

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Institut für Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere
Abteilung Biochemie
Leiterin: Prof. Dr. B. Schmitz

**Untersuchungen zur Rolle der O-glykosidisch gebundenen N-Acetylglucosamin-
Modifikation von Proteinen beim proteolytischen Prozessieren des
humanen Amyloid Precursor Proteins**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaft
(Dr.oec.troph.)

der
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt am 27. Februar 2002

von
Carmen Mäß
aus Bonn

Referent: Prof. Dr. B. Schmitz

Koreferent: PD Dr. R. Wingender

Tag der mündlichen Prüfung:

Gedruckt bei:

E L E N A

Danksagung

Frau Prof. Dr. Brigitte Schmitz danke ich für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes sowie ihrer steten Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Frau PD Dr. Ruth Wingender danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Der Graduiertenförderung des Landes Nordrhein Westfalen möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken.

Allen früheren und jetzigen Mitarbeitern der Abteilung Biochemie sei gedankt für das freundschaftliche Arbeitsklima, die stete Hilfsbereitschaft sowie die Aufmunterung bei jeglichen Laborproblemen. Insbesondere bedanke ich mich bei der Abteilung Biochemie sowie dem gesamten Institut für Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere für die tatkräftige Unterstützung und unkomplizierte Lösung verschiedener Probleme während der Schwangerschaft.

Dr. Benedikta Langenfeld-Oster, Sabine Werner und Dr. Karsten Thelen gilt mein Dank für zahlreiche fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen und Anregungen. Claudia Müller möchte ich für die tatkräftige Hilfe in der Zellkultur sowie Dr. Jürgen Koch für die Bereitstellung der cDNA der OGT danken. Monica Wolff sowie Bernd Gehrig sei gedankt für die fotografische Unterstützung. Ich möchte mich auch besonders bei Ursula Munzel für ihre stete Hilfsbereitschaft in organisatorischen Fragen bedanken.

PD Dr. Thomas Bayer und Sascha Weggen gilt mein Dank für die Transfektion der N2a-Zellen. Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Viebahn danke ich für die Benutzung des Fluoreszenz-Mikroskops. Für die Bereitstellung von Antikörpern möchte ich mich bedanken bei den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. K. Beyreuther, Prof. Dr. G. Hart sowie Prof. Dr. Volker Herzog.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie:

Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mir jederzeit unterstützend unter die Arme gegriffen haben;

Meinem Mann Jörg, der immer ein offenes Ohr für meine Probleme und ein aufmunterndes Wort hatte und mich so unterstützt und motiviert hat.

Zusammenfassung

Das Amyloid Precursor Protein (APP) spielt eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Alzheimer Demenz (AD). APP wird durch die sog. α -, β - und γ -Sekretase zu verschiedenen proteolytischen Fragmenten gespalten. Diese Prozessierung von APP wird u.a. durch verschiedene Signalkaskaden reguliert.

O-glykosidisch an Serin- oder Threonin-Reste gebundenes N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) ist eine ubiquitäre intrazelluläre Kohlenhydratmodifikation von Proteinen. O-GlcNAc scheint u.a. die Assoziation von Proteinen zu beeinflussen und ein zur Phosphorylierung alternatives Signaltransduktionssystem darzustellen.

Basierend auf früheren Untersuchungen, in denen gezeigt worden war, dass (a) APP O-GlcNAc-modifiziert ist und (b) in humanen Hirnregionen von AD-Patienten die O-GlcNAc-Expression signifikant erhöht ist, sollte in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen für das proteolytische Prozessieren des humanen APP₆₉₅ untersucht werden. Dazu wurden Experimente an stabil mit der cDNA des humanen APP₆₉₅ transfizierten N2a-Zellen durchgeführt. Im Vergleich zu nicht-transfizierten, parental N2a-Zellen wiesen die das humane APP₆₉₅ exprimierenden N2a-Zellen längere Neuriten sowie eine gesteigerte Zelladhäsion auf. Die Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen an anderen APP-exprimierenden Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass das von den N2a-Zellen exprimierte humane APP₆₉₅ O-GlcNAc-modifiziert ist. Die unreife Form des Proteins wies eine stärkere O-GlcNAcylierung auf als die reife Form. Dies traf sowohl für den Wildtyp als auch die schwedische Mutante des humanen APP₆₉₅ zu.

Es wurde kein signifikanter Einfluss einer erhöhten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf die Sekretion des humanen APP_s bzw. APP_{s α} beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikant reduzierte Sekretion des humanen A β _{x-40} verzeichnet werden, was jedoch einer Absicherung durch weitere Versuche bedarf. Dieses vorläufige Ergebnis könnte auf eine Beteiligung der O-GlcNAcylierung an der Regulation der Prozessierung von APP hindeuten.

Des Weiteren führte die gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen zu einer verstärkten Expression des humanen APP₆₉₅ in Neuriten. Daraus lässt sich schließen, dass die O-GlcNAcylierung von APP selbst oder aber von anderen Proteinen möglicherweise eine wichtige Rolle beim axonalen Transport von APP spielt.

Abstract

The Amyloid precursor protein (APP) plays a central role in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). APP is cleaved by so-called α -, β - and γ -secretase leading to the generation of several proteolytic fragments. This processing of APP is regulated by a variety of different signaling pathways.

N-acetylglucosamine O-glycosidically linked to serine or threonine residues (O-GlcNAc) is a ubiquitous intracellular carbohydrate modification of proteins. O-GlcNAc may be involved in the multimerization of proteins and may function as an alternative signal transduction pathway to phosphorylation.

Based on former investigations demonstrating that (a) APP is O-GlcNAc-modified and (b) in human brain areas of AD patients the O-GlcNAc expression of proteins is significantly upregulated, the aim of the present study was to elucidate the role of the O-GlcNAc modification of proteins for the proteolytic processing of human APP₆₉₅. Experiments were performed on N2a cells stably transfected with the cDNA of human APP₆₉₅. Human APP₆₉₅ expressing N2a cells exhibited longer neurites and an increased cell adhesion compared to non-transfected, parental N2a cells. These observations are in agreement with former investigations on other APP-expressing cell types.

It was shown that human APP₆₉₅ expressed by N2a cells is O-GlcNAc-modified. The immature protein was more heavily O-GlcNAcylated than the mature form. This observation was shown to be true for the wild type as well as the Swedish mutant of human APP₆₉₅.

Increased O-GlcNAc-levels of proteins did not have any significant influence on the secretion of human APP_s and APP_{s α} respectively. On the contrary, it resulted in a significant reduction of the secreted human A β _{x-40}; this, however, needs to be confirmed in additional experiments. This preliminary result may hint at the involvement of O-GlcNAcylation in the regulation of the proteolytic processing of APP.

Furthermore, it was shown that the increased O-GlcNAc-levels of proteins lead to an enhanced expression of the human APP₆₉₅ in neurites. As a result, O-GlcNAcylation of APP itself or of other proteins may play a major role for the axonal transport of APP.

Abkürzungsverzeichnis

Aβ ₁₋₄₀	Aβ Peptid mit 1-40 Aminosäuren	DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyoxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumethylsulfat
Aβ ₁₋₄₂	Aβ Peptid mit 1-42 Aminosäuren	DPBS	Dulbecco's PBS
Aβ ₄₀	Aβ Peptid mit 40 Aminosäuren	DRG	Dorsal Root Ganglia
Aβ _{42/43}	Aβ Peptid mit 42 bzw. 43 Aminosäuren	<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
Aβ _{x-40/x-42}	N-terminal heterogene Aβ Peptide mit 40 bzw. 42 Aminosäuren	E	Glutamat
Abb.	Abbildung	EDTA	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazoliumsulfonsäure(6))	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
AD	Alzheimer Demenz	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease	EGTA	Ethylenglycol bis-(3-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-Tetraacetat
APLP	APP-ähnliche Proteine (Amyloid Precursor-Like Protein)	ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
APP	Amyloid Precursor Protein	ER	Endoplasmatische Retikulum
APP ₆₉₅	APP MIT (&) % Aminosäuren	ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
APP _{695Sw}	Schwedische Mutante von APP ₆₉₅	Fa.	Firma
APP _{695WT}	Wildtyp von APP ₆₉₅	FAD	Familiäre Form der Alzheimer Demenz
APP ₇₅₁	APP mit 751 Aminosäuren	FKS	Fötale Kälberserum
APP ₇₇₀	APP mit 770 Aminosäuren	fmol	Femtomol
APP _s	soluble Amyloid Precursor Protein	g	Gramm oder Gravitationskonstante (9,81 m/s)
APP _{sα}	durch α-Sekretase-Spaltung entstandenes APP _s	G	Glycin
APP _{sβ}	durch β-Skeretase-Spaltung entstandenes APP _s	GFAT	Glutamin:Fructose-6-Phosphat Amidotransferase
APP _{sKPI}	APP _s mit der KPI-Domäne	GlcNAc	N-Acetylglucosamin
APP _{Sw}	Schwedische Mutante von APP	Glu	Glutamat
APP _{WT}	Wildtyp von APP	GPI	Glykosylphosphatidylinositol
APS	Ammoniumpersulfat	GSK	Glykogen-Synthase-Kinase
Asp	Aspartat	GTP	Guanosintriphosphat
Asp	Asparaginsäure	h	Stunde(n)
ATP	Adenosintriphosphat	H	Histidin
BACE	Beta-site APP-Cleaving Enzyme	HBSS ⁻	Hank's Balanced Salt Solution ohne Calcium- und Magnesiumionen
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)	HEK	Human Embryonic Kidney
<i>C.</i>	<i>Caenorhabditis</i>	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-11-Piperazinethansulfonat
C83	C-terminales Fragment mit 83 Aminosäuren	Ho	Gesamthomogenat
C99	C-terminales Fragment mit 99 Aminosäuren	HSPG	Heparan Sulfat Proteoglycan
Cdk5	neuronale cdc-ähnliche Kinase	HTRF	Homogeneous Time-Resolved Fluorescence
cDNA	complementary DNA	I	Isoleucin
CHO	Chinese Hamster Ovary	Ig	Immunglobulin
CK	Caseinkinase	IK	Intermediär Kompartiment
CNBr	Cyanogenbromid	IP	Immunpräzipitation
CTF	C-terminales Fragment	IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
D	Asparaginsäure	kD	Kilodalton
DAB	Diaminobenzidin	KPI	Kunitz Protease Inhibitor
DC	Detergent Compatible	l	Liter
DIG	Detergent-Insoluble Glycolipid-enriched membrane domains	LOGNAC	2-Acetamido-2-deoxy-D-gluconhydroxim-1,5-lacton
DMSO	Dimethylsulfoxid	M	Mol/Liter
DNA	Deoxyribonucleic Acid	M	Methionin
		mA	Milliampere
		MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry

MAP	Microtubule Associated Protein oder Mitogen Activated Protein	S	Serin
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
mDab	mammalian Disabled	Ser	Serin
MG	Molekulargewichtsstandard	T	Threonin
min	Minute	TACE	Tumor Necrosis α Cleaving Enzyme
ml	Milliliter	TBS	Tris Buffered Saline
mm	Millimeter	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
mM	Millimol	TGF	Transforming Growth Factor
mRNA	Messenger RNA	TGN	trans-Golgi-Netzwerk
MS	Massenspektroskopie	TM	Transmembrandomäne
μ g	Mikrogramm	Tyr	Tyrosin
μ l	Mikroliter	ü. N.	über Nacht
μ M	Mikromol	UDP	Uridindiphosphat
N	Asparagin oder Stickstoff	UMP	Uridinmonophosphat
N2a-APP ₆₉₅ -Zellen	Mit der cDNA des humanen APP ₆₉₅ transfizierte N2a-Zellen	UTP	Uridintriphosphat
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule	v/v	volume/volume
nm	Nanometer	Vol.	Volumen
nm	Nanometer	w/v	weight/volume
NP40	Nonidet P 40	W	Tryptophan
NTF	N-terminales Fragment	WW	Proteindomänen, die poly-Prolin-Sequenzen erkennen
OD	Optische Dichte	Y	Tyrosin
O-GlcNAc	Sauerstoff-gebundenes N-Acetylglucosamin		
OGT	O-GlcNAc-Transferase		
P	Prolin		
p.a.	pro analysi		
p110	α -Untereinheit der O-GlcNAc-Transferase		
p78	β -Untereinheit der O-GlcNAc-Transferase		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
PBS	Phosphate Buffered Saline		
PC	Phäochromocytom		
PD	Privatdozent		
PFA	Paraformaldehyd		
pg	Picogramm		
PHF	Paarige helikale Filamente		
PID/PTB-Domäne	Phosphotyrosin-Interaktionsdomäne / Phosphotyrosin-Bindungsdomäne		
PIPES	1,4-Piperazinediethane Sulfonic Acid		
PKA	Protein Kinase A		
PKC	Protein Kinase C		
pLL	poly-L-Lysin		
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat		
pmol	Picomol		
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid		
POD	Peroxidase (aus Meerrettich)		
PS	Presenilin		
PUGNAc	O-(2-Acetamido-2-deoxy -D-glucopyranosyliden)-amino-N-phenylcarbamate		
R	Arginin		
RASM	Rat Aortic Smooth Muscle		
RNA	Ribonucleic Acid		
rpm	rounds per minute		
RT	Raumtemperatur		

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Alzheimer Krankheit	1
1.2	Histopathologische Merkmale der Alzheimer Demenz	1
1.2.1	Amyloide Plaques	1
1.2.2	Neurofibrilläre Stränge	2
1.3	Das Amyloid Precursor Protein (APP)	3
1.3.1	Expression und Struktur von APP	3
1.3.2	Funktionen von APP	4
1.3.3	Das proteolytische Prozessieren von APP	6
1.3.3.1	α -Sekretase	7
1.3.3.2	β -Sekretase	8
1.3.3.3	γ -Sekretase und Preseniline	9
1.3.4	A β und die Amyloid-Hypothese	12
1.4	Die Bedeutung der Phosphorylierung für das proteolytische Prozessieren von APP	15
1.5	Die O-GlcNAc-Modifikation	16
1.5.1	Mögliche Funktionen der O-GlcNAc-Modifikation	17
1.5.2	Enzyme des O-GlcNAc-Zyklus	20
1.5.2.1	Die O-GlcNAc-Transferase	20
1.5.2.2	Die O-GlcNAc-Hydrolase	21
1.5.3	Zusammenhang zwischen O-GlcNAc und der Alzheimer Krankheit	21
1.6	Zielsetzung der Arbeit	22
2.	Material und Methoden	24
2.1	Materialien und Geräte	24
2.1.1	Geräte	24
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3	Chemikalien	25
2.1.4	Antikörper	26
2.2	Lösungen und Puffer	27
2.3	Methoden	28
2.3.1	Zellkultur	28
2.3.1.1	Kultivierung und Subkultivierung von N2a- sowie COS-Zellen	28
2.3.1.2	Langzeit-Lagerung von Zellen	29
2.3.1.3	Transiente Transfektion von N2a- sowie COS-Zellen	29
2.3.1.4	Kultivierung von Zellen in Ab- und Anwesenheit von PUGNAc	30
2.3.1.5	Herstellung von Gesamthomogenaten von Zellen	30
2.3.1.6	Präparation der Detergens-löslichen Fraktion und Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraktion (nach Refolo et al., 1991)	31
2.3.1.7	Gewinnung von konditionierten Medien	32
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	32
2.3.3	Proteinchemische Methoden	32

2.3.3.1	Immunpräzipitation von APP aus Gesamthomogenaten	32
2.3.3.2	Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE	33
2.3.3.3	Commassie-Blau Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	34
2.3.3.4	Westernblot nach dem Semi-dry Verfahren	34
2.3.3.5	Ponceau-S-Färbung	35
2.3.3.6	Detektion von Proteinen durch Antikörper im Westernblot	35
2.3.3.7	Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA)	36
2.3.4	Antikörperisolierung aus Hühner-Eigelb (verändert nach Jensenius et al., 1981)	37
2.3.5	Kopplung des anti-APP _s -IgY-Antikörpers an CNBr-aktivierte Sepharose	37
2.3.6	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	38
3.	Ergebnisse	40
3.1	Nachweis der Expression und Sekretion des humanen APP₆₉₅ von stabil transfizierten N2a-Zellen	40
3.1.1	Nachweis der Expression des humanen APP ₆₉₅	41
3.1.2	Einzelzell-Klonierung	42
3.1.3	Nachweis der Sekretion des humanen APP _s	43
3.1.3.1	Nachweis der Sekretion von humanem APP _s mittels Westernblot	43
3.1.3.2	Nachweis der Sekretion des humanen APP ₆₉₅ mittels ELISA	45
3.1.3.3	Nachweis der Sekretion des humanen APP _s	46
3.2	Einfluss der Expression des humanen APP₆₉₅ auf N2a-Zellen	47
3.2.1	Morphologischer Vergleich der N2a- und N2a-APP ₆₉₅ -Zellen	47
3.2.2	Proteinbiochemischer Vergleich der N2a- und N2a-APP ₆₉₅ -Zellen	49
3.3	Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen aus N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen	51
3.4	Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation des humanen APP₆₉₅	52
3.5	Lokalisation des humanen APP₆₉₅ in verschiedenen Zellfraktionen	55
3.6	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit der cDNA der O-GlcNAc-Transferase	56
3.7	Einfluss von PUGNAc auf die O-GlcNAc-Modifikation und das proteolytische Prozessieren des humanen APP₆₉₅	58
3.7.1	Untersuchung des Einflusses von PUGNAc auf die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen	58
3.7.1.1	Untersuchung des Einflusses von PUGNAc auf die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen im Westernblot	59
3.7.1.2	Untersuchung des Einflusses von PUGNAc auf die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen mittels indirekter Immunfluoreszenz	60
3.7.2	Einfluss von PUGNAc auf die O-GlcNAc-Modifikation des humanen APP ₆₉₅	63
3.7.3	Einfluss von PUGNAc auf die Expression und Sekretion des humanen APP ₆₉₅	65
3.7.4	Einfluss von PUGNAc auf intrazelluläre Lokalisation des humanen APP ₆₉₅	67

3.7.4.1	Einfluss von PUGNAc auf die Lokalisation des humanen APP ₆₉₅ in verschiedenen Zellfraktionen	67
3.7.4.2	Immuncytochemische Untersuchung des Einflusses von PUGNAc auf die intrazelluläre Lokalisation des humanen APP ₆₉₅	68
4.	Diskussion	72
4.1	Metabolismus des humanen APP₆₉₅	72
4.1.1	Nachweis der Expression des humanen APP ₆₉₅ in N2a-Zellen mittels Westernblot-Analyse sowie indirekter Immunfluoreszenz	72
4.1.2	Untersuchungen zur Sekretion des humanen APP _s bzw. APP _{sα}	74
4.1.3	Untersuchungen zur Sekretion des humanen Aβ	74
4.1.4	Untersuchungen von intrazellulärem humanem Aβ	76
4.2	Die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen	77
4.2.1	Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen mittels Westernblot	77
4.2.2	Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen mittels indirekter Immunfluoreszenz	79
4.2.3	Die O-GlcNAc-Modifikation des humanen APP ₆₉₅	79
4.3	Untersuchungen zur Assoziation des humanen APP₆₉₅ mit dem Cytoskelett	81
4.4	Einfluss der Expression des humanen APP₆₉₅ auf die N2a-Zellen	83
4.4.1	Einfluss der Expression des humanen APP ₆₉₅ auf das Neuritenwachstum	83
4.4.2	Einfluss der Expression des humanen APP ₆₉₅ auf die Zelladhäsion	84
4.5	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen mit der cDNA der O-GlcNAc-Transferase (OGT)	85
4.6	Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf das proteolytische Prozessieren des humanen APP₆₉₅	86
4.6.1	Einfluss einer gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf die Expression des humanen APP ₆₉₅	86
4.6.2	Einfluss einer gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf die Sekretion des humanen APP _s bzw. APP _{sα}	86
4.6.3	Einfluss einer gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf die Sekretion des humanen Aβ	89
4.6.4	Einfluss einer gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf die subzelluläre Lokalisation des humanen APP ₆₉₅	90
5.	Zusammenfassung	92
6.	Literatur	95

1. Einleitung

1.1 Die Alzheimer Krankheit

Die Alzheimer Krankheit betrifft ca. 5-20 % der älteren Bevölkerung. In den westlichen Industrieländern ist sie neben der koronaren Herzkrankheit, Krebs und Apoplexie die vierthäufigste Todesursache (Haass und De Strooper, 1999; Schultz et al., 2001).

Bei der Alzheimer Demenz (AD) handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung. In die Pathogenese sind u.a. genetische, metabolische sowie Umweltfaktoren involviert (Iqbal et al., 1994). Man unterscheidet zwei Formen der Krankheit. Am häufigsten kommt die senile oder sporadische Form vor. Diese ist durch einen späten Krankheitsbeginn (>65 Jahre) gekennzeichnet. Die wesentlich seltenere, familiäre Form der AD (FAD) bricht schon in jüngerem Alter (<60 Jahre) aus. Insgesamt weniger als 5 % der gesamten Erkrankungen sind auf Mutationen in drei verschiedenen Genen zurückzuführen (APP, Presenilin 1 und 2).

1.2 Histopathologische Merkmale der Alzheimer Demenz

Charakteristisch für die AD sind neben dem Verlust von Synapsen und dem Absterben von Neuronen vor allem anormale Proteinablagerungen im cerebralen Cortex und Hippocampus (Sinha und Lieberburg, 1999).

1907 beschrieb der Psychologe Alois Alzheimer erstmals die charakteristischen histopathologischen Veränderungen anhand eines Gehirnpräparates einer verstorbenen 51jährigen Patientin. Auguste D. wies zu Lebzeiten u.a. Anzeichen eines zunehmenden Gedächtnisverlustes und Halluzinationen auf (Alzheimer, 1907; Maurer et al., 1997). Heute weiß man, dass es sich bei den histopathologischen Veränderungen um extrazelluläre amyloide Plaques und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel handelt.

1.2.1 Amyloide Plaques

Die amyloiden Plaques in Hirnen von Alzheimer Patienten enthalten fibrilläre und nicht-fibrilläre Formen des sog. A β , einem 4 kD großen Peptid, das durch Proteolyse aus dem Amyloid Precursor Protein entsteht (De Strooper und Annaert, 2000; Lichtenthaler et al., 1997) (siehe 1.3.4). Weitere Bestandteile sind Apolipoprotein E, verschiedene Proteasen

und andere Proteine (Dawbarn und Allen, 1995). A β -Ablagerungen kommen auch in Basalmembranen einiger cerebralen Kapillaren, Arteriolen und Venolen sowie in einigen meningealen Arteriolen vor (Selkoe, 1999).

Man unterscheidet im allgemeinen zwei Arten der Plaques. In den präamyloiden oder diffusen Plaques liegt A β in nicht-fibrillärer, α -helikaler Konformation vor. Diese Plaques bestehen hauptsächlich aus den um zwei bis drei Aminosäuren längeren, stark amyloido-genen Formen des Peptids (A β 42/43) (siehe 1.3.4), während reife oder neuritische Plaques zusätzlich A β 40 und A β 42/43 in der β -Faltblatt-Konformation enthalten. Außerdem enthalten sie neben den oben genannten Proteinen degenerierte Neuriten. In der Peripherie der Plaques befinden sich zudem reaktive Astrocyten, und innerhalb des Zentrums der Plaques sind auch aktivierte Mikroglia nachgewiesen worden.

Zwischenformen der Plaques enthalten fibrilläre und nicht-fibrilläre A β -Formen. Sie sind zudem in unterschiedlichem Ausmaß mit aktivierten Gliazellen und veränderten (z.B. geschwollenen) Neuriten assoziiert (Iwatsubo et al., 1994; Selkoe, 2000).

1.2.2 Neurofibrilläre Stränge

Die intrazellulären neurofibrillären Stränge bestehen aus nicht-membrangebundenen Bündeln paariger helikaler Filamente (PHF). Hauptbestandteil der PHF ist die hyperphosphorylierte Form des Tau-Proteins.

Tau gehört zu der Familie der mit den Mikrotubuli assoziierten Proteinen. In gesunden Neuronen reguliert das Protein die Assoziation und Stabilisierung axonaler Mikrotubuli sowie den Transport von Vesikeln bzw. Organellen entlang der Mikrotubuli (Mandelkow, 1999). Über seine Mikrotubuli-Bindungsdomäne kann Tau auch an sich selbst binden (Busciglio et al., 1995). Zudem kann das Protein in Abhängigkeit der Phosphorylierung mit der Plasmamembran assoziieren und mit den Tyrosin-Kinasen fyn und src interagieren. Daher ist Tau auch direkt in Signalkaskaden involviert (Götz, 2001).

Die Assoziation von Tau mit den Mikrotubuli wird durch Phosphorylierung reguliert. So ist anscheinend eine moderate Phosphorylierung von Tau für die Flexibilität der Mikrotubuli nötig. Nach bisheriger Auffassung setzt die Hyperphosphorylierung¹ von Tau dessen Bindungsfähigkeit an die Mikrotubuli herab. In Folge dessen depolymerisieren die Mikro-

¹ Hyperphosphoryliertes Tau ist nicht nur an physiologischen Stellen in stärkerem Maße sondern auch an sog. anormalen Epitopen phosphoryliert (Götz, 2001).

tubuli. Die gesteigerte Menge an ungebundenem, hyperphosphoryliertem Tau könnte ein erster Schritt in der Fibrillenbildung sein (Götz, 2001; Imahori und Uchida, 1997; Mandelkow, 1999) (siehe auch 1.3.4). Möglicherweise findet die (Hyper-)Phosphorylierung von Tau jedoch auch erst nach dessen Aggregation statt. Es konnte sogar ein protektiver Effekt der (Hyper-)Phosphorylierung von Tau bezüglich der Bildung der PHF gezeigt werden (Schneider et al., 1999).

In vitro können verschiedene Kinasen bzw. Phosphatasen Tau phosphorylieren bzw. dephosphorylieren. Zu den Kinasen gehören u.a. die Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β), die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) sowie die neuronale cdc-ähnliche Kinase (Cdk5) (Schultz et al., 2001). Letztere scheint in Hirnen von Alzheimer Patienten dereguliert zu sein. Zudem akkumuliert die Cdk5 in Neuronen, die fibrilläre Stränge enthalten (Patrick et al., 1999). Die Protein-Phosphatasen 1, 2A und 2B sowie Calcineurin können Tau dephosphorylieren. Die Protein-Phosphatase 2A, die im Gehirn stark exprimiert wird, ist u.a. auch mit den Mikrotubuli und Tau assoziiert (Götz, 2001).

Einige der bei der AD als hyperphosphoryliert nachgewiesenen Aminosäuren von Tau sind auch unter physiologischen Bedingungen phosphoryliert. Dies ist insbesondere in fötalen Geweben und in noch nicht ausdifferenzierten Neuronen zu beobachten. Es wird vermutet, dass die Phosphorylierung von Tau im Zusammenhang mit der Proliferationsfähigkeit embryonaler Neuronen zu sehen ist und dass bei der AD Proliferationsmechanismen als Antwort auf Degenerationsvorgänge initiiert werden, zu denen die verstärkte Phosphorylierung von Tau gehört (Preuss et al., 1995).

1.3 Das Amyloid Precursor Protein (APP)

1.3.1 Expression und Struktur von APP

A β wurde zuerst als Bestandteil der Amyloidablagerungen in meningealen Blutgefäßen und kurze Zeit später als Hauptbestandteil der amyloiden Plaques identifiziert (Glennner und Wong, 1984; Masters et al., 1985). Klonierung des zugehörigen Gens, das auf Chromosom 21 lokalisiert ist, ergab, dass A β ein Peptidfragment von APP darstellt (Kang et al., 1987; Tanzi et al., 1987).

APP ist Mitglied einer Proteinfamilie, zu der auch die APP-ähnlichen Proteine APLP1 und APLP2 gehören, denen jedoch die A β -Region fehlt (Wasco et al., 1992; Slunt et al., 1994). APP und APLPs sind vermutlich redundante Proteine. So weisen APP-*knock-out*-Mäuse

erst im späteren Leben u.a. cerebrale Gliosis sowie Veränderungen im Bewegungsverhalten auf (Selkoe, 1999; Zheng et al., 1995). Doppel-*knock-out*-Mäuse, denen APP und APLP2 bzw. APLP1 und APLP2 fehlen, sterben vor der Geburt (von Koch et al., 1997; Heber et al., 2000). In *Drosophila*, *C. elegans* und *Xenopus* wurden homologe Proteine identifiziert (De Strooper und Annaert, 2000).

APP ist ein Typ 1 Transmembranprotein. Es besteht aus einer großen extrazellulären N-terminalen, einer transmembranen sowie einer kurzen cytoplasmatischen Domäne. Das Protein wird ubiquitär exprimiert und ist zwischen Spezies hoch konserviert (De Strooper und Annaert, 2000). Durch alternatives Spleißen der APP-mRNA entstehen insgesamt 8 Isoformen (Wilson et al., 1999).

Drei Isoformen (APP₆₉₅, APP₇₅₁ und APP₇₇₀¹) kommen überwiegend im Gehirn vor. APP₆₉₅ wird hauptsächlich von Neuronen, APP₇₅₁ und APP₇₇₀ hingegen von Glia- und anderen nicht-neuronalen Zellen exprimiert (Small et al., 1996; Wilson et al., 1999). Im Gegensatz zu APP₆₉₅ enthalten APP₇₅₁ und APP₇₇₀ eine 56 Aminosäuren große Domäne in ihrem N-Terminus, die Homologie zu der Kunitz-Familie von Serinproteasen aufweist (KPI-Domäne; Sinha und Lieberburg, 1999).

Aufgrund seines Signalpeptids wird APP co-translational im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert. Die Reifung erfolgt im konstitutiven Exozytoseweg. APP wird zunächst N- und O-glykosyliert, später phosphoryliert, tyrosinsulfatiert sowie sialyliert (Weidemann et al., 1989).

Nur ein geringer Prozentsatz des APP-Holoproteins lässt sich an der Zelloberfläche nachweisen (Selkoe, 1998). Die cytoplasmatische NPTY-Sequenz ermöglicht die Reinternalisierung in Clathrin-bedeckten Vesikeln. In Lysosomen erfolgt dann teilweise der Abbau von APP (Koo und Squazzo, 1994; Golde et al., 1992).

1.3.2 Funktionen von APP

Die genauen Funktionen von APP bzw. dessen Proteolyseprodukten APP_s, A β sowie des C-Terminus sind noch weitgehend unbekannt. Die Struktur des membrangebundenen APP deutet jedoch auf eine Funktion als Zelloberflächenrezeptor hin (Kang et al., 1987). Da APP eine ähnliche Struktur wie Integrine besitzt, könnte membrangebundenes APP ähn-

¹ Die Zahl gibt die Anzahl der Aminosäuren an.

liche Funktionen aufweisen, wie beispielsweise die Vermittlung der Zelladhäsion (Chow et al., 1996) (siehe 4.4.2). So wurde für APP_s gezeigt, dass es *in vitro* Zell-Zell- bzw. Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktionen neuronaler und nicht-neuronaler Zellen fördert (Schubert et al., 1989).

Möglicherweise spielt APP aber auch eine wichtige Rolle bei der neuronalen Differenzierung während der Gehirnentwicklung (Qiu et al., 1995; Hung et al., 1992). So wiesen beispielsweise Neuronen aus dem Hippocampus von APP-*knock-out*-Mäusen eine eingeschränkte Lebensfähigkeit sowie eine verzögerte neuronale Entwicklung auf (Perez et al., 1997). Zudem könnte die Lokalisation von APP in Synapsen auf eine Rolle von APP bei der Neuritenextension (siehe 4.4.1) oder der synaptischen Transmission hinweisen (Muller et al., 1994).

Außerdem beeinflussen sowohl APP_s als auch A β offenbar den intrazellulären Calcium-Spiegel (Mattson et al., 1993; Mattson et al., 1998). Da APP_{sKPI}¹ dem Inhibitor der Serinprotease Nexin II bzw. einem Inhibitor der Blutgerinnungsfaktoren XIa und IXa entspricht, könnte diese spezielle APP-Form an der Regulation der Blutgerinnung beteiligt sein (Oltersdorf et al., 1989; Davis-Salinas et al., 1994; Saitoh und Mook-Jung, 1996).

Inzwischen konnten verschiedene Bindungspartner der cytoplasmatischen Domäne von APP identifiziert werden (Abb. 1). Dazu gehört das in den Zellzyklus involvierte APP-BP1 sowie die Adapterproteine X11 und Fe65 (Neve et al., 2000; Russo et al., 1998). Der an Fe65 gebundene C-Terminus scheint nach Translokation in den Zellkern an der Transkriptionsaktivierung bestimmter Gene beteiligt zu sein (siehe auch 1.3.3.3) (Cao und Südhof, 2001; Cupers et al., 2001; Kimberly et al., 2001; Minopoli et al., 2001).

Auch das in Signalkaskaden involviert G_o, das G-Protein in den Wachstumskegeln, bindet an APP, wobei Bindung von G_o an die schwedische Mutante von APP (APP_{sw}) (siehe Abb. 2 sowie 1.3.4) Apoptose auslöst (Russo et al., 1998; Neve et al., 2000; Yamatsuji et al., 1996).

APP wird des Weiteren im C-Terminus durch verschiedene Caspasen gespalten (LeBlanc et al., 1999; Pellegrini et al., 1999), was ebenfalls im Zusammenhang mit möglichen pro- oder antiapoptotischen Eigenschaften diskutiert wird (De Strooper und Annaert, 2000).

¹ APP_s mit der KPI-Domäne (siehe 1.3.1).

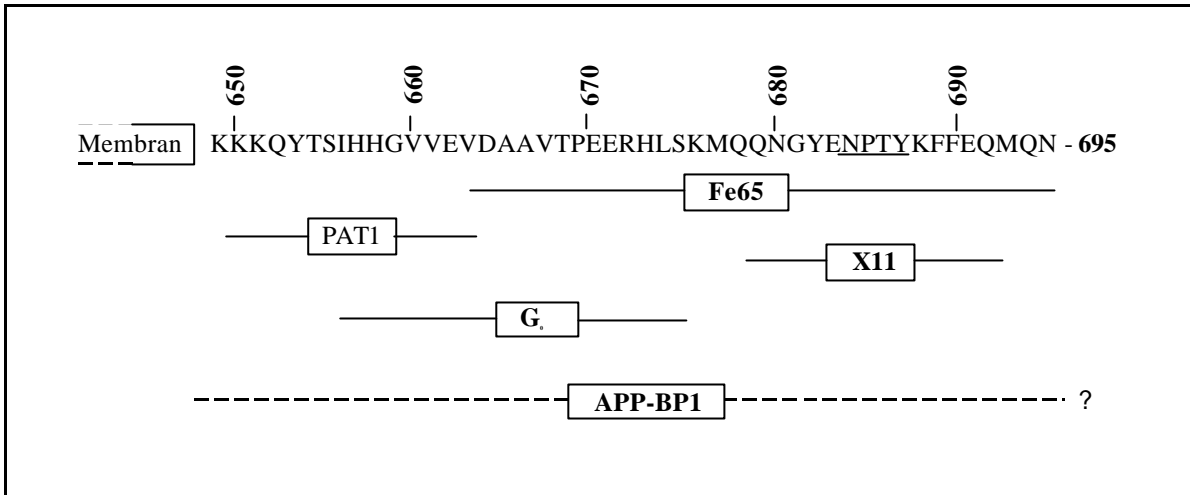


Abb. 1: Aminosäuresequenz der cytoplasmatischen Domäne von APP und dessen Bindungspartner (nach Russo et al., 1998)

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der cytoplasmatischen Domäne von APP mit den minimalen Regionen, die für die Bindungen an die Proteine PAT1, Fe65, X11, G₀ bzw. APP-BP1 von APP gezeigt wurden. Die Signalsequenz für Endocytose durch Clathrin bedeckte Vesikel ist unterstrichen.

1.3.3 Das proteolytische Prozessieren von APP

Drei verschiedene Proteinasen sind für das proteolytische Prozessieren von APP verantwortlich: α -, β - sowie γ -Sekretase (Abb. 2).

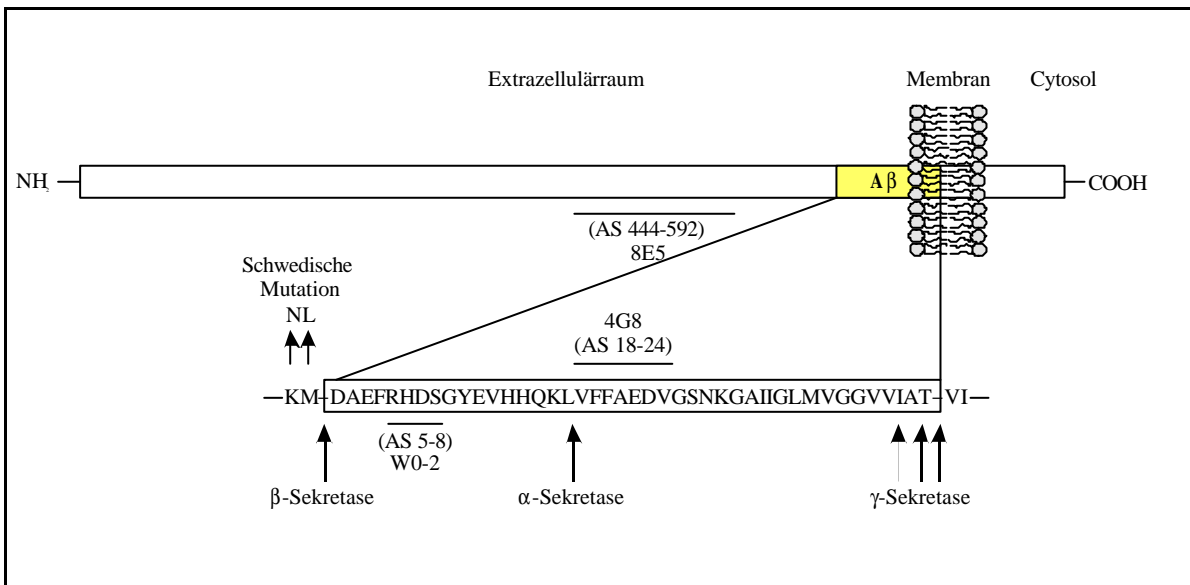


Abb. 2: Schematische Darstellung von APP und der Sekretase-Spaltstellen

Dargestellt ist APP mit den α -, β - und γ -Sekretase-Spaltstellen, die Aminosäuresequenz von A β sowie die von der schwedischen Mutante betroffenen Aminosäuren. Außerdem sind die durch die Antikörper 8E5, W0-2 sowie 4G8 erkannten Peptidsequenzen eingezeichnet.

Die α -Sekretase (siehe 1.3.3.1) spaltet membrangebundenes APP in einer definierten Entfernung von der Zelloberfläche zwischen Lysin 16 und Leucin 17 der A β -Domäne. Dabei entstehen das lösliche APP_{s α} (ca. 90-100 kD) sowie das membrangebundene C-terminale Fragment C83 (CTF; ca. 10 kD) (Schubert et al., 1989). Da die α -Sekretase-Spaltung innerhalb der A β -Region stattfindet, wird die Entstehung von A β verhindert.

Alternativ kann membrangebundenes APP durch die kürzlich identifizierte β -Sekretase (siehe 1.3.3.2) prozessiert werden. Dabei entstehen das sog. APP_{s β} sowie das membran-gebundene CTF C99 (ca. 12 kD). Diese Spaltung erfolgt ca. 28 Aminosäuren N-terminal von der Membran entfernt. C99 enthält somit die gesamte A β -Region (Neve et al., 2000; Nunan und Small, 2000; Selkoe, 1999).

C83 und C99 können weiterhin durch die potentielle γ -Sekretase (siehe 1.3.3.3) gespalten werden. Im Falle des C83 entsteht das Peptid p3 (ca. 3 kD), das sezerniert oder aber in den Lysosomen abgebaut wird. Durch γ -Sekretase-Spaltung des C99 entsteht das Peptid A β (ca. 4 kD) (Haass et al., 1992; Schubert et al., 1989; Thinakaran et al., 1996a).

1.3.3.1 α -Sekretase

Die primäre Aminosäuresequenz von APP ist vermutlich nicht entscheidend für die Spaltung durch die α -Sekretase. Hingegen scheinen dafür folgende Parameter essentiell zu sein: eine α -helikale Konformation, der Abstand der Spaltstelle von der Membran sowie eine basische Aminosäure (Arginin 672 von APP₆₉₅) in der cytoplasmatischen Domäne von APP (Sisodia, 1992; Tomita et al., 1998). Es wurden bisher eine basale oder konstitutiv exprimierte sowie eine durch Protein Kinase C (PKC) aktivierbare, d.h. regulierbare α -Sekretase-Aktivität nachgewiesen (siehe 1.4).

