

**Homo- und Heterophile Oligomerisierung von APP, APLP1 und APLP2:
Charakterisierung von Kontaktstellen und Cis- und Transinteraktionen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Daniela Kaden
aus Berlin

Dezember 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerd Multhaup am Institut für Chemie und Biochemie des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup

2. Gutachter: Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel

Disputation am 06.02.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Die Alzheimer Krankheit	6
1.2. Die APP-Gen-Familie	7
1.2.1. Prozessierung des APP	8
1.2.2. Prozessierung der APLPs	10
1.2.3. Funktionen des APP	10
1.2.4. Funktionen der APLPs	11
1.2.5. Struktur des APP	14
1.3. Liganden der APP-Familie	16
1.4. Zielsetzung	18
2. Ergebnisse	19
2.1. Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus <i>Pichia pastoris</i>	19
2.1.1. Analyse der löslichen Ektodomänen der APP-Familie in <i>P. pastoris</i>	19
2.1.2. Analyse des N-Terminus von APP (APP18-350)	20
2.1.2.1. Inhibition der Dimerisierung von APP18-350-WT	21
2.1.2.2. Einfluss der „Loop“-Region auf die APP18-350 Dimerisierung	22
2.1.3. Herstellung polyklonaler Antikörper	27
2.1.4. Interaktion von sAPLP1 α und sAPLP2 α mit sorLA	28
2.2. Analyse der Homo- und Heterodimerisierung der Proteine der APP-Familie in höheren eukaryotischen Zellen	30
2.2.1. Analyse der Homodimerisierung	30
2.2.2. Analyse der Heterodimerisierung	34
2.2.3. Einfluss der Heterodimerisierung auf die Prozessierung des APP und die Entstehung von A β	37
2.2.4. Relevanz des N-Terminus für die Homo- und Heterodimerisierung	40
2.2.4.1. Homodimerisierung der Deletionsmutanten	40
2.2.4.2. Heterodimerisierung der Deletionsmutanten	42
2.2.5. Die Disulfidbrücke der APP-„Loop“-Region beeinflusst die Lokalisation und Dimerisierung des APP in lebenden eukaryotischen Zellen	44
2.3. Funktionen der APP-Familie in der Zelladhäsion und mögliche Liganden	46
2.3.1. APLP1-vermittelte Zell-Zell-Kontakte	46
2.3.2. Zink vermittelte Cis- und Transinteraktionen	48
2.3.3. Zink verstärkt die Cis-Dimerisierung von APLP1 und APLP2	49
3. Diskussion	52
3.1. Analyse der Oligomerisierung der Proteine der APP-Familie in <i>P. pastoris</i>	52
3.1.1. Homodimerisierung	52
3.1.2. Analyse des APP-N-Terminus (APP18-350)	53
3.1.3. Bindungsstudien mit APP18-350	55
3.1.4. Heterodimerisierung	55
3.2. Analyse der Oligomerisierung der APP-Protein-Familie in höheren eukaryotischen Zellen	56
3.2.1. Subzelluläre Lokalisation	56
3.2.2. Charakterisierung der Kolo-kalisation der APP-Protein-Familie	57
3.2.3. Homo- und Heterodimerisierung der APP-Familie	58

3.2.4. Einfluss der Heterodimerisierung der APP-Protein-Familie auf die Prozessierung des APP	59
3.2.5. Relevanz des N-Terminus für die Homo- und Heterodimerisierung	61
3.2.6. Modelle der Homo- und Heterodimerisierung	63
3.2.7. Einfluss von Heparin und Heparansulfat auf die Dimerisierung	66
3.2.8. Homo- und Heterodimere Rezeptoren	66
3.3. Analyse der Zinkbindestelle – die APP-Familie als Zelladhäsionsproteine	67
4. Zusammenfassung	72
Summary	74
5. Material	76
5.1. Zelllinien und Nährmedien	76
5.2. Hefestämme und Nährmedien	76
5.3. Bakterienstämme	77
5.4. Plasmid-Vektoren	77
5.4.1. Klonierungsvektoren	77
5.4.2. Vektoren zur Proteinexpression in höheren eukaryotischen Zellen	77
5.4.3. Vektoren zur Proteinexpression in Hefen	78
5.5. Primer	78
5.5.1. Primer für Klonierungen in den Hefvektor pPICZ α A	78
5.5.2. Primer für die Klonierung von FLAG-, YFP- und CFP-Fusionsproteinen	78
5.5.3. Primer zur Erzeugung der Deletionsmutanten	79
5.5.4. Primer für die zielgerichtete Mutagenese	79
5.6. Erzeugte Konstrukte	79
5.7. Vorhandene Konstrukte	80
5.8. Antiseren und Antikörper	80
5.9. Allgemeine Laborchemikalien	81
5.10. Enzyme und „Kits“	81
5.11. Allgemeine Verbrauchsmaterialien	82
5.12. Puffer	82
5.13. Geräte	82
5.14. Software	83
6. Methoden	84
6.1. Molekularbiologische Methoden	84
6.1.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	84
6.1.2. Klonierungsstrategien	84
6.1.2.1. Klonierungsstrategie für die Umklonierung von pPIC9 in pPICZ α A	84
6.1.2.2. Klonierungsstrategie der APLP-Vollängenkonstrukte	85
6.1.2.3. Klonierungsstrategie der YFP/CFP/FLAG-markierten APLP-Vollängenkonstrukte	85
6.1.2.4. Klonierungsstrategie der YFP/CFP/FLAG-markierten Deletionsmutanten	86
6.1.2.5. Klonierungsstrategie nach der „Quick Change“-Methode	87
6.1.2.6. Sequenzierungen	87
6.1.3. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	88
6.1.3.1 Chemisch kompetente Zellen	88
6.1.3.2. Elektrokompente Zellen	88
6.1.4. Plasmidräparationen	89

6.1.5. DNA-Konzentrationsbestimmung	89
6.1.6. DNA-Agarosegelelektrophorese	90
6.1.7. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und von PCR-Fragmenten	90
6.2. Expression rekombinanter Proteine in <i>Pichia pastoris</i>	90
6.2.1. Kultivierung von <i>P. pastoris</i>	91
6.2.2. Herstellung von Glycerolkulturen	91
6.2.3. Herstellung elektrokompenter Hefezellen und Elektrotransformation	91
6.2.4. Proteinexpression in <i>P. pastoris</i>	92
6.3. Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus <i>P. pastoris</i>	92
6.3.1. Anionenaustauschchromatographie	92
6.3.2. Blue Sepharose	93
6.3.3. Gelpermeationschromatographie	94
6.3.4. Herstellung polyklonaler Antikörper mit gereinigten Proteinen aus <i>P. pastoris</i>	94
6.4 Kreuzvernetzung von gereinigten Proteinen aus <i>P. pastoris</i>	94
6.5. „Real-Time-Surface-Plasmon-Resonanz“- SPR- Analysen	95
6.6. Biochemische Methoden	96
6.6.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	96
6.6.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	96
6.6.3. Dot-Blot- und Western-Blot-Analyse	96
6.6.3.1. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	96
6.6.3.2. Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	97
6.6.4. Herstellung von Zellysaten	97
6.6.5. Immunpräzipitationen	98
6.6.6. MALDI-MS	99
6.7. Zellkultur	100
6.7.1. Passagieren von Zelllinien	100
6.7.2. Erzeugung stabiler Zelllinien	100
6.7.3. Transiente Transfektion	100
6.7.4. Kryogene Lagerung	100
6.7.5. ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“)	101
6.7.6. Immunfluoreszenz	101
6.7.7. Konfokale Mikroskopie und „Live-Cell-Imaging“	102
6.7.8. Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer - FRET	103
6.7.9. „Fluorescence recovery after photobleaching“- FRAP	105
6.8. Statistische Analysen	106
7. Literaturverzeichnis	107
8. Abkürzungsverzeichnis	119
9.1. Publikationsliste	121
9.2. Lebenslauf	122
9.3. Danksagung	123
9.4. Erklärung	125

1. Einleitung

1.1. Die Alzheimer Krankheit

Die Bezeichnung Demenz kommt aus dem Lateinischen und bedeutet wörtlich übersetzt „ohne Geist“. Die am häufigsten auftretende Demenzerkrankung ist die Alzheimer Krankheit. Erste Symptome zeigen sich häufig in Gedächtnis- und Wortfindungsstörungen und Veränderungen der sozialen Verhaltensweisen. Letztendlich führt diese Krankheit zum Verlust des Gedächtnisses und der Persönlichkeit. Der Arzt Alois Alzheimer (1864-1915) beschrieb 1906 auf der 37. Versammlung Südwestdeutscher Irrenärzte in Tübingen erstmals das Krankheitsbild seiner ersten, damals erst 51-jährigen Patientin Auguste Deter (Alzheimer, 1907). In Deutschland leiden gegenwärtig etwa 1,2 Millionen Menschen an einer mittelschwer bis schwer ausgeprägten Demenz (<http://www.alzheimerinfo.de/alzheimer/zahlen/>; Stand 2007). Dabei stellt das Altern den größten Risikofaktor dar. Je älter ein Mensch wird, desto höher ist das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken. In den nächsten Jahren wird der Anteil an älteren Menschen in der Bevölkerung deutlich steigen. Somit wird sich die Zahl der Demenzkranken über einen Zeitraum von 20 Jahren verdoppeln und würde damit in Deutschland schon 2030 bei über 2 Millionen liegen (Ferri et al., 2005). Neben den sporadischen Erkrankungen, die erst im hohen Alter auftreten (60-80 Jahre), erkranken weniger als 3% aller Alzheimer Patienten schon im Alter von 30-50 Jahren. In diesen Fällen, die als familiäre Alzheimerfälle („familial Alzheimer’s Disease“, FAD) bezeichnet werden, wird die verfrühte Ausprägung der Krankheitssymptome durch autosomal dominant vererbte Mutationen ausgelöst (Mullan et al., 1992; Nilsberth et al., 2001; Rogaeva et al., 2001).

Aus den Gehirnschnitten der Patientin Auguste Deter ließen sich zwei Formen neuropathologischer Ablagerungen unterscheiden: extrazelluläre amyloide Plaques sowie intrazelluläre Neurofibrillen (Alzheimer, 1907). Die amyloiden Plaques bestehen u. a. aus Amyloid- β (A β)-Peptiden und stellen ein spezifisches Merkmal der Alzheimer Krankheit dar (Glennner und Wong, 1984; Masters et al., 1985). In den Gehirnbereichen Cortex, Hippocampus und Amygdala, die besonders mit Kognition, Lernen, Gedächtnis und Gefühlsbildung verknüpft sind, sind die Ablagerungen der A β -Peptide besonders prominent (Sisodia, 1999). Die Ursache

des Gedächtnisverlustes bei der Alzheimer Krankheit ist die neuronale Degeneration. Diese setzt bereits ein, lange bevor die Plaques sichtbar werden (Schmitz et al., 2004). Neurofibrillen bestehen aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau, welches im hyperphosphorylierten Zustand zur Aggregation neigt (Goedert und Spillantini, 2006). Neurofibrillen sind nicht spezifisch für Morbus Alzheimer, da sie auch bei anderen Demenzerkrankungen auftreten können (Goedert und Spillantini, 2006).

1.2. Die APP-Gen-Familie

Eines der wichtigsten Proteine, das bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit eine Rolle spielt, ist das Amyloid Vorläufer Protein („amyloid precursor protein“, APP). APP ist Teil einer Gen-Super-Familie, zu der insgesamt 17 Gene gehören (Collin et al., 2004; Coulson et al., 2000). Das sind unter anderem die APP-homologen Gene APLP1 und APLP2 („amyloid precursor like proteins“) und die homologen Gene APPL aus *D. melanogaster* und APL-1 aus *C. elegans* (Daigle und Li, 1993; Paliga et al., 1997; Rosen et al., 1989; Slunt et al., 1994; Wasco et al., 1993a; Wasco et al., 1992; Wasco et al., 1993b). Entwicklungsgeschichtlich gesehen entstanden die Gene APPL und APL-1 vermutlich als separate Linie als Vorläufer von APP (Coulson et al., 2000). Die Linie der APP-Gen-Familie, zu der alle anderen Gene gehören, entwickelte sich wahrscheinlich durch zwei Genduplikationen (Abb. 1). Die erste Genduplikation führte zu den Linien APP und preAPLP (APLP2) (Collin et al., 2004). APLP1 spaltete sich dann in einem zweiten Genduplikations-Ereignis von APLP2 ab (Collin et al., 2004).

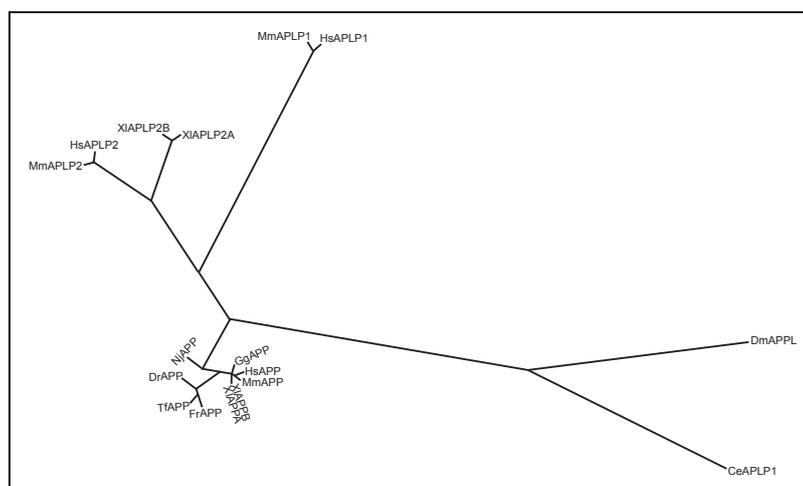


Abb. 1: Stammbaum der Gen-Superfamilie des APP verändert aus (Collin et al., 2004).

Hs: *Homo sapiens*, Mm: *Mus musculus*, Xi: *Xenopus laevis*, Gg: *Gallus gallus*, Dr: *Danio rerio* (Zebrafisch), Ce: *Caenorhabditis elegans*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Nj: *Narke japonica* („electric ray“), Fr: *Fugu rubripes*, Tf: *Tetraodon fluviatilis*.

Die Genprodukte sind Transmembranglykoproteine vom Typ I mit einer großen extrazellulären Domäne und einem kurzen zytoplasmatischen Teil. Die Proteine der humanen APP-Familie gelangen über den konstitutiv sekretorischen Weg und posttranslationale Modifikation an die Plasmamembran (Buxbaum et al., 1990; Dyrks et al., 1988; Eggert et al., 2004; Lyckman et al., 1998; Walter et al., 1997; Weidemann et al., 1989).

1.2.1. Prozessierung des APP

Die Prozessierung des APP trägt entscheidend zur Entstehung der Alzheimer Krankheit bei. Dabei können zwei Wege unterschieden werden: der amyloidogene Weg, der zur Entstehung der A β -Peptide führt, sowie der nicht-amyloidogene Weg, bei dem keine A β -Peptide entstehen (Abb. 3).

Der amyloidogene Weg wird durch die proteolytische Spaltung des APP durch die β -Sekretase eingeleitet (Abb. 2A). Dabei wird die Ektodomäne, die als sAPP β bezeichnet wird, abgespalten und in den Extrazellularraum, bzw. das Zellkulturmedium entlassen. Dieser Prozess wird auch als „ectodomain shedding“ bezeichnet (Vassar et al., 1999). Gleichzeitig bleibt das β -C-terminale Fragment, β -CTF, in der Membran verankert. Die β -Sekretase-Aktivität wird durch die Aspartat-Protease BACE1 („beta-site APP-cleaving enzyme“) vermittelt (Vassar et al., 1999). Die β -Sekretase liegt als Dimer vor und konnte in der Plasmamembran in so genannten „lipid rafts“ nachgewiesen werden (Cordy et al., 2003; Eehalt et al., 2003; Marlow et al., 2003; Schmechel et al., 2003; Westmeyer et al., 2004). Das β -CTF wird durch die γ -Sekretase weiter gespalten, wobei die Spaltung ungewöhnlicherweise innerhalb der Transmembransequenz erfolgt, was auch als „regulated intramembrane proteolysis“ (RIP) bezeichnet wird (Annaert und De Strooper, 2002; Brown et al., 2000; Struhl und Adachi, 2000). Dabei entstehen 4 kDa A β -Peptide (Abb. 2B), welche in der Länge von etwa 34 bis 42 Aminosäuren variieren können, sowie die APP intrazelluläre Domäne (AICD) (Annaert und De Strooper, 2002). Die AICD kann im Komplex mit Fe65 und der Histon-Acetyltransferase Tip60 in den Kern translozieren und dort die Transkription eines Reportergens aktivieren (Cao und Sudhof, 2004; Qi-Takahara et al., 2005). Die γ -Sekretase, die auch als Proteasom der Membran bezeichnet wird, ist ein Proteinkomplex aus den vier Transmembranproteinen PS1 oder PS2 („presenilin“), Nicastrin, Aph-1 („anterior-pharynx-defective“) und PEN-2 („presenilin enhancer protein“), welche

notwendig und hinreichend für die Spaltung des Substrates, die CTFs des APP, sind (Edbauer et al., 2003; Kopan und IJagan, 2004).

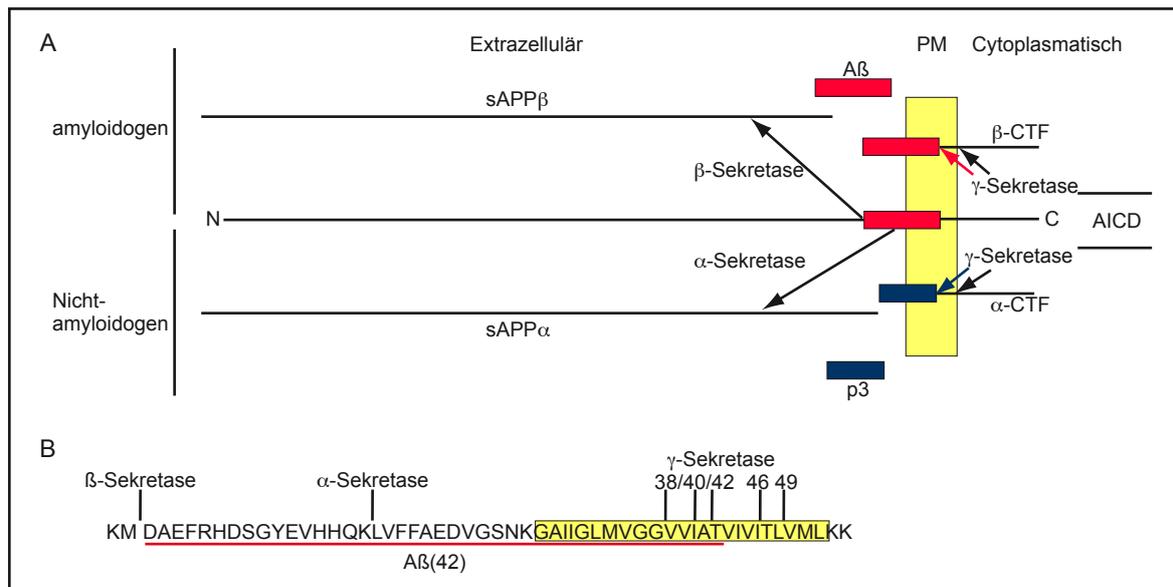


Abb. 2: Schematische Darstellung der Prozessierung von APP.

A: Die amyloidogene Prozessierung beginnt mit dem Schnitt der β -Sekretase. Das sAPP β wird in den Extrazellulärraum bzw. das Zellkulturmedium entlassen und das β -C-terminale Fragment (β -CTF) bleibt in der Plasmamembran (PM) verankert. Das β -CTF wird sequentiell von der γ -Sekretase geschnitten, daraus resultiert die APP-intrazelluläre Domäne (AICD) und A β (rot). Die nicht amyloidogene Prozessierung, die durch die α -Sekretase eingeleitet wird, führt zu dem sekretierten sAPP α und dem membranverankerten α -CTF. Nach der Prozessierung durch die γ -Sekretase wird ebenfalls AICD freigesetzt und ein kürzeres Peptid als A β , p3 (blau).

B: Sequenzauszug der A β -Region des APP. Pfeile geben die genauen Schnittstellen der Sekretasen an, rot unterstrichen ist die A β 42-Sequenz. Der gelbe Rahmen markiert den Bereich der Plasmamembran. Die γ -Sekretase schneidet innerhalb der Transmembransequenz.

Im nicht-amyloidogenen Weg erfolgt das „ectodomain shedding“ durch die α -Sekretase, was zur Freisetzung von sAPP α sowie dem membranständigen α -CTF führt. Die α -Sekretase-Aktivität geht vermutlich von mehreren Sekretasen aus, die zur Familie der Disintegrin- und Metalloproteinasen („a disintegrin and metalloproteinase“, ADAM) gehören, beispielsweise ADAM10, ADAM17 und ADAM9 (Allinson et al., 2003; Slack et al., 2001). Das α -CTF wird wie das β -CTF durch die γ -Sekretase abgebaut. Da die Prozessierung der α -Sekretase innerhalb der A β -Sequenz erfolgt, wird ein kleineres, 3 kDa Peptid (p3) generiert (Haass et al., 1993). C-terminal wird ebenfalls die AICD abgespalten.

Das „ectodomain shedding“ des APP wird wechselseitig durch die α - und β -Sekretase beeinflusst. Durch die Stimulation der einen Sekretase-Aktivität wird die entsprechend andere heruntergesetzt (Vassar et al., 1999). Dabei werden normalerweise zwei Drittel des gesamten APP durch die α -Sekretase abgebaut (Selkoe, 2004).

Die u. a. aus dem γ -Sekretase-Schnitt entstehenden A β -Peptide A β 40 und A β 42 können sich im wässrigen Milieu von einer α -helikalen Struktur sehr schnell in eine β -Faltblattstruktur umlagern (Schmechel et al., 2003; Xu et al., 2005). Da die Kerne der amyloiden Plaques hauptsächlich aus A β 42 bestehen, werden sie als die toxische Spezies bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit angesehen (Pike et al., 1995; Younkin, 1998). Die heute gültige Amyloid-Hypothese geht davon aus, dass die Toxizität schon durch lösliche Oligomere des A β 42-Peptids ausgelöst wird (Haass und Selkoe, 2007).

1.2.2. Prozessierung der APLPs

Die APLPs werden ähnlich wie APP prozessiert (Eggert et al., 2004). Das „ectodomain shedding“ von APLP2 erfolgt *in vivo* und *in vitro* von ADAM10 und ADAM17 sowie von BACE1 (Eggert et al., 2004; Endres et al., 2005; Pastorino et al., 2004). Die Ektodomäne von APLP1 kann *in vitro* von der α - und β -Sekretase geschnitten werden, hingegen findet vermutlich *in vivo* nur die Prozessierung durch eine α -Sekretase-Aktivität statt (Eggert et al., 2004; Fadeeva et al., 2004; Li und Sudhof, 2004). Die nach der Entfernung der Ektodomäne verbleibenden C-terminalen Fragmente von APLP1 und APLP2 werden durch den γ -Sekretase-Komplex abgebaut (Eggert et al., 2004; Gu et al., 2001). Die dabei entstehenden intrazellulären Domänen oder ALICDs („APP like intracellular domains“) können wie APP im Komplex mit Fe65 und Tip60 die Transkription von Reportergenen aktivieren (Li und Sudhof, 2004; Scheinfeld et al., 2002; Walsh et al., 2003). Dabei entstehen auch kleinere A β -ähnliche Peptide (Eggert et al., 2004). Diese unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz deutlich von A β und neigen nicht zur Aggregation (Minogue et al., 2006).

1.2.3. Funktionen des APP

Obwohl das auf Chromosom 21 lokalisierte APP-Gen schon vor 20 Jahren zum ersten Mal kloniert wurde (Goldgaber et al., 1987; Kang et al., 1987), sind weder die Struktur noch die Funktionen bis heute vollständig aufgeklärt. APP wird ubiquitär exprimiert, wobei die höchsten Genexpressionen in Hirn, Niere, Herz und Milz nachgewiesen werden konnten (Tanzi et al., 1988). Allerdings wurden auch gewebsspezifische Expressionsunterschiede alternativer

Spleißvarianten deutlich. Von APP sind 9 alternative Spleißformen bekannt, welche durch das Spleißen der Exons 2, 7, 8 und 15 entstehen (Tang et al., 2003). Die Benennung der Isoformen erfolgt nach der Anzahl der Aminosäuren der entsprechenden Genprodukte. Dabei können zwei wichtige Hauptgruppen unterschieden werden. Zur ersten Hauptgruppe gehören das APP770 und seine Spleißform APP751, die im Gehirn und peripheren Organen exprimiert werden sowie APP695, welches ausschließlich im Gehirn exprimiert wird und im Gegensatz zu APP770 und APP751 keine Kunitz-Protease-Inhibitor-Domäne (KPI) besitzt (Kang und Muller-Hill, 1990; Shioi et al., 1995). Zur zweiten Hauptgruppe gehören die L-APP-Isoformen, die durch eine Chondroitin-Sulfat-Glykosaminoglykan-Kette modifiziert sind und als Appicane bezeichnet werden. (Pangalos et al., 1995; Shioi et al., 1995). Die Ektodomänen aller Isoformen enthalten eine Kupfer- und Zinkbindestelle (Bush et al., 1993; Multhaup et al., 1996). Neben der Fähigkeit Metallionen zu binden, geben unter anderem die Bindestellen für Heparin (mit niedriger Affinität die Aminosäuren 96-110 sowie mit hoher Affinität die Aminosäuren 523-540) und Kollagen Hinweise auf Funktionen des APP in der Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktion (Behr et al., 1996; Breen et al., 1991; Chen und Yankner, 1991; Multhaup, 1994; Schubert et al., 1989; Siemes et al., 2006; Small et al., 1994; Soba et al., 2005). Interessanterweise wird die Bindung von Heparin durch die Zugabe von Zink verstärkt (Multhaup et al., 1994; Multhaup et al., 1995). Auch die Bindung von Kollagen-Typ I lässt sich durch Kupfer und Zink sowie Heparin kompetitiv beeinflussen (Behr et al., 1996). Schon im Jahr 1987 wurde anhand der Primärstruktur postuliert, dass APP Funktionen als Zelloberflächenrezeptor ausüben könnte (Kang et al., 1987). Es konnte auch eine Aktivierung des GTP-bindenden Proteins GO gezeigt werden (Nishimoto et al., 1993; Okamoto et al., 1995). Die Cystein-reiche N-terminale Domäne des APP aktiviert bei korrekter Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücken die MAP-Kinase (Greenberg et al., 1995). Der N-terminalen Heparinbindestelle wurde außerdem eine Stimulation des Neuritenwachstums zugeschrieben (Small et al., 1994).

1.2.4. Funktionen der APLPs

In einem Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen APP-Protein-Familie mit *D. melanogaster* APPL und *C. elegans* APL-1 wird deutlich, dass es drei größere konservierte Bereiche gibt: den N-Terminus, die zentrale APP-Domäne und den zytoplasmatischen Teil.

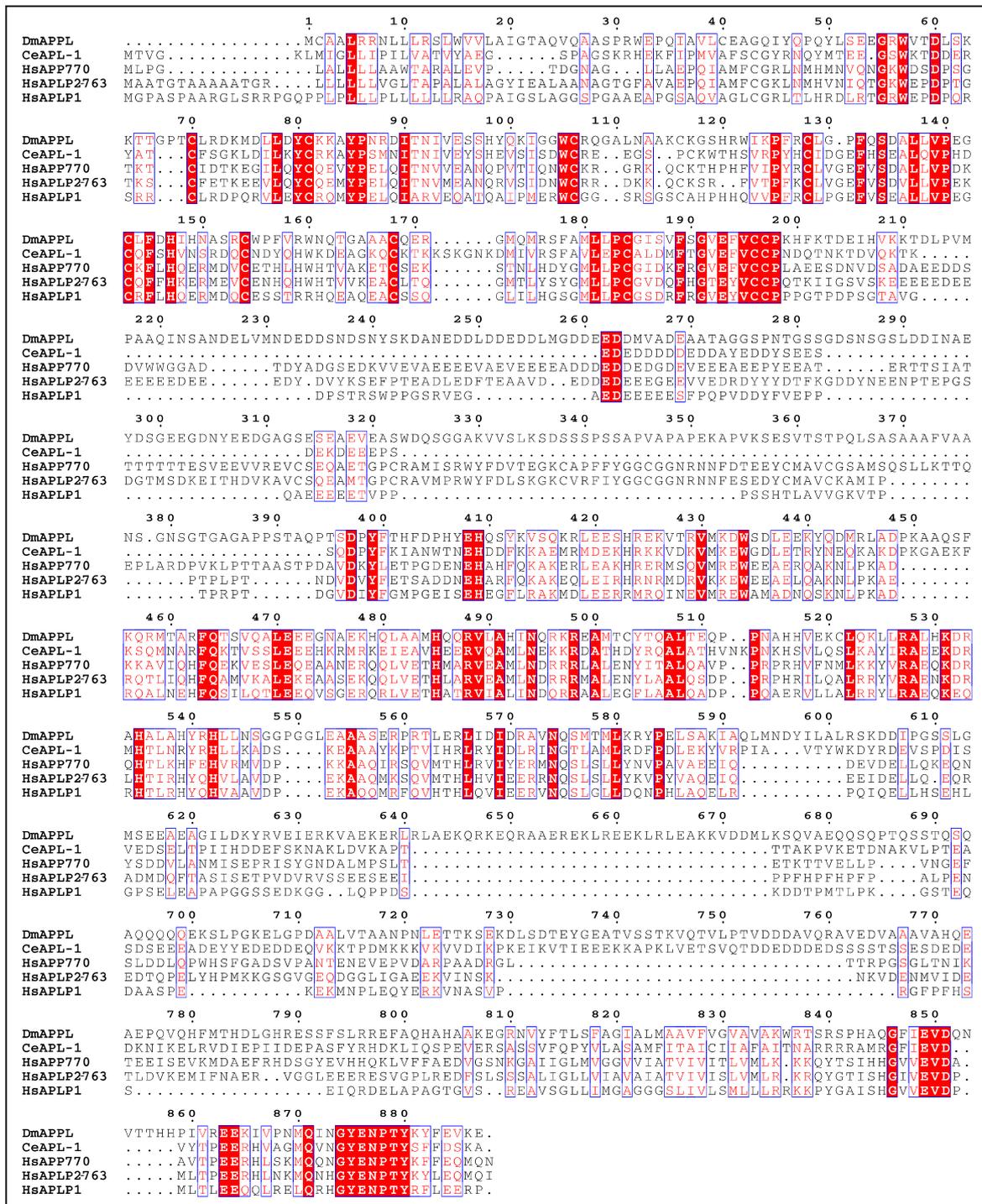


Abb. 3: Aminosäuren-Sequenzvergleich der humanen APP-Protein-Familie (APP770, APLP2763 und APLP1) mit *D. melanogaster* APPL und *C. elegans* APL-1. Konservierte Aminosäuren sind in roten Blöcken, konservativ ausgetauschte Aminosäuren in roter Schrift markiert. Die Nummerierung bezieht sich auf DmAPPL.

Wie aus dem Aminosäurevergleich (Abb. 3) deutlich wird, gibt es in der APP-Familie drei konservierte Bereiche. Innerhalb dieser Bereiche befinden sich funktionelle Domänen, die in Abbildung 4 dargestellt sind. Dazu gehören im C-Terminus die zytoplasmatische Domäne mit der Konsensussequenz „NPXY“ für die Clathrin-vermittelte Internalisierung, in der zentralen APP-Domäne die Kollagen- und die Heparinbindestelle und im N-Terminus die Zinkbindestelle. Ähnlich wie bei APP kann Zink auch die Bindung von Heparin an die APLPs verstärken

(Bush et al., 1994). Die A β -Region ist einzig in APP vorhanden, dieser Bereich ist in der APP-Familie nicht konserviert. Interessanterweise besitzt APLP1 weder eine KPI-Domäne noch die Konsensussequenz für die Kupferbindung (Simons et al., 2002). Die Kupferbindestelle von APP und APLP2 bewirkt, dass beide Proteine am Kupferexport beteiligt sind und möglicherweise die Kupferhomöostase regulieren (Treiber et al., 2004). Die N-terminale Heparinbindestelle befindet sich ebenso nur in APP und APLP2 und ist in APLP1 nicht vorhanden.

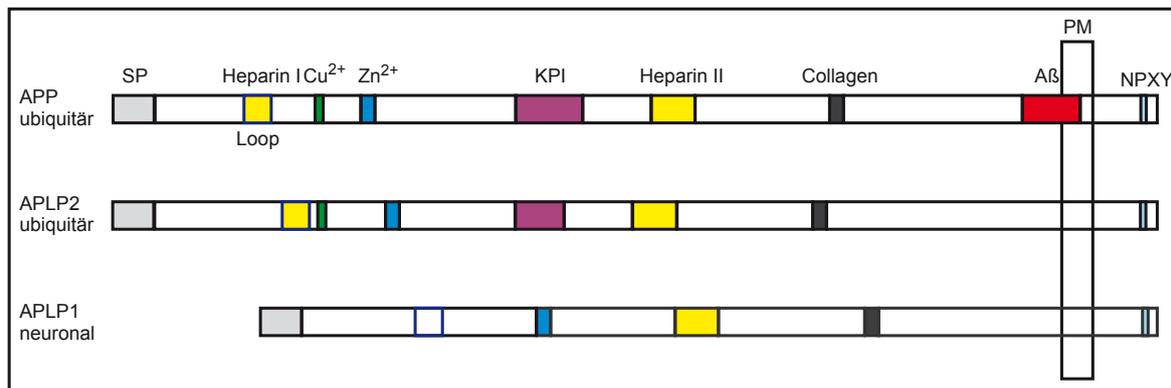


Abb. 4: Funktionelle Domänen der APP-Familie.

Signalpeptid (SP): grau, Heparinbindestellen I+II: gelb, Loop-Region: dunkelblau umrandet, Cu²⁺-Bindestelle: grün, Zn²⁺-Bindestelle: blau, Kunitz-Protease-Inhibitor-Domäne (KPI): violett, Kollagenbindestelle: schwarz; A β : rot; Konsensussequenz für Clathrin-vermittelte Internalisierung (NPXY): cyan. APP und APLP2 werden ubiquitär, APLP1 hauptsächlich neuronal exprimiert.

Hinsichtlich der Funktionen, unterscheidet sich das evolutionär jüngste Protein der APP-Familie, APLP1, teilweise deutlich von APP und APLP2. Im Gegensatz zu APP unterliegen die 17 Exons des auf Chromosom 19 lokalisierten APLP1 keinem alternativen Spleißen (Lenkkeri et al., 1998; Wasco et al., 1993a; Zhong et al., 1996). APLP1 kann sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen nachgewiesen werden und wird ausschließlich im zentralen Nervensystem exprimiert (Bayer et al., 1997). Es findet sich in der postsynaptischen Dichte („post-synaptic density“; PSD) von Neuronen des cerebralen Cortex, Hippocampus und des Riechkolbens und ist vermutlich an der Reifung der Synapsen in der corticalen Entwicklung beteiligt (Kim et al., 1995).

Das auf Chromosom 11 lokalisierte APLP2 wird wie APP ubiquitär in allen Geweben exprimiert (Leach et al., 1999; Thinakaran et al., 1995). Durch alternatives Spleißen können vier Isoformen unterschieden werden (Sandbrink et al., 1994). Im Gegensatz zu APP werden im Gehirn besonders die APLP2-Isoformen mit KPI-Domäne exprimiert (Sandbrink et al., 1994). In Astrozyten dominieren die den Appicanen ähnlichen L-APLP2-Isosformen (Sandbrink et al.,

1994). Vergleichbar zu APLP1 konnte auch APLP2 in der PSD von Neuronen des Cortex und Hippocampus detektiert werden und übt möglicherweise Funktionen in der Synapsenbildung und der axonalen Zielsteuerung aus (Thinakaran et al., 1995).

Mauslinien, in denen eines der APP-Familienmitglieder funktionell ausgeschaltet wurde (Einzel-KO, „Knock-Out“), waren phänotypisch unauffällig (Heber et al., 2000; von Koch et al., 1997; Zheng et al., 1995). In Doppel-KO-Linien wurde deutlich, dass APLP2 eine Sonderstellung in der APP-Familie einnimmt, da Mauslinien, bei denen APP bzw. APLP1 in Kombination mit APLP2 ausgeschaltet wurden, perinatal letal sind (Heber et al., 2000). Die APP/APLP1-Doppel-KO-Mäuse hingegen waren lebensfähig (Heber et al., 2000). Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass die Proteine der APP-Familie teilweise redundante Funktionen besitzen (Heber et al., 2000). Interessanterweise verändern die KO-Linien weder die Stärke der Expression noch das Expressionsmuster der verbleibenden Familienmitglieder (Heber et al., 2000). Aus den KO-Linien konnten den Mitgliedern der APP-Protein-Familie Funktionen in der postnatalen neuronalen Entwicklung, dem Neuriten- und Axonwachstum, der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion sowie der Signaltransduktion in den Zellkern zugeordnet werden (Herms et al., 2004; Wang et al., 2005).

1.2.5. Struktur des APP

Bei den bisher beschriebenen Funktionen der APP-Protein-Familie verwundert es kaum, dass die Proteine eine homologe Domänenstruktur besitzen. Strukturen von Teilen des APP konnten bisher mit Hilfe von Röntgenstrahlen und NMR („nuclear magnetic resonance“) bestimmt werden (Barnham et al., 2003; Dulubova et al., 2004; Kong et al., 2007; Rossjohn et al., 1999; Wang und Ha, 2004).

Die in Abbildung 5A dargestellte Röntgenkristallstruktur der Wachstumsfaktor-ähnlichen Domäne (GFLD, „growth factor like domain“) umfasst die Aminosäuren 28-123 und zeigt eine stark geladene, basische Oberfläche. Dieser Bereich könnte mit Glykosaminoglykanen der extrazellulären Matrix des Gehirns interagieren (Rossjohn et al., 1999). Des Weiteren gibt es eine hydrophobe Oberfläche, die eine wichtige Rolle in der Ligandenbindung spielen könnte. Es

wurde postuliert, dass durch den hoch flexiblen und oberflächenexponierten „Loop“ (gebildet durch die Disulfidbrücke der Cysteine 98 und 105; Abb. 5A gelb markiert) möglicherweise eine Dimerisierung vermittelt werden könnte (Rossjohn et al., 1999).

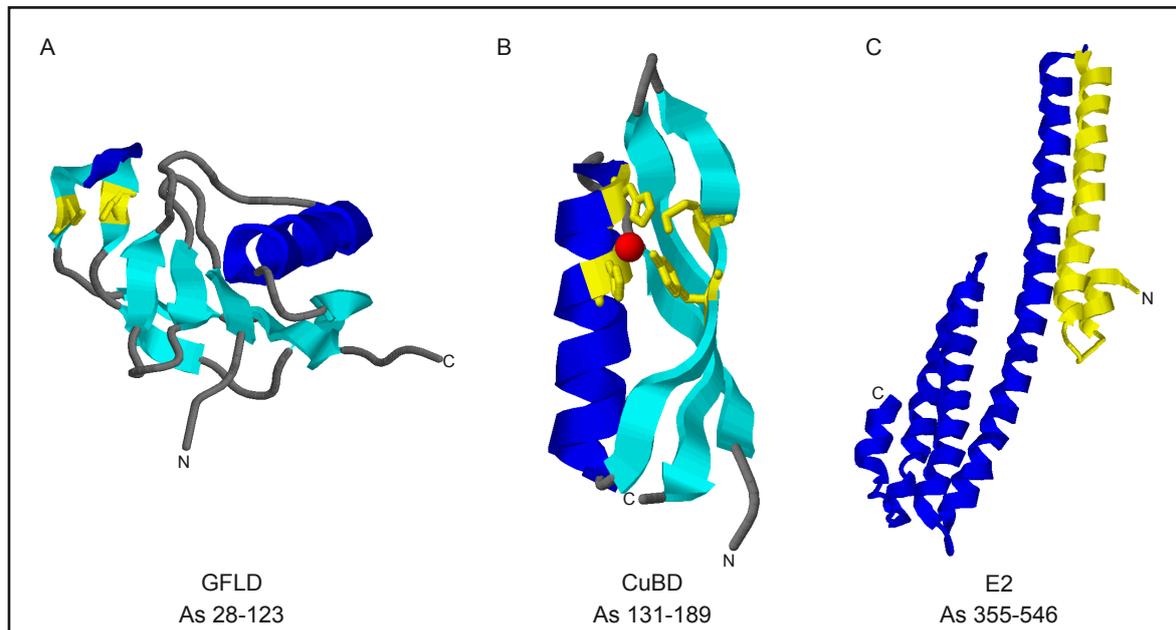


Abb. 5: Bekannte Strukturen der APP-Ektodomäne

Röntgenstrukturdaten von A (pdb: 1MWP): GFLD: „growth factor like domain“ (Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne), B (pdb: 2FK1) CuBD: Kupferbindedomäne; C (pdb:1RW6): E2-Domäne wurden mit RasWin visualisiert. α -helicale Bereiche sind in blau, β -Faltblätter in cyan dargestellt. A: gelb: Cys-Reste 98 und 105 die eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden B: gelb: His-147, His-151, Tyr-168, Met-170 koordinieren Cu(I) (rot) in tetrahedraler Orientierung C: gelb: α -helicaler Bereich der eine N-terminale Substruktur bildet.

