, die ausgezeichnete Unterstützung und die zahlreichen Diskussionen und Anregungen.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. Diego Sepulveda-Falla für die umfangreiche Betreuung und die vielen interessanten fachlichen Diskussionen.

Darüber hinaus gilt mein herzlicher Dank Herrn Dr. rer. nat. Hermann Altmepfen, der mich mit Geduld und Verständnis in die Laborarbeit eingewiesen hat und mir während der ganzen Arbeit in jeder Hinsicht zur Seite stand. Ich danke ihm sehr für die intensive Betreuung, die freundliche Atmosphäre und die Unterstützung sowohl im fachlichen als auch im außerfachlichen Bereich.

Desweiteren bedanke ich mich bei jedem einzelnen Mitarbeiter des Instituts für Neuropathologie; insbesondere Beata Szalay, Giovanna Galliciotti, Berta Puig-Martorell, Susanne Krasemann, Clemens Falker, Frank Dohler, Alvaro Andres Barrera Ocampo und Karima Chakroun, für die große Hilfsbereitschaft und die interessanten Gespräche.

Ich danke Herrn Johannes Prox (AG Paul Saftig, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) für die Bereitstellung des Zellmodells (MEFs) und Frau Lucia Chavez Gutierrez (AG Bart De Strooper, Center for Human Genetics Vlaams, Instituut voor Biotechnologie (VIB) Katholieke Universiteit Leuven) für die Bereitstellung der stabil transfizierten Zellen (MEFs) sowie Herrn Florian Wegwitz (Institut für Tumorbologie, Zentrum für Experimentelle Medizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)) für die Durchführung sämtliche RT-PCR-Messungen. Zudem bedanke ich mich beim UKE Microscopy Imaging Facility (umif) für die Unterstützung bei der Mikroskopie.

Mein tiefster Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden; insbesondere bedanke ich mich bei Yvonne Otter für ihre Ermutigungen und besondere Unterstützung und bei Natalie Tadych für das Korrekturlesen und die bereicherenden Gespräche.

10 LEBENS LAUF

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

11 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation:

„Der Einfluss von Präsenilinen und Präsenilin-Mutationen auf die Expression des Prionproteins“

Selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ferner wurde diese Dissertation oder Teile dieser Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfung vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

.....
Ort, Datum

.....
Samer G. A. Swileh