Verschiedene Proteasen weisen α -Sekretase-Aktivität auf:

1. TACE (Tumor Necrosis _{α} Cleaving Enzyme = ADAM¹-17): TACE kann ein synthetisches Peptid mit einer Aminosäuresequenz, die der α -Sekretase-Schnittstelle entspricht, spalten. Zudem beeinflusst die Inhibition des Enzyms durch „Immunex Compound 3“, einem effektiven Inhibitor von Proteasen der ADAM-Familie, die APP_{s α} - und A β -Bildung. Allerdings weisen Zellen von TACE-*knock-out*-Mäusen eine basale APP_{s α} -Sekretion auf (Buxbaum et al., 1998).

¹ ADAM = A Disintegrin And Metalloprotease

2. ADAM-10: Überexpression von ADAM-10 in HEK293-Zellen resultiert in einer gesteigerten konstitutiven sowie regulierten APP_{sα}-Sekretion. Allerdings führt eine dominant negative Form des Enzyms nicht zur kompletten Inhibition der APP_{sα}-Sekretion (Lammich et al., 1999). Somit scheinen sowohl TACE als auch ADAM-10 eine Rolle bei der regulierten α-Sekretase-Spaltung zu spielen (Skovronsky et al., 2000a).
3. Die membrangebundene Metalloprotease MDC9, ebenfalls eine Protease der ADAM-Familie kann APP an der α-Sekretase-Spaltstelle schneiden, was durch Phorbol ester aktivierbar ist (Koike et al., 1999).
4. Möglicherweise stellt die Prohormon-Konvertase PC7 eine konstitutiv exprimierte α-Sekretase dar. Allerdings könnte PC7 auch die als Proproteine synthetisierten Enzyme TACE und ADAM-10 aktivieren und so als „Pro-α-Sekretase“ fungieren (Lopez-Perez et al., 1999).
5. Auch Proteasomen könnten an der α-Sekretase Aktivität beteiligt sein (Marambaud et al., 1996; Marambaud et al. 1997a; Marambaud et al. 1997b; Nunan et al., 2001; Skovronsky et al., 2000b).

1.3.3.2 β-Sekretase

Vor ca. zwei Jahren konnten fünf verschiedene Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Methoden unabhängig von einander die β-Sekretase BACE (Beta-site APP-Cleaving Enzyme) identifizieren (Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999; Lin et al., 2000). Kurze Zeit später wurde das homologe Enzym BACE2 identifiziert (Vassar und Citron, 2000).

BACE weist alle nötigen Eigenschaften einer β-Sekretase auf: 1. Das Enzym wird von den meisten Zelltypen exprimiert. 2. BACE und APP werden co-exprimiert und sind subzellulär co-lokalisiert, z.B. in Kompartimenten des sekretorischen Weges sowie in Endosomen. 3. BACE besitzt ein für Endosomen typisches saures pH-Optimum. 4. Das Enzym ist insbesondere in Neuronen aktiv. 5. BACE spaltet an der für die β-Sekretase typischen Aminosäure Asp 1 von Aβ, und es spaltet APP_{sw} besonders effizient (Sinha et al., 1999; Yan et al., 1999; Hussain et al., 1999; Vassar et al., 1999).

BACE und BACE2 sind Typ 1 Transmembranproteine. Ihr aktives Zentrum ist dem Lumen des ER bzw. Golgi-Komplexes zugewandt. Die Gene von BACE bzw. BACE2 befinden sich auf Chromosom 11 bzw. 21, also auf Chromosomen, deren Assoziation mit AD schon länger bekannt ist. BACE2 ist möglicherweise in die AD-Pathogenese bei der Trisomie 21 (Down Syndrom) (siehe 1.3.4) involviert (Vassar und Citron, 2000).

Die stärkste Enzymaktivität ist im Gehirn zu beobachten. Der Pankreas hingegen weist die höchste mRNA-Expression auf (Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999; Sinha et al., 1999). Da eine bestimmte Spleißvariante von BACE ausschließlich im Pankreas exprimiert wird, könnte die Enzymaktivität durch gewebespezifisches alternatives Spleißen reguliert werden (Bodendorf et al., 2001). Die für Aspartat-Proteasen ungewöhnlichen 6 Disulfid-Brücken können ebenfalls die enzymatischen Eigenschaften beeinflussen (Vassar und Citron, 2000).

1.3.3.3 γ -Sekretase und Preseniline

Im Gegensatz zur α - und β -Sekretase spaltet die noch unbekannt γ -Sekretase APP auf noch ungeklärte Weise innerhalb der Transmembrandomäne. Eine ähnliche intramembranöse Spaltung findet auch bei dem Transmembranprotein Notch statt, an der wie bei der Spaltung von APP die Preseniline beteiligt sind. Die durch die γ -Sekretase freigesetzte intrazelluläre Domäne von Notch kann im Zellkern die Transkription aktivieren (De Strooper und Annaert, 2000; Selkoe, 2000). Ein ähnlicher Vorgang wurde auch für das durch die γ -Sekretase-Spaltung von APP-C83 bzw. -C99 entstandene C-terminale Fragment nachgewiesen, wobei allerdings die Bindung von C83 bzw. C99 an Fe65 erforderlich ist (Cao und Südhof, 2001; Cupers et al., 2001; Kimberly et al., 2001; Minopoli et al., 2001).

Es gibt zunehmend Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen den Presenilinen und der γ -Sekretase.

Presenilin 1 (PS1) wurde als das Gen auf Chromosom 14 identifiziert, für das eine Assoziation bei 50 % bis 60 % aller FAD-Erkrankungen gezeigt worden war (Sherrington et al., 1995; Doan et al., 1996; Thinakaran et al., 1996b). Das Genprodukt eines homologen Gens auf Chromosom 1, wurde entsprechend Presenilin 2 (PS2) bezeichnet (Levy-Lahad et al., 1995).

Die Presenilin-Gene weisen eine gewisse Homologie zu den *C. elegans* Genen sel-12 und spe-4 auf. Sel-12 ist in die lin-12/Notch-Signalkaskade involviert, die wichtig für die Zelldifferenzierung ist. Spe-4 spielt eine Rolle bei der Spermatogenese durch Regulation der Proteinzielsteuerung im Golgi-Komplex (Selkoe, 1999; Thinakaran et al., 1996b; Mattson et al., 1998). Der Phänotyp von sel-12-Mutanten wird durch die Preseniline, aber nur bedingt durch deren FAD-Mutanten, aufgehoben. Dies weist auf konservierte Funktionen der vier Proteine hin (Capell et al., 1998).

Die Preseniline sind Transmembranproteine mit wahrscheinlich 8 Transmembrandomänen (TM) (siehe Abb. 3). Die Spaltung durch eine noch unbekannte Presenilase innerhalb der konservierten hydrophilen Schleife zwischen 6. und 7. TM führt zur Bildung eines N-terminalen und C-terminalen Fragmentes (NTF bzw. CTF), die nicht-kovalent miteinander assoziieren (Xia et al., 1998; Capell et al., 1998; Thinakaran et al., 1996b). Dieses Heterodimer stellt vermutlich die biologisch aktive Form der Preseniline dar (Haass und De Strooper, 1999; Capell et al., 1998).

Bis heute konnten mehr als 50 Mutationen in den Presenilin-Genen nachgewiesen werden, die wie oben erwähnt, für die Pathogenese der meisten FAD-Fälle verantwortlich gemacht werden (Wolfe et al., 1999b; Capell et al., 1998; Wisniewski et al., 1995).

Bei Presenilin-Mutationen lässt sich insbesondere ein selektiver Anstieg von A β 42 nachweisen (Annaert et al., 1999). An neuronalen Kulturen PS1 defizienter Mausembryonen konnte gezeigt werden, dass u.a. selektiv die γ -Sekretase-Spaltung von APP blockiert ist und es gleichzeitig zu einer intrazellulären Akkumulation der APP-CTF kommt (De Strooper et al., 1998). All diese Beobachtungen belegen, dass die Preseniline an der γ -Sekretase-Spaltung von APP beteiligt sind oder aber mit der γ -Sekretase identisch sind.

Durch mehrere Untersuchungen wurde belegt, dass die Preseniline eine direkte Interaktion mit APP eingehen können, und zwar über die jeweiligen TM. So befinden sich die Preseniline in Kompartimenten, in denen die γ -Sekretase-Spaltung stattfindet (ER, Golgi-Komplex und Intermediär Kompartiment (IK)) (Culvenor et al., 1997; Xia et al., 2000). Es konnte auch eine Anreicherung von PS1, APP-C83 und -C99 in Fraktionen mit γ -Sekretase-Aktivität gezeigt werden (Pinnix et al., 2001). APP und die Preseniline konnten außerdem aus Golgi-reichen und trans-Golgi-Netzwerk-(TGN)-reichen Fraktionen co-präzipitiert werden (Xia et al., 2000).

Folgende Mechanismen werden für die Beteiligung der Preseniline an der γ -Sekretase-Spaltung vorgeschlagen (Abb. 3):

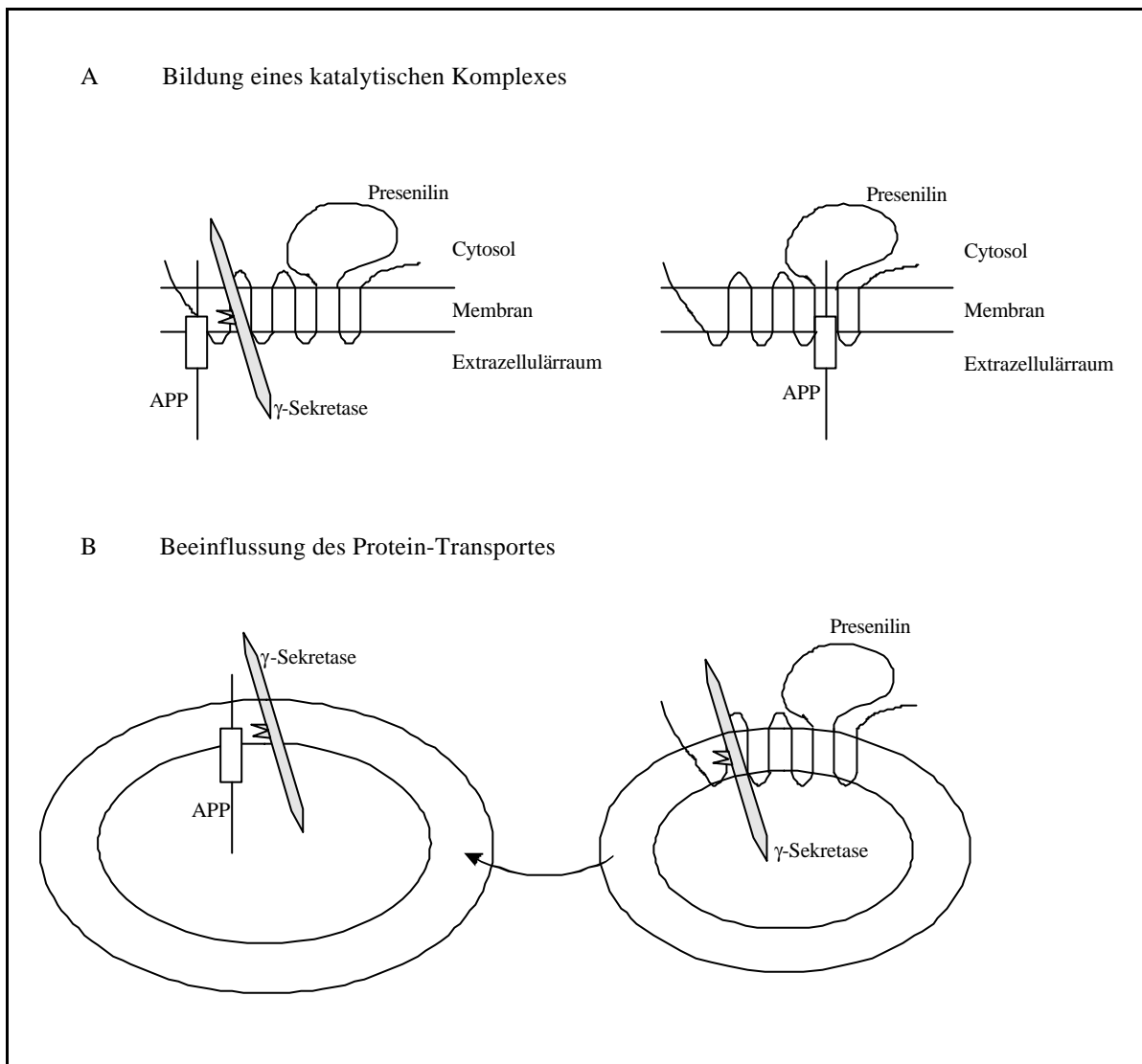


Abb. 3: Zwei Modelle der möglichen Funktion der Preseniline bei der γ -Sekretase-Spaltung von APP (nach Selkoe, 2000)

A: Bildung eines katalytischen Komplexes

Die Preseniline, dargestellt in der postulierten Topologie mit 8 Transmembrandomänen, stellen einen essentiellen katalytischen Co-Faktor der γ -Sekretase-Spaltung dar (links). Die Preseniline könnten aber auch die γ -Sekretase selbst sein (rechts).

B: Beeinflussung des Protein-Transportes

Es kommt zu keiner direkten Interaktion zwischen den Presenilinen und APP. Die Preseniline beeinflussen den Transport der γ -Sekretase in eine membranöse Mikrodomäne, um die Interaktion zwischen APP und der γ -Sekretase zu ermöglichen..

Das Rechteck in der schematischen Zeichnung von APP stellt die 40 bis 42 Aminosäuren große A β -Region dar.

1. Die Preseniline erleichtern als essentieller Co-Faktor die γ -Sekretase-Spaltung.

Möglicherweise bilden die Preseniline eine Mikrodomäne in der Membran, um die spätere Proteolyse zu ermöglichen. Die Preseniline könnten allerdings auch als Chaperone fungieren und so den Transport von APP und/oder der γ -Sekretase zu Kompartimenten ermöglichen, in denen die γ -Sekretase lokalisiert ist (De Strooper und Annaert, 2000; Selkoe, 2000).

2. Die Preseniline sind identisch mit der γ -Sekretase.

PS1 könnte tatsächlich eine autoaktivierte Aspartat-Protease sein. So sind offenbar zwei Aspartat-Reste in TM6 und TM7 essentiell für die γ -Sekretase-Spaltung von APP und die Endoproteolyse von PS1. Möglicherweise gehören die Preseniline zu einer neuen Familie der Aspartat-Proteasen, da sie keine Homologie zu bisher bekannten Aspartat-Protease aufweisen (Steiner et al., 2000; Wolfe et al., 1999a). Jedoch ist das aktive Zentrum beider Preseniline homolog zu dem der Mitglieder der Familie von Typ-4 Prepilin Peptidasen aus Bakterien (Steiner et al., 2000), was die residuale γ -Sekretase-Aktivität PS1-defizienter Zellen erklären könnte (Kimberly et al., 2000). Bei einem Doppel-*knock-out* von PS1 und PS2 ist tatsächlich die gesamte γ -Sekretase-Aktivität inhibiert (Nunan und Small, 2000).

1.3.4 A β und die Amyloid-Hypothese

Die A β -Bildung ist nicht, wie zunächst vermutet, pathologisch. Das Peptid ist in der Cerebrospinalflüssigkeit sowie im Plasma von gesunden Kontrollpersonen und Alzheimer Patienten nachweisbar (Seubert et al., 1992). Zudem wird es von kultivierten Zellen unter physiologischen Bedingungen in das Zellkulturmedium sezerniert (Shoji et al., 1992; Haass et al., 1992).

In pico- bis nanomolaren Konzentrationen werden A β verschiedene physiologische Funktionen zugeschrieben (Luo et al., 1996). Da Deletion der lumenalen, d.h. extrazellulären Region von A β im APP den axonalen Transport von APP hemmt, wird angenommen, dass dieser Bereich möglicherweise für das axonale Sortieren von APP durch Interaktion mit einem bestimmten Rezeptor verantwortlich ist (Tienari et al., 1996). A β besitzt anscheinend außerdem neurotrophe Eigenschaften für differenzierende Neuronen und scheint bedingt durch die RHDS-Sequenz die Zelladhäsion zu fördern (Whitson et al., 1989; Yankner et al., 1990; Chen und Yankner, 1991) (siehe 4.4.2). Saitoh und Mook-Jung (1996) schlagen außerdem vor, dass A β möglicherweise als neuromodulatorisches Peptid

die synaptische Funktion an den Axonenenden kontrolliert, da A β Tachykinin-Rezeptoren aktiviert und in Gegenwart von Glutamat zu einer Akkumulation von Inositoltrisphosphat und einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration führt (Kimura und Schubert, 1993).

Neben diesen potentiell physiologischen Funktionen sprechen viele Beobachtungen für die zentrale Rolle von A β bei der Pathogenese der AD (Amyloid-Hypothese). So führen alle bisher bekannten FAD-Mutationen von APP und den Presenilinen zu einem selektiven Anstieg von A β_{x-42} ¹ (s.u.), mit Ausnahme von APP_{Sw} (siehe 1.3.2 sowie 1.3.3.2), das eine gesteigerte Sekretion des gesamten A β bewirkt (Haass et al., 1995; Thinakaran et al., 1996a).

Patienten mit Trisomie 21 entwickeln oftmals nach dem 40. Lebensjahr eine der AD ähnliche Symptomatik und Pathologie (Wisniewski et al., 1985). Dies ist auf die dreifache Kopie des Chromosoms 21 zurückzuführen, auf dem sich das APP-Gen befindet, so dass es zu einer gesteigerten APP-Expression und damit vermutlich auch zu einer gesteigerten A β -Produktion kommt.

A β weist sowohl N- als auch C-terminale Heterogenität auf. Die am häufigsten vorkommenden Peptide sind A β_{1-40} bzw. A β_{1-42} . In der Cerebrospinalflüssigkeit entfallen ca. 90-95 % des gesamten A β auf A β_{x-40} , aber nur ca. 5-10 % auf A β_{x-42} (Evin et al., 1994; Wilson et al., 1999). *In vitro* Studien ergaben, dass letzteres eine stärkere Aggregationsneigung aufweist als A β_{x-40} .

Auch die N-terminalen Heterogenität ist anscheinend bei der Pathogenese der AD von Bedeutung. So scheinen p3 (siehe 1.3.3) bzw. ein um 10 Aminosäuren am N-Terminus verkürztes A β relativ unlöslich zu sein und leicht zu aggregieren (Busciglio et al., 1993; Demeester et al., 2001; Kumar-Singh et al., 2000; Kuo et al., 1996; Podlisny et al., 1995).

Inkubation verschiedener Zelltypen mit höheren Konzentrationen (1 - 10 μ M) synthetischem A β ² ist toxisch und führt z.B. zur Neurodegeneration sowie zu Aktivierung von Mikrogliazellen (Hartmann, 1999; Luo et al., 1996). Es gibt verschiedene Vermutungen über den Mechanismus der A β -induzierten Neurotoxizität. Dazu gehören die Bildung eines Calcium-Kanals, die Bildung freier Radikale, eine Verstärkung der Glutamat-Toxizität

¹ A β_{x-42} bzw. A β_{x-40} weisen auf die N-terminale Heterogenität des Peptids hin.

² Für die Untersuchungen hinsichtlich der Cytotoxizität von synthetischem A β wird dieses häufig *in vitro* 3 bis 7 Tage bei 37 °C inkubiert. Dadurch entstehen aggregierte, oligomere sowie polymere Formen des Peptids (Podlisny et al., 1995).

sowie die Aktivierung von Kinasen und der Apoptose (Arispe et al., 1994; Behl und Schubert, 1993; Mattson et al., 1992; Zhang et al., 1994; De Strooper und Annaert, 2000).

A β aktiviert u.a. die GSK-3, die neben Tau (siehe 1.2.2) und der Glykogensynthase auch die Pyruvat-Dehydrogenase phosphoryliert, ein Schlüsselenzym der Glykolyse. Da die Pyruvat-Dehydrogenase dadurch inaktiviert wird, könnte lösliches A β auch für die bei der AD beobachteten Störungen im Energie- und Glucose-Stoffwechsel des Gehirns sowie für die Reduktion des Acetylcholingehaltes verantwortlich sein (Brandt, 2001; Imahori und Uchida, 1997).

Monomeres A β ist nicht toxisch. Es gibt allerdings kontroverse Ergebnisse darüber, ob schon die Fibrillenbildung oder erst die Aggregation des Peptid für dessen Toxizität verantwortlich ist (Podlisny et al., 1995; Lorenzo und Yankner, 1994; Zhang et al., 1994; Boland et al., 1996; Hensley et al., 1994).

Nach einer relativ neuen Hypothese spielt nicht sezerniertes, sondern intrazelluläres A β eine zentrale Rolle bei der Entstehung der amyloiden Plaques. A β kann in verschiedenen Zelltypen intrazellulär nachgewiesen werden, und zwar sowohl A β_{x-40} als auch A β_{x-42} . Dabei scheint intrazelluläres A β allerdings in anderen Kompartimenten zu entstehen als sezerniertes A β (Wertkin et al., 1993; Tienari et al., 1997; Wilson et al., 1999). Letzteres wird vermutlich in Neuronen in Golgi- und/oder post-Golgi-Vesikeln bzw. in nicht-neuronalen Zellen im endosomalen/lysosomalen System gebildet. Intrazellulär nachgewiesenes A β befindet hingegen sich im ER/IK (Hartmann, 1999; Wilson et al., 1999).

Im Gegensatz zu sezerniertem A β besteht intrazelluläres A β hauptsächlich aus A β_{x-42} , dessen unlösliche Form mit zunehmender Dauer der Zellkultivierung zunimmt (Skovronsky et al., 1998). Durch Absterben der betroffenen Neuronen könnte akkumuliertes A β_{x-42} freigesetzt werden und dann den Nidus für die Akkumulation von sezerniertem A β bilden (Wilson et al., 1999). Das bedeutet, dass gerade intrazelluläres A β für die Entstehung der amyloiden Plaques von entscheidender Bedeutung sein könnte (Turner et al., 1996; Tienari et al., 1997).

In Hirngewebe von Alzheimer Patienten wurde in Neuronen nachgewiesen, dass intrazelluläres A β und neurofibrilläre Bündel (siehe 1.2.2) co-lokalisiert sind und miteinander assoziieren (Grundke-Iqbal et al., 1989; Murphy et al., 1994; Schwab et al., 1998). Diese

Beobachtungen weisen auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der Amyloidbildung und der Aggregation von Tau bzw. der Entstehung der neurofibrillären Bündel hin.

Ein weiterer Zusammenhang zwischen A β - und Taupathologie ist dadurch gegeben, dass A β die Aktivität verschiedener Proteinkinasen, wie z.B. GSK-3, steigert, die u.a. auch Tau phosphorylieren (siehe 1.2.2). A β aktiviert außerdem Calpain, eine Calcium-abhängige Protease. Dadurch wird u.a. das Protein p35 gespalten, das für die Membranassoziation der Cdk5 verantwortlich ist. Dies führt dazu, dass die Cdk5 in die lösliche Form überführt wird. Während die membranassoziierte Form der Cdk5 (Trans-)Membranproteine, wie z.B. APP, phosphoryliert, phosphoryliert die lösliche Form u.a. die Neurofilamente und Tau (Dhavan und Tsai, 2001).

1.4 Die Bedeutung der Phosphorylierung für das proteolytischen Prozessieren von APP

Es gibt zahlreiche Untersuchungen, aus denen hervorgeht, dass bestimmte Signaltransduktionsmechanismen das proteolytische Prozessieren von APP beeinflussen (Gandy, 1999). Dazu gehören Signalwege, die durch muskarinerge Agenzien stimuliert werden, bzw. solche, in denen Protein Kinase C (PKC), Protein Kinase A (PKA), Protein-Phosphatasen 1 und 2A und/oder Rezeptor-Tyrosinkinasen eine Rolle spielen (Xu et al., 1996; Mills et al., 1997; Buxbaum et al., 1990; Wolf et al., 1995; Nitsch et al., 1996). Auch scheint die Phosphorylierung von APP durch die Prolin-dirigierende Cdc2-Kinase in bestimmten Phasen des Zell-Zyklus dessen proteolytisches Prozessieren zu beeinflussen (Suzuki et al., 1994).

Die Regulation des APP-Prozessierens durch die PKC ist für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse. Daher soll im Folgenden näher auf die Rolle der PKC beim APP-Metabolismus eingegangen werden.

Aktivierung der PKC durch Phorbolster oder Neurotransmitter stimuliert den α -sekretorischen Weg (Buxbaum et al., 1992) (siehe 1.3.3.1). Die APP_{s β} -Sekretion wird dadurch meist indirekt beeinflusst, d.h. dass Aktivierung des α -Sekretase-Weges eine verringerte Prozessierung von APP durch die β -Sekretase zur Folge hat. Allerdings ist die beobachtete Wirkung auf die A β -Sekretion abhängig vom jeweils verwendeten Zelltyp und manchmal nur transient (Sinha und Lieberburg, 1999; Selkoe, 1998).

Die genauen Ursachen des „PKC-Effekts“ sind noch unklar. Er scheint jedoch unabhängig von der *in vitro* nachgewiesenen cytoplasmatischen Phosphorylierung von APP durch PKC zu sein (Gandy et al., 1988; Suzuki et al., 1992). Dies wurde an Zellen gezeigt, die APP mit einer Mutation der durch PKC phosphorylierbaren Aminosäure bzw. mit deletierter cytoplasmatischer Domäne exprimieren. Das APP-Prozessieren dieser Mutanten reagiert ebenso sensitiv auf Phorbol ester wie in Kontrollzellen (Haass et al., 1993; da Cruz e Silva et al., 1993).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie die PKC die α -Sekretase-Spaltung beeinflussen könnte. Einerseits könnte die PKC die α -Sekretase direkt phosphorylieren (Skovronsky et al., 2000a); dies konnte für MDC9 (siehe 1.3.3.1) gezeigt werden (Roghani et al., 1999). Andererseits könnte die Aktivierung der PKC den APP-Transport vom TGN zur Zelloberfläche beschleunigen. Dies würde zu einem gesteigerten Einbau von APP in die Plasmamembran führen, wo die α -Sekretase-Spaltung erfolgt (Caporaso et al., 1994; Xu et al., 1995).

Während des Verlaufs der Alzheimer Demenz vom sporadischen Typ treten Dysfunktionen verschiedener Signaltransduktionssysteme auf. Dazu gehören eine reduzierte Produktion von Phosphoinosit-4,5-bisphosphat, eine Beeinträchtigung von G-Protein vermittelten Signalkaskaden, Veränderungen in der APP-G_o-Signaltransduktion sowie ein verminderter neuronaler Gehalt der PKC (Fowler et al., 1995; Roth et al., 1995).

Die Ursachen für die genannten, nicht nur auf das Gehirn beschränkten Veränderungen sind noch unbekannt. Auch der (kausale) Zusammenhang zwischen den veränderten Signalkaskaden und z.B. dem proteolytischen Prozessieren von APP ist noch weitgehend unklar (Fowler et al., 1995; Roth et al., 1995).

1.5 Die O-GlcNAc-Modifikation

Bis vor ca. 15 Jahren ging man davon aus, dass Proteine nur auf ihren extrazellulären Domänen glykosyliert sein können, da man annahm, dass die Glykosylierung von Proteinen nur in lumenalen Kompartimenten des ER oder Golgi co- und post-translational stattfindet. Dann wurde allerdings eine Form der post-translationalen Glykosylierung entdeckt, die nicht im ER oder Golgi-Komplex stattfindet sondern im Cytosol und Zellkern. Es handelt sich hierbei um das Monosaccharid N-Acetylglucosamin, das O-glykosidisch an

die Hydroxylgruppen von Serin- bzw. Threonin-Resten gebunden ist (O-GlcNAc) (Torres und Hart, 1984).

O-GlcNAc ist eine weit verbreitete Modifikation. Sie wird von allen bisher untersuchten Eukaryoten exprimiert. Dazu gehören z.B. filamentöse Pilze, Pflanzen, Tiere, tierische Parasiten sowie für Eukaryoten infektiöse Viren (Comer und Hart, 2000). O-GlcNAc kommt auf Proteinen des Zellkerns sowie des Cytoplasmas vor, wobei die Kernhülle die höchste Konzentration an O-GlcNAc-modifizierten (O-GlcNAcylierten) Proteinen besitzt (Hart, 1997; Holt et al., 1987).

Inzwischen konnten schon mehr als 100 Proteine als O-GlcNAc-modifiziert nachgewiesen werden (Dong et al., 1996). Dazu gehören die Kernporenproteine, an der Translation und Transkription beteiligte Proteine, Tumorsuppressor-Proteine und Oncogene, Proteine des Cytoskeletts, Kinasen und Phosphatasen sowie Membranproteine (Comer und Hart, 1999; Hart, 1997; Roos und Hanover, 2000; Snow und Hart, 1998; Griffith et al., 1995; Cheng und Hart, 2001; Jiang und Hart, 1997). Für das Kernporenprotein p62, aber auch für andere Proteine konnte gezeigt werden, dass mehrere Aminosäuren eines Proteins mit O-GlcNAc modifiziert sein können (Lubas et al., 1995; Dong et al., 1996).

1.5.1 Mögliche Funktionen der O-GlcNAc-Modifikation

Die genauen biochemischen Funktionen von O-GlcNAc sind noch nicht bekannt, jedoch deuten verschiedene Experimente auf lebensnotwendige Funktionen von O-GlcNAc hin. So führt z.B. Transfektion von CHO-Zellen mit einer cytoplasmatisch oder nukleär lokalisierten Galactosyltransferase zur Galactosylierung von O-GlcNAc („capping“) und bewirkt das Absterben der Zellen innerhalb eines Zellzyklus. Die Autoren führen diesen letalen Effekt auf die Hemmung des O-GlcNAc-Metabolismus zurück (Snow et al., 1996; Hart et al., 1996). Außerdem sind embryonale Stammzellen mit einem inaktivierten Gen der O-GlcNAc-Transferase (OGT) (siehe 1.5.2.1) nicht lebensfähig, was deutlich macht, dass die OGT für die Maus-Ontogenität sowie die Vitalität embryonaler Stammzellen essentiell ist (Shafi et al., 2000).

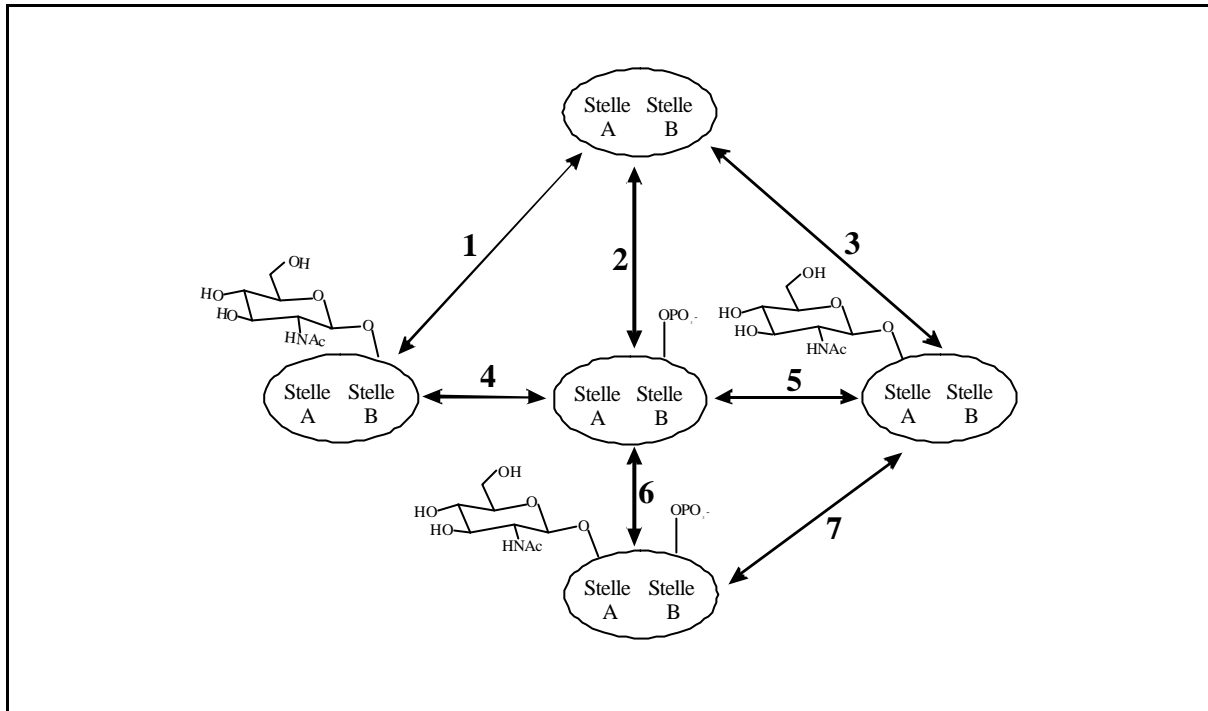


Abb. 4: Zusammenhang zwischen den Proteinmodifikationen O-GlcNAc und Phosphat (nach Comer und Hart, 2000)

Zur Vereinfachung der Komplexität ist ein Protein mit zwei möglichen Modifikationsstellen (Stelle A und Stelle B) dargestellt. Ausgehend vom unmodifizierten Zustand kann das Protein entweder O-GlcNAcyliert (Wege 1 und 3) oder phosphoryliert (Weg 2) werden. Auch ist ein reziproker Zusammenhang zwischen den beiden Modifikationen an derselben Stelle (Weg 4) oder aber an unterschiedlichen Stellen (Weg 5) möglich. Bestimmte zelluläre Signale können zum jeweiligen Austausch zwischen O-GlcNAc und Phosphat führen. Die beiden Modifikationen könnten auch auf zelluläre Stimuli hin unabhängig von einander an dieselben (Wege 1 und 2) oder verschiedenen Serin-/Threonin-Reste (Wege 2 und 3) gebunden oder von ihnen abgespalten werden. Diese unterschiedlichen Modifikationszustände können mit unterschiedlichen Funktionen des Proteins verbunden sein. Die beiden Modifikationen können sich auch gegenseitig beeinflussen, so dass das Protein nacheinander O-GlcNAcyliert und phosphoryliert wird (Wege 2 bis 6 oder 3 bis 7). Nicht dargestellt ist die Möglichkeit, dass die Stelle A phosphoryliert ist bzw. beide Stellen mit O-GlcNAc oder nur Phosphat modifiziert sind.

Alle bisher identifizierten O-GlcNAcylierten Proteine sind Phosphoproteine. Viele der O-GlcNAc-modifizierten Stellen ähneln Konsensus-Sequenzen verschiedener Kinasen, wie z.B. der Prolin-dirigierenden Kinasen, Caseinkinase II und GSK-3 (Haltiwanger et al., 1992a; Hayes und Hart, 1994; Hart et al., 1996). Tatsächlich kompetieren O-GlcNAc und Phosphat in einigen Fällen um dieselbe Aminosäure, wie z.B. für den murinen Östrogen-Rezeptor β , das SV40 T-Antigen sowie das Oncogen c-Myc gezeigt wurde (Cheng et al., 2000; Cheng und Hart, 2001; Medina et al., 1998; Chou et al., 1995). Es konnte aber auch die Co-Existenz von O-GlcNAc und Phosphat auf verschiedenen Serin-/Threonin-Resten eines Proteins gezeigt werden (Dong et al., 1996).

Experimente mit Aktivatoren (Inhibitoren) von Kinasen bzw. Phosphatasen weisen auf eine generelle reziproke Beziehung zwischen O-GlcNAc und Phosphat hin. In Kleinhirn-

neuronen führte die Aktivierung der PKC oder PKA zu einer Reduktion der O-GlcNAc-Modifikation, und zwar hauptsächlich bei cytoskeletalen und mit dem Cytoskelett assoziierten Proteinen (Griffith und Schmitz, 1999). Auch Inhibition von Phosphatasen mittels Okadasäure reduzierte den O-GlcNAc-Einbau in hauptsächlich nukleäre Proteine (Lefebvre et al., 1999).

Da Signalkaskaden zelluläre Prozesse durch (De-)Phosphorylierung von Proteinen regulieren, könnte O-GlcNAc eine für Kohlenhydrate ungewöhnliche, direkte Rolle bei Signalkaskaden spielen (Wells et al., 2001). So kann O-GlcNAc den Phosphorylierungsgrad von Proteinen durch sterische Hinderung oder Blockade der Phosphorylierungsstellen beeinflussen. Zum anderen ist aber auch möglich, dass O-GlcNAc-modifizierte Proteine eine andere Konformation annehmen als die durch negativ geladene Phosphatreste modifizierten Proteine, so dass daraus je nach Modifikation unterschiedliche Aktivitätszustände ein und desselben Proteins resultieren (Hanover et al., 1999). Das komplexe Zusammenspiel zwischen O-GlcNAc und Phosphat ist vereinfacht in Abb. 4 dargestellt.

Die Ähnlichkeit der O-GlcNAc-Modifikation mit der Phosphorylierung von Proteinen wird durch weitere Beobachtungen unterstützt: 1. O-GlcNAc besitzt eine sehr viel größere Umsatzrate als das Trägerprotein, was man für eine dynamische, in Signaltransduktion involvierte post-translationale Modifikation erwarten würde. Dies wurde für Cytokeratine sowie für kleine Hitzeschock-Proteine gezeigt (Chou und Omary, 1993; Roquemore et al., 1996). 2. In bestimmten Fällen reagiert O-GlcNAc auf zelluläre Stimuli, wie z.B. bei der Aktivierung von Lymphocyten mit Conavalin A (Kearse und Hart, 1991). 3. Die O-GlcNAc-Expression z.B. der Cytokeratine sowie verschiedener Kernporenproteine ist abhängig vom Zellzyklus (Chou und Omary, 1993; Hayes und Hart, 1994).

O-GlcNAc werden auch noch weitere Funktionen zugeschrieben. Viele der O-GlcNAc-modifizierten Proteine können multimere Komplexe bilden, wie z.B. die Kernporenproteine. Es wird daher angenommen, dass O-GlcNAc die Assoziation von Proteinen begünstigen oder stabilisieren kann (Hart et al., 1996). Außerdem scheint O-GlcNAc eine Rolle beim „Turnover“ von Proteinen zu spielen, die „PEST“-Sequenzen¹ tragen. Proteine mit einer oder mehreren PEST-Sequenzen werden schnell abgebaut, wenn diese phosphoryliert sind, wohingegen die O-GlcNAc-Modifikation dieser Serin- bzw. Threonin-Reste den

¹ PEST-Sequenzen zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) aus (Rechensteiner, 1990).

PEST-vermittelten Abbau zu verhindern scheint (Hayes und Hart, 1994; Haltiwanger et al., 1992a; Rechensteiner, 1990). Dies konnte für den Östrogen-Rezeptor β gezeigt werden (Cheng et al., 2000). Weiterhin wird angenommen, dass O-GlcNAc als Glucose-Sensor fungieren könnte, da die extrazelluläre Glucose-Konzentration die O-GlcNAcylierung von Proteinen beeinflussen kann. Essentiell dafür ist, dass Glucose über Glucosamin zu UDP-GlcNAc, dem Substrat der O-GlcNAc-Transferase metabolisiert wird (Han et al., 2000; Liu et al., 2000).

1.5.2 Enzyme des O-GlcNAc-Zyklus

1.5.2.1 Die O-GlcNAc-Transferase

Eine O-GlcNAc-Transferase¹ (OGT) mit cytosolischer und nukleärer Enzymaktivität wurde zunächst aus Rattenleber und aus Membranen von Kaninchenreticulocyten isoliert (Haltiwanger et al., 1990).

Das aus Rattenleber, humanen Erythrocyten und *C. elegans* klonierte OGT-Gen befindet sich auf dem X-Chromosom (Kreppel et al., 1997; Lubas et al., 1997; Shafi et al., 2000). Das Gen kann in allen bisher untersuchten Eukaryoten nachgewiesen werden und weist keine Sequenz- oder Struktur-Homologie zu bisher klonierten UDP-GlcNAc-Transferasen auf (Kreppel und Hart, 1999). In der Pflanze *Arabidopsis* wurde ein homologes Gen (*spindly*, *spy*) identifiziert, dessen Genprodukt in die Hemmung des Gibberilin-Signaltransduktionsweges involviert ist (Thornton et al., 1999).

Die OGT ist ein Heterotrimer aus zwei α - und einer β -Untereinheit. Die α -Untereinheit (p110) enthält wahrscheinlich das katalytische Zentrum, während die β -Untereinheit (p78) vermutlich ähnlich wie bei anderen Glykosyltransferasen regulatorische Funktionen besitzt (Haltiwanger et al., 1992b).

Die OGT ist zwischen den Spezies hoch konserviert und wird in allen bisher untersuchten Geweben exprimiert, wobei die stärkste Expression im Pankreas zu beobachten ist (Lubas et al., 1997). Das Enzym ist O-GlcNAcyliert und besitzt eine Konsensus-Sequenz für Tyrosin-Phosphorylierung, so dass die Enzymaktivität vermutlich durch eine oder mehrere

¹ Uridin Diphospho-N-Acetylglucosamino:Peptid β -N-Acetylglucosaminyltransferase

Rezeptor-Tyrosinkinasen reguliert werden kann (Kreppel et al., 1997). Des Weiteren sind UDP, UTP sowie UDP-GlcNAc, nicht aber UDP-GalNAc oder UMP, potente Inhibitoren des Enzyms (Haltiwanger et al., 1992b).