Die Kupferbindedomäne des APP (Aminosäuren 127-188 bzw. 124-189), wurde mittels NMR und EPR-Spektroskopie („electron paramagnetic resonance“) sowie röntgenstrukturanalytisch untersucht. Die Röntgenkristallstruktur ist in Abbildung 5B gezeigt. Sie besteht aus einer α -Helix, die dicht gepackt an einem dreisträngigen β -Faltblatt orientiert ist (Barnham et al., 2003; Kong et al., 2007). Dabei besteht die stark geladene Oberfläche aus Bereichen positiv und negativ geladener Aminosäuren (Barnham et al., 2003). Schon 1996 konnte gezeigt werden, dass an der Kupferbindestelle Cu(II) zu Cu(I) reduziert werden kann, was zur Oxidation der Cysteine 144/158 und damit zur Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken im APP führt (Multhaup et al., 1998; Multhaup et al., 1996). Dies konnte mit den Strukturdaten bestätigt werden, die ein Intermediat aus einer quadratisch planaren Koordination für Cu(II) und einer tetrahedralen Koordination von Cu(I) vorschlagen, wie in Abbildung 5B dargestellt (Barnham et al., 2003; Kong et al., 2007).

Die zentrale APP-Domäne (wird im Weiteren als E2 bezeichnet) stellt mit 200 Aminosäuren (Aminosäuren 365-570) den längsten Bereich mit hoher Sequenzidentität innerhalb der APP-Familie dar. Die E2-Domäne besteht aus insgesamt sechs α -Helices (Wang und Ha, 2004). Dabei bilden die beiden N-terminalen Helices eine Substruktur (Abb. 5C, gelb). Ein antiparalleles Dimer bildet sich über eine Anlagerung der N-terminalen, doppelsträngig ineinander gewundenen Helixstruktur („coiled coil“) des einen Monomers an die C-terminale dreisträngige „coiled coil“ Struktur des zweiten Monomers (Wang und Ha, 2004).

Bis heute steht die Oligomerisierung des APP im Mittelpunkt kontroverser Diskussionen. In drei verschiedenen Arbeiten wurde die Homodimerisierung des membranständigen APP gezeigt (Munter et al., 2007; Scheuermann et al., 2001; Soba et al., 2005). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die Dimerisierung des APP auch die Prozessierung beeinflussen kann (Munter et al., 2007; Scheuermann et al., 2001). Eine dimere Konformation in Lösung konnte für die N-terminale Domäne (APP18-350), die APP-E2-Domäne und für ein rekombinantes Protein mit den Aminosäuren 191-680 (der APP751-Isoform) gezeigt werden (Scheuermann et al., 2001; Wang und Ha, 2004). Im Gegensatz dazu wurden eine N-terminal verkürzte E2-Domäne sowie die gesamte APP-Ektodomäne ausschließlich in monomerer Form beobachtet (Dulubova et al., 2004; Gralle und Ferreira, 2007; Gralle et al., 2006). Dabei wurde postuliert, dass sich die APP-Ektodomäne eher wie ein elongiertes als ein sphärisches Molekül verhält, da es einen sehr hohen Stokes-Radius aufweist (Botelho et al., 2003; Gralle et al., 2002).

1.3. Liganden der APP-Familie

Wie in Kapitel 1.2.3. beschrieben gibt es Hinweise darauf, dass APP möglicherweise Rezeptorfunktionen besitzt. Bisher konnte allerdings noch kein Ligand zugeordnet werden, der auf eine definierte Funktion als Rezeptor hindeutet. Einen Hinweis auf eine mögliche Ligandenbindestelle im APP gab die Stimulation der Go-Aktivierung durch den N-terminalen Antikörper 22C11 (22C11, Epitop: APP, Aminosäuren 66-81) in rekonstituierten Phospholipidvesikeln (Okamoto et al., 1995). Im Gegensatz dazu, führte der 22C11-Antikörper in neuronalen Mikrodomänen zu einer verringerten GTPase-Aktivität (Brouillet et al., 1999).

Eine weitere Ligandenbindestelle oder Modulator der Ligandenbindung in der APP-Familie

könnte die hoch-konservierte Zinkbindestelle im N-Terminus sein. Bisher ist nur bekannt, dass Zink die Heparinbindung der APP-Familie positiv modulieren kann und so möglicherweise an der Struktur des APP und der Interaktion mit der extrazellulären Matrix beteiligt ist (Bush et al., 1993; Bush et al., 1994). Des Weiteren konnte durch Zugabe von Heparin zu rekombinanter, gereinigter APP-Ektodomäne, die Homodimerisierung vermittelt werden. Dadurch stellen die Heparinbindestellen des APP auch mögliche Modulatoren für eine Ligandenbindung oder Dimerisierung dar (Gralle et al., 2006). Zweiwertige Metallionen wie Zn(II), Co(II) und Cd(II) führten *in vitro* zur Dimerisierung eines Peptides, das den Aminosäuren 170-188 des APP und somit der hoch-konservierten Zinkbindestelle entspricht (Ciuculescu et al., 2005).

Neben den N-terminalen Zink- und Kupferbindestellen können in der A β -Region ebenfalls Zink- und Kupferionen gebunden werden. Allerdings erfolgt die Bindung erst nach der Freisetzung der A β -Peptide. Die Interaktion von Zink und Kupfer mit A β führt *in vivo* zu einer verstärkten Aggregation (Atwood et al., 1998; Atwood et al., 2000; Brown et al., 1997). In Gehirnen von Alzheimer Patienten wurden erhöhte corticale Zink-Level gemessen, die mit den A β -Ablagerungen und den kognitiven Leistungen („clinical dementia rate“) korrelierten (Religa et al., 2006). Die Wirkung zweiwertiger Metallionen wie Zink und Kupfer bei der Alzheimer Krankheit ist, ähnlich wie die Dimerisierung, eine kontrovers diskutierte Thematik.

1.4. Zielsetzung

Aufgrund bisher vorliegender Ergebnisse war anzunehmen, dass sowohl das membranständige APP als auch Teile der Ektodomäne dimerisieren können. Um diese Theorien beweisen und die interagierenden Domänen identifizieren zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Homo- und Heterodimerisierung von APP und den homologen APLPs in zwei verschiedenen eukaryotischen Systemen *in vitro* und in Zellkulturen untersucht werden. Als Erstes sollten in der Hefe *P. pastoris* die löslichen Ektodomänen der APP-Familie aufgereinigt und hinsichtlich der Oligomerisierung analysiert werden. Mit den gereinigten, rekombinanten Proteinen sollten Antikörper gegen spezifische Domänen hergestellt und Bindungsstudien durchgeführt werden. Zweitens sollte die Lokalisation, Homo- und Heterodimerisierung der Vollängen-Varianten der humanen APP-Familie in Zellkulturen (HEK293) charakterisiert werden. Zusätzlich sollten Deletionsmutanten erzeugt werden, um eine mögliche Beteiligung der unabhängigen Faltungseinheiten für die Homo- und Heterodimerisierung in den lebenden Zellen aufzuklären.

Für APP wurden mögliche Rezeptorfunktionen beschrieben. Bisher wurde allerdings kein Ligand gefunden, der eine Rezeptorfunktion vermitteln könnte. Des Weiteren wurden der APP-Familie Funktionen in der Zell-Adhäsion zugeschrieben. Die Bindung von Zink, Heparin und Kupfer in der APP-Ektodomäne könnte einen Einfluss auf die Konformation des APP und somit eine mögliche Ligandenbindung haben. Ferner könnte dies auch zu einer Veränderung der Zelladhäsionseigenschaften der APP-Familie führen. Im zweiten Teil der Arbeit sollten daher diese Bindestellen, die in der APP-Familie konserviert sind, auf funktioneller Ebene genauer untersucht werden. Es sollte gezeigt werden, wie Metallionen wie Zink und Kupfer die Lokalisation, Konformation und möglicherweise die Funktionen der APP-Familie beeinflussen.

2. Ergebnisse

2.1. Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *Pichia pastoris*

Aus der methylotrophen Hefe *P. pastoris* sollten die löslichen Ektodomänen sAPP770 α , sAPLP1 α und sAPLP2 α sowie eine verkürzte Form der APP-Ektodomäne (APP18-350) aufgereinigt und die Oligomerisierungseigenschaften untersucht werden. Mit den rekombinant hergestellten Proteinen sollten Bindungsstudien durchgeführt und Antikörper generiert werden.

Das gewählte Expressionssystem eignet sich besonders für die Expression löslicher Proteine, da *P. pastoris* selbst keine Proteine sekretiert. Dazu wird das heterolog zu exprimierende Protein mit dem α -Faktor pre-pro-Peptid aus *Saccharomyces cerevisiae* kombiniert. Die Expression erfolgt über den Alkoholoxidasepromotor (AOX), der durch Methanol induzierbar ist. Die Aufreinigung wurde typischerweise in zwei Schritten durchgeführt. Dabei erfolgte im ersten Schritt eine Aufkonzentration aus dem Kulturüberstand, im zweiten Schritt eine Trennung nach der Größe der Proteine. APP und APLP2 wurden zuerst auf einer Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose) aufkonzentriert. Da APLP1 nicht an die Q-Sepharose gebunden hatte, wurde Blue Sepharose verwendet. Blue Sepharose wird zur Aufreinigung einer Vielzahl von Proteinen verwendet, wobei die genauen Bindungseigenschaften nicht bekannt sind. Im zweiten Aufreinigungsschritt wurden die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, mittels eines Amicon-Filters aufkonzentriert und in einer Gelpermeationschromatographie aufgetrennt.

2.1.1. Analyse der löslichen Ektodomänen der APP-Familie in *P. pastoris*

Mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie wurden die Oligomerisierungseigenschaften der rekombinanten Proteine analysiert. In Western Blots mit proteinspezifischen Antikörpern wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen die Fraktionen ermittelt, die das gewünschte Protein enthielten. Über das Elutionsvolumen und eine Eichgerade wurden die nativen Molekulargewichte berechnet.

So konnte eine Aussage über die Homodimerisierung bzw. Oligomerisierung getroffen werden.

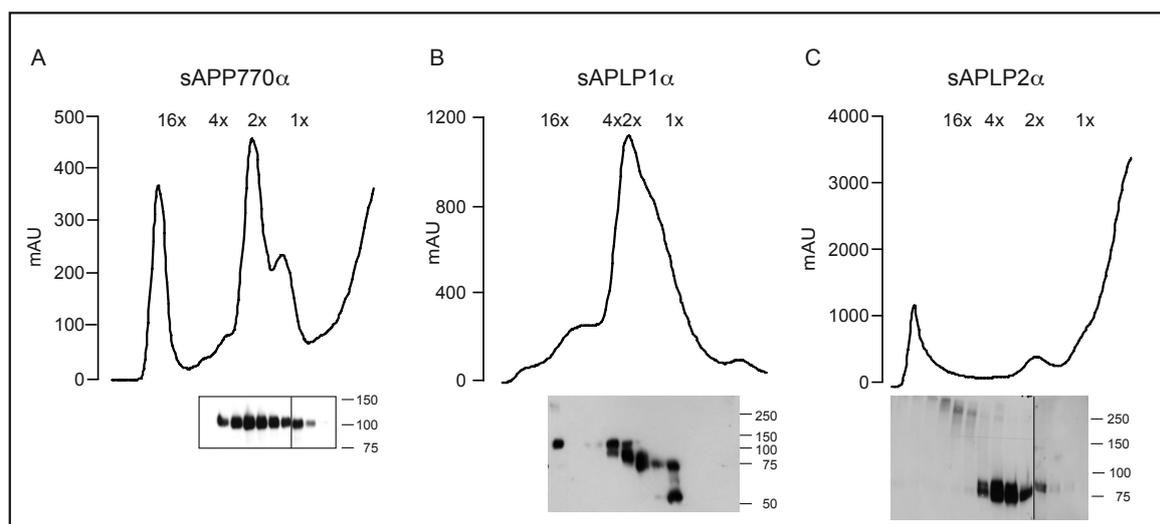


Abb. 6: Untersuchung der Oligomerisierung der APP-Familie mittels Gelpermeationschromatographie.

Chromatogramme von sAPP770 α (A), sAPLP1 α (B) und sAPLP2 α (C). Der Kurvenverlauf wurde nur vom Ausschlusspeak bis zum Beginn des Salzpeaks dargestellt. Die nativen Molekulargewichte wurden mittels einer Eichgeraden berechnet. Die in den Western Blots gezeigten Fraktionen entsprechen in ihren Positionen den Chromatogrammen. Die Auftrennung erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen. Detektionsantikörper: W0-2 für APP (A), 42464 für APLP1 (B) und 42476 für APLP2 (C). Durch Senkrechte Linien wurden Bereiche unterschiedlicher Belichtungszeiten markiert. mAU: mili-Absorptionseinheit. 16x: 16mer, 4x: Tetramer, 2x: Dimer, 1x: Monomer.

In Abb. 6 sind die Ergebnisse der Analysen zusammengefasst. Bei der Chromatographie von sAPP770 α ließen sich Dimere und Monomere unterscheiden, wobei der Anteil an Monomeren bei etwa 25% lag (Abb. 6A). Bei der Größenausschlusschromatographie von sAPLP1 α wurden 5-10% Oligomere (16mere), 50-60% Tetramere und Dimere sowie 20-30% Monomere erhalten (Abb. 6B). Interessanterweise konnte bei der sAPLP2 α -Aufreinigung kein Monomer detektiert werden. Es wurden etwa 50% Tetramere und 50% Dimere detektiert (Abb. 6C). Folglich bilden die löslichen Ektodomänen der APP-Familie Dimere, Tetramere und höhere Oligomere aus.

2.1.2. Analyse des N-Terminus von APP (APP18-350)

Wie schon in der Einleitung beschrieben unterteilt sich die Ektodomäne von APP in unabhängige Faltungseinheiten. Hier sollte der N-terminale Bereich des APP genauer untersucht werden (Abb. 7B). Dieser setzt sich zusammen aus der GFLD, der CuBD, einem flexiblen sauren Bereich (AcD) sowie der Kunitz-Protease-Inhibitor Domäne (KPI). Die Expression und Aufreinigung aus *P. pastoris* erfolgte wie bereits in Kapitel 2.1. beschrieben. Um auch die höheren Oligomere zu detektieren, wurde die Säule überladen, so dass der Höchstwert des Dimers das Maximum der Absorption überschreitet. Die erhaltenen Fraktionen wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abb. 7A). Unter den nativen

Bedingungen der Gelpermeationschromatographie wurden etwa 80% Dimere und 20% Tetramere, Oktamere und höhere Oligomere aufgereinigt. Interessanterweise konnten nach der Auftrennung im denaturierenden Polyacrylamidgel SDS-stabile von SDS-labilen Dimeren unterschieden werden. Das APP18-350-WT, welches beim apparenten Molekulargewicht des Dimers eluierte, war im SDS-Gel hauptsächlich SDS-labil, wohingegen Tetramere und Oktamere in SDS-stabile Dimere und höhere Oligomere in Tetramere und Dimere zerlegt wurden (Abb. 7A).

Folglich kann die Dimerisierung des APP schon durch den N-Terminus (Aminosäuren 18-350) erfolgen.

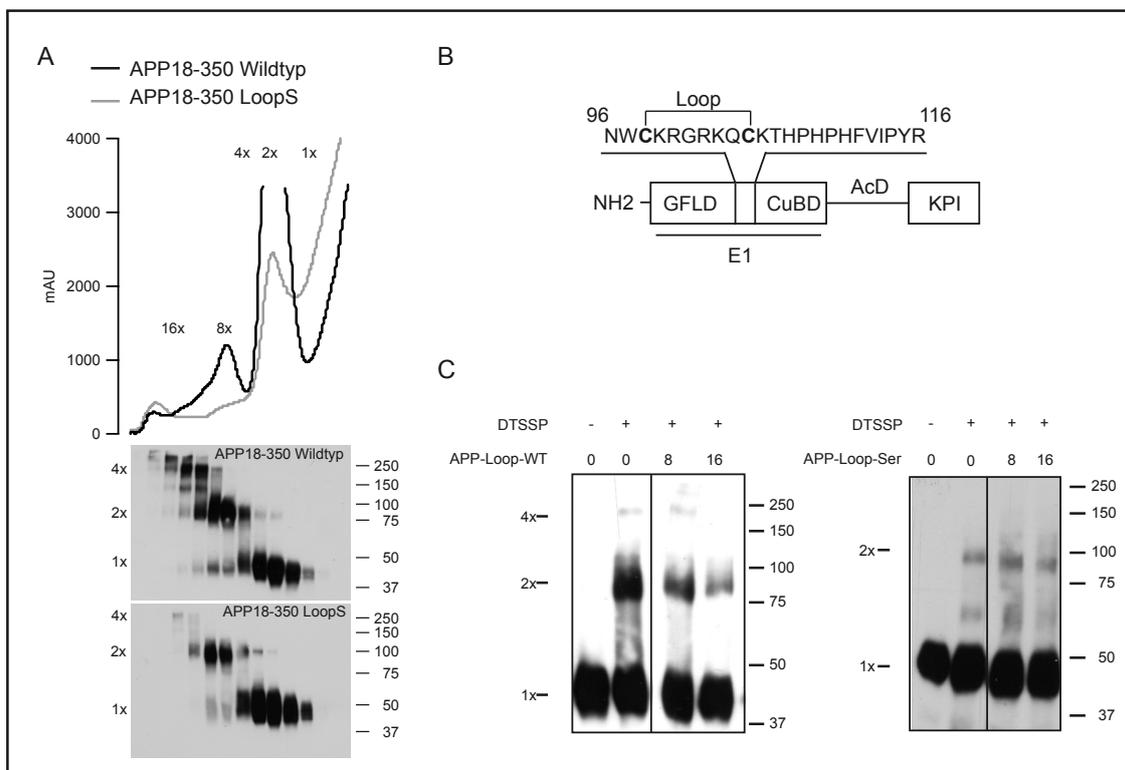


Abb. 7: Analyse der Dimerisierung der N-terminalen Domäne des APP.

A: Chromatogramme der Gelpermeationschromatographien von APP18-350 WT (schwarze Linie) und APP18-350 Loop-Ser (graue Linie). Nachweis des APP18-350 in den Fraktionen erfolgte im Western Blot unter nicht reduzierenden Bedingungen mit dem Antikörper 22C11. Bestimmung der nativen Molekulargewichte erfolgte mittels einer Eichgeraden. 16x: 16mer, 8x: Oktamer, 4x: Tetramer, 2x: Dimer, 1x: Monomer, mAU: mili-Absorptionseinheit.

B: Schematische Darstellung von APP18-350-WT mit den unabhängigen Faltungseinheiten GFLD: Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne, CuBD: Kupferbindedomäne, E1: GFLD und CuBD, AcD: saure Domäne, KPI: Kunitz-Protease-Inhibitor-domäne. Die Loop-Sequenz wurde hervorgehoben. In der APP18-350-Loop-Ser Mutante wurden beide Cystein-Reste der Loop-Sequenz durch Serin-Reste ersetzt.

C: Inkubation von APP18-350 WT-Dimer mit PBS (0) oder APP-Loop-WT (links) oder APP-Loop-Ser (rechts) Peptid im molaren Überschuss (8, 16) und mit (+) oder ohne (-) dem bimolekularen Kreuzvernetzer DTSSP. Die Senkrechte Linie deutet an, dass die Reihenfolge der Spuren zur besseren Darstellung verändert wurde. Die Detektion erfolgte mit dem 22C11-Antikörper.

2.1.2.1. Inhibition der Dimerisierung von APP18-350-WT

Die Cystein-Reste 98 und 105 des APP bilden eine Disulfidbrücke aus, die zur Oberflächenexposition positiv geladener Aminosäuren sowie einer hohen Flexibilität dieses

Bereichs führt (Rossjohn et al., 1999). Die positiv geladenen Aminosäuren in diesem „Loop“ vermitteln die Bindung an Heparin (Small et al., 1994). Es sollte nun untersucht werden, ob der „Loop“ eine mögliche Interaktionsstelle für die Dimerisierung darstellt. Initial wurde dazu Aufgereinigtes APP18-350 über den bimolekularen Kreuzvernetzer DTSSP kovalent verbunden. Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnten so ca. 20% der SDS-labilen Dimere (90 kDa) sichtbar gemacht werden (Abb. 7C, Spur DTSSP +, Loop-WT 0). Durch die Zugabe eines Peptides, welches die „Loop“-Region darstellt (APP-Loop-WT-Peptid) wurde mit einem 8- und 16-fach Molaren Überschuss, die Bildung der kreuzvernetzten Dimere konzentrationsabhängig inhibiert (Abb. 7C links, Spur DTSSP +, APP-Loop-WT 8, 16). Mit dem Kontrollpeptid APP-Loop-Ser, welches die Disulfidbrücke nicht enthält, konnte die Dimerbildung nicht inhibiert werden (Abb. 7C rechts). Das Experiment zeigt, dass das APP-Loop-WT-Peptid die Dimerisierung von APP18-350-WT inhibiert.

Bei Zugabe höherer Mengen an APP-Loop-WT-Peptid und auch des Kontrollpeptids kam es jedoch zu einer Präzipitation des APP18-350, was vermutlich durch eine Interaktion der positiv geladenen Aminosäuren mit dem sauren Bereich des APP oder durch die Exposition hydrophober Aminosäurereste zustande kam.

2.1.2.2. Einfluss der „Loop“-Region auf die APP18-350 Dimerisierung

Wegen der Inhibition der APP18-350-WT-Dimerisierung durch das APP-Loop-WT-Peptid stellte sich die Frage, ob die Cys-Reste dafür verantwortlich sind. Es erfolgte ein Austausch der Cys-Reste 98 und 105 gegen Ser-Reste im APP18-350. Die Aufreinigung, des als APP18-350-Loop-Ser bezeichneten Proteins, erfolgte wie in Kapitel 2.1. beschrieben. Im Chromatogramm der Gelpermeationschromatographie sowie im anschließenden Western Blot konnten keine Unterschiede zum APP18-350-WT festgestellt werden (Abb. 7A). Folglich sind neben den Cys-Resten der „Loop“-Region noch weitere Bereiche des APP18-350 an der Dimerisierung beteiligt (siehe dazu Kapitel 2.1.2.1. und Diskussion 3.1.2.).

2.1.2.3. Bindungsstudien verschiedener „Loop“-Peptide an APP18-350

Mittels „Surface Plasmon Resonance“-Analysen (SPR) kann man mit gereinigten Proteinen,

die kovalent an eine beschichtete Goldoberfläche gekoppelt werden (Liganden), direkte Interaktionen mit verschiedenen Peptiden oder Proteinen (Analyten) untersuchen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das APP-Loop-WT-Peptid direkt an APP18-350 bindet (Schmechel, 2005).

In einem weit ausführlicheren Ansatz wurden nun Analysen der verschiedenen „Loop“-Peptide der APP-Familie durchgeführt. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Carina Treiber durchgeführt. Als Analyten wurden die Peptide APP-Loop-WT, APP-Loop-Ser, APLP1-Loop-WT sowie APLP2-Loop-WT eingesetzt. Die Ausbildung der Disulfidbrücke der Peptide wurde mittels „matrix-assisted laser-desorption ionisation“-Massenspektrometrie (MALDI-MS) kontrolliert (beispielhaft dargestellt für das APP-Loop-WT in Abb. 8).

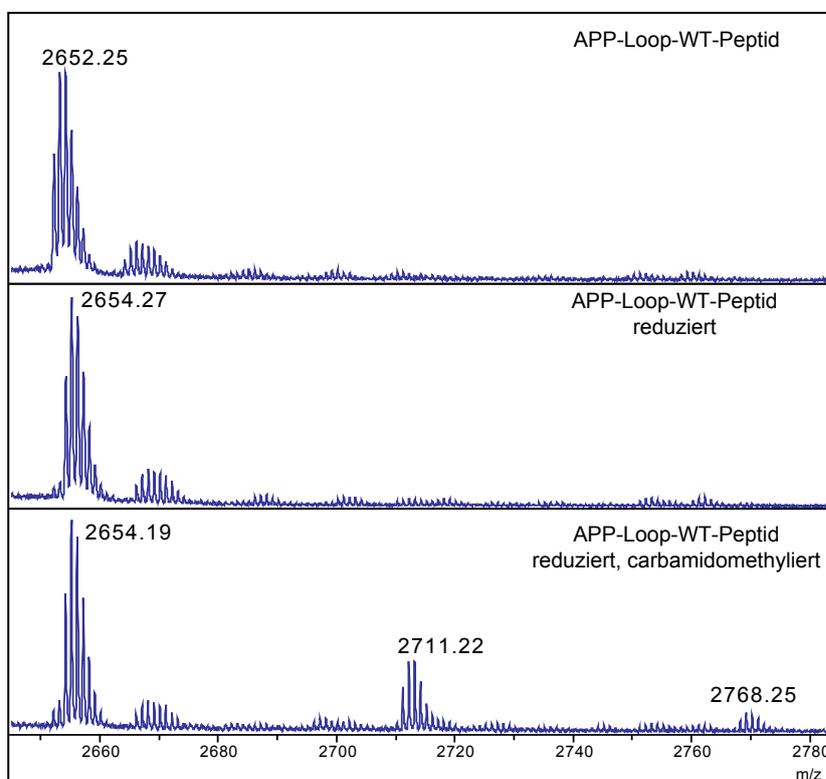


Abb. 8: MALDI-MS-Analysen des APP-Loop-WT-Peptids. Die Masse des reduzierten Peptids verschob sich erwartungsgemäß um 2 Da, die Masse des reduzierten Peptids mit einem carbamidomethylierten Cys um 57, bzw. mit beiden um 114 Da.

Als Liganden wurden Aufgereinigtes APP18-350-WT, APP18-350-Loop-Ser sowie das Peptid APP-Loop-WT verwendet. Als Kontrolle wurde 1 x PBS eingesetzt. Die Proteine wurden in 10 mM Natriumacetat, pH 3,4 auf eine Konzentration von 100 µg/ml verdünnt. Für die Kopplung wurde ein CM5-Chip mit an Dextran gekoppelten Carboxymethylgruppen verwendet. Nach Aktivierung der Oberfläche mit einem Gemisch aus NHS/EDC erfolgte die Injektion der Liganden. Abschließend wurden die verbleibenden, freien Aminogruppen mit Ethanolamin abgesättigt (beispielhaft dargestellt in Abb. 9). Insgesamt wurden dabei 445 RU („Response Units“) APP-Loop-WT-Peptid (Abb. 9A), 1024 RU APP-18-350-WT und 411 RU APP-18-350-

Loop-Ser gekoppelt. 1 RU entspricht 1 pg/mm² an gekoppeltem Ligand auf der Oberfläche. Um die Faktoren des variierenden Molekulargewichts sowie der unterschiedlich hohen RU anzugleichen, wurde folgende Rechnung angestellt:

$$\text{RU-gekoppelt [pg]} / \text{Molekulargewicht [mm}^2/\text{kDa]}$$

Somit ergaben sich folgende Werte: 27,48 für APP18-350-WT, 11,03 für APP18-350-Loop-Ser und 167,5 für das Peptid APP-Loop-WT. Setzt man die Werte von APP18-350-WT und APP18-350-Ser ins Verhältnis zum APP-Loop-WT-Peptid ergeben sich die Korrekturfaktoren 6,1 für APP18-350-WT und 15,2 für APP18-350-Loop-Ser, wodurch die Kurven direkt miteinander vergleichbar sind. Kontrollmessungen wurden mit dem polyklonalen Antikörper 40090, welcher gegen rekombinant hergestelltes APP18-350 generiert wurde, durchgeführt. Damit wurde die Funktionalität der Oberflächen zwischen den einzelnen kinetischen Messungen überprüft. Die Kurven von APP18-350-WT und APP18-350-Loop-Ser mit dem Analyten 40090 waren nach Multiplikation mit dem Korrekturfaktor nahezu identisch (Abb. 9B), was zeigt, dass die berechneten Korrekturfaktoren für die Auswertung der Messungen benutzt werden können. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der Messungen mit den verschiedenen „Loop“-Peptiden zusammengefasst. Dabei wurde deutlich, dass das APLP1-Loop-WT Peptid an keinen der Liganden gebunden hat (Abb. 10A). Auch bei anders gewählter Skalierung war nur eine unspezifische Bindung an APP18-350-WT, APP18-350-Loop-Ser und das APP-Loop-WT-Peptid zu erkennen (Abb. 11).

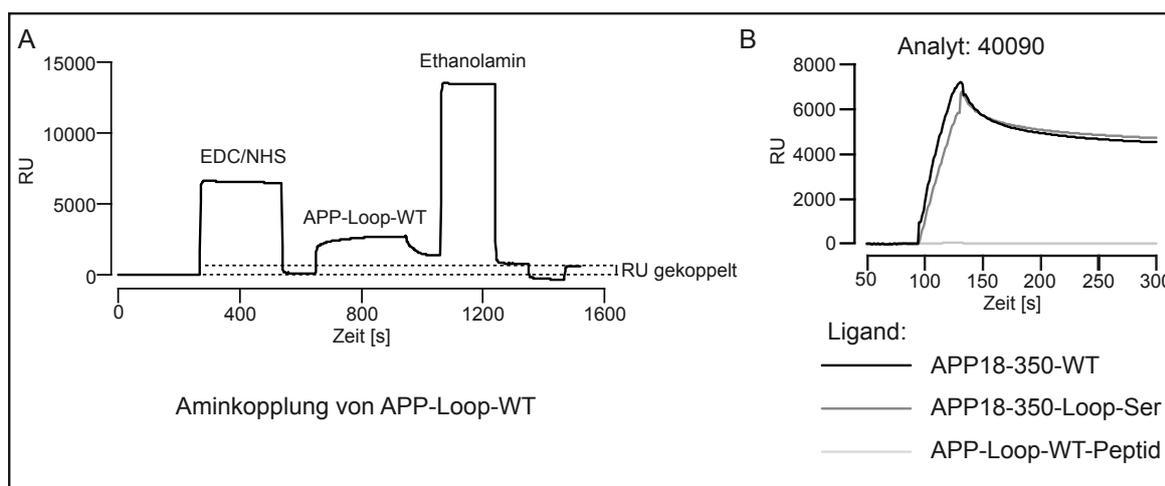


Abb. 9: Sensorgramme zur Immobilisierung und Antikörperkontrollmessung

A: Sensorgramm der Aminkopplung von APP-Loop-WT. EDC/NHS: Aktivierung der Oberfläche. APP-Loop-WT: Injektion des Liganden. Ethanolamin: Absättigung freier Aminogruppen, RU („Response Units“) gekoppelt: Differenz der Basislinie vor und nach der Immobilisierung. B: Kontrollmessung zur Verifizierung der Korrekturfaktoren. Bindungsstudie mit dem polyklonalen Antikörper 40090. Im dargestellten Sensorgramm wurden die Originaldaten mit dem Korrekturfaktor 6,1 für APP18-350-WT sowie 15,2 für APP18-350-Loop-Ser multipliziert. Die Korrekturfaktoren ergeben sich aus dem Verhältnis der Quotienten gekoppelte RU/Molekulargewicht. Das APP-Loop-WT-Peptid wird durch den Antikörper 40090 nicht erkannt.

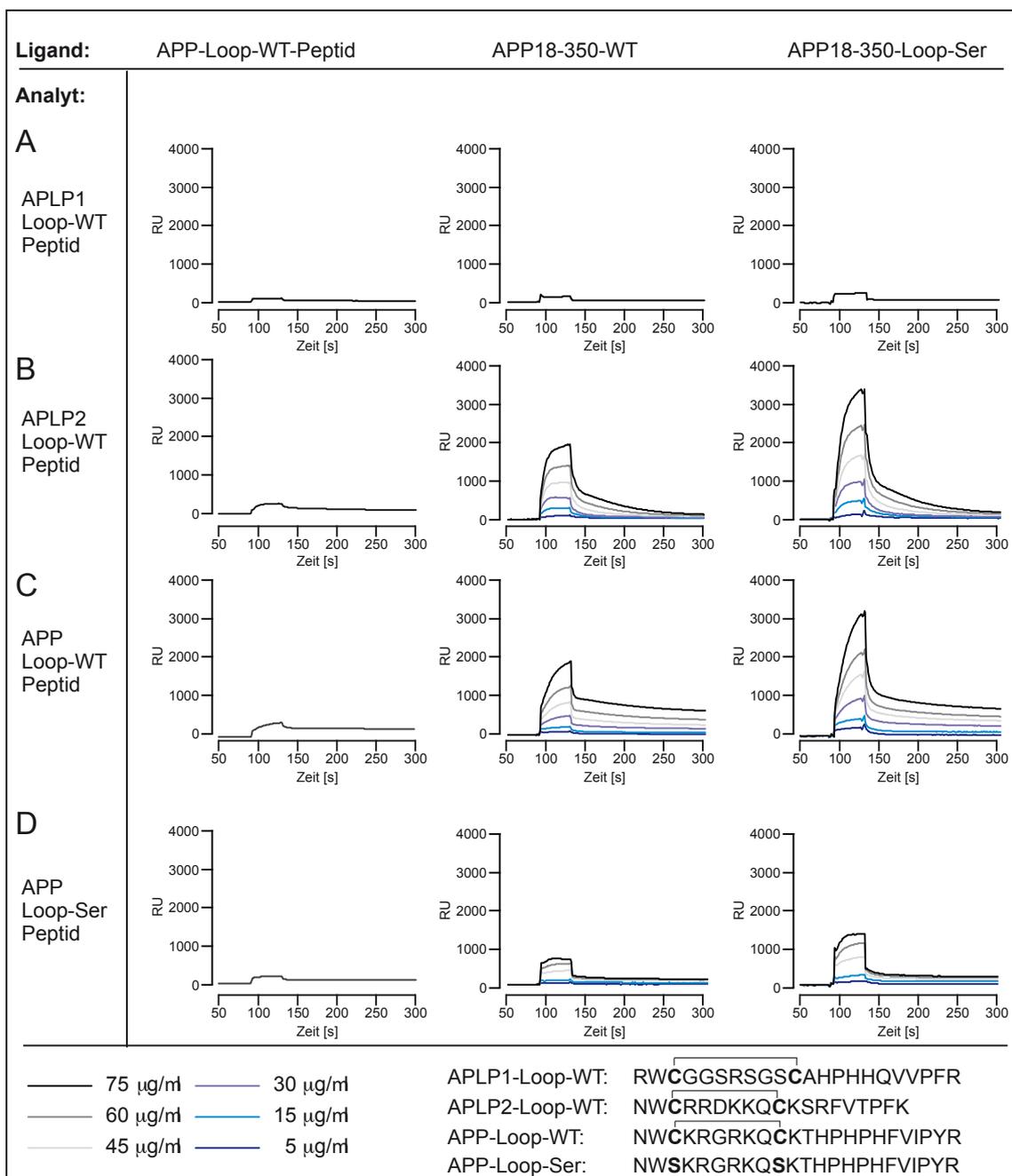


Abb. 10: Sensorgramme der Bindungsstudien verschiedener Loop-Peptide mit APP18-350 und APP-Loop-WT-Peptid. Die Liganden APP-Loop-WT, APP18-350-WT, APP18-350-Loop-Ser sowie PBS als Kontrolle wurden mit den Analyten APLP1-Loop-WT (A), APLP2-Loop-WT (B), APP-Loop-WT (C) sowie APP-Loop-Ser (D) analysiert. Gezeigt sind die mit den Korrekturfaktoren (Abb. 9) multiplizierten Daten aller Messungen, wobei die Daten der Kontrollflusszelle jeweils abgezogen wurden. Die Dissoziationsphase wurde bis 700s aufgezeichnet, gezeigt ist nur der Kurvenverlauf bis 300s. Die Legende zeigt die eingesetzten Konzentrationen sowie die genauen Aminosäuresequenzen der Analyten an, der Balken steht dabei für die Disulfidbrücke. Bei Signalen unter 500 RU („Response Units“) wurde nur die Kurve der höchsten Konzentration gezeigt. Eine höhere Auflösung mit allen Konzentrationen ist in Abb. 11 gezeigt.

Im Gegensatz dazu hat das APLP2-Loop-WT-Peptid spezifisch und konzentrationsabhängig sowohl an das Peptid APP-Loop-WT (Abb. 10B und 11B), als auch die Proteine APP18-350-WT und APP18-350-Loop-Ser gebunden (Abb. 10B). Interessanterweise wurden im Vergleich mit APP18-350-WT durch APP18-350-Loop-Ser höhere Mengen des APLP2-Loop-WT-Peptides gebunden.

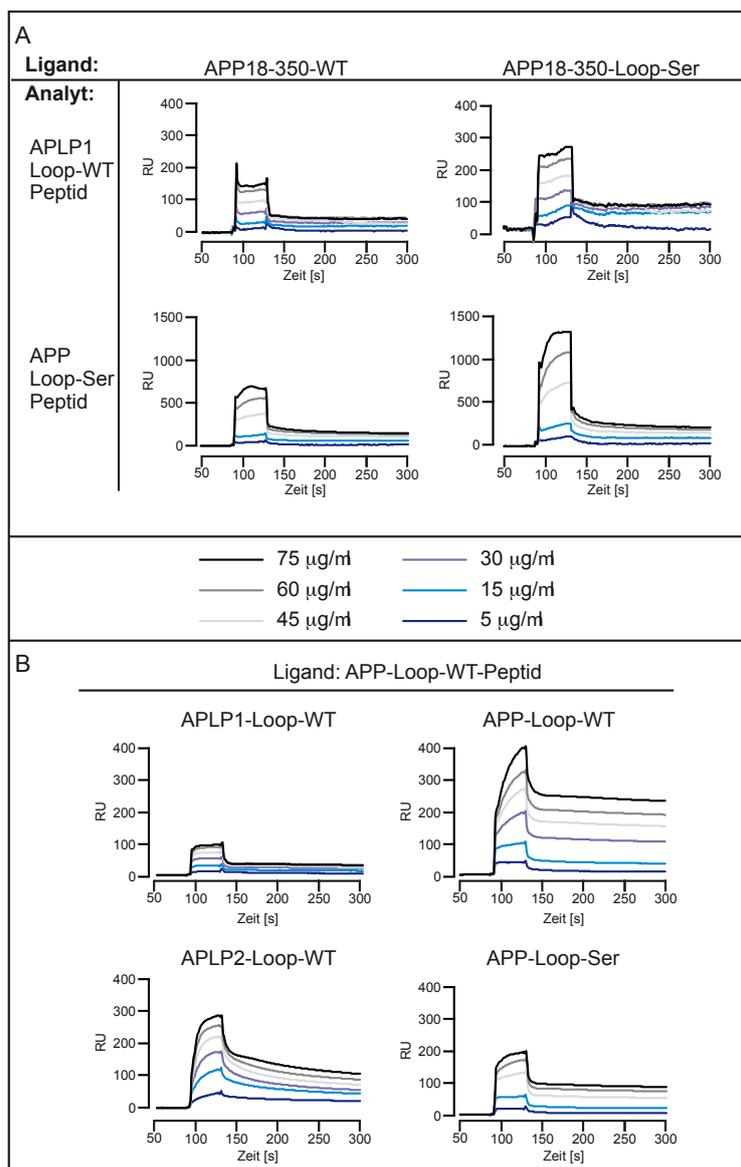


Abb. 11. Höher aufgelöste Darstellung der Messungen aus Abb. 9.

Analytkonzentrationen sind in der Mitte angegeben. A: Bindungsstudien der Analyten APLP1-Loop-WT-Peptid (oben) sowie APP-Loop-Ser-Peptid (unten) an die Liganden APP18-350-WT und APP18-350-Loop-Ser. B: Bindungsstudien aller vier Loop-Peptide an den Liganden APP-Loop-WT-Peptid.

Eine Bindung an alle drei Liganden konnte ebenfalls mit dem APP-Loop-WT-Peptid gemessen werden (Abb. 10C). Auch hier wurde sichtbar, dass durch APP18-350-Loop-Ser höhere Mengen des Analyten gebunden wurden. Im Vergleich zum APP-Loop-WT-Peptid konnten mit dem Kontrollpeptid APP-Loop-Ser ohne Disulfidbrücke nur schwache, unspezifische Bindungen an die Liganden gemessen werden (Abb. 10D + 11).

Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass zwischen dem APLP1-Loop-WT-Peptid sowie APP-Loop-Ser-Peptid und dem N-Terminus des APP keine stabilen, spezifischen Wechselwirkungen stattfinden. Hingegen konnte für das APLP2-Loop-WT-Peptid und das APP-Loop-WT-Peptid eine stabile Wechselwirkung mit dem N-terminalen Bereich des APP gezeigt werden. Für diese Interaktionen lassen sich kinetische Parameter bestimmen, die in Tabelle 1 zusammengefasst wurden.

	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	K_A [1/M]	K_D [M]
APLP2-WT-Peptid +				
APP18-350-WT	$2,9 \times 10^3$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,9 \times 10^9$	5×10^{-10}
APP18-350-Loop-Ser	$2,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^9$	$7,8 \times 10^{-10}$
APP-Loop-WT-Peptid	$3,6 \times 10^3$	$1,3 \times 10^{-7}$	$2,9 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{-11}$
APP-WT-Peptid +				
APP18-350-WT	22,2	$2,2 \times 10^{-5}$	1×10^6	$9,9 \times 10^{-7}$
APP18-350-Loop-Ser	156	$1,54 \times 10^{-5}$	1×10^7	$9,9 \times 10^{-8}$
APP-Loop-WT-Peptid	35,3	$1,44 \times 10^{-5}$	$2,45 \times 10^6$	$4,08 \times 10^{-7}$

Tab. 1. Kinetische Parameter zu den Messungen B und C aus Abb. 10 und 11.

Kinetische Parameter wurden mittels der Software „BIAevaluation 4.1 program“ (Biacore) mit einem 1:1 Modell ($A+B = AB$) mit variierender Basislinie bestimmt. Für die Bestimmung der Assoziationskonstante (k_a) wurde der Zeitrahmen von 89,5s bis 125s verwendet. Die Dissoziationskonstante (k_d) wurde im Zeitrahmen 129s bis 700s ermittelt. Für die kinetischen Berechnungen wurden nur die Kurven der Konzentrationen 5, 15, 30 und 45 $\mu\text{g/ml}$ zugrunde gelegt. K_A : Gleichgewichts-Assoziationskonstante, K_D : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante.

Aus den kinetischen Berechnungen zeigte sich, dass das APLP2-Loop-WT-Peptid mit sehr hoher Affinität (etwa 1 nM) an die Proteine APP18-350-WT, APP18-350-Ser und das Peptid APP-Loop-WT gebunden hat (Tab. 1). Die Affinität des APP-Loop-WT-Peptids war geringer und lag für APP18-350-WT und das APP-Loop-WT-Peptid nur bei etwa 400-900 nM (Tab. 1). Die Affinität des APP-Loop-WT-Peptids an APP18-350-Loop-Ser war mit 90 nM um den Faktor zehn höher (Tab. 1). Im Vergleich der Kurven von APP-Loop-WT-Peptid und APLP2-Loop-WT-Peptid mit den entsprechenden Liganden (Abb. 10B+C) wurde ersichtlich, dass die Menge an gebundenen Molekülen (RUs) etwa gleich war, sich die Assoziationsraten aber deutlich unterschieden haben. Das APLP2-Loop-WT-Peptid erreichte unabhängig vom Liganden wesentlich schneller die Sättigung als das APP-Loop-WT-Peptid, was sich auch in den entsprechenden Assoziationsraten k_a (Tab. 1) widerspiegelte. Die Dissoziation des APLP2-Loop-WT-Peptids verlief wesentlich schneller als die des APP-Loop-WT-Peptids. Zusammenfassend kann für die stabilen Wechselwirkungen von APP und APLP2 an APP18-350 folgende Affinitätsreihe aufgestellt werden (Analyt_{Ligand}, Abkürzungen: APP-Loop-WT-Peptid: APP, APLP2-Loop-WT-Peptid: A2):

$$APP_{APP18-350-WT} < APP_{APP-Loop-WT} < APP_{APP18-350-Ser} < A2_{APP18-350-Loop-WT} < A2_{APP18-350-Loop-Ser} < A2_{APP-Loop-WT}$$

2.1.3. Herstellung polyklonaler Antikörper

Es war notwendig einen spezifischen Antikörper für die Detektion von APLP2 herzustellen.

Dazu wurde das gereinigte, rekombinante sAPLP2 α aus *P. pastoris* für die Immunisierung von Kaninchen verwendet. Das Antikörper enthaltende Serum, welches aus der Blutung nach den Immunisierungen erhalten wurde, wurde als 8/1 bezeichnet und zunächst im Western Blot getestet. Für die Western-Blot-Analysen wurden Lysate aus HEK293-Zellen elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit dem polyklonalen Antikörper 8/1 detektiert (Abb. 12). Nur in der Spur mit APLP2-YFP war eine Bande bei dem apparenten Molekulargewicht von 125 kDa erkennbar. Da diese in den anderen Spuren nicht erhalten wurde und auch mit dem Prä-Immunsersum nicht detektierbar war, handelt es sich vermutlich um das YFP-markierte APLP2. Zusätzlich waren in allen Spuren auch bei 100 kDa schwache Banden erkennbar, wahrscheinlich von endogenem APLP2. Zur Kontrolle der Expression der homologen Proteine wurden APP und APLP1 auf einem separaten Gel mit proteinspezifischen Antikörpern nachgewiesen. Auch für die Detektion von löslichem APLP2 (nicht gezeigt) sowie in der Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 2.2.1.) konnte dieser Antikörper erfolgreich und spezifisch eingesetzt werden.

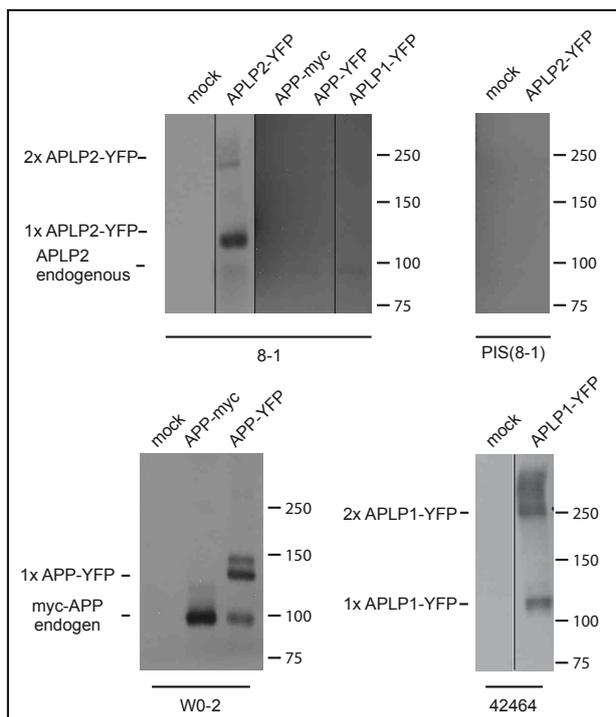


Abb. 12: Analyse des polyklonalen APLP2-Antikörpers 8/1.

HEK293-Zellen, wurden transient entweder mit den Leervektor, APLP2-YFP, APP-YFP, myc-APP oder APLP1-YFP-Konstrukten transfiziert und im Western Blot analysiert. A: Spezifische APLP2-Banden wurden mit dem neu generierten polyklonalen Antikörper 8/1, jedoch nicht mit dem entsprechenden Präimmunsersum (PIS) detektiert. Der Antikörper 8/1 zeigt keine Kreuzreaktivität mit den homologen Proteinen APP und APLP1, deren Expressionskontrolle in B gezeigt ist. Für APLP1-YFP und APLP2-YFP sind neben den Monomeren (1x), SDS-stabile Dimere (2x) erkennbar.

2.1.4. Interaktion von sAPLP1 α und sAPLP2 α mit sorLA

In einer Kooperation mit Dr. O. Andersen aus der Gruppe von Prof. Dr. T. Willnow, aus dem Max-Delbrück-Zentrum in Berlin wurden Bindungsstudien von rekombinantem sAPLP1 α und

sAPLP2 α und dem sorLA-Rezeptor durchgeführt. Der neuronale sorLA- oder LR11-Rezeptor ist ein 250 kDa Protein mit bisher ungeklärter Funktion. *In vitro* konnte eine Bindung des Rezeptors an APP gezeigt werden (Andersen et al., 2005). APP und sorLA kolokalisieren im Golgi-Apparat und den Endosomen, wobei die Überexpression von sorLA in der Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y zu einer Rückverteilung in den Golgi-Apparat und somit zu einer verringerten A β -Produktion führte (Andersen et al., 2005). Die Interaktionsstelle konnte im APP auf die in der APP-Protein-Familie konservierte E2-Domäne eingeschränkt werden (Andersen et al., 2006). Um eine direkte Interaktion zwischen sorLA und den APLP-Ektodomänen zu messen, wurden SPR-Analysen mit den aufgereinigten Proteinen durchgeführt. Dazu wurden die gereinigten rekombinanten Ektodomänen aus *P. pastoris* (siehe Kapitel 2.1 und Abb. 13A) als Ligand an einen CM5-Chip gekoppelt (siehe Kapitel 2.1.2.3) und der neuronale Rezeptor sorLA, aufgereinigt aus CHO-Zellen, als Analyt eingesetzt.

Dabei konnte eine stabile Wechselwirkung zwischen sorLA und der APLP1-Ektodomäne sowie sorLA und der APLP2-Ektodomäne gemessen werden (Abb. 13C). Bei der kinetischen Berechnung wurden für beide Liganden, APLP1 und APLP2, Gleichgewichtskonstanten (K_D) im Bereich von 100-200 nM berechnet (Abb. 13B). Dabei unterschieden sich APLP1 und

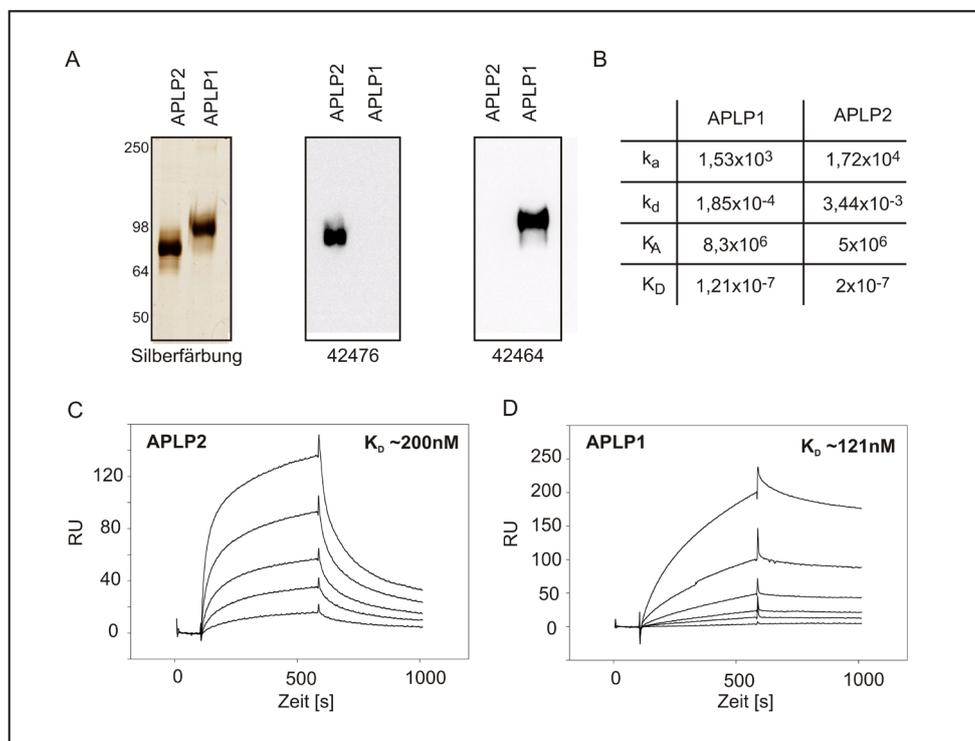


Abb 13: SPR-Analysen von sorLA an sAPLP1 α und sAPLP2 α .

A: Silberfärbung und Western Blot-Analyse der gereinigten Proteine. Die Molekulargewichte sind links angegeben. B: Kinetische Parameter der Bindung von sorLA an sAPLP1 α und sAPLP2 α . C: Sensorgramme der Bindungsstudien. Daten der Kontrolloberfläche wurden jeweils abgezogen. RU: „Response Units“.

APLP2 allerdings in den Assoziations- und Dissoziationskonstanten.

Folglich konnte auch für die gereinigten APLP-Ektodomänen eine stabile Wechselwirkung mit dem neuronalen Rezeptor sorLA gezeigt werden.

2.2. Analyse der Homo- und Heterodimerisierung der Proteine der APP-Familie in höheren eukaryotischen Zellen

Wir konnten in unserer Arbeitsgruppe erstmals zeigen, dass APP in lebenden Zellen dimerisiert (Munter et al. 2007). Daraus ergab sich die Fragestellung, ob die APLPs in höheren eukaryotischen Zellen ebenfalls Homodimere ausbilden können und ob auch Heterodimere existieren. Mit dem physikalischen Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) kann darüber sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage getroffen werden. Dazu wurden die Proteine der APP-Familie als Fusionsproteine am Carboxyende mit dem gelb-fluoreszierenden Protein (YFP) und dem cyano-fluoreszierenden Protein (CFP) exprimiert (siehe Abb. 22) und die FRET-Effizienzen von YFP- und CFP-koexprimierenden HEK293-Zellen bestimmt. Durch Bleichen des FRET-Akzeptors (YFP) nimmt die Fluoreszenz des FRET-Donors (CFP) zu (siehe Abb. 16A+B), wenn Donor und Akzeptor sich in einem Abstand von höchstens 10-12 nm befinden. Da für eine mögliche Heterodimerisierung die Kolokalisation der Interaktionspartner entscheidend ist, wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine untersucht. Diese Analysen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Schaefer, teilweise in Zusammenarbeit mit Dr. P. Voigt, durchgeführt.

2.2.1. Analyse der Homodimerisierung

Die mit YFP fusionierten Proteine APP, APLP1 oder APLP2 wurden in HEK293-Zellen exprimiert und mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (cLSM) in den lebenden Zellen untersucht. Dabei wurde deutlich, dass APP-YFP hauptsächlich in intrazellulären Kompartimenten wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat lokalisiert war. Nur ein geringer Teil des APP-YFP konnte an der Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 14 Rechts). Hingegen konnte APLP1-YFP fast ausschließlich in der Plasmamembran beobachtet werden (Abb. 14 Links). Nur bei sehr starker Überexpression wurde APLP1-YFP auch in intrazellulären

Kompartimenten detektiert (nicht gezeigt). Interessanterweise war APLP2-YFP gleichmäßig sowohl an der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Kompartimenten wie ER und Golgi-Apparat lokalisiert (Abb. 14 Mitte) und stellt somit hinsichtlich der Lokalisation eine Mischform zwischen APP und APLP1 dar.

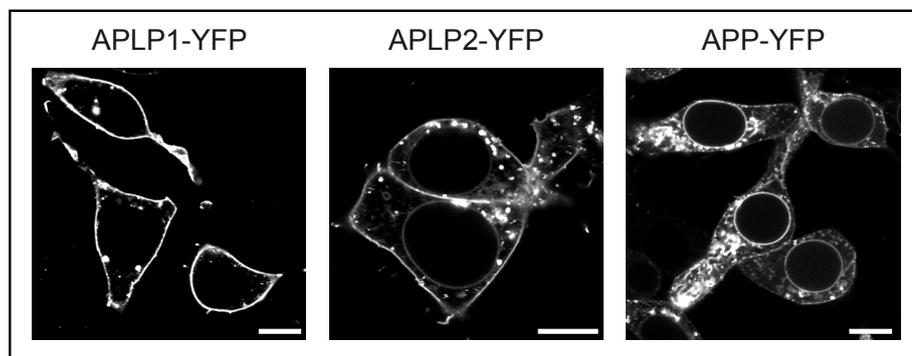


Abb. 14: Subzelluläre Lokalisation der Proteine der APP-Familie.

C-terminal mit YFP oder CFP fusioniertes APLP1, APLP2 und APP wurde transient in HEK293-Zellen exprimiert. Zellen wurden mittels konfokaler LSM 24h nach Transfektion aufgenommen. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen. Balken entsprechen 10 μm.

Da die Proteine C-terminal mit den Fluorophoren fusioniert sind, könnten im cLSM auch nur die CTFs detektiert worden sein. Die im cLSM analysierten Zellen wurden lysiert und die Proteine über den „tag“ im Western Blot nachgewiesen. Dabei zeigte sich die Immunreaktivität hauptsächlich bei den Molekulargewichten der Vollängenvarianten (nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass in den konfokalen Bildern tatsächlich die Vollängenproteine detektiert wurden.

Da das Molekulargewicht des YFP-„tags“ 25 kDa beträgt, gilt es auszuschließen, dass der „tag“ die subzelluläre Lokalisation der Proteine beeinflusst. Daher wurden vergleichende Immunfluoreszenzanalysen der YFP- und FLAG-fusionierten Proteine durchgeführt. HEK293-Zellen wurden transient mit den entsprechenden Plasmiden (APLP-YFP bzw. APLP-FLAG) transfiziert, nach 24 h fixiert, permeabilisiert, über proteinspezifische Antikörper nachgewiesen und mittels cLSM abgebildet. Sowohl für APLP1 (Abb. 15A) als auch APLP2 (Abb. 15B) konnte gezeigt werden, dass die YFP-Fusionsproteine die gleiche subzelluläre Lokalisation aufweisen wie die FLAG-Fusionsproteine. Die Spezifität der polyklonalen Antikörper, besonders des neu generierten APLP2-Antikörpers 8/1, wurde an den nur mit dem pcDNA3-FLAG-Vektor transfizierten Zellen gezeigt (Abb. 15B). Als Kontrolle wurden die YFP-Fusionsproteine direkt über YFP detektiert. Dabei wurde das gleiche Expressionsmuster wie bei der Antikörperdetektion der FLAG- und YFP-Fusionsproteine erhalten. Die Immunfluoreszenzen

mit den polyklonalen Antikörpern zeigen weiterhin, dass es sich bei den im cLSM detektierten Formen um die Volllängenvarianten handelt.

Zur Untersuchung der Homodimerisierung wurden die FRET-Effizienzen von APLP-YFP und APLP-CFP koexprimierenden Zellen bestimmt (Abb. 16). Dabei betragen die FRET-Effizienzen für die APLP1-Homodimere etwa 15% und für die APLP2-Homodimere etwa 16% und waren damit deutlich höher als die FRET-Effizienzen von APP mit etwa 11% (Munter et al., 2007). Um

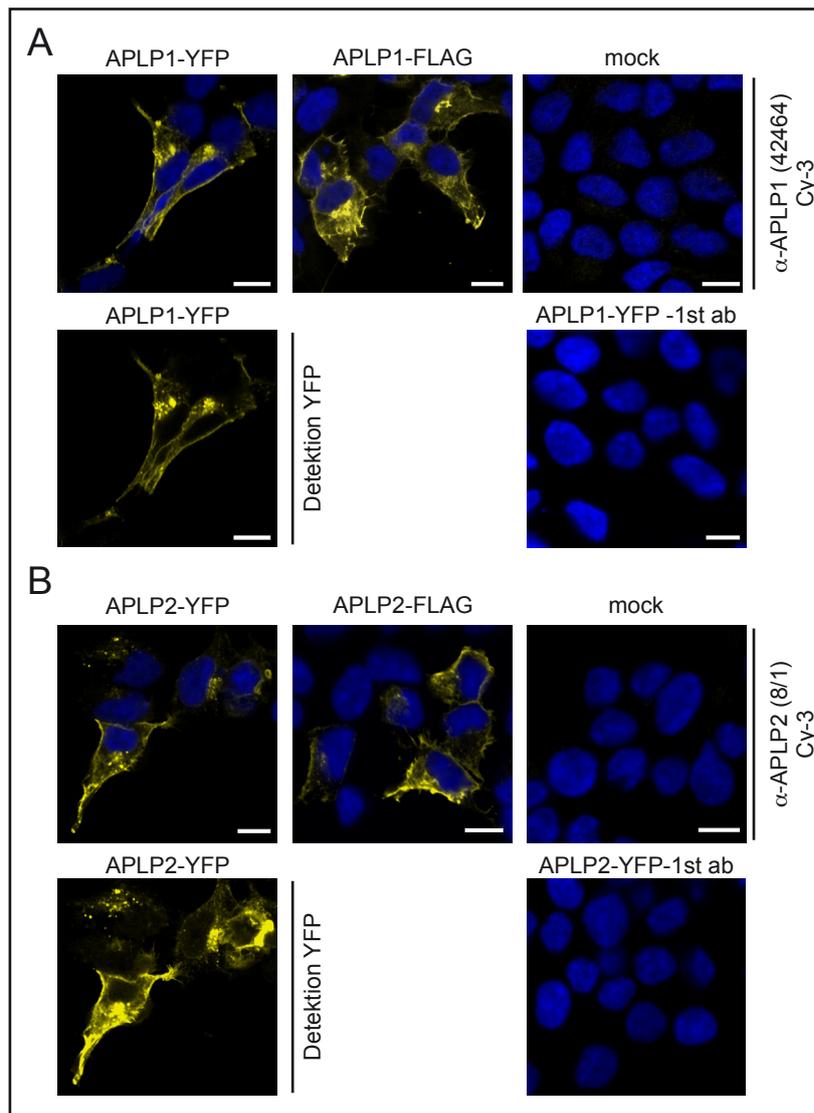


Abb. 15: Vergleichende Immunfluoreszenzanalysen der YFP-markierten Proteine.

APLP1-YFP, APLP1-FLAG sowie der Vektor pcDNA3 (mock) (A) bzw. APLP2-YFP, APLP2-FLAG und Leervektor (B) exprimierende Zellen wurden mit den angegebenen polyklonalen Erstantikörpern inkubiert. Als Kontrolle wurden APLP-YFP-Zellen ohne Erstantikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem Fluorophor Cy3-gekoppelten zweiten Antikörper (gelb). Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt (blau). Als Kontrolle wurden jeweils die gleichen APLP-YFP-Zellen zusätzlich mit 488 nm angeregt, um YFP-getaggtes APLP zu detektieren (gelb, A+B unten links). Die subzelluläre Verteilung von YFP- und FLAG-getaggtem APLP1 und APLP2 ändert sich nicht. Dargestellt sind repräsentative Bilder. Balken entsprechen 10 μ m.

die Spezifität der Interaktionen zu untersuchen, wurde zusätzlich in steigenden Mengen nicht fluoreszierendes APLP1-FLAG respektive APLP2-FLAG exprimiert. Die FRET-Effizienz konnte in konzentrationsabhängiger Weise kompetiert werden (Abb. 16C+D). Des Weiteren konnten bei Koexpression mit ähnlich lokalisierten Transmembranproteinen wie Glykophorin A (GypA-CFP) mit APLP1-YFP (Abb. 16C, siehe auch Abb. X) und dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR-CFP mit APLP2-YFP (Abb. 16D) keine FRET-Effizienzen gemessen werden.

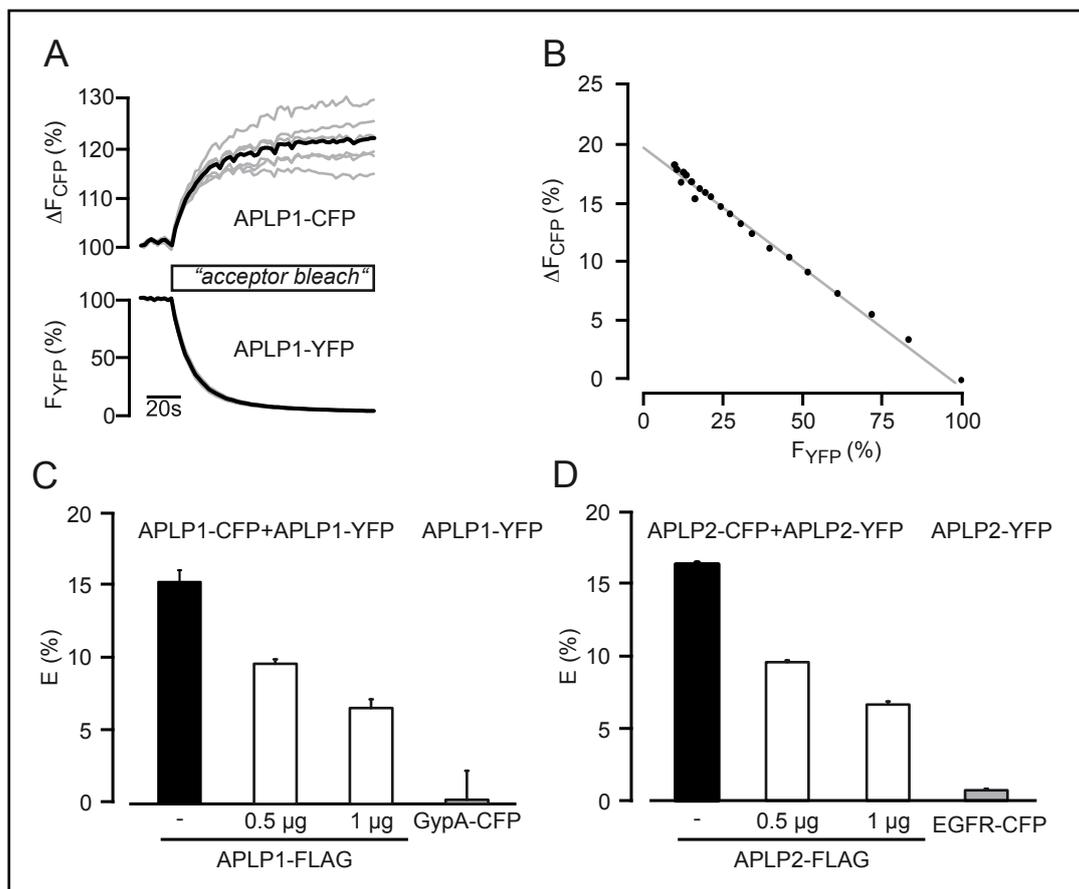


Abb. 16: Homodimerisierung von APLP1 und APLP2 mittels FRET. A: Zeitverlauf der Wiedererlangung der Donor-Fluoreszenz (ΔF_{CFP}) während selektivem Bleichen des Akzeptors (F_{YFP}). Gezeigt sind Einzelzellen (graue Linien) und der Mittelwert (schwarze Linie) einer repräsentativen Messung von APLP1-CFP and APLP1-YFP. B: Lineare Regressionsanalyse der Wiedererlangung der Donor-Fluoreszenz (ΔF_{CFP}) aufgetragen gegen die Schrittweise gebleichte Fluoreszenz des Akzeptors (F_{YFP}). Dargestellt ist der mittlere Verlauf der Einzelmessungen des Experimentes aus A. C, D: Schwarze Balken zeigen die FRET-Effizienzen (E) von APLP1-CFP und APLP1-YFP (C), sowie APLP2-CFP and APLP2-YFP (D). Weiße Balken zeigen die gleichen Messungen in Anwesenheit steigender Mengen der entsprechenden FLAG-fusionierten Proteine. Als Negativkontrollen wurden APLP1-YFP mit Glycophorin A (GypA-CFP; C, grauer Balken) und APLP2-YFP mit EGF-Rezeptor-CFP (D, grauer Balken) koexprimiert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei bis vier unabhängigen Transfektionen (jeweils 4 Messungen mit 4-6 Zellen).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Proteine der APP-Familie hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation deutliche Unterschiede aufweisen. APLP1 ist hauptsächlich an der Zelloberfläche, APLP2 und APP hingegen sind sowohl in intrazellulären Kompartimenten als auch zu einem geringeren Teil an der Zelloberfläche lokalisiert. Das konnte zusätzlich mit den nicht-fluoreszenzmarkierten Proteinen in Immunfluoreszenzanalysen nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch die APP-homologen Proteine APLP1 und APLP2 Homodimere in lebenden, höheren eukaryotischen Zellen ausbilden.

2.2.2. Analyse der Heterodimerisierung

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Heterointeraktionen der Proteine der APP Familie zu analysieren. Initial wurde dazu die Lokalisation der entsprechenden Proteine in Anwesenheit eines weiteren homologen Proteins untersucht. Dies ist besonders interessant für APP und APLP1, da sich die subzelluläre Lokalisation der beiden Proteine in Abwesenheit des jeweils Anderen sehr deutlich unterscheidet (siehe Abb. 14). Bei der Koexpression von APP-CFP und APLP1-YFP zeigte sich, dass APLP1-YFP teilweise in intrazellulären Kompartimenten zurückgehalten wurde (Abb. 17 links). Dies deutet auf eine Interaktion der beiden Proteine hin. Eine verstärkte APP-Lokalisation an der Zelloberfläche konnte allerdings nicht oder nur vereinzelt beobachtet werden. Aufgrund der geringen Zelloberflächenlokalisierung von APP war die Kolo-kalisation von APP und APLP1 somit hauptsächlich auf intrazelluläre Kompartimente beschränkt (Abb. 17 links). Auch die Koexpression von APLP1-YFP mit APLP2-CFP führte teilweise zur Retention von APLP1 (Abb. 17 mitte). Somit kolo-kalisieren APLP1 und APLP2 sowohl in intrazellulären Kompartimenten als auch der Plasmamembran. Obwohl APLP1 in Gegenwart der homologen Proteine teilweise in der Zelle zurückgehalten wurde, konnte APLP1, besonders im Vergleich mit APP, doch immer noch sehr deutlich an der Zelloberfläche detektiert werden. Die Expressionsmuster der einzeln mit APP- und APLP2-transfizierten Zellen sind sich sehr ähnlich, was sich auch in der Koexpression mit einer weitgehend übereinstimmenden Kolo-kalisation zeigte (Abb. 17 rechts).

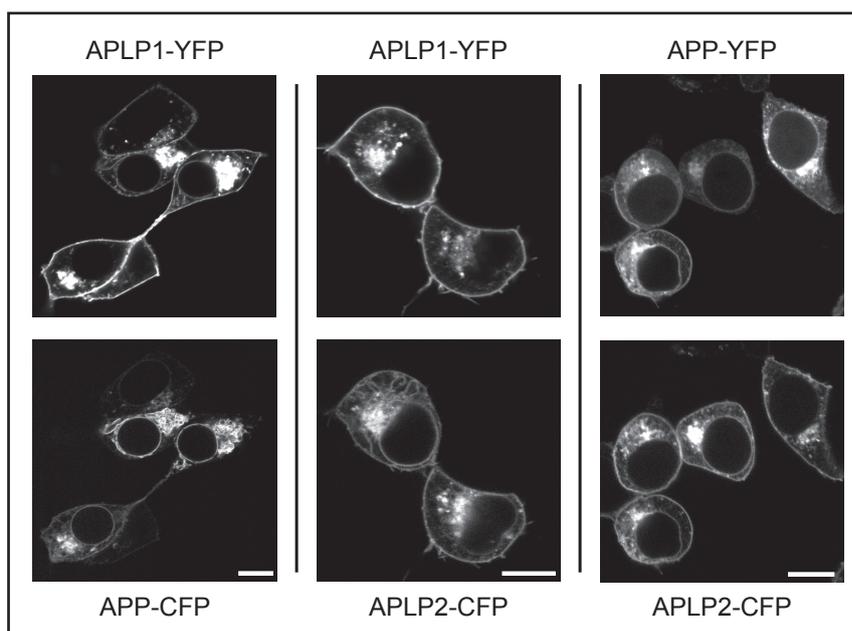


Abb. 17: Subzelluläre Lokalisation der Proteine der APP-Familie bei Koexpression. C-terminal mit YFP oder CFP fusioniertes APLP1, APLP2 und APP wurde jeweils in Kombination mit einem weiteren Familienmitglied transient in HEK293-Zellen exprimiert. Zellen wurden mittels konfokaler LSM 24h nach Transfektion aufgenommen. Gezeigt sind representative Bilder aus mindestens drei unabhängigen Transfektionen. Balken entsprechen 10 µm.

Folglich kolokalisieren die APP-Familienmitglieder in intrazellulären Kompartimenten wie dem ER und dem Golgi-Apparat, was erste Hinweise auf daraus folgende funktionelle Interaktionen zwischen den Mitgliedern der APP-Familie zulässt. Die Lokalisation von APLP1 lässt sich durch die Anwesenheit der homologen Proteine beeinflussen, was einen weiteren Anhaltspunkt für heterophile Interaktionen gibt.

Um die Heterodimerisierung in lebenden Zellen zu untersuchen, wurden die mit YFP- oder CFP-fusionierten Proteine APP, APLP1 und APLP2 wie in Abbildung 18 angegeben koexprimiert.

Für alle Varianten konnten dabei deutliche FRET-Effizienzen gemessen werden (Abb. 18).

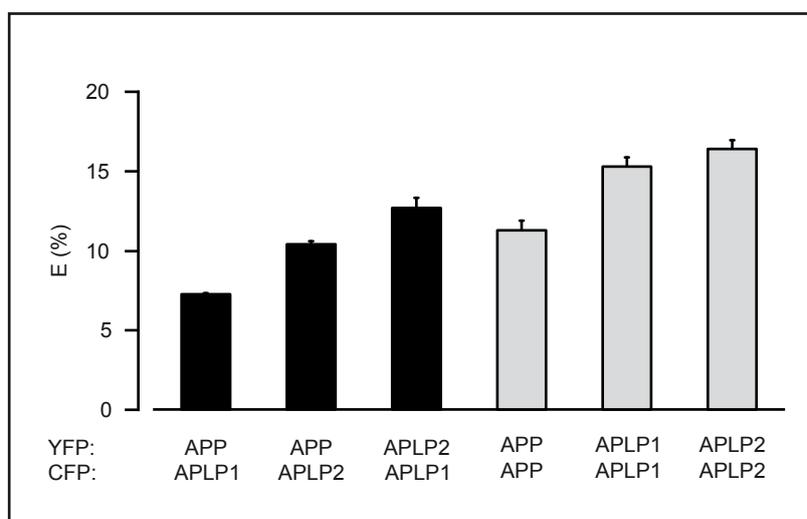


Abb. 18: Untersuchung der Homo- und Heterodimerisierung der APP-Protein-Familie mittels FRET.

FRET-Analysen der APP, APLP1, APLP2 Hetero- (schwarze Balken) und Homodimerisierung (graue Balken, aus Abb. 16 sowie Munter et al.). YFP- und CFP-markierte Fusionsproteine wurden in den angegebenen Kombinationen koexprimiert. Ähnliche FRET-Effizienzen (E) wurden gemessen, wenn Donor und Akzeptor ausgetauscht wurden (nicht gezeigt). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei bis vier unabhängigen Transfektionen (jeweils 4 Messungen mit 4-6 Zellen).

Wie aus den Kolokalisationsstudien erwartet, variierte dabei die Höhe der FRET-Effizienzen abhängig vom Grad der Kolokalisation. So zeigten die gut kolokalisierten Proteine APLP1-APLP2 und APP-APLP2 signifikant höhere FRET-Effizienzen als die deutlich schlechter kolokalisierten Proteine APP-APLP1. Im direkten Vergleich der Homo- und Heterodimerisierung der APP-Familie fiel auf, dass die FRET-Effizienzen der Heterodimerisierung von APP-APLP1 ($7,3 \pm 0,1\%$) und APLP1-APLP2 ($12,7 \pm 0,6\%$) geringer ausfielen als die FRET-Effizienzen der entsprechenden Homodimere, APP-APP ($11,3 \pm 0,6\%$), APLP1-APLP1 ($15,4 \pm 0,8\%$) und APLP2-APLP2 ($16,4 \pm 0,2\%$). Interessanterweise war im Fall von APP die FRET-Effizienz der Homodimerisierung vergleichbar mit der FRET-Effizienz der Heterodimerisierung mit APLP2 (APP-APP $11,3 \pm 0,6\%$; APP-APLP2 $10,4 \pm 0,2\%$), was möglicherweise darauf hindeutet, dass ähnlich viele APP-APP Homodimere wie APP-APLP2 Heterodimere in der Zelle vorhanden sind. Da die FRET-Effizienzen ein Abstandsmaß darstellen, könnten die unterschiedlichen FRET-Effizienzen allerdings auch durch eine veränderte Stellung der Fluorophore der

Heterointeraktionspartner zueinander hervorgerufen werden (siehe auch Diskussion, Kapitel 3.2.3.). Zusätzlich konnte die Heterodimerisierung der APP-Familie noch mit weiteren Kontrollmessungen belegt werden. Bei Austausch von FRET-Donor und -Akzeptor wurden für alle Kombinationen der Heterointeraktion vergleichbare FRET-Effizienzen erhalten (nicht gezeigt). Des Weiteren konnte die Heterodimerisierung von APP-APLP1 durch alle drei FLAG-markierten Proteine der APP-Familie kompetiert werden (nicht gezeigt).

Um die Ergebnisse der FRET-Messungen mit einem unabhängigen biochemischen Ansatz zu bestätigen, wurden Koimmunpräzitationen durchgeführt. Dazu wurden die YFP-Fusionsproteine mit den entsprechenden FLAG-Fusionsproteinen koexprimiert. Nach der Lyse der Zellen wurden die FLAG-Fusionsproteine mit dem Anti-FLAG-Antikörper präzipitiert. Mit den FLAG-Fusionsproteinen koaufgereinigte YFP-Fusionsproteine wurden im Western Blot mit proteinspezifischen Antikörpern detektiert. Dabei konnte sowohl die Homo- als auch die Heterodimerisierung aller APP-Familienmitglieder bestätigt werden (Abb. 19). Aus den Koimmunpräzitationen konnten allerdings, anders als im FRET, keine Aussagen über Quantitäten der gezeigten Interaktionen gemacht werden.

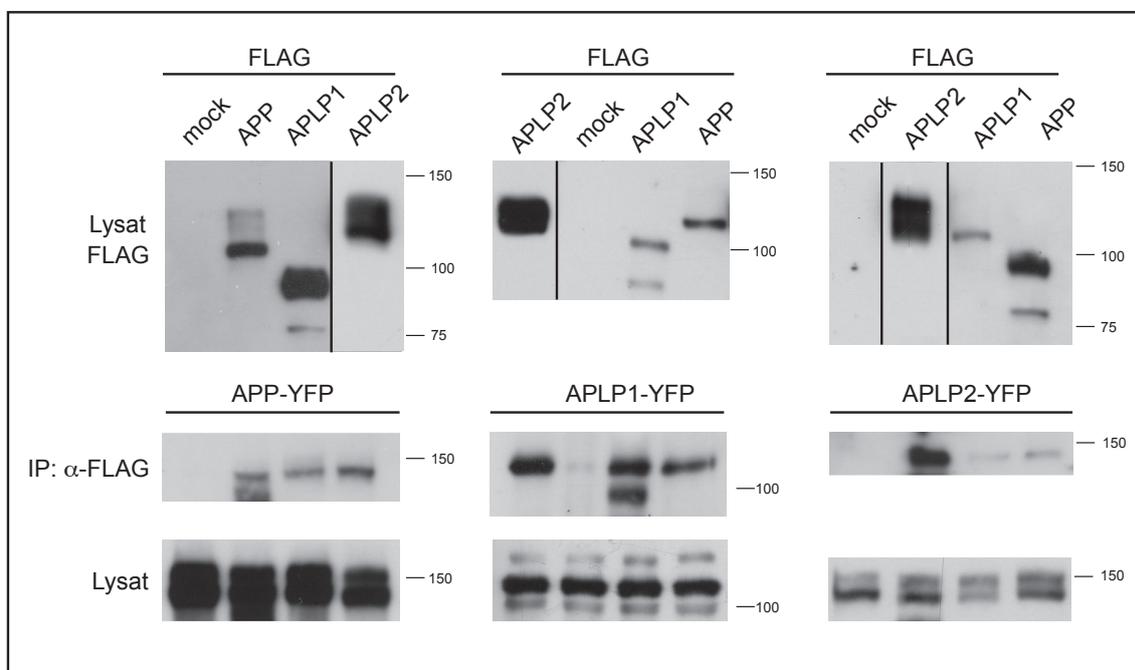


Abb. 19: Untersuchung der Homo- und Heterodimerisierung der APP-Protein-Familie mittels Koimmunpräzitation. Koimmunpräzitation von APP, APLP1 und APLP2. HEK293-Zellen wurden transient mit den Konstrukten für APP-, APLP1- und APLP2-FLAG sowie den entsprechenden YFP-Plasmiden oder dem Leervektor (mock) wie angegeben transfiziert. Zell-Lysate wurden mit dem monoklonalen M2-FLAG-Antikörper analysiert (Lysat FLAG). Die FLAG-Fusionsproteine wurden mit dem anti-FLAG Antikörper präzipitiert und die koaufgereinigten Proteine, sowie die Zell-Lysate als Ladekontrolle (Lysat), wurden mit Protein-spezifischen Antikörpern detektiert: W0-2 (APP), 42464 (APLP1) and 8/1 (APLP2). Durch den YFP-tag erhöht sich das Molekulargewicht um 25 kDa. Gezeigt sind representative Western Blots aus drei verschiedenen Koimmunpräzitationen. IP: Immunpräzitation.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Proteine der APP-Familie in lebenden eukaryotischen Zellen Homo- und Heterodimere ausbilden können.

2.2.3. Einfluss der Heterodimerisierung auf die Prozessierung des APP und die Entstehung von A β

Für die Transmembransequenz des APP konnte gezeigt werden, dass der Dimerisierungsgrad des APP-C-terminalen Fragments die Prozessierung zu den verschiedenen A β -Spezies beeinflusst (Munter et al., 2007). Da APP und die APLPs ähnlich prozessiert werden (siehe Einleitung), sollte untersucht werden, ob die Heterodimerisierung von APP-APLP1 bzw. APP-APLP2 einen Einfluss auf die Prozessierung des APP ausübt. Dazu wurden stabil APP-exprimierende humane Neuroblastoma-Zellen (SH-SY5Y) mit den APLP1-FLAG- und APLP2-FLAG-Konstrukten stabil kotransfiziert.