1.5.2.2 Die O-GlcNAc-Hydrolase

Ähnlich wie Phosphatasen für die Abspaltung von Phosphat verantwortlich sind, sind O-GlcNAc-Hydrolasen¹ verantwortlich für die Abspaltung von O-GlcNAc. Eine cytosolische und nukleäre O-GlcNAc-Hydrolase, die selektiv O-glykosidisch gebundenes GlcNAc abspaltet, konnte aus Rattenmilz aufgereinigt und identifiziert werden (Dong und Hart, 1994).

Das Gen der O-GlcNAc-Hydrolase, das sich auf Chromosom 10 befindet, konnte kürzlich aus humanem Hirn kloniert werden. Die O-GlcNAc-Hydrolase, die keine signifikante Homologie zu anderen Proteinen oder Glykosidasen aufweist, ist in höheren Eukaryoten konserviert, während ein Homolog in Hefen oder Prokaryoten fehlt (Gao et al., 2001).

Die O-GlcNAc-Hydrolase ist ein Heterodimer bestehend aus einer α - und einer β - Untereinheit. Die Enzymaktivität ist in allen untersuchten Rattengeweben nachweisbar und hat im Gegensatz zur lysosomalen GlcNAc-Hydrolase ein neutrales pH-Optimum (Dong und Hart, 1994). Das Enzym wird durch GlcNAc und dessen Analoga, einschließlich PUGNAc (O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyliden)-amino-N-phenylcarbamat) und LOGNAC (2-Acetamido-2-deoxy-D-gluconhydroxim-1,5-lacton) gehemmt (Haltiwanger et al., 1998).

1.5.3 Zusammenhang zwischen O-GlcNAc und der Alzheimer Krankheit

Es gibt verschiedene Hinweise für eine mögliche Beteiligung von O-GlcNAc an der Pathogenese der AD. So sind die beiden an der Entstehung der Krankheit beteiligten Proteine Tau (siehe 1.2.2) und APP (siehe 1.3) O-GlcNAc-modifiziert (Arnold et al., 1996; Griffith et al., 1995). Es ist nicht auszuschließen, dass auch die Preseniline O-GlcNAcyliert sind, da sie auch phosphoryliert sind und darüber hinaus die N-terminale Region von PS2

¹ β -N-Acetylglucosaminidase

einer PEST-Sequenz ähnelt (Walter et al., 1998; Li und Greenwald, 1996). Zudem werden bei der Krankheit Störungen verschiedener Signaltransduktionssysteme beobachtet (Roth et al., 1995; Mattson et al., 1998) (siehe 1.4).

Da die O-GlcNAc-Modifikation vermutlich ein zur Phosphorylierung alternatives Signaltransduktionssystem darstellt (siehe 1.5.1), spielen möglicherweise neben veränderten Kinase-/Phosphatase-Aktivitäten auch Veränderungen der Aktivitäten und/oder Expression der OGT bzw. O-GlcNAc-Hydrolase bei der Pathogenese der AD eine Rolle.

Ein weiterer Hinweis auf Veränderungen der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen bei der AD lässt sich daraus ableiten, dass im Vergleich zu Hirnen von gesunden Kontrollpatienten in Hirnen von Alzheimer Patienten mit dem Cytoskelett assoziierte Proteine eine gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation aufweisen. Dies ist nur in Hirnregionen nachweisbar, die von den pathologischen Veränderungen der Krankheit betroffen sind, wie z.B. Hippocampus, Temporal- und Frontalcortex (Griffith und Schmitz, 1995). Die von der gesteigerten O-GlcNAcylierung betroffenen Proteine sind allerdings noch unbekannt.

Es wurde auch bei Alzheimer Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen eine geringere Expression der O-GlcNAc-modifizierten Proteine AP-3 und AP-180¹ beobachtet (Yao und Coleman, 1998a; Yao und Coleman, 1998b). Allerdings lässt sich aufgrund der reduzierten Proteinmenge keine Aussage darüber machen, ob auch die O-GlcNAc-Expression dieser Proteine verändert ist.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das APP-Prozessieren wird durch verschiedene Signaltransduktionssysteme reguliert. Wie in 1.4 diskutiert, ist von besonderer Bedeutung, dass das APP-Prozessieren durch PKC regulierbar ist. Da O-GlcNAc als ein zur Phosphorylierung alternatives Signaltransduktionssystem gilt und auch gezeigt worden ist, dass sich die O-GlcNAc-Expression reziprok zur PKC-Aktivierung/-Inaktivierung verhält, lässt sich postulieren, dass der APP-Metabolismus durch O-GlcNAcylierung beeinflusst werden kann.

Ein weiterer Hinweis ist, dass in Hirnen von Alzheimer Patienten eine erhöhte O-GlcNAc-Modifikation von cytoskeletalen und mit dem Cytoskelett-assoziierten Proteinen im Vergleich zu Hirnen von Kontrollpatienten beobachtet wurde (siehe 1.5.3). Es ist nicht bekannt, ob APP aus Gehirnen von Alzheimer Patienten eine veränderte O-GlcNAc-Modi-

¹AP-3 und AP-180 sind an der Clathrin-abhängigen Vesikelbildung beteiligt.

fikation aufweist. Es ist möglich, dass die abnorme O-GlcNAc-Modifikation von (regulatorischen) Proteinen oder von APP selbst dessen proteolytisches Prozessieren beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit sollte der mögliche Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf das proteolytische Prozessieren des humanen APP₆₉₅ untersucht werden. An Neuroblastomzellen in Kultur wurde daher (a) die O-GlcNAc-Modifikation von APP und (b) die Auswirkungen einer verstärkten O-GlcNAc-Modifikation aller Proteine, die durch Hemmung der O-GlcNAc-Hydrolase erreicht wurde, auf verschiedene Parameter des APP-Metabolismus untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Geräte

Gerät	Typ; Hersteller/Vertrieb	Sitz
Elektrophorese-System für Proteinauftrennung	Mini-Protean II; Bio-Rad	München
Geltrockner	Fröbel Laborgeräte	Köln
Membranpumpen	M72C; Vacuubrand	Wertheim
Mikroskop	DMIL; Leica	Wetzlar
pH-Messgerät	761 Calimatic; Knick Fastnacht	Bonn
Reinstwasser-Anlage	Barbstead E-Pure; Werner	Leverkusen
Spannungsquelle	PowerPac200; BioRad	München
Sterilbank	BHA72; Schrader	Friedland
Tiefkühlschrank -80 °C	Ultra Low; Sanyo	Japan
Titertek PLUS MS2	ICN	Meckenheim
Vortexer	Certomat MV; Braun Biotech Int.	Melsungen
Zell-Inkubator	Modell 160; ICN	Eschwege
Zentrifugen:	Biofuge 15R; Heraeus	Osterode
	Biofuge 13, Heraeus	Osterode
	Labofuge 200; Heraeus	Osterode
	2K15, Sigma	Deisenhofen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller	Sitz
Einweg Zellschaber	Becton-Dickinson	Plymouth, GB
Flexible Falcon 3912 Mikrotiter-Platten	Becton-Dickinson	Heidelberg
Kryogefäße, 1ml	Greiner	Solingen
Mikroreaktionsgefäße, 1,5ml	Eppendorf	Hamburg
Petrischalen	Sarstedt	Nümbrecht
Pipetten	Sarstedt	Nümbrecht
T75-Zellkulturflaschen	Sarstedt	Nümbrecht
Zellkulturschalen 6cm	Sarstedt	Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Falcon [®] , Becton-Dickinson	Plymouth, GB
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Falcon [®] , Becton-Dickinson	Plymouth, GB

2.1.3 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien stammen von der Firma Merck, Darmstadt.

Reagenz	Hersteller	Sitz
Acrylamid	Serva	Heidelberg
Ammoniumpersulfat-Lösung	Sigma	Deisenhofen
Aprotinin	Roche	Mannheim
Bis-Acrylamid	Serva	Heidelberg
Bradford	Biorad	München
Proteinbestimmungsreagenz		
Bromphenolblau	Serva	Heidelberg
Cyanogenbromid-aktivierte Sephrose	Pharmacia	Freiburg
DC (Detergent Compatible) Protein Assay	Biorad	München
DMSO	Sigma	Deisenhofen
DOTAP [®]	Roche	Mannheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma	Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Riedl-de Haën	Seelze
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma	Deisenhofen
Geneticin (G418)	ICN	Meckenheim
Glutamin	Fluka	Neu-Ulm
HEPES	Serva	Heidelberg
Leupeptin	Sigma	Deisenhofen
Lumilight ^{Plus}	Roche	Mannheim
Mercapthoethanol	Sigma	Deisenhofen
Micr-O-protect	Roche	Mannheim
Mowiol	Hoechst	Frankfurt
Natriumdodecylsulfat	Biorad	München
Nitrocellulose-Membran	Satorius	Göttingen
Nonidet P 40	Roche	Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Sigma	Deisenhofen
Pepstatin	Roche	Mannheim
PMSF	Sigma	Deisenhofen
Ponceau-S	Serva	Heidelberg
Protein-Molekulargewichtsstandard	Gibco-BRL	Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma	Deisenhofen
RPMI 1640	Sigma	Deisenhofen
Röntgenfilme X-OMAT AR	Eastman-Kodak	München
SuperSignal [®] Substrate	Pierce	Rochester, USA
TEMED	Pharmacia	Freiburg
Trypsin (für die Zellkultur)	Roche	Mannheim
Wasserstoffperoxid	Riedl-de Haën	Seelze

2.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper

8E5	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das Epitop 444-592 von APP. Humanspezifisch. Aliquots mit Glycerin im Verhältnis 1:1 (v/v), Antikörperkonzentration: 2,65 µg/µl
AL25	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die p110-Untereinheit der O-GlcNAc-Transferase
AL28	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen den C-Terminus der p110-Untereinheit der O-GlcNAc-Transferase
anti-APP _s -IgY-Antikörper	Polyklonaler Huhn-Antikörper gegen rekombinantes APP _s
HGAC39	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen O-GlcNAc
RL2	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen O-GlcNAc der Fa. Affinity Bioreagents Inc., USA. Aliquots mit Glycerin im Verhältnis 1:1 (v/v), Antikörperkonzentration: 1µg/µl
W0-2	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das Aβ-Epitop von APP. Humanspezifisch. Antikörperkonzentration 0,5 µg/µl

Der 8E5-Antikörper wurde freundlicherweise von Athena Neuroscience (San Francisco), der W0-2-Antikörper von K. Beyreuther (Heidelberg), der AL25- sowie AL28-Antikörper von G. Hart (Baltimore, USA) und die Eigelbe von mit rekombinantem APP_s immunisierten Hühnern von V. Herzog (Bonn) zur Verfügung gestellt.

Die Antikörper-Zelllinie des HGAC39-Antikörpers wurde freundlicherweise von N. Greenspan (Cleveland, Ohio, USA) zur Verfügung gestellt.

Sekundäre Antikörper

anti-Maus-POD	Polyklonaler Ziege-Antikörper, der die Maus-Antikörper der Subklassen IgG und IgM erkennt, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase
anti-Kaninchen-POD	Polyklonaler Ziege-Antikörper, der die Kaninchen-Antikörper der Subklassen IgG und IgM erkennt, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase
anti-Maus-Cy3	Polyklonaler Ziege-Antikörper, der die Maus-Antikörper der Subklasse IgG erkennt, gekoppelt an Cy3

Alle Zweitantikörper wurden von der Firma Dianova (Hamburg) bezogen.

2.2 Lösungen und Puffer

Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen:

Aprotinin/Leupeptin-Stammlösung (10.000fach):	10 mg/ml Aprotinin 10 mg/ml Leupeptin
PBS:	137 mM NaCl 3 mM KCl 16 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2-7,4
Pepstatin-Stammlösung:	1 mg/ml Pepstatin in Methanol
Probenpuffer (5fach):	250 mM Tris-HCl 7,5 % (w/v) SDS 30 % (w/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol pH 6,8

2.3 Methoden

2.3.1 Zellkultur

2.3.1.1 Kultivierung und Subkultivierung von N2a- sowie COS-Zellen

HBSS⁻:
5,4 mM KCl
0,44 mM KH₂PO₄
136,9 mM NaCl
4,62 mM Na₂HPO₄
5,5 mM D-Glucose
0,03 mM Phenolrot
pH 7,2-7,4 (eingestellt)

Trypsin/HBSS⁻:
0,125 % Trypsin
(w/v) in HBSS⁻

Zellkulturmedium: RPMI 1640 (mit Glutamin)
1 % (v/v) Penicilin/Streptomycin
0,2 % (w/v) Geneticin G418
10 % (v/v) FKS

DMEM
1 % (v/v) Penicilin/Streptomycin
1 % (w/v) Glutamin
10 % (v/v) FKS

Murine N2a-Neuroblastomzellen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. T. Bayer, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universität Bonn, stabil mit der cDNA des Wildtyps bzw. der schwedischen Mutante des humanen APP₆₉₅ (N2a-APP₆₉₅- bzw. N2a-APP_{695Sw}-Zellen) transfiziert. Als Expressionsvektor diente der retrovirale Vektor pLXSN. Nähere Angaben zur Durchführung der Transfektion sind Weggen (1996) zu entnehmen.

N2a-Zellen werden in RPMI mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und in 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Selektion der Zellen, die das Plasmid stabil in ihr Genom integriert haben, erfolgt mit Geneticin G418 (0,2 %) in RPMI-Kulturmedium. Die Kultivierung erfolgt in T75-Zellkulturflaschen, die zur besseren Adhäsion der Zellen mit 0,1 % poly-L-Lysin (PLL) beschichtet werden.

Die für die transiente Transfektion verwendeten COS-Zellen werden in DMEM mit 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % Glutamin bei 37 °C und in 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Ca. 95 % konfluente Zellen werden dreimal mit HBSS⁻ gewaschen und dann zur Dissoziation ca. 3 min mit Trypsin/HBSS⁻ inkubiert. Durch Zugabe von 1/10 Vol. FKS wird der Prozess gestoppt, die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 150 g pelletiert. Das Zellpellet wird in Kulturmedium resuspendiert und abschließend in einem Verhältnis von 1:10 auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.3.1.2 Langzeit-Lagerung von Zellen

Einfrier-Medium: 90 % (v/v) Zellkultur-Medium
 10 % (v/v) DMSO

Zellen mit einer Konfluenz von ca. 95 % werden aus einer T75-Zellkulturflasche abgelöst und pelletiert (siehe 2.3.1.1). Das Zellsediment wird in 2 ml der Einfrierlösung resuspendiert und auf zwei 1 ml Kryogefäße verteilt. Bevor die Zellen zur Langzeit-Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden, werden sie ca. 1 Woche bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.1.3 Transiente Transfektion von N2a- sowie COS-Zellen

Die transiente Transfektion der N2a- sowie COS-Zellen mit der cDNA der O-GlcNAc-Transferase aus Ratte, die freundlicherweise von G. Hart (Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt wurde, erfolgt mit dem DOTAP-Kit der Fa. Roche entsprechend der Anleitung des Herstellers. Es werden 5 µg cDNA pro Petrischale (6 cm Durchmesser) zur Transfektion eingesetzt. Die Inkubation mit der DOTAP/cDNA-Mischung erfolgt 18 h. Nach dreimaligem Waschen mit HBSS⁻ werden die Zellen für weitere 24 h in Kulturmedium kultiviert.

2.3.1.4 Kultivierung von Zellen in Ab- und Anwesenheit von PUGNAc

Zur Behandlung der N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen mit PUGNAc, einem potenten Inhibitor der O-GlcNAc-Hydrolase, werden $0,25 \times 10^6$ Zellen/Petrischale (6 cm Durchmesser) ausgesät (siehe 2.3.1.1). Nach 72 h werden die Zellen dreimal mit HBSS⁻ gewaschen, 1,5 ml serumfreies RPMI und dann 40 μ M PUGNAc (1,5 μ l einer 40 mM Stammlösung) bzw. die äquivalente Menge aqua dem. zugegeben. Die Zellen werden anschließend 20 h weiterkultiviert.

2.3.1.5 Herstellung von Gesamthomogenaten von Zellen

Homogenisierungspuffer 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 8,0 (eingestellt)
 140 mM NaCl
 3 mM MgCl₂
 1 % (v/v) Nonidet P 40 (NP-40)

DPBS: Lösung A (10fach)
 1,37 M NaCl
 0,03 M KCl
 0,08 M Na₂HPO₄ • 2 H₂O
 0,01 M KH₂PO₄
 Lösung B (1.000fach)
 0,9 M MgCl₂ • 6 H₂O
 0,9 M CaCl₂ • 2 H₂O

100 mM GlcNAc sowie die Proteaseinhibitoren PMSF (1 mM), Aprotinin (1 μ g/ml), Leupeptin (1 μ g/ml) sowie Pepstatin (1 μ g/ml) werden dem Homogenisierungspuffer unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.

Nach dreimaligem Waschen mit DPBS werden die Zellen mit einem Zellschaber in Homogenisierungspuffer abgelöst und suspendiert. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wird die Suspension 10 min bei 15000 g (Biofuge 15R, Rotor 3743) und 4 °C zentrifugiert. 100 μ l des Überstandes (Gesamthomogenat) werden direkt mit 25 μ l 5fach Probenpuffer (siehe 2.2) versetzt und bis zur Analyse bei -20 °C, der restliche Überstand bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.1.6 Präparation der Detergens-löslichen Fraktion und der Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraktion (nach Refolo et al., 1991)

Solubilisierungspuffer A:

10 mM	PIPES (Serva, Heidelberg)
50 mM	KCl
2 mM	EGTA (Boehringer, Mannheim)
1 mM	MgCl ₂
2 M	Glycerin
0,5 % (w/v)	Triton X-100 (Serva, Heidelberg)
100 mM	GlcNAc (Sigma, München)

Solubilisierungspuffer B:

50 mM	Tris, pH 7,4
10 mM	EGTA
10 mM	EDTA
100 mM	NaCl
1 % (w/v)	SDS
100 mM	GlcNAc

100 mM GlcNAc sowie die Proteaseinhibitoren PMSF (1 mM), Aprotinin (1 µg/ml), Leupeptin (1 µg/ml) und Pepstatin (1 µg/ml) werden frisch zu den Puffern hinzugegeben.

Die Zellen werden dreimal mit DPBS (siehe 2.3.1.5) und einmal mit Solubilisierungspuffer A ohne Triton X-100 gewaschen bevor sie 5 min bei Raumtemperatur (RT) mit Solubilisierungspuffer A (mit Triton X-100) inkubiert und so extrahiert werden. Die Detergenslösung wird abgenommen und 10 min bei RT und 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wird als Detergens-lösliche Fraktion bezeichnet.

Die in der Petrischale verbliebenen Zellreste werden mit Solubilisierungspuffer A ohne Triton X-100 abgeschabt und mit einer Pistille auf Eis homogenisiert. Das Homogenat wird 15 min bei 4 °C und 10000 g zentrifugiert. Das Detergens-unlösliche Pellet wird in Solubilisierungspuffer B resuspendiert und ca. 7mal durch eine 22 gauge Nadel gepresst und zuletzt 10 min bei 100 °C erhitzt, um den Lösungsvorgang zu unterstützen. Nach einer abschließenden 10-minütigen Zentrifugation bei RT und 15000 g wird der Überstand, bei dem es sich um die Detergens-unlösliche Cytoskelettfraktion handelt, abpipettiert.

2.3.1.7 Gewinnung von konditionierten Medien

Ca. 85 % konfluente Zellen werden dreimal mit HBSS⁻ gewaschen und in serumfreiem Kulturmedium ca. 22 h weiterkultiviert. Der Zellkulturüberstand (konditioniertes Medium) wird abgenommen und mit den Proteaseinhibitoren PMSF (1 mM), Aprotinin (1 µg/ml), Leupeptin (1 µg/ml) sowie Pepstatin (1 µg/ml) versetzt. Ein Teil des konditionierten Mediums wird mit 5fach Probenpuffer (siehe 2.2) versetzt und bei -20 °C, der Rest nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

„Reagenz A“, „Reagenz S“ und „Reagenz B“ des Proteinbestimmungskits DC (Detergent Compatible) Protein Assay nach der Methode von Lowry (1951) (BioRad, München)
Bradford-Reagenz (BioRad, München)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry bzw. Bradford wird gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standard dient eine Verdünnungsreihe von BSA in Homogenisierungspuffer bzw. PBS bei Zellkulturüberständen. Die Ausgangskonzentration beträgt 10 µg/µl. Sie wird schrittweise bis zu einer Endkonzentration von 0,00049 µg/µl verdünnt. Sowohl von der Standardverdünnungsreihe als auch von den einzelnen Proben werden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Aus den Mittelwerten der Standardverdünnungsreihe wird nach Abzug des Hintergrundes eine Eichkurve erstellt. Durch Auftragen der optischen Dichte gegen die Konzentration lässt sich die Proteinkonzentration direkt bestimmen.

2.3.3 Proteinchemische Methoden

2.3.3.1 Immunpräzipitation von APP aus Gesamthomogenaten

LiCl-Waschpuffer:	100 mM	LiCl
	150 mM	Tris/HCl
		pH 7,4 (eingestellt)
Tris-Puffer:	1 mM	Tris/HCl
		pH 7,9 (eingestellt)

1 ml frisch präpariertes Gesamthomogenat wird mit 150 µl des an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelten polyklonalen anti-APP_s-IgY-Antikörpers (siehe 2.3.4) über Nacht (ü. N.) unter Rotieren bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird der Antigen-Antikörper-Sepharose-Komplex durch 2-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm (Biofuge 15R, Rotor 3743) und 4 °C pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet dreimal mit je 1 ml LiCl-Puffer und abschließend einmal mit 1 ml Tris/HCl gewaschen. Anschließend wird das Pellet in 120 µl reduzierendem 2fach Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 100 °C erhitzt. Die eluierten Proteine werden durch SDS-PAGE (siehe 2.3.3.2) aufgetrennt.

2.3.3.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Acrylamid-Stammlösung:	29,2 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
APS-Lösung:	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS pH 8,3
Sammelgelpuffer:	1 M Tris-HCl pH 6,8
SDS-Lösung:	10 % (w/v) SDS in aqua dem.
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl pH 8,8

Die Auftrennung von Proteinen gemäß ihres Molekulargewichtes erfolgt durch die diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970), bei der das Minigel-System der Fa. Biorad verwendet wird. Das Sammelgel hat eine Größe von 1 cm, das Trenngel von 6 cm. Die Zusammensetzung des Polyacrylamidgels und der Puffer entspricht der Vorschrift von Harlow und Lane (1988). Es wurden 1,5 mm dicke Polyacrylamidgele verwendet.

Die zu untersuchenden, mit Probenpuffer gemischten Proteine werden 10 min bei 100 °C denaturiert bzw. immunpräzipitierte Proteine eluiert. Nach Auftragen der Proben in die Geltaschen erfolgt die Auftrennung, indem man zunächst einen Stromfluss von 30 mA anlegt. Hat die Proteinfront das Trenngel erreicht, wird die Stromstärke auf 50 mA erhöht. Als Molekulargewichtsstandard wird die „Molekulargewichtsleiter“ der Fa. Gibco verwendet.

2.3.3.3 Coomassie-Blau Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Coomassie-Färbung:	6 % (w/v) Ammoniumsulfat
	2 % (v/v) Phosphorsäure
	6 % Ammoniumsulfat in 2 % Phosphorsäure lösen
	0,1 % (w/v) Coomassie brilliant blue G250 (das in 10 ml aqua dem. gelöst ist, wobei sich 0,1 % auf das Gesamtvolumen bezieht.)
Fixier-Lösung:	25 % (v/v) Isopropanol
	10 % (v/v) Essigsäure

Die SDS-Gele werden 30 min bei RT in der Fixier-Lösung inkubiert und anschließend ü. N. bei RT in der Coomassie-Lösung gefärbt. Am nächsten Tag wird nichtgebundener Farbstoff mit aqua dem. solange herausgewaschen, bis die gefärbten Proteinbanden sichtbar sind. Die Trocknung der Gele erfolgt unter Vakuum.

2.3.3.4 Westernblot nach dem Semi-dry Verfahren

Anodenpuffer I:	300 mM Tris-HCl
	20 % (v/v) Methanol
	pH 10,4
Anodenpuffer II:	25 mM Tris-HCl
	20 % (v/v) Methanol
	pH 10,4
Kathodenpuffer:	25 mM Tris-HCl
	20 % (v/v) Methanol
	40 mM Amino-n-Caprinsäure
	pH 9,4

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose transferiert. Es wird eine selbstgebaute horizontale Transferkammer mit einem diskontinuierlichen Puffersystem verwendet.

Vorbereitend werden zehn Stück Whatman-Filterpapier und ein Stück Nitrocellulose auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Es werden erst drei in Anodenpuffer I, dann zwei in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere auf die Anodengraphitplatte gelegt. Auf diesen Stapel legt man luftblasenfrei die mit Anodenpuffer II befeuchtete Nitrocellulose und das SDS-Gel. Bedeckt wird der Stapel mit fünf in Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren. Abschließend wird die Kathodengraphitplatte aufgelegt. Der Transfer erfolgt bei einem konstanten Strom von 150 mA bis 3 mA/cm² (entspricht bei einem der in 2.3.3.2 beschriebenen Gele ca. 25 min) geflossen sind. Die Nitrocellulose wird vor der weiteren Verwendung in aqua dem. gewaschen.

2.3.3.5 Ponceau-S-Färbung

Ponceau-S-Färbung: 0,2 % (w/v) Ponceau S
 3 % (v/v) Eisessig

Die reversible Ponceau-S-Färbung erfolgt, um den Proteintransfer auf die Nitrocellulosemembran zu kontrollieren. Gleichzeitig ermöglicht sie das Markieren des Molekulargewichtsstandards und das eventuelle Zerschneiden der Membran in einzelne Bahnen.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wird diese 2 min in der Ponceau S-Färbelösung inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen, wodurch die Proteine als rote Banden sichtbar werden. Nach Markierung der Proteinbanden des Molekulargewichtsstandards wird die Membran durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfärbt. Die Nitrocellulosemembran wird 5 min in PBS aufgekocht, wodurch unspezifische Wechselwirkungen von Antikörpern mit der Nitrocellulosemembran bzw. mit anderen Proteinen minimiert werden (Ida et al., 1996).

2.3.3.6 Detektion von Proteinen im Westernblot

Blockierlösung: 5 % (w/v) Milchpulver
 0,1 % (v/v) Tween 20
 in PBS

Inkubationslösung für Antikörper 0,25 % (w/v) BSA
 0,05 % (v/v) Tween 20
 in PBS

Antikörper-Verdünnungen:

AL25	1:5000
AL28	1:5000
8E5	1:10000
RL2	1:8000
W0-2	1:2000
anti-Maus-POD	1:5000
anti-Kaninchen-POD	1:5000

Waschpuffer I: 0,5 % (w/v) Triton X-100
 in PBS

Waschpuffer II: 0,05 % (v/v) Tween 20
 in PBS

Die Nitrocellulose wird eine Stunde bei RT in der Blockierlösung inkubiert. Anschließend wird sie dreimal in PBS gewaschen bevor die Inkubation mit dem primären Antikörper ü. N. bei 4 °C erfolgt. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers mit anderen Proteinen zu minimieren, wird die Membran dreimal jeweils 10 min mit Waschpuffer I gewaschen.

Die Inkubation mit dem sekundären, an Peroxidase-gekoppelten Antikörper erfolgt eine Stunde bei RT. Die Membran wird erneut dreimal jeweils 10 min mit Waschpuffer I gewaschen. Die Bindung beider Antikörper wird durch eine Chemilumineszenzreaktion, die durch die Peroxidase katalysiert wird, nachgewiesen. Dabei wird das SuperSignal[®] Substrate-Kit der Fa. Pierce eingesetzt. Das emittierte Licht wird auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Wird der W0-2-Antikörper als Primärantikörper eingesetzt, erfolgen alle Waschschritte mit Waschpuffer II. Für die Chemilumineszenzreaktion wird das Lumilight^{Plus}-Kit der Fa. Roche verwendet.

2.3.3.7 Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA)

Antigenverdünnungs-Lösung: 100 mM NaCO₃

Blockier-Lösung: 100 mM NaCO₃
1 % (w/v) BSA

Acetatpuffer: 100 mM Natriumacetat
50 mM Natriumdihydrogenphosphat
mit Eisessig auf pH 4,2 eingestellt

ABTS-Lösung 2 % (2,2'-Azino-di(3-ethyl-benzthiazoliumsulfonsäure(6)) (Roche, Mannheim)

Entwickler-Lösung: 95 % Acetatpuffer
0,1 % ABTS-Lösung
0,03 % H₂O₂ (35 %)

Stopp-Lösung: 0,6 % (w/v) SDS

Die Mikrotiterplatte wird mit ca. 50 µl konditioniertem Medium (45 ng/µl Protein) pro Vertiefung ü. N. bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird dreimal mit PBS gewaschen bevor mit jeweils 200 µl Blockier-Lösung blockiert wird. Nach erneutem Waschen mit PBS werden 50 µl des primären 8E5-Antikörpers in einer Verdünnung 1:2000 in jede Vertiefung pipettiert. Nach einer Inkubation von zwei Stunden bei RT wird dreimal mit PBS gewaschen und 50 µl des sekundären Antikörpers in einer Verdünnung von 1:2000 in jede Vertiefung pipettiert und ebenfalls für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS werden 50 µl der Peroxidase-Entwickler-Lösung zugegeben. Die Reaktion wird nach ca. 20 min gestoppt und die optische Dichte der Färbung photometrisch bei 405 nm bestimmt.

2.3.4 Isolierung von Antikörpern aus Hühner-Eigelb (verändert nach Jensenius et al., 1981)

5 g gefrorener Eidotter werden in 5 ml PBS suspendiert und mit weiteren 15 ml PBS vermischt. Danach werden 2 ml einer 10 %igen Dextransulfat-Lösung und 5 ml einer 1 M CaCl_2 -Lösung zugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wird das Gemisch bei 4 °C und 6000 g (2K15, Rotor 12139) 15 min zentrifugiert. Der klare Überstand wird auf Eis langsam mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 45 % versetzt und ü. N. bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend wird 30 min bei 4 °C und 6000 g (s.o.) zentrifugiert. Das Präzipitat wird in 1 ml PBS aufgenommen und 45 min bei 5000 g (Biofuge 15R, Rotor 3751) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (IgY-Fraktion) wird bei -20°C aufbewahrt.

Zur Überprüfung der Reinheit werden die Proteine des Überstandes mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt.

2.3.5 Kopplung des anti-APP_s-IgY-Antikörpers an CNBr-aktivierte Sepharose

Kopplungspuffer (2fach):	0,2 M NaHCO_3 1 M NaCl pH 8,3
Blockier-Lösung:	0,2 M Glycin pH 8,0 (eingestellt)
Saurer Waschpuffer:	0,1 M Na-Acetat x 3 H_2O 0,5 M NaCl pH 4,0 (eingestellt)
Basischer Waschpuffer:	0,1 M NaHCO_3 0,5 M NaCl pH 8,3 (eingestellt)

Der polyklonale anti-APP_s-IgY-Antikörper aus Hühner-Eigelb wird in einem Verhältnis von 1 mg CNBr-aktivierte Sepharose zu 2 µg Protein an diese gekoppelt. Dazu wird zunächst die Sepharose in 1 mM HCl in einem 15 ml Zentrifugenröhren gequollen und mehrmals mit 1 mM HCl gewaschen. Anschließend wird der Antikörper (1 ml Antikörper (10 mg Protein)), der in einem Verhältnis 1:1 mit Kopplungspuffer (2fach) versetzt wurde, aufpipettiert. Der Ansatz wird ü. N. unter Rotieren bei 4 °C inkubiert und dann bei 4 °C und 1600 g (Biofuge 15R, Rotor 3751) 4 min zentrifugiert. Danach werden die freien Bindungsstellen der CNBr-aktivierten Sepharose durch zweistündige Inkubation mit der Blockier-Lösung abgesättigt. Abschließend wird die Gelmasse je viermal im Wechsel mit

saurem und basischem Waschpuffer gewaschen. Die Lagerung erfolgt in PBS unter Zusatz von Micr-O-protect bei 4 °C.

2.3.6 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Antikörper-Verdünnungen:	8E5 1:2000 RL2 1:500 HGAC39 Hybridomaüberstand anti-Maus-Cy3 1:100
Blockierlösung:	1 % (w/v) BSA 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS
Inkubationslösung für die Antikörper :	0,25 % (w/v) BSA 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS
Mowiol-Lösung	4,8 g Mowiol 4-88 12 g Glycerin p.a. 12 ml aqua dem. 2 h bei RT mischen 24 ml 200 mM Tris/HCl, pH 8,5 10 min bei 50 °C erhitzen, dann 15 min bei 4000 rpm zentrifugieren; aliquotiert bei -20 °C lagern
PFA-Lösung:	4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in Phosphatpuffer
Phosphatpuffer	0,33 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 2,24 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O pH 7,3 (eingestellt)
Waschlösung:	0,2 % (v/v) Tween 20 in PBS

Für die indirekte Immunfluoreszenzanalysen werden $0,25 \times 10^6$ Zellen/Petrischale (6 cm Durchmesser) auf 8 mit PLL beschichteten Glasdeckgläschen ausgesät und 72 h kultiviert. Nach dreimaligem Waschen mit HBSS⁻ werden 2 ml serumfreies Kulturmedium dazu pipettiert und die Zellen 20 h in An- bzw. Abwesenheit von 40 µM PUGNAc bzw. der äquivalenten Menge aqua dem. inkubiert.

Sofern nicht anders erwähnt, erfolgen alle folgenden Schritte bei RT in einer feuchten, vor Lichteinfall geschützten Kammer. Die Zellen werden dreimal mit DBPS (siehe 3.1.5) gewaschen und 15 min mit PFA-Lösung fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit DBPS werden die Zellen mit eiskaltem (-20°C) 100 %igem Ethanol 5 min auf Eis permeabilisiert und dreimal mit DPBS gewaschen. Anschließend wird mit der Blockierlösung mindestens 15 min blockiert, bevor nach zweimaligem Waschen mit DPBS die Inkubation mit dem primären Antikörper (RL2 1:500; 8E5 1:2000) für eine Stunde erfolgt.

Nach dreimaligem Waschen mit der Wasch-Lösung werden die Zellen eine Stunde mit dem an Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper (1:500) inkubiert. Nach einem abschließendem Waschschrift werden die Deckgläschen in Ethanol entfettet, in Mowiol-Lösung eingebettet und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Anregung von Cy3 erfolgt bei 546 - 580 nm.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis der Expression und Sekretion des humanen APP₆₉₅ von stabil transfizierten N2a-Zellen

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf das proteolytische Prozessieren von APP analysiert werden. Die Versuche wurden mit der N2a-Neuroblastom-Zell-Linie durchgeführt, die in Zusammenarbeit mit PD Dr. Bayer, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Bonn, stabil mit der cDNA des Wildtyps des humanen APP₆₉₅ (N2a-APP₆₉₅-Zellen) transfiziert worden waren.

Als Expressionsvektor diente der retrovirale Vektor pLXSN. Die Verwendung von Retroviren als Vektoren für den Gentransfer und die Expression nicht-viraler Gene in eukaryotischen Zellen hat verschiedene Vorteile. Zum einen ist die Effizienz des Gentransfers größer als bei gängigen Transfektionsmethoden. Zum anderen integriert das retrovirale Genom stabil in die Chromosomen der Wirtszelle und wird bei jeder Teilung der Wirtszelle an die Tochtergeneration weitergegeben. Des Weiteren wird aufgrund der Struktur des Provirus eine hohe Expressionseffizienz der viralen Gene erzielt (Kriegler, 1994).

Eine wichtige Voraussetzung für die geplanten Versuche war, dass die transfizierten Zellen das humane APP₆₉₅ konstitutiv exprimieren und auch sezernieren. Als erstes wurden daher diese beiden Parameter untersucht.

Es wurde versucht, die Expression des humanen APP₆₉₅ nach Auftrennung von Zellhomogenaten mittels SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Blau nachzuweisen (siehe auch 3.2.2). Weiterhin wurde versucht, die Expression des humanen APP₆₉₅ nach metabolischer Markierung der Zellen mit ³⁵S-Methionin, Immunpräzipitation des humanen APP₆₉₅ mit dem monoklonalen 8E5-Antikörper (siehe Abb. 2 sowie 3.1.1) und Auftrennung mittels SDS-PAGE autoradiographisch zu detektieren. Keines der Experimente führte zum Nachweis des humanen APP₆₉₅.

Erst die Westernblot-Analyse führte zum spezifischen Nachweis des humanen APP₆₉₅ in Gesamthomogenaten sowie des sezernierten APP_s in Zellkulturüberständen. Möglicherweise hatten die Zellen in den genannten Versuchen trotz Selektionsdruck die Expression des exogenen Proteins eingestellt. Daher wurden die im folgenden beschriebenen Nachweise zur Kontrolle der Expression regelmäßig wiederholt.

3.1.1 Nachweis der Expression des humanen APP₆₉₅

Die Expression des humanen APP₆₉₅ wurde in Gesamthomogenaten konfluenter N2a-APP₆₉₅-Zellen mittels Westernblot analysiert. Da die primäre Aminosäuresequenz des murinen und humanen APP₆₉₅ zu 97 % identisch ist, war eine Kreuzreaktion humanspezifischer Antikörpern mit endogenem Maus-APP nicht auszuschließen (De Strooper et al., 1992). Aus diesem Grund dienten parentale, d.h. nicht-transfizierte N2a-Zellen als Kontrolle. Um für alle nachfolgenden Untersuchungen Zellen mit vergleichbarer Expression des humanen APP₆₉₅ einsetzen zu können, wurde zudem eine Einzelzell-Klonierung durchgeführt (siehe 3.1.2).

Zunächst wurde APP mit dem polyklonalen anti-APP_s-IgY-Antikörper (siehe 2.3.3 und 2.3.4) aus Gesamthomogenaten von N2a-APP₆₉₅-Zellen sowie des Einzelzell-Klons A2 (siehe 3.1.2) immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Parallel dazu wurden Gesamthomogenate der N2a-APP₆₉₅-Zellen aufgetrennt. Zur Detektion des humanen APP₆₉₅ wurde der humanspezifische monoklonale 8E5-Antikörper eingesetzt. Dieser erkennt die Aminosäuren 444-592 der N-terminalen, extrazellulären Domäne von APP (siehe Abb. 2) (Games et al., 1995). Das gleiche Prozedere wurde mit Gesamthomogenaten parentaler N2a-Zellen durchgeführt.

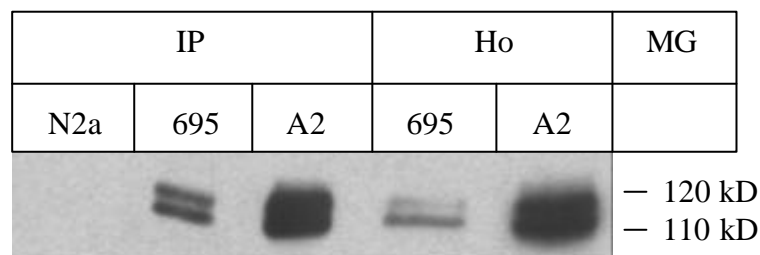


Abb. 5: Nachweis des humanen APP₆₉₅ aus immunpräzipitierten Proteinen und Gesamthomogenaten von N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen mittels Westernblot

Konfluente N2a- (N2a), N2a-APP₆₉₅-Zellen (695) sowie Zellen des Einzelzell-Klons A2 (A2) wurden homogenisiert. Mit dem polyklonalen anti-APP_s-IgY-Antikörper immunpräzipitierte Proteine (IP) bzw. Proteine des Gesamthomogenats (Ho) wurden über SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Immundetektion des humanen APP₆₉₅ erfolgte mit dem monoklonalen 8E5-Antikörper und dem anti-Maus-POD-Antikörper. (MG = Molekulargewichtsstandard)

Der Nachweis des humanen APP₆₉₅ wurde insgesamt 12mal wiederholt. Alle Versuche lieferten das gleiche Ergebnis.

Der 8E5-Antikörper detektierte zwei immunpräzipitierte Proteinbanden, die ein Molekulargewicht von ca. 110 kD und 115 kD aufweisen. Wie erwartet, reagierte der 8E5-Antikörper nicht mit immunpräzipitierten Proteinen von parentalen N2a-Zellen. Auch aus Gesamthomogenaten von N2a-APP₆₉₅-Zellen und des Einzelzell-Klons A2 wurden mit dem 8E5-Antikörper zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kD bzw. 115 kD nachgewiesen (Abb. 5).