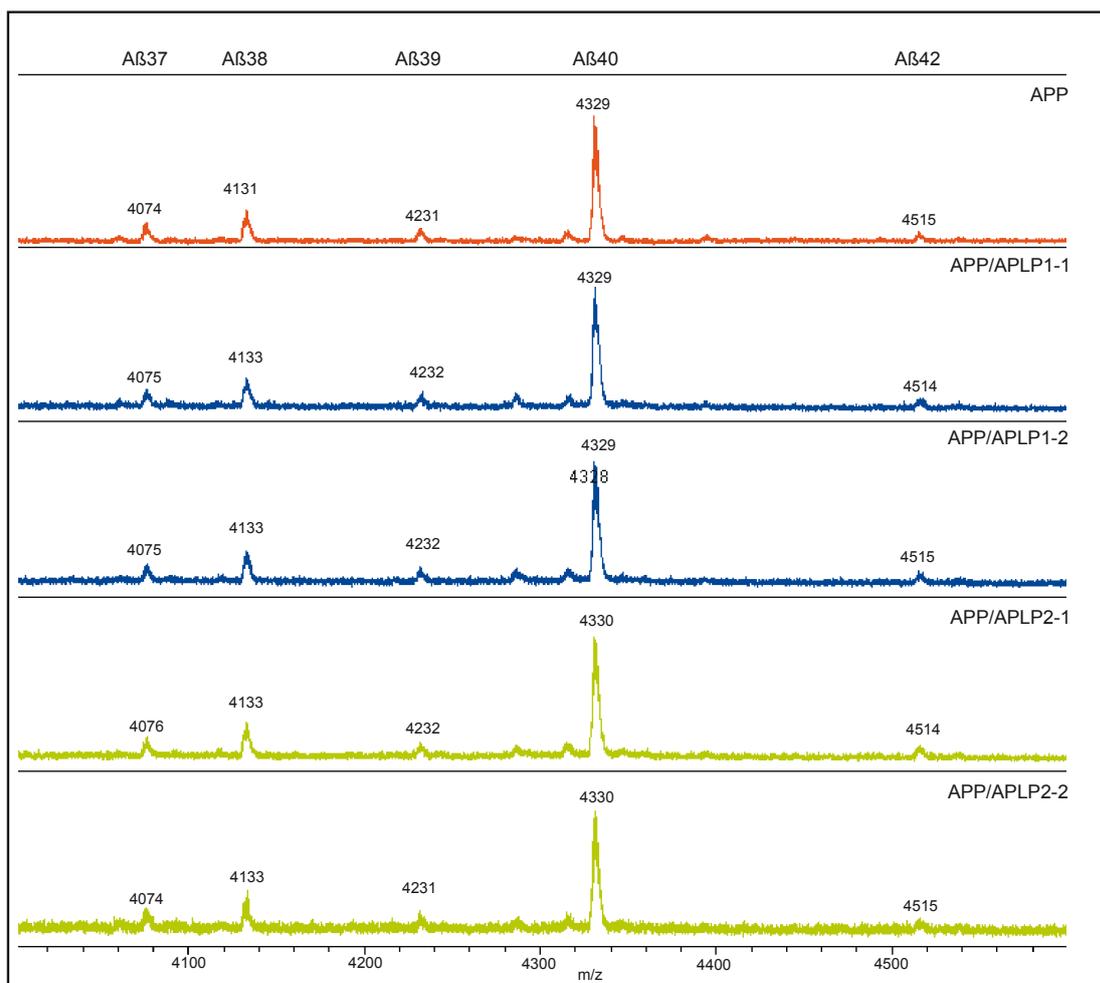


Abb. 20: Einfluss der Koexpression von APP mit APLP2 oder APLP1 auf die gebildeten A β -Spezies. MALDI-MS-Analyse der konditionierten Zellkulturmedien von stabil APP/APLP1 und APP/APLP2 koexprimierenden SH-SY5Y-Zellen. A β wurde mittels des monoklonalen Antikörpers W0-2 immunpräzipitiert und im MALDI-Massenspektrometer analysiert. Die Messungen wurden von Dr. Chris Weise durchgeführt.

Um Aussagen über die Entstehung der A β -Spezies machen zu können, wurden sowohl qualitative als auch quantitative Analysen durchgeführt. Bei der Prozessierung des APP erfolgt die Freisetzung der Ektodomäne ins Medium durch die α - oder β -Sekretase. Durch weitere Prozessierung der verbleibenden C-terminalen Fragmente kommt es unter anderem zur Freisetzung des A β -Peptids, welches dann ebenfalls im konditionierten Zellkulturmedium nachweisbar ist. Zur qualitativen Analyse wurden die Zellen 24 h mit frischem Medium inkubiert. Anschließend erfolgte aus dem Medium eine Immunpräzipitation von A β . Mittels MALDI-MS konnten so die verschiedenen A β -Spezies nachgewiesen werden. Die Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Chris Weise durchgeführt. Die erhaltenen Spektren sind in Abb. 20 dargestellt. In der Qualität der generierten A β -Spezies wurden dabei keine Unterschiede festgestellt. Sowohl aus den APP-WT exprimierenden Zellen, als auch den APP-APLP koexprimierenden Zellen konnten die A β -Spezies A β 42, A β 40, A β 39, A β 38 und A β 37 aufgereinigt und nachgewiesen werden.

Um eine quantitative Analyse durchzuführen, wurden die konditionierten Medien mit einem „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) genauer untersucht. Dazu wurden monoklonale Antikörper verwendet, die spezifisch den C-Terminus von A β erkennen, bzw. der myc-Antikörper, der den N-terminalen myc-„tag“ des APP und somit lösliches sAPP α und sAPP β erkennt. Die Detektion erfolgte mit biotinyliertem W0-2. Dieser erkennt den N-Terminus von A β und den C-Terminus von sAPP α , jedoch nicht sAPP β . Aus konditioniertem Medium koexprimierender Zellen wurden die relativen Mengen von sAPP α , A β 40 und A β 42 bestimmt, wobei der Wildtyp auf 100% gesetzt wurde. Bei den sAPP α -Mengen ließ sich nur für eine APP-APLP1-Linie eine signifikante Verringerung (um 20%) detektieren (Abb. 21B). Die Prozessierung durch die α -Sekretase wird also durch die Koexpression mit den APLPs nicht oder nur in geringem Maße beeinflusst. Da noch kein ELISA für die Detektion der β -geschnittenen Ektodomäne zur Verfügung steht, wurden die Mengen von sAPP β mittels eines C-terminal-endspezifischen Antikörpers (879) im Western Blot untersucht (Abb. 21A). Dabei konnte für die APP/APLP2 koexprimierenden Zellen eine leichte Erhöhung an sAPP β beobachtet werden. Interessanterweise kommt in diesen Zelllinien direkt unterhalb der sAPP β -Bande eine zusätzliche Bande hinzu, welche allerdings noch nicht genauer analysiert werden konnte. Die Menge an sAPP β der APP/APLP1 koexprimierenden Zellen wird gegenüber APP alleine etwas geringer. Die Effekte sind in beide Richtungen nicht besonders groß und müssten

deshalb genauer quantifiziert werden. Eine Quantifizierung der A β 40 und A β 42-Mengen ist in Abbildung 21C dargestellt. Die A β 40 Mengen von APP/APLP1-koexprimierenden Zellen unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant von den APP-Wildtypzellen. Interessanterweise erhöhte sich aber die Menge an A β 40 in den APP/APLP2-koexprimierenden Zellen um 20% bzw. 50% (zwei unterschiedliche Transfektionen). Dieser Effekt konnte auch für A β 42 beobachtet werden. Dabei erhöhte sich die A β 42-Menge gegenüber dem Wildtyp sogar um 30% bzw. 90%. Für A β 42 konnte überraschenderweise ein Effekt der APP/APLP1-Koexpression detektiert werden, die Menge an A β 42 reduzierte sich signifikant um 15-20%.

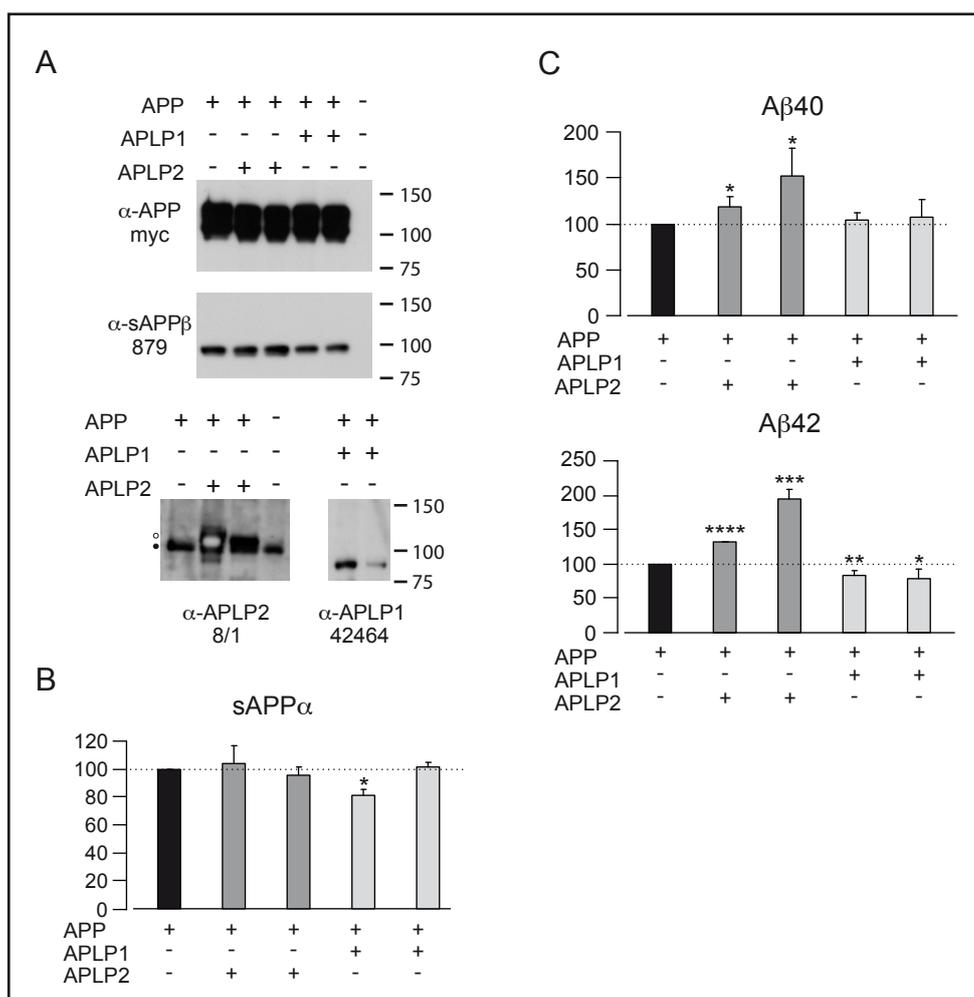


Abb. 21: Einfluss der Koexpression von APP mit APLP2 oder APLP1 auf die Prozessierung des APP.

A: Western Blot-Analysen der Lysate (Oben und Unten) und des Zellkulturmediums (Mitte). Detektion von sAPP β mit 879, Volllängen-APP mit α -myc; APLP1 mit 42464; APLP2 mit 8/1. Der gefüllte Kreis zeigt endogenes APLP2 an, der offene Kreis das überexprimierte APLP2-FLAG. B, C: Quantifizierung von sAPP α (B) sowie A β 40 und A β 42 (C) aus Zellkulturmedium mittels ELISA. Die nur APP-exprimierenden Zellen wurden auf 100% gesetzt, gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 3. Signifikanzen wurden mit dem Student t-Test berechnet. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,0005, **** p<0,0001.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Koexpression von APP mit den APLPs die Prozessierung des APP beeinflussen kann. Zusätzliches APLP2 provoziert die Entstehung von A β 40 und A β 42. Eine Koexpression mit APLP1 führt hingegen zu einer Verringerung der A β 42-Menge.

Möglicherweise stehen diese Effekte in direktem Zusammenhang mit den veränderten sAPP β -Mengen, welche für APLP1 zu einer leichten Erniedrigung, für APLP2 zu einer leichten Erhöhung führten.

2.2.4. Relevanz des N-Terminus für die Homo- und Heterodimerisierung

Der N-Terminus des APP ist entscheidend an der Strukturgebung des Volllängenproteins beteiligt und besteht aus mehreren unabhängigen Faltungseinheiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher N-terminal verkürzte Deletionsmutanten, von APP, APLP1 und APLP2 generiert. Um die Faltungseinheiten genauer zu charakterisieren, wurden die GFLD und CuBD bzw. der flexiblen saure Bereich deletiert. Da in der GFLD die „Loop“-Region enthalten ist und dieser Bereich eine wichtige Rolle spielt, wird die GFLD im Weiteren als „Loop“-Region bezeichnet. Für alle Proteine wurde das Signalpeptid des APP verwendet (siehe Methoden 6.1.2.4.). Die Mutanten, welche als Δ -Loop, Δ -E1 und Δ -E1-AcD bezeichnet werden, sind in Abbildung 22A schematisch dargestellt.

Bevor Studien zur Dimerisierung der Deletionsmutanten durchgeführt wurden, haben wir die subzelluläre Lokalisation mittels cLSM bestimmt. Für alle Deletionsmutanten konnten dabei vergleichbare Expressionsmuster wie die der entsprechenden Wildtyp-Varianten gezeigt werden (Abb. 22B). Auch im Western Blot ließen sich die entsprechend kleineren Proteine nachweisen (nicht gezeigt). Somit konnten wir zeigen, dass die Deletionsmutanten exprimiert werden und die subzelluläre Lokalisation nicht beeinflusst wird.

2.2.4.1. Homodimerisierung der Deletionsmutanten

Mittels FRET konnten die Deletionsmutanten nun auf ihre Fähigkeit untersucht werden Dimere auszubilden. Interessanterweise haben wir gefunden, dass die Domänen der einzelnen Proteine unterschiedliche Einflüsse auf die Dimerisierung ausüben. Dabei konnten wir für APP zeigen, dass die Deletion der „Loop“-Region (APP- Δ -Loop) zu einer über 50%igen Verringerung der FRET-Effizienz führte (Abb. 22C, oben). Eine weitere Verkürzung des N-Terminus (APP- Δ -E1 und APP- Δ -E1-AcD) resultierte in einer vollständigen Inhibition der Dimerisierung (Abb.

22C). Die Deletion der „Loop“-Region (APLP1- Δ -Loop) von APLP1 hatte hingegen nur einen minimalen Einfluss auf die Dimerisierung. Die FRET-Effizienz wurde erst durch das Fehlen der E1-Domäne (APLP1- Δ -E1) signifikant um 50% gesenkt (Abb. 22C Mitte). Die weitere Verkürzung um die saure Domäne (APLP1- Δ -E1-AcD) führte zu keiner weiteren Reduktion der FRET-Effizienz. Bei APLP2 wurde die Dimerisierung durch das Fehlen der „Loop“-Region (APLP2- Δ -Loop) sowie der E1- und sauren Domäne (APLP2- Δ -E1-AcD) vollständig inhibiert (Abb. 22C Unten). Die Daten für die Mutante APLP2- Δ -E1 fehlen, da diese im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr generiert werden konnte.

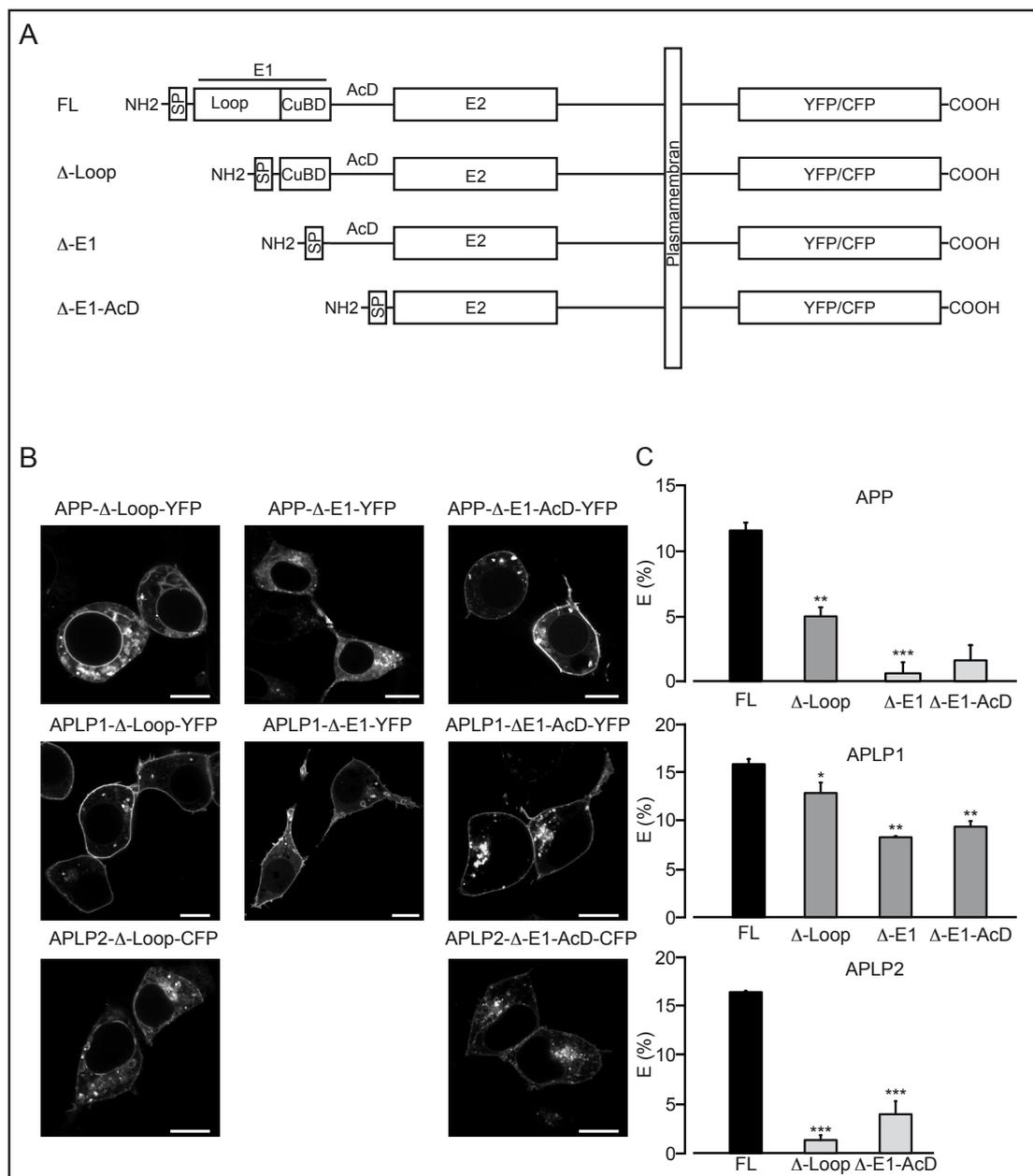


Abb. 22: Expression und Analyse von N-terminalen Deletionsmutanten der APP-Protein-Familie. A: Schematische Darstellung der N-terminalen Deletionsmutanten. FL: Vollängenprotein CuBD: Kupferbindedomäne, AcD: saure Domäne. B: Konfokale LSM-Bilder der YFP- oder CFP-markierten N-terminalen Deletionsmutanten. Gezeigt sind repräsentative Bilder von mindestens drei unabhängigen Transfektionen. Balken entsprechen 10 μ m. C: FRET-Analysen der N-terminalen Deletionsmutanten in HEK293-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der FRET-Effizienzen (E) von drei bis vier unabhängigen Transfektionen (jeweils 4 Messungen mit 3-5 Zellen). Signifikanzen wurden mit dem Student t-Test ermittelt, * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der Mechanismus der Homodimerisierung von APLP1 deutlich von den Mechanismen der APP- und APLP2-Homodimerisierung abweicht. Das ist besonders interessant, weil sich schon die Lokalisation von APLP1 sichtbar von den anderen Familienmitgliedern unterscheidet (Abb. 14), sich das APLP1-Loop-WT-Peptid bei der Bindung an den APP-N-Terminus offensichtlich von den entsprechenden "Loop"-Peptiden von APP und APLP2 abhebt und APLP1 auch evolutionär gesehen weiter von APP und APLP2 entfernt ist (Collin et al., 2004).

2.2.4.2. Heterodimerisierung der Deletionsmutanten

Neben der Homodimerisierung wurde nun untersucht, wie die einzelnen Deletionsmutanten die Heterodimerisierung mit den Vollängen-Varianten der APP-Familie beeinflussen. Dazu wurden die entsprechenden CFP-fusionierten Vollängen Proteine, sowie die YFP-fusionierten Deletionsmutanten koexprimiert und die FRET-Effizienzen ermittelt. Daraus ergaben sich die in Abbildung 23 zusammengefassten Ergebnisse. Zur besseren Darstellung sowie zum Vergleich, sind die FRET-Effizienzen der Homo- und Heterodimerisierung der entsprechenden Vollängenproteine aus Abb. 14 nochmals mit abgebildet.

In Abbildung 23A sind die Ergebnisse der APP-Mutanten dargestellt. Dabei führte die Deletion der „Loop“-Region (APP- Δ -Loop) in Kombination mit allen drei Vollängenproteinen zu einer signifikanten Verringerung der FRET-Effizienzen. Somit scheint die „Loop“-Region des APP, wie schon für die Homodimerisierung, auch für die Heterodimerisierung eine wichtige Rolle zu spielen. Dabei fiel auf, dass sich die FRET-Effizienzen der APP-Familie untereinander, im Gegensatz zu den signifikant abweichenden FRET-Effizienzen der Vollängenproteine alleine, jetzt auf einen Wert um circa 3% angeglichen haben. Bei Deletion der E1-Domäne (APP- Δ -E1) war die Dimerisierung mit allen Vollängenproteinen vollständig inhibiert. Interessanterweise erhöhten sich die FRET-Effizienzen wieder, wenn zusätzlich noch die saure Domäne (APP- Δ E1-AcD) entfernt wurde.

In Abbildung 23B sind die Daten für APLP1 zusammengefasst. Hier wurde deutlich, dass die „Loop“-Region von APLP1 auf die Dimerisierung mit den Vollängenproteinen ebenfalls

nur einen minimalen Einfluss hatte. Allerdings konnte ähnlich wie beim APP beobachtet werden, dass sich durch das Fehlen der „Loop“-Region die FRET-Effizienzen angleichen. Interessanterweise konnte dabei sogar eine leichte Erhöhung der APP-APLP1-FRET-Effizienz beobachtet werden. Die geringste FRET-Effizienz, wurde ähnlich wie bei APP, mit der APLP1- Δ -E1-Mutante erhalten. Ebenfalls analog zu APP, erhöhte sich die FRET-Effizienz durch die weitere Deletion des sauren Bereichs (APLP1- Δ -E1-AcD) wieder in etwa auf die Ebene der APLP1- Δ -Loop-Mutante.

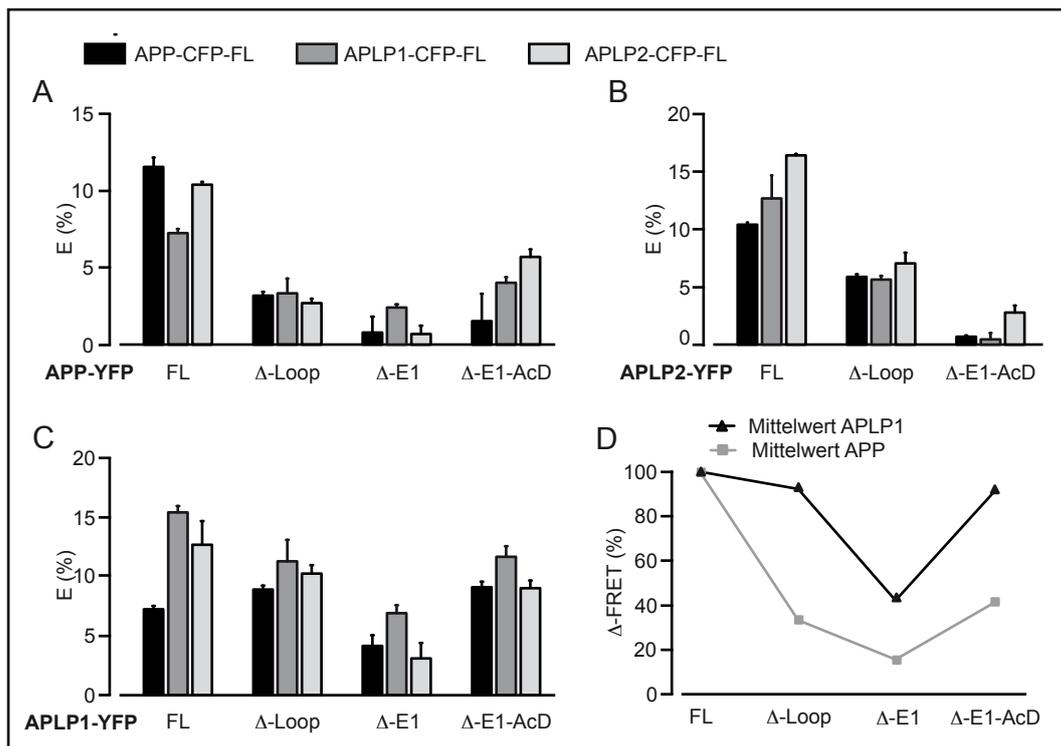


Abb. 23: Analyse der Heterodimerisierung der Deletionsmutanten mit den Volllängenproteinen der APP-Familie.

Entweder die mit YFP-fusionierten Volllängenvarianten (FL) oder Deletionsmutanten von APP (A), APLP2 (B) und APLP1 (C) wurden mit den entsprechenden CFP-fusionierten FL-Formen der APP-Familie koexprimiert. Dabei stehen für die Koexpression mit FL-APP schwarze Balken, für FL-APLP1 dunkelgraue Balken und für FL-APLP2 hellgraue Balken. Die Analyse der Interaktionen wurde mittels FRET durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der FRET-Effizienzen (E) von drei bis vier unabhängigen Transfektionen (jeweils 4 Messungen mit 3-5 Zellen). D fasst die Messungen von A und C zusammen. Gezeigt sind die Mittelwerte (%) der verringerten FRET-Effizienzen, wobei die entsprechenden Volllängenproteine auf 100% gesetzt wurden.

Fasst man die Daten der APP und APLP1 Deletionsmutanten in einer Grafik zusammen, ergibt sich ein möglicher mechanistischer Zusammenhang (Abb. 23D). Die Dimerisierung wurde sowohl bei APP als auch bei APLP1 am stärksten durch das Fehlen der E1-Domäne beeinträchtigt. Durch die zusätzliche Deletion des sauren Bereichs erhöhten sich die FRET-Effizienzen jedoch wieder auf den Wert der Δ -Loop-Mutanten. Neben der E1-Domäne befindet sich in der E2-Domäne zusätzlich ein Bereich mit hoch-konservierten hydrophoben Aminosäuren, die eine mögliche zweite Dimerisierungsstelle in der Ektodomäne darstellen. Die drastische Reduktion der Dimerisierung der Δ -E1-Mutanten sowie die Erhöhung der

FRET-Effizienz nach Entfernung der sauren Domäne legen nahe, dass die flexible saure Domäne die Interaktion der verbleibenden E2-Domäne stört. Des Weiteren wurde deutlich, dass die „Loop“-Region von APP entscheidend für die Homo- und Heterodimerisierung mit den Volllängenproteinen ist, wohingegen die „Loop“-Region von APLP1 die Dimerisierung mit den Volllängenproteinen nur geringfügig beeinflusst.

Für APLP2 wurde diese Analyse nur mit zwei Deletionsmutanten durchgeführt (Abb. 23C). Dabei konnte mit der APLP2- Δ -Loop Mutante eine mindestens 50%ige Reduktion der Dimerisierung gemessen werden. Auch hier konnte beobachtet werden, dass sich die FRET-Effizienzen auf einen Wert von etwa 6% angleichen. Mit der APLP2- Δ -E1-AcD Mutante wurde die Dimerisierung mit den Volllängenproteinen fast vollständig inhibiert.

Daraus kann abgeleitet werden, dass die N-Termini von APP, APLP1 und APLP2 entscheidend an der Homo- und Heterodimerisierung der APP-Familie beteiligt sind. Besonders der „Loop“-Bereich allein, sowie die gesamte E1-Domäne scheinen die Stärke der Heterointeraktionen zu beeinflussen. Möglicherweise vermittelt die „Loop“-Region die Spezifität, die gesamte E1-Domäne hingegen die Stärke bzw. Stabilität der Dimerisierung. Des Weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die hoch-konservierte E2-Domäne an der Stabilisierung der Homo- und Heterodimerisierung beteiligt ist.

2.2.5. Die Disulfidbrücke der APP-„Loop“-Region beeinflusst die Lokalisation und Dimerisierung des APP in lebenden eukaryotischen Zellen

Aus den Deletionsmutanten konnte abgeleitet werden, dass der N-Terminus entscheidend für die Dimerisierung der Proteine der APP-Familie ist. Um einen genauen Einblick in den Mechanismus und möglicherweise einen Hinweis auf direkt involvierte Aminosäuren zu bekommen, wurden die Cys-Reste an den Positionen 98 und 105 zu Ser-Resten ausgetauscht (Abb. 24A). Die Einzelmutanten, APP- LoopS1 und APP-LoopS2, sowie die Doppelmutante, APP- LoopSD wurden in HEK293-Zellen exprimiert und mittels cLSM auf ihre Lokalisation untersucht. Dabei fiel auf, dass alle LoopS-Mutanten keine oder nur eine sehr schwache Zelloberflächenlokalisierung aufwiesen (Abb. 24A). Das intrazelluläre Expressionsmuster

Plasmamembran sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurde die APP-LoopSD Mutante mit einer weiteren Punktmutation kombiniert. Dabei handelte es sich um die Mutation L613C, die spontan zu einer kovalenten Dimerisierung des APP führt (Munter et al., 2007). Die APP-LoopSD-L613C- Mutante, welche nachweislich noch Dimere ausbildet, konnte ebenfalls nicht an der Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 24A).

Anhand der APP-LoopS Mutanten wurde deutlich, dass ein einziger Aminosäureaustausch die Lokalisation und Dimerisierungseigenschaften des APP beeinflussen kann. Die fehlende Lokalisation in der Plasmamembran ist nicht auf die verringerte Dimerisierung, sondern vermutlich auf eine veränderte Konformation des N-Terminus zurückzuführen. Dies wird zusätzlich durch die Tatsache belegt, dass die APP-Deletionsmutanten die Plasmamembran noch erreichen (siehe auch Abb. 22B).

2.3. Funktionen der APP-Familie in der Zelladhäsion und mögliche Liganden

Die Proteine der APP-Familie interagieren über ihre Ektodomänen mit Zell-Matrix-Bestandteilen, wie Kollagen und Heparin, sowie mit den Metallionen Zink und Kupfer (Beher et al., 1996; Bush et al., 1993; Bush et al., 1994; Multhaup, 1994; Multhaup et al., 1994; Multhaup et al., 1995; Small et al., 1994). Die Trans-Dimerisierung von APLP1 und APLP2 wurde erstmals in *D. melanogaster* S2-Schneider-Zellen mittels eines Zelladhäsions-Essays beschrieben (Soba et al., 2005). In den HEK293-Zellen sollten nun mögliche Transinteraktionen der APP-Familie sowie der Einfluss verschiedener möglicher Effektoren genauer untersucht werden.

2.3.1. APLP1-vermittelte Zell-Zell-Kontakte

Bei der konfokalen LSM von APLP1-YFP-exprimierenden Zellen fiel auf, dass APLP1 vermehrt in Zell-Zell-Kontakten zu finden war (Abb. 25). Eine genauere Betrachtung der anderen Familienmitglieder, ergab, dass sich eine deutliche Häufung dieser Zell-Zell-Kontakte einzig für APLP1 beobachten ließ. Im Fall von APLP2-YFP wurden nur sehr vereinzelt Zell-Zell-Kontakte gesehen und bei der APP-YFP-Expression konnten überhaupt keine Kontakte beobachtet werden.

Somit scheint APLP1 neben der Cis-Dimerisierung (Kapitel 2.2.1.) auch in Transinteraktionen involviert zu sein.

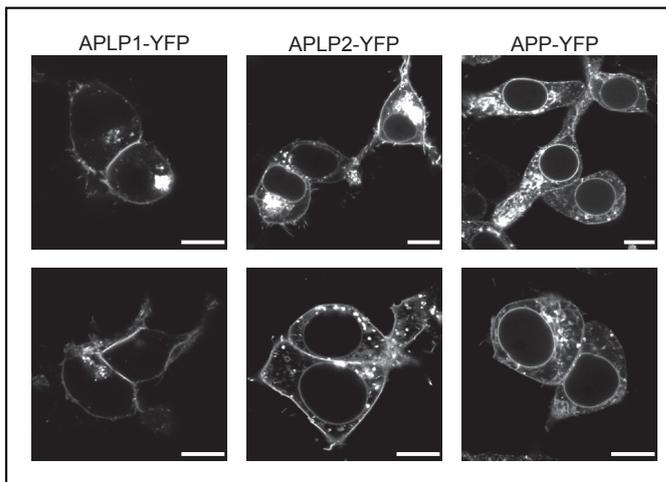


Abb. 25: Analyse von Zell-Zell-Kontakten der APP-Protein-Familie.

Konfokale LSM-Aufnahmen von transient APLP1-YFP, APLP2-YFP und APP-YFP exprimierenden Zellen. Nur bei APLP1 konnte eine Verstärkung der Fluoreszenz in den Zell-Zellkontakten beobachtet werden.

Im Falle eines strukturellen Netzwerkes aus Cis- und Trans-Dimerisierung müsste sich somit die Beweglichkeit der APLP1-Moleküle in der Plasmamembran drastisch verringern. Mittels „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP) konnten die Diffusionsgeschwindigkeiten des membranständigen APLP1-YFP bestimmt werden. Dazu wurde APLP1-YFP in HEK293-Zellen exprimiert. Bereiche in den Membranen (ca. 10-15 μm), außerhalb der Zell-Zell-Kontakte sowie in den Kontakten selbst, wurden mittels hoher Anregungsintensität ausgebleicht. Anschließend wurde die Kinetik der Rückdiffusion der fluoreszierenden Moleküle bestimmt. Diese gibt an, wie schnell sich die fluoreszenz-markierten Proteine in der Membran bewegen können. Die Diffusionsgeschwindigkeit von APLP1 innerhalb der Zell-Zell-Kontakte war gegenüber der Membran außerhalb der Kontakte signifikant verringert. Das deutet darauf hin, dass APLP1 in der Tat in einem strukturellen Netzwerk aus Cis- und Transinteraktionen involviert ist.

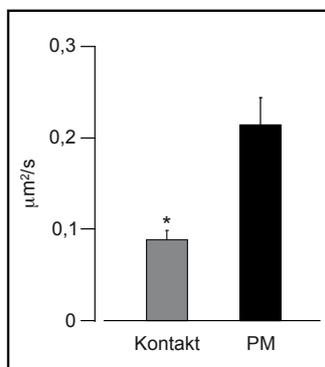


Abb. 26: Verringerte Diffusionsgeschwindigkeit von APLP1 in Zell-Zell-Kontakten.

Mittels FRAP („Fluorescence recovery after photobleaching“) wurden die Diffusionsgeschwindigkeiten von APLP1 in Zell-Zell-Kontakten und der Plasmamembran (PM) außerhalb der Kontakte bestimmt.

2.3.2. Zink vermittelte Cis- und Transinteraktionen

Es stellte sich die Frage, warum APLP1 in Transinteraktionen involviert ist, die anderen Familienmitglieder allerdings nicht. Daher wurden mögliche Effektoren getestet, die an die Ektodomänen binden und so möglicherweise die Transinteraktionen vermitteln könnten. Besonders auffällig war die hoch-konservierte Zink-Bindestelle, die schon in den APP-homologen Proteinen in *D. melanogaster* und *C. elegans* vorkommt (Abb. 27).

	180	190	200
DmAPPL	S F A M L L P C G I S V F S G V E E V C C P	K H F K T D	
CeAPL-1	S F A V L E P C A L D M F T G V E E V C C P	N D Q T N K	
HsAPP770	D Y G M L L P C G I D K F R G V E E V C C P	L A E E S D	
HsAPLP2763	S Y G M L L P C G V D Q F H G T E E V C C P	Q T K I I G	
HsAPLP1	G S G M L L P C G S D R F R G V E E V C C P	P P G T P D	

Abb. 27: Konservierte Zinkbindestelle in der APP-Protein-Familie. Aminosäuresequenzvergleich. Konservierte Aminosäuren sind in roten Blöcken, konservativ ausgetauschte Aminosäuren in roter Schrift markiert. Die Nummerierung bezieht sich auf DmAPPL

Initial wurden APLP1-YFP-, APLP2-YFP- und APP-YFP exprimierende Zellen mit 200 μM ZnCl_2 in HBS-Puffer im Brutschrank inkubiert. Überraschenderweise konnten nach der Inkubation sowohl für APLP1 als auch für APLP2 sehr deutliche Zell-Zell-Kontakte beobachtet werden (nicht gezeigt). Somit könnte Zink tatsächlich ein möglicher Kandidat für einen Effektor der APP-Familie sein. Für APP konnten wir diesen Effekt nicht beobachten, was vermutlich daran liegt, dass im Vergleich zu APLP1 und APLP2 deutlich weniger APP an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Um die Wirkung des Zinks genauer zu untersuchen, wurden die Pufferbedingungen und Konzentrationen dem physiologischen Bereich (15 μM im Plasma, im Gehirn zeitweilig bis 300 μM) angepasst (Frederickson, 1989). Für die cLSM-Messungen wurde standardmäßig ein Puffer ohne BSA, Calcium und Magnesium verwendet und das ZnCl_2 in einer Konzentration von 50 μM eingesetzt. In Abbildung 28 sind die Daten für APLP1 und APLP2 zusammengefasst. Durch die Zugabe von 50 μM ZnCl_2 bildeten sich in der Membran der APLP1-YFP- und APLP2-YFP-exprimierenden Zellen innerhalb von Sekunden „Cluster“ aus. Diese verstärkten sich bei längerer Inkubation, so dass in Teilen der Membran keine Fluoreszenz mehr detektierbar war und die in Abbildung 28A gezeigten „punktuellen Muster“ in den Membranen entstanden. Durch die zusätzliche Gabe von 400 μM EDTA konnte der Effekt, ebenfalls innerhalb von Sekunden rückgängig gemacht werden. Als Kontrolle wurde Glykophorin A, welches wie APLP1 hauptsächlich an der Zelloberfläche lokalisiert ist, mit den gleichen Mengen ZnCl_2 und EDTA behandelt und zeigte keinen Effekt. Der Effekt konnte auch nicht durch die Inkubation mit 1 mM CaCl_2 sowie 1 mM MgCl_2 ausgelöst werden (Abb. 28C). Die Spezifität wurde mit CoCl_2 gezeigt, welches einen ähnlichen Ionenradius wie Zink besitzt,

und ebenfalls nicht zu einer „Cluster“-Bildung führte. Kupfer war das einzige untersuchte Metallion, mit dem ein ähnlicher Effekt erzielt werden konnte (Abb. 28C). Da im Vergleich zu APLP1 und APLP2 nur wenig APP an der Zelloberfläche exprimiert wird, war es schwierig für die Zink-Analysen vergleichbare Zellen zu finden. Wir konnten in APP-exprimierenden Zellen nicht zeigen, dass APP „Cluster“ bildet. Allerdings konnte bei Inkubation von APP mit Zink im Brutschrank, eine Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, auch zu nicht transfizierten Zellen, beobachtet werden (nicht gezeigt).

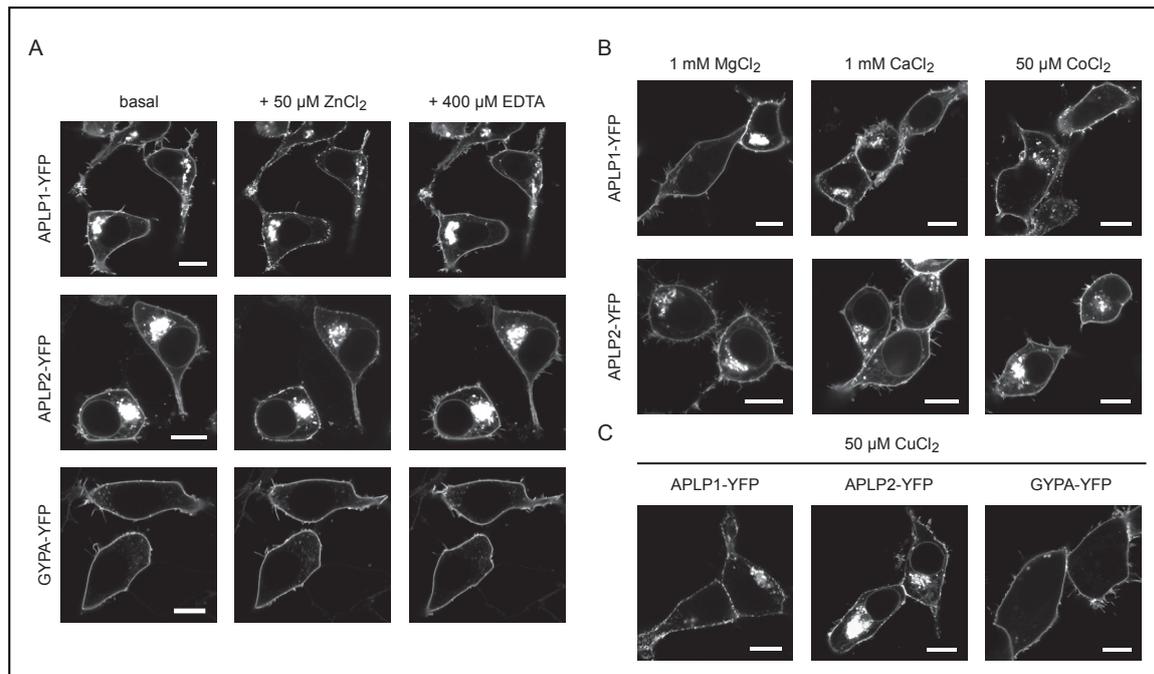


Abb. 28: Der Einfluss von Zink und Kupfer auf APLP1 und APLP2.

A: APLP1-, APLP2- und GYPA-YFP-exprimierende Zellen (basal, links) wurden mit 50 µM ZnCl₂ (mitte) inkubiert und nach 5 Minuten ein Bild aufgenommen. Nach 10 Minuten erfolgte die Inkubation mit 400 µM EDTA, wobei nach 12 min konfokale LSM-Bilder aufgenommen wurden. B: APLP1- und APLP2-YFP-exprimierende Zellen wurden mit 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ sowie 50 µM CoCl₂ inkubiert und nach 5 min bildlich festgehalten. C: Konfokale LSM-Aufnahmen von APLP1-, APLP2- und GYPA-YFP-exprimierende Zellen, die 5 min mit 50 µM CuCl₂ inkubiert wurden.

Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass die extrazelluläre Zugabe eines Liganden/ Effektors, Zink, das Verhalten der APP-Familie hinsichtlich ihrer Lokalisation beeinflusst.

2.3.3. Zink verstärkt die Cis-Dimerisierung von APLP1 und APLP2

Aufgrund der „Cluster“-Bildung lag es nahe zu vermuten, dass die cis-Dimerisierung des APLP1 verstärkt wird. Dazu wurden dynamische FRET-Messungen (ohne Bleichen des Akzeptors) durchgeführt. Tatsächlich führte die Anwesenheit von ZnCl₂ im Analysepuffer zu einer sofortigen Erhöhung der FRET-Effizienz (Abb. 29A, bei ca. 220s). Diese wurde durch EDTA wieder auf den Ausgangswert zurückgeführt (Abb. 29A, bei ca. 460s). Mit den FRET-

Messungen wurde so eine Quantifizierung des Effektes von Zink auf APLP1 möglich. Dazu wurde eine Kinetik erstellt und in halblogarithmischen Schritten eine Konzentrationsreihe (100 nM bis 1 mM ZnCl_2) über die Änderung der FRET-Effizienz gemessen (Abb. 29B).

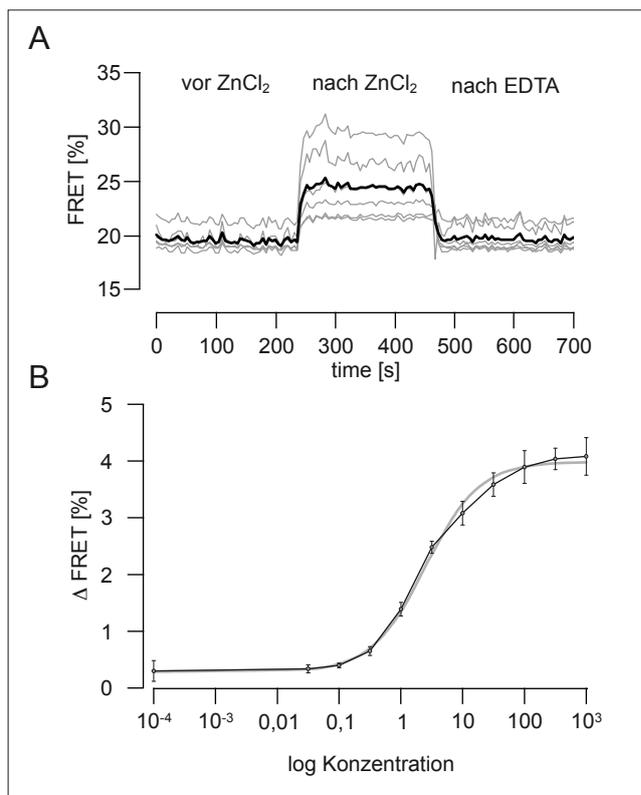


Abb. 29: Dynamische FRET-Analysen von APLP1 mit ZnCl_2 und EDTA.

A: Ausschnitt einer Dynamik mit Zink- und EDTA-Gabe. Graue Linien stellen Einzelzellen dar, die schwarze Linie den Mittelwert. Aufgetragen wurde die FRET-Effizienz (E) über die Zeit. B: Kinetik der Erhöhung der FRET-Effizienz von APLP1 in Anwesenheit von Zink. Aufgetragen wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Differenz der FRET-Erhöhung durch Zink ($\Delta\text{-FRET}[\%]$) über den Logarithmus der eingesetzten ZnCl_2 -Konzentration. Berechnung erfolgte aus vier Transfektionen mit jeweils 6-8 gemessenen Einzelzellen (graue Punkte). Daraus wurde der „Fit“ (graue Linie) des Hill-Plots mit 4 Parametern, wobei die Kooperativität = 1 gesetzt wurde, erstellt.

Mittels des Programms Sigma-Plot (1997) wurde ein Fit erstellt. (Hill-Gleichung mit 4 Parametern, siehe Methoden). Darüber konnten der EC_{50} sowie die Kooperativität bestimmt werden. Der EC_{50} gibt die Konzentration an ZnCl_2 an, die für eine halbmaximale Erhöhung der FRET-Effizienz benötigt wird. Der EC_{50} für ZnCl_2 und APLP1 lag bei $2,5 \mu\text{M}$ und befindet sich damit im physiologischen Bereich. Die Kooperativität wird über den Hill-Koeffizienten charakterisiert. Ist der Hill-Koeffizient größer als eins, so liegt positive Kooperativität vor, das heißt, die Bindung eines Liganden erleichtert die Bindung weiterer Liganden. Im umgekehrten Fall der negativen Kooperativität (Hill-Koeffizient < 1) wird die Bindung weiterer Liganden durch die vorhergehende Bindung eines Liganden erschwert. Für unsere Kinetik wurde ein Hill-Koeffizient um 1 berechnet. Das bedeutet, dass die Bindung von Zink an APLP1 nicht kooperativ verläuft. So besteht die Möglichkeit, dass entweder nur ein Zinkion oder aber mehrere Zinkionen unabhängig voneinander an APLP1 binden. Die FRET-Effizienzen der APLP2-Homoineraktion erhöhten sich in Anwesenheit von Zink ebenfalls (nicht gezeigt).

Folglich können in APLP1- und APLP2-exprimierenden Zellen durch die Zugabe von Zink in physiologischen Konzentrationen möglicherweise zwei Effekte ausgelöst werden. Erstens

eine Verstärkung bestehender oder die Vermittlung von Transinteraktionen und zweitens eine Verstärkung der Cis-Interaktionen in „Clustern“ in der Plasmamembran.

3. Diskussion

3.1. Analyse der Oligomerisierung der Proteine der APP-Familie in *P. pastoris*

3.1.1. Homodimerisierung

Kürzlich konnten wir nachweisen, dass die Dimerisierung der Transmembransequenz (TMS) des APP durch drei konsekutive GxxxG-Motive vermittelt wird (Munter et al., 2007). Allerdings konnte in FRET-Analysen gezeigt werden, dass eine gestörte Interaktion in der TMS keinen Einfluss auf die Dimerisierung des Volllängen-APP ausübt (Munter et al., 2007). Folglich hängt die Dimerisierung des Volllängen-APP von den Kontaktstellen in der Ektodomäne ab. Daher wurden in *P. pastoris* zunächst nur die Ektodomänen der APP-Protein-Familie untersucht. Mit den Analysen der Oligomerisierung des löslichen APP konnte ich zeigen, dass die Ektodomäne hinreichend für die Dimerisierung ist. Das steht im Einklang mit publizierten Daten. Bisher konnten im APP zwei Regionen, die möglicherweise eine Dimerisierung vermitteln, eingegrenzt werden. Das waren der N-terminale Bereich des APP mit der „Loop“-Region (GFLD, siehe Kapitel 1.2.5.) und die APP-E2-Domäne (Behr et al., 1996; Rossjohn et al., 1999; Scheuermann et al., 2001; Wang und Ha, 2004). Von der in Bakterien rekombinant hergestellten APP-E2-Domäne (Aminosäuren 365-566) konnte sogar ein antiparalleles Dimer kristallisiert werden (Wang und Ha, 2004). Anhand der Kristallstruktur zeigte sich, dass sich das antiparallele Dimer über eine Anlagerung der N-terminalen, doppelsträngig ineinander gewundenen Helixstruktur („coiled coil“) des einen Monomers an die C-terminale dreisträngige „coiled coil“ Struktur des zweiten Monomers bildet (Wang und Ha, 2004). Im Gegensatz dazu steht eine Publikation, in der die verkürzte APP-E2-Domäne (Aminosäuren 460-576) als Monomer beschrieben wurde (Dulubova et al., 2004). Die beiden N-terminalen α -Helices, welche entscheidend an der APP-E2-Dimerisierung beteiligt sind, fehlen in dem rekombinanten Protein von Dulubova et al., weshalb vermutlich nur Monomere erhalten wurden (Dulubova et al., 2004; Wang und Ha, 2004). Unsere Daten widersprechen den Publikationen einer anderen Arbeitsgruppe, die für ebenfalls aus *P. pastoris* gereinigte lösliche Ektodomänen aller APP-Isoformen ausschließlich Monomere gezeigt haben (Gralle et al., 2002; Gralle und Ferreira, 2007; Gralle et al., 2006). Vermutlich führen die abweichenden Aufreinigungsmethoden und

Ionenstärken der verwendeten Puffer zu einer veränderten Oligomerisierung der Ektodomänen während der Aufreinigung.

Für die löslichen Ektodomänen der homologen Proteine APLP1 und APLP2 konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine Di- und Oligomerisierung gezeigt werden. Der Anteil an Monomeren war bei allen drei Familienmitgliedern sehr gering, von 0% bei APLP2 bis 20-30% bei APP und APLP1. Möglicherweise waren die Methoden nicht empfindlich genug, um auch APLP2-Monomere nachzuweisen.

3.1.2. Analyse des APP-N-Terminus (APP18-350)

Um die Interaktionsstellen der APP-Dimerisierung in der Ektodomäne, außerhalb der E2-Domäne, genauer zu charakterisieren, wurde die N-terminale Domäne, das APP18-350, untersucht. In der Gelpermeationschromatographie wurden keine Monomere, etwa 80% Dimere sowie 20% Tetramere und höhere Oligomere des APP18-350 detektiert und gereinigt. Hier zeigte sich, dass der geringe Anteil an Monomeren bei der Aufreinigung der gesamten APP-Ektodomäne zugunsten von Dimeren und Oligomeren verschoben wurde. Das bedeutet, dass der N-Terminus des APP hinreichend für eine Dimerisierung ist. Der Monomeranteil im sAPP770 α könnte sich möglicherweise durch intramolekulare Interaktionen zwischen der E1- und E2-Domäne des APP erklären lassen, allerdings haben wir dazu keine experimentellen Evidenzen. Ebenso könnten Bereiche innerhalb der Ektodomäne für eine vollständige Dimerisierung störend wirken. Im SDS-Gel wurde deutlich, dass die nativen Dimere aus der Gelpermeationschromatographie SDS-labil waren. Um sie dennoch im Gel sichtbar zu machen, wurden sie kreuzvernetzt. Dabei konnten allerdings nur etwa 20% der Dimere kovalent verbunden werden, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass die Kreuzvernetzungsreaktion nicht vollständig abgelaufen ist. Auch bei der APP-E2-Domäne, welche vollständig beim Molekulargewicht des Dimers eluierte und sogar als Dimer kristallisiert wurde, konnten nur etwa 20% der Dimere kovalent verbunden werden (Wang und Ha, 2004). Ein Peptid, welches die „Loop“-Region des APP darstellt (APP-Loop-WT), konnte die Bildung des kreuzvernetzten Dimers teilweise inhibieren. Dieses Peptid bindet spezifisch an APP18-350 und führt in stabil APP-exprimierenden SH-SY5Y-Zellen zu einer signifikanten Reduktion von sAPP β sowie A β 40 und A β 42 (Kaden et al., 2007/2008). Das bedeutet, das APP-Loop-

WT-Peptid beeinflusst nicht nur die Dimerisierung von APP18-350 sondern auch massiv die Prozessierung des Vollängen-APP in lebenden Zellen. In einem *in vitro* Ansatz konnte gezeigt werden, dass das APP-Loop-WT-Peptid die Aktivität der β -Sekretase BACE-1 nicht beeinflusst (Kaden et al., 2007/2008). Das heißt, das APP-Loop-WT-Peptid beeinträchtigt möglicherweise durch eine Konformationsänderung im APP die Erkennung oder Bindung des Substrates APP an BACE-1. Anhand von NMR-Messungen konnte gezeigt werden, dass die Faltungseinheiten („Loop“-Region bzw. GFLD, CuBD und KPI) sich unabhängig voneinander bewegen. Somit könnte es sich bei dem gereinigten Protein auch um ein kurzlebiges Dimer handeln (Kaden et al., 2007/2008). Die NMR-Spektren von Komplexen aus APP18-350 und dem Peptid APP-Loop-WT, zeigten kleine chemische Verschiebungen definierter Aminosäuren in der „Loop“-Region, CuBD und dem sauren Bereich, es konnten aber keine großen Konformationsänderungen im Protein beobachtet werden (Kaden et al., 2007/2008). Das bedeutet, dass das APP-Loop-WT-Peptid nicht in einer definierten Bindungstasche an das APP18-350 bindet. Basierend auf den NMR- und biochemischen und Daten kann spekuliert werden, dass die Bindung des APP-Loop-WT-Peptids durch konformationelle Änderungen benachbarter Domänen die Dimerisierung des APP beeinflusst. Dazu konnte folgendes Modell aufgestellt werden (Abb. 30).

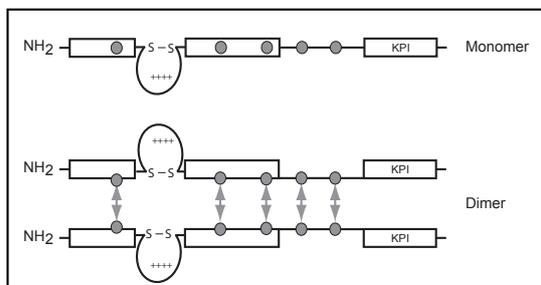


Abb. 30: Modell der Homodimerisierung des APP. Der oberflächenexponierte „Loop“ bildet die initialen Kontaktstellen der Dimerisierung. Diese wird stabilisiert über konservierte, hydrophobe Reste in den folgenden Domänen.

Die Dimerisierung wird initial durch Kontakte zwischen der „Loop“-Region vermittelt. Dadurch erfährt das APP eine Konformationsänderung, die hydrophobe Aminosäuren benachbarter Domänen einbezieht und so über hydrophobe Wechselwirkungen die Dimerisierung stabilisiert. Dass neben der „Loop“-Region weitere Aminosäuren an der Dimerisierung beteiligt sind, zeigen auch die Experimente mit dem rekombinanten Protein APP18-350-Loop-Ser. In der Gelpermeationschromatographie konnte mit dem mutierten Protein kein verändertes Elutionsverhalten beobachtet werden. Das zeigt, dass eine Dimerisierung von APP18-350 auch ohne die Disulfidbrücke möglich ist und daran andere, möglicherweise die konservierten, hydrophoben Aminosäuren beteiligt sind.

3.1.3. Bindungsstudien mit APP18-350

Da das APP-Loop-WT-Peptid die Dimerisierung und Prozessierung des APP beeinflusst, ist es von erheblicher Bedeutung, wo das APP-Loop-WT-Peptid an APP18-350 bindet. Um diese Fragestellung aufzuklären, wurden umfangreiche SPR-Analysen durchgeführt. Daraus ergaben sich die folgenden Resultate: (1) Das APP-Loop-WT-Peptid bindet spezifisch an APP18-350-WT und APP18-350-Loop-Ser. (2) Das APP-Loop-WT-Peptid bindet auch spezifisch an das APP-Loop-WT-Peptid. (3) Das Peptid APP-Loop-Ser zeigt nur schwache, unspezifische Bindungen an APP18-350-WT, APP18-350-Loop-Ser und APP-Loop-WT-Peptid. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ausbildung der Disulfidbrücke notwendig ist, um eine spezifische Bindung des APP-Loop-WT-Peptids an APP18-350 zu vermitteln. Die hohe Affinität der APP-Loop-WT-Peptid-Peptid-Interaktion legt die Vermutung nahe, dass eine homophile Bindung in diesem Bereich stattfinden kann. Ergänzend dazu, bindet das Peptid APP-Loop-WT auch mit hoher Affinität an das Protein APP18-350-Loop-Ser. Somit kann der "Loop"-Bereich nicht die einzige Bindestelle sein. Die Affinität des APP-Loop-WT-Peptids für APP18-350-Loop-Ser ist sogar um den Faktor 10 höher als für APP18-350-WT. Daher kann spekuliert werden, dass die "Loop"-Region im APP18-350 nicht unmittelbar an der Bindung des APP-Loop-WT-Peptids beteiligt ist. Im Vergleich mit APP18-350-WT hat in APP18-350-Loop-Ser vermutlich eine konformationelle Änderung stattgefunden, die zu einer erleichterten Bindung des APP-Loop-WT-Peptids führte. Die spezifischen Wechselwirkungen des APP-Loop-WT-Peptids sowohl mit dem Peptid als auch den Proteinen bestätigen die NMR-Analysen, Inhibitionsexperimente und Analysen der Prozessierung, die zeigen, dass die Bindung nicht in einer definierten Tasche stattfindet, sondern vermutlich die Konformation des gesamten Proteins beeinflusst.

3.1.4. Heterodimerisierung

Die Ektodomänen der Proteine der APP-Familie sollten auch auf ihre Fähigkeit untersucht werden Heterodimere auszubilden. In mit den Ektodomänen der APP-Familie kotransformierten Hefezellen war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, die Heterodimerisierung der APP-Protein-Familie nachzuweisen. Ob tatsächlich keine Heterodimere in den Hefen existieren

oder die Methoden nicht empfindlich genug waren, diese zu detektieren, konnte nicht geklärt werden. Ursächlich für die fehlenden Heterodimere könnte beispielsweise eine deutlich höhere Affinität der jeweiligen Homodimere sein. In der Literatur und auch aus meinen eigenen Daten gibt es jedoch viele Anhaltspunkte, die auf mögliche Heterointeraktionen hinweisen. Die durch Bindung des APP-Loop-WT-Peptids an APP18-350-WT beeinflussten Aminosäuren sind in der APP-Familie größtenteils konserviert (Kaden et al., 2007/2008). Die Kontaktflächen des antiparallelen APP-E2-Dimers enthalten viele hydrophobe Aminosäuren, von denen 58% in der APP-Familie ebenfalls konserviert sind (Wang und Ha, 2004). Die hohe Identität der Aminosäuren in diesen dimerisierungsrelevanten Bereichen könnte bedeuten, dass die APLPs auf ähnliche Weise wie APP homophile Interaktionen ausbilden können. Zusätzlich könnte aber auch die Heterodimerisierung über diese Bereiche reguliert werden. Unterstützt wird diese Theorie dadurch, dass das APLP2-Loop-WT-Peptid spezifisch an APP18-350-WT, APP18-350-Loop-Ser und das APP-Loop-WT-Peptid bindet. Das liefert erste Anhaltspunkte dafür, dass die Heterodimerisierung von APP und APLP2 möglicherweise mechanistisch der Homodimerisierung des APP ähnelt. Das APLP1-Loop-WT-Peptid hingegen zeigte keine spezifischen Wechselwirkungen mit APP. Dies verwundert wenig, da sich die Aminosäuren im APLP1-Loop deutlich von APP und APLP2 unterscheiden (siehe Kapitel 1.2., Abb. 31). Folglich wird eine mögliche Heterodimerisierung von APP und APLP1 wahrscheinlich nicht über die APLP1-„Loop“-Region vermittelt.

	110	120	130	140
DmAPPL	GWCRQGalNAAK	KGSHRWIKPFRCLG	PFQSDALLVPEG	
CeAPL-1	DWCRE..EGS..	QKWTHSVRPYHCIDG	EFHSEALQVP	HD
HsAPP770	NWCRR..GRK.Q	CKTHPHFVIPYRCLV	GEFVSDALLV	PDK
HsAPLP2/763	NWCRR..DKK.Q	CKSR..FVTPFKCLV	GEFVSDVLLV	PEK
HsAPLP1	RWCGG..SRSGS	AHPHHQVVPFERCL	PGEFVSEALLV	PEG

Abb. 31: Aminosäuresequenzvergleich der „Loop“-Region. Konservierte Aminosäuren sind in roten Blöcken, konservativ ausgetauschte Aminosäuren in roter Schrift markiert. Die Nummerierung bezieht sich auf DmAPPL.

3.2. Analyse der Oligomerisierung der APP-Protein-Familie in höheren eukaryotischen Zellen

3.2.1. Subzelluläre Lokalisation

Die isolierte Untersuchung der Ektodomänen und die *in vitro* Bindungsstudien lieferten erste Einblicke in mögliche Mechanismen der Dimerisierung der APP-Protein-Familie. Um diese Interaktionen in lebenden Zellen zu untersuchen, wurden die Vollängenproteine am

C-Terminus mit YFP und CFP markiert und mittels cLSM und FRET analysiert. Es gab bisher nur wenige hoch aufgelöste Untersuchungen zur Lokalisation der APP-Familie (Munter et al., 2007). Vergleichende Analysen aller drei Proteine in einer Zelllinie wurden nicht publiziert. Interessanterweise wiesen die Proteine der humanen APP-Familie in lebenden HEK293-Zellen distinkte subzelluläre Lokalisationen auf. Der Hauptunterschied bezog sich dabei besonders auf die Zelloberflächenlokalisation. Das verwundert, da alle drei Proteine Typ-I-Transmembranproteine sind und eine ähnliche Domänenstruktur aufweisen. Im Vergleich der APP-Familienmitglieder zeigte APP die geringste Zelloberflächenlokalisation. In embryonalen Mausneuronen (E15) wurden nur 5% des APP an der Zelloberfläche detektiert (Brouillet et al., 1999). Auch in Cos-7-Zellen wurde der Anteil an APP695-GFP in der Plasmamembran nur auf 23% des gesamten APP bestimmt (Domingues et al., 2007). Eine prozentuale Verteilung von APP in der Plasmamembran im Vergleich zu intrazellulären Kompartimenten wurde in den HEK293-Zellen nicht ermittelt. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen an den Cos-7-Zellen konnte aus den konfokalen Bildern allerdings abgeschätzt werden, dass nicht mehr als 20% des APP695 in der Plasmamembran residieren (siehe auch Abb. 14 Ergebnisteil). Es besteht die Möglichkeit, dass der hohe Anteil an intrazellulärem APP durch die Überexpression zustande kommt. Das ist aber sehr unwahrscheinlich, weil das APP-homologe Protein APLP1 bei ähnlich hoher bzw. sogar höherer Überexpression in den konfokalen Aufnahmen schätzungsweise mit 80-100% an der Zelloberfläche detektiert wurde. Eine Erklärung dafür könnten die unterschiedlichen Signalsequenzen von APP und APLP1 sein. Diese Möglichkeit kann ebenfalls nahezu ausgeschlossen werden, da die APLP1-Deletionsmutanten, die als chimäre Konstrukte die APP-Signalsequenz enthalten, ähnlich gut an der Zelloberfläche lokalisiert waren wie die Vollängenkonstrukte mit der APLP1-Signalsequenz. Hinsichtlich der Lokalisation stellte APLP2 eine Mischform zwischen APP und APLP1 dar, weil sowohl ein großer Anteil an der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert war. Die von APP und APLP1 abweichende Verteilung ist ein weiteres Indiz dafür, dass die subzelluläre Lokalisation nicht einfach das Resultat einer zu starken Überexpression ist.

3.2.2. Charakterisierung der Koloalokalisation der APP-Protein-Familie

Bei der Betrachtung von APP und APLP1 in koexprimierenden Zellen, wurde deutlich,

dass ein erhöhter Anteil des APLP1 in intrazellulären Kompartimenten zurückgehalten wurde. Dies könnte durch eine Heterointeraktion von APP und APLP1 im ER oder Golgi-Apparat erklärt werden, welche dazu führt, dass nur ein kleinerer Anteil des APLP1 an die Plasmamembran transportiert wird. Das wird dadurch untermauert, dass wir mittels FRET und Koimmunpräzipitationen tatsächlich die Heterointeraktion von APP und APLP1 in lebenden Zellen zeigen konnten. Demgegenüber wäre es aber auch denkbar, dass die Endozytose von APLP1 in Anwesenheit von APP erhöht ist. Die Internalisierung der Proteine der APP-Familie wird durch die Konsensussequenz „NPXY“ in der zytoplasmatischen Domäne vermittelt und erfolgt im Komplex mit Fe65 und LRP (Bonifacino und Traub, 2003; Lichtenthaler, 2006). Kürzlich wurde in einer Studie gezeigt, dass das α -Sekretase „ectodomain shedding“ von APP durch APLP1 positiv reguliert werden kann, indem die beiden Proteine um den Komplex mit LRP und Fe65 und damit die Endozytose konkurrieren (Neumann et al., 2006). APP steht somit länger als Substrat für die α -Sekretase zur Verfügung. Auch wenn in dieser Studie die Internalisierung des APLP1 nicht isoliert untersucht wurde, sind die folgenden Szenarien vorstellbar. (1) Die Kolokalisation von APP und APLP1 wird direkt durch die Heterointeraktion der beiden Proteine beeinflusst. (2) Heterokomplexe mit anderen Proteinen wie Fe65 und LRP beeinflussen wechselseitig die Lokalisation von APP und APLP1.

3.2.3. Homo- und Heterodimerisierung der APP-Familie

Die Bedeutung der Homo- und Heterodimerisierung der APP-Familie *in vivo* konnte bisher durch die Kreuzvernetzung von endogenen Homodimeren in SH-SY5Y-Zellen sowie Koimmunpräzipitationen von endogenen Heterodimeren aus Hirnhomogenaten von Mäusen gezeigt werden (Scheuermann et al., 2001; Soba et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels FRET und Koimmunpräzipitationen die Homo- und Heterodimerisierung der APP-Familie in lebenden Zellen genauer charakterisiert werden. Auch wenn die Proteine in dieser Untersuchung überexprimiert wurden, so stellen FRET und die Bildgebung („imaging“) der fluoreszenzmarkierten Proteine durch cLSM sehr elegante Methoden dar, um den Einfluss der Faltungseinheiten zu untersuchen. Zusätzlich kann direkt das Verhalten der Proteine auf die Gabe extrazellulärer Substanzen, z.B. möglicher Liganden untersucht werden. Bisher wurde FRET in mehreren Publikationen zur Kartierung von Interaktionsdomänen und auch zur

Analyse von Rezeptor-Homo- und Heterodimerisierungen erfolgreich angewendet (Barnes, 2006; Hellwig et al., 2005; Voigt et al., 2005). Eine Quantifizierung aus den FRET-Effizienzen der Homo- und Heterodimerisierung ist zwar grundsätzlich möglich, allerdings sollte ein daraus abgeleiteter Vergleich der Stärken der Dimerisierung innerhalb der humanen APP-Protein-Familie mit Vorsicht betrachtet werden. Die FRET-Effizienzen sind letztendlich ein Abstandsmaß, welche neben der unmittelbaren Nähe, die die Proteine zueinander haben müssen, auch von den Positionen der Fluorophore zueinander abhängen. Diese kann sowohl von der Länge des „Linkers“ zwischen Proteinsequenz und Fluorophor als auch der Proteinsequenz selbst abhängen. Die Aminosäureanzahl der C-terminalen Domänen von APP, APLP1 und APLP2 ist identisch. Zusätzlich weisen alle drei Proteine besonders im extremen C-Terminus eine hohe Sequenzidentität auf (siehe Abb. 2, Einleitung). Die Fusion mit den Fluorophoren erfolgte außerdem über die gleichen Schnittstellen, so dass die verbindenden Aminosäuren ebenfalls identisch waren. Zu einem gewissen Maß ist daher ein Vergleich der FRET-Effizienzen untereinander möglich und führt zu den folgenden Schlussfolgerungen. (1) Die Homodimerisierung der APLPs ist stärker als die Homodimerisierung von APP. (2) Die Stärke der Heterodimerisierung hängt vom Grad der Kolokalisation ab. (3) Die Homodimerisierung scheint für alle Familienmitglieder stärker zu sein, als die heterophilen Interaktionen mit den homologen Proteinen. Eine Ausnahme stellt dabei möglicherweise das APP dar. Die FRET-Effizienzen der APP-Homodimerisierung sind vergleichbar mit den FRET-Effizienzen der APP-APLP2-Heterodimerisierung. Das könnte bedeuten, dass ähnlich viele APP-APP-Homodimere wie APP-APLP2-Heterodimere in der Zelle existieren. Zusätzlich belegt wird diese Theorie mit den *in vitro* Bindungsstudien, die zeigten, dass die Affinität des APLP2-Loop-WT-Peptids an APP18-350-WT deutlich höher war als die Affinität des APP-Loop-WT-Peptids.

3.2.4. Einfluss der Heterodimerisierung der APP-Protein-Familie auf die Prozessierung des APP

Bisher ist noch nicht geklärt, ob und wie die APLPs möglicherweise den Beginn oder die Progression der Alzheimer Krankheit beeinflussen. Allerdings konnte APLP2 in Subpopulationen von Neuronen, aktivierten Astrozyten und neuritischen Plaques detektiert werden (Crain et al., 1996; McNamara et al., 1998). Auch APLP1 wurde in Subpopulationen

neuritischer Plaques nachgewiesen (Bayer et al., 1997; McNamara et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Heterointeraktionen innerhalb der humanen APP-Protein-Familie die amyloidogene Prozessierung von APP beeinflussen und die APLPs somit möglicherweise zur Progression der Alzheimer Krankheit beitragen. Dabei führte die Koexpression von APP und APLP2 zu einer signifikant erhöhten Bildung von A β 40 und A β 42. Da auch die sAPP β -Mengen erhöht waren, ist das möglicherweise direkt auf eine gesteigerte β -Sekretase-Aktivität zurückzuführen. Vielleicht stellen die APP-APLP2-Heterodimere bessere Substrate für die Prozessierung durch die β -Sekretase dar. Die Koexpression von APP und APLP1 resultierte dagegen in einer leichten, jedoch signifikanten Verringerung an A β 42. Da auch die sAPP β -Mengen leicht erniedrigt waren, könnte hier hingegen die Substraterkennung durch die β -Sekretase verschlechtert sein. Ebenso könnte aber auch die Prozessierung durch die γ -Sekretase verändert sein. In unserem Labor konnte für APP ein Modell des Schnittmechanismus durch die γ -Sekretase aufgestellt werden. In der Transmembransequenz des APP sind drei konsekutive GxxxG-Motive enthalten (siehe Abb. 3 der Einleitung), welche die Dimerisierung der beiden Transmembranhelices vermitteln (Munter et al., 2007). Dabei ist der entscheidende Rest das Gly33. Dieser bildet einen Überkreuzungspunkt der beiden Helices und stellt somit ein sterisches Hindernis für die γ -Sekretase dar (Munter et al., 2007). Die Spaltung der nach dem ersten γ -Schnitt entstehenden Fragmente A β 49 bzw. A β 48 erfolgt sequentiell in zwei verschiedenen Produktlinien: A β 49, A β 46, A β 43 und A β 40 sowie A β 48, A β 45 und A β 42 (Munter et al., 2007; Qi-Takahara et al., 2005). Welche Produktlinie letztendlich gebildet wird, hängt wiederum vom Dimerisierungsgrad der Transmembransequenz ab. Wird die Dimerisierung gestört, beispielsweise durch Mutationen im GxxxG-Motiv oder möglicherweise auch Medikamente, so kann die γ -Sekretase die Substrate proteolytisch weiter abbauen und es entstehen die kürzeren Spezies A β 39 bzw. A β 38 und A β 35 bzw. A β 34 (Munter et al., 2007). In der APLP1-Transmembransequenz befindet sich ebenfalls ein GxxxG-Motiv. Somit könnte die Heterointeraktion der beiden Transmembranhelices auch zu einer verminderten Dimerisierung des APP und so zur Bildung kürzerer A β -Spezies führen. Dass qualitativ alle A β -Spezies gebildet werden, konnte anhand der MALDI-MS-Analysen gezeigt werden. Um nun ein verändertes Schnittverhalten genauer zu analysieren, müssten zusätzlich zu A β 40 und A β 42 auch die kürzeren A β -Spezies wie A β 38 quantifiziert werden. Ferner sollte auch die Heterodimerisierung der Transmembransequenzen untersucht werden. Das könnte

mit dem bakteriellen ToxR-System realisiert werden (Lindner und Langosch, 2006). Diese Analysen würden Hinweise auf die tatsächliche Beteiligung von α - und β - oder γ -Sekretase bei der Prozessierung von Heterodimeren der APP-Protein-Familie liefern. Die Stärke der Effekte der Koexpression auf die Prozessierung des APP korreliert gut mit der Heterodimerisierung von APP mit APLP1 und APLP2, die mit APP-APLP2 stärker war als mit APP-APLP1.

3.2.5. Relevanz des N-Terminus für die Homo- und Heterodimerisierung

Aus der Analyse des APP18-350 in *P. pastoris* sowie einer Publikation ging hervor, dass der N-Terminus des APP entscheidend zur Dimerisierung des APP beiträgt (Soba et al., 2005). Durch die Analyse von drei verschiedenen N-terminalen Deletionsmutanten sowie Punktmutanten haben wir einen tieferen Einblick in die Mechanismen der Homo- und Heterodimerisierung bekommen. Auch die für die Interaktion relevanten Bereiche konnten weiter eingegrenzt werden. Die Homo- und Heterodimerisierung von Soba et al. wurde mittels Koimmunpräzipitationen gezeigt (Soba et al., 2005). Daraus war weder eine Quantifizierung möglich, noch konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um cis- oder Transinteraktionen handelte. Davon ausgehend, dass sich die Position der Fluorophore zueinander nicht ändert, konnten bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten FRET-Messungen die FRET-Effizienzen der Volllängenkonstrukte direkt mit den entsprechenden Deletionsmutanten verglichen werden. Daher spiegeln die verringerten FRET-Effizienzen vermutlich eine geringere Affinität der Interaktionen wieder, d.h., dass insgesamt deutlich weniger Moleküle überhaupt dimerisieren können. Da größtenteils Einzelzellen, die keine Kontakte zu anderen Zellen ausgebildet haben, gemessen wurden, kann zusätzlich die Aussage getroffen werden, dass die gemessenen FRET-Effizienzen aus Interaktionen innerhalb derselben Zellen, also Cis-Interaktionen, resultieren. Aus den Analysen können folgende Schlussfolgerungen für die Homodimerisierung der APP-Familienmitglieder gezogen werden. (1) Die Homodimerisierung von APP und APLP2 wird zu einem großen Teil durch die "Loop"-Region vermittelt. (2) Die Homodimerisierung von APLP1 hingegen erfolgt überwiegend unabhängig von der "Loop"-Region. (3) Die Deletion der E1-Domäne führt in der gesamten APP-Familie zu einer drastischen Reduktion der Dimerisierung. (4) Die Dimerisierung erfolgt in einer „Kopf zu Kopf“-Anordnung. Evidenzen für die letzte Schlussfolgerung geben die Messungen der homophilen Interaktionen der Deletionsmutanten

mit den Vollängenkonstrukten, welche eine im gleichen Maß reduzierte FRET-Effizienz wie die Messungen der Deletionsmutanten zeigten. Das bedeutet, dass das Vorhandensein von nur einer „Loop“- oder E1-Region nicht ausreicht, um die Dimerisierung zu vermitteln. Die Homodimere der E1 und E2-Domäne des APP verdeutlichen ebenfalls eine N- und C-terminal gerichtete Dimerisierung (Scheuermann et al., 2001; Wang und Ha, 2004). Diese Ergebnisse bestätigen nicht nur, sondern erweitern erheblich die bisher publizierten Daten und lassen sie in einem völlig neuen Licht erscheinen. Neben der gesamten E1-Domäne, die entscheidend an der Homodimerisierung der Proteine der APP-Familie beteiligt ist, konnte die „Loop“-Region als essentielle Domäne der APP- und APLP2-Dimerisierung charakterisiert werden.

Die Deletionsmutanten zeigten ähnliche subzelluläre Verteilungen wie die jeweiligen Vollängenvarianten. Dabei beeinflusste das Signalpeptid vom APP die proteinspezifische Lokalisation der APP-Familienmitglieder nicht. Interessanterweise unterschieden sich die APP-LoopS Mutanten signifikant vom APP-Wildtyp. Die APP-LoopS-Mutanten zeigten im cLSM (1) eine verringerte Zelloberflächenexpression und (2) eine erhöhte Expression in intrazellulären Kompartimenten sowie (3) im Western Blot eine Anreicherung von nicht maturiertem APP. Das bedeutet, das Fehlen der Disulfidbrücke (APP Aminosäuren 98 und 105), die den oberflächenexponierten „Loop“ bildet, führt möglicherweise zu einer Konformation des APP, die in einem verringerten Transport resultiert. Ähnliche N-terminale, disulfid-verbrückte „Loops“ wurden für Chromogranin B, pro-Opiomelanocortin und der Rezeptor-Tyrosin-Kinase MusK als Sortierungssignale beschrieben (Chanat et al., 1993; Cool et al., 1997; Stiegler et al., 2006). Weil die APP- Δ -Loop-Mutanten ähnlich wie der Wildtyp lokalisiert sind, kann ausgeschlossen werden, dass der „Loop“ direkt ein Sortierungssignal darstellt und die Dimerisierung das Signal für die Zelloberflächenlokalisierung ist. Letzteres wurde zusätzlich durch die Kombination der LoopSD Mutante mit einer Mutation (APP-L613C), die spontan zu einer kovalenten Dimerisierung des APP führt, gezeigt (Munter et al., 2007). Die kovalent dimerisierte LoopSD Mutante verhielt sich hinsichtlich der Lokalisation und dem Bandenmuster wie die LoopSD Mutante. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die APP-LoopS-Mutanten einem schnelleren Abbau oder Internalisierung unterliegen als der Wildtyp. Aufgrund der biochemischen und zellbiologischen Daten ist das aber sehr unwahrscheinlich. Des Weiteren waren die FRET-Effizienzen der APP-LoopS-Mutanten, ähnlich wie die APP-

Δ -Loop-Mutanten, um 50% reduziert. Folglich führt die Mutation des „Loops“ zu einer drastischen Strukturänderung im APP, die sich in einer verringerten Dimerisierung und einem gestörten Transport an die Zelloberfläche zeigt. Im Gegensatz dazu resultierte der Austausch der analogen Cys-Reste im APLP2 weder in einer veränderten Zelloberflächenlokalisation noch in einer verringerten Dimerisierung (nicht gezeigt). Für die Strukturbildung im APLP2 scheint der „Loop“ daher nicht von essentieller Bedeutung zu sein, bzw. erfolgt die korrekte Faltung möglicherweise auch ohne die Ausbildung der Disulfidbrücke. Bezüglich einer möglichen Rezeptorfunktion der APP-Familie könnten solche kleinen Unterschiede daher genau die Spezifität der Proteine für bestimmte Liganden ausmachen.

In umfangreichen FRET-Analysen wurde zusätzlich die Heterodimerisierung der APP-Familie charakterisiert. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen. (1) Die Heterodimerisierung der APP-Familie mit APP und APLP2 ist abhängig von der „Loop“-Region. (2) Die Heterodimerisierung der APP-Familie mit APLP1 findet unabhängig von der „Loop“-Region statt. (3) Der saure Bereich in den Δ -E1-Mutanten stört die Dimerisierung der E2-Domäne. Diese Daten konnten zusätzlich mit Koimmunpräzipitationen bestätigt werden (nicht gezeigt).

Aus den bisherigen Untersuchungen können auch Rückschlüsse darauf gezogen werden, inwiefern die KPI-Domäne in die Dimerisierung der APP-Familie involviert ist. (1) APLP1, welches in lebenden Zellen sehr gut dimerisiert, existiert nur als Isoform ohne KPI-Domäne. (2) Die untersuchte, im Gehirn prädominante APLP2-763-Isoform mit KPI-Domäne zeigt eine ähnlich hohe FRET-Effizienz wie APLP1. (3) Für die ebenfalls im Gehirn dominante APP695-Isoform, wiederum ohne KPI-Domäne, konnten homophile Interaktionen nachgewiesen werden. (4) Die in NMR-Analysen durch das APP-Loop-WT-Peptid detektierte Konformationsänderung betraf nur Resonanzen in den Domänen „Loop“, CuBD und der sauren Region. Die KPI-Domäne blieb davon weitgehend unbeeinflusst. Folglich wird die Dimerisierung der APP-Familie wahrscheinlich nicht direkt durch die KPI-Domäne beeinflusst.

3.2.6. Modelle der Homo- und Heterodimerisierung

Basierend auf den vorher diskutierten zellbiologischen und biochemischen Daten konnten zwei Modelle der Homo- und Heterodimerisierung der APP-Familie entwickelt werden.

In einem zweiten möglichen Modell kommt es zu einer Reorientierung der "Loop"- und Kupferbindedomänen. Laut der NMR-Daten können der "Loop"-Bereich und die CuBD sich unabhängig voneinander bewegen (Kaden et al., 2007/2008), so dass sich die "Loop"-Bereiche so zueinander annähern könnten, dass die CuBD nicht mehr direkt in die Dimerisierung involviert sind (Abb. 32B). Das würde erklären, warum schon die Entfernung der "Loop"-Region einen so drastischen Effekt ausübt. Da die "Loop"-Region im APLP1 hingegen keinen essentiellen Einfluss auf die Dimerisierung ausübt, verhält sich APLP1 vermutlich wie in Abb. 32A beschrieben.

Wenn es sich bei der Dimerisierung um ein evolutionär frühes Merkmal handelt, das für die Funktionen der humanen APP-Protein-Familie entscheidend ist, sollte der grundsätzliche Mechanismus bei allen drei Proteinen gleich sein. Zumindest sollte im Dimer die Anordnung der Monomere zueinander ähnlich sein. Daher erscheint das erste Modell wesentlich wahrscheinlicher. Im Vergleich der Aminosäuresequenzen wird ersichtlich, dass sich innerhalb der E1-Domäne die "Loop"-Regionen von APP und APLP2 deutlich von APLP1 unterscheiden, was dafür spricht, dass genau dieser Bereich den Unterschied zwischen APP/APLP2 und APLP1 ausmacht (Abb. 31). So könnte diese Region in APP und APLP2 die Homo- und Heterodimerisierung regulieren. Dabei ist besonders im APP die Ausbildung der Disulfidbrücke und somit der Konformation der Ektodomäne für die Lokalisation und Dimerisierung von entscheidender Bedeutung (siehe auch 3.2.5.). Die Aktivierung von G_o-Proteinen durch das APP konnte mit einem Antikörper (22C11, Epitop APP Aminosäuren 66-81) nachgeahmt werden (Okamoto et al., 1995). In einem Modell der APP-Polypeptidkette liegen das 22C11-Epitop und die "Loop"-Region relativ dicht beieinander (Turner et al., 2003). Durch die Dimerisierung und eine damit möglicherweise verbundene Konformationsänderung der Ektodomäne könnte sich diese mögliche Ligandenbindestelle so verändern, dass ein Ligand entweder besser oder aber überhaupt nicht mehr binden kann. Das wiederum hätte einen Einfluss auf die postulierte Rezeptorfunktion des APP. Zusätzlich könnte eine solche allosterische Strukturänderung auch durch die Bindung von Heparin oder Heparansulfat in der "Loop"-Region ausgelöst werden (Small et al., 1994).