Die Molekulargewichte der mit dem 8E5-Antikörper immundetektierten Proteine entsprechen denen von „reifem“ (115 kD) bzw. „unreifem“ (110 kD) APP₆₉₅ (Weidemann et al., 1989; Schubert et al., 1989; Thinakaran et al., 1996a). Das höhere Molekulargewicht der „reifen“ Form des APP resultiert daraus, dass es über komplexe N- und O-Glykane verfügt, während die „unreife“ Form nur die ER-spezifischen oligomannosidischen N-Glykane trägt. Da der 8E5-Antikörper nicht mit endogenem Maus-APP reagierte, muss es sich bei den beiden immundetektierten Proteinbanden um Formen des humanen APP₆₉₅ handeln.

Der spezifische Nachweis des humanen APP₆₉₅ wurde mit dem W0-2-Antikörper, einem humanspezifischen monoklonalen anti-A β -Antikörper (siehe Abb. 2 sowie 3.1.3.3), bestätigt (nicht gezeigt).

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde humanes APP₆₉₅ im Westernblot mit dem 8E5-Antikörper aus Gesamthomogenaten ohne vorangegangene Immunpräzipitation detektiert.

3.1.2 Einzelzell-Klonierung

Bei der Transfektion von Zellen entstehen heterogene Zellpopulationen, d.h. Zellen mit unterschiedlicher Expression des humanen APP₆₉₅. Um Zellen gleicher Expression zu erhalten, wurde eine Einzelzell-Klonierung durchgeführt, bei der insgesamt 9 Einzelzell-Klone (A2, A3, B2, C2, C4, D1, D3, E1 und E2) gewonnen wurden.

Es konnten erwartungsgemäß bei den jeweiligen Einzelzell-Klonen keine phänotypischen Veränderungen verglichen mit den nicht-klonierten Zellen beobachtet werden. Mit Hilfe der Westernblot-Analyse wurden die erhaltenen Einzelzell-Klone auf die Expression des humanen APP₆₉₅ untersucht.

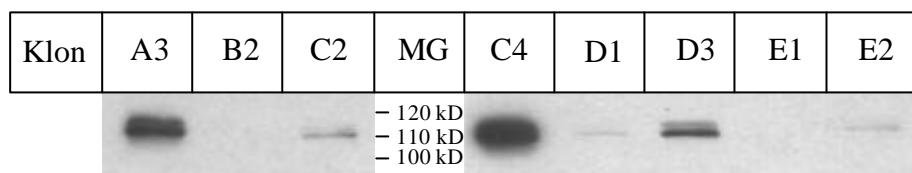


Abb. 6: Westernblot-Analyse der Expression des humanen APP₆₉₅ verschiedener Einzelzell-Klone

Konfluente Einzelzell-Klone (A3, B2, C2, C4, D1, D3, E1, E2) wurden homogenisiert. Jeweils 20 µg Protein wurden über SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Immundetektion des humanen APP₆₉₅ erfolgte mit dem monoklonalen 8E5-Antikörper und dem anti-Maus-POD-Antikörper. (MG = Molekulargewichtsstandard)

Abb. 6 zeigt die Expression des humanen APP₆₉₅ der Klone. Humanes APP₆₉₅ wurde von den Klonen B2, C2, D1, E1 und E2 nur in sehr geringer Menge exprimiert. Die Klone C4 und A3 hingegen exprimierten humanes APP₆₉₅ deutlich stärker. Die Expression des humanen APP₆₉₅ durch den Klon A2 war vergleichbar mit der Expression des Klons A3 (nicht gezeigt). Die weiteren Versuche wurden mit dem Klon A3 durchgeführt.

3.1.3 Nachweis der Sekretion des humanen APP_s

Nach Spaltung von APP durch die α - bzw. β -Sekretase entsteht das sog. APP_{s α} bzw. APP_{s β} (siehe Abb. 2). Diese APP-Fragmente werden von Zellen sezerniert und können daher in Zellkulturüberständen nachgewiesen werden.

Der Nachweis des humanen APP_s kann durch im fötalen Kälberserum enthaltene Proteine erschwert bzw. beeinträchtigt werden. Deshalb wurden ca. 90 % konfluente N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen in serumfreiem Kulturmedium gehalten. Der Zellkulturüberstand (sog. „konditioniertes Medium“) wurde nach 24stündiger Kultivierung abgenommen und analysiert.

3.1.3.1 Nachweis der Sekretion von humanem APP_s mittels Westernblot

APP_s wurde entweder ohne vorherige Konzentrierung oder nach Acetonfällung aus Zellkulturüberständen von N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen im Westernblot nachgewiesen. Alternativ wurde der Nachweis auch nach Immunpräzipitation mit dem polyklonalen anti-APP_s-IgY-Antikörper geführt. Alle drei Versuche, die 6mal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt wurden, waren erfolgreich.

Während nach Immunpräzipitation nur eine sehr schwache Proteinbande bei ca. 95 kD mit dem 8E5-Antikörper nachgewiesen werden konnte, war diese ohne vorherige Immunpräzipitation und v.a. nach Konzentrierung der Zellkulturüberstände deutlich zu erkennen (Abb. 7). Auch bei den immunpräzipitierten Proteinen von N2a-APP₆₉₅-Zellen ist bei längerer Exposition des Röntgenfilms eine Reaktion des Antikörpers zu verzeichnen (nicht gezeigt).

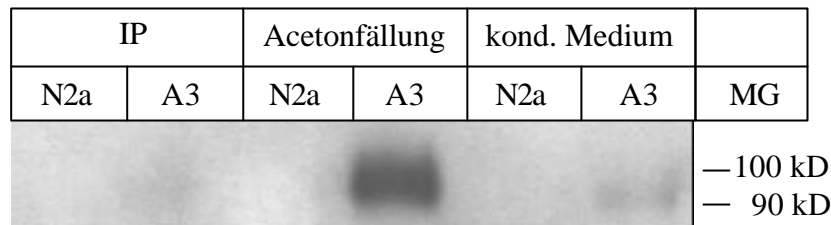


Abb. 7: Nachweis des humanen APP_s aus konditionierten Medien von N2a- (N2a) und N2a-APP₆₉₅-Zellen (A3) mittels Westernblot

Ca. 90 % konfluente N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen wurden 24 Stunden in serumfreien Kulturmedium kultiviert. Anschließend wurden die konditionierten Medien abgenommen. Mit dem polyklonalen anti-APP_s-IgY-Antikörper immunpräzipitierte Proteine (IP), mit Aceton gefällte Proteine (Acetonfällung) und Proteine des konditionierten Mediums ohne Vorbehandlung (kond. Medium) wurden über SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Humanes APP_s wurde mit dem monoklonalen 8E5-Antikörper und dem anti-Maus-POD Antikörper immundetektiert. (MG = Molekulargewichtsstandard)

Das Molekulargewicht des immundetektierten Proteins entspricht dem von APP_s (Thinakaran et al., 1996a). Der 8E5-Antikörper reagierte in keinem Fall mit einem der von den parentalen N2a-Zellen sezernierten Proteine. Somit muss es sich bei dem immundetektierten Protein um humanes APP_s handeln.

Der Nachweis des humanen APP_s aus konditionierten Medien konnte durch Behandlung der Nitrocellulose (5minütige Inkubation in kochendem PBS), Veränderung der Inkubationslösungen (Verdünnung der Antikörper nicht in Blockier- bzw. Milchpulverlösungen sondern in der Inkubationslösung, wie in 2.3.3.6 beschrieben) sowie Optimierung der Antikörperkonzentrationen verbessert werden. Dadurch wurde eine Konzentrierung mittels Acetonfällung oder Immunpräzipitation unnötig, so dass in den folgenden Versuchen der Nachweis des humanen APP_s direkt aus den Zellkulturüberständen mittels Westernblot erfolgen konnte.

3.1.3.2 Nachweis der Sekretion des humanen APP₆₉₅ mittels ELISA

Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse sollten zusätzlich im ELISA bestätigt werden. Mikrotiterplatten wurden mit Zellkulturüberständen von N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen beschichtet. Nach Inkubation mit dem monoklonalen 8E5-Antikörper als Erstantikörper und dem anti-Maus-POD-Antikörper wurde der ELISA wie in 2.3.2.7 beschrieben entwickelt.

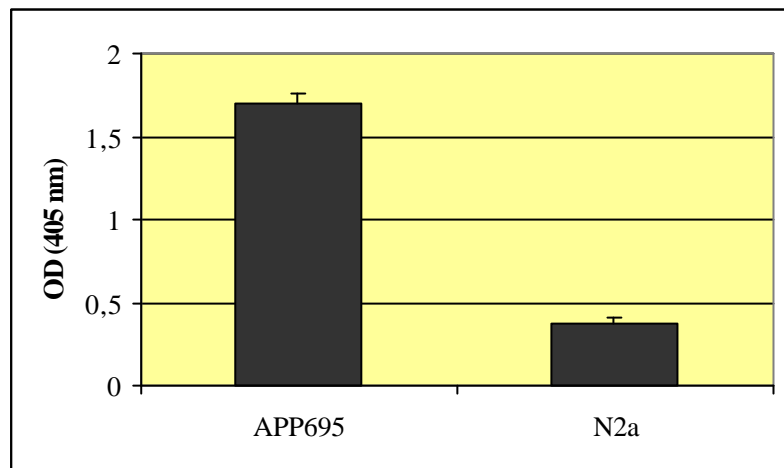


Abb. 8: ELISA von konditionierten Medien von N2a-APP₆₉₅- (APP695) und N2a-Zellen (N2a) mit dem monoklonalen 8E5-Antikörper

Ca. 90 % konfluente N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen wurden 24 Stunden in serumfreien Kulturmedium kultiviert. Anschließend wurden die konditionierten Medien abgenommen und jeweils 50 µl mit einer Proteinkonzentration von 45 ng/µl pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Blockierung der freien Bindungsstellen der Mikrotiterplatte mit BSA erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen 8E5-Antikörper und dem anti-Maus-POD-Antikörper. Die optische Dichte (OD) der Farbreaktion wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm (OD (405 nm)) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung. Der Hintergrund (Reaktion des anti-Maus-POD-Antikörpers mit Proteinen der konditionierten Medien bzw. dem Kulturmedium, Reaktion des 8E5-Antikörpers mit dem Kulturmedium, Reaktion beider Antikörper mit BSA) wurde nicht abgezogen. Die OD-Werte dieser Reaktionen lagen zwischen 0,13 und 0,24.

Der 8E5-Antikörper reagierte ausschließlich mit Proteinen aus dem konditionierten Medium der N2a-APP₆₉₅-Zellen. Die Reaktion mit Proteinen aus dem konditionierten Medium von Kontroll-N2a-Zellen lag im Bereich der unspezifischen Antikörperreaktionen (Abb. 8). Das ELISA-Ergebnis betätigt somit die Ergebnisse der Westernblot-Analyse.

3.1.3.3 Nachweis der Sekretion des humanen APP_{sa}

Aktivierung der PKC durch Phorbolster führt zu einem selektiven Anstieg der APP_{so}-Sekretion (siehe 1.4). Zudem besteht eine reziproke Beziehung zwischen der PKC-Phosphorylierung und der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen (Griffith und Schmitz, 1999). Daher erschien im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis von APP_{so} zusätzlich zu dem des gesamten APP_s sinnvoll.

Der in den vorangegangenen Kapiteln verwendete 8E5-Antikörper reagiert mit den Aminosäuren 444-592 des N-Terminus von APP (siehe Abb. 2). Er unterscheidet somit nicht zwischen α - und β -Sekretase gespaltenem APP_s, so dass nur eine Aussage über das gesamte APP_s möglich ist. Der C-Terminus von APP_{so} enthält 16 Aminosäuren, die im Falle der β -Sekretase-Spaltung von APP den N-Terminus von A β bilden. APP_{so} lässt sich daher mit einem Antikörper nachweisen, der spezifisch gegen diese Region gerichtet ist. Der human-spezifische monoklonale W0-2-Antikörper erkennt die Aminosäuren 5-8 des humanen A β (siehe Abb. 2) und kann daher zum spezifischen Nachweis des humanen APP_{so} verwendet werden.

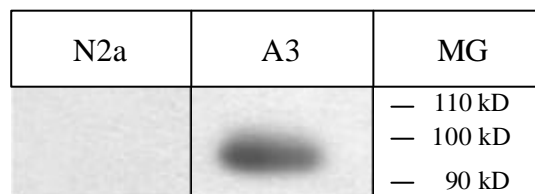


Abb. 9: Nachweis des humanen APP_{sa} aus konditionierten Medien von N2a- (N2a) und N2a-APP₆₉₅-Zellen (A3) mittels Westernblot

Ca. 90 % konfluente N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen wurden 24 Stunden in serumfreien Kulturmedium kultiviert. Anschließend wurden die konditionierten Medien abgenommen, die jeweiligen Proteine über SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Humanes APP_{so} wurde mit dem monoklonalen W0-2-Antikörper und dem anti-Maus-POD Antikörper immunodetektiert. (MG = Molekulargewichtsstandard)

Der W0-2-Antikörper reagierte mit einem der von N2a-APP₆₉₅-Zellen sezernierten Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 95 kD. Es konnte keine Reaktion mit von Kontroll-N2a-Zellen sezernierten Proteinen nachgewiesen werden (Abb. 9). Da das Molekulargewicht des mit dem W0-2-Antikörper immunodetektierten Proteins mit dem für APP_{so} bekannten Molekulargewicht übereinstimmt, ist anzunehmen, dass es sich bei dem detektierten Protein um humanes APP_{so} handelt (Thinakaran et al., 1996a).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die N2a-APP₆₉₅-Zellen humanes APP₆₉₅ dauerhaft exprimieren und humanes APP_s bzw. APP_{sα} sezernieren. Bei besserer Auftrennung der sezernierten Proteine konnten mit dem 8E5-Antikörper zwei distinkte Proteinbanden beobachtet werden, die ein um ca. 2 kD unterschiedliches Molekulargewicht aufwiesen (nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Thinakaran et al. (1996a) handelt sich bei den beiden Proteinen vermutlich um APP_{sα} sowie APP_{sβ}. Daraus lässt sich schließen, dass die N2a-APP₆₉₅-Zellen humanes APP₆₉₅ über den nicht-amyloidogenen sowie amyloidogenen Weg prozessieren. Sie stellen daher ein geeignetes Zellkultursystem für die geplanten Versuche dar.

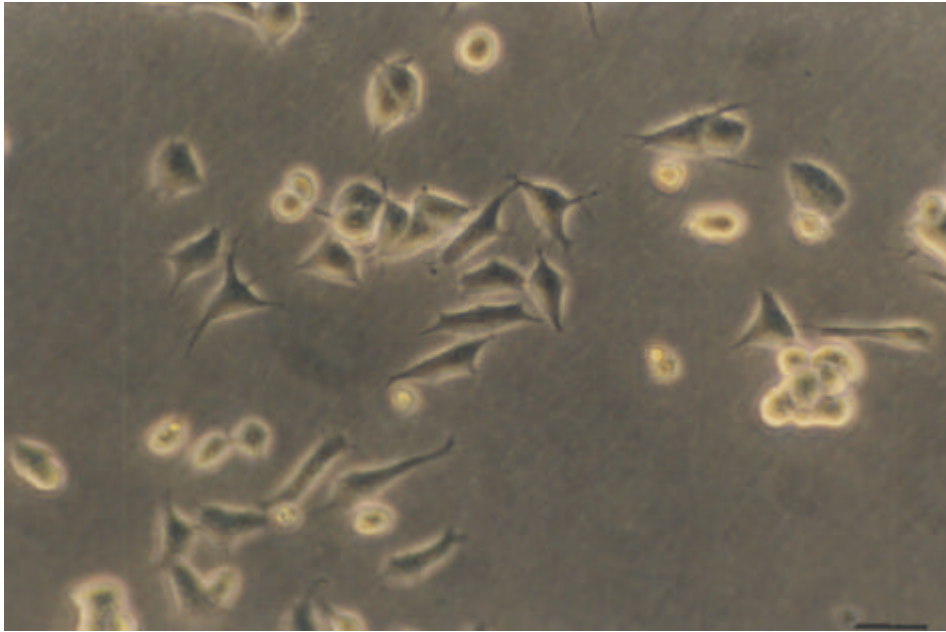
3.2 Einfluss der Expression des humanen APP₆₉₅ auf N2a-Zellen

3.2.1 Morphologischer Vergleich der N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen

Bei der Betrachtung mit dem Phasenkontrast-Mikroskop der parentalen und der von PD Dr. T. Bayer zur Verfügung gestellten transfizierten N2a-Zellen waren morphologische Unterschiede der Zellen zu beobachten. So wiesen N2a-APP₆₉₅-Zellen längere Neuriten auf und die Zellkörper waren stärker abgerundet, während die Zellkörper der parentalen N2a-Zellen spindelförmiger waren. Zudem wurden unterschiedlich große und viele lokale Verdickungen in den Neuriten der transfizierten Zellen beobachtet, die möglicherweise Synapsen darstellen (Abb. 10).

Diese morphologischen Unterschiede traten bei jedem der oben genannten Einzelzellklone auf (nicht gezeigt) und waren unabhängig von der Stärke der Expression des humanen APP₆₉₅ (siehe 3.1.2). Die veränderte Morphologie wurde während der gesamten Versuche beobachtet.

A



B

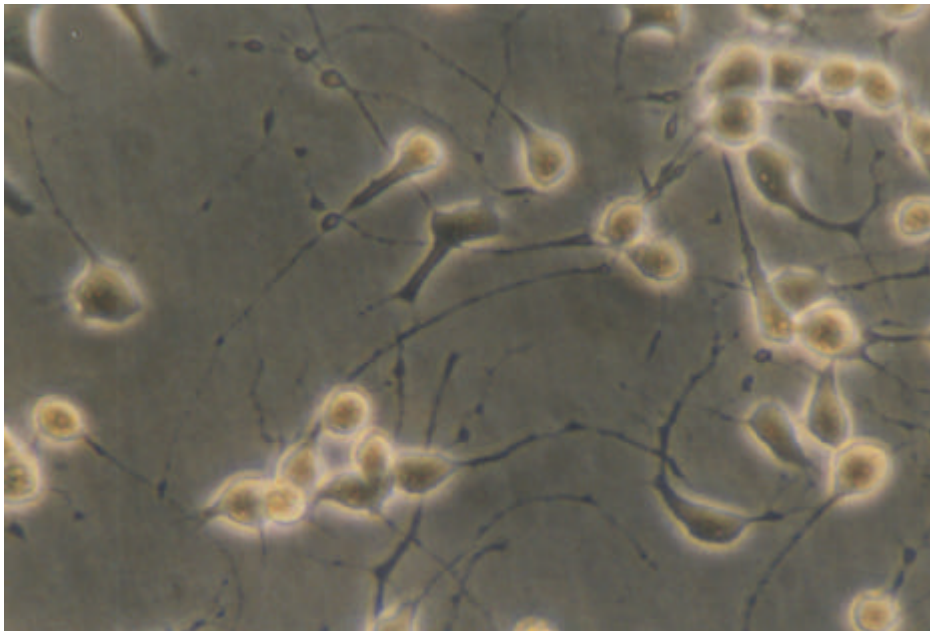


Abb. 10: Phasenkontrastaufnahmen von N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen
N2a (A) und N2a-APP₆₉₅-Zellen (B) wurden in PLL-beschichteten T75-Kulturflaschen nach Subkultivierung drei Tage kultiviert. Ca. 50 % konfluente Zellen wurden fotografiert. Der in Abb. 10A eingezeichnete Balken entspricht 10 μm .

3.2.2 Proteinbiochemischer Vergleich der N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen

Zusätzlich zu der veränderten Morphologie der N2a-APP₆₉₅-Zellen wurde eine verstärkte Adhärenz an das Plastikmaterial der Petrischalen dieser Zellen im Vergleich zu parentalen N2a-Zellen beobachtet. Dies machte sich bei der Subkultivierung der Zellen bemerkbar. Das Abtrypsinieren dauerte ca. zwei- bis dreimal so lange wie bei den parentalen Zellen.

Daher wurden auch proteinbiochemische Unterschiede zwischen den beiden Zell-Linien in Betracht gezogen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden neben Gesamthomogenaten auch die sog. Detergens-lösliche Fraktion bzw. Detergens-unlösliche Cytoskelettfraktion analysiert. In der Detergens-löslichen Fraktion sowie in Gesamthomogenaten befinden sich nach Detergens-Extraktion und Zentrifugation hauptsächlich cytosolische und Membran-assoziierte Proteine. Die Detergens-unlösliche Cytoskelettfraktion enthält im Gegensatz dazu Proteine, die sich nicht durch Detergens-Extraktion in Lösung bringen lassen. Dabei handelt es sich überwiegend um mit dem Cytoskelett-assoziierte und SDS-lösliche cytoskeletale Proteine (Refolo et al., 1991).

Proteine aus den genannten Fraktionen beider Zell-Linien wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Coomassie-Blau Färbung der Proteine. Dieser Versuch wurde insgesamt viermal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

Abb. 11 zeigt ein mit Coomassie-Blau angefärbtes Polyacrylamidgel, mit dem die Proteine von N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen der oben genannten Fraktionen aufgetrennt wurden. Zwischen den Bandenmustern der Gesamthomogenate und der Detergens-löslichen Fraktion wurden unter diesen Bedingungen nur Unterschiede in höheren Molekulargewichtsbereichen beobachtet. Einige Proteine mit einem Molekulargewicht > 200 kD waren in Gesamthomogenaten, nicht aber in der Detergens-löslichen Fraktion enthalten. Proteinbanden in diesem Molekulargewichtsbereich traten dafür in der Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraktion auf. Die Doppelbande bei ca. 33 kD sowie weitere Proteinbanden im unteren Molekulargewichtsbereich waren hingegen charakteristisch für die Detergens-unlösliche Cytoskelettfraktion. Einige Proteinbanden im unteren Molekulargewichtsbereich (< 40 kD) treten hingegen nur in der Detergens-löslichen Fraktion auf, d.h. dass es sich bei diesen Proteinen um cytosolische bzw. membrangebundene Proteine handelt. Dies trifft auch auf Proteine bei ca. 95 bzw. 60 kD zu.

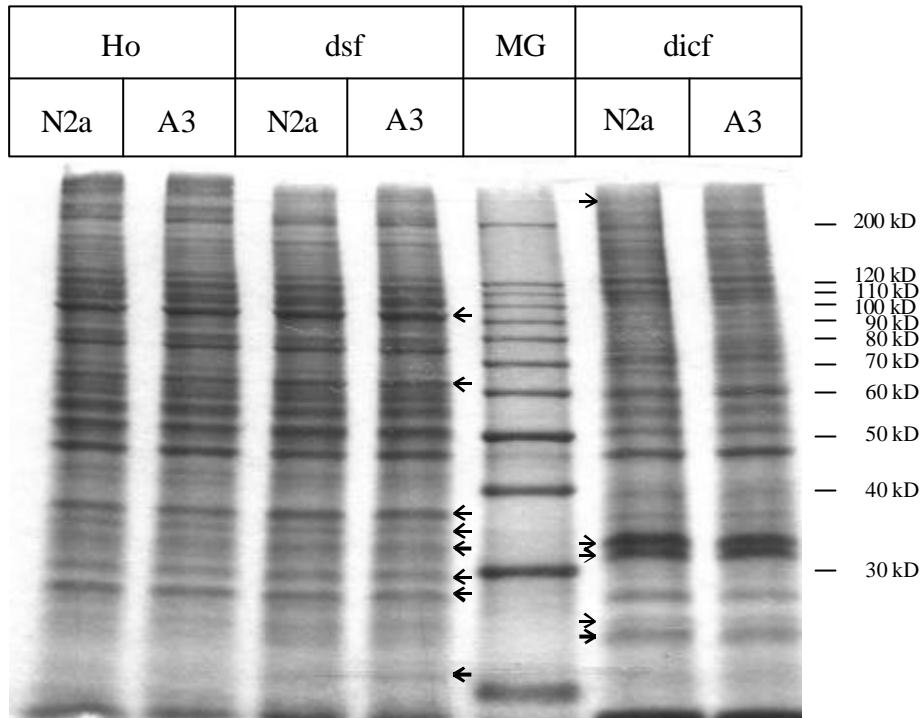


Abb. 11: Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Proteine von Gesamthomogenaten, der Detergens-löslichen Fraktion und der Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraction von N2a-(N2a) und N2a-APP₆₉₅-Zellen (A3)

Von konfluenten N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen wurden Gesamthomogenate (Ho), die Detergens-lösliche Fraktion (dsf) und die Detergens-unlösliche Cytoskelettfraction (dicf) präpariert. Jeweils 20 µg der entsprechenden Fraktionen wurden über SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Die Pfeile markieren Proteine, die nur in der Detergens-löslichen Fraktion bzw. Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraction vorkommen. (MG = Molekulargewichtsstandard)

Es konnten keine Unterschiede bezüglich des Bandenmusters der jeweiligen Fraktionen zwischen den beiden Zell-Linien beobachtet werden. Die Transfektion führt somit zu keinen unter diesen Bedingungen detektierbaren Veränderungen der Proteinexpression. Auch das in den N2a-APP₆₉₅-Zellen exprimierte humane APP₆₉₅ führte in Übereinstimmung mit den in 3.1.1 sowie 3.1.2 beschriebenen Versuchen nicht zu Unterschieden der Proteinbanden in dem Bereich von 100 - 120 kD. Es lässt sich daher nicht mit Sicherheit sagen, ob die verstärkte Adhärenz der N2a-APP₆₉₅-Zellen auf die zusätzliche Expression des humanen APP₆₉₅ zurückzuführen ist.

3.3 Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen aus N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen

Um den möglichen Einfluss von O-GlcNAc auf das Prozessieren des humanen APP₆₉₅ zu untersuchen, wurde zunächst die O-GlcNAc-Modifikation der gesamten von den N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen exprimierten Proteine analysiert und miteinander verglichen. Folgende Proteinfractionen der beiden Zellen-Linien wurden analysiert: Gesamthomogenate, die Detergens-lösliche Fraktion (überwiegend cytosolische und Membranproteine) sowie die Detergens-unlösliche Cytoskelettfraktion (überwiegend cytoskeletale und mit dem Cytoskelett assoziierte Proteine) (siehe 3.2.2). Die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen wurde im Westernblot mit dem monoklonalen RL2-Antikörper nachgewiesen.

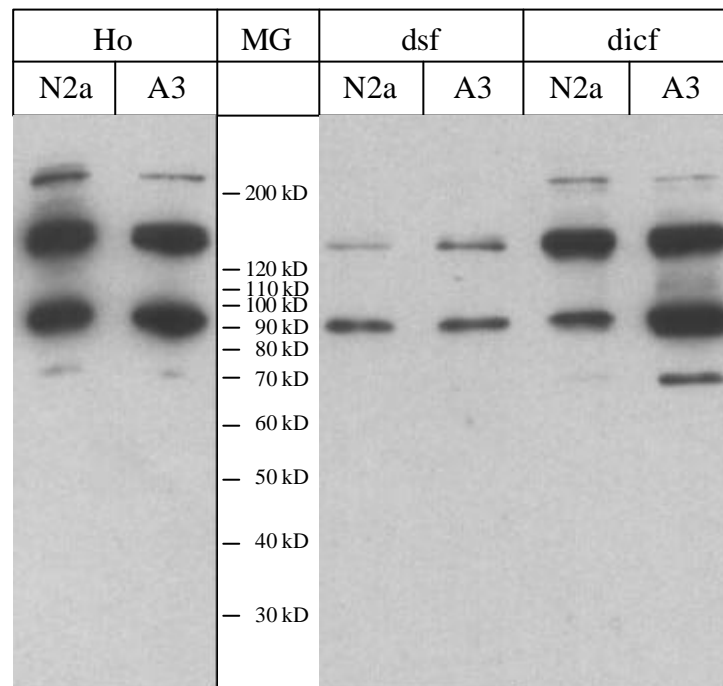


Abb. 12: Westernblot-Analyse der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen aus Gesamthomogenaten, der Detergens-löslichen Fraktion und der Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraktion von N2a- (N2a) und N2a-APP₆₉₅-Zellen (A3)

Von konfluenten N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen wurden Gesamthomogenate (Ho), die Detergens-lösliche Fraktion (dsf) und die Detergens-unlösliche Cytoskelettfraktion (dicf) präpariert. Jeweils 20 µg Protein wurden über SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen wurde mit dem monoklonalen RL2-Antikörper und dem anti-Maus-POD-Antikörper nachgewiesen. (MG = Molekulargewichtsstandard)

Abb. 12 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer von insgesamt vier durchgeführten Westernblot-Analysen. In Gesamthomogenaten wurden 4 bis 5 Proteine mit dem RL2-Antikörper detektiert. Diese wiesen alle ein Molekulargewicht > 60 kD auf. Die Reaktion mit zwei der genannten Proteine bei ca. 65 kD bzw. 210 kD war deutlich schwächer als mit den übrigen Proteinen.

Die von den Zellen exprimierten Proteine wurden in die Detergens-lösliche Fraktion bzw. die Detergens-unlösliche Cytoskelettfraktion differenziert. Beide Fraktionen scheinen die gleichen Proteine zu enthalten, allerdings in unterschiedlicher Verteilung. Der RL2-Antikörper reagierte stärker mit Proteinen der Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraktion als mit denen der Detergens-löslichen Fraktion, d.h. dass cytoskeletale und mit dem Cytoskelett-assoziierte Proteine der N2a-Zellen offensichtlich stärker O-GlcNAc-modifiziert sind als cytosolische und Membranproteine. Diese Beobachtung stimmt mit Untersuchungen von Griffith und Schmitz (1999) an Kleinhirnneuronen überein.

Wie zu erwarten, detektierte der RL2-Antikörper nicht alle von den N2a- bzw. N2a-APP₆₉₅-Zellen exprimierten Proteine wie bei einem Vergleich der Ergebnisse der Westernblot-Analyse (Abb. 12) mit dem Coomassie-gefärbten Gel (Abb. 11) deutlich wird. Die nur in der Detergens-löslichen Fraktion oder Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraktion vorkommenden Proteine (siehe Abb. 11) im unteren Molekulargewichtsbereich tragen keine detektierbare O-GlcNAc-Modifikation.

Es wurde kein Unterschied in der Reaktion des RL2-Antikörpers mit Proteinen von parentalen und transfizierten N2a-Zellen beobachtet, so dass ausgeschlossen werden kann, dass die Transfektion die O-GlcNAc-Expression beeinflusst.

3.4 Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation des humanen APP₆₉₅

Griffith et al. (1995) hatten den Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation des murinen APP mit einer chemischen Methode geführt. Dabei wurde der Einbau von ³H-Galactose in O-Glykane von immunpräzipitiertem APP gemessen, dessen N-Glykane zuvor mit PNGase F abgespalten worden waren (Griffith et al., 1995). Da es sich dabei um einen eher indirekten und umständlichen Nachweis handelt, wurde untersucht, ob die O-GlcNAc-Modifikation des humanen APP₆₉₅ im Westernblot nachweisbar ist.

APP wurde aus Gesamthomogenaten mit dem polyklonalen anti-APP_s-IgY-Antikörper immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und humanes APP₆₉₅ im Westernblot mit den monoklonalen Antikörpern 8E5 und W0-2 nachgewiesen. Der Nachweis von O-GlcNAc erfolgte mit den monoklonalen Antikörpern RL2 und HGAC39. Durch Berechnung der jeweiligen R_f-Werte wurde eine mögliche Übereinstimmung der erhaltenen APP- und O-GlcNAc-Chemilumineszenz-Signale geprüft.

Das Experiment wurde insgesamt 11mal mit dem 8E5- und dem RL2-Antikörper durchgeführt. Bei 7 Versuchen wurden jeweils die R_f-Werte berechnet, wobei in 6 Versuchen vergleichbare Werte erhalten wurden. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde viermal zusätzlich zum 8E5-Antikörper der W0-2-Antikörper erfolgreich eingesetzt. Der Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation sollte mit dem HGAC39-Antikörper bestätigt werden. Dies gelang aber auf Grund der unzuverlässigen Reaktion des HGAC-Antikörpers im Westernblot nur bei einem von drei Versuchen.

Abb. 13 zeigt eine exemplarische Westernblot-Analyse. Beide anti-APP-Antikörper detektierten zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 115 kD und 110 kD (Abb. 13B und 13C). Da sowohl der 8E5- als auch der W0-2-Antikörper nicht mit endogenem Maus-APP reagieren, muss es sich bei den beiden Proteinen um die reife (ca. 115 kD) bzw. unreife (ca. 110 kD) Form des humanen APP₆₉₅ handeln (siehe 3.1.1 und 3.1.2).

Der RL2-Antikörper reagierte mit mehreren Proteinen. Die Reaktion mit einem ca. 100 kD und einem ca. 110 kD großen Protein ist besonders stark (Abb. 13A und 13B). Der HGAC39-Antikörper reagierte ebenfalls mit mehreren der immunpräzipitierten Proteine. Dazu gehört auch die Reaktion mit einem ca. 115 kD sowie 110 kD großen Protein. Allerdings zeigte der HGAC39-Antikörper mit diesen beiden Proteinen im Vergleich zu den anderen Proteinen eine relativ schwache Reaktivität (Abb. 13C).

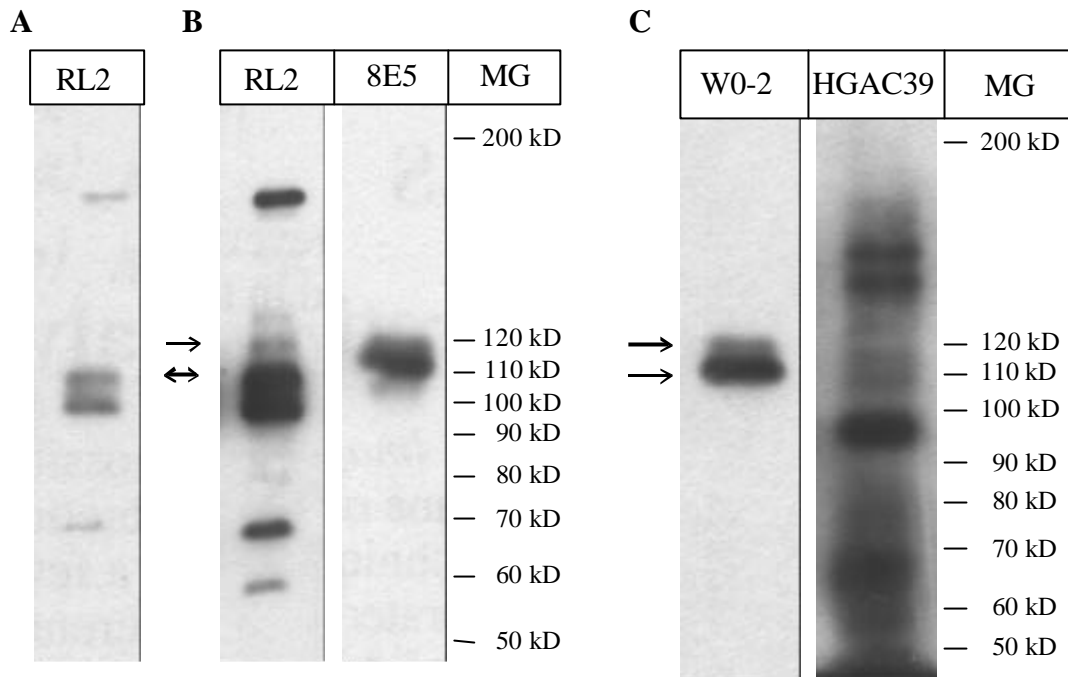


Abb. 13: Westernblot-Analyse der O-GlcNAc-Modifikation des humanen APP₆₉₅

Konfluente N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen wurden homogenisiert und APP mit dem polyklonalen anti-APP_s-IgY-Antikörper immunpräzipitiert. Die über SDS-PAGE (8 %) aufgetrennten immunpräzipitierten Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert und humanes APP₆₉₅ mit den monoklonalen Antikörpern: 8E5 (B) und W0-2 (C) und dem anti-Maus-POD-Antikörper immun-detektiert. Der Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen erfolgte mit den monoklonalen Antikörpern RL2 (A und B) und HGAC39 (C) mittels Immunoblot. Abb. 13A und 13B zeigen denselben Versuch mit dem RL2-Antikörper, wobei der Röntgenfilm in Abb. 13B länger exponiert wurde. Es wurden die R_f -Werte der Chemilumineszenz-Signale berechnet. Alle vier Antikörper reagierten mit zwei Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich von ca. 110 kD bzw. ca. 115 kD. (MG = Molekulargewichtsstandard)

Die R_f -Werte der oben genannten beiden Proteinbanden wurden berechnet und in einem semilogarithmischem Diagramm ausgewertet (nicht gezeigt). Diese Auswertung ergab übereinstimmende Molekulargewichtsbereiche von Proteinbanden bei 110 und 115 kD, die sowohl von den anti-APP- als auch von den O-GlcNAc-spezifischen Antikörpern erkannt wurden. Dies bedeutet, dass nicht nur, wie bereits gezeigt wurde, Maus-APP sondern auch das humane APP₆₉₅ O-GlcNAc-modifiziert ist. Der Vergleich der R_f -Werte der mit dem RL2-Antikörper detektierten Proteinbanden mit denen, die vom 8E5-Antikörper erkannt wurden, lässt vermuten, dass die unreife Form des humanen APP₆₉₅ stärker O-GlcNAc-modifiziert ist als die reife Form.

Die Reaktion des RL2- und HGAC39-Antikörpers mit mehreren der mit dem polyklonalen anti-APP_s-IgY-Antikörper immunpräzipitierten Proteine ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der anti-APP_s-IgY-Antikörper nicht affinitätsaufgereinigt wurde und daher offenbar zusätzlich zum humanen APP₆₉₅ noch weitere Proteine aus Gesamthomogenaten

immunpräzipitiert wurden. Endogenes Maus-APP weist ein um ca. 5 kD größeres Molekulargewicht auf als humanes APP₆₉₅ (nicht gezeigt), so dass es sich bei den mit dem RL2- bzw. HGAC35-Antikörper immundetektierten 110 kD bzw. 115 kD großen Proteinen vermutlich nicht um endogenes Maus-APP handelt.

3.5 Lokalisation des humanen APP₆₉₅ in verschiedenen Zellfraktionen

Es war an verschiedenen Zell-Linien gezeigt worden, dass APP mit dem Cytoskelett assoziiert ist (Allinquant et al., 1994; Refolo et al., 1991). Aktivierung der PKC führt in C6-Gliomzellen aus noch unbekanntem Grund zu einer gesteigerten Assoziation von APP mit dem Cytoskelett (Refolo et al., 1991). Da eine reziproke Beziehung zwischen der PKC-Phosphorylierung und O-GlcNAc gezeigt worden war, ist es möglich, dass nicht nur die Phosphorylierung durch die PKC sondern auch Veränderungen der O-GlcNAc-Expression die Assoziation von APP mit dem Cytoskelett beeinflussen (siehe 1.5.2) (Griffith und Schmitz, 1999).

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch das von den N2a-Zellen exprimierte humane APP₆₉₅ mit dem Cytoskelett assoziiert ist. Dazu wurden in Anlehnung an Refolo et al. (1991) die sog. Detergens-lösliche Fraktion und Detergens-unlösliche Cytoskelettfraktion präpariert (siehe 3.2.2). Die Lokalisation des humanen APP₆₉₅ in den beiden Fraktionen wurde mit dem monoklonalen 8E5-Antikörper im Westernblot analysiert. Insgesamt wurden 8 Experimenten mit jeweils Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Abb. 14 zeigt exemplarisch eine Westernblot-Analyse. In der Detergens-löslichen Fraktion wurde schon nach kurzer Exposition des Röntgenfilms eine Reaktion des 8E5-Antikörpers beobachtet (Abb. 14A). Erst nach deutlich längerer Exposition des Röntgenfilmes traten auch in der Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraktion zwei Proteinbanden auf (Abb. 14B).

Das von den N2a-Zellen exprimierte humane APP₆₉₅ war somit hauptsächlich in der Detergens-löslichen Fraktion lokalisiert und nur in geringem Ausmaß in der cytoskeletalen Fraktion. Im Gegensatz dazu haben andere Arbeitsgruppen gezeigt, dass APP überwiegend in cytoskeletaler Assoziation vorliegt (Allinquant et al., 1994; Refolo et al., 1991).

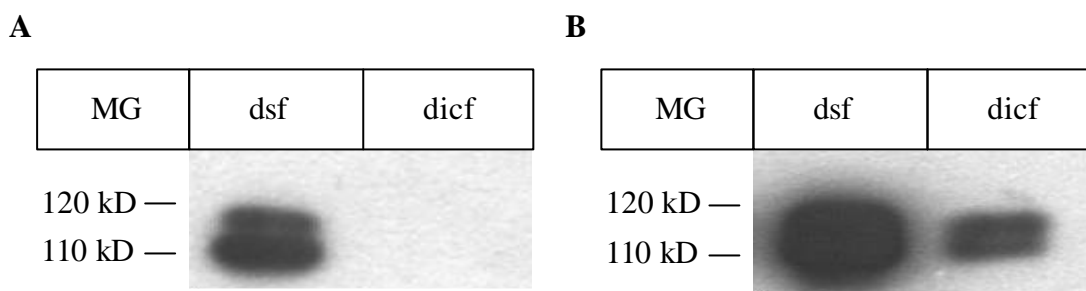


Abb. 14: Nachweis des humanen APP₆₉₅ in der Detergens-löslichen Fraktion (dsf) und der Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraktion (dicf) mittels Westernblot

Von konfluenten N2a-APP₆₉₅-Zellen wurden die Detergens-lösliche Fraktion und die Detergens-unlösliche Cytoskelettfraktion präpariert. Jeweils 20 µg Protein wurden über SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Humanes APP₆₉₅ wurde mit dem 8E5-Antikörper und dem anti-Maus-POD Antikörper immunodetektiert. Abb. 14A und 14B zeigen denselben Versuch, wobei in Abb. 14B der Röntgenfilm länger exponiert wurde.