3.2.7. Einfluss von Heparin und Heparansulfat auf die Dimerisierung

Die Dimerisierung der löslichen Ektodomäne des APP kann durch Heparin induziert werden (Gralle et al., 2006). Somit stellt sich die Frage, ob die Dimerisierung der APP-Familie in den HEK293-Zellen möglicherweise durch extrazelluläre Matrixbestandteile wie Heparansulfat vermittelt werden kann. Da HEK293-Zellen Heparansulfatproteoglykane bilden, wäre es durchaus möglich, dass diese dadurch die Dimerisierung initiieren. Da die Dimerisierung des APP schon im ER beginnt und die gemessenen FRET-Effizienzen hauptsächlich aus intrazellulären Kompartimenten resultieren, erscheint diese Möglichkeit sehr unwahrscheinlich. Die extrazelluläre Gabe von Heparin hatte keinen Einfluss auf die Dimerisierung des APP (nicht gezeigt). Das könnte daran liegen, dass die Dimerisierung schon ohne Heparin erfolgen kann oder die Menge an APP an der Zelloberfläche nicht ausreicht um einen signifikanten Effekt auf die FRET-Effizienz zu detektieren. Hier wäre es sinnvoll, die FRET-Effizienzen des fast ausschließlich zelloberflächenlokalisierten APLP1 in Anwesenheit von zusätzlichem, extrazellulärem Heparin zu untersuchen. Allerdings wäre es auch denkbar, dass schon Heparin oder Heparansulfat an APP gebunden sind und die Dimerisierung durch Heparin nicht mehr zusätzlich verstärkt werden kann. Um das zu zeigen, müsste Heparin (Molekulargewicht von 6-30 kDa) im nativen APP-Dimer nachgewiesen werden. Dies könnte man beispielsweise mit den kovalenten Dimeren (APP-L613C-Mutanten) versuchen, indem die durch eine Immunpräzipitation gereinigten APP-Dimere mit Heparanase behandelt und im MALDI-MS untersucht oder einer vergleichenden Western-Blot-Analyse unterzogen werden.

3.2.8. Homo- und Heterodimere Rezeptoren

Wenn es sich bei den Proteinen der APP-Familie um Rezeptoren handelt, könnte die Heterodimerisierung die Ligandenbindung regulieren. Dazu sind verschiedene Szenarien vorstellbar. Die Ligandenbindestelle wird durch die Heterodimerisierung allosterisch so verändert, dass eine höher bzw. niedriger affine oder keine Ligandenbindung mehr erfolgen kann. Zusätzlich könnte auch die Art der Liganden, die binden können, davon abhängen, ob Homo- oder Heterodimere vorliegen. Die Phosphorylierung der Rezeptor Tyrosin Kinase ErbB-3 erfolgt beispielsweise nur im Heterodimer mit ErbB-2, was zu einer extrem wirksamen

mitogenen Aktivierung führt. Die isolierten Rezeptoren hingegen sind signal-inkompetent (Citri et al., 2004). Die Retention von APLP1 durch APP und APLP2 in intrazellulären Kompartimenten könnte möglicherweise auch ein Regulationsmechanismus sein, so dass APLP1 im Heterodimer mit APP und APLP2 keine oder nur eine geschwächte Signalfunktion ausüben kann. Beispielsweise ist der β -adrenerge Rezeptor (AR) β 1D-AR normalerweise nicht an der Zelloberfläche lokalisiert. Bei einer Heterodimerisierung mit β 1B-AR oder β 2-AR findet eine Translokation der Heterokomplexe an die Plasmamembran statt (Barnes, 2006). Der neuronale Rezeptor sorLA bindet an APP und führt dadurch zu einer verringerten Zelloberflächenexpression des APP (Andersen et al., 2005). Die Bindestelle konnte auf die APP-E2-Domäne eingegrenzt werden (Andersen et al., 2006). Möglicherweise konkurriert die Bindung durch sorLA um die APP-Dimerisierung. Dies konnte in FRET-Kompetitionsexperimenten nachgewiesen werden. Die Expression von nicht Fluoreszenz-markiertem sorLA führte zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung der FRET-Effizienzen (nicht gezeigt). Im Rahmen dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die APLPs *in vitro* an sorLA binden. Aufgrund der Homologie in der E2-Domäne vermuten wir, dass die Bindung ebenfalls in diesem Bereich erfolgt. Da in der E2-Domäne auch Kollagen gebunden wird, könnte die Bindung von sorLA neben den Einfluss auf die Cis-Dimerisierung auch die Funktionen der APP-Protein-Familie in der Zell-Matrix und/oder Zell-Zell-Adhäsion stören.

3.3. Analyse der Zinkbindestelle – die APP-Familie als Zelladhäsionsproteine

Schon 1989 wurden zelladhäsive Funktionen des APP beschrieben (Chen und Yankner, 1991; Schubert et al., 1989). Die in der APP-Familie konservierten Bindestellen für Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Heparin, Kollagen und Glykosaminoglykane unterstützten diese Theorie weiterhin (Behr et al., 1996; Bush et al., 1993; Bush et al., 1994; Gralle et al., 2006; Multhaup, 1994; Small et al., 1994). Im Jahr 2005 wurde gezeigt, dass die APP-Familie Transinteraktionen vermitteln kann (Soba et al., 2005). In einem Zelladhäsions-Assay der homophilen Transinteraktionen in *Drosophila Schneider* (S2) Zellen wurden bei APLP1 und APLP2 30-35% adhärenter Zellen beobachtet, für APP hingegen nur 5-10% (Soba et al., 2005). Unsere Daten aus den HEK293-Zellen stehen dazu teilweise im Widerspruch, da wir nur in APLP1-exprimierenden Zellen deutliche Anreicherungen von APLP1 in Zell-Zell-Kontakten

beobachten konnten. Das APLP1 in diesen „Clustern“ zeigte eine sehr geringe Beweglichkeit, was darauf hindeutet, dass tatsächlich Interaktionen zwischen APLP1-Molekülen zweier Zellen, also Transinteraktionen stattfanden. Interessanterweise führte die extrazelluläre Zugabe von Zink zu APLP2 exprimierenden HEK293-Zellen auch zur Ausbildung von APLP2-vermittelten Zell-Zell-Kontakten. In APP-exprimierenden Zellen haben wir diesen Effekt nicht gesehen, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass APP nur sehr wenig an der Zelloberfläche lokalisiert war. Um trotzdem untersuchen zu können, ob APP strukturell in der Lage ist homophile Zell-Zell-Kontakte zu vermitteln, könnte in einem folgenden Experiment GPI-verankertes APP exprimiert werden. In einigen Zellen, die APP oder die APLPs exprimierten, fiel auf, dass eine Anreicherung der Proteine an den Kontaktstellen zu nicht exprimierenden Zellen auftrat. Diese Zell-Zell-Kontakte wurden noch nicht genauer untersucht. Es könnte sich dabei um Kontakte mit den endogenen APP-Familienmitgliedern oder auch mit anderen, noch nicht identifizierten Proteinen handeln. In mit Zink behandelten APLP1- und APLP2-koexprimierenden Zellen konnten wir zusätzlich heterophile Anreicherungen in Zell-Zell-Kontakten beobachten (nicht gezeigt). Diese Daten stehen teilweise in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus embryonalen Maus-Fibroblasten-Zellen, die zeigten, dass APLP1 und APLP2 in homo- und heterophile Transinteraktionen involviert sind, APP hingegen nicht (Soba et al., 2005). Allerdings wurde in diesen Untersuchungen keine Metallionenabhängigkeit beobachtet.

Neben den Trans-Kontakten konnten wir in den Plasmamembranen der APLP1 und APLP2-exprimierenden Zellen nach Zinkzugabe die Ausbildung von „Clustern“ beobachten. Diese gingen mit einer Erhöhung der FRET-Effizienz einher. Somit verstärkte Zink sowohl die cis- als auch die Transinteraktionen von APLP1 und APLP2 in lebenden HEK293-Zellen. Die Ausbildung von „Clustern“ in den Plasmamembranen konnte auch durch Kupfer ausgelöst werden. Da APLP1 die in APP und APLP2 konservierte Kupferbindestelle nicht besitzt, spekulieren wir, dass die Bindung des Kupfers vermutlich ebenfalls an der Zinkbindestelle, vermutlich mit geringerer Affinität, erfolgt. Aus einigen anderen Metallbindenden Proteinen ist bekannt, dass Zink durch Kupfer ersetzt werden kann. Beispielsweise wird in den Metallothioneinen, die im Normalzustand Zink gebunden haben, bei einem Überschuss an Kupfer das Zink verdrängt, welches an die Zinkfinger des Transkriptionsfaktors MTF-1 bindet und damit die Transkription der Metallothioneine aktiviert (Balamurugan und Schaffner, 2006).

Im Vergleich der APP-Familie mit typischen Zelladhäsionsproteinen fallen einige

Gemeinsamkeiten auf. Beispielsweise sind Cadherine, Integrine und Immunglobulin Zelladhäsionsproteine (IgCAMs) ebenfalls Transmembranproteine vom Typ I, die viele verschiedene Spleißformen besitzen und welche Homo- und Heterodimere teilweise in Cis- und Trans-Positionen ausbilden können (Shapiro et al., 2007). Aus den bekannten Mechanismen der Zelladhäsionsproteine lassen sich mögliche Mechanismen für die Zink-vermittelten Effekte ableiten.

In einigen Integrinen befindet sich eine Metallionen abhängige Adhäsionsstelle (MIDAS, „metall ion dependent adhesion site“) (Craig et al., 2004). Dabei erfolgt die vollständige Koordination der Metallionen an der MIDAS durch die Integrine selbst und durch die Glu- und Asp-Reste eines Liganden (Craig et al., 2004). So könnte möglicherweise auch die Erhöhung der Cis-Dimerisierung der APLPs mechanistisch erklärt werden. Die Koordination der Zink- oder Kupfer-Ionen wird durch zwei APLP-Moleküle innerhalb der konservierten Zinkbindestelle (siehe auch Ergebnisteil, Abb. 27) vermittelt und stabilisiert so zusätzlich die Dimerisierung. Es wäre aber auch denkbar, dass sich durch konformationelle Änderungen die Domänen so reorientieren, dass Zink über die Bindestellen zweier Dimere komplexiert wird. Dadurch würden mehrere Dimere miteinander verknüpft werden, was ebenfalls zu einer Erhöhung der FRET-Effizienzen führen würde (Abb. 33A). Diese Modelle wären mit der Kinetik, aus der eine nicht kooperative Bindung des Zinks an APLP1 hervorgeht, gut vereinbar. Unterstützend zu unseren Modellen konnte in einer Publikation gezeigt werden, dass das Peptid der Zink-Bindestelle *in vitro* dimerisiert (Ciuculescu et al., 2005). In den NMR- und EPR-Strukturdaten der CuBD ist auch die Zinkbindestelle enthalten. Die Zugabe von Zink zu dem rekombinanten Protein (APP127-188) führte dabei zu einer Präzipitation, was wiederum darauf hinweist, dass über diesen Bereich möglicherweise eine Di- oder Oligomerisierung vermittelt werden könnte (Barnham et al., 2003).

Domänen „swapping“ ist ein bei den Zelladhäsionsproteinen verbreiteter Mechanismus. Die Dimerisierung der Cadherine erfolgt über einen Austausch zweier N-terminaler β -Faltblatt-Strukturen, wobei die Seitenketten von konservierten Trp-Resten in eine große Tasche im hydrophoben Kern des Partnermoleküls insertieren (Haussinger et al., 2004; Shapiro et al., 1995). Im N-Terminus der APP-Protein-Familie befinden sich interessanterweise zwei vollständig konservierte Trp-Reste (Trp52 und Trp97, siehe auch Abb. 31). Der Trp97-Rest liegt zudem genau neben dem konservierten Cys98 der „Loop“-Region. Daher könnte spekuliert

werden, dass ein ähnlicher Mechanismus auch für die APP-Protein-Familie möglich wäre. Es wäre z.B. vorstellbar, dass die Strukturänderungen in der "Loop"-Region der APP-LoopS-Mutanten das Trp97 so maskieren, dass mit der anderen Domäne keine stabile Interaktion mehr möglich ist. Die bisherigen Daten widersprechen diesem theoretischen Mechanismus keinesfalls. Weiterführend könnte man beispielsweise die entsprechenden Trp-Reste austauschen und diesen Mechanismus damit überprüfen.

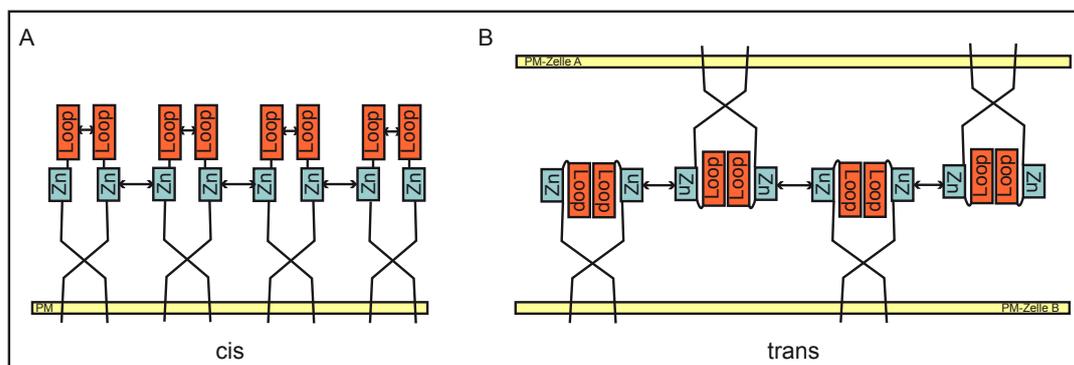


Abb. 33: Modelle der Zink-vermittelten Cis- und Transinteraktionen von APLP1 und APLP2. A: In der Loop-Region stabilisierte Dimere in Cis-Position werden durch die Zink an den konservierten Bindestellen miteinander verknüpft. B: Transinteraktionen bilden sich über direkte Kontakte durch Zink über die konservierten Bindestellen. Dabei erfolgt die Trans-Dimerisierung auf Kosten der Cis-Dimerisierung. Loop: „Loop“-Region, Zn: Kupferbindedomäne mit der konservierten Zinkbindestelle, AcD: Bereich der sauren Aminosäuren, PM: Plasmamembran.

Ein schlüssiges Modell für die Transinteraktionen lässt sich aus den bisherigen Daten nicht erstellen. Unter Umständen wäre aber folgendes Modell denkbar (Abb. 33B). Die Dimerisierung wird durch die "Loop"-Region vermittelt und die Verknüpfung mit den APLPs aus der gegenüberliegenden Zelle erfolgt über die Zinkbindestelle. Dabei müsste aber auch in APLP1 die "Loop"-Region von entscheidender Bedeutung für die Trans-Dimerisierung sein. Des Weiteren würde das bedeuten, dass die Trans-Dimerisierung auf Kosten der Cis-Dimerisierung erfolgen müsste. Für das IgCAM Hemolin, wurde ein ähnlicher Mechanismus beobachtet (Su et al., 1998). Um den Mechanismus der Trans-Dimerisierung der humanen APP-Protein-Familie genauer zu untersuchen, wäre es beispielsweise sinnvoll die Deletionsmutanten hinsichtlich der Trans-Dimerisierung und Zelladhäsionseigenschaften zu charakterisieren. Erst dann lassen sich vermutlich genauere Modelle erstellen.

Die neuronalen Zelloberflächenproteine Neuroligin in den postsynaptischen und Neurexin in den präsynaptischen Dichten glutamaterger Synapsen üben wichtige Funktionen bei der Synapsenentwicklung aus (Song et al., 1999). Dabei führt die Interaktion von Neurexin/Neuroligin von gegenüberliegenden Zellen eher zu einer Signalwirkung als einer direkten Zelladhäsion (Shapiro et al., 2007). APP wurde hauptsächlich in präsynaptischen Bereichen

detektiert, die APLPs hingegen in den postsynaptischen Dichten (Kim et al., 1995; Thinakaran et al., 1995). Des Weiteren wurde in APP/APLP2 Doppel-Knock-Out-Mauslinien gezeigt, dass die Entwicklung der neuromuskulären Synapsen gestört ist (Wang et al., 2005). Daher wäre es vorstellbar, dass die Homo- und Heterodimerisierungen der APP-Protein-Familie mit Zink als Kofaktor eine wichtige Rolle z.B. bei der Synaptogenese spielen. Dies könnte ähnlich wie bei Neuroligin/Neurexin durch die Vermittlung von Zell-Zell-Adhäsion oder/und Zell-Matrix-Adhäsion oder/und über eine direkte Signalwirkung erfolgen.

4. Zusammenfassung

Die Homo- und Heterodimerisierung der APP-Protein-Familie sowie der Einfluss heterophiler Interaktionen auf die Prozessierung des APP und die Funktionen der Protein-Familie sind bisher wenig verstanden. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Homodimerisierung der APLPs und die Heterodimerisierung der APP-Protein-Familie charakterisiert werden.

Mit *in vitro* Studien rekombinant hergestellter Proteine konnte erstmals eine Oligomerisierung (Dimere, Tetramere, höhere Oligomere) der APP-homologen Proteine APLP1 und APLP2 gezeigt werden. Des Weiteren konnte die Dimerisierung des APP charakterisiert werden und führte zu folgenden Resultaten. (1) Der N-Terminus (Aminosäuren 18-350) ist ausreichend um die Dimerisierung des APP zu vermitteln. (2) Die Dimerisierung lässt sich durch ein Peptid, welches den „Loop“ (Cys 98 und 105) darstellt, teilweise inhibieren. (3) Das „Loop“-Peptid beeinflusst massiv die Prozessierung von APP und verringert die Entstehung von Aβ. (4) Das „Loop“-Peptid führt zu mit NMR detektierbaren Konformationsänderungen, die besonders konservierte hydrophobe Aminosäuren betreffen. Basierend auf diesen Daten konnte ein Modell der Homodimerisierung des APP-N-Terminus erstellt werden. Demnach wird die Homodimerisierung von APP durch den „Loop“ vermittelt und durch hydrophobe Aminosäuren benachbarter Domänen stabilisiert. Diese Daten sind beim „Journal of Biological Chemistry“ zur Veröffentlichung eingereicht und unter Revision.

In umfangreichen „Lebend-Zell-Analysen“ wurde im Rahmen dieser Arbeit die Lokalisation und Homo- und Heterodimerisierung der Proteine der APP-Familie charakterisiert. Hinsichtlich der subzellulären Lokalisation unterschied sich APLP1 sehr deutlich von den beiden anderen Familienmitgliedern. (1) APLP1 war fast ausschließlich an der Zelloberfläche lokalisiert. (2) APP und APLP2 fanden sich hingegen hauptsächlich in intrazellulären Kompartimenten und wenig an der Zelloberfläche. (3) Die Lokalisation von APLP1 konnte durch die Koexpression mit APP oder APLP2 beeinflusst werden und führte zu einer Retention von APLP1. Mittels FRET und Koimmunpräzipitationen konnte für alle drei Proteine der humanen APP-Familie sowohl die Homo- als auch die Heterodimerisierung in lebenden HEK293-Zellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind teilweise im EMBO Journal veröffentlicht (Munter et al., 2007). Durch

Analysen von N-terminalen Deletionsmutanten konnten die bisherigen Modelle zur Interaktion erheblich erweitert werden. Durch die FRET-Analysen kristallisierten sich zudem deutliche Unterschiede zwischen APLP1 und APP/APLP2 heraus. (1) Die APLP1-„Loop“-Region ist nicht entscheidend an der Homo- und Heterodimerisierung von APLP1 beteiligt. (2) In APP und APLP2 hingegen ist die „Loop“-Domäne für die Homo- und Heterodimerisierung essentiell. (3) Die Dimerisierung der Proteine der APP-Familie erfolgt von „Kopf-zu-Kopf“. Diese Ergebnisse führten zu einem „Kopf-zu-Kopf“-Modell der Homo- und Heterodimerisierung der Vollängenproteine.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Zink erstmals ein extrazellulärer Effektor identifiziert werden, welcher Interaktionen zwischen den Proteinen und die Lokalisation der APP-Protein-Familie erheblich beeinflusst. Daraus ergaben sich die folgenden Ergebnisse. (1) Unabhängig von extrazellulären Effektoren konnten in HEK293-Zellen nur für APLP1 Zell-Zell-Kontakte beobachtet werden. (2) Zink führte in APLP1- und APLP2- exprimierenden Zellen zur Ausbildung von „Clustern“ in der Plasmamembran, die eine Verstärkung bestehender Cisinteraktion hervorrief. (3) Für die Erhöhung der Cis-Dimerisierung von APLP1 durch Zink konnte ein EC50 von 2,5 μM bestimmt werden. (4) Zink konnte sowohl eine Verstärkung bestehender Transinteraktionen (APLP1) als auch die Vermittlung von Transinteraktionen (APLP1 und APLP2) auslösen. Basierend auf diesen Daten und dem Modell der Homo- und Heterodimerisierung konnten hypothetische Mechanismen für die Zink-vermittelte Cis- und Trans-Dimerisierung abgeleitet werden. Demnach können die Dimere durch Zink ein strukturelles Netzwerk ausbilden. Die Zinkabhängigkeit von Zell-Zell-Kontakten und der Einfluss auf die Cis-Dimerisierung eröffnen neue Perspektiven für die funktionelle Charakterisierung der APP-Protein-Familie.

Summary

Homo- and heterodimerization of the APP protein family as well as the influence of heterophilic interactions on processing and function of APP are still under debate. Therefore the aim of this work was to characterize homodimerization of APLPs and heterodimerization of the APP protein family.

We therefore performed *in vitro* studies with recombinant proteins. For the first time we demonstrated the presence of oligomers (dimers, tetramers, higher oligomers) for the APP homologous proteins APLP1 and APLP2. Furthermore, we characterized the dimerization of APP with the following results. (1) The N-terminus (amino acids 18-350) is sufficient to mediate APP dimerization. (2) Dimerization is partially inhibited by a peptide that mimics a surface exposed loop between Cys 98 and 105 of APP. (3) The loop peptide dramatically influences the processing of APP and decreases A β production. (4) The loop peptide causes NMR-detectable structural changes in conserved hydrophobic regions. Based on this data, we proposed a model for the homodimerization of the APP N terminus. Thus, we suggest that APP acquires a loop-mediated homodimeric state, which is further stabilized by interactions of hydrophobic residues of neighboring domains. This data has been submitted to Journal of Biological Chemistry and the manuscript is under revision.

In living cells we characterized the localization and homo- and heterodimerization of the APP-family proteins. Concerning the subcellular distribution, APLP1 markedly differs from the other family members. (1) APLP1 was almost exclusively located at the cell surface. (2) APP and APLP2 were mainly found in intracellular compartments and showed only a weak plasma membrane staining. (3) Subcellular distribution of APLP1 was influenced by APP and APLP2 and led to retention of APLP1 in intracellular compartments. The homo- and heterodimerization of the APP-family members was determined in living HEK293 cells by FRET and coimmunoprecipitations. Parts of these results have been published in the EMBO Journal (Munter et al. 2007). Based on the analyses of N-terminal deletion mutants we could elaborate more advanced versions of existing models. Additionally, the FRET studies revealed distinct mechanisms of dimerization for APLP1 and APP/APLP2. (1) The loop region of APLP1 is not es-

essential for homo- and heterophilic interactions of APLP1. (2) However, in APP and APLP2 the loop domain is crucial for mediating homo- and heterodimerization. (3) Dimerization occurs in a head-to-head arrangement. Based on these results we propose a head-to-head-model for the homo- and heterophilic dimerization of the full-length proteins.

For the first time, we have identified zinc ions as extracellular ligands of APLP1 and APLP2 that substantially influence the localization as well as the interactions of the APP-family proteins. We obtained the following results. (1) Only APLP1 was determined in cell-cell contacts independently of extracellular ligands. (2) Zinc induced clustering of APLP1 and APLP2 in the plasma membrane, accompanied by increasing FRET efficiencies, indicating enhanced cis interactions. (3) We measured an EC50 of 2.5 μ M for the zinc-mediated increase of APLP1 cis interactions. (4) Zinc also modulated trans interactions and led to an enhancement of already existing cell-cell contacts (APLP1) and induced the formation of novel cell-cell contacts (APLP1 und APLP2). Based on this data and the model for homo- and heterodimerization a hypothesis for the mechanism of the zinc-mediated cis and trans dimerization could be that the dimers are linked to a structural network in cis or trans position. The zinc-dependent generation of cell-cell contacts and its influence on cis dimerization opens up new perspectives for the functional characterization of the APP family proteins.

5. Material

5.1. Zelllinien und Nährmedien

HEK293, Humane Nierenzelllinie, ATCC-Nummer: CRL-1573 (ATCC, Rockville, USA)

Nährmedium: „Minimal essential Medium“ mit „Earle's“ Salzen (1 x MEM-Earle), 10% Fetales Kälberserum, 20 mM Glutamin, 10 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin

SH-SY5Y, Humane Neuroblastomazelllinie, ATCC-Nummer: CRL-2266 (ATCC, Rockville, USA)

Nährmedium: 50% „Dulbecco's minimal essential Medium“, 50% Hams-F12, 10% Fetales Kälberserum, 20 mM Glutamin, 20 mM Natriumpyruvat, 1 x Nicht-essentielle Aminosäuren

Die Zellkulturmedien, Zusätze und 1 x PBS wurden von den Firmen PAA, USA oder Biochrom, Berlin verwendet. Die Zellkulturschalen wurden von der Firma TPP, Schweiz bezogen.

5.2. Hefestämme und Nährmedien

P. pastoris SMD1168 (Invitrogen, Karlsruhe)

Folgende Hefelinien wurden übernommen:

Stamm	Insert	Erzeugt von
SMD1168	pPIC9-sAPP770 α	Andre Kemmling, nicht publiziert
SMD1168	pPIC9-sAPLP2 α	Andre Kemmling, nicht publiziert
SMD1168	pPIC9-sAPLP1 α	Andre Kemmling, nicht publiziert
SMD1168	pPIC9-sAPP18-350 α	(Scheuermann et al., 2001)

Verwendete Nährmedien:

YPD-Medium: 1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) Bacto-Pepton, 2 % (w/v)

Glukose

YPDS-Selektionsplatten: 1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Bacto-Pepton, 1 M

Sorbitol, 2 % (w/v) Agar, 100 µg/ml Zeocin

BMGY-Medium: 1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Bacto-Pepton, 100 mM
Kaliumphosphat, pH 6,0, 1,34 % (w/v) Hefestickstoffbasis, 4 x
10⁻⁵ % (w/v) Biotin, 1 % (w/v) Glycerin

BMMY-Medium 1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Bacto-Pepton, 100 mM
Kaliumphosphat, pH 6,0, 1,34 % (w/v) Hefestickstoffbasis, 4 x
10⁻⁵ % (w/v) Biotin, 2 % (v/v) Methanol

5.3. Bakterienstämme

CH3-Blue (Bioline, Mannheim)

Top 10 (Invitrogen, Karlsruhe)

Nährmedium: LB (1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl)

5.4. Plasmid-Vektoren

5.4.1. Klonierungsvektoren

pBluescript II KS (+) (Stratagene, La Jolla, USA) Ampicillin-Resistenz

5.4.2. Vektoren zur Proteinexpression in höheren eukaryotischen Zellen

- pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe) mit den Antibiotika-Resistenzen: Ampicillin und Zeocin, Hygromycin oder Genetecin (G-418)
- pcDNA3-YFP (Invitrogen, Karlsruhe) modifiziert von AG Prof. Michael Schaefer Institut für Pharmakologie, Charité Berlin, Ampicillin und Genetecin-Resistenz
- pcDNA3-CFP (Invitrogen, Karlsruhe) modifiziert von AG Prof. Michael Schaefer, Institut für Pharmakologie, Charité Berlin, Ampicillin und Genetecin-Resistenz
- pcDNA3-FLAG (Invitrogen, Karlsruhe) modifiziert von AG Prof. Michael Schaefer, Institut für Pharmakologie, Charité Berlin, Ampicillin und Genetecin-Resistenz

5.4.3. Vektoren zur Proteinexpression in Hefen

- pPIC9 (Invitrogen, Karlsruhe)
- pPICZ α A (Invitrogen, Karlsruhe), Zeocin-Resistenz

5.5. Primer

Sämtliche Primer wurden HPLC-gereinigt von Sigma Aldrich, Deutschland bezogen.

5.5.1. Primer für Klonierungen in den Hefvektor pPICZ α A

Primer-Name	5'-3'-Sequenz
APLP2revN	TTGCGGTGCCGAATCTCCAG
APLP2revCNotI	TACTGTATGCGGCCCTCTAGAAGACGCTGGAATAA
APLP2fwNEco	GCCGAGCGGAATTCGTGTGCTAAGCGAGGAGTCCGAGT
APLP2fwC	CAACTCCTTGCCAACCAAT
APP18-350asW0Stop	TTCATCTAAGCGGCCGCGAGTAAACTTTGGGACATGGCGCTGCCACACAC
APPE2revStopNot-2	CGCAATATAGCGGCCCTTAAAGCAGCTCATCAACTTC
fwsAPP770NotI	CTGTTACACATGCGGCCCGCCTGGAGGTACCCACTGATG
revsAPLP1alphaNotI	CTGAATGTATGCGGCCCGCCTGAATCTCCGATGAGTGG
revsAPLP1alphaNotI/Stop	CTGAATGTATGCGGCCGCTTACTGAATCTCCGATGAGTGG
fwsAPLP1EcoRI	TGAGCAATCTGAATTCAGCCTGGCCGGTGGGAGCC
revsAPP770alphaXbaI/Stop	CAGCACTGGCTCTAGATTATTTTGTATGATGAACTTCATATCCTGAGTC
revsAPP770alphaXbaI	CAGCACTGGCTCTAGAGCTTTTTTGTATGATGAACTTCATATCCTGAGTC

5.5.2. Primer für die Klonierung von FLAG-, YFP- und CFP-Fusionsproteinen

Primer-Name	5'-3'-Sequenz
APLP1-Int-P	ATGCGCTTCCAGGTGCATAC
WP-APLP1-CT-XbaI	GACTACGTCTAGATAGGGTCGTTTCCCTCCAGGAAGCGGTAAGT
WP-APLP2-CT-XbaI	GCACGCGTCTAGACTAATCTGCATCTGCTCCAGGTA
WP-APLP2-P1-NheI	ACGATAGGCTAGCGGTGTGCTAAGCGAGGAGTC
WP-APLP2-P2-HindIII-R	GACGGCGGTCATTCAAGCTAA
WP-APLP2-P3-HindIII-F	GAGGCAGAGCTTCAAGCTAA

5.5.3. Primer zur Erzeugung der Deletionsmutanten

Primer-Name	5'-3'-Sequenz
P1-SP-APP-NotI	gtaagcgccgcATGCTGCCCGTTTGGCACTGCTCCTGCTGGCCGCCTG
P2-SP-APP-central	GCTCCTGCTGGCCGCCTGGACGGCTCGGGCGCTGGAGGTACCC
P3-APP Δ Loop_SP	GCT CGG GCG CTG GAG GTA CCC GTT CCT GAC AAG TGC AAA TTC
P4-APP- Δ Loop_MBS_SP	GCT CGG GCG CTG GAG GTA CCC GAA GAA AGT GAC AAT GTG GAT TC
P5-APP- Δ Loop_MBS_AD_SP	GGCTCGGGCGCTGGAGGTACCCACCAGCATTGCCACCACC
P6-rev-APP-Int_XhoI-REV	CTCGAGATACTTGTCAACGGC
P7-APLP1- Δ Loop_SP	GCT CGG GCG CTG GAG GTA CCC GTGCCTGAAGGCTGCCGG
P8-APLP1-Int_EcoNI_Rev	TGTTCAAGAGTGGAGGAGTTC
P9-APLP2- Δ Loop_SP	GCTCGGGCGCTGGAGGTACCC GTTCCAGAAAAGTGCCAGTTTTCC
P9-APLP1-D-Loop-MBS	GCTCGGGCGCTGGAGGTACCCGGACCCCGACCCATCTG
P10-APLP1-D-Loop-MBS-AcD	GCTCGGGCGCTGGAGGTACCCACAGACGGTGTGGATATTTAC
P11-APLP2-D-Loop-MBS	GCTCGGGCGCTGGAGGTACCCAAGATTATTGGATCTGTGTCAAAAAG
P12-APLP2-D-Loop-MBS-AcD	GCTCGGGCGCTGGAGGTACCCACTGAACCCGGCAGCGACG

5.5.4. Primer für die zielgerichtete Mutagenese

Primer-Name	5'-3'-Sequenz
MP-APP-LoopSD	CATCCAGAACTGGAGTAAGCGGGGCCCAAGCAGAGCAAGACCCATCC
MP-APP-LoopSD-R	GGATGGGTCTTGCTCTGCTTGCGGCCCGCTTACTCCAGTTCTGGATG
MP-APP-LoopS1	CATCCAGAACTGGAGTAAGCGGGGCCCAAGCAGTGAAGACC
MP-APP-LoopS1-R	GGTCTTGCACTGCTTGCGGCCCGCTTACTCCAGTTCTGGATG
MP-APP-LoopS2	CAGAACTGGTGCAAGCGGGGCCCAAGCAGAGCAAGACCCATCC
MP-APP-LoopS2-R	GGATGGGTCTTGCTCTGCTTGCGGCCCGCTTGACCCAGTTCTG

5.6. Erzeugte Konstrukte

In der Tabelle sind die in dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Konstrukte mit Vektor, Insert und entsprechenden Mutationen zusammengefasst.

Vektor	Insert	Mutationen
pPICZ α A	APP18-350 / APP18-350-myc	C98S/C105S
pPICZ α A	sAPLP1 α / sAPLP1 α -myc	
pPICZ α A	sAPLP2 α / sAPLP2 α -myc	
pPICZ α A	sAPP770 α / sAPP770 α -myc	
pcDNA3.1 (Zeo)	APP695	
pcDNA3.1 (Genetecin)	APLP2-763	
pcDNA3-FLAG/YFP/CFP	APLP2-763	
pcDNA3.1 (Hygromycin)	APLP1	
pcDNA3-FLAG/YFP/CFP	APLP1	
pcDNA3-FLAG/YFP/CFP	APP- Δ -Loop	
pcDNA3-FLAG/YFP/CFP	APP- Δ -E1	
pcDNA3-FLAG/YFP/CFP	APP- Δ -E1-AcD	
pcDNA3-FLAG/YFP/CFP	APLP1- Δ -Loop	
pcDNA3-FLAG/YFP/CFP	APLP1- Δ -E1	
pcDNA3-FLAG/YFP/CFP	APLP1- Δ -E1-AcD	
pcDNA3-FLAG/YFP/CFP	APLP2- Δ -Loop	
pcDNA3-FLAG/YFP/CFP	APLP2- Δ -E1-AcD	

5.7. Vorhandene Konstrukte

Es wurden folgende bereits vorhandene oder in Kooperation erhaltene Konstrukte verwendet und nachträglich die angegebenen Mutationen eingefügt.

Vektor	Insert	Mutationen	Quelle
pcDNA3-YFP/CFP	APP695	C98S/C105S	Lisa Münter, AG Multhaup
pBluescript	APP695		Ariane Schmechel, AG Multhaup
pBluescript	APLP1		Simone Eggert, Heidelberg
pCEP4	APLP2		Simone Eggert, Heidelberg
pPIC9	sAPLP1 α		Roberto Cappai, Australien
pPIC9	sAPLP2 α		Roberto Cappai, Australien
pPIC9	sAPP770 α		Roberto Cappai, Australien

5.8. Antiseren und Antikörper

In dieser Arbeit wurden die folgende Antiseren und Antikörper verwendet. Abkürzungen: WB- Western Blot, IP: Immunpräzipitation, IF: Immunfluoreszenz.

W0-2:	monoklonaler Maus-Antikörper (The Genetics Company (TGC)); Epitop A β 5–8, humanspezifisch, (Ida et al., 1996) WB: 0,03 mg/ml IP: 0,26 mg/ ml
22C11:	monoklonaler Maus-Antikörper; Epitop: APP 66–81 (Hilbich et al., 1993) WB: 1:10000
G2-10:	monoklonaler Maus-Antikörper (TGC); Epitop: C-Terminus von A β 40 ELISA nach Angaben TGC
G2-13:	monoklonaler Maus-Antikörper (TGC); Epitop: C-Terminus von A β 42 ELISA nach Angaben TGC
Anti-Flag-„tag“:	monoklonaler Maus-Antikörper (Sigma-Aldrich); Epitop: DYKDDDDK WB: 0,25 mg/ml, IP: 1 mg/ml, IF: 0,5 mg/ml
Anti-Myc-„tag“:	monoklonaler Maus-Antikörper (Cell Signaling, USA); Epitop EQKLISEEDL; WB: 1:10000, ELISA: 1:5000

40090:	polyklonaler Kaninchen-Antikörper; wurde hergestellt durch Immunisierung mit in Hefe rekombinant exprimierter APP-Ektodomäne APP 18–350 (Schmechel et al., 2004), IF: 1:100
879:	polyklonaler Kaninchen-Antikörper; Epitop: C-Terminus sAPP β , P. Paganetti, Novartis, WB: 1:1000
42476:	polyklonaler Kaninchen-Antikörper, Epitop: APLP2, Aminosäuren 608-662; WB: 1:2000
42464:	polyklonaler Kaninchen-Antikörper, Epitop: APLP1, Aminosäuren 499-557; WB: 1:2000, IF: 1:100
8/1:	polyklonaler Kaninchen-Antikörper, wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt durch Immunisierung mit in Hefe rekombinant exprimierter sAPLP2 α -Ektodomäne, WB: 1:2000, IF: 1:100
2nd-anti-Maus-HRP:	mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper zur Chemilumineszenz-Detektion muriner Erstantikörper im Western Blot (Promega, USA), WB: 1:10000
2nd-anti-Kaninchen-HRP:	mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper zur Chemilumineszenz-Detektion von Erstantikörpern aus Kaninchen im Western Blot (Promega, USA), WB: 1:10000
SA-HRP:	mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter Streptavidin-Antikörper WB: 1:10000

5.9. Allgemeine Laborchemikalien

Die Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von Sigma Aldrich, Deutschland, Roth GmbH, Karlsruhe oder Merck, Darmstadt in der Qualitätsstufe pro analysis bezogen.

5.10. Enzyme und „Kits“

Restriktionsenzyme, T4-Ligasen und DNA-Polymerasen wurden von den Firmen New England Biolabs, USA, Promega, USA oder Biotin, Mannheim bezogen. In dieser Arbeit verwendete „Kits“, die nicht gesondert aufgeführt werden, wurden nach Herstellerangaben verwendet und

von Qiagen, Hilden, Macherey&Nagel, Düren, The Genetics Company, Schweiz; Stratagene, USA und Invitrogen, Karlsruhe bezogen.

5.11. Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Plastikwaren wie ReagiergefäÙe, Mikrotiterplatten und Petrischalen wurden von Sarstedt, Nümbrecht bezogen. Mikrotiterplatten für ELISA wurden von Nunc, Wiesbaden, Pipettenspitzen von Steinbrenner, Wiesbaden oder Roth GmbH, Karlsruhe bezogen. Es wurden Röntgenfilme „Hyperfilm ECL“ von Ge Healthcare, München, und „Konica Minolta Medical Film“ von A. Hartenstein, Würzburg verwendet.

5.12. Puffer

Alle nicht gesondert aufgelisteten Pufferlösungen wurden nach Sambrook et al. hergestellt (Sambrook, 1989).

5.13. Geräte

- Begasungsbrutschrank Hera Cell 240 (Heraeus-Kendro, USA)
- Sterile Werkbank Herasafe (Heraeus-Kendro, USA)
- Pipetten, 1000 ml, 200 ml , 20 ml, 10 µl und 2 µl (Gilson, USA)
- Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR (Cawo, Deutschland)
- Massenspektrometer Bruker Reflex, MALDI-TOF-Massenspektrometer mit Reflektor und kontinuierlicher Extraktion (Bruker Daltonic, Bremen)
- Photometer SmartSpec 3000 (Biorad, München)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg)
- PCR-Maschine Mastercycler (Eppendorf, Hamburg)
- Analysenwaage BP 211D (Sartorius, Göttingen)
- Vakuumkonzentrator SpeedVac (Savant)
- Li-Cor 4000 Flachgelsequenzler (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE)
- Mikrotiterplattenlesegerät Anthos ht2 (Anthos, Salzburg)

- Schüttelinkubator TR-225 HT (Infors AG, Bottmingen)
- FPLC-Anlagen (Ge Healthcare, München)
- Biacore 3000, (Ge Healthcare, München)
- LSM-510 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen)
- Axivert 100 (Carl Zeiss, Oberkochen)

5.14. Software

Für die Erstellung dieser Arbeit wurden die folgenden Programme benutzt; Corel Photo-Paint 11, Corel Draw 11, LSM5 Image Browser, Microsoft Office 2003, End Note 9, Adobe InDesign CS2, Adobe Illustator, SE Central (mit Clone Manager 5, Primer Designer 4, Align Plus 4), RasWin, BiacoreEvaluation4.1, Unicorn 4.0, Sigma Plot, Till-Vision sowie die Internet-Tools Pubmed, Expasy und NCBI Blast.

6. Methoden

6.1. Molekularbiologische Methoden

6.1.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Standardmäßig wurde folgender PCR-Ansatz gemacht:

10-20 ng Ausgangs („template“)-DNA

1 x Polymerasespezifischer-Puffer (pfu oder taq)

0,3-0,5 mM dNTPs (Bioline, Mannheim)

10 pmol je Primer (siehe Kapitel 5.5.)