3.6 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit der cDNA der O-GlcNAc-Transferase

Es war gezeigt worden, dass Transfektion von HEK293- und HeLa-Zellen mit der cDNA der OGT zu einer gesteigerten Enzymaktivität und damit zu einer gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen führt (Kreppel et al., 1997; Lubas et al., 1997). Daher wurde versucht, die O-GlcNAc-Expression in N2a-Zellen mit dieser Methode zu erhöhen, um den Einfluss von O-GlcNAc auf das Prozessieren von APP bei gesteigerter O-GlcNAc-Expression untersuchen zu können.

Zusätzlich zu N2a- bzw. N2a-APP₆₉₅-Zellen wurden COS-Zellen transient transfiziert. Mit der DOTAP-Technik wurden insgesamt drei transiente Transfektionen von N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen sowie vier transiente Transfektionen von COS-Zellen durchgeführt. COS-Zellen wurden zusätzlich als Kontrolle mit der cDNA für humanes L1, ein transmembranes Zelladhäsionsmolekül der Ig-Superfamilie, transfiziert.

Nach 18stündiger Inkubation mit dem DOTAP-Reagenz und der jeweiligen cDNA (5 µg) (siehe 2.3.1.3) und Wechsel des Zellkulturmediums wurden die Zellen weitere 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden Gesamthomogenate der Zellen präpariert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Für die Analyse der Expression der OGT mittels Westernblot wurden die polyklonalen Kaninchen-Antikörper AL25 und AL28 eingesetzt. Gleichzeitig wurde untersucht, ob es zu einer Veränderung der O-GlcNAc-Expression kam.

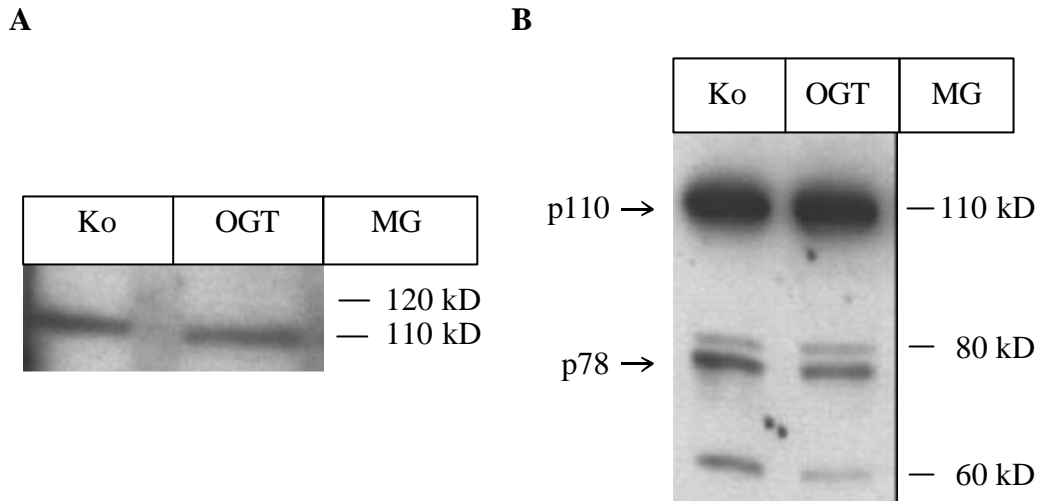


Abb. 15: Westernblot-Analyse der transient mit der cDNA für die O-GlcNAc-Transferase (OGT) transfizierten COS-Zellen mit den polyklonalen Antikörpern AL25 (A) und AL28 (B)

Ca. 80 % konfluente COS-Zellen wurden mit dem DOTAP-Kit und der cDNA der OGT (5 µg) entsprechend den Angaben des Herstellers transfiziert (OGT). Kontrollzellen (Ko) wurden mit Ausnahme der DNA identisch behandelt. Die Zellen wurden 18 Stunden mit dem DOTAP-DNA-Gemisch inkubiert und anschließend 24 Stunden in Kulturmedium weiterkultiviert. Die Zellen wurden homogenisiert, 40 µg Protein über SDS-PAGE (8 %) aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Immundetektion der OGT erfolgte mit den polyklonalen Antikörpern AL25 bzw. AL28 und dem anti-Kaninchen-Antikörper. (MG= Molekulargewicht)

Abb. 15 zeigt einen repräsentativen Westernblot nach transienter Transfektion von COS-Zellen mit der cDNA der OGT. Der AL25-Antikörper reagierte ausschließlich mit einem Protein von ca. 110 kD (Abb. 15A). Mit dem AL28-Antikörper wurden insgesamt vier Proteine immundetektiert, die ein Molekulargewicht von ca. 60 kD, 78 kD, 80 kD bzw. 110 kD aufwiesen (Abb. 15B).

Die bei Eukaryoten hoch konservierte OGT ist ein Heterotrimer aus zwei p110 Untereinheiten und einer p78 Untereinheit (siehe 1.6.3.1). Der AL25-Antikörper wurde gegen die in *E. coli* überexprimierte, rekombinante p110 Untereinheit hergestellt, der AL28-Antikörper gegen deren C-Terminus (persönliche Mitteilung C. Shane, Baltimore, USA). Es wurden keine Kreuzreaktion mit anderen Proteinen beobachtet (Kreppel et al., 1997). Beide Antikörper detektierten die p110 Untereinheit, der AL28-Antikörper außerdem die p78-Untereinheit der OGT.

Zusätzlich dazu reagierte der AL28-Antikörper mit einer ca. 80 und 60 kD großen Proteinbande. Dieses Bandenmuster wurde ebenfalls nach Silberfärbung der aus Rattenleber auf

gereinigten OGT beschrieben. Dabei scheinen weder das ca. 80 kD noch das ca. 60 kD große Protein ein Enzymbestandteil zu sein (Haltiwanger et al., 1992b).

In keinem der durchgeführten Experimente konnten Unterschiede in der Reaktion der beiden Antikörper zwischen Kontroll- und transfizierten Zellen beobachtet werden, so dass es sich bei den detektierten Proteinen um die endogene OGT der COS- bzw. N2a-Zellen handelt. Es wurde nach der Transfektion auch keine Zunahme der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen beobachtet (nicht gezeigt).

Da auch humanes L1 nach Transfektion mit der entsprechenden cDNA nicht nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt), wird davon ausgegangen, dass die transienten Transfektionen der N2a- und der COS-Zellen nicht erfolgreich war.

3.7 Einfluss von PUGNAc auf die O-GlcNAc-Modifikation und das proteolytische Prozessieren des humanen APP₆₉₅

Um mögliche Auswirkungen einer gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf verschiedene Parameter des APP-Prozessierens untersuchen zu können, wurden N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen 20 Stunden mit 40 µM PUGNAc, einem potenten Inhibitor der O-GlcNAc-Hydrolase, behandelt (Haltiwanger et al., 1998).

Der Einfluss der PUGNAc-Behandlung auf folgende Parameter wurde untersucht: 1. die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen allgemein, 2. die Expression des humanen APP₆₉₅, 3. die O-GlcNAc-Modifikation des humanen APP₆₉₅, 4. die intrazelluläre Lokalisation des humanen APP₆₉₅ sowie 5. die Sekretion des humanen APP_s bzw. APP_{sα}. Die Analyse des sezernierten Aβ₁₋₄₀ wurde von Dr. D. Beher, Merck, London, durchgeführt.

3.7.1 Untersuchung des Einflusses von PUGNAc auf die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen

Unter serumfreien Bedingungen wurde der Einfluss einer 20stündigen PUGNAc-Behandlung auf die O-GlcNAc-Expression von Proteinen der Gesamthomogenate von N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen untersucht. Die serumfreien Bedingungen waren für den Nachweis des humanen APP_s bzw. APP_{sα} aus Zellkulturüberständen notwendig (siehe 3.1.2). Außerdem wurden intrazelluläre Immunfluoreszenz-Färbungen der Zellen durchgeführt.

Für die Westernblot-Analyse wurden insgesamt 10 Versuche mindestens als Doppelbestimmung durchgeführt ($n = 29^1$). Die immunocytochemischen Experimente umfassten insgesamt 9 Versuche mindestens als Doppelbestimmung.

3.7.1.1 Untersuchung des Einflusses von PUGNAc auf die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen im Westernblot

Gesamthomogenate von Kontroll- und mit PUGNAc behandelten N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen wurden präpariert. Die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen wurde im Westernblot mit dem RL2-Antikörper analysiert. Alle durchgeführten Experimenten lieferten ähnliche Ergebnisse. Allerdings wurden in den durchgeführten Versuchen immer wieder Schwankungen in der Reaktivität des RL2-Antikörpers beobachtet (nicht gezeigt).

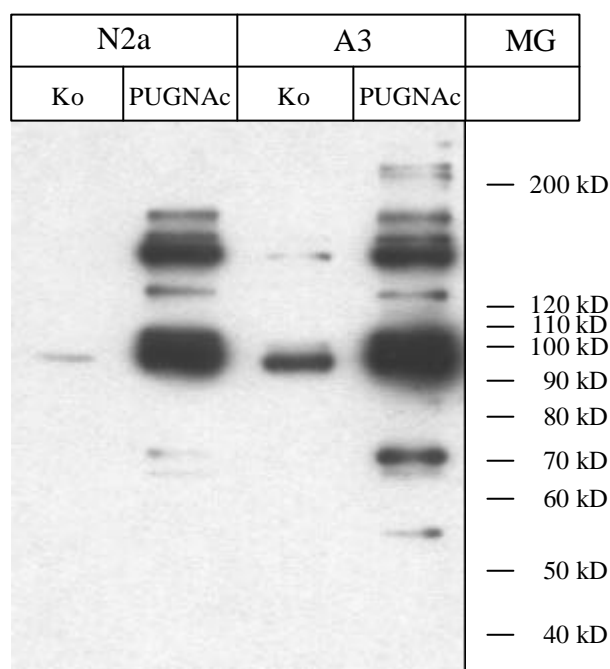


Abb. 16: Westernblot-Analyse der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen von Gesamthomogenaten von N2a- (N2a) und N2a-APP₆₉₅-Zellen (A3) in Ab- (Ko) und Anwesenheit (PUGNAc) von PUGNAc

Ca. 85 % konfluente N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen 20 Stunden mit PUGNAc (40 μ M) kultiviert und anschließend Gesamthomogenate präpariert. 20 μ g Protein wurden über SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und mit dem monoklonalen Antikörper RL2 und dem anti-Maus-POD-Antikörper analysiert. (MG = Molekulargewichtsstandard)

¹ Es wurden jeweils 29 Kontroll- sowie 29 mit PUGNAc-behandelte Zellen analysiert.

PUGNAc führte zu einem deutlich sichtbaren Anstieg der Reaktion des RL2-Antikörpers. Neben der stärkeren Reaktion des Antikörpers mit den Proteinen, die auch unter Kontrollbedingungen detektiert wurden, ließen sich zusätzlich noch weitere Proteine als O-GlcNAc-modifiziert nachweisen. Diese Beobachtungen treffen für N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen zu (Abb. 16).

3.7.1.2 Untersuchung des Einflusses von PUGNAc auf die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen mittels indirekter Immunfluoreszenz

Mittels Immuncytochemie sollten die Ergebnisse der Westernblot Analyse bestätigt werden. Die immuncytochemischen Untersuchungen wurden mit den monoklonalen Antikörpern RL2 und HGAC39 durchgeführt. Auf mit PLL beschichteten Glasdeckgläschen kultivierte N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen 20 Stunden mit 40µM PUGNAc inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die immuncytochemische Färbung mit dem RL2- bzw. HGAC39-Antikörper. Alle 9 durchgeführten Experimente lieferten die gleichen Ergebnisse.

Abb. 17 zeigt exemplarisch intrazelluläre Immunfluoreszenz-Färbungen mit dem RL2-Antikörper. Der RL2-Antikörper färbt insbesondere den Kern von nicht mit PUGNAc-behandelten Zellen, während das Cytoplasma eine deutlich schwächere Färbung aufweist. Zusätzlich wurde der proximale Bereich der Neuriten von spindelförmigen Zellen gefärbt. Zwischen nicht mit PUGNAc-behandelten Zellen der parentalen sowie der transfizierten Zellen wurden keine Unterschiede beobachtet.

PUGNAc-Behandlung der Zellen führte – wie erwartet – zu einem Anstieg der Intensität der Färbung, und zwar der nukleären und cytoplasmatischen Färbung. Im Gegensatz zum Westernblot ist der Anstieg der Immunfluoreszenzfärbung des RL2-Antikörpers relativ schwach (Abb. 17).

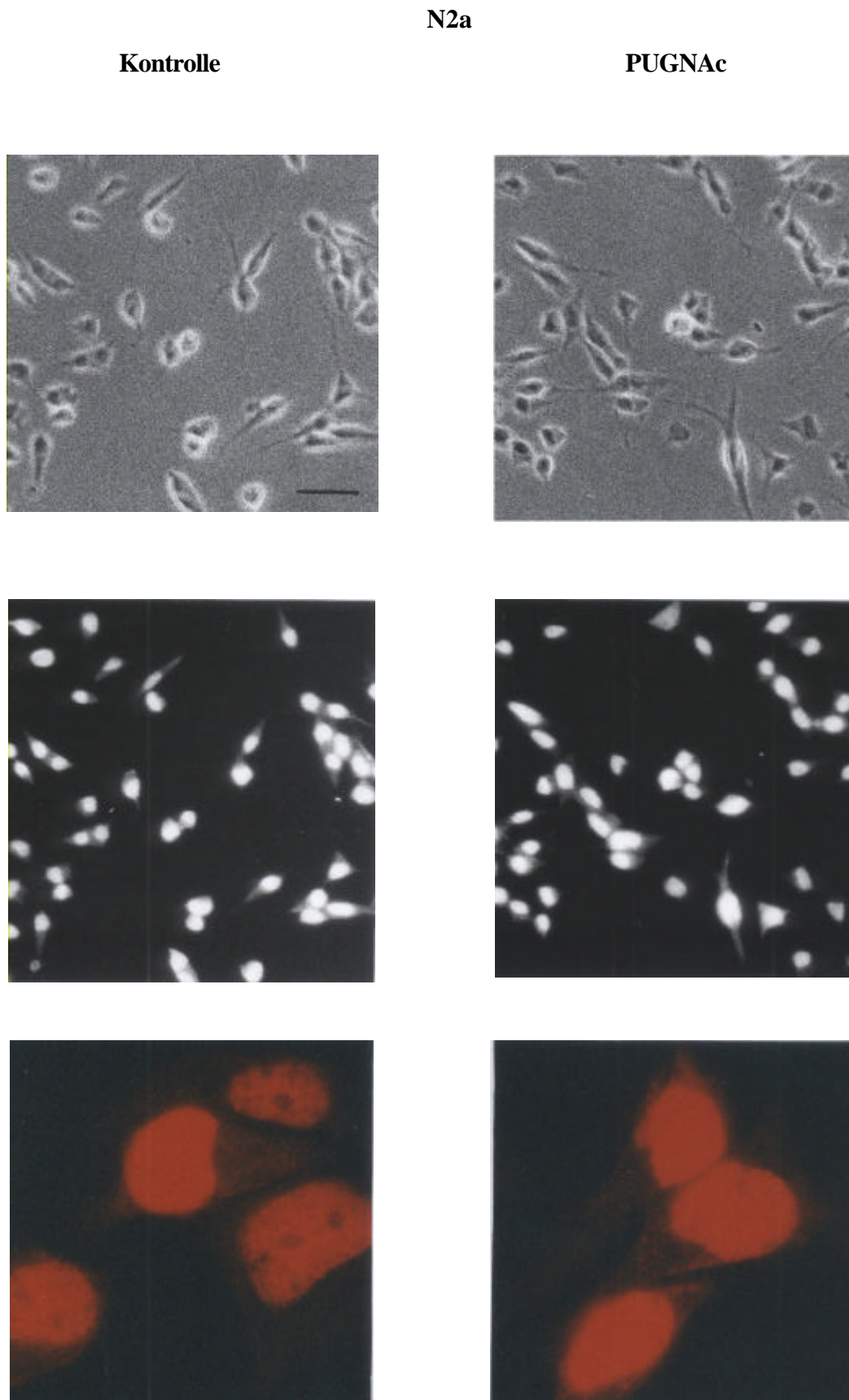


Abb. 17A

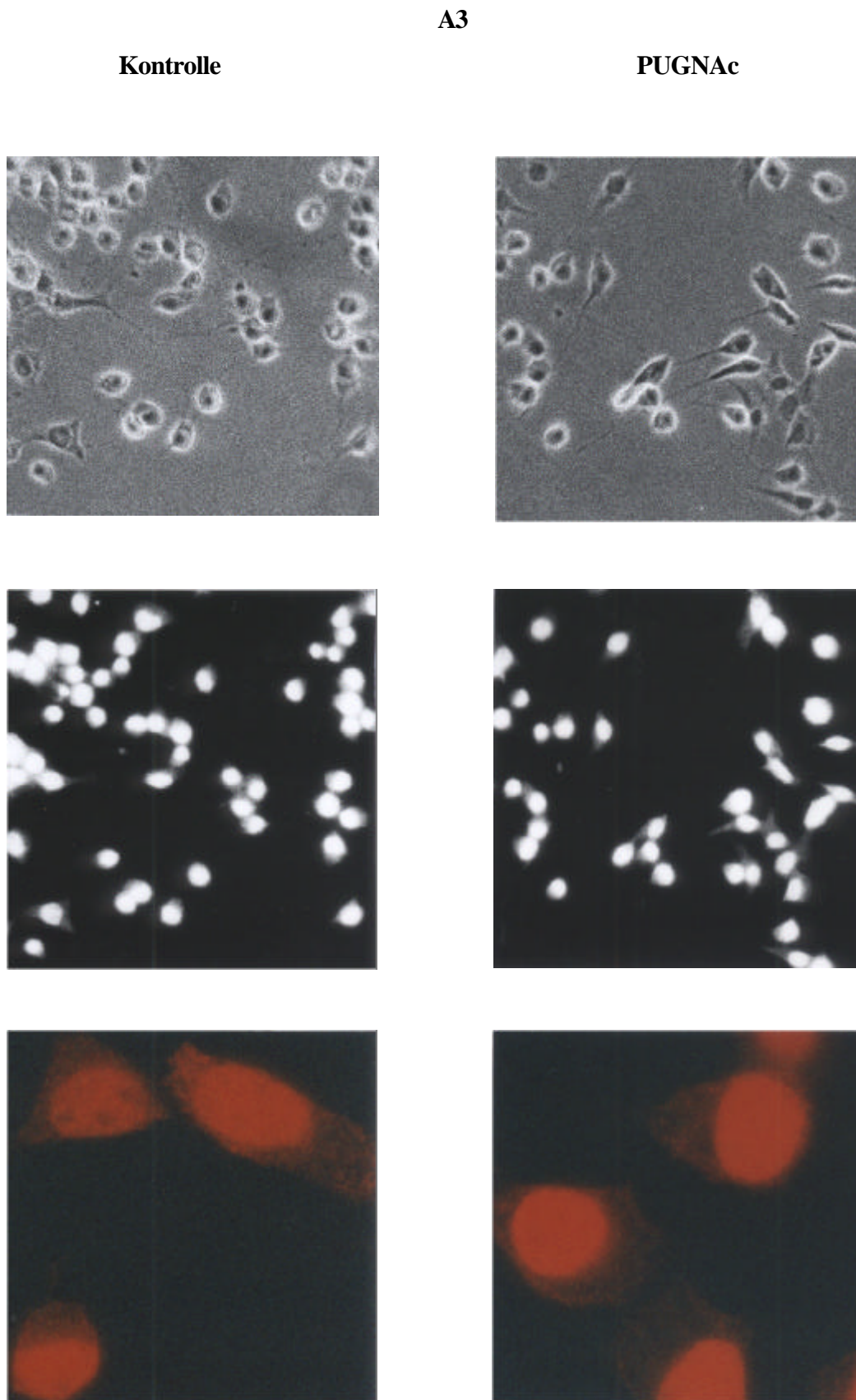


Abb. 17B

Abb. 17: Intrazelluläre Immunfluoreszenz-Färbung von N2a- (A) und N2a-APP₆₉₅-Zellen (B) in Ab- (Kontrolle) und Anwesenheit (PUGNAc) von PUGNAc mit dem monoklonalen Antikörper RL2

N2a- (N2a) und N2a-APP₆₉₅-Zellen (A3) wurden nach Subkultivierung drei Tage auf mit PLL-beschichteten Glasdeckgläsern und dann unter serumfreien Bedingungen 20 Stunden in Ab- bzw. Anwesenheit von 40 µM PUGNAc, einem Inhibitor der O-GlcNAc-Hydrolase, kultiviert. Nach Fixierung mit Paraformaldehyd (4 %) und Permeabilisierung mit Ethanol (100 %, p.a.) wurden die Zellen mit dem monoklonalen RL2-Antikörper und dem anti-Maus-Cy3 Antikörper inkubiert. Die mikroskopische Beobachtung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 546 - 580 nm. Der eingezeichnete Balken entspricht 20 µm.

3.7.2 Einfluss von PUGNAc auf die O-GlcNAc-Modifikation des humanen APP₆₉₅

Um zu untersuchen, ob auch das humane APP₆₉₅ und dessen schwedische Mutante (APP_{695Sw}) in Gegenwart des Inhibitors der O-GlcNAc-Hydrolase PUGNAc verstärkt O-GlcNAc-modifiziert sind, wurden N2a-APP₆₉₅-Zellen und N2a-APP_{695Sw}-Zellen 20 Stunden in Ab- bzw. Anwesenheit von 40 µM PUGNAc kultiviert. Anschließend wurden die Zellen homogenisiert, APP aus den Gesamthomogenaten mit dem polyklonalen anti-APP₅-IgY-Antikörper immunpräzipitiert (siehe 3.1.1 sowie 3.4), das Immunpräzipitat über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Der Nachweis des humanen APP₆₉₅ bzw. APP_{695Sw} erfolgte mit dem monoklonalen 8E5-Antikörper und der Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation mit dem monoklonalen RL2-Antikörper. Dieses Experiment wurde insgesamt 5mal durchgeführt.

Abb. 18 zeigt das Ergebnis einer repräsentativen Westernblot-Analyse. Der 8E5-Antikörper reagierte mit zwei der aus Gesamthomogenaten immunpräzipitierten Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 115 kD bzw. 110 kD, die die reife (ca. 115 kD) bzw. unreife (ca. 110 kD) Form des humanen APP₆₉₅ bzw. APP_{695Sw} darstellen (siehe 3.1.1 sowie 3.4). Zwischen Kontroll- und PUGNAc behandelten Zellen konnte kein signifikanter Unterschied der Immunreaktion des 8E5-Antikörpers beobachtet werden. Die Reaktion des 8E5-Antikörpers mit APP_{695Sw} war allerdings sichtbar schwächer als mit APP₆₉₅, vermutlich bedingt durch eine schwächere Expression des APP_{695Sw}.

Der RL2-Antikörper reagierte mit mehreren Proteinen, u.a. auch mit zwei Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 115 kD bzw. 110 kD. PUGNAc-Behandlung der Zellen führte zu einer sichtbar stärkeren Immunreaktion des RL2-Antikörpers.

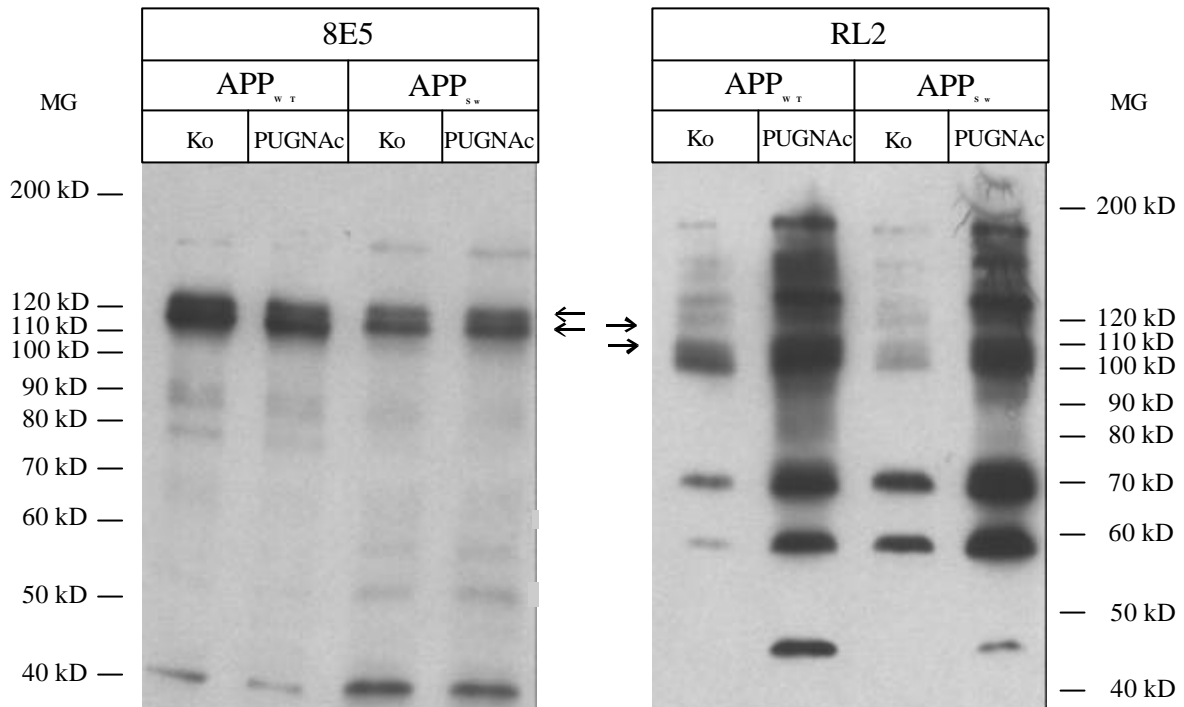


Abb. 18: Westernblot-Analyse der O-GlcNAc-Modifikation des Wildtyps (APP_{WT}) und der schwedischen Mutante (APP_{Sw}) des humanen APP₆₉₅ in Ab- (Ko) und Anwesenheit (PUGNAc) von PUGNAc

Ca. 90 % konfluente N2a-APP₆₉₅- und APP_{695Sw}-Zellen wurden 20 Stunden mit 40 μ M PUGNAc behandelt. Anschließend wurden die Zellen homogenisiert und APP mit dem polyklonalen anti-APP₅-IgY-Antikörper immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden über SDS-PAGE (8 %) aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Humanes APP_{WT} bzw. APP_{Sw} wurden mit dem monoklonalen 8E5-Antikörper und dem anti-Maus-POD-Antikörper, die O-GlcNAc-Modifikation mit dem monoklonalen RL2-Antikörper und dem anti-Maus-POD-Antikörper nachgewiesen. Die R_f -Werte der erhaltenen Chemilumineszenz-Signale wurden berechnet. Beide Antikörper reagieren mit zwei Proteinen, die ein Molekulargewicht von ca. 110 kD bzw. ca. 115 kD aufweisen (MG = Molekulargewichtsstandard)

Es wurden die R_f -Werte der jeweiligen Chemilumineszenz-Signale berechnet und in einem semilogarithmischem Diagramm ausgewertet (nicht gezeigt). Diese Auswertung ergab übereinstimmende Molekulargewichte der Proteinbanden bei 110 kD und 115 kD, die sowohl von dem 8E5- als auch von dem RL2-Antikörper erkannt wurden. Das bedeutet, nicht nur der Wildtyp des humanen APP₆₉₅ ist O-GlcNAc-modifiziert sondern auch dessen schwedische Mutante. Inkubation der Zellen mit PUGNAc führte zu einer gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation des humanen APP₆₉₅ bzw. APP_{695Sw}, jedoch sind die unreifen Formen beider Proteine deutlich stärker O-GlcNAc-modifiziert als die jeweilige reife Form.

Es konnte wie erwartet kein Unterschied hinsichtlich der O-GlcNAc-Modifikation zwischen humanem APP₆₉₅ und APP_{695Sw} beobachtet werden, da der C-Terminus beider Proteine identisch ist.

3.7.3 Einfluss von PUGNAc auf die Expression und Sekretion des humanen APP₆₉₅

Für die Untersuchung des Einflusses einer gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf das proteolytische Prozessieren des humanen APP₆₉₅ wurden N2a-APP₆₉₅-Zellen unter serumfreien Bedingungen 20 Stunden mit 40 µM PUGNAc inkubiert.

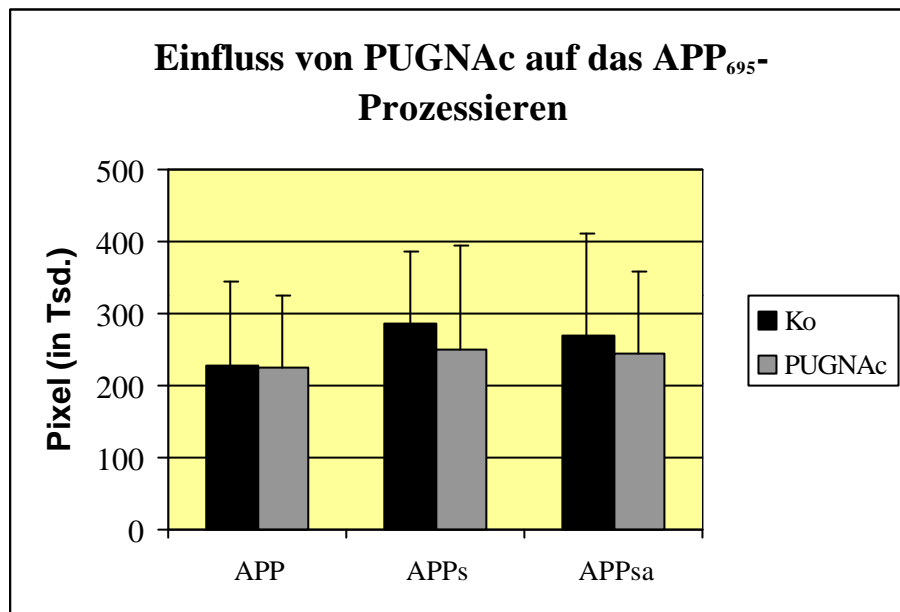


Abb. 19: Einfluss von PUGNAc auf die Expression und Sekretion des humanen APP₆₉₅ (APP), APP_s (APPs) und APP_{sa} (APPsa)

Ca. 85 % konfluente N2a-APP₆₉₅-Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen in Ab- (Ko) und Anwesenheit (PUGNAc) von 40 µM PUGNAc kultiviert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand (konditioniertes Medium) abgenommen und die Zellen homogenisiert. 10 µg Protein der Gesamthomogenate wurden über SDS-PAGE (8 %) aufgetrennt und humanes APP₆₉₅ mit dem monoklonalen 8E5-Antikörper und dem anti-Maus-POD-Antikörper mittels Westernblot immunodetektiert. Für den Nachweis des humanen APP_s wurden 0,5 µg Protein des konditionierten Mediums über SDS-PAGE (8 %) aufgetrennt und APP_s mittels Westernblot mit dem monoklonalen 8E5-Antikörper nachgewiesen. Zur Immundetektion des humanen APP_{sa} mit dem monoklonalen W0-2-Antikörper wurde 1 µg Protein des konditionierten Mediums über SDS-PAGE (8 %) aufgetrennt. Die den Proteinen entsprechenden Chemilumineszenz-Signale wurden mit dem Programm ImageQuant quantifiziert. Die erhaltenen Werte sind in Pixel (in Tausend (Tsd.)) angegeben. Für die statistische Auswertung wurde ein unabhängiger T-Test mit n=29 durchgeführt.

Es wurden insgesamt 10 Versuche mit Doppel- bis Vierfachbestimmungen der Gesamthomogenate sowie der konditionierten Medien von Kontroll- bzw. PUGNAc-behandelten Zellen analysiert. Humanes APP₆₉₅, APP_s sowie APP_{sα} wurden mittels Westernblot detektiert und die den Proteinen entsprechenden Chemilumineszenz-Signale mit dem Programm ImageQuant densitometrisch quantifiziert. Zur statistischen Auswertung wurde ein unabhängiger T-Test (n = 29) durchgeführt.

Abb. 19 zeigt, dass eine 20-stündige Behandlung der Zellen mit PUGNAc keinen Einfluss auf die Expression des humanen APP₆₉₅ sowie die Sekretion von APP_s und APP_{sα} hat.

Die Analyse des sezernierten A β _{x-40} wurde in Kooperation mit Dr. D. Beher, London, durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem sog. HTRF (homogeneous time-resolved fluorescence) „Immunoassay“. Bei dieser Methode wird die Überlagerung von Resonanzenergie zwischen zwei Fluorophoren genutzt. Mit diesen Fluorophoren sind Antikörper markiert, die mit dem N- bzw. C-Terminus von A β reagieren. Die Eigenschaften der eingesetzten Fluorophore ermöglichen eine quantitative und qualitative Bestimmung von A β in Lösungen (Clarke und Shearman, 2000). Die Konzentrationen des sezernierten A β _{x-42} konnte auch mit dieser Methode nicht bestimmt werden, da sie unterhalb der Detektionsgrenze lagen (persönliche Mitteilung Dr. Beher).

Sezerniertes A β _{x-40} wurde von 6 Kontrollversuchen sowie von 6 Versuchen mit PUGNAc-behandelten Zellen gemessen. Die A β _{x-40}-Konzentration betrug in konditionierten Medien von Kontrollzellen 1,22 pmol/ml konditioniertes Medium. Dem gegenüber wurde eine Konzentration von 1,04 pmol/ml konditioniertes Medium bei den mit PUGNAc-behandelten Zellen gemessen werden. Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls mit einem unabhängigen T-Test. Dieser ergab eine signifikante Abnahme der A β _{x-40}-Sekretion (p = 0,01).

Unter den gewählten Bedingungen hat die gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen weder einen messbaren Einfluss auf die Expression des humanen APP₆₉₅ noch auf die Sekretion des humanen APP_s bzw. APP_{sα}. Hingegen führt eine gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation zu einer signifikanten Abnahme der A β _{x-40}-Sekretion.

3.7.4 Einfluss von PUGNAc auf intrazelluläre Lokalisation des humanen APP₆₉₅

Um zu untersuchen, ob O-GlcNAc die intrazelluläre Verteilung des humanen APP₆₉₅ beeinflusst, wurde untersucht, ob die Behandlung der N2a-APP₆₉₅-Zellen mit PUGNAc die subzelluläre Lokalisation des humanen APP₆₉₅ beeinflusst. Es wurde daher zum einen die Assoziation des humanen APP₆₉₅ mit dem Cytoskelett in Ab- bzw. Anwesenheit von PUGNAc untersucht, zum anderen die subzelluläre Lokalisation des humanen APP₆₉₅ mittels Immuncytochemie.

3.7.4.1 Einfluss von PUGNAc auf die Lokalisation des humanen APP₆₉₅ in verschiedenen Zellfraktionen

N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen wurden 20 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von PUGNAc kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Detergens-lösliche Fraktion sowie die Detergens-unlösliche Cytoskelettfraktion präpariert (siehe 3.2.2). Humanes APP₆₉₅ wurde mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen.

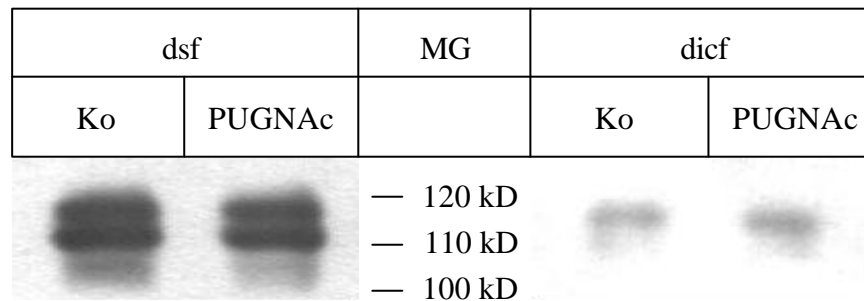


Abb. 20: Analyse des humanen APP₆₉₅ in der Detergens-löslichen Fraktion (dsf) und Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraktion (dicf) in Ab- (Ko) und Anwesenheit (PUGNAc) von PUGNAc mittels Westernblot

Ca. 85 % konfluente N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen wurden 20 Stunden mit PUGNAc (40 µM) kultiviert. Anschließend wurden die Detergens-lösliche Fraktion und die Detergens-unlösliche Cytoskelettfraktion präpariert. Jeweils 20 µg Protein der beiden Fraktionen wurden über SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und mit dem monoklonalen Antikörper 8E5 und dem anti-Maus-POD-Antikörper analysiert. (MG = Molekulargewichtsstandard)

Es wurden insgesamt vier Experimente mit Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen durchgeführt. In allen durchgeführten Experimenten konnte eine starke Reaktion des 8E5-Antikörpers in der Detergens-löslichen Fraktion beobachtet werden. Nur in zwei der durchgeführten Versuche konnte eine Reaktion des 8E5-Antikörpers mit humanem APP₆₉₅ in der Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraktion verzeichnet werden (Abb. 20). Dies beruht ver-

mutlich auf den geringen Mengen des humanen APP₆₉₅, die in dieser Fraktion detektiert werden konnten (siehe Abb. 14). PUGNac hatte keinen Einfluss auf die Verteilung des humanen APP₆₉₅ zwischen der Detergens-löslichen Fraktion und der Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraktion (Abb. 20).

3.7.4.2 Immuncytochemische Untersuchung des Einflusses von PUGNac auf die intrazelluläre Lokalisation des humanen APP₆₉₅

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation des humanen APP₆₉₅ mittels indirekter Immunfluoreszenztechnik wurden auf Glasdeckgläschen kultivierte N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen unter serumfreien Bedingungen 20 Stunden in Ab- bzw. Anwesenheit von PUGNac inkubiert. Die immuncytochemische Färbung erfolgte anschließend mit dem monoklonalen 8E5-Antikörper. Es wurden insgesamt 9 Versuche mit Doppel- oder Dreifachbestimmungen durchgeführt, die alle zu denselben Ergebnissen führten.

Im Gegensatz zur Westernblot Analyse (siehe 3.1.1 und 3.1.2) zeigte der 8E5-Antikörper eine schwache Immunfluoreszenzfärbung von cytoplasmatischen Vesikeln und Neuriten der parentalen N2a-Zellen (Abb. 21A). Ob es sich dabei jedoch um eine spezifische Reaktion des 8E5-Antikörpers mit murinem APP oder um eine unspezifische Reaktion handelt, lässt sich nicht ohne weiteres beurteilen.

N2a-APP₆₉₅-Zellen hingegen wiesen eine starke cytoplasmatische Färbung auf. Auffallend war die Perlenschnur-ähnliche Färbung der Neuriten der N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen und die deutlich verstärkte Färbung der Neuriten sowohl von N2a- als auch von N2a-APP₆₉₅-Zellen unter PUGNac-Behandlung.