5 U/μl Polymerase (Pfu, Promega, USA oder Stratagene, USA; taq, Promega, USA oder Bioline, Mannheim)

Es wurde immer eine Hot-Start-PCR durchgeführt, das heißt, die gekühlten Ansätze wurden direkt in den auf 95°C vorgeheizten PCR-Block (Mastercycler oder MastercyclerGradient, Eppendorf) gestellt und das Programm gestartet.

Denaturiert wurde standardmäßig 1 min bei 95°C. Die „Annealing“-Temperaturen lagen zwischen 54°C und 60°C für 30-60 s und die Elongation erfolgte entsprechend der Länge der zu amplifizierenden DNA (ca. 30-60 s je kb der DNA) bei 68°C (pfu-Polymerase von Stratagene, USA) oder 72°C (alle anderen Polymerasen). Wenn nicht anders vermerkt, wurden 30 Zyklen durchgeführt.

6.1.2. Klonierungsstrategien

6.1.2.1. Klonierungsstrategie für die Umklonierung von pPIC9 in pPICZαA

Es war notwendig, die Konstrukte von dem pPIC9-Vektor in den aktuellen Vektor pPICZαA umzuklonieren. Dazu wurden die kodierenden DNA-Sequenzen im Leserahmen mit dem α-Faktor des pPICZαA-Vektors aus den Ursprungsplasmiden mittels PCR amplifiziert. Durch

überhängende Primerenden wurden Restriktionsschnittstellen, für Klone ohne myc-„tag“ zusätzlich ein Stopcodon, eingefügt. Wurde kein Stopcodon eingefügt, wurde ein C-terminaler myc und His-„tag“ mit abgelesen.

Die Ligation von pPICZ α A -APP18-350, -sAPLP1 α , -sAPLP2 α und der entsprechenden Klone mit myc-tag erfolgte über die Schnittstellen von EcoRI und NotI, die von pPICZ α A-sAPP770 α und pPICZ α A-sAPP770 α -myc über die von NotI und XbaI. Die verwendeten Primer sind in Kapitel 5.5.1. angegeben.

6.1.2.2. Klonierungsstrategie der APLP-Vollängenkonstrukte

Für stabile Koexpressionen in höheren eukaryotischen Zellen war es wichtig, dass APLP2, APLP1 und APP in einheitlichen Vektoren, die sich nur in ihrer Antibiotikaresistenz unterscheiden, zur Verfügung stehen. Dafür eignen sich die pcDNA3.1-Vektoren, da sie mit Genetecin-, Zeocin- sowie Hygromycin-Resistenz erhältlich sind (Invitrogen, Karlsruhe).

Die Umklonierung von APLP2-763 wurde über eine interne HindIII-Schnittstelle in zwei Schritten durchgeführt. Mittels PCR wurden der 5'-Bereich bis einschließlich der HindIII-Schnittstelle sowie der HindIII-Schnittstelle und der 3'-Bereich amplifiziert. Zusätzlich wurden mit Hilfe der Primer am 5'- bzw. 3'-Ende überhängende Enden mit den benötigten Restriktionsschnittstellen amplifiziert. Die erste Ligation (des 5'-Bereichs) in den Vektor pcDNA3.1 (Genetecin) erfolgte über die Enden von NheI und HindIII geschnittenem Vektor und Amplifikat. In diesen Vektor wurde dann der 3'-Bereich über die Schnittstellen von HindIII und XbaI ligiert.

Die Umklonierung von APLP1 erfolgte direkt aus dem pBluescript-Vektor pBS-APLP1 über die Schnittstellen für XbaI und XhoI in den Vektor pcDNA3.1/Hygro.

Als Vorlage zur Generierung des Plasmids pcDNA3.1/Zeo-APP695 wurde pBluescript-APP695 verwendet. Dazu wurde das APP695 über die Restriktionsenzyme Sall und SpeI herausgeschnitten und über die kompatiblen Schnittstellen von XhoI und NheI in den pcDNA3.1/Zeo-Vektor ligiert.

6.1.2.3. Klonierungsstrategie der YFP/CFP/FLAG-markierten APLP-Vollängenkonstrukte

Es wurden die modifizierten Vektoren pcDNA3-YFP, pcDNA3-CFP und pcDNA3-FLAG

verwendet (Quelle: AG Prof. Dr. Michael Schaefer). Die APLP1- und APLP2-Konstrukte mussten im Leserahmen mit den entsprechenden „tags“ erzeugt werden. Dazu wurden Primer generiert, die in einer PCR im 3'-Bereich das Stop-Codon deletieren und zusätzlich eine zum Vektor kompatible Schnittstelle amplifizieren (XbaI).

APLP1 wurde aus pcDNA3.1/Hygro-APLP1 über die Schnittstellen von KpnI und XbaI in den pcDNA3-CFP-Vektor umklontiert. Durch PCR mit den Primern APLP1-Int-P und APLP1-CT-XbaI, Restriktionsverdau und anschließender Ligation erfolgte dann die Deletion des Stopcodons.

Zur Herstellung des Plasmids pcDNA3-YFP-APLP2 wurde zuerst der 3'-Bereich kloniert. Dazu wurde erneut die interne HindIII-Schnittstelle verwendet. In einer PCR wurde das 3'-Ende mit deletiertem Stopcodon und der XbaI-Schnittstelle generiert und nach Restriktionsverdau mit HindIII und XbaI in den Vektor ligiert. In diesen Vektor wurde anschließend der 5'-Bereich über SpeI und HindIII umklontiert.

6.1.2.4. Klonierungsstrategie der YFP/CFP/FLAG-markierten Deletionsmutanten

Als Template für diese Klonierung standen die Plasmide pcDNA3-YFP-APP, -APLP1 und -APLP2 zur Verfügung (Kapitel 6.1.2.3.). Die cDNAs, welche die Deletionsmutanten kodieren wurden in drei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen amplifiziert. Die verwendeten Primer sind in Kapitel 5.5.3. zusammengefasst. Interne Rückwärtsprimer wurden so gewählt, dass interne Restriktionsschnittstellen, XhoI für APP und EcoNI für APLP1 und APLP2 benutzt werden konnten.

Mit der ersten PCR wurde der neue N-Terminus definiert und ein Teil der Signalsequenz wurde angefügt (siehe Abb. 34). Mit den folgenden beiden PCR-Reaktionen wurde das Signalpeptid vervollständigt. Zusätzlich wurde vor das Startcodon mit der dritten PCR eine NotI-Schnittstelle eingefügt (Abb. 34). Für APP, APLP1 und APLP2 wurde das Signalpeptid von APP amplifiziert. Die Ligation in die Zielvektoren erfolgte mit NotI und XhoI für APP sowie mit NotI und EcoNI für APLP1 und APLP2.

Zwischen den einzelnen Schritten wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und 1 µl als „template“ für die nächste PCR eingesetzt. Dabei wurde die Zyklenzahl von 30 (PCR1) auf 12 (PCR2) und 8 (PCR3) Zyklen heruntergesetzt.

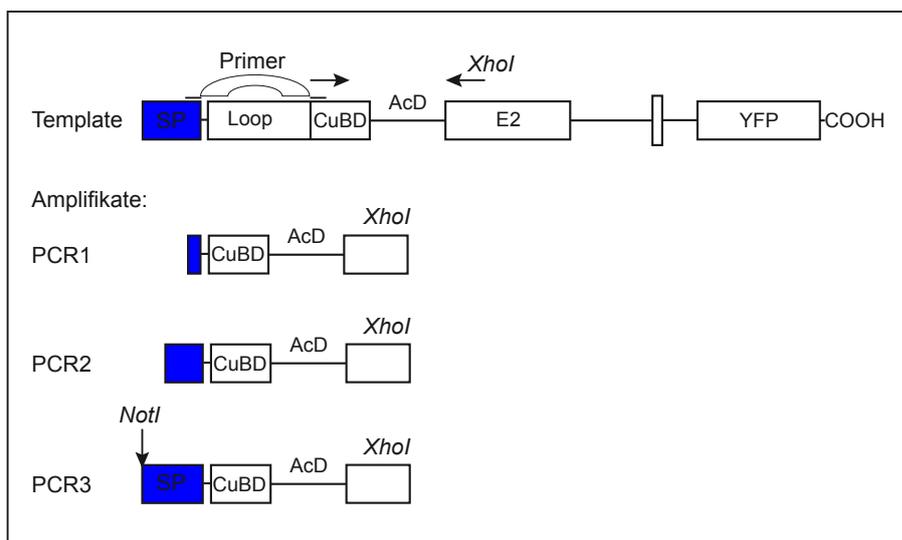


Abb. 34: Schematische Darstellung der PCR für die Generierung der Deletionsmutanten. SP: Signalpeptid, CuBD: Kupferbindedomäne.

6.1.2.5. Klonierungsstrategie nach der „Quick Change“-Methode

Mit der „Quick-Change“-Methode können in einer PCR-Reaktion direkt Basen ausgetauscht werden. Dazu werden zwei komplementäre Primer mit etwa 30-45 Basen, die die gewünschten Punktmutationen enthalten, erstellt. In einer PCR wird dann das gesamte Plasmid amplifiziert (mit pfu-Polymerase, Elongation 1 min je kb Plasmidgröße, insgesamt 20 Zyklen). Das „template“ enthält methylierte Basen, wohingegen das PCR-Produkt unmethyliert ist. So kann mit Hilfe des Enzyms DpnI die „Template“-DNA verdaut werden. Das verbleibende PCR-Produkt kann dann direkt in chemisch kompetente Bakterienzellen transformiert werden (Kapitel 6.1.3.). Die Mutationen LoopS1, LoopS2 und LoopSD wurden mit dieser Methode erzeugt. Die entsprechenden Primer sind in Kapitel 5.5.4. angegeben.

6.1.2.6. Sequenzierungen

Die erzeugten Konstrukte wurden entweder mit fluoreszierenden Primern oder Nukleotiden auf Basis der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger sequenziert (Sanger et al., 1977). Letztere erfolgten durch die Firma GATC.

6.1.3. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

6.1.3.1 Chemisch kompetente Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden 240 ml LB-Medium 1:100 aus einer Übernachtskultur angeimpft. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,6 wurden die Zellen auf 4°C für 5 min abgekühlt und in sterilen Zentrifugenbechern für 5 min bei 4000 rpm sedimentiert. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls bei 4°C. Das Sediment wurde in 2/5 des ursprünglichen Volumens (96 ml) Tfb I aufgenommen und nach 5 min abermals zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1/25 des ursprünglichen Volumens (9,6 ml) Tfb II resuspendiert, 15 min inkubiert, aliquotiert und direkt auf -80°C-Schrank eingefroren.

Für die Transformation wurden 1-5 µl DNA (die nicht gereinigt sein muss) in 50 µl kompetenten Zellen aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitze-Schock für 45 Sekunden bei 42°C. Nach 2 min abkühlen auf Eis wurden 500 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) dazugegeben. Nach 30-60 min wurden die kompletten Ansätze auf Selektionsmediumplatten ausplattiert.

Tfb I: 30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% (v/v) Glycerol, pH 5,8

Tfb II: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% (v/v) Glycerol, pH 6,5

6.1.3.2. Elektrokompente Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 250 ml LB-Medium 1:100 aus einer Übernachtskultur angeimpft. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5-1 wurden die Zellen 15-30 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 5000 rpm geerntet. Das Pellet wurde mit 250 ml und 125 ml eiskalten, sterilem Wasser und 5 ml 10% Glycerin gewaschen und abschließend in 1 ml 10% Glycerin aufgenommen. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf -80°C gelagert.

Für die Elektroporation wurde nur gereinigte DNA verwendet. Hauptsächlich wurde diese Methode zur Retransformation eingesetzt. Dazu wurden 10 ng Plasmid-DNA in 30 µl

elektrokompetenten Zellen aufgenommen, in eine eisgekühlte Küvette überführt und für 1 min auf Eis inkubiert. Die Elektrotransformation erfolgte bei 25 mF, 1,8 kV und 200 Ω unter Verwendung eines Elektroporator Gene Pulser II (BioRad, München). Anschließend wurden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 30-60 min bei 37°C geschüttelt. 50-300 μ l wurden auf Selektionsplatten ausgestrichen.

Die Selektion erfolgte entweder mit 25 μ g/ml Zeocin (pPICZ α A-Vektoren) oder 100 μ g/ml Ampicillin.

6.1.4. Plasmidpräparationen

Plasmid-DNA wurde im kleinen Maßstab (Mini-Prep, ca. 5 μ g) mit den Puffern aus dem Macherey&Nagel NucleoBond®-PC500 „Maxi-Kit“ isoliert. Dazu wurden von 3 ml Bakterienkultur mit dem entsprechenden Plasmid, 1,5 ml in einem Eppendorf-Gefäß abzentrifugiert (6.600 rpm, 6 min, Raumtemperatur). Das Pellett wurde in 100 μ l S1-Puffer resuspendiert und anschließend mit 200 μ l S2-Puffer für höchstens 5 min lysiert. Mit dem Neutralisationspuffer S3 (150 μ l) erfolgte die Fällung der Proteine, welche zweimal bei 4°C und 14.000 rpm abzentrifugiert wurden. Die Fällung der Plasmid-DNA aus dem Überstand erfolgte entweder mit Isopropanol (7/10 des Überstandsvolumens) bei Raumtemperatur, oder mit 100% eiskaltem Ethanol (2,5-fache Menge vom Überstandsvolumen) für 20 min auf -20°C. Das Pellett wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30-50 μ l H₂O aufgenommen.

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA im großen Maßstab erfolgte entweder mit NucleoBond®-PC500-Maxi oder NucleoBond®-Xtra-Midi nach Herstellerangaben.

6.1.5. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationsbestimmungen erfolgten photometrisch (Photometer SmartSpec 3000, Bio-Rad, München). Dazu wurden 1:100 Verdünnungen der DNA in 400 μ l H₂O hergestellt und in einer Quartz-Küvette bei 260 und 280 nm gemessen. Dabei entspricht 1 OD₂₆₀ = 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA. Unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors wurde so die DNA-Konzentration berechnet. Verunreinigungen der DNA mit Proteinen und RNA wurden mit dem

Faktor 260/280 nm (ratio) kontrolliert. Diese lagen üblicherweise zwischen 1,7 und 2.

6.1.6. DNA-Agarosegelelektrophorese

Für analytische als auch präparative Anwendungen wurden DNA-Agarosegele gefahren. Dazu wurde Agarose von Invitrogen, Karlsruhe verwendet. Entsprechend der erwarteten Fragmentgrößen wurden Gele von 0,8-1% Agarose eingesetzt. Durch den Zusatz von 1 µg/ml Ethidiumbromid konnte die DNA auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht werden.

1 x TBE-Laufpuffer: 90 mM Tris, pH 8,3, 90 mM Borsäure, 0,1 mM EDTA

6 x DNA-Probenpuffer 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 60% (v/v) Glycerin, 0,1 mM EDTA, pH 8,0

6.1.7. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und von PCR-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte anhand des „gel-extraction-kits“ (Qiagen, Hilden) nach der Anleitung des Herstellers. Die Reinigung von PCR-Fragmenten wurde mit dem „PCR-purification-kit“ (Qiagen, Hilden) ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt.

6.2. Expression rekombinanter Proteine in *Pichia pastoris*

Pichia pastoris ist eine methylotrophe Hefe, das heißt, sie kann Methanol als Kohlenstoffquelle nutzen. Die Klonierung der Gene in den pPICZ α A-Vektor erfolgte so, dass sie im Leserahmen mit dem α -Faktor-pre-Propeptid aus *S. cerevisiae* abgelesen wurden (siehe Kapitel 6.1.2.1.). Die Fusion mit dem α -Faktor führt dazu, dass die naszierende Proteinkette in das ER transportiert, posttranslational modifiziert und sekretiert werden kann. Der α -Faktor enthält das Aminosäuresequenzmotiv EKR, welches nach der Translation zur Abspaltung durch die KEX2-Protease führt (Brake et al., 1984).

Die Regulation der Expression erfolgt über den Alkoholoxidase (AOX)-Promotor, welcher durch Methanol induzierbar ist. In den Peroxisomen wird Methanol durch die Alkoholoxidase zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid oxidiert. Da die Alkoholoxidase eine geringe Affinität

zu Sauerstoff hat, erfolgt die Kompensation über eine erhöhte Proteinexpression. Durch die Kombination des zu exprimierenden Proteins mit dem AOX-Promotor führt die Induktion durch Methanol zu einer sehr hohen Expressionsrate. In Anwesenheit von Glycerin oder anderen Kohlenstoffquellen ist der AOX-Promotor hingegen fast vollständig reprimiert.

6.2.1. Kultivierung von *P. pastoris*

Ein optimales Wachstum zeigt *P. pastoris* bei 28-30°C, die Verdopplungszeit beträgt dann in der exponentiellen Wachstumsphase etwa zwei Stunden.

Zum Animpfen einer *P. pastoris* Kultur (Stamm SMD1168, Invitrogen, Karlsruhe) wurden 50 µl Glycerinkultur in 500 ml YPD aufgenommen und zur Vermeidung von Bakterienkontaminationen mit 1 x Penicillin /Streptomycin versetzt und 24 h bei 220 rpm und 29°C geschüttelt (Certomat BS-1, Braun Biotech). Bei Erreichen einer OD600 von 1 bis 1,6 wurden die Zellen geerntet, d.h. 10 min in sterilen Zentrifugenbechern bei 1500 x g und 4°C abzentrifugiert. Die Pelletts wurden dann entweder zur Herstellung von Glycerolstocks oder elektrokompenten Zellen verwendet.

6.2.2. Herstellung von Glycerolkulturen

Die Zellpellets der kultivierten Hefezellen (siehe Kapitel 6.2.1) wurden in 5 ml YPD-Medium mit 15% Glycerin aufgenommen, in 50 µl Aliquots abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

6.2.3. Herstellung elektrokompenter Hefezellen und Elektrotransformation

Das Sediment (siehe Kapitel 6.2.1.) wurde jeweils in 500 ml und 250 ml eiskaltem H₂O aufgenommen und zentrifugiert (1500 x g, 4°C). Anschließend wurde das gewaschene Pellet in 20 ml 1 M Sorbitol gelöst, abzentrifugiert und die Zellen in einer zähflüssigen Suspension von 1-2 ml 1 M Sorbitol bis zu einer Woche bei 4°C aufbewahrt.

Für die Elektrotransformation wurden 80 µl der kompetenten Zellen mit 5-20 µg linearisierter DNA vermischt und in einer 0,2 cm Elektroportationsküvette (BioRad) 5 min auf Eis inkubiert.

Die Elektroporation erfolgte bei 25 μ F, 1,5 kV und 400 Ω . Anschließend wurden direkt 1 ml 1 M Sorbitol dazugegeben und für 2 h bei 30°C inkubiert. Verschiedene Mengen der Zellsuspension wurden auf YPDSZeocin-Platten ausgestrichen und 3-4 Tage bei 30°C bebrütet.

6.2.4. Proteinexpression in *P. pastoris*

Klonselektion

Von den YPDS-Platten wurden 5-10 Klone in 10 ml BMGY-Medium aufgenommen und 12-24 h bei 29°C und 220 rpm geschüttelt. Von 5 ml wurde eine Glycerinkultur hergestellt und 5 ml wurden für die Testexpression in 25 ml BMMY/2% Methanol eingesetzt. Dabei wurden die eingesetzten Mengen der verschiedenen Klone auf jeweils die gleiche Optische Dichte eingestellt (OD₆₀₀ ~ 1). Nach 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden wurden Proben genommen, in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm abzentrifugiert und die Kulturüberstände in einem Dot Blot oder Western Blot analysiert. Von den am besten exprimierenden Klonen wurden wie in 6.2.2. beschrieben Glycerinkulturen angefertigt und für weitere Versuche gelagert.

Proteinexpression im großen Maßstab

Für die Proteinexpression im großen Maßstab wurden 30 ml BMGY mit 50 μ l Glycerinkultur versetzt und 12 h bei 29°C, 220 rpm geschüttelt. Ein Teil dieser Vorkultur wurde unter sterilen Bedingungen abzentrifugiert und im gleichen Volumen BMMY/2% Methanol aufgenommen. 300-500 ml BMMY/2% Methanol wurden so angeimpft, dass die OD₆₀₀ ungefähr 1 betrug. Die Expressionsdauer richtete sich nach den vorher bestimmten Zeiten mit der höchsten Proteinexpressionsrate, betrug aber immer zwischen 24 und 48 Stunden.

6.3. Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *P. pastoris*

6.3.1. Anionenaustauschchromatographie

Aufreinigung über eine Säule

Die Hefekulturen (siehe Kapitel 6.2.) wurden für 10 min bei 4.500 rpm abzentrifugiert und der Kulturüberstand über einen Sterilfilter (0,2 μ m) von im Medium verbliebenen Zellbestandteilen getrennt. 200-300 ml des Kulturüberstandes (versetzt mit Complete, Proteaseinhibitormix)

wurden auf eine Q-Sepharosesäule (Hiload_16/10_Q-Sepharose_FF, Ge Healthcare, München) aufgetragen. Die Q-Sepharose wurde vorher mit dem Laufpuffer (50 mM Tris, pH 6,8) equilibriert. Die Steuerung erfolgte dabei über eine ÄKTA-FPLC- oder ÄKTA-explorer-Anlage (Ge Healthcare, München). Nach dem Auftrag wurde die Säule mit mindestens fünf Volumen des Laufpuffers gewaschen, bis die UV-Absorption wieder fast die Basislinie erreicht hat. Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten (über ein Volumen von 100 ml) mit dem Elutionspuffer 50 mM Tris, 2 M NaCl, pH 6,8. Die Fraktionen wurden gesammelt und im Dot Blot auf das rekombinante Protein untersucht. Die Proteinenthaltenden Fraktionen wurden über einen Amicon-Filter aufkonzentriert (Amicon centrifugal tubes 30 kDa „cut-off“, Millipore, Schwalbach). So wurde hauptsächlich APP18-350 aufgereinigt.

Aufreinigung im „batch“-Verfahren

Da die Expressionsraten von APLP2 und APP770 deutlich geringer und der proteolytische Abbau höher als bei APP18-350 war, wurden diese Aufreinigungen mit 1000-2000 ml Kulturüberstand im „batch“-Verfahren durchgeführt. Der Kulturüberstand wurde abzentrifugiert und direkt mit 50-100 ml Q-Sepharose (equilibriert in Laufpuffer) mit 10 mM EDTA und 0,4 mM PMSF in einer 2 l Flasche inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C mit gelegentlichem Durchmischen von Kulturüberstand und Sepharose. Anschließend wurde die Q-Sepharose mit dem rekombinanten Protein mit Laufpuffer mindestens viermal gewaschen und anschließend mit 50 mM Tris, 1 M NaCl, pH 6,8 in zwei Schritten mit je 100 ml eluiert. Dazu wurde die Sepharose mit dem Elutionspuffer für 10 min auf einem Überkopfdreher bei 4°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die Überstände wurden über einen Faltenfilter von überschüssiger Sepharose getrennt und in einem Amicon-Becher (Amicon Ultrafiltration Cell, Filter mit 50 kDa „cut-off“ von Millipore) auf 10-20 ml eingeeengt.

6.3.2. Blue Sepharose

Der Farbstoff Cibacron Blue F3G-A an Sepharose CL-4B gekoppelt wird als Blue Sepharose bezeichnet. Die Kopplung erfolgte wie in Böhme et al. beschrieben (Böhme et al., 1972). Diese Sepharose ist zur Aufreinigung vieler Proteine wie z.B. Albumin oder Interferon geeignet. Auch für APLP1 konnte eine sehr gute Bindung an Blue Sepharose festgestellt werden. Die Aufreinigung erfolgte ebenfalls im „batch“-Verfahren. 1 l Hefekulturüberstand wurde mit 50 ml

Blue Sepharose (equilibriert in 50 mM Tris, pH 6,8-7) versetzt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Abzentrifugation und Waschen der Sepharose wurde der erste Durchlauf erneut mit der Blue Sepharose inkubiert. Die Elution erfolgte mit 50 mM Tris, 1 M NaCl, pH 6,8 in zwei Schritten mit je 100 ml und wurde analog zu Kapitel 6.3.1. eingeeengt.

6.3.3. Gelpermeationschromatographie

Die konzentrierten Proteinlösungen aus 6.3.1 und 6.3.2. wurden entweder auf eine „HighLoad XK16/60 Superdex 200“-Säule (2 ml) oder eine „HighLoad XK26/60 Superdex 200“-Säule (5 ml) aufgetragen (Ge Healthcare, München). Diese Säulen haben einen theoretischen Trennbereich von 10-600 kDa. Der Laufpuffer bestand aus 50 mM NaH₂PO₄ und 100 mM NaCl, pH 6,9. Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts der rekombinanten Proteine wurde eine Eichreihe erstellt. Dazu wurden acht Standardproteine verwendet (LMW and HMW Gel Filtration Calibration Kit, Ge Healthcare, München). Die Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten, wurden im Western Blot ermittelt, so konnte vom Elutionsvolumen ausgehend über die Eichgerade auf das native Molekulargewicht zurückgerechnet werden. Dazu wurde der Verteilungskoeffizient (K_{av}) der Proteine wie folgt berechnet:

$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ mit dem Ausschlussvolumen V_0 , dem Elutionsvolumen V_e und dem Säulenvolumen V_t . Folgende Eichgerade wurde erstellt: $K_{av} = f(\log \text{Molekulargewicht})$.

6.3.4. Herstellung polyklonaler Antikörper mit gereinigten Proteinen aus *P. pastoris*

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper wurden 150 µg gereinigtes sAPLP2 α 1:1 mit Freund'schem Adjuvanz versetzt und den Kaninchen injiziert. Die Immunisierung erfolgte viermal in einem Abstand von 3-4 Wochen. 4 Wochen nach der letzten Immunisierung wurde den Tieren das Blut entnommen und durch Zentrifugation das Serum gewonnen, welches in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurde.

6.4 Kreuzvernetzung von gereinigten Proteinen aus *P. pastoris*

Der homobifunktionale Kreuzvernetzer DTSSP ist ein wasserlöslicher N-hydroxysuccimid

Ester, der an primäre Amine bindet. DTSSP wurde frisch in einer Konzentration von 10 mM in H₂O gelöst. Die gereinigten Dimer-Fractionen (0,25-1 µg/µl) wurden mit 1 mM DTSSP versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte das Abstoppen der Kreuzvernetzungsreaktion mit 10 mM Tris (pH 7,5).

Für die Inhibition der Dimerbildung wurden die Fractionen mit 8 und 16-fach molarem Überschuss der Peptide APP-Loop-WT und APP-Loop-Ser für 60 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend erfolgte die Kreuzvernetzung. Die Proben wurden 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und die Überstände in einem 8% SDS-PA-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt.

6.5. „Real-Time-Surface-Plasmon-Resonanz“- SPR- Analysen

Für die SPR-Analysen stand eine Biacore 3000 (Ge Healthcare, München) zur Verfügung. Ein Vorteil von diesem Gerät ist, dass 4 Flusszellen simultan angesprochen werden können. So konnten die Bindungsstudien der verschiedenen Analyten an die drei Liganden und die Kontrolle innerhalb einer Messung durchgeführt und so die Ergebnisse direkt miteinander verglichen werden. Für die Kopplung wurde ein CM5-Chip verwendet. Die Aktivierung des Chips erfolgte mit EDC/NHS nach Herstellerangaben. 100 µg/ml Proteinlösung in Kopplungspuffer (50 mM Na-Acetat pH 3,5) wurden für 5 min bei einer Flussrate von 10 µl/min gekoppelt. Abschließend wurden die freien Bindestellen ebenfalls nach Angaben des Herstellers abgesättigt. Bei APP18-350-LoopS erfolgte die Kopplung über Nacht bei einer Flussrate von 1 µl/min. Die Analyten wurden in Konzentrationen von 5-75 µg/ml in Laufpuffer (1 x PBS) eingesetzt. Für die Regenerierung wurde 50 mM NaOH verwendet. Zur Verhinderung von Masse-Transfer-Effekten wurden die Kinetiken bei einer Flussrate von 30 µl/min durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels der BIAevaluation-Software 4.1. Zwischen den einzelnen kinetischen Messungen erfolgten Kontrollmessungen mit dem polyklonalen Antikörper 40090, welcher 1:100 verdünnt als Analyt eingesetzt wurde.

6.6. Biochemische Methoden

6.6.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde ein Bicinchoninsäure (BCA)-Assay durchgeführt. Dieser beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} , dabei bildet BCA spezifisch mit Cu^{+} einen Farbkomplex, der kalorimetrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm nachgewiesen werden kann. Die zu bestimmenden Proteinlösungen sowie BSA als Eichprotein wurden in verschiedenen Verdünnungen (Volumen 20 oder 25 μl) in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Die BCA-Lösung wurde 1:40 mit CuSO_4 versetzt und davon je 200 μl zu den Proteinlösungen pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C sowie 15 min bei RT wurde die Wellenlänge bei 562 nm gemessen und über die Eichgerade die Proteinkonzentrationen errechnet.

6.6.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die aufzutrennenden Proteingemische wurden in 4 x SDS-Protein-Probenpuffer entweder mit oder ohne 20% (v/v) β -Mercaptoethanol aufgenommen. Nach 5-minütiger Denaturierung bei 95°C wurden sie auf ein SDS-Polyacrylamid (PA)-Gel aufgetragen. Entsprechend des erwarteten Molekulargewichts der Proteine wurden dazu 8%ige bis 15%ige SDS-PA-Gele verwendet. Die Auftrennung erfolgte elektrophoretisch bei 20–30 mA.

4 x SDS-Protein-Probenpuffer : 250 mM Tris/HCl, pH 6,8, 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerin,
0,008% Bromphenolblau

6.6.3. Dot-Blot- und Western-Blot-Analyse

6.6.3.1. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Für den Dot Blot wurde eine spezielle Apparatur (Minifold, Schleicher&Schuell) verwendet. Dazu wurde ein Stück Whatman-Papier und eine Nitrozellulosemembran in 1 x PBS eingeweicht,

die Apparatur zusammengebaut, die Proteinlösung in die Löcher pipettiert und die Proteine mittels einer Vakuumpumpe auf die Membran „gesaugt“.

Für den Western Blot wurden die SDS-PA-Gele auf eine Nitrozellulosemembran im Nassblotverfahren in einer Trans-Blot-Apparatur (Bio-Rad, München) bei 380 mA für 3 h oder 180 mA über Nacht transferiert. Anschließend wurde die Nitrozellulose in H₂O gewaschen und mit einer 2% Ponceaulösung gefärbt, um gleichmäßigen Proteinauftrag und das Blotten zu kontrollieren. Die Überschussfärbung wurde mit 1 x PBS wieder entfernt.

6.6.3.2. Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Die Membranen wurden in 5-10% Magermilchpulver entweder in 1 x PBS oder 1 x TBS gelöst für mindestens eine Stunde blockiert. Nach dreimaligem kurzen waschen entweder in PBS oder TBS erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen wurde der Erstantikörper mit dem mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Maus- oder Kaninchen-Zweitantikörper (Promega, USA) nachgewiesen. Die gebundenen Antikörper und damit indirekt das Protein, das vom Primärantikörper erkannt wird, werden nach Zugabe der ECL-Reagenzien (Ge Healthcare, München) mittels Chemolumineszenz auf Röntgenfilmen (GE-Healthcare) detektiert.

Selbst hergestelltes ECL-Reagenz (<http://www.laborjournal.de/rubric/tricks/tricks/trick81.html>)

Reagenz A: 50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,6 (lagern bei 4°C)

Reagenz B: 22 mg p-Hydroxycoumarinsäure in 20 ml DMSO (lagern bei RT, dunkel)

H₂O₂ (35%)

Ansatz: 1 ml A + 0,3 µl H₂O₂ + 0,1 ml B

6.6.4. Herstellung von Zelllysaten

Für Expressionskontrollen oder Immunpräzipitationen wurden Zelllysate hergestellt. Dazu

wurden die bis zu 100% konfluenten Zellen in den Zellkulturschalen auf Eis gestellt, das Medium abgenommen und mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde entsprechend der Schalenfläche 150-1000 µl Lysepuffer Standard oder Ko-IP-Lysepuffer auf die Zellen pipettiert und für 10-30 min bei 4°C auf dem Kippschüttler inkubiert. Anschließend wurden die lysierten Zellen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei 4°C und 14.000 rpm unlösliche Bestandteile sedimentiert. Das Lysat wurde entweder mit Probenpuffer versetzt oder direkt für eine Immunpräzipitation eingesetzt.

Lysepuffer: 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1-2 % Triton-X-100, 1-2 % NP-40

Ko-IP-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 x Complete-Proteaseinhibitormix (Roche, Mannheim)

6.6.5. Immunpräzipitationen

Immunpräzipitationen (IP) von Aβ für die Detektion im MALDI-MS erfolgten aus 24 h konditioniertem Medium mit dem monoklonalen Antikörper W0-2. Pro Ansatz wurden 30 µl Protein G-Sepharose (Ge Healthcare, München) mit 2,6 µg W0-2 in einem Mastermix angesetzt. Dieser wurde für 10 min inkubiert und dann auf die Eppendorfgefäße verteilt. 500-1000 µl des konditionierten Mediums wurden mit dem Sepharose-Antikörpermix über Nacht bei 4°C im Überkopfdreher inkubiert. Die Sepharose wurde in einer Tischzentrifuge für 3 min bei 2000 x g abzentrifugiert und dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Zum Entsalzen erfolgten ein bis zwei Waschschrte mit 10 mM Ammoniumacetat. Eluiert wurde zweimal 5 min mit 50% Essigsäure bei 40°C im Eppendorfschüttler. Das Eluat wurde in der Speed-Vac eingedampft und auf -20°C bis zur MALDI-MS-Messung gelagert.

Für Koimmunpräzipitationen wurden die FLAG-markierten Proteine mit dem FLAG-Antikörper präzipitiert. Dazu wurden je Ansatz 30 µl Protein G-Sepharose mit 1,5 µl FLAG-Antikörper vorinkubiert. Je Ansatz wurden von 650 µl Gesamt-Lysat (Ko-IP-Lysepuffer) 500 µl für die IP eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Gewaschen wurde dreimal mit Ko-IP-Hochsalzpuffer und einmal mit dem Ko-IP-Puffer. Die Elution erfolgte 5 min bei 95°C mit

50-80 µl 1 x Probenpuffer (mit MCE). Im SDS-PA-Gel wurden sowohl die Lysate als auch die präzipitierten Proteine analysiert. Kopräzipitierte Proteine wurden mit den entsprechenden proteinspezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Ko-IP-Hochsalz-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 x Complete-Proteaseinhibitormix (Roche, Mannheim)

6.6.6. MALDI-MS

MALDI-MS von Aβ

Die getrockneten Proben (siehe Kapitel 6.5) wurden in 10 ml TA20-Puffer (20% Acetonitril, 0,1% Tri-fluoressigsäure in H₂O) aufgenommen und für 20 min im Ultraschallbad gelöst. Als Matrix wurde 4-Hydroxy- α -cyano-Zimtsäure (CCA) verwendet. Es wurde eine gesättigte CCA-Lösung in 30% Acetonitril und 0,1% Tri-fluoressigsäure hergestellt und ebenfalls für 20 min in das Ultraschallbad gestellt. Danach wurde die CCA-Lösung zentrifugiert und mit dem Überstand weitergearbeitet. Zum Probenauftrag wurde ein Stahl-Probenteller verwendet. Nach der „Dry-Droplet“-Methode wurde 1 µl der gelösten Probe mit 1 µl CCA-Lösung gemischt und davon 1 µl auf den Probenteller aufgetragen. Nachdem die Proben getrocknet waren, wurden sie mit einem Ultraflex II-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) im Reflektor-Modus mit dem Programm RP_PepMix gemessen.

MALDI-MS der Loop-Peptide

Die gelösten Peptide wurden auf eine Konzentration von 50 µg/ml eingestellt. Die Peptide wurden entweder direkt analysiert, reduziert oder reduziert und alkyliert.

Für die Reduktion wurden je 25 µg/ml Peptid und 50 mM DTT für 56 min bei 30°C inkubiert. Für die Reduktion und zusätzliche Alkylierung wurden das reduzierte Peptid (ohne Entfernung des DTT) mit Iodacetamid für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (Endkonzentrationen: 16,7 µg/ml Peptid, 33 mM DTT und 33 mM Iodacetamid). Die Proben wurden wie oben angegeben 1:1 mit CCA-Matrix versetzt und mit einem Ultraflex II-Massenspektrometer gemessen.

6.7. Zellkultur

Die Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien SH-SY5Y sowie HEK293 erfolgte im Brutschrank unter Zusatz von 5% CO₂ bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit.

6.7.1. Passagieren von Zelllinien

Die 80-100% konfluenten Zellen einer 10 cm Schale wurden mit 5 ml 1 x PBS gewaschen und anschließend für höchstens 5 min mit 2,5 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Zum Abstoppen wurden 7,5 ml Medium dazugegeben und die Zellen in der Glaspipette vereinzelt. 500-1000 µl dieser Zellsuspension wurden auf eine frische Schale verteilt und auf 10 ml mit Medium aufgefüllt. Je nach Dichte der Zellen und der Zelllinie erfolgte diese Prozedur alle 3-7 Tage.

6.7.2. Erzeugung stabiler Zelllinien

Um Zelllinien über einen längeren Zeitraum untersuchen zu können, ist es von Vorteil die gewünschten Proteine stabil zu exprimieren. Je nach Linie kann das Protein bis zu 10 Passagen in gleich bleibender Höhe exprimiert werden. Die Zellen wurden so ausgesät, dass sie zur Transfektion etwa 80% konfluent waren. Diese erfolgte in 6-Loch-Schalen mit Transfektin (Biorad) oder Lipofektamin (Invitrogen) nach den Angaben der Hersteller. Die Selektion erfolgte abhängig von transfiziertem Plasmid, entweder mit Genetecin, Zeocin oder Hygromycin.

6.7.3. Transiente Transfektion

Die transienten Transfektionen wurden mit Transfektin (Biorad, München) oder Fugene (Roche, Mannheim) nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Nach 24 h konnten die Zellen für die entsprechenden Anwendungen eingesetzt werden.

6.7.4. Kryogene Lagerung

Wenn Zellkulturen schonend eingefroren werden, können sie über einen längeren Zeitraum

aufbewahrt und anschließend wieder aufgetaut werden. Dies ist besonders wichtig für frühe Passagen einer stabilen Zelllinie, aber auch für die Lagerung der Wildtyp-Zelllinien. Nachdem die Zellen trypsiniert und in Medium aufgenommen wurden (siehe Kapitel 6.7.1.) erfolgte die Sedimentation der Zellen bei 500 x g für 5 min. Das Pellet einer 100% konfluenten 10 cm Schale wurde in 3,5 ml Einfrierlösung aufgenommen und auf zwei Cryo-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden oder Greiner, Frickenhausen) verteilt. Das Einfriermedium besteht aus dem entsprechenden Zellkulturmedium (70%), fetalem Kälberserum (20%) und 10% DMSO, welches die Membranen löchrig macht und so ein Platzen der Zellen verhindert. Die Cryoröhrchen wurden sofort in mit Isopropanol gefüllte, vorher gekühlte Einfrierboxen und darin in den -80°C-Schrank gestellt. Das Isopropanol ermöglicht eine langsame Temperaturerniedrigung. Nach 24 h können die Zellen dann im Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Um die Zellen erneut in Kultur zu nehmen, wurden die Cryoröhrchen schnell bei 37°C aufgetaut und sofort in 10 ml des entsprechenden Zellkulturmediums überführt. Um restliches DMSO zu entfernen, wurden die Zellen 5 min bei 500 x g sedimentiert, erneut in Zellkulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturschale verteilt.

6.7.5. ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“)

Es wurden 3×10^5 Zellen der stabilen Linien jeweils für eine Dreifachbestimmung in 12-Lochplatten kultiviert. Am folgenden Tag wurden 500 µl frisches Medium für 6 h inkubiert. Die Analyse der Medien erfolgte mit dem CSF-ELISA Aβ1-40/42 nach Herstellerangaben mit jeweils 50 µl der Mediumproben (The Genetics Company, Schlieren, Schweiz). Zur Quantifizierung von sAPP α wurde als Fängerantikörper der monoklonale myc-Antikörper verwendet.

6.7.6. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden Zellen auf Glasplättchen kultiviert, so dass die Konfluenz 50-70% betrug und transient mit 1-2 µg DNA transfiziert (siehe Kapitel 6.7.3.). Alternativ dazu wurden auch stabile Zelllinien auf Glasplättchen ausgesät. Bei HEK293-Zellen wurden diese vorher mit 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin (Biochrom, Berlin) beschichtet, um ein Ablösen der Zellen zu vermeiden. Für die Antikörperdetektion wurden die Zellen zunächst mit PBS

gewaschen und bei Raumtemperatur für 15 min mit 2 % – 4 % Paraformaldehyd fixiert. Für eine Permeabilisierung wurden die Zellen zusätzlich 15 min mit 0,3 % Triton-X-100 und 2 mM EDTA in PBS inkubiert. Freie Bindungsstellen wurden mit 1 % BSA in PBST (PBS mit 1 % Tween 20) für mindestens 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte entweder über Nacht bei 4°C oder für 1-2 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurden die Zellen im Dunkeln für 45 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Zellen wurden abermals dreimal mit PBST gewaschen, kurz in H₂O getaucht und auf einem Tropfen Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, USA) fixiert und vor der Mikroskopie mindestens 12 h kühl und dunkel gelagert.