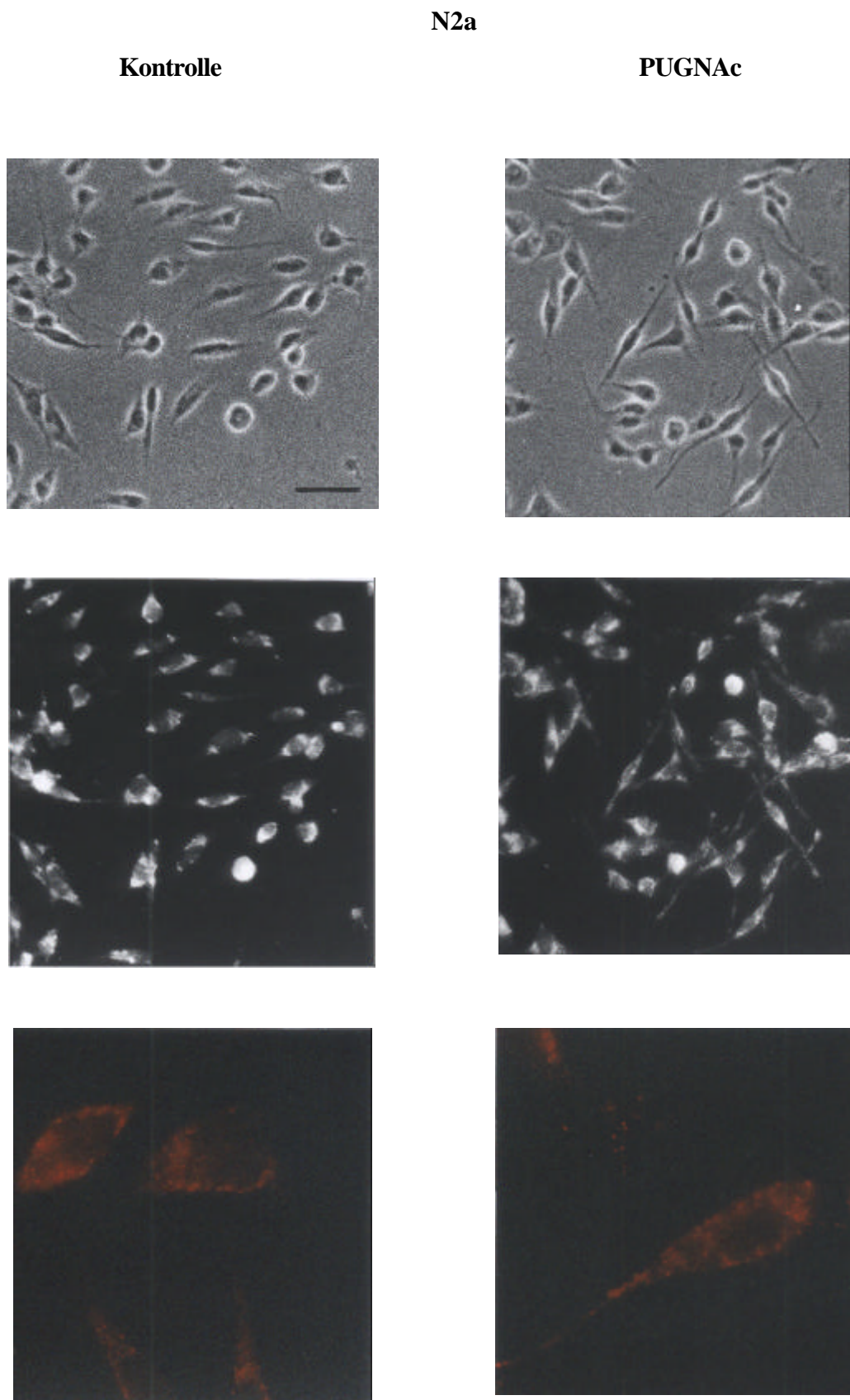


Abb. 21A

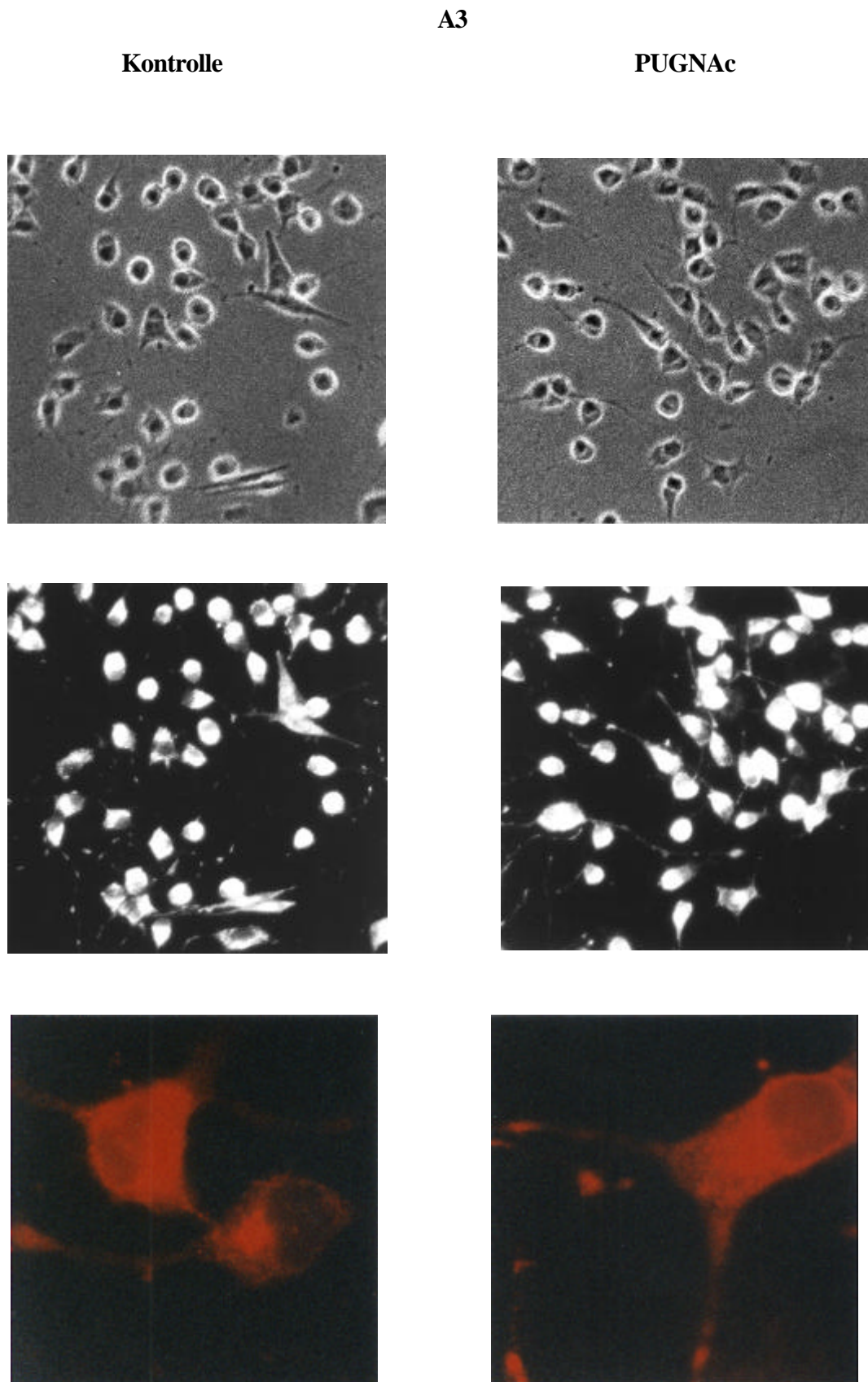


Abb. 21B

Abb. 21: Intrazelluläre Immunfluoreszenz von Kontroll- und PUGNAc-behandelten N2a- (A) und N2a-APP₆₉₅-Zellen (B) mit dem monoklonalen Antikörper 8E5

N2a- (N2a) und N2a-APP₆₉₅-Zellen (A3) wurden nach Subkultivierung drei Tage auf mit PLL-beschichteten Deckgläschen und dann unter serumfreien Bedingungen die Zellen 20 Stunden in Ab- (Kontrolle) bzw. Anwesenheit (PUGNAc) von 40 µM PUGNAc kultiviert. Nach Fixierung mit Paraformaldehyd (4 %) und Permeabilisierung mit eiskaltem Ethanol (100 %, p.a.) wurden die Zellen mit dem monoklonalen 8E5-Antikörper und dem anti-Maus-Cy3-Antikörper inkubiert. Die mikroskopische Beobachtung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 546 - 580 nm. Der eingezeichnete Balken entspricht 20 µm.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen keinen Einfluss auf die Expression des humanen APP₆₉₅ hat. Auch beeinflusste sie die Sekretion des humanen APP_s bzw. APP_{sα} nicht. Im Gegensatz dazu war eine signifikante Reduktion der Aβ_{x-40}-Sekretion zu verzeichnen. Außerdem konnte immunocytochemisch gezeigt werden, dass die Neuriten in Gegenwart von PUGNAc in ihrer gesamten Länge mit dem für humanes APP spezifischen Antikörper angefärbt sind, während in Abwesenheit von PUGNAc lediglich Färbungen im proximalen Bereich der Neuriten zu beobachten waren.

4. Diskussion

Es gibt Hinweise, die auf eine mögliche Bedeutung der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen bei der Pathogenese der Alzheimer Demenz hindeuten (siehe 1.5.3). So sind APP und Tau, die eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Krankheit spielen (siehe 1.3 sowie 1.2.2), O-GlcNAc-modifiziert (siehe 1.5). Des Weiteren wurde in Gehirnen von Alzheimer Patienten in Bereichen, die morphologische Veränderungen aufweisen, eine deutlich höhere O-GlcNAc-Expression nachgewiesen als bei Kontroll-Patienten (siehe 1.5.3). Da außerdem das proteolytische Prozessieren von APP durch verschiedene Signalkaskaden reguliert wird (siehe 1.4) und die O-GlcNAcylierung ein zur Phosphorylierung alternatives Signaltransduktionssystem darstellt (siehe 1.5.1), wurde die Hypothese aufgestellt, dass die O-GlcNAcylierung die A β -Bildung aus APP möglicherweise reziprok zur Phosphorylierung beeinflusst.

Um diese Hypothese zu beweisen, wurden Experimente an einer neuronalen Zell-Linie durchgeführt, die mit der cDNA des humanen APP₆₉₅ transfiziert worden war. Diese Zellkulturbedingungen wurden gewählt, um eine der Pathogenese des humanen Gehirns etwa vergleichbare Situation zu schaffen, da bekannt war, dass A β – und damit die Plaquesbildung – zum einen nicht in anderen Spezies, wie z.B. der Maus, nachweisbar ist und zum anderen wahrscheinlich ausschließlich durch das Prozessieren von APP in Neuronen und nicht in anderen Zellen des Gehirns verursacht wird.

4.1 Metabolismus des humanen APP₆₉₅

4.1.1 Nachweis der Expression des humanen APP₆₉₅ in N2a-Zellen mittels Westernblot-Analyse sowie indirekter Immunfluoreszenz

Die Expression des humanen APP₆₉₅ konnte im Westernblot mit dem für das humane APP spezifischen monoklonalen 8E5-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 5). Damit die geplanten Versuche an einer homogenen Zellpopulation durchgeführt werden konnten, wurden Einzelzell-Klone isoliert (Abb. 6) und für die weiteren Versuche ein Einzelzell-Klon (A3) mit starker Expression des humanen APP₆₉₅ ausgewählt.

Die Expression des humanen APP₆₉₅ durch die N2a-Zellen konnte nicht durch Coomassie-Färbung von SDS-Gelen der Gesamthomogenate detektiert werden (siehe Abb. 11), so dass anzunehmen ist, dass die N2a-Zellen das humane APP₆₉₅ nicht sehr stark überexprimierten.

Während im Westernblot keine Kreuzreaktion des gegen das humane APP gerichteten 8E5-Antikörpers mit endogenem Maus-APP beobachtet wurde (Abb. 5), war immunocytochemisch eine schwache, tolerierbare Färbung der parentalen, d.h. nicht mit humanem APP₆₉₅ transfizierten N2a-Zellen zu erkennen, die auf den Fotos allerdings deutlicher zu erkennen ist als unter dem Mikroskop (Abb.21A). In Folge dessen wurden die Versuchsbedingungen nicht weiter optimiert.

Möglicherweise handelt es sich bei der Färbung der parentalen N2a-Zellen um eine unspezifische Reaktion des 8E5-Antikörpers. Dies ließe sich prinzipiell durch Konkurrenzexperimente zeigen, in denen die Bindung des 8E5-Antikörpers an das endogene Antigen durch zugefügtes lösliches Antigen (in diesem Fall z.B. APP_s) verhindert wird. Dieses Experiment wurde jedoch nicht durchgeführt.

N2a- sowie N2a-APP₆₉₅-Zellen wiesen eine vesikuläre Färbung des Cytoplasmas sowie eine – wenn auch schwächere – Färbung der Zellkerne mit dem 8E5-Antikörper auf. Außerdem konnte eine deutliche vesikuläre bzw. z.T. segmentale Färbung der Neuriten beobachtet werden (Abb. 21).

Diese Färbung scheint typisch für APP zu sein, da sie sowohl für überexprimiertes als auch endogenes APP beschrieben wird (Ando et al., 1999; Caporaso et al., 1994; Haass et al., 1995; Iijima et al., 2000; Storey et al., 1996a; Storey et al., 1996b; Xu et al., 1999; Yamazaki et al., 1996).

Die vesikuläre Färbung der Neuriten der N2a-APP₆₉₅-Zellen wird bei verschiedenen Nervenzell-Typen beschrieben, wie z.B. Kleinhirnneuronen von Mäusen bzw. Ratten, mit der cDNA des humanen APP transfizierten B103-Zellen sowie Hippocampus-Neuronen der Ratte (Coulson et al., 1997; Storey et al., 1996a; Storey et al., 1996b; Xu et al., 1999; Iijima et al., 2000). Diese Färbung ist scheinbar spezifisch für APP, da sie durch Behandlung von Maus-DRGs mit Antisense-Oligonukleotiden von APP reduziert werden konnte (Coulson et al., 1997).

Für die vesikuläre Färbung könnte zum einen in Transportvesikeln lokalisiertes APP verantwortlich sein. So unterliegt APP einem schnellen axonalen anterograden Transport; es kann aber auch retrograd transcytosiert werden (Koo et al., 1990; Simons et al., 1995; Yamazaki et al., 1995).

Zum anderen könnte es sich bei den lokalen Verdickungen, die auch deutlich in der Phasenkontrast-Mikroskopie zu erkennen sind (vgl. Abb. 10), um Synapsen handeln (persönliche Mitteilung Prof. V. Herzog, Institut für Zellbiologie, Bonn). Es ist bekannt, dass in Neuronen ein Großteil von APP in Synapsen lokalisiert ist, so dass die vesikuläre Färbung der Neuriten auf in Synapsen lokalisiertes humanes APP₆₉₅ zurückgeführt werden könnte (Huber et al., 1999; Saitoh und Mook-Jung, 1996; Schubert et al., 1991; Shimokawa et al., 1993).

Des weiteren könnte in Fokalkontakten oder anderen Adhäsionsstellen lokalisiertes APP für die vesikuläre Färbung verantwortlich sein. Darauf deuten Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen hin, die eine Co-Lokalisation von APP mit β 1-Integrin und Talin gezeigt haben. Beide Proteine sind Bestandteile von Fokalkontakten und besitzen eine punktartige Verteilung (Coulson et al., 1997; Storey et al., 1996b).

4.1.2 Untersuchungen zur Sekretion des humanen APP_s bzw. APP_{sa}

Das von den N2a-APP₆₉₅-Zellen in das Zellkulturmedium sezernierte humane APP_s bzw. APP_{sa} konnte im Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 7 sowie Abb. 9). Die Sekretion des humanen APP_s wurde im ELISA bestätigt (Abb. 8). Daraus lässt sich schließen, dass diese murine Zell-Linie Sekretasen besitzt, die das humane APP₆₉₅ proteolytisch abbauen können.

4.1.3 Untersuchungen zur Sekretion des humanen A β

Zur Analyse der Sekretion von A β wurde konditioniertes Medium auf unterschiedliche Weise konzentriert und mit Ameisensäure sowie Acetonitril behandelt. Dieses Prozedere wird oftmals in der Literatur als Voraussetzung für den A β -Nachweis beschrieben (Gravina et al., 1995; Permanne et al., 1995; Roher et al., 1996; Skovronsky et al., 1998).

Es gelang jedoch nicht, im ELISA mit dem monoklonalen G2-10-Antikörper sezerniertes A β nachzuweisen. Auch Immunpräzipitation von A β mit einem käuflichen polyklonalen Anti-A β -Antikörper und anschließende Westernblot-Analyse mit dem G2-10- sowie G2-

11-Antikörper führte nicht zum Nachweis des sezernierten A β (beides nicht gezeigt). In Kontrollversuchen konnte synthetisches A β_{1-40} mit beiden Antikörpern nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Prinzipiell war das verwendete Prozedere also für den A β -Nachweis geeignet.

Die Problematik des A β -Nachweises ist aus der Literatur bekannt. So scheinen zum einen N2a-Zellen trotz (starker) Überexpression von APP nur geringe Mengen A β zu sezernieren (Sastre et al., 1998; Thinakaran et al., 1996a; Xu et al., 1997). Da die A β -Sequenz nur einen Methionin-Rest enthält (siehe Abb. 2), ist der Nachweis nach metabolischer Markierung des Peptids mit ^{35}S -Methionin nicht sehr sensitiv. Des weiteren tendiert A β zur Aggregation (siehe 1.3.4), was wiederum den A β -Nachweis beeinträchtigen könnte, da die Aggregation die Erkennung durch Antikörper behindern könnte (Kuo et al., 1996; Permann et al., 1995; Podlisny et al., 1995; Roher et al., 1996; Walsh et al., 2000).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten allerdings nach metabolischer Markierung von Proteinen mit ^{35}S -Methionin und anschließender Immunpräzipitation mit anderen Antikörpern von N2a-Zellen sezerniertes A β nachweisen (Sastre et al., 1998; Thinakaran et al., 1996a; Xu et al., 1997). Auch ohne metabolische Markierung gelang dies Arbeitsgruppen, die jedoch andere Zeiten für die Gewinnung des konditionierten Mediums sowie andere Antikörper in der Immunpräzipitation, Westernblot-Analyse bzw. im („Sandwich“-)ELISA verwendeten (Asami-Odaka et al., 1995; Sudoh et al., 2000).

Sezerniertes A β konnte somit nicht selbst detektiert werden. Daher wurde dessen Konzentration in Kooperation mit Dr. D. Beher, Merck, London, mit dem sehr sensitiven HTRF „Immunoassay“ (Clarke und Shearman, 2000) (siehe 3.7.3 sowie 4.6.3) analysiert. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass die N2a-APP₆₉₅-Zellen ca. 1 pmol/ml A β_{x-40} (ca. 4 ng/ml Medium) sezernierten, was deutlich unterhalb der Detektionsgrenze der eigenen Westernblot-Analyse von 100 ng synthetischem A β_{1-40} pro Laufbahn lag.

Die Menge des sezerniertes A β_{x-42} konnte allerdings auch mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden, da dessen Konzentration offenbar ebenfalls unterhalb der Detektionsgrenze der HTRF-Methode lag (persönliche Mitteilung Dr. D. Beher).

Ein Grund für die im Vergleich zu APP_s geringe Menge an A β könnte sein, dass nur ein geringer Teil des gesamten APP zu A β prozessiert wird (Busciglio et al., 1993; Haass et al., 1992; Kumar-Singh et al., 2000; Kuo et al., 1996; McConlogue et al., 1996; Nunan et al., 2001; Sambamurti et al., 1999; Shoji et al., 1992). An Astrocyten sowie einer humanen Neurogliom-Zelllinie konnte beispielsweise gezeigt werden, dass APP überwiegend durch die α -Sekretase prozessiert wird (Kuentzel et al., 1993; LeBlanc et al., 1996).

Auch der Abbau von A β durch extrazelluläre Proteasen kann nicht ausgeschlossen werden. So konnten synthetische A β -Peptide nachweislich durch Proteasen im konditionierten Medium von N2a-Zellen degradiert werden (Wang et al., 1996). Neben Mikrogliazellen scheinen auch neuronale und nicht-neuronale Zellen (Metallo-) Proteasen zu sezernieren, die A β degradieren können. Dazu gehört auch das Insulin-degradierende Enzym (Paresce et al., 1997; Qiu et al., 1997; Qiu et al., 1998).

4.1.4 Untersuchungen von intrazellulärem humanem Ab

Um zu untersuchen, ob N2a-Zellen ähnlich wie für andere Zellen beschrieben A β intrazellulär bilden und möglicherweise nur in geringem Umfang sezernieren (siehe 1.3.4), wurde A β aus Gesamthomogenaten bestimmt (Skovronsky et al., 1998; Walsh et al., 2000; Xu et al., 1997).

Es wurden aus Gesamthomogenaten Immunpräzipitationen mit einem polyklonalen Anti-A β -Antikörper durchgeführt. Im Westernblot konnte A β_{x-40} mit dem G2-10-Antikörper allerdings nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auch Einhaltung der in der Literatur beschriebenen Versuchsbedingungen (siehe 4.1.3) führte nicht zum Nachweis von A β_{x-40} mittels Immunoblot (nicht gezeigt).

Da im Gegensatz zu sezerniertem A β intrazelluläres A β hauptsächlich aus A β_{x-42} besteht (siehe 1.3.4), wurde versucht, intrazelluläres A β_{x-42} nachzuweisen. Dieses kann spezifisch mit dem monoklonalen G2-11-Antikörper nachgewiesen werden, der im Westernblot bereits ca. 12 pg (3 fmol) synthetisches A β_{1-42} nachweisen kann, also sehr sensitiv ist (Ida et al., 1996).

Bei der Immunoblot-Analyse mit dem G2-11-Antikörper traten jedoch methodische Probleme auf (nicht gezeigt). Daher konnte auch intrazelluläres A β_{x-42} mit keiner der verwendeten Methoden nachgewiesen werden.

Die durchgeführten Experimente lassen somit keinen Rückschluss auf die Menge an intrazellulärem A β zu. Vermutlich ist dessen Menge noch geringer als die des sezernierten A β _(x-40), wie von verschiedenen Arbeitsgruppen an nicht neuronalen sowie neuronalen Zellen bzw. Zell-Linien (u.a. auch N2a-Zellen) beobachtet wurde (Martin et al., 1995; Tienari et al., 1997; Turner et al., 1996; Wertkin et al., 1993; Wild-Bode et al., 1997; Xu et al., 1997). Vermutlich hätte durch den Einsatz sensitiverer Antikörper/Methoden intrazelluläres A β nachgewiesen werden können (siehe 4.1.3).

4.2 Die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen

4.2.1 Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen mittels Westernblot

Die O-GlcNAc-Modifikation der von N2a- bzw. N2a-APP₆₉₅-Zellen exprimierten Proteine wurde in Gesamthomogenaten, der Detergens-löslichen Fraktion sowie der Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraktion untersucht (Abb. 12).

Der Nachweis von O-GlcNAc erfolgte entweder mit dem monoklonalen RL2- oder dem monoklonalen HGAC39-Antikörper. Der RL2-Antikörper, der gegen Kernporenproteine aus Rattenleber hergestellt wurde, erkennt hauptsächlich O-GlcNAc, allerdings auch noch zusätzlich bestimmte Sekundär- oder Primärstrukturen des Proteinrückgrats (Snow et al., 1987; Holt et al., 1987). Das bedeutet, dass dieser Antikörper nicht alle O-GlcNAc-modifizierten Proteine gleich gut erkennt.

Der monoklonale HGAC39-Antikörper wurde gegen Kohlenhydrate von Streptokokken hergestellt. Im Gegensatz zum RL2-Antikörper ist die Erkennung von O-GlcNAc durch den HGAC39-Antikörper anscheinend unabhängig vom Proteinrückgrat, allerdings gibt dieser Antikörper aus unbekanntem Gründen im Westernblot keine reproduzierbaren Ergebnisse (Turner et al., 1990).

O-GlcNAc kann auch durch die ³H-Galactosylierung der O-glykosidisch gebundenen terminalen GlcNAc-Reste mittels Galactosyltransferase nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass diese Methode und der immunologische Nachweis von O-GlcNAc zumindest im ELISA vergleichbar sind (Griffith und Schmitz, 1999). Da die ³H-Galactosylierung im Vergleich zur Westernblot-Analyse deutlich zeitaufwendiger ist, wurde letztere für den Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen gewählt.

Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen zwischen parentalen N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen beobachtet werden. Dies trifft für alle untersuchten Proteinfractionen zu (Abb. 12), d.h. es kann ausgeschlossen werden, dass die Expression des humanen APP₆₉₅ einen Einfluss auf die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen hat.

Der RL2-Antikörper zeigte mit Proteinen aus Gesamthomogenaten und der Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraction eine vergleichbare Reaktivität, während er mit Proteinen aus der Detergens-löslichen Fraction bei gleicher Proteinkonzentration deutlich schwächer reagierte (Abb. 12).

Dies stimmt mit den Ergebnissen von Griffith und Schmitz (1999) an Kleinhirnneuronen überein. Mittels ELISA konnten sie zeigen, dass cytoskeletale und mit dem Cytoskelett assoziierte Proteine eine 2-3fach höher O-GlcNAc-Expression pro µg Protein aufwiesen als cytosolische und membrangebundene Proteine (Griffith und Schmitz, 1999).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass O-GlcNAc für spezifische Eigenschaften des Cytoskeletts von Bedeutung sein könnte. Für die Organisation des Cytoskeletts ist die Phosphorylierung wichtig und die Organisation des Cytoskeletts wiederum spielt in Neuronen eine wichtige Rolle beim Neuritenwachstum (Brandt, 1998; Suter und Forscher, 1998).

Möglicherweise ist auch O-GlcNAc für die Regulation des Cytoskeletts bzw. dessen Stabilisierung von entscheidender Bedeutung. Dafür spricht, dass viele cytoskeletale Proteine sowohl phosphoryliert als auch O-GlcNAc-modifiziert sind, wie z.B. die MAPs (Microtubule Associated Proteins) Tau, Vinculin und Talin¹ (Arnold et al., 1996; Ding und Vandr , 1996; Hart et al., 1996; Hagmann et al., 1992). Auch beeinflusst O-GlcNAc anscheinend die Assoziation der Neurofilamente und spielt eine Rolle bei der Fibrillenbildung von Intermediärfilamenten (Hart, 1997; Hart et al., 1996; Comer und Hart, 2000).

Die genannten Ergebnisse könnten daher auf eine wichtige Funktion von O-GlcNAc bei der Organisation des neuronalen Cytoskeletts hindeuten. Ein Vergleich mit den genannten Zellfractionen von nicht-neuronalen Zellen wäre in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse.

¹ MAPs, Vinculin und Talin vermitteln die Bindung des Cytoskeletts an die Plasmamembran. Dies wiederum ist abhängig von der Phosphorylierung (Clark und Brugge, 1995).

Die Behandlung der N2a- bzw. N2a-APP₆₉₅-Zellen mit PUGNAc führte erwartungsgemäß zu einem deutlichen Anstieg der RL2-Reaktion im Westernblot (Abb. 16). Dies ist jedoch in den immunocytochemischen Untersuchungen weniger deutlich zu erkennen (Abb. 17). Im Westernblot reagierte der RL2-Antikörper sowohl verstärkt mit Proteinen, die auch unter Kontrollbedingungen detektiert wurden, als auch mit zusätzlichen Proteinen (Abb. 16). Ähnliche Beobachtungen wurden an NIH-3T3-, CV-1- und HeLa-Zellen sowie murinen Kleinhirnneuronen gemacht (Haltiwanger et al., 1998; Rex-Mathes et al., 2001).

4.2.2 Untersuchung der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen mittels indirekter Immunfluoreszenz

Mit den beiden O-GlcNAc-spezifischen Antikörpern RL2 und HGAC39 konnte eine starke nukleäre Färbung sowie eine deutlich schwächere, diffuse cytoplasmatische Färbung beobachtet werden (Abb. 17). Dies stimmt mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen an FR 3T3-Zellen, DRG- sowie Kleinhirnneuronen überein (Turner et al., 1990; Griffith et al., 1995; Rex-Mathes et al., 2001).

Mittels indirekter Immunfluoreszenz mit dem RL2-Antikörper konnte weder bei N2a- bzw. N2a-APP₆₉₅-Zellen (vorliegende Ergebnisse) noch bei Kleinhirnneuronen (Rex-Mathes et al., 2001) eine mit der Plasmamembran-assoziierte Färbung beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wiesen DRG-Neuronen mit dem HGAC-Antikörper und nach einer DAB-Farb-reaktion eine membranassoziierte Färbung auf (Griffith et al., 1995).

Ursache hierfür könnten unterschiedliche Sensitivitäten der verwendeten Methoden oder aber zelltypspezifische Unterschiede sein. Außerdem wurde bis heute auch nur von wenigen Transmembranproteinen nachgewiesen, dass sie O-GlcNAc-modifiziert sind (siehe 1.5). Möglicherweise ist daher die O-GlcNAc-Expression von Transmembranproteinen zu gering für den Nachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz.

4.2.3 Die O-GlcNAc-Modifikation des humanen APP₆₉₅

Die O-GlcNAc-Modifikation des humanen APP₆₉₅ wurde mittels Westernblot mit den RL2- sowie HGAC39-Antikörpern analysiert. Dabei konnte eine stärkere Reaktion insbesondere des RL2-Antikörpers mit der unreifen Form des humanen APP₆₉₅ beobachtet werden (Abb. 13).

Die Reaktion beider O-GlcNAc-spezifischer Antikörper mit dem humanen APP₆₉₅ ist jedoch verhältnismäßig schwach. Es ist anzunehmen, dass in Übereinstimmung mit Untersuchungen von anderen O-GlcNAcylierten Proteinen nur eine Subpopulation des humanen APP₆₉₅ O-GlcNAc-modifiziert ist (Ding und Vandr , 1996; Dong et al., 1993; Dong et al., 1996; Inaba und Maede, 1989; Kelly et al., 1993; Reason et al., 1992).

Des Weiteren ist die Erkennung von O-GlcNAc durch den RL2-Antikörper auch von dem Proteinrückgrat abhängig (Snow et al., 1987) (siehe 4.2.1). Daher ist möglicherweise die Affinität des RL2-Antikörpers für APP niedriger als für die Kernporenproteine, das Antigen, gegen das er hergestellt wurde.

Es wurde bisher noch nicht gezeigt, dass im Vergleich zur reifen Form die unreife Form des humanen APP₆₉₅ stärker O-GlcNAcyliert ist. Griffith et al. (1995) konnten bei ihren Untersuchungen diese beiden Formen aufgrund der angewendeten Methode nicht unterscheiden (siehe 3.4).

Das Ergebnis ist besonders interessant im Hinblick auf die konstitutive Phosphorylierung des reifen APP durch die Cdk5 und scheint die Hypothese der alternativen, möglicherweise reziproken Beziehung zwischen O-GlcNAc und Phosphat zu unterstützen (Iijima et al., 2000). So sind beispielsweise bei der RNA-Polymerase II dieselben Serin- und Threonin-Reste entweder O-GlcNAcyliert oder phosphoryliert (Kelly et al., 1993). Die O-GlcNAc-modifizierte Form des Enzyms spielt eine Rolle bei der Bildung des Präinitiationskomplexes, während die phosphorylierte Form für die Elongationsphase der Transkription von Bedeutung ist (Wells et al., 2001).

Möglicherweise trifft eine ähnliche reziproke Beziehung zwischen Phosphat und O-GlcNAc auch für APP zu. Dazu müssten allerdings noch weitere Versuche durchgeführt werden. Beispielsweise müsste die O-GlcNAc-Modifikation bzw. Phosphorylierung der Serin-/Threonin-Reste der reifen bzw. unreifen Form APP identifiziert werden.

Es wird angenommen, dass O-GlcNAc die Assoziation von Proteinen begünstigt (siehe 1.5.1) und es stellt sich die Frage, ob die O-GlcNAc-Modifikation von APP für seine Assoziation mit anderen Proteinen eine Rolle spielt.

Es ist zwar gezeigt worden, dass APP und die Preseniline im ER einen Komplex bilden, aber ob O-GlcNAc dabei eine Rolle spielt ist eher fraglich, da angenommen wird, dass die Interaktion zwischen APP und den Presenilinen zwischen den Transmembranregionen und nicht zwischen den cytosolischen Domänen stattfindet (Weidemann et al., 1997; Xia et al.,

1997; Xia et al., 1997). Allerdings ist gezeigt worden, dass unreifes APP Bestandteil eines hochmolekularen Proteinkomplexes ist, der neben den Presenilinen u.a. auch Calreticulin und das Transmembranprotein Nicastrin enthält (Johnson et al., 2001; Yu et al., 1998; Yu et al., 2000). Möglicherweise beeinflusst die O-GlcNAc-Modifikation die Interaktionen zwischen APP und anderen Transmembran- bzw. cytosolischen Proteinen und so indirekt die Interaktion zwischen APP und den Presenilinen.

Um die Frage zu beantworten, ob O-GlcNAc tatsächlich die Assoziation zwischen APP und cytosolischen Proteinen beeinflusst, müsste man Versuche durchführen, in denen mit und ohne Beeinflussung der O-GlcNAc-Modifikation (z.B. durch PUGNAc-Behandlung) die mit APP co-präzipitierten Proteine analysiert und quantifiziert werden.

Zwischen dem humanen APP₆₉₅ und dessen schwedischer Mutante (APP_{695Sw}) konnten mittels Westernblot-Analyse keine Unterschiede hinsichtlich der O-GlcNAc-Modifikation festgestellt werden. In beiden Fällen ist die unreife Form stärker O-GlcNAcyliert als die reife Form, unabhängig davon, ob die Zellen mit PUGNAc behandelt wurden oder nicht (Abb. 18).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse scheint somit die O-GlcNAc-Modifikation von APP_{695Sw} selbst keine Rolle bei der gesteigerten A β -Produktion der schwedischen Mutante zu spielen.

4.3 Untersuchungen zur Assoziation des humanen APP₆₉₅ mit dem Cytoskelett

Humanes APP₆₉₅ wurde mittels Westernblot-Analyse überwiegend in der Detergens-löslichen Fraktion nachgewiesen, während die Detergens-unlösliche Cytoskelettfraktion vergleichsweise geringe Mengen APP₆₉₅ enthielt (Abb. 14).

Das Ergebnis steht im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So sind in PC12- bzw. C6-Gliomzellen ca. 50 % bzw. ca. 85 % des APP mit dem Cytoskelett assoziiert (Refolo et al., 1991). In embryonalen Kleinhirnneuronen der Ratte sind ebenfalls vergleichbare Mengen APP in der Detergens-löslichen Fraktion und Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraktion enthalten (Allinquant et al., 1994).

Es ist unwahrscheinlich, dass humanes APP₆₉₅ schlechter mit dem murinen Cytoskelett verankert werden kann als murines APP selbst, da die Aminosäuresequenzen der jeweiligen C-Termini identisch sind. Möglicherweise liegt daher hier ein zelltypspezifischer Effekt vor. Das Cytoskelett der PC12- oder C6-Zellen könnte sich von dem der N2a-Zellen

unterscheiden und eine bessere Assoziation von APP erlauben als das Cytoskelett der N2a-Zellen.

Ein anderer Grund für diese Diskrepanz könnte sein, dass in der vorliegenden Arbeit mit humanen APP₆₉₅ transfizierte Zellen analysiert wurden, während in den oben genannten Studien das endogene APP der jeweiligen Zellen untersucht wurde.

Es ist möglich, dass bereits die meisten aller Bindungsstellen zum Cytoskelett durch endogenes Maus-APP abgesättigt sind, so dass das zusätzlich exprimierte humane APP₆₉₅ nicht mehr gebunden werden kann und daher überwiegend in der löslichen Fraktion auftritt. Es wäre in diesem Zusammenhang interessant zu untersuchen, ob das endogene Maus-APP ein unterschiedliches Bindungsverhalten gegenüber dem Cytoskelett aufweist im Vergleich zum zusätzlich exprimierten humanen APP₆₉₅.

Als mögliche limitierte Bindungspartner für APP kommen die Proteine Fe65 und Mena in Frage (siehe Abb. 1), die eine Verbindung zwischen APP und den Cytoskelett-Komponenten Profilin-Actin und Vinculin herstellen (Neve et al., 2000; Russo et al., 1998; Ermekova et al., 1997; Gertler et al., 1996; Suter und Forscher, 1998). Auch Kinesin bzw. dessen Homolog PAT1 binden an die cytosolische Domäne von APP (siehe Abb. 1) und gleichzeitig an die Mikrotubuli (Isohara et al., 1999; Kamal et al., 2000; Zheng et al., 1998). Ob eines oder mehrere dieser Proteine O-GlcNAc-abhängig an APP bindet bzw. binden, ist unbekannt. Da auch der in Bakterien hergestellte rekombinante C-Terminus von APP an Fe65 bindet, scheidet dieses Protein als Bindungspartner für die O-GlcNAc-modifizierte cytosolische Domäne von APP aus (Cao und Südhoff, 2001).

Die durch PUGNAc-Behandlung der Zellen gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen beeinflusste die Verteilung des humanen APP₆₉₅ zwischen der Detergens-löslichen Fraktion und der Detergens-unlöslichen Cytoskelettfraktion nicht (Abb. 20), so dass festzustellen ist, dass die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen zumindest in N2a-Zellen unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Assoziation des humanen APP₆₉₅ mit dem Cytoskelett hat.

4.4 Einfluss der Expression des humanen APP₆₉₅ auf die N2a-Zellen

4.4.1 Einfluss der Expression des humanen APP₆₉₅ auf das Neuritenwachstum

N2a-APP₆₉₅-Zellen wiesen verglichen mit parentalen N2a-Zellen ein verstärktes Neuritenwachstum auf (Abb. 10). Allerdings konnte dies nicht unter allen Zellkulturbedingungen festgestellt werden. Bei Kultivierung auf mit PLL beschichteten Glasdeckgläschen zeigten N2a- und N2a-APP₆₉₅-Zellen ein ausgeprägtes Aggregationsverhalten, so dass neben dicht bewachsenen Arealen z.T. sehr vereinzelte Zellen auftraten (Abb. 21). Diese Problematik trat nicht bei der Kultivierung der Zellen auf PLL-beschichteten Plastikschaalen auf, wie sie in Abb. 10 dargestellt ist. Dort wurde nach Subkultivierung eine gleichmäßige Zellverteilung erzielt. Da das Neuritenwachstum von der Zelldichte abhängig ist, wurden möglicherweise die Unterschiede im Falle der unregelmäßigen Zellverteilung weniger deutlich.

Des Weiteren wurden die Zellen für die immunocytochemischen Untersuchungen 20 Stunden unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Es ist bekannt, dass das Neuritenwachstum durch Serumentzug stimuliert wird (Ishii et al., 2001; Satoh et al., 2000; Shea et al., 1992a; Shea et al., 1992b; Shea et al., 1991; Spero und Roisen, 1984). Möglicherweise sind die stimulierenden Effekte durch Serumentzug und Expression des humanen APP₆₉₅ nicht additiv, so dass unter diesen Umständen kein Unterschied in der Neuritenlänge zu beobachten ist.

Im Einklang mit Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen ist vermutlich die zusätzliche Expression des humanen APP₆₉₅ für das gesteigerte Neuritenwachstum verantwortlich. So war gezeigt worden, dass B103-Zellen, die kein endogenes APP exprimieren, nach Transfektion mit APP ein verstärktes Neuritenwachstum aufweisen (Schubert und Behl, 1993). Außerdem konnte durch Transfektion von Kleinhirnneuronen der Ratte mit Antisense-Oligonukleotiden von APP das Neuritenauswachsen gehemmt werden (Allinquant et al., 1995).

Der Einfluss des humanen APP₆₉₅ auf das Neuritenwachstum war unabhängig von der Stärke dessen Expression. Dies stimmt ebenfalls mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, wonach schon eine moderate Expression des humanen APP im Maushirn zu einer gesteigerten synaptischen Dichte führt bzw. schon geringe Veränderungen der APP-Expression die normale Endothelfunktion von Hep-1-Zellen beeinflussen (Mucke et al.,

1994; Kusiak et al., 2001). Anscheinend reichen schon geringe Veränderungen der APP-Expression für einen maximalen Effekt aus.

Die Signalkaskaden, die für die Regulation des Neuritenwachstums von Bedeutung sind, sind noch nicht in allen Einzelheiten bekannt. Sicher ist, dass z.B. die MAPK-(Mitogen Activated Protein Kinase)-Signalkaskade, die PKC sowie die intrazelluläre Calcium-Konzentration von Bedeutung sind (Greenberg et al., 1994; Wood et al., 1992; Perron und Bixby, 1999; Théodore et al., 1995; Hundle et al., 1995; Rizzuto, 2001).

Es gibt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen APP bzw. APP_s und der Aktivierung der MAPK-Signalkaskade (Wallace et al., 1997). Die Aktivierung der p21^{ras}-abhängigen MAPK-Signalkaskade erfolgt möglicherweise über die Cystein-reiche Region in der Nähe des N-Terminus von APP (Greenberg et al., 1994; Greenberg et al., 1995). Über die RERMS-Sequenz¹, die in B103-Zellen das Neuritenwachstum stimuliert, scheint APP_s hingegen die Phosphoinositid-PKC-Kaskade zu aktivieren (Jin et al., 1994; Ishiguro et al., 1998). Dabei ist noch nicht sicher bekannt, an welchen Rezeptor APP_s bindet, um das Signal weiterzuleiten.

4.4.2 Einfluss der Expression des humanen APP₆₉₅ auf die Zelladhäsion

Bei der Subkultivierung der N2a-APP₆₉₅-Zellen wurde eine gesteigerte Zelladhäsion beobachtet (siehe 3.2.2). In Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ist vermutlich die zusätzliche Expression des humanen APP₆₉₅ nicht nur für das gesteigerte Neuritenwachstum (siehe 4.4.1) sondern auch die verstärkte Adhäsion verantwortlich.

Es wurde beispielsweise gezeigt, dass Inkubation von Maus-DRG-Neuronen mit Antisense-Oligonukleotiden von APP die Adhäsion der Zellen an Heparansulfatproteoglykane, Kollagen sowie Laminin reduziert (Coulson et al., 1997). Auch Transfektion von B103-Zellen mit APP resultiert in einer schnelleren Adhäsion an Kollagen (Schubert und Behl, 1993).

Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass PLL im Gegensatz zu Heparansulfatproteoglykanen, Kollagen und Laminin kein Bestandteil der extrazellulären Matrix ist. Möglicherweise beruht daher die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete gesteigerte Adhäsion auf der Interaktion zwischen dem negativ geladenen PLL und extrazellulären Glykanen von APP und ist daher unspezifisch.

¹ Die RERMS-Sequenz befindet sich in der Mitte der Ectodomäne von APP.

In der Literatur gibt es verschiedene Erklärungsansätze für den Mechanismus, über den APP die Zelladhäsion fördert. So können APP oder APP_s an verschiedene Proteoglykane oder Glykoproteine der extrazellulären Matrix binden, wie z.B. Laminin, HSPG, Kollagen und Fibulin-1 (Kibbey et al., 1993; Clarris et al., 1994; Beher et al., 1996; Ohasawa et al., 1997).

Da APP außerdem u.a. über die RHDS-Sequenz¹ mit Integrinen interagiert, könnten dadurch Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen moduliert werden (Ghiso et al., 1992; Coulson et al., 1997). Die Interaktion der Integrine mit dem Cytoskelett ist essentiell für deren Funktionen bei Zell-Zell- bzw. Zell-Substrat-Wechselwirkungen (Clark und Brugge, 1995; Suter und Forscher, 1998). Möglicherweise gilt dies ebenfalls für APP (Refolo et al., 1991) (siehe 4.3).

G₀ spielt u.a. beim Neuritenwachstum und bei der neuronalen Zelladhäsion eine Rolle, so dass auch die Assoziation von APP mit G₀ in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein könnte (Brabet et al., 1990; Strittmatter et al., 1994; Schuch et al., 1989; Doherty et al., 1991; Nishimoto et al., 1993; Okamoto et al., 1995).

4.5 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen mit der cDNA der O-GlcNAc-Transferase (OGT)

Durch Transfektion eukaryotischer Zellen mit der cDNA der OGT sollte die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen gesteigert werden. In keinem der durchgeführten Experimente konnte eine Zunahme der Expression der OGT verzeichnet werden (Abb. 15). Auch wurde kein Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen beobachtet (nicht gezeigt).

Vermutlich wurde nur eine geringe Transfektionseffizienz erzielt wie es auch bei HeLa-Zellen beobachtet wurde (Lubas et al., 1997). Die Zunahme der Proteinmenge der OGT könnte daher zu niedrig für den Nachweis mittels Westernblot gewesen sein.

Möglicherweise hätte die Verwendung einer anderen Transfektionsmethode zu einem besseren Ergebnis geführt. So wurden HeLa- und HEK293-Zellen erfolgreich mit der cDNA der OGT mittels Calcium-Phosphat- bzw. Lipid-vermittelter Transfektion sowie Elektroporation transfiziert (Lubas et al., 1997; Kreppel et al., 1997).

¹ Die RHDS-Sequenz befindet sich zwischen der β - und α -Sekretase-Spaltstelle in der N-terminalen Domäne von A β (siehe Abb. 2). A β scheint somit nicht nur neurotoxisch zu sein sondern auch als Zelladhäsionsmolekül fungieren zu können (Chen und Yankner, 1991).

4.6 Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf das proteolytische Prozessieren des humanen APP₆₉₅

4.6.1 Einfluss einer gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf die Expression des humanen APP₆₉₅

Es konnte kein Einfluss der in Gegenwart von PUGNAc gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf die Expression des humanen APP₆₉₅ beobachtet werden (Abb. 19). Dies wurde auch unter vergleichbaren Bedingungen für den Transkriptionsfaktor Sp1 an HT29-Zellen gezeigt (Haltiwanger et al., 1998). Das bedeutet, dass zumindest unter den gewählten Bedingungen eine gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen nicht in die Regulation der Synthese oder des Abbaus von Proteinen eingreift.

Eine verringerte O-GlcNAc-Modifikation von Sp1 führt jedoch zu dessen gesteigertem Abbau durch Proteasomen (Han und Kudlow, 1997). Auch APP kann durch Proteasomen abgebaut werden (Marambaud et al., 1996; Marambaud et al., 1997a; Marambaud et al., 1997b; Nunan et al., 2001; Skovronsky et al., 2000b). Die Proteasomen scheinen dabei auch in die Entstehung von A β involviert zu sein (Nunan et al., 2001; Skovronsky et al., 2000b). Besonders interessant ist, dass die Proteasomen zumindest in HEK293-Zellen bei der durch die PKA stimulierten APP_{s α} -Sekretion eine Rolle spielen (Marambaud et al., 1997a).

Es wäre daher – auch im Hinblick auf die schon mehrfach erwähnte reziproke Beziehung zwischen der PKC- bzw. PKA-Phosphorylierung und O-GlcNAc – von Interesse, den Einfluss einer reduzierten O-GlcNAc-Modifikation auf den Abbau des humanen APP₆₉₅, dessen proteolytische Fragmente sowie eine mögliche Beteiligung der Proteasomen zu untersuchen.

4.6.2 Einfluss einer gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf die Sekretion des humanen APP_s bzw. APP_{sa}

Es ließ sich auch kein Einfluss einer PUGNAc-Behandlung der Zellen auf die Sekretion des humanen APP_s oder die des humanen APP_{s α} nachweisen (Abb. 19).

Interessanterweise führt PUGNAc-Behandlung von N2a-Zellen, die die schwedische Mutante von APP₆₉₅ exprimieren, unter vergleichbaren Bedingungen zu einer gesteigerten

Sekretion von APP_s sowie APP_{sα} (Gollner, 2001). Daher könnte die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen – nicht aber von APP selbst (siehe 4.2.3) – auf unterschiedliche Weise das Prozessieren des Wildtyps (APP_{Wt}) bzw. der schwedischen Mutante von APP (APP_{Sw}) beeinflussen.

Verschiedene Transmembranproteine des ER sowie des Golgi-Komplexes sind auf ihren cytosolischen Domänen O-GlcNAc-modifiziert (Abeijon und Hirschberg, 1988; Capasso et al., 1988). In diesen beiden Kompartimenten spaltet offenbar die β-Sekretase (unreifes) APP_{Sw}, nicht aber APP_{Wt} (Citron et al., 1995; Gabuzda et al., 1994; Haass et al., 1995; Thinakaran et al., 1996a; Urmoneit et al., 1998). Es ist somit durchaus möglich, dass eine gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation von anderen, regulatorischen Proteinen die β-Sekretase-Spaltung von APP_{Sw} begünstigt. Gollner (2001) setzte ebenfalls den W0-2-Antikörper für die Analyse des APP_{sα} ein, so dass eine Unterscheidung zwischen APP_{sα} und bestimmten C-terminal verlängerten APP_{sβ}-Spezies (s.u.) nicht möglich war. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Sekretion dieser C-terminal verlängerten APP_{sβ}-Formen eine Abnahme der APP_{sα}-Sekretion überdeckte.

Inzwischen konnte die β-Sekretase BACE identifiziert werden (siehe 1.3.3.2). Es ist daher besonders interessant, zu untersuchen, ob (a) BACE O-GlcNAc-modifiziert ist und (b) ob O-GlcNAc ihre Aktivität beeinflusst.

Allerdings bedarf das Ergebnis der vorliegenden Arbeit aus verschiedenen Gründen einer Absicherung durch zusätzliche Experimente.

So werden mit dem W02-Antikörper außer APP_{sα} auch bestimmte Formen von APP_{sβ} detektiert. Aβ weist neben C-terminaler auch N-terminale Heterogenität auf. Das ist darauf zurückzuführen, dass die β-Sekretase außer der an Asp1 von Aβ (siehe 1.3.4 sowie Abb. 2) in geringerem Umfang u.a. auch zwischen Tyr10 und Glu11 innerhalb der Aβ-Region spaltet (De Strooper und Annaert, 2000; Evin et al., 1994; Vassar et al., 1999). Mittels MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) wurde gezeigt, dass N2a-Zellen über 40 verschiedene Aβ-Spezies produzieren, von denen ein großer Teil N-terminal verkürzt ist (Wang et al., 1996) (siehe auch 4.6.3).

Eine Unterscheidung zwischen APP_{sα} und C-terminal verlängertem APP_{sβ} ist mit dem W0-2-Antikörper nicht möglich, da dieser Antikörper die Aminosäuren 5-8 von Aβ erkennt (siehe Abb. 2) und daher außer APP_{sα} C-terminal verlängerte Formen von APP_{sβ} detektiert.

So könnte eine Zunahme der Sekretion von C-terminal verlängertem APP_{sβ} eine Abnahme der APP_{sα}-Sekretion überdecken, was durch den W0-2-Antikörper nicht detektiert werden könnte. Darüber würde die massenspektrometrische Analyse der sezernierten Aβ-Spezies sowie die Verwendung von Antikörpern Aufschluss geben, die spezifisch C-terminal verlängertes APP_{sβ} detektieren.

Dass unter PUGNAc nicht wie erwartet eine erhöhte APP_{sβ}-Bildung nachgewiesen werden konnte, liegt möglicherweise auch daran, dass der Sekretionszeitraum von 20 Stunden zu lang ist und dass Veränderungen der APP_{sβ}-/APP_{sα}- Sekretion unter Zellkulturbedingungen nur kurzfristig stattfinden. So wurde gezeigt, dass die durch den Phorbolster PMA stimulierte APP_{sα}-Sekretion von CHO- bzw. C6-Gliomzellen bereits nach ca. 1 Stunde ein Maximum erreicht (Skovronsky et al., 2000a; Efthimiopoulos et al., 1994), wobei allerdings die Konzentration des PMA entscheidend ist für die Schnelligkeit der Aktivierung bzw. Inaktivierung der PKC.

In Anbetracht der reziproken Beziehung zwischen der PKC-Phosphorylierung und O-GlcNAc können analoge zeitabhängige Effekte einer gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen nicht ausgeschlossen werden (Griffith und Schmitz, 1999). Möglicherweise waren daher die in Anlehnung an Haltiwanger et al. (1998) gewählten Versuchsbedingungen (20 Stunden Behandlung mit PUGNAc) ungeeignet für den Nachweis von Veränderungen der humanen APP_s-/APP_{sα}-Sekretion.

Zudem sind mögliche Folgen der (Über-)Expression des humanen APP₆₉₅ zu berücksichtigen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Expression des humanen APP₆₉₅ zu einer Sättigung von Sekretasen führt. Dies wurde jedenfalls für die γ -Sekretase beschrieben (Forman et al., 1997).

Auf einen weiteren problematischen Aspekt der (Über-)Expression von APP weisen auch die Ergebnisse von Johnson et al. (2001) hin. Sie hatten gezeigt, dass in nicht transfizierten IMR-32-Zellen und Kleinhirnneuronen nur unreifes APP mit Calreticulin¹ assoziiert, wohingegen in mit APP₆₉₅ transfizierten HEK293-Zellen sowohl unreifes als auch reifes APP₆₉₅ an Calreticulin bindet. Die Autoren vermuten, dass bedingt durch die Überexpression reifes APP über den endosomalen Weg zurück ins ER transportiert werden könnte, wodurch die (konstitutive) α -Sekretase-Spaltung verhindert würde, die überwiegend an der

¹ Calreticulin ist ein wichtiges Calcium-bindendes Protein im ER, das anscheinend als molekulares Chaperon fungiert.

Zelloberfläche erfolgt (Johnson et al., 2001; Parvathy et al., 1999; Sisodia, 1992; Skovronsky et al., 2000a). Allerdings kann ein zelltypspezifischer Effekt nicht ausgeschlossen werden.

Des Weiteren findet das proteolytische Prozessieren von APP wohl auch in sog. „rafts“¹ statt (Bouillot et al., 1996; Ikezu et al., 1998; Ledesma et al., 2000; Lee et al., 1998; Nishiyama et al., 1999; Sambamurti et al., 1999; Simons und Ikonen, 1997; Simons et al., 1998; Tang et al., 1996; Yanagisawa et al., 1995). Möglicherweise sind Caveolae, Caveolin- sowie GPI-verankerte Proteine bei α -Sekretase bzw. β -Sekretase-Spaltung von APP wichtig (Ikezu et al., 1998; Nishiyama et al., 1999; Sambamurti et al., 1999; Tang et al., 1996). Die endogenen, für die Lokalisation von APP in DIGs verantwortlichen Bindungspartner könnten einen limitierenden Faktor für die Lokalisation des humanen APP₆₉₅ in diesen Membranmikrodomänen darstellen (vgl. 4.3.1), so dass Auswirkungen auf das Prozessieren des humanen APP₆₉₅ nicht ausgeschlossen werden können.

4.6.3 Einfluss einer gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf die Sekretion des humanen Ab

PUGNAc-Behandlung der Zellen führte zu einer signifikanten Abnahme der A β _{x-40}-Sekretion (siehe 3.7.3). Auch Veränderungen der A β _{x-42}-Sekretion können nicht ausgeschlossen werden (siehe 4.1.3).

Diese Beobachtung widerspricht der Hypothese, dass die O-GlcNAcylierung das APP-Prozessieren reziprok zur Phosphorylierung beeinflusst. Allerdings muss festgestellt werden, dass mit dem HTRF „Immunoassay“ nicht nur A β _{x-40} sondern auch p3 detektiert wird, da für den Nachweis von A β _{x-40} neben dem G2-10-Antikörper auch der 4G8-Antikörper eingesetzt wurde, der mit der mittleren Region von A β reagiert, die u.a. auch Bestandteil von p3 ist (siehe Abb. 2 und vgl. 4.6.2). So ist zum einen keine Unterscheidung zwischen A β _{x-40} und p3 möglich. Zum anderen erfasst der HTRF „Immunoassay“ auch N-terminal verkürzte Formen von A β (vgl. 4.6.2). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Abnahme der p3-Sekretion durch eine gesteigerte Sekretion der N-terminal verkürzten A β -Spezies verdeckt wird.

¹ „Rafts“, auch DIG (Detergent-Insoluble Glycolipid-enriched membrane domains) genannt, sind Caveolae-ähnliche Mikrodomänen der Membran. In „rafts“ sind neben Sphingolipiden, Cholesterin, cytoplasmatischen Signalmolekülen (z.B. heterotrimere G-Proteine und Mitglieder der src-Familie von Tyrosin-Kinasen) auch zahlreiche GPI-verankerte Proteine konzentriert (Gorodinsky und Harris, 1995; Simons und Ikonen, 1997).

Die Beantwortung der Frage, ob unter PUGNAc-Behandlung vermehrt verkürztes A β – und damit auch verlängertes APP_{s β} (siehe 4.6.2) – gebildet wird, ist insofern wichtig, da eine vermehrte Bildung von A β im Einklang mit der aufgestellten Hypothese stehen würde, dass eine erhöhte O-GlcNAc-Expression in einem kausalen Zusammenhang mit dem veränderten Prozessieren von APP steht. Von wesentlicher Bedeutung dabei ist, dass gerade in letzter Zeit in mehreren Publikationen darauf hingewiesen wird, dass N-terminal verkürztes A β eine hohe Aggregationsneigung hat und zumindest bei bestimmten Alzheimer-Formen in Plaques zu finden ist (Demeester et al., 2001; Kumar-Singh et al., 2000; Walsh et al., 2001; Yip und McLaurin, 2001). Da MALDI-MS-Analysen von A β erst seit kurzem erfolgreich durchgeführt werden, ist davon auszugehen, dass in zahlreichen früheren Untersuchungen zur A β -Bildung verkürztes A β nicht erfasst wurde.

Weitere Versuche sind daher wichtig, in denen die sezernierten A β -Peptide massenspektrometrisch analysiert und quantifiziert werden. Auch die Westernblot-Analyse oder der („Sandwich“-)ELISA mit Antikörpern, die spezifisch mit verschiedenen Aminosäuresequenzen von A β reagieren, würden über die N-terminale Heterogenität der sezernierten A β_{x-40} /A β_{x-42} -Spezies Auskunft geben.

4.6.3 Einfluss einer gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf die subzelluläre Lokalisation des humanen APP₆₉₅

Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen deuten auf einen Einfluss der Phosphorylierung auf den intrazellulären Transport von APP hin (Caporaso et al., 1994; De Strooper et al., 1993; Lai et al., 1995; Refolo et al., 1991; Xu et al., 1995). In Anbetracht der reziproken Beziehung zwischen der Phosphorylierung und O-GlcNAcylierung von Proteinen könnte dies auch für O-GlcNAc zutreffen.

Nach PUGNAc-Behandlung der Zellen konnte sowohl bei N2a- als auch N2a-APP₆₉₅-Zellen eine verstärkte Reaktion des 8E5-Antikörpers mit den Neuriten beobachtet werden (Abb. 21). Somit scheint tatsächlich eine erhöhte O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen oder aber des humanen APP₆₉₅ selbst den intrazellulären Transport des humanen APP₆₉₅ in die Neuriten zu fördern.

O-GlcNAc scheint generell eine Rolle bei der Organisation bzw. Stabilisierung des Cytoskeletts zu spielen (Comer und Hart, 2000; Ding und Vandr e, 1996; Hagmann et al., 1992; Hart, 1997; Hart et al., 1996) (siehe 4.2.1). Eine gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation

von Proteinen könnte die für den Transport von APP in die Neuriten nötigen Proteininteraktionen begünstigen. Dazu gehört z.B. die Interaktion zwischen der mit den Mikrotubuli assoziierten ATPase Kinesin (siehe 4.3) und APP. Der schnelle anterograde Transport von APP hin zu den Plus-Enden der Mikrotubuli ist von dieser Interaktion abhängig (Kamal et al., 2000; Ferreira et al., 1993). Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass Kinesin bzw. das homologe Protein PAT1 tatsächlich an eine Sequenz von APP bindet, die zwei potentielle O-GlcNAcylierte Aminosäuren enthält (siehe Abb. 1) (Isohara et al., 1999; Kamal et al., 2000; Zheng et al., 1998; Lai et al., 1995).

Weitere Versuche sind notwendig, um zu nun klären, ob O-GlcNAc tatsächlich z.B. die Interaktion zwischen Kinesin bzw. PAT1 beeinflusst.

5. Zusammenfassung

Das Amyloid Precursor Protein (APP) spielt eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Alzheimer Demenz. Hauptbestandteil der senilen Plaques ist das 4 kD schwere Peptid A β , das durch Proteolyse aus APP entsteht. Die β -Sekretase-Spaltung von APP in der extrazellulären Domäne nahe der Plasmamembran stellt den ersten Schritt der A β -Bildung dar. Nach γ -Sekretase-Spaltung innerhalb der Transmembrandomäne wird A β sezerniert. Alternativ kann APP durch die α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne geschnitten werden. Somit wird durch die α -Sekretase-Spaltung die Entstehung des Peptids verhindert.

Das proteolytische Prozessieren von APP wird u.a. durch verschiedene Signalkaskaden reguliert. Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) fördert beispielsweise die α -Sekretase-Spaltung von APP. Dabei scheint jedoch die Phosphorylierung von APP selbst durch die PKC nicht entscheidend zu sein.

O-glykosidisch an Serin- oder Threonin-Reste gebundenes N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) ist eine ubiquitäre intrazelluläre Kohlenhydratmodifikation von Proteinen. Neben zahlreichen cytoplasmatischen und nukleären Proteinen ist auch das Transmembranprotein APP O-GlcNAc-modifiziert.

Analog zu Kinasen und Phosphatasen sind O-GlcNAc-Transferasen (OGT) und O-GlcNAc-Hydrolasen für den Turnover von O-GlcNAc verantwortlich. Obwohl es anscheinend keine Konsensussequenz für die O-GlcNAcylierung gibt, kommt O-GlcNAc häufig an Serin-/Threonin-Resten von Konsensussequenzen Prolin-dirigierender Kinasen vor. Zudem sind alle bisher als O-GlcNAcyliert identifizierten Proteine ebenfalls phosphoryliert. Diese und weitere Beobachtungen deuten darauf hin, dass O-GlcNAc ein zur Phosphorylierung alternatives Signaltransduktionssystem darstellen könnte. So ist gezeigt worden, dass eine reziproke Beziehung zwischen der O-GlcNAcylierung und der Phosphorylierung durch die PKC besteht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen für das proteolytische Prozessieren des humanen APP₆₉₅ untersucht werden. Dazu wurden Experimente an stabil mit der cDNA des humanen APP₆₉₅ transfizierten N2a-Zellen (N2a-APP₆₉₅-Zellen) durchgeführt.

N2a-APP₆₉₅-Zellen wiesen im Vergleich zu parentalen N2a-Zellen längere Neuriten sowie eine erhöhte Zelladhäsion auf. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit denen anderer

Arbeitsgruppen, denen zufolge APP als Zelladhäsionsmolekül fungieren und das Neuri-
tenwachstum stimulieren kann.

Mit einem O-GlcNAc-spezifischen Antikörper konnte im Westernblot gezeigt werden,
dass humanes APP₆₉₅ O-GlcNAc-modifiziert ist. Damit wurde der von Griffith et al.
(1995) mit einer chemischen Methode für murines APP geführte Nachweis der O-GlcNAc-
Modifikation von APP bestätigt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die unreife
Form des Proteins eindeutig stärker O-GlcNAcyliert ist als die reife Form. Dies trifft
sowohl für den Wildtyp als auch die schwedische Mutante des humanen APP₆₉₅ zu.

Da unreifes APP mit verschiedenen Proteinen, u.a. den Presenilinen, zu interagieren
scheint, ist es möglich, dass die stärkere O-GlcNAcylierung der unreifen Form von APP
von Bedeutung ist für die Regulation der Interaktion zwischen APP und seinen Bindungs-
partnern.

Da gezeigt worden war, dass in Hirnen von Alzheimer Patienten die O-GlcNAc-Modifika-
tion von Proteinen in den Bereichen, in denen morphologische Veränderungen vorkom-
men, erhöht ist, sollte untersucht werden, ob eine gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation von
Proteinen das Prozessieren von APP durch den amyloidogenen β -Sekretase-Weg
beschleunigt.

Zur Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen wurden N2a-APP₆₉₅-Zellen mit
PUGNAc, einem potenten Inhibitor der O-GlcNAc-Hydrolase, behandelt. Im Westernblot
konnte nachgewiesen werden, dass in Gegenwart von PUGNAc die O-GlcNAc-Modifika-
tion von Proteinen deutlich erhöht ist. Allerdings ließ sich unter diesen Bedingungen keine
Veränderung der Sekretion des humanen APP_s bzw. APP _{α} nachweisen. Im Gegensatz
dazu konnte eine signifikante Reduktion der Sekretion des humanen A β _{x-40} verzeichnet
werden.

Da die verwendete Nachweismethode nicht die Unterscheidung zwischen A β ₁₋₄₀, verkürz-
tem A β _{x-40} und dem durch α -Sekretase-Spaltung gebildetem p3 erlaubt, ist es ohne zusätz-
liche Versuche nicht möglich zu entscheiden, ob APP tatsächlich entsprechend der aufge-
stellten Hypothese bei erhöhter O-GlcNAcylierung verstärkt durch den β -Sekretase-Weg
prozessiert wird.

Des weiteren wurde der Einfluss der gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen
auf die subzelluläre Lokalisation des humanen APP₆₉₅ untersucht. Im Gegensatz zu den aus
der Literatur bekannten Beobachtungen zeigt das von den N2a-Zellen exprimierte humane
APP₆₉₅ nur eine schwache Assoziation mit dem Cytoskelett, die durch erhöhte O-GlcNAc-

ylierung von Proteinen nicht beeinflusst wurde. Hingegen konnte bei gesteigerter O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen eine verstärkte Expression des humanen APP₆₉₅ in Neuriten nachgewiesen werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die O-GlcNAcylierung von APP selbst oder aber von anderen Proteinen von Bedeutung ist für den axonalen Transport von APP.

6. Literatur

- Abeijon, C., and Hirschberg, C. B. (1988). Intrinsic membrane glycoproteins with cytosol-oriented sugars in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1010-1014.
- Allinquant, B., Moya, K. L., Bouillot, C. und Prochiantz, A. (1994). Amyloid precursor protein in cortical neurons: coexistence of two pools differentially distributed in axons and dendrites and association with cytoskeleton. *J. Neurosci.* 14, 6842-6854.
- Allinquant, B., Hantraye, P., Maillieux, P., Moya, K., Bouillot, C. und Prochiantz, A. (1995). Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J. Cell Biol.* 128, 919-927.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Hirnrinde. *Allg. Z. Psychat.* 64, 146-148.
- Ando, K., Oishi, M., Takeda, S., Iijima, K.-i., Isohara, T., Nairn, A. C., Kirino, Y., Greengard, P. und Suzuki, T. (1999). Role of phosphorylation of Alzheimer's amyloid precursor protein during neuronal differentiation. *J. Neurosci.* 19, 4421-4427.
- Annaert, W. G., Levesque, L., Craessaerts, K., Dierinck, I., Snellings, G., Westaway, D., St. George-Hyslop, P., Cordell, B., Fraser, P. und De Strooper, B. (1999). Presenilin 1 controls γ -secretase processing of amyloid precursor protein in pre-Golgi compartments of hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* 147, 277-294.
- Arispe, N., Pollard, H. B. und Rojas, E. (1994). The ability of amyloid β -protein [A β P (1-40)] to form Ca^{2+} channels provides a mechanism for neuronal death in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 747, 256-266.
- Arnold, C. S., Johnson, G. V. W., Cole, R. N., Dong, D. L.-Y., Lee, M. und Hart, G. W. (1996). The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 271, 28741-28744.
- Asami-Odaka, A., Ishibashi, Y., Kikuchi, T., Kitada, C., and Suzuki, N. (1995). Long amyloid β -protein secreted from wild-type human neuroblastoma IMR-32 cells. *Biochemistry* 34, 10272-10278.
- Behr, D., Hesse, L., Masters, C. L. und Multhaup, G. (1996). Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J. Biol. Chem.* 271, 1613-1620.
- Behl, C. und Schubert, D. (1993). Heat shock partially protects rat pheochromocytoma PC12 cells from amyloid β peptide toxicity. *Neurosci. Lett.* 154, 1-4.
- Bodendorf, U., Fischer, F., Bodian, D., Multhaup, G. und Paganetti, P. (2001). A splice variant of β -secretase deficient in the amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 276, 12019-12023.
- Boland, K., Behrens, M., Choi, D., Manias, K. und Perlmutter, D. H. (1996). The serpin-enzyme complex receptor recognizes soluble, nontoxic amyloid- β peptide but not aggregated, cytotoxic amyloid- β peptide. *J. Biol. Chem.* 271, 18032-18044.

- Bouillot, C., Prochiantz, A., Rougon, G. und Allinquant, B. (1996). Axonal amyloid precursor protein expressed by neurons in vitro is present in a membrane fraction with caveolae-like properties. *J. Biol. Chem.* *271*, 7640-7644.
- Brabet, P., Pantaloni, C., Rodriguez, M., Martinez, J., Bockaert, J. und Homburger, V. (1990). Neuroblastoma differentiation involves the expression of two isoforms of the α -subunit of Go. *J. Neurochem.* *54*, 1310-1320.
- Brandt, R. (1998). Cytoskeletal mechanisms of axon outgrowth and pathfinding. *Cell Tissue Res.* *292*, 181-189.
- Brandt, R. (2001). Cytoskeletal mechanisms of neuronal degeneration. *Cell Tissue Res.* *305*, 255-265.
- Busciglio, J., Gabuzda, D. H., Matsudaira, P. und Yankner, B. A. (1993). Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 2092-2096.
- Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J. und Yankner, B. A. (1995). β -amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* *14*, 879-888.
- Buxbaum, J. D., Gandy, S. E., Cicchetti, P., Ehrlich, M. E., Czernik, A. J., Fracasso, R. P., Ramabhadran, T. V., Unterbeck, A. J. und Greengard, P. (1990). Processing of Alzheimer β /A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *87*, 6003-6006.
- Buxbaum, J. D., Oishi, M., Chen, H. I., Pinkas-Kramarski, R., Jaffe, E. A., Gandy, S. E. und Greengard, P. (1992). Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer β /A4 amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 10075-1078.
- Buxbaum, J. D., Liu, K.-N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P. und Black, R. A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* *273*, 27765-27767.
- Cao, X. und Südhof, T. C. (2001). A transcriptively active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* *293*, 115-120.
- Capasso, J. M., Abeijon, C., and Hirschberg, C. B. (1988). An intrinsic membrane glycoprotein of the golgi apparatus with O-linked N-acetylglucosamine facing the cytosol. *J. Biol. Chem.* *263*, 19778-19782.
- Capell, A., Grünberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D. J. und Haass, C. (1998). The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. *J. Biol. Chem.* *273*, 3205-3211.
- Caporaso, G. L., Takei, K., Gandy, S. E., Matteoli, M., Mundigl, O., Greengard, P. und de Camilli, P. (1994). Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer β /A4 amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* *14*, 3122-3138.

- Chen, M. und Yankner, B. A. (1991). An antibody to β amyloid and the amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types. *Neurosci. Letters* *125*, 223-226.
- Cheng, X., Cole, R. N., Zaia, J. und Hart, G. W. (2000). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor β . *Biochemistry* *39*, 11609-11620.
- Cheng, X. und Hart, G. W. (2001). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of Serine-16 in murine estrogen receptor β . *J. Biol. Chem.* *276*, 10570-10575.
- Chou, C.-F. und Omary, M. B. (1993). Mitotic arrest-associated enhancement of O-linked glycosylation and phosphorylation of human keratins 8 and 18. *J. Biol. Chem.* *268*, 4465-4472.
- Chou, T.-Y., Hart, G. W. und Dang, C. V. (1995). c-myc is glycosylated at Threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J. Biol. Chem.* *270*, 18961-18965.
- Chow, N., Korenberg, J. R., Chen, X. N. und Neve, R. L. (1996). APP-BP1, a novel protein that binds to the carboxyl-terminal region of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* *271*, 11339-11346.
- Citron, M., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1995). Generation of amyloid β protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* *14*, 661-670.
- Clark, E. A. und Brugge, J. S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* *268*, 233-239.
- Clarke, E. E. und Shearman, M. S. (2000). Quantitation of amyloid- β peptides in biological milieu using a novel homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) assay. *J. Neurosci. Methods* *102*, 61-68.
- Clarris, H. J., Nurcombe, V., Small, D. H., Beyreuther, K. und Masters, C. L. (1994). Secretion of nerve growth factor from septum stimulates neurite outgrowth and release of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease from hippocampal explants. *J. Neurosci. Res.* *38*, 248-258.
- Comer, F. I. und Hart, G. W. (1999). O-GlcNAc and the control of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* *1473*, 161-171.
- Comer, F. I. und Hart, G. W. (2000). O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. *J. Biol. Chem.* *275*, 29179-29182.
- Coulson, E. J., Barrett, G. L., Storey, E., Bartlett, P. F., Beyreuther, K. und Masters, C. L. (1997). Down-regulation of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease by antisense oligonucleotides reduces neuronal adhesion to specific substrata. *Brain Res.* *770*, 72-80.

- Culvenor, J. G., Maher, F., Evin, G., Malchiodi-Albedi, F., Cappai, R., Underwood, J. R., Davis, J. B., Karran, E. H., Roberts, G. W., Beyreuther, K. und Masters, C. L. (1997). Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in neuronal cells: evidence for localization to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *J. Neurosci. Res.* *49*, 719-731.
- Cupers, P., Orlans, I., Craessaerts, K., Annaert, W., and De Strooper, B. (2001). The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by γ -secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurons in culture. *J. Neurochem.* *78*, 1168-1178.
- da Cruz e Silva, O. A., Iverfeldt, K., Oltersdorf, T., Sinha, S., Lieberburg, I., Ramabhadran, T. V., Suzuki, T., Sisodia, S. S., Gandy, S. und Greengard, P. (1993). Regulated cleavage of Alzheimer β -amyloid precursor protein in the absence of the cytoplasmic tail. *Neuroscience* *57*, 873-877.
- Davis-Salinas, J., Saporito-Irwin, S. M., Donovan, F. M., Cunningham, D. D. und van Nostrand, W. E. (1994). Thrombin receptor activation induces secretion and nonamyloidogenic processing of amyloid β -protein precursor. *J. Biol. Chem.* *269*, 22623-22627.
- Dawbarn, D. und Allen, S. J. (1995). *Neurobiology of Alzheimer's disease*. β IOS Scientific Publishers (Oxford).
- Demeester, N., Mertens, C., Caster, H., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., and Labeur, C. (2001). Comparison of the aggregation properties, secondary structure and apoptotic effects of wilde-type, Flemish and Dutch N-terminally truncated amyloid β peptides. *Eur. J. Neurosci.* *13*, 2015-2024.
- De Strooper, B., van Leuven, F. und van den Berghe, H. (1992). α 2-macroglobulin and other proteinase inhibitors do not interfere with the secretion of amyloid precursor protein in mouse neuroblastoma cells. *FEBS Letters* *308*, 50-53.
- De Strooper, B., Umans, L., van Leuven, F. und van den Berghe, H. (1993). Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway. *J. Cell Biol.* *121*, 295-304.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., von Figura, K. und van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* *391*, 387-390.
- De Strooper, B. und Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.* *113*, 1857-1870.
- Dhavan, R., and Tsai, L.-H. (2001). A decade of Cdk5. *Nature Reviews* *2*, 749-759.
- Ding, M. und Vandr e, D. D. (1996). High molecular weight microtubule-associated proteins contain O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* *271*, 12555-12561.

- 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. und Sisodia, S. S. (1996). Protein topology of presenilin 1. *Neuron* *17*, 1023-1030.
- Doherty, P., Ashton, S. V., Moore, S. E. und Walsh, F. S. (1991). Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca²⁺ channels. *Cell* *67*, 21-33.
- Dong, D. L.-Y., Xu, Z.-S., Chevrier, M. R., Cotter, R. J., Cleveland, D. W. und Hart, G. W. (1993). Glycosylation of mammalian neurofilaments. *J. Biol. Chem.* *268*, 16679-16687.
- Dong, D. L.-Y. und Hart, G. W. (1994). Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl- β -D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J. Biol. Chem.* *269*, 19321-19330.
- Dong, D. L.-Y., Xu, Z.-S., Hart, G. W. und Cleveland, D. W. (1996). Cytoplasmic O-GlcNAc modification of the head domain and the KSP repeat motif of the neurofilament protein neurofilament-H. *J. Biol. Chem.* *271*, 20845-20852.
- Efthimiopoulos, S., Felsenstein, K. M., Sambamurti, K., Robakis, N. K. und Refolo, L. M. (1994). Study of the phorbol ester effect on Alzheimer amyloid precursor processing: sequence requirements and involvement of a cholera toxin sensitive protein. *J. Neurosci. Res.* *38*, 81-90.
- Ermeikova, K. S., Zambrano, N., Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T. und Sudol, M. (1997). The WW domain of neural protein Fe65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of Drosophila Enabled. *J. Biol. Chem.* *272*, 32869-32877.
- Evin, G., Beyreuther, K. und Masters, C. L. (1994). Alzheimer's disease amyloid precursor protein (A β PP): proteolytic processing, secretases and β A4 amyloid production. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* *1*, 263-280.
- Ferreira, A., Caceres, A. und Kosik, K. S. (1993). Intraneuronal compartments of the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* *13*, 3112-3123.
- Forman, M. S., Cook, D. G., Leight, S., Doms, R. W. und Lee, V. M.-Y. (1997). Differential effects of the Swedish mutant amyloid precursor protein on β -amyloid accumulation and secretion in neurons and nonneuronal cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 32247-32253.
- Fowler, C. J., Cowburn, R. F., Garlind, A., Winblad, B. und O'Neill, C. (1995). Disturbances in signal transduction mechanisms in Alzheimer's disease. *Mol. Cell. Biochem.* *149/150*, 287-292.
- Gabuzda, D., Busciglio, J., Chen, L. B., Matsudaira, P. und Yankner, B. A. (1994). Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative. *J. Biol. Chem.* *269*, 13623-13628.

- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., Guido, T., Hagopian, S., Johnson-Wood, K., Khan, K., Lee, M., Leibowitz, P., Lieberburg, I., Little, S., Masliah, E., McConlogue, L., Montoya-Zavala, M., Mucke, L., Paganini, L., Penniman, E., Power, M., Schenk, D., Seubert, P., Snyder, B., Sorlano, F., Tan, H., Vitale, J., Wadsworth, S., Wolozin, B. und Zhao, J. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-527.
- Gandy, S., Czernik, A., and Greengard, P. (1988). Phosphorylation of Alzheimer disease amyloid precursor peptide by protein kinase C and Ca^{2+} / calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6218-6221.
- Gandy, S. (1999). Neurohormonal signaling pathways and the regulation of Alzheimer β -amyloid precursor metabolism. *TEM* 10, 273-279.
- Gao, Y., Wells, L., Comer, F. I., Parker, G. J. und Hart, G. W. (2001). Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a neutral, cytosolic β -N-acetylglucosaminidase from human brain. *J. Biol. Chem.* 276, 9838-9845.
- Gertler, F. B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J. und Soriano, P. (1996). Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* 87, 227-239.
- Ghiso, J., Rostagno, A., Gardella, J. E., Liem, L., Gorevic, P. D. und Frangione, B. (1992). A 109-amino-acid C-terminal fragment of Alzheimer's-disease amyloid precursor protein contains a sequence, -RHDS-, that promotes cell adhesion. *Biochem. J.* 288, 1053-1059.
- Glenner, G. G. und Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 120, 885-890.
- Golde, T. E., Estus, S., Younkin, L. H., Selkoe, D. J. und Younkin, S. G. (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* 255, 728-730.
- Gollner, U. F. (2001). Untersuchungen zur Bedeutung der N-Acetylglucosaminylierung für die proteolytische Spaltung der schwedischen Mutante des β -Amyloid Precursor Proteins. Dissertation an der Universität Bonn.
- Gorodinsky, A. und Harris, D. A. (1995). Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. *J. Cell Biol.* 129, 619-627.
- Götz, J. (2001). Tau be or not tau be - Tauopathien und transgene Tiermodelle. *Neuroforum* 3, 93-101.
- Gravina, S. A., Ho, L., Eckman, C. B., Long, K. E., Otvos, L. jr., Younkin, L. H., Suzuki, N. und Younkin, S. G. (1995). Amyloid β protein (A β) in Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* 270, 7013-7016.

- Greenberg, S. M., Koo, E. H., Selkoe, D. J., Qiu, W. Q. und Kosik, K. S. (1994). Secreted β -amyloid precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances tau phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 7104-7108.
- Greenberg, S. M., Qiu, W. Q., Selkoe, D. J., Ben-Itzhak, A. und Kosik, K. S. (1995). Amino-terminal region of the β -amyloid precursor protein activates mitogen-activated protein kinase. *Neurosci. Letters* *198*, 52-56.
- Griffith, L. S., Rex-Mathes, M. und Schmitz, B. (1995). β -amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Neurosci. Res.* *41*, 270-278.
- Griffith, L. S. und Schmitz, B. (1995). O-linked N-acetylglucosamine is upregulated in Alzheimer brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* *213*, 424-431.
- Griffith, L. S. und Schmitz, B. (1999). O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* *262*, 824-831.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., George, L., Tung, Y. C., Kim, K. S. und Wisniewski, H. M. (1989). Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *86*, 2853-2857.
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B. und Selkoe, D. J. (1992). Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* *359*, 322-325.
- Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B. und Selkoe, D. J. (1993). β -amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J. Biol. Chem.* *268*, 3021-3024.
- Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L. und Selkoe, D. J. (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat. Med.* *1*, 1291-1296.
- Haass, C. und De Strooper, B. (1999). The presenilins in Alzheimer's Disease - proteolysis holds the key. *Science* *286*, 916-919.
- Hagmann, J., Grob, M. und Burger, M. M. (1992). The cytoskeletal protein talin is O-glycosylated. *J. Biol. Chem.* *267*, 14424-14428.
- Haltiwanger, R. S., Holt, G. D. und Hart, G. W. (1990). Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide β -N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* *265*, 2563-2568.
- Haltiwanger, R. S., Kelly, W. G., Roquemore, E. P., Blomberg, M. A., Dong, L.-Y. D., Kreppel, L., Chou, T.-Y. und Hart, G. W. (1992a). Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins is ubiquitous and dynamic. *Biochem. Soc. Trans.* *20*, 264-268.