6.7.7. Konfokale Mikroskopie und „Live-Cell-Imaging“

Bei der konventionellen Lichtmikroskopie ist die räumliche Auflösung durch die Überlagerung von fokussiertem und unfokussiertem Licht eingeschränkt. Im konfokalen „Laser Scanning Microscope“ (cLSM) gibt es zwei Lochblenden mit dem gleichen Brennpunkt (konfokal). Dadurch wird nur ein Punkt im Objekt fokussiert und dieser scharf abgebildet. Somit kann einerseits kein unfokussiertes Licht auf das Objekt treffen und andererseits wird das emittierte, unfokussierte Licht nicht abgebildet. Da nur einzelne Punkte aufgenommen werden, muss das Bild abgetastet („scanning“) werden. Die Umwandlung erfolgt über einen Photomultiplier, der die schwachen Lichtsignale in elektrische Signale umwandelt.

Zellen für die „imaging“-Experimente wurden wie in 6.7.6 beschrieben auf Glasplättchen ausgesät und transient mit 1-2 µg DNA transfiziert (siehe Kapitel 6.7.3.). Nach 24 h wurden die Glasplättchen in speziell angefertigte Kammern eingespannt und vorsichtig mit HBS-Puffer überschichtet. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Kammern wurden in den Objektträger eines inversen cLSM (LSM-510 meta, Carl Zeiss, Oberkochen) eingespannt und mit einem α Plan-Fluar 100 \times /1.45 Objektiv (Carl Zeiss, Oberkochen) mit Immersionsöl visualisiert.

Die Anregung von YFP erfolgte bei 488 nm mit einem Argon Laser. Die Emission wurde über einen 505 nm Breitbandfilter gemessen. CFP wurde bei 458 nm mit einem Argon Laser über einen Hauptfarbteiler angeregt und die Emission durch einen 475 nm Breitbandfilter über den konventionellen LSM-Detektor aufgenommen. Bei simultanen Aufnahmen von YFP und CFP

wurde CFP bei 458 nm angeregt und über einen CFP-selektiven Bandpassfilter (470-500 nm) detektiert (alle Filter und Spiegel von Chroma, Brattleboro, VT, USA).

Für die Immunfluoreszenzen wurden folgende Einstellungen verwendet: DAPI: Anregung bei 364 nm, Detektion mit 385-470 nm Breitbandfilter. Cy3: Anregung bei 543 nm, Detektion mit 560 nm Breitbandfilter.

Zink-Behandlung

Bei der Behandlung mit Zink wurden transient transfizierte Zellen üblicherweise mit 50 μM ZnCl_2 in HBS ohne Calcium und BSA direkt in der Kammer oder 30 min vor der Messung im Brutschrank inkubiert. Zur Eliminierung des verfügbaren Zinks wurden 400 μM EDTA dazupipettiert.

HBS-Puffer: 10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 128 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 5.5 mM Glukose, 0.2% BSA.

6.7.8. Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer - FRET

FRET ist der strahlungslose Energietransfer eines Donorfluorophors auf ein Akzeptorfluorophor. Voraussetzung für dieses physikalische Phänomen ist, dass die Emissionswellenlänge des Donors (CFP) mit der Anregungswellenlänge des Akzeptors (YFP) überlappt und sich YFP und CFP in einem Abstand von höchstens 10-12 nm zueinander befinden. Somit eignet sich diese Methode um homophile oder heterophile Interaktionen von Proteinen zu untersuchen.

Akzeptor-Bleichen

Die Quantifizierung der FRET-Effizienzen erfolgte nach folgender Gleichung (Cantor und Schimmel, 1980) $E = 1 - (FDA/FD)$. Dabei bezeichnet FDA die Fluoreszenz des Donors in Anwesenheit des Akzeptors, FD die Fluoreszenz des Donors in Abwesenheit des Akzeptors. Mit dem verwendeten Protokoll des Akzeptor-Bleichens wurde diese Situation an denselben Zellen herbeigeführt. Dafür wurde FDA durch Anregung des Donors in Anwesenheit des Akzeptors gemessen. Durch hohe Anregungsenergie wurde der Akzeptor selektiv und

irreversibel gebleicht. FD wurde durch eine lineare Regressionsanalyse (Anstieg der Donor-Fluoreszenz mit Bleichen des Akzeptors und Extrapolation auf eine Akzeptorfluoreszenz von Null) berechnet. Das benutzte Epifluoreszenz-Mikroskop war ein invertes Mikroskop (Axivert 100, Carl Zeiss, Oberkochen) ausgestattet mit einem 63 x / 1.4 F-Fluar Objektiv. Die Anregung erfolgte mit monochromatischem Licht einer Xenon-Lampe (Polychrome IV System, TILL Photonics, Martinsried) bei 410 nm für CFP und 515 nm für YFP. Die emittierten Fluoreszenzsignale wurden über einen motorisierten Filtrerradwechsler geleitet (YFP 515-550 nm und CFP 475-505 nm; Lambda 10/2, Sutter Instruments) und über eine gekühlte CCD-Kamera detektiert (Imago, TILL Photonics).

Die auf Glasplättchen kultivierten Zellen wurden transient mit 1-2 µg Plasmid-DNA transfiziert. Die DNA-Mengen wurden so eingestellt, dass das Verhältnis von Akzeptor (YFP) zu Donor (CFP) 2:1 betrug und die Helligkeit des Akzeptors in den Experimenten vergleichbar war. Für Konkurrenzexperimente mit den FLAG-Plasmiden wurden entsprechend weniger der YFP und CFP-Plasmide eingesetzt. Die Messungen erfolgten in den speziell angefertigten Kammern (siehe Kapitel 6.7.8.) in 1 x HBS-Puffer. In jeder Messreihe wurden CFP für 40 ms bei 410 nm und YFP für 8 ms bei 515 nm angeregt. Alle 2 s wurden Bilder aufgenommen. Nach 15 Zyklen wurde YFP für 60 s durch eine zusätzliche 1,8-Sekunden Anregung bei 512 nm gebleicht. Typischerweise konnte YFP auf diese Weise bis zu 95% gebleicht werden.

Dynamische FRET-Messungen

Bei den dynamischen FRET-Messungen wurden die FRET-Effizienzen ohne ein Bleichen des Akzeptors gemessen. Das diente dazu, die Interaktion von Proteinen auf einen extrazellulären Stimulus, in unserem Fall Zink, zu untersuchen. Für die Kinetiken der APLP1-Homodimerisierung in Antwort auf Zink wurden jeweils Intervalle von 2 min in folgender Reihenfolge und Konzentrationen gemessen:

Zyklus	ZnCl ₂	EDTA
0	-	-
1	-	50 µM
2	31,6 nM	-
3	-	50 µM
4	100 nM	-
5	-	50 µM
6	316 nM	-
7	-	50 µM
8	1 µM	-
9	-	50 µM
10	3,16 µM	-
11	-	50 µM
12	10 µM	-
13	-	50 µM
14	31,6 µM	-
15	-	500 µM
16	100 µM	-
17	-	500 µM
18	316 µM	-
19	-	5000 µM
20	1 mM	-
21	-	5000 µM

Die FRET-Effizienzen wurden mit dem FRET-Solver (selbst generiertes Programm von Prof. Dr. Michael Schaefer) nach folgenden Formeln berechnet:

$$(1) \text{ gesFCFP} = \text{FCFP} + \text{FCFP/YFP(FRET)}$$

$$(2) \text{ FRET (\%)} = (\text{FCFP/YFP(FRET)} / \text{gesFCFP}) * 100$$

FCFP ist die Emission von CFP bei 450 nm gemessen (angeregt bei 415 nm), FCFP/YFP(FRET) ist die Emission von YFP bei 550 nm gemessen (ebenfalls angeregt bei 415 nm). Mittelwerte mehrerer Einzelzellen sowie die sich daraus ergebenden Mittelwerte aus drei verschiedenen Messungen wurden mit Sigma-Plot nach der Gleichung $f = y_0 + a * x^b / (c^b + x^b)$ so angepasst, dass sie bestmöglich mit den experimentellen Ergebnissen übereinstimmen. Dabei ist y_0 das Minimum, a das Maximum, b der Hill-Koeffizient (Kooperativität) und c der EC50.

6.7.9. „Fluorescence recovery after photobleaching“- FRAP

Für die Bestimmung der lateralen Diffusionskoeffizienten wurde ein LSM-510 meta cLSM, ausgestattet mit einem α Plan-Fluar 100 x/1.45 Objektiv, benutzt. Um die YFP-Intensitäten vor und nach dem Bleichen aufzunehmen, wurde YFP mit 458 nm Wellenlänge eines Argon-Lasers mit geringer Intensität angeregt und um weiteres Bleichen zu minimieren, durch einen 488 nm

Hauptfarbteiler geleitet. Die emittierte Fluoreszenz wurde mit einem 505 nm Breitbandfilter gefiltert. Für die Bleich-Impulse wurden die 458, 488 und 514 nm Wellenlängen des Argon-Lasers bei maximaler Leistung benutzt. Die Daten für jeden Membranabschnitt wurden in 128 x 15 Pixel-Bildern in einer Größe von 7-9 x 0,8-1,2 μm aufgenommen.

Vor den Bleich-Impulsen wurden alle ~250 ms oder ~500 ms (~42 ms Aufnahmezeit und Warteintervall) 10 Bilder („pre-bleach“) aufgenommen. Ein Bleich-Impuls wurde für 23 ms in einer Region von 6 x 15 Pixeln im Zentrum des Bildes gegeben. Die Rückdiffusion der fluoreszierenden Moleküle in das gebleichene „Loch“ wurde mit 30 „post-bleach“-Bildern aufgenommen, dabei wurden die gleichen Einstellungen wie für die „pre-bleach“-Bilder gewählt. Nach einer zusätzlichen Wartezeit von 40 s wurde ein neuer Zyklus gestartet. Insgesamt wurden 10 Wiederholungen durchgeführt.

Um ein eindimensionales Intensitätsprofil zu erhalten, wurden die Pixel-Intensitäten über der y-Dimension summiert (15 Pixel). Zum Ausgleich von Inhomogenitäten in der Verteilung der YFP-markierten Proteine, wurden die „post-bleach“-Bilder durch den Mittelwert der „pre-bleach“-Bilder geteilt und somit normalisierte Intensitäten erhalten. Um Randartefakte zu vermeiden wurden die Intensitäten an den Bildrändern auf eins gesetzt. Die Kalkulation der eindimensionalen Diffusionskoeffizienten erfolgte durch Simulation der Diffusion entlang des Membranprofils für verschiedene Diffusionskoeffizienten bis die beste Übereinstimmung mit den experimentellen Daten erhalten wurde. Dazu wurde eine individuell gefertigte Software, basierend auf dem Brent's Algorithmus für die Minimierung, benutzt. Für jede Zelle wurde der Diffusionskoeffizient als Mittelwert von 10 Bleich-Zyklen bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben ermittelt.

6.8. Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden durchgeführt, indem der mittlere Standardfehler (SEM) von mindestens drei unabhängigen Messungen berechnet wurde. Die statistische Signifikanz wurde, wenn nicht anders angegeben, über den Student t-Test ermittelt.

7. Literaturverzeichnis

- Allinson, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J. and Hooper, N.M. (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res*, 74, 342-352.
- Alzheimer, A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin*, 64, 146-148.
- Andersen, O.M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., von Arnim, C.A., Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu, X., Bales, K.R., Cappai, R., Masters, C.L., Gliemann, J., Mufson, E.J., Hyman, B.T., Paul, S.M., Nykjaer, A. and Willnow, T.E. (2005) Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 13461-13466.
- Andersen, O.M., Schmidt, V., Spoelgen, R., Gliemann, J., Behlke, J., Galatis, D., McKinstry, W.J., Parker, M.W., Masters, C.L., Hyman, B.T., Cappai, R. and Willnow, T.E. (2006) Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor SorLA/LR11. *Biochemistry*, 45, 2618-2628.
- Annaert, W. and De Strooper, B. (2002) A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18, 25-51.
- Atwood, C.S., Moir, R.D., Huang, S., Scarpa, R.C., Bacarra, N.M.E., Romano, D.M., Hartshorn, M.A., Tanzi, R.E. and Bush, A. (1998) Dramatic aggregation of Alzheimer A β by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem* 273, 12817-12826.
- Atwood, C.S., Scarpa, R.C., Huang, X., Moir, R.D., Jones, W.D., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E. and Bush, A.I. (2000) Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar affinity copper binding site on amyloid beta1-42. *J Neurochem*, 75, 1219-1233.
- Balamurugan, K. and Schaffner, W. (2006) Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. *Biochim Biophys Acta*, 1763, 737-746.
- Barnes, P.J. (2006) Receptor heterodimerization: a new level of cross-talk. *J Clin Invest*, 116, 1210-1212.
- Barnham, K.J., McKinstry, W.J., Multhaup, G., Galatis, D., Morton, C.J., Curtain, C.C., Williamson, N.A., White, A.R., Hinds, M.G., Norton, R.S., Beyreuther, K., Masters, C.L., Parker, M.W. and Cappai, R. (2003) Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. A regulator of neuronal copper homeostasis. *J Biol Chem*, 278, 17401-17407.
- Bayer, T.A., Paliga, K., Weggen, S., Wiestler, O.D., Beyreuther, K. and Multhaup, G. (1997) Amyloid precursor-like protein 1 accumulates in neuritic plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*, 94, 519-524.
- Behr, D., Hesse, L., Masters, C.L. and 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.

-
- Böhme, H.J., Kopperschläger, G., Schulz, J. and Hofmann, E. (1972) Affinity chromatography of phosphofruktokinase using Cibacron blue F3G-A. *J Chromatogr*, 69, 209-214.
- Bonifacino, J.S. and Traub, L.M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*, 72, 395-447.
- Botelho, M.G., Gralle, M., Oliveira, C.L., Torriani, I. and Ferreira, S.T. (2003) Folding and stability of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 278, 34259-34267.
- Brake, A.J., Merryweather, J.P., Coit, D.G., Heberlein, U.A., Masiarz, F.R., Mullenbach, G.T., Urdea, M.S., Valenzuela, P. and Barr, P.F. (1984) Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 4642-4646.
- Breen, K.C., Bruce, M. and Anderton, B.H. (1991) Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J Neurosci Res*, 28, 90-100.
- Brouillet, E., Trembleau, A., Galanaud, D., Volovitch, M., Bouillot, C., Valenza, C., Prochiantz, A. and Allinquant, B. (1999) The amyloid precursor protein interacts with Go heterotrimeric protein within a cell compartment specialized in signal transduction. *J Neurosci*, 19, 1717-1727.
- Brown, A.M., Tummolo, D.M., Rhodes, K.J., Hofmann, J.R., Jacobsen, J.S. and Sonnenberg-Reines, J. (1997) Selective Aggregation of Endogenous β -Amyloid Peptide and Soluble Amyloid Precursor Protein in Cerebrospinal Fluid by Zinc. *J Neurochem*, 69, 1204-1212.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B. and Goldstein, J.L. (2000) Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, 100, 391-398.
- Bush, A.I., Multhaup, G., Moir, R.D., Williamson, T.G., Small, D.H., Rumble, B., Pollwein, P., Beyreuther, K. and Masters, C.L. (1993) A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 268, 16109-16112.
- Bush, A.I., Pettingell, W.H., Jr., de Paradis, M., Tanzi, R.E. and Wasco, W. (1994) The amyloid beta-protein precursor and its mammalian homologues. Evidence for a zinc-modulated heparin-binding superfamily. *J Biol Chem*, 269, 26618-26621.
- Buxbaum, J.D., Gandy, S.E., Cicchetti, P., Ehrlich, M.E., Czernik, A.J., Fracasso, R.P., Ramabhadran, T.V., Unterbeck, A.J. and Greengard, P. (1990) Processing of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6003-6006.
- Cantor, C.R. and Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Cao, X. and Sudhof, T.C. (2004) Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem*, 279, 24601-24611.

- Chanat, E., Weiss, U., Huttner, W.B. and Tooze, S.A. (1993) Reduction of the disulfide bond of chromogranin B (secretogranin I) in the trans-Golgi network causes its missorting to the constitutive secretory pathways. *Embo J*, 12, 2159-2168.
- Chen, M. and Yankner, B.A. (1991) An antibody to beta amyloid and the amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types. *Neurosci Lett*, 125, 223-226.
- Citri, A., Gan, J., Mosesson, Y., Vereb, G., Szollosi, J. and Yarden, Y. (2004) Hsp90 restrains ErbB-2/HER2 signalling by limiting heterodimer formation. *EMBO Rep*, 5, 1165-1170.
- Ciuculescu, E.-D., Mekmouche, Y. and Faller, P. (2005) Metal-Binding Properties of the Peptide APP170–188: A Model of the Zn(II)-Binding Site of Amyloid Precursor Protein (APP). *Chem. Eur. J.*, 11, 903 - 909.
- Collin, R.W., van Strien, D., Leunissen, J.A. and Martens, G.J. (2004) Identification and expression of the first nonmammalian amyloid-beta precursor-like protein APLP2 in the amphibian *Xenopus laevis*. *Eur J Biochem*, 271, 1906-1912.
- Cool, D.R., Normant, E., Shen, F., Chen, H.C., Pannell, L., Zhang, Y. and Loh, Y.P. (1997) Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in *Cpe(fat)* mice. *Cell*, 88, 73-83.
- Cordy, J.M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N.M. and Turner, A.J. (2003) Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 11735-11740.
- Coulson, E.J., Paliga, K., Beyreuther, K. and Masters, C.L. (2000) What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int*, 36, 175-184.
- Craig, D., Gao, M., Schulten, K. and Vogel, V. (2004) Structural insights into how the MIDAS ion stabilizes integrin binding to an RGD peptide under force. *Structure*, 12, 2049-2058.
- Crain, B.J., Hu, W., Sze, C.I., Slunt, H.H., Koo, E.H., Price, D.L., Thinakaran, G. and Sisodia, S.S. (1996) Expression and distribution of amyloid precursor protein-like protein-2 in Alzheimer's disease and in normal brain. *Am J Pathol*, 149, 1087-1095.
- Daigle, I. and Li, C. (1993) *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 12045-12049.
- Domingues, S.C.T.S., Henriques, A.G., Wu, W., Da Cruz E Silva, E.F. and Da Cruz E Silva, O.A.B. (2007) Altered subcellular Distribution of the Alzheimer's Amyloid Precursor Protein Under Stress Conditions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1096, 184-195.
- Dulubova, I., Ho, A., Huryeva, I., Sudhof, T.C. and Rizo, J. (2004) Three-dimensional structure of an independently folded extracellular domain of human amyloid-beta precursor protein. *Biochemistry*, 43, 9583-9588.

- Dyrks, T., Weidemann, A., Multhaup, G., Salbaum, J.M., Lemaire, H.G., Kang, J., Muller-Hill, B., Masters, C.L. and Beyreuther, K. (1988) Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *Embo J*, 7, 949-957.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H. and Haass, C. (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol*, 5, 486-488.
- Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C.L., Weidemann, A. and Beyreuther, K. (2004) The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J Biol Chem*, 279, 18146-18156.
- Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. and Simons, K. (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*, 160, 113-123.
- Endres, K., Postina, R., Schroeder, A., Mueller, U. and Fahrenholz, F. (2005) Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. *Febs J*, 272, 5808-5820.
- Fadeeva, J.V., Walsh, D.M., Tang, J.T., Luo, Y., Citron, M., Wasco, W. and Selkoe, D.J. (2004) Generation of the intracellular C-terminal domain of the APP family of proteins does not require α -secretase *Neurobiol Aging*, 25, 158.
- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P.R., Rimmer, E. and Sczufca, M. (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366, 2112-2117.
- Frederickson, C.J. (1989) Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int Rev Neurobiol*, 31, 145-238.
- Glennner, G.G. and Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 120, 885-890.
- Goedert, M. and Spillantini, M.G. (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science*, 314, 777-781.
- Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, U. and Gajdusek, D.C. (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*, 235, 877-880.
- Gralle, M., Botelho, M.M., de Oliveira, C.L., Torriani, I. and Ferreira, S.T. (2002) Solution studies and structural model of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein. *Biophys J*, 83, 3513-3524.
- Gralle, M. and Ferreira, S.T. (2007) Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol*, 82, 11-32.

- Gralle, M., Oliveira, C.L., Guerreiro, L.H., McKinstry, W.J., Galatis, D., Masters, C.L., Cappai, R., Parker, M.W., Ramos, C.H., Torriani, I. and Ferreira, S.T. (2006) Solution conformation and heparin-induced dimerization of the full-length extracellular domain of the human amyloid precursor protein. *J Mol Biol*, 357, 493-508.
- Greenberg, S.M., Qiu, W.Q., Selkoe, D.J., Ben-Itzhak, A. and Kosik, K.S. (1995) Amino-terminal region of the beta-amyloid precursor protein activates mitogen-activated protein kinase. *Neurosci Lett*, 198, 52-56.
- Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K. and Ihara, Y. (2001) Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. *J Biol Chem*, 276, 35235-35238.
- Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Teplow, D.B. and Selkoe, D.J. (1993) beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem*, 268, 3021-3024.
- Haass, C. and Selkoe, D.J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 101-112.
- Haussinger, D., Ahrens, T., Aberle, T., Engel, J., Stetefeld, J. and Grzesiek, S. (2004) Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography. *Embo J*, 23, 1699-1708.
- 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., Wolfer, D.P. and 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.
- Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G. and Schaefer, M. (2005) Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci*, 118, 917-928.
- Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretschmar, H., Sisodia, S. and Muller, U. (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *Embo J*, 23, 4106-4115.
- Hilbich, C., Monning, U., Grund, C., Masters, C.L. and Beyreuther, K. (1993) Amyloid-like properties of peptides flanking the epitope of amyloid precursor protein-specific monoclonal antibody 22C11. *J Biol Chem*, 268, 26571-26577.
- Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schroder, J., Zeffass, R., Forstl, H., Sandbrink, R., Masters, C.L. and Beyreuther, K. (1996) Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J Biol Chem*, 271, 22908-22914.
- Kaden, D., Munter, L.M., Joshi, M., Treiber, C., Bethge, T., Weise, C., Voigt, P., Beyermann, M., Schaefer, M., Reif, B. and Multhaup, G. (2007/2008) Homophilic interactions of the APP ectodomain are regulated by the loop region and affect β -secretase cleavage of APP. *J Biol Chem* (Under revision, Nov 2007).
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325, 733-736.

-
- Kang, J. and Muller-Hill, B. (1990) Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 166, 1192-1200.
- Kim, T.W., Wu, K., Xu, J.L., McAuliffe, G., Tanzi, R.E., Wasco, W. and Black, I.B. (1995) Selective localization of amyloid precursor-like protein 1 in the cerebral cortex postsynaptic density. *Brain Res Mol Brain Res*, 32, 36-44.
- Kong, G.K., Adams, J.J., Harris, H.H., Boas, J.F., Curtain, C.C., Galatis, D., Masters, C.L., Barnham, K.J., McKinstry, W.J., Cappai, R. and Parker, M.W. (2007) Structural studies of the Alzheimer's amyloid precursor protein copper-binding domain reveal how it binds copper ions. *J Mol Biol*, 367, 148-161.
- Kopan, R. and Ilagan, M.X. (2004) Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 499-504.
- Leach, R., Ko, M. and Krawetz, S.A. (1999) Assignment of amyloid-precursor-like protein 2 gene (APLP2) to 11q24 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 87, 215-216.
- Lenkkeri, U., Kestila, M., Lamerdin, J., McCready, P., Adamson, A., Olsen, A. and Tryggvason, K. (1998) Structure of the human amyloid-precursor-like protein gene APLP1 at 19q13.1. *Hum Genet*, 102, 192-196.
- Li, Q. and Sudhof, T.C. (2004) Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *J Biol Chem*, 279, 10542-10550.
- Lichtenthaler, S.F. (2006) Ectodomain shedding of the amyloid precursor protein: cellular control mechanisms and novel modifiers. *Neurodegener Dis*, 3, 262-269.
- Lindner, E. and Langosch, D. (2006) A ToxR-based dominant-negative system to investigate heterotypic transmembrane domain interactions. *Proteins*, 65, 803-807.
- Lyckman, A.W., Confaloni, A.M., Thinakaran, G., Sisodia, S.S. and Moya, K.L. (1998) Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily proteins in the central nervous system. *J Biol Chem*, 273, 11100-11106.
- Marlow, L., Cain, M., Pappolla, M.A. and Sambamurti, K. (2003) Beta-secretase processing of the Alzheimer's amyloid protein precursor (APP). *J Mol Neurosci*, 20, 233-239.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L. and Beyreuther, K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 4245-4249.
- McNamara, M.J., Ruff, C.T., Wasco, W., Tanzi, R.E., Thinakaran, G. and Hyman, B.T. (1998) Immunohistochemical and in situ analysis of amyloid precursor-like protein-1 and amyloid precursor-like protein-2 expression in Alzheimer disease and aged control brains. *Brain Res*, 804, 45-51.
- Minogue, A.M., Fadeeva, J.V., Tang, J., Wasco, W., Selkoe, D.J. and Walsh, D.M. (2006) APLP1-Derived Peptides do not undergo rapid fibrillogenesis. *The Journal of the Alzheimer's Association (10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders)*, 2, S478.
-

- Mullan, M., Houlden, H., Windelspecht, M., Fidani, L., Lombardi, C., Diaz, P., Rossor, M., Crook, R., Hardy, J., Duff, K. and et al. (1992) A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene. *Nat Genet*, 2, 340-342.
- Multhaup, G. (1994) Identification and regulation of the high affinity binding site of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor (APP) to glycosaminoglycans. *Biochimie*, 76, 304-311.
- Multhaup, G., Bush, A.I., Pollwein, P. and Masters, C.L. (1994) Interaction between the zinc (II) and the heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP). *FEBS Lett*, 355, 151-154.
- Multhaup, G., Mechler, H. and Masters, C.L. (1995) Characterization of the high affinity heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP) and its enhancement by zinc(II). *J Mol Recognit*, 8, 247-257.
- Multhaup, G., Ruppert, T., Schlicksupp, A., Hesse, L., Bill, E., Pipkorn, R., Masters, C.L. and Beyreuther, K. (1998) Copper-binding amyloid precursor protein undergoes a site-specific fragmentation in the reduction of hydrogen peroxide. *Biochemistry*, 37, 7224-7230.
- Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C.L. and Beyreuther, K. (1996) The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science*, 271, 1406-1409.
- Munter, L.M., Voigt, P., Harmeier, A., Kaden, D., Gottschalk, K.E., Weise, C., Pipkorn, R., Schaefer, M., Langosch, D. and Multhaup, G. (2007) GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *Embo J*, 26, 1702-1712.
- Neumann, S., Schobel, S., Jager, S., Trautwein, A., Haass, C., Pietrzik, C.U. and Lichtenthaler, S.F. (2006) Amyloid precursor-like protein 1 influences endocytosis and proteolytic processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 281, 7583-7594.
- Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C.B., Condrón, M.M., Axelman, K., Forsell, C., Stenih, C., Luthman, J., Teplow, D.B., Younkin, S.G., Naslund, J. and Lannfelt, L. (2001) The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci*, 4, 887-893.
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y. and Ogata, E. (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature*, 362, 75-79.
- Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E. and Nishimoto, I. (1995) Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J Biol Chem*, 270, 4205-4208.

- Paliga, K., Peraus, G., Kreger, S., Durrwang, U., Hesse, L., Multhaup, G., Masters, C.L., Beyreuther, K. and Weidemann, A. (1997) Human amyloid precursor-like protein 1--cDNA cloning, ectopic expression in COS-7 cells and identification of soluble forms in the cerebrospinal fluid. *Eur J Biochem*, 250, 354-363.
- Pangalos, M.N., Efthimiopoulos, S., Shioi, J. and Robakis, N.K. (1995) The chondroitin sulfate attachment site of appican is formed by splicing out exon 15 of the amyloid precursor gene. *J Biol Chem*, 270, 10388-10391.
- Pastorino, L., Ikin, A.F., Lamprianou, S., Vacaresse, N., Revelli, J.P., Platt, K., Paganetti, P., Mathews, P.M., Harroch, S. and Buxbaum, J.D. (2004) BACE (beta-secretase) modulates the processing of APLP2 in vivo. *Mol Cell Neurosci*, 25, 642-649.
- Pike, C.J., Walencewicz-Wasserman, A.J., Kosmoski, J., Cribbs, D.H., Glabe, C.G. and Cotman, C.W. (1995) Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem*, 64, 253-265.
- Qi-Takahara, Y., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Dolios, G., Hirotani, N., Horikoshi, Y., Kametani, F., Maeda, M., Saido, T.C., Wang, R. and Ihara, Y. (2005) Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci*, 25, 436-445.
- Religa, D., Strozyk, D., Cherny, R.A., Volitakis, I., Haroutunian, V., Winblad, B., Naslund, J. and Bush, A.I. (2006) Elevated cortical zinc in Alzheimer disease. *Neurology*, 67, 69-75.
- Rogaeva, E.A., Fafel, K.C., Song, Y.Q., Medeiros, H., Sato, C., Liang, Y., Richard, E., Rogaev, E.I., Frommelt, P., Sadovnick, A.D., Meschino, W., Rockwood, K., Boss, M.A., Mayeux, R. and St George-Hyslop, P. (2001) Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases: 21 novel mutations. *Neurology*, 57, 621-625.
- Rosen, D.R., Martin-Morris, L., Luo, L.Q. and White, K. (1989) A Drosophila gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 2478-2482.
- Rossjohn, J., Cappai, R., Feil, S.C., Henry, A., McKinstry, W.J., Galatis, D., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C.L. and Parker, M.W. (1999) Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat Struct Biol*, 6, 327-331.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandbrink, R., Masters, C.L. and Beyreuther, K. (1994) Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4-amyloid protein precursor-like proteins. *J Biol Chem*, 269, 14227-14234.
- Scheinfeld, M.H., Ghersi, E., Laky, K., Fowlkes, B.J. and D'Adamio, L. (2002) Processing of beta-amyloid precursor-like protein-1 and -2 by gamma-secretase regulates transcription. *J Biol Chem*, 277, 44195-44201.

- Scheuermann, S., Hamsch, B., Hesse, L., Stumm, J., Schmidt, C., Beher, D., Bayer, T.A., Beyreuther, K. and Multhaup, G. (2001) Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 276, 33923-33929.
- Schmechel, A. (2005) Grundlagen der APP Prozessierung durch BACE und Entstehung von A β . Dissertation.
- Schmechel, A., Strauss, M., Schlicksupp, A., Pipkorn, R., Haass, C., Bayer, T.A. and Multhaup, G. (2004) Human BACE forms dimers and colocalizes with APP. *J Biol Chem*, 279, 39710-39717.
- Schmechel, A., Zentgraf, H., Scheuermann, S., Fritz, G., Pipkorn, R., Reed, J., Beyreuther, K., Bayer, T.A. and Multhaup, G. (2003) Alzheimer beta-amyloid homodimers facilitate A beta fibrillization and the generation of conformational antibodies. *J Biol Chem*, 278, 35317-35324.
- Schmitz, C., Rutten, B.P., Pielen, A., Schafer, S., Wirths, O., Tremp, G., Czech, C., Blanchard, V., Multhaup, G., Rezaie, P., Korr, H., Steinbusch, H.W., Pradier, L. and Bayer, T.A. (2004) Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 164, 1495-1502.
- Schubert, D., Jin, L.W., Saitoh, T. and Cole, G. (1989) The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron*, 3, 689-694.
- Selkoe, D.J. (2004) Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med*, 140, 627-638.
- Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grubel, G., Legrand, J.F., Als-Nielsen, J., Colman, D.R. and Hendrickson, W.A. (1995) Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*, 374, 327-337.
- Shapiro, L., Love, J. and Colman, D.R. (2007) Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. *Annu Rev Neurosci*, 30, 451-474.
- Shioi, J., Pangalos, M.N., Ripellino, J.A., Vassilacopoulou, D., Mytilineou, C., Margolis, R.U. and Robakis, N.K. (1995) The Alzheimer amyloid precursor proteoglycan (appican) is present in brain and is produced by astrocytes but not by neurons in primary neural cultures. *J Biol Chem*, 270, 11839-11844.
- Siemes, C., Quast, T., Kummer, C., Wehner, S., Kirfel, G., Muller, U. and Herzog, V. (2006) Keratinocytes from APP/APLP2-deficient mice are impaired in proliferation, adhesion and migration in vitro. *Exp Cell Res*, 312, 1939-1949.
- Simons, A., Ruppert, T., Schmidt, C., Schlicksupp, A., Pipkorn, R., Reed, J., Masters, C.L., White, A.R., Cappai, R., Beyreuther, K., Bayer, T.A. and Multhaup, G. (2002) Evidence for a copper-binding superfamily of the amyloid precursor protein. *Biochemistry*, 41, 9310-9320.
- Sisodia, S.S. (1999) Alzheimer's disease: perspectives for the new millennium. *J Clin Invest*, 104, 1169-1170.

- Slack, B.E., Ma, L.K. and Seah, C.C. (2001) Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem J*, 357, 787-794.
- Slunt, H.H., Thinakaran, G., Von Koch, C., Lo, A.C., Tanzi, R.E. and Sisodia, S.S. (1994) Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem*, 269, 2637-2644.
- Small, D.H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K. and Masters, C.L. (1994) A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci*, 14, 2117-2127.
- Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C.L., Muller, U., Kins, S. and Beyreuther, K. (2005) Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *Embo J*, 24, 3624-3634.
- Song, J.Y., Ichtchenko, K., Sudhof, T.C. and Brose, N. (1999) Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 1100-1105.
- Stiegler, A.L., Burden, S.J. and Hubbard, S.R. (2006) Crystal structure of the agrin-responsive immunoglobulin-like domains 1 and 2 of the receptor tyrosine kinase MuSK. *J Mol Biol*, 364, 424-433.
- Struhl, G. and Adachi, A. (2000) Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell*, 6, 625-636.
- Su, X.D., Gastinel, L.N., Vaughn, D.E., Faye, I., Poon, P. and Bjorkman, P.J. (1998) Crystal structure of hemolin: a horseshoe shape with implications for homophilic adhesion. *Science*, 281, 991-995.
- Tang, K., Wang, C., Shen, C., Sheng, S., Ravid, R. and Jing, N. (2003) Identification of a novel alternative splicing isoform of human amyloid precursor protein gene, APP639. *Eur J Neurosci*, 18, 102-108.
- Tanzi, R.E., McClatchey, A.I., Lamperti, E.D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J.F. and Neve, R.L. (1988) Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature*, 331, 528-530.
- Thinakaran, G., Kitt, C.A., Roskams, A.J., Slunt, H.H., Masliah, E., von Koch, C., Ginsberg, S.D., Ronnett, G.V., Reed, R.R., Price, D.L. and et al. (1995) Distribution of an APP homolog, APLP2, in the mouse olfactory system: a potential role for APLP2 in axogenesis. *J Neurosci*, 15, 6314-6326.
- Treiber, C., Simons, A., Strauss, M., Hafner, M., Cappai, R., Bayer, T.A. and Multhaup, G. (2004) Clioquinol mediates copper uptake and counteracts copper efflux activities of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 279, 51958-51964.
- Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P. and Abraham, W.C. (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol*, 70, 1-32.

- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. and Citron, M. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286, 735-741.
- Voigt, P., Brock, C., Nurnberg, B. and Schaefer, M. (2005) Assigning functional domains within the p101 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Biol Chem*, 280, 5121-5127.
- von Koch, C.S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L.H., Price, D.L. and Sisodia, S.S. (1997) Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging*, 18, 661-669.
- Walsh, D.M., Fadeeva, J.V., LaVoie, M.J., Paliga, K., Eggert, S., Kimberly, W.T., Wasco, W. and Selkoe, D.J. (2003) gamma-Secretase cleavage and binding to FE65 regulate the nuclear translocation of the intracellular C-terminal domain (ICD) of the APP family of proteins. *Biochemistry*, 42, 6664-6673.
- Walter, J., Capell, A., Hung, A.Y., Langen, H., Schnolzer, M., Thinakaran, G., Sisodia, S.S., Selkoe, D.J. and Haass, C. (1997) Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J Biol Chem*, 272, 1896-1903.
- Wang, P., Yang, G., Mosier, D.R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y.D., Zhao, N.M., Dominguez, B.D., Lee, K.-F. and Zheng, H. (2005) Defective Neuromuscular Synapses in Mice Lacking Amyloid Precursor Protein (APP) and APP-Like Protein 2. *J Neurosci*, 25, 1219-1225.
- Wang, Y. and Ha, Y. (2004) The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol Cell*, 15, 343-353.
- Wasco, W., Brook, J.D. and Tanzi, R.E. (1993a) The amyloid precursor-like protein (APLP) gene maps to the long arm of human chromosome 19. *Genomics*, 15, 237-239.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J.F., Tanzi, R.E. and Solomon, F. (1992) Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10758-10762.
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M.D., Romano, D.M., Sisodia, S.S., Hyman, B.T., Neve, R.L. and Tanzi, R.E. (1993b) Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet*, 5, 95-100.
- Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J.M., Masters, C.L. and Beyreuther, K. (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*, 57, 115-126.
- Westmeyer, G.G., Willem, M., Lichtenthaler, S.F., Lurman, G., Multhaup, G., Assfalg-Machleidt, I., Reiss, K., Saftig, P. and Haass, C. (2004) Dimerization of beta-site beta-amyloid precursor protein-cleaving enzyme. *J Biol Chem*, 279, 53205-53212.

- Xu, Y., Shen, J., Luo, X., Zhu, W., Chen, K., Ma, J. and Jiang, H. (2005) Conformational transition of amyloid beta-peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 5403-5407.
- Younkin, S.G. (1998) The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris*, 92, 289-292.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M.E., Sirinathsinghji, D.J., Hopkins, R., Smith, D.W., Heavens, R.P., Dawson, G.R., Boyce, S., Conner, M.W., Stevens, K.A., Slunt, H.H., Sisoda, S.S., Chen, H.Y. and Van der Ploeg, L.H. (1995) beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*, 81, 525-531.
- Zhong, S., Wu, K., Black, I.B. and Schaar, D.G. (1996) Characterization of the genomic structure of the mouse APLP1 gene. *Genomics*, 32, 159-162.

8. Abkürzungsverzeichnis

α -CTF:	APP-C-terminales Fragment nach α -Sekretase-Schnitt
AcD:	saure, unstrukturierte Region im APP und den APLPs, „acidic domain“
ADAM:	„a disintegrin and matrix metalloproteinase“
AICD:	APP Intrazelluläre Domäne
AOX:	Alkoholoxidase
APH-1:	„anterior-pharynx-defective“
APLP:	Amyloid Vorläufer ähnliche Proteine, „amyloid precursor like protein“
APP:	Amyloid Vorläufer Protein, „amyloid precursor protein“
A β :	Amyloid β
BACE:	„beta site cleaving enzyme“
CCA:	4-Hydroxy- α -cyano-Zimtsäure
CFP:	cyan-fluoreszierendes Protein („cyano-fluorescent protein“)
cLSM:	„confocal laser scanning microscopy“
CuBD:	Kupferbindedomäne
DAPI:	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DAPT:	N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester
<i>E. coli</i> :	Escherichia coli
E1:	GFLD/Loop und CuBD
E2:	C-terminal konservierter Bereich der Ektodomänen der APP-Protein-Familie
EGFR:	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ELISA:	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
EPR:	„electric paramagnetic resonance“
FAD:	Familiär vererbte Alzheimerfälle, „familial alzheimer's disease“
FCS:	Fetales Kälberserum
FRAP:	„Fluorescence Recovery after Photobleaching“
FRET:	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GFLD:	Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne, „growth factor like domain“, auch Loop-Region
HRP:	Meerrettich-Peroxidase
IF:	Immunfluoreszenz
IP:	Immunpräzipitation
kDa:	kilo Dalton
KPI:	Kunitz-Protease-Inhibitordomäne
Loop-Region:	entspricht der GFLD, Umbenennung wegen der Wichtigkeit des Loops
MALDI-MS:	„matrix-assisted laser-desorption ionisation-mass spectrometry“
MCE:	β -Mercaptoethanol
NMR:	„nuclear magnetic resonance“
OD:	optische Dichte

PCR:	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEN-2:	„presenilin-enhancer“
PS:	Presenilin
sAPLP α :	lösliche APLP-Ektodomänen nach α -Sekretase-Schnitt
sAPP α :	lösliches APP-Ektodomäne nach α -Sekretase-Schnitt
sAPP β :	lösliches APP-Ektodomäne nach β -Sekretase-Schnitt
SDS-PA-Gel:	Natriumdodecyl-Polyacrylamid-Gel
β -CTF:	APP-C-terminales Fragment nach β -Sekretase-Schnitt
TMS:	Transmembransequenz
WB:	Western Blot
WT:	Wildtyp
YFP:	Gelb-fluoreszierendes Protein („yellow-fluorescent protein“)

Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
X	alle Aminosäuren außer Prolin	

9. Anhang

9.1. Publikationsliste

Artikel:

Munter LM, Voigt P, Harmeier A, Kaden D, Gottschalk KE, Weise C, Pipkorn R, Schaefer M, Langosch D, Multhaup G. „GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42”, EMBO J. 2007 Mar 21;26(6):1702-12.

Liere K., Kaden D., Maliga P., Borner T. “Overexpression of phage-type RNA polymerase RpoTp in tobacco demonstrates its role in chloroplast transcription by recognizing a distinct promoter type”, NAR 2004 Feb 18;32(3):1159-65.

Eingereichte Artikel:

Kaden, D., Munter, L.M., Joshi, M., Treiber, C., Bethge, T., Weise, C., Voigt, P., Beyermann, M., Schaefer, M., Reif, B. and Multhaup, G. (2007/2008) „Homophilic interactions of the APP ectodomain are regulated by the loop region and affect β -secretase cleavage of APP“. J Biol Chem (Manuskript unter Revision, Nov 2007).

Publikationen in Vorbereitung:

Kaden D, Voigt P, Munter LM, Schaefer M, Multhaup G, “N-terminal domains of APP family proteins mediate homo- and heterodimerization”.

Tagungsbeiträge:

Poster Präsentation