- Haltiwanger, R. S., Blomberg, M. A. und Hart, G. W. (1992b). Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide β -N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* *267*, 9005-9013.
- Haltiwanger, R. S., Grove, K. und Philipsberg, G. A. (1998). Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc- β -N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J. Biol. Chem.* *273*, 3611-3617.
- Han, I. und Kudlow, J. E. (1997). Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 2550-2558.
- Han, I., Oh, E.-S., and Kudlow, J. E. (2000). Responsiveness of the state of O-linked N-acetylglucosamine modification of nuclear pore protein p62 to the extracellular glucose concentration. *Biochem. J.* *350*, 109-114.
- Hanover, J. A., Lai, Z., Lee, G., Lubas, W. A. und Sato, S. M. (1999). Elevated O-linked N-acetylglucosamine metabolism in pancreatic β -cells. *Arch. Biochem. Biophys.* *362*, 38-45.
- Harlow, E. und Lane, D. (1988). *Antibodies: a laboratory manual* (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Hart, G. W., Kreppel, L. K., Comer, F. I., Arnold, C. S., Snow, D. M., Ye, Z., Cheng, X., DellaManna, D., Caine, D. S., Earles, B. J., Akimoto, Y., Cole, R. N. und Hayes, B. K. (1996). O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization. *Glycobiology* *6*, 711-716.
- Hart, G. W. (1997). Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *66*, 315-335.
- Hartmann, T. (1999). Intracellular biology of Alzheimer's disease amyloid β peptide. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* *249*, 291-298.
- Hayes, B. K. und Hart, G. W. (1994). Novel forms of protein glycosylation. *Current Opinion Structural Biol.* *4*, 692-696.
- Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., Lipp, H. P., Wolfner, D. P. und Muller, U. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J. Neurosci.* *20*, 7951-7963.
- Hensley, K., Carney, J. M., Mattson, M. P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, J. F., Floyd, R. A. und Butterfield, D. A. (1994). A model for β -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 3270-3274.
- Holt, G. D., Snow, C. M., Senior, A., Haltiwanger, R. S., Gerace, L. und Hart, G. W. (1987). Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J. Cell Biol.* *104*, 1157-1164.

- Huber, A. B., Brosamle, C., Mechler, H. und Huber, G. (1999). Metalloprotease MP100: a synaptic protease in rat brain. *Brain Res.* 837, 193-202.
- Hundle, B., McMahon, T., Dadgar, J. und Messing, R. O. (1995). Overexpression of e-protein kinase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 270, 30134-30140.
- Hung, A. Y., Koo, E. H., Haass, C. und Selkoe, D. J. (1992). Increased expression of β -amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9439-9443.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., Gloger, I. S., Murphy, K. E., Southan, C. D., Ryan, D. M., Smith, T. S., Simmons, D. L., Walsh, F. S., Dingwall, C. und Christie, G. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* 14, 419-427.
- Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schröder, J., Zerfass, R., Förstl, H., Sandbrink, R., Masters, C. L. und Beyreuther, K. (1996). Analysis of heterogeneous β A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive western blot assay. *J. Biol. Chem.* 271, 22908-22914.
- Iijima, K.-i., Ando, K., Takeda, S., Satoh, Y., Seki, T., Itohara, S., Greengard, P., Kirino, Y., Nairn, A. C. und Suzuki, T. (2000). Neuron-specific phosphorylation of Alzheimer's β -amyloid precursor protein by cyclin-dependent kinase 5. *J. Neurochem.* 75, 1085-1091.
- Ikezu, T., Trapp, B. D., Song, K. S., Schlegel, A., Lisanti, M. P. und Okamoto, T. (1998). Caveolae, plasma membrane microdomains for α -secretase-mediated processing of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 273, 10485-10495.
- Imahori, K. und Uchida, T. (1997). Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J. Biochem.* 121, 179-188.
- Inaba, M. und Maede, Y. (1989). O-N-Acetyl-D-glucosamine moiety on discrete peptide of multiple protein 4.1 isoforms regulated by alternative pathways. *J. Biol. Chem.* 264, 18149-18155.
- Iqbal, K., Alonso, A. d. C., Gong, C.-X., Khatoon, S., Singh, T. J. und Grundke-Iqbal, I. (1994). Mechanisms of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 9, 119-123.
- Ishiguro, M., Ohsawa, I., Takamura, C., Morimoto, T. und Kohsaka, S. (1998). Secreted form of β -amyloid precursor protein activates protein kinase C and phospholipase C γ 1 in cultured embryonic rat neocortical cells. *Mol. Brain Res.* 53, 24-32.
- Ishii, T., Satoh, E., and Nishimura, M. (2001). Integrin-linked kinase controls neurite outgrowth in N1E-115 neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 276, 42994-43003.
- Isohara, T., Horiuchi, A., Watanabe, T., Ando, K., Czernik, A. J., Uno, I., Greengard, P., Nairn, A. C. und Suzuki, T. (1999). Phosphorylation of the cytoplasmic domain of Alzheimer's β -amyloid precursor protein at Ser655 by a novel protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 258, 300-305.

- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N. und Ihara, Y. (1994). Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* 13, 45-53.
- Jensenius, J. C., Andersen, I., Hau, J., Crone, M. und Koch, C. (1981). Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods* 46, 63-68.
- Jiang, M.-S. und Hart, G. W. (1997). A subpopulation of estrogen receptors are modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 272, 2421-2428.
- Jin, L. W., Ninomiya, H., Roch, J. M., Schubert, D., Masliah, E., Otero, D. A. und Saitoh, T. (1994). Peptides containing the RERMS sequence of amyloid β /A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *J. Neurosci.* 14, 5461-5470.
- Johnson, R. J., Xiao, G., Shanmugaratnam, J. und Fine, R. E. (2001). Calreticulin functions as a molecular chaperone for the β -amyloid precursor protein. *Neurobiol. Aging* 22, 387-395.
- Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C.-H. und Goldstein, L. S. B. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-1. *Neuron* 28, 449-459.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. und Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Kearse, K. P. und Hart, G. W. (1991). Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1701-1705.
- Kelly, W. G., Dahmus, M. E. und Hart, G. W. (1993). RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J. Biol. Chem.* 268, 10416-10424.
- Kibbey, M. C., Jucker, M., Weeks, B. S., Neve, R. L., van Nostrand, W. E. und Kleinman, H. K. (1993). β -amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10150-10153.
- Kimberly, W. T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M. S. und Selkoe, D. J. (2000). The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for γ -secretase activity and amyloid β -protein generation. *J. Biol. Chem.* 275, 3173-3178.
- Kimberly, W. T., Zheng, J. B., Guénette, S. Y., and Selkoe, D. J. (2001). The intracellular domain of the β -amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a Notch-like manner. *J. Biol. Chem.* 276, 40288-40292.
- Kimura, H., and Schubert, D. (1993). Amyloid β -protein activates tachykinin receptors and inositol trisphosphate accumulation by synergy with glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7508-7512.

- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K. und Ishiura, S. (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an α -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem. J.* 343, 371-375.
- Koo, E. H., Sisodia, S. S., Archer, D. R., Martin, L. J., Weidemann, A., Beyreuther, K., Fischer, P., Masters, C. L. und Price, D. L. (1990). Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1561-1565.
- Koo, E. H. und Squazzo, S. L. (1994). Evidence that production and release of amyloid β -protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 269, 17386-17389.
- Kreppel, L. K., Blomberg, M. A. und Hart, G. W. (1997). Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 272, 9308-9315.
- Kreppel, L. K. und Hart, G. W. (1999). Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 274, 32015-32022.
- Kriegler, M. (1994). Gene transfer and expression: a laboratory manual. Oxford University Press, 47-56.
- Kuentzel, S. L., Ali, S. M., Altman, R. A., Greenberg, B. D. und Raub, T. J. (1993). The Alzheimer β -amyloid protein precursor/protease nexin-II is cleaved by secretase in a trans-Golgi secretory compartment in human neuroglioma cells. *Biochem. J.* 295, 367-378.
- Kumar-Singh, S., Jonghe, C. d., Cruts, M., Kleinert, R., Wang, R., Mercken, M., De Strooper, B., Vanderstichele, H., Löffgren, A., Vanderhoeven, I., Backhovens, H., Vanmechelen, E., Kroisel, P. M. und Broeckhoven, C. v. (2000). Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a γ 42-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated A β 42 in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Gen.* 9, 2589-2598.
- Kuo, Y.-M., Emmerling, M. R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T. C., Kirkpatrick, J. B., Murdoch, G. H., Ball, M. J. und Roher, A. E. (1996). Water-soluble A β (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J. Biol. Chem.* 271, 4077-4081.
- Kusiak, J. W., Lee, L. L. und Zhao, B. (2001). Expression of mutant amyloid precursor proteins decreases adhesion and delays differentiation of Hep-1 cells. *Brain Res.* 896, 146-152.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lai, A., Sisodia, S. S. und Trowbridge, I. S. (1995). Characterization of sorting signals in the β -amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 270, 3565-3573.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. und Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96, 3922-3927.

- LeBlanc, A. C., Xue, R. und Gambetti, P. (1996). Amyloid precursor protein metabolism in primary cell cultures of neurons, astrocytes, and microglia. *J. Neurochem.* 66, 2300-2310.
- LeBlanc, A., Liu, H., Goodyer, C., Bergeron, C. und Hammond, J. (1999). Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 274, 23426-23436.
- Ledesma, M. D., Silva, J. S. D., Crassaerts, K., Delacourte, A., De Strooper, B. und Dotti, C. G. (2000). Brain plasmin enhances APP α -cleavage and A β degradation and is reduced in Alzheimer's disease brains. *EMBO Reports* 1, 530-535.
- Lee, S.-J., Liyanage, U., Bickel, P. E., Xia, W., Lansbury, P. T. jr. und Kosik, K. S. (1998). A detergent-insoluble membrane compartment contains A β in vivo. *Nat. Med.* 4, 730-734.
- Lefebvre, T., Alonso, C., Mahboub, S., Dupire, M.-J., Zanetta, J.-P., Caillet-Boudin, M.-L. und Michalski, J.-C. (1999). Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1472, 71-81.
- 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., Crowley, A. C., Fu, Y.-H., Guenette, S. Y., Galas, D., Nemens, E., Wijsman, E. M., Bird, T. D., Schellenberg, G. D. und Tanzi, R. E. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973-977.
- Li, X. und Greenwald, I. (1996). Membrane topology of the *C. elegans* SEL-12 presenilin. *Neuron* 17, 1015-1021.
- Lichtenthaler, S. F., Ida, N., Multhaup, G., Masters, C. L. und Beyreuther, K. (1997). Mutations in the transmembrane domain of APP altering γ -secretase specificity. *Biochemistry* 36, 15396-15403.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A. und Tang, J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1456-1460.
- Liu, K., Paterson, A. J., Chin, E. und Kudlow, J. E. (2000). Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic β cells: linkage of O-linked GlcNAc to β cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2820-2825.
- Lopez-Perez, E., Seidah, N. G. und Checler, F. (1999). Proprotein convertase activity contributes to the processing of the Alzheimer's β -amyloid precursor protein in human cells: evidence for a role of the prohormone convertase PC7 in the constitutive α -secretase pathway. *J. Neurochem.* 73, 2056-2062.
- Lorenzo, A. und Yankner, B. A. (1994). β -amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12243-12247.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randell, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

- Lubas, W. A., Smith, M., Starr, C. M. und Hanover, J. A. (1995). Analysis of nuclear pore protein p62 glycosylation. *Biochemistry* 34, 1686-1694.
- Lubas, W. A., Frank, D. W., Krause, M. und Hanover, J. A. (1997). O-linked GlcNAc transferase is a conserved nucleoplasmic protein containing tetra- and pentapeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 272, 9316-9324.
- Luo, Y., Sunderland, T., and Wolozin, B. (1996). Physiologic levels of β -amyloid activate phosphatidylinositol 3-kinase with the involvement of tyrosin phosphorylation. *Journal of Neurochemistry* 67, 978-987.
- Mandelkow, E. (1999). The tangled tale of tau. *Nature* 402, 588-589.
- Marambaud, P., Lopez-Perez, E., Wilk, S. und Checler, F. (1996). Constitutive and protein kinase C-regulated secretory cleavage of Alzheimer's β -amyloid precursor protein: different control of early and late events by proteasome. *J. Neurochem.* 69, 2500-2505.
- Marambaud, P., Chevallier, N., Barelli, H., Wilk, S. und Checler, F. (1997a). Proteasome contributes to the α -secretase pathway of amyloid precursor protein in human cells. *J. Neurochem.* 68, 698-703.
- Marambaud, P., Wilk, S. und Checler, F. (1997b). Protein kinase A phosphorylation of the proteasome: a contribution to the α -secretase pathway in human cells. *J. Neurochem.* 67, 2616-2619.
- Martin, B. L., Schrader-Fischer, G., Busciglio, J., Duke, M., Paganetti, P. und Yankner, B. A. (1995). Intracellular accumulation of β -amyloid in cells expressing the Swedish mutant amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 270, 26727-26730.
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L. und Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4245-4249.
- Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I. und Rydel, R. E. (1992). β -amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 12, 376-389.
- Mattson, M. P., Tomaselli, K. J. und Rydel, R. E. (1993). Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated β -amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain Res.* 621, 35-49.
- Mattson, M. P., Guo, Q., Furukawa, K. und Pedersen, W. A. (1998). Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 70, 1-14.
- Maurer, K., Volk, S. und Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349, 1546-1549.
- McConlogue, L., Castellano, F., deWitt, C., Schenk, D. und Maltese, W. A. (1996). Differential effects of a Rab6 mutant on secretory versus amyloidogenic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 271, 1343-1348.

- Medina, L., Grove, K. und Haltiwanger, R. S. (1998). SV40 large T antigen is modified with O-linked N-acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation. *Glycobiology* 8, 383-391.
- Mills, J., Charest, D. L., Lam, F., Beyreuther, K., Ida, N., Pelech, S. L. und Reiner, P. B. (1997). Regulation of amyloid precursor protein catabolism involves the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Neurosci.* 17, 9415-9422.
- Minopoli, G., de Candida, P., Bonetti, A., Faraonio, R., Zambrano, N. und Russo, T. (2001). The β -amyloid precursor protein functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* 276, 6545-6550.
- Mucke, L., Masliah, E., Johnson, W. B., Ruppe, M. D., Alford, M., Rockenstein, E. M., Forss-Petter, S., Pietropaolo, M., Mallory, M. und Abraham, C. R. (1994). Synaptotrophic effects of human amyloid β protein precursors in the cortex of transgenic mice. *Brain Res.* 666, 151-167.
- Muller, U., Cristina, N., Li, Z. W., Wolfer, D. P., Lipp, H. P., Rulicke, T., Brandner, S., Aguzzi, A. und Weissmann, C. (1994). Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified β -amyloid precursor protein gene. *Cell* 79, 755-765.
- Murphy, G. M. jr., Forno, L. S., Higgins, L., Scardina, J. M., Eng, L. F. und Cordell, B. (1994). Development of a monoclonal antibody specific for the COOH-terminal of β -amyloid 1-42 and its immunohistochemical reactivity in Alzheimer's disease and related disorders. *Am. J. Pathol.* 144, 1082-1088.
- Neve, R. L., McPhie, D. L. und Chen, Y. (2000). Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Res.* 886, 54-66.
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y. und Ogata, E. (1993). Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein Go. *Nature* 362, 75-79.
- Nishiyama, K., Trapp, B. D., Ikezu, T., Ransohoff, R. M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Kanazawa, I., Hsiao, K. K., Lisanti, M. P. und Okamoto, T. (1999). Caveolin-3 upregulation activates β -secretase-mediated cleavage of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 19, 6538-6548.
- Nitsch, R. M., Deng, M., Growdon, J. H. und Wurtman, R. J. (1996). Serotonin 5-HT_{2a} and 5-HT_{2c} receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion. *J. Biol. Chem.* 271, 4188-4194.
- Nunan, J. und Small, D. H. (2000). Regulation of APP cleavage by α -, β - and γ -secretases. *FEBS Letters* 483, 6-10.
- Nunan, J., Shearman, M. S., Checler, F., Cappai, R., Evin, G., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Small, D. H. (2001). The C-terminal fragment of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor is degraded by a proteasome-dependent mechanism distinct from γ -secretase. *Eur. J. Biochem.* 268, 5329-5336.

- Ohsawa, I., Takamura, C. und Kohsaka, S. (1997). The amino-terminal region of amyloid precursor protein is responsible for neurite outgrowth in rat neocortical explant culture. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 236, 59-65.
- Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E. und Nishimoto, I. (1995). Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J. Biol. Chem.* 270, 4205-4208.
- Oltersdorf, T., Fritz, L. C., Schenk, D. B., Lieberburg, I., Johnson-Wood, K. L., Beattie, E. C., Ward, P. J., Blacher, R. W., Dovey, H. F. und Sinha, S. (1989). The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II. *Nature* 341, 144-147.
- Paresce, D. M., Chung, H. und Maxfield, F. R. (1997). Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid β -protein by microglial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 29390-29397.
- Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E. H., Turner, A. J. und Hooper, N. M. (1999). Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by α -secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry* 38, 9728-9734.
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., Monte, S. d. I., Dikkes, P. und Tsai, L. H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615-622.
- Pellegrini, L., Passer, B. J., Tabaton, M., Ganjei, J. K. und D'Adamio, L. (1999). Alternative, non-secretase processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein during apoptosis by caspase-6 and -8. *J. Biol. Chem.* 274, 21011-21016.
- Perez, R. G., Zheng, H., van der Ploeg, L. H. T. und Koo, E. H. (1997). The β -amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J. Neurosci.* 17, 9407-9414.
- Permanne, B., Buée, L., David, J.-P., Fallet-Bianco, C., Menza, C. d. und Delacourte, A. (1995). Quantitation of Alzheimer's amyloid peptide and identification of related amyloid proteins by dot-blot immunoassay. *Brain Res.* 685, 154-162.
- Perron, J. C. und Bixby, J. L. (1999). Distinct neurite outgrowth signaling pathways converge on ERK activation. *Mol. Cell. Neurosci.* 13, 362-378.
- Pinnix, I., Musunuru, U., Tun, H., Sridharan, A., Golde, T., Eckman, C., Ziani-Cherif, C., Onstead, L. und Sambamurti, K. (2001). A novel γ -secretase assay based on detection of the putative C-terminal fragment- γ of amyloid β protein precursor. *J. Biol. Chem.* 276, 481-487.
- Podlisny, M. B., Ostaszewski, B. L., Squazzo, S. L., Koo, E. H., Rydell, R. E., Teplow, D. B. und Selkoe, D. J. (1995). Aggregation of secreted amyloid β -protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture. *J. Biol. Chem.* 270, 9564-9570.

- Preuss, U., Döring, F., Illenberger, S. und Mandelkow, E.-M. (1995). Cell cycle-dependent phosphorylation and microtubule binding of tau protein stably transfected into Chinese hamster ovary cells. *Mol. Biol. Cell* 6, 1397-1410.
- Qiu, W. Q., Ferreira, A., Miller, C., Koo, E. H. und Selkoe, D. J. (1995). Cell-surface β -amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform dependent manner. *J. Neurosci.* 15, 2157-2167.
- Qiu, W. Q., Ye, Z., Kholodenko, D., Seubert, P. und Selkoe, D. J. (1997). Degradation of amyloid β -protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells. *J. Biol. Chem.* 272, 6641-6646.
- Qiu, W. Q., Walsh, D. M., Ye, Z., Vekrellis, K., Zhang, J., Podlisny, M. B., Rosner, M. R., Safavi, A., Hersh, L. B. und Selkoe, D. J. (1998). Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid β -protein by degradation. *J. Biol. Chem.* 273, 32730-32738.
- Reason, A. J., Morris, H. R., Panico, M., Marais, R., Treisman, R. H., Haltiwanger, R. S., Hart, G. W., Kelly, W. G. und Dell, A. (1992). Localization of O-GlcNAc modification on the serum response transcription factor. *J. Biol. Chem.* 267, 16911-16921.
- Rechensteiner, M. (1990). PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis. *Seminars in Cell Biology* 1, 433-440.
- Refolo, L. M., Wittenberg, I. S., Friedrich, V. L. jr. und Robakis, N. K. (1991). The Alzheimer amyloid precursor protein is associated with the detergent-insoluble cytoskeleton. *J. Neurosci.* 11, 3888-3897.
- Rex-Mathes, M., Werner, S., Strutas, D., Griffith, L. S., Viebahn, C., Thelen, K. und Schmitz, B. (2001). O-GlcNAc expression in developing and aging mouse brain. *Biochimie* 83, 583-590.
- Rizzuto, R. (2001). Intracellular Ca^{2+} pools in neuronal signaling. *Current Opinion Neurobiol.* 11, 306-311.
- Roghani, M., Becherer, J. D., Moss, M. L., Atherton, R. E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R. K., Weskamp, G., Tempst, P. und Blobel, C. P. (1999). Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 274, 3531-3540.
- Roher, A. E., Chaney, M. O., Kuo, Y.-M., Webster, S. D., Stine, W. B., Haverkamp, L. J., Woods, A. S., Cotter, R. J., Tuohy, J. M., Krafft, G. A., Bonnell, B. S. und Emmerling, M. R. (1996). Morphology and toxicity of $\text{A}\beta$ -(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 271, 20631-20635.
- Roos, M. D. und Hanover, J. A. (2000). Structure of O-linked GlcNAc transferase: mediator of an glycan-dependent signaling. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 271, 275-280.
- Roquemore, E. P., Chevrier, M. R., Cotter, R. J. und Hart, G. W. (1996). Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein α B-crystallin. *Biochemistry* 35, 3578-3586.

- Roth, G. S., Joseph, J. A. und Mason, R. P. (1995). Membrane alterations as causes of impaired signal transduction in Alzheimer's disease and aging. *TINS* 18, 203-206.
- Russo, T., Faraonio, R., Minopoli, G., de Candia, P., deRenzis, S. und Zambrano, N. (1998). Fe65 and the protein network centered around the cytosolic domain of the Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *FEBS Letters* 434, 1-7.
- Saitoh, T. und Mook-Jung, I. (1996). Commentary: Is understanding the biological function of APP important in understanding Alzheimer's disease? *Alzheimer's Disease Review* 1, 30-36.
- Sambamurti, K., Sevlever, D., Koothan, T., Refolo, L. M., Pinnix, I., Gandhi, S., Onstead, L., Younkin, L., Prada, C. M., Yager, D., Ohyagi, Y., Eckmann, C. B., Rosenberry, T. L. und Younkin, S. G. (1999). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins play an important role in the biogenesis of the Alzheimer's amyloid β -protein. *J. Biol. Chem.* 274, 26810-26814.
- Sastre, M., Turner, R. S. und Levy, E. (1998). X11 interaction with β -amyloid precursor protein modulates its cellular stabilization and reduces amyloid β -protein secretion. *J. Biol. Chem.* 273, 22351-22357.
- Satoh, T., Furuta, K., Tomokiyo, K., Suzuki, M., and Watanabe, Y. (2000). Designed cyclopentenone prostaglandin derivatives as neurite outgrowth-promoting compounds for CAD cells, a rat catecholaminergic neuronal cell line of the central nervous system. *Neurosci. Lett.* 291, 167-170.
- Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E. und Madelkow, E.-M. (1999). Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 38, 3549-3558.
- Schubert, D., Jin, L.-W., Saitoh, T. und Cole, G. (1989). The regulation of amyloid β protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* 3, 689-694.
- Schubert, W., Prior, R., Weidemann, A., Dircksen, H., Multhaup, G., Masters, C. L. und Beyreuther, K. (1991). Localization of Alzheimer β A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res.* 563, 184-194.
- Schubert, D. und Behl, C. (1993). The expression of amyloid β protein precursor protects nerve cells from β -amyloid and glutamate toxicity and alters their interaction with the extracellular matrix. *Brain Res.* 629, 275-282.
- Schuch, U., Lohse, M. J. und Schachner, M. (1989). Neural cell adhesion molecules influence second messenger systems. *Neuron* 3, 13-20.
- Schultz, C., Braak, E. und Braak, H. (2001). Abnorme Phosphorylierung und Aggregation des Tau-Proteins im Zentralnervensystem. *Neuroforum* 2, 57-67.
- Schwab, C., Akiyama, H., McGeer, E. G. und McGeer, P. L. (1998). Extracellular neurofibrillary tangles are immunopositive for the 40 carboxy-terminal sequence of β -amyloid protein. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 1131-1137.

Selkoe, D. J. (1998). The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends in Cell Biology* 8, 447-453.

Selkoe, D. J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399, A23-A31.

Selkoe, D. J. (2000). Notch and presenilins in vertebrates and invertebrates: implications for neuronal development and degeneration. *Current Opinion Neurobiol.* 10, 50-57.

Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D., Lieberburg, I. und Schenk, D. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature* 359, 325-327.

Shafi, R., Iyer, S. P. N., Ellies, L. G., O'Donnell, N., Marek, K. W., Chui, D., Hart, G. W. und Marth, J. D. (2000). The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5735-5739.

Shea, T. B., Beermann, M. L., and Nixon, R. A. (1991). Multiple proteases regulate neurite outgrowth in NB2a / dl neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 56, 842-851.

Shea, T. B., Beermann, M. L., Nixon, R. A., and Fischer, I. (1992a). Microtubule-associated protein tau is required for axonal neurite elaboration by neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* 32, 363-374.

Shea, T. B., Beermann, M. L., and Nixon, R. A. (1992b). Sequential effects of astroglial-derived factors on neurite outgrowth: initiation by protease inhibitors and potentiation by extracellular matrix components. *J. Neurosci. Res.* 31, 309-317.

Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Iekeda, 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., Chumakow, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R. J., Wasco, W., Silva, H. A. R. d., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Tanzi, R. E., Roses, A. D., Fraser, P. E., Rommens, J. M. und St. George-Hyslop, P. H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.

Shimokawa, M., Yanagisawa, K., Nishiye, H. und Miyatake, T. (1993). Identification of amyloid precursor protein in synaptic plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 240-244.

Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., Cai, X.-D., McKay, D. M., Tintner, R., Frangione, B. und Younkin, S. G. (1992). Production of the Alzheimer amyloid β protein by normal proteolytic processing. *Science* 258, 126-129.

Simons, M., Ikonen, E., Tienari, P. J., Cid-Arregui, A., Monning, U., Beyreuther, K. und Dotti, C. G. (1995). Intracellular routing of human amyloid protein precursor: axonal delivery followed by transport to the dendrites. *J. Neurosci. Res.* 41, 121-128.

Simons, K. und Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.

Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G. und Simons, K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6460-6464.

Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaaari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L. und John, V. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature* 402, 537-540.

Sinha, S. und Lieberburg, I. (1999). Cellular mechanisms of β -amyloid production and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11049-11053.

Sisodia, S. S. (1992). β -amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6075-6079.

Skovronsky, D. M., Doms, R. W. und Lee, V. M.-Y. (1998). Detection of a novel intraneuronal pool of insoluble amyloid β protein that accumulates with time in culture. *J. Cell Biol.* 141, 1031-1039.

Skovronsky, D. M., Moore, D. B., Milla, M. E., Doms, R. W. und Lee, V. M.-Y. (2000a). Protein kinase C-dependent α -secretase competes with β -secretase for cleavage of amyloid- β precursor protein in the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* 275, 2568-2575.

Skovronsky, D. M., Pijak, D. S., Doms, R. W., and Lee, V. M. (2000b). A distinct ER/IC γ -secretase competes with the proteasome for cleavage of APP. *Biochemistry* 39, 810-817.

Slunt, H. H., Thinakaran, G., Koch, C. v., Lo, A. C. Y., Tanzi, R. E. und Sisodia, S. S. (1994). Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse β -amyloid precursor protein (APP). *J. Biol. Chem.* 269, 2637-2644.

Small, D. H., Clarris, H. L., Williamson, T. G., Reed, G., Key, B., Mok, S. S., Beyreuther, K., Masters, C. L. und Nurcombe, V. (1996). Neurite outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease Review* 1, 21-29.

Snow, C. M., Senior, A. und Gerace, L. (1987). Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *J. Cell Biol.* 104, 1143-1156.

Snow, D. M., Shaper, J. H., Shaper, N. L. und Hart, G. W. (1996). Cytosolic galactosyltransferase mediated capping of O-GlcNAc in CHO cells: a model to elucidate function. *Mol. Biol. Cell* 6, 357a.

Snow, D. M. und Hart, G. W. (1998). Nuclear and cytoplasmic glycosylation. In *International review of cytology: a survey of cell biology*, K. W. Jeon, ed. (San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press), S. 43-68.

- Spero, D. A., and Roisen, F. J. (1984). Ganglioside-mediated enhancement of the cytoskeletal organization and activity in neuro-2a neuroblastoma cells. *Brain Res.* 315, 37-48.
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. L., Baumeister, R., Fechteler, K. und Haass, C. (2000). Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat. Cell. Biol.* 2, 848-851.
- Storey, E., Spurck, T., Picket-Heaps, J., Beyreuther, K. und Masters, C. L. (1996a). The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is found on the surface of static but not actively motile portions of neurites. *Brain Res.* 735, 59-66.
- Storey, E., Beyreuther, K. und Masters, C. L. (1996b). Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components. *Brain Res.* 735, 217-231.
- Strittmatter, S. M., Fishman, M. C. und Zhu, X. P. (1994). Activated mutants of the α subunit of G(o) promote an increased number of neurites per cell. *J. Neurosci.* 14, 2327-2338.
- Sudoh, S., Hua, G., Kawamura, Y., Maruyama, K., Komano, H., and Yanagisawa, K. (2000). Intracellular site of γ -secretase cleavage for A β 42 generation in Neuro 2a cells harbouring a presenilin 1 mutation. *Eur. J. Biochem.* 267, 2036-2045.
- Suter, D. M. und Forscher, P. (1998). An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Current Opinion Neurobiol.* 8, 106-116.
- Suzuki, T., Nairn, A. C., Gandy, S. E. und Greengard, P. (1992). Phosphorylation of Alzheimer amyloid precursor protein by protein kinase C. *Neurosci.* 48, 755-761.
- Suzuki, T., Oishi, M., Marshak, D. R., Czernik, A. J., Nairn, A. C. und Greengard, P. (1994). Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein. *EMBO J.* 13, 1114-1122.
- Tang, Z. L., Scherer, P. E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D. S., Nishimoto, I., Lodish, H. F. und Lisanti, M. P. (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* 271, 2255-2261.
- Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Watkins, P. C., Bruns, G. A. P., St. George-Hyslop, P., van Keuren, M. L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D. M. und Neve, R. L. (1987). Amyloid β protein gene: cDNA, mRNA distribution and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880-884.
- Théodore, L., Derossi, D., Chassaing, G., Llibat, B., Kubes, M., Jordan, P., Chneiweiss, H., Godement, P. und Prochiantz, A. (1995). Intraneuronal delivery of protein kinase C pseudosubstrate leads to growth cone collapse. *J. Neurosci.* 15, 7158-7167.

- Thinakaran, G., Teplow, D. B., Siman, R., Greenberg, B. und Sisodia, S. S. (1996a). Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in Neuro2A (N2a) cells. Evidence that cleavage at the β -secretase" site occurs in the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 271, 9390-9397.
- 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. und Sisodia, S. S. (1996b). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17, 181-190.
- Thornton, T. M., Swain, S. M. und Okzewski, N. E. (1999). Gibberellin signal transduction presents ...the SPY who O-GlcNAc'd me. *Trends Plant Science Reviews* 4, 424-428.
- Tienari, P. J., De Strooper, B., Ikonen, E., Simons, M., Weidemann, A., Czech, C., Hartmann, T., Ida, N., Multhaup, G., Masters, C. L., Leuven, F. v., Beyreuther, K. und Dotti, C. G. (1996). The β -amyloid domain is essential for axonal sorting of amyloid precursor protein. *EMBO J.* 15, 5218-5229.
- Tienari, P. J., Ida, N., Ikonen, E., Simons, M., Weidemann, A., Multhaup, G., Masters, C. L., Dotti, C. G. und Beyreuther, K. (1997). Intracellular and secreted Alzheimer β -amyloid species are generated by distinct mechanisms in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4125-4130.
- Tomita, S., Kirino, Y. und Suzuki, T. (1998). A basic amino acid in the cytoplasmic domain of Alzheimer's β -amyloid precursor protein (APP) is essential for cleavage of APP at the α -site. *J. Biol. Chem.* 273, 19304-19310.
- Torres, C.-R. und Hart, G. W. (1984). Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surface of intact lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 259, 3308-3317.
- Turner, J. R., Tartakoff, A. M. und Greenspan, N. S. (1990). Cytologic assessment of nuclear and cytoplasmic O-linked N-acetylglucosamine distribution by using anti-streptococcal monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5608-5612.
- Turner, R. S., Suzuki, N., Chyung, A. S. C., Younkin, S. G. und Lee, V. M.-Y. (1996). Amyloids β 40 and β 42 are generated intracellularly in cultured human neurons and their secretion increases with maturation. *J. Biol. Chem.* 271, 8966-8970.
- Urmoneit, B., Turner, J., and Dyrks, T. (1998). Pulse-chase experiments revealed β -secretase cleavage from immature full-length amyloid precursor protein harboring the Swedish mutation. *J. Mol. Neurosci.* 11, 141-150.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Khan, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.-C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. und Citron, M. (1999). β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.

- Vassar, R. und Citron, M. (2000). A β -generating enzymes: recent advances in β - and γ -secretase research. *Neuron* 27, 419-422.
- von Koch, C. S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., Ploeg, L. H. v. d., Price, D. L. und Sisodia, S. S. (1997). Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging* 18, 661-669.
- Wallace, W. C., Akar, C. A., Lyons, W. E., Kole, H. K., Egan, J. M. und Wolozin, B. (1997). Amyloid precursor protein requires the insulin signaling pathway for neurotrophic activity. *Mol. Brain Res.* 52, 213-227.
- Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B. und Selkoe, D. J. (2000). The oligomerization of amyloid β -protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochem.* 39, 10831-10839.
- Walsh, D. M., Hartley, D. M., Condron, M. M., Selkoe, D. J., and Teplow, D. B. (2001). In vitro studies of amyloid β -protein fibril assembly and toxicity provide clues to the aetiology of Flemish variant (Ala⁶⁹² \rightarrow Gly) Alzheimer's disease. *Biochem. J.* 355, 869-877.
- Walter, J., Grünberg, J., Schindzielorz, A., and Haass, C. (1998). Proteolytic fragments of the Alzheimer's disease associated presenilin-1 and -2 are phosphorylated in vivo by distinct cellular mechanisms. *Biochemistry* 37, 5961-5967.
- Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S. E. und Sisodia, S. S. (1996). The profile of soluble amyloid β protein in cultured cell media. *J. Biol. Chem.* 271, 31894-31902.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E. und Solomon, F. (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid β protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10758-10762.
- Weggen, S. (1996). Herstellung und Charakterisierung von retroviralen Vektoren zur Expression des humanen Amyloid Vorläufer Proteins (APP) in neuronalen Transplantaten. Diplomarbeit der Universität Bonn, 40-47.
- Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L. und Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57, 115-126.
- Weidemann, A., Paliga, K., Durrwang, U., Czech, C., Evin, G., Masters, C. L. und Beyreuther, K. (1997). Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: presenilin-2 and β -amyloid precursor protein. *Nat. Med.* 3, 328-332.
- Wells, L., Vosseller, K. und Hart, G. W. (2001). Glycosylation of nucleoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 291, 2376-2378.
- Wertkin, A. M., Turner, R. S., Pleasure, S. J., Golde, T. E., Younkin, S. G., Trojanowski, J. Q. und Lee, V. M.-Y. (1993). Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular β -amyloid or A4 peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9513-9517.

- Whitson, J. S., Selkoe, D. J. und Cotman, C. W. (1989). Amyloid β protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science* 243, 1488-1490.
- Wild-Bode, C., Yamazaki, T., Capell, A., Leimer, U., Steiner, H., Ihara, Y. und Haass, C. (1997). Intracellular generation and accumulation of amyloid β -peptide terminating at amino acid 42. *J. Biol. Chem.* 272, 16085-16088.
- Wilson, C. A., Doms, R. W. und Lee, V. M.-Y. (1999). Intracellular APP processing and A β production in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 787-794.
- Wisniewski, K. E., Dalton, A. J., McLachlan, C., Wen, G. Y. und Wisniewski, H. M. (1985). Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology* 35, 957-961.
- Wisniewski, T., Palha, J. A., Ghiso, J. und Frangione, B. (1995). S182 protein in Alzheimer's disease neuritic plaques. *Lancet* 346, 1366.
- Wolf, B. A., Wertkin, A. M., Jolly, Y. C., Yasuda, R. P., Wolfe, B. B., Konrad, R. J., Manning, D., Ravi, S., Williamson, J. R. und Lee, V. M.-Y. (1995). Muscarinic regulation of Alzheimer's disease amyloid precursor protein secretion and amyloid β -protein production in human neuronal NT2N cells. *J. Biol. Chem.* 270, 4916-4922.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T. und Selkoe, D. J. (1999a). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature* 389, 513-517.
- Wolfe, M. S., delosAngeles, J., Miller, D. D., Xia, W. und Selkoe, D. J. (1999b). Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 38, 11223-11230.
- Wood, K. W., Sarnecki, C., Roberts, T. M. und Blenis, J. (1992). ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, raf-1, and RSK. *Cell* 68, 1041-1050.
- Xia, W., Zhang, J., Perez, R., Koo, E. H. und Selkoe, D. J. (1997). Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8208-8213.
- Xia, W., Zhang, J., Ostaszewski, B. L., Kimberly, W. T., Seubert, P., Koo, E. H., Shen, J. und Selkoe, D. J. (1998). Presenilin 1 regulates the processing of β -amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid β -protein in endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochemistry* 37, 16465-16471.
- Xia, W., Ray, W. J., Ostaszewski, B. L., Rahmati, T., Kimberly, W. T., Wolfe, M. S., Zhang, J., Goate, A. M. und Selkoe, D. J. (2000). Presenilin complexes with the C-terminal fragments of amyloid precursor protein at the sites of amyloid β -protein generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9299-9304.
- Xu, H., Greengard, P. und Gandy, S. (1995). Regulated formation of Golgi secretory vesicles containing Alzheimer β -amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 270, 23243-23245.

- Xu, H., Sweeney, D., Greengard, P. und Gandy, S. (1996). Metabolism of Alzheimer β -amyloid precursor protein: regulation by protein kinase A in intact cells and in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 4081-4084.
- Xu, H., Sweeney, D., Wang, R., Thinakaran, G., Lo, A. C. Y., Sisodia, S. S., Greengard, P. und Gandy, S. (1997). Generation of Alzheimer β -amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 3748-3752.
- Xu, X., Yang, D., Wyss-Coray, T., Yan, J., Gan, L., Sun, Y. und Mucke, L. (1999). Wild-type but not Alzheimer-mutant amyloid precursor protein confers resistance against p53-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 7547-7552.
- Yamatsuji, T., Matsui, T., Okamoto, T., Komatsuzaki, K., Takeda, S., Fukumoto, H., Iwatsubo, T., Suzuki, N., Asami-Odaka, A., Ireland, S., Kinane, T. B., Giambarella, U. und Nishimoto, I. (1996). G protein-mediated neuronal DNA fragmentation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP. *Science* *272*, 1349-1352.
- Yamazaki, T., Selkoe, D. J. und Koo, E. H. (1995). Trafficking of cell surface β -amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons. *J. Cell Biol.* *129*, 431-442.
- Yamazaki, T., Koo, E. H. und Selkoe, D. J. (1996). Trafficking of cell-surface amyloid β -protein precursor. II. Endocytosis, recycling, and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *J. Cell Sci.* *109*, 999-1008.
- Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashler, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrichson, R. L. und Gurney, M. E. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature* *402*, 533-537.
- Yanagisawa, K., Odaka, A., Suzuki, N. und Ihara, Y. (1995). GM1 ganglioside-bound amyloid β -protein (A β): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* *1*, 998-999.
- Yankner, B. A., Duffy, L. K. und Kirschner, D. A. (1990). Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* *250*, 279-282.
- Yao, P. J. und Coleman, P. D. (1998a). Reduction of O-linked N-acetylglucosamine-modified assembly protein-3 in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* *18*, 2399-2411.
- Yao, P. J. und Coleman, P. D. (1998b). Reduced O-glycosylated clathrin assembly protein AP180: implication for synaptic vesicle recycling dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurosci. Letters* *252*, 33-36.
- Yip, C. M., and McLaurin, J. (2001). Amyloid- β peptide assembly: a critical step in fibrillogenesis and membrane disruption. *Biophys. J.* *80*, 1359-1371.

Yu, G., Chen, F., Levesque, G., Nishimura, M., Zhang, D.-M., Levesque, L., Rogaeva, E., Xu, D., Liang, Y., Duthie, M., St. George-Hyslop, P. H. und Fraser, P. E. (1998). The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains β -catenin. *J. Biol. Chem.* 273, 16470-16475.

Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D. S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D. M., Xu, D. H., Sato, C., Rogaev, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebersold, R., Farrer, L. S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P. und St. George-Hyslop, P. (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. *Nature* 407, 48-54.

Zhang, C., Lambert, M. P., Bunch, C., Barber, K., Wade, W. S., Krafft, G. A. und Klein, W. L. (1994). Focal adhesion kinase expressed by nerve cell lines shows increased tyrosine phosphorylation in response to Alzheimer's A β peptide. *J. Biol. Chem.* 269, 25247-25250.

Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Sirinathsingji, D. J., Hopkins, R., Smith, D. W., Heavens, R. P., Dawson, G. R., Boyce, S. und Conner, M. W. (1995). β -amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525-531.

Zheng, P., Eastman, J., Pol, S. V. und Pimplikar, S. W. (1998). PAT1, a microtubule-interacting protein, recognizes the basolateral sorting signal of amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14745-14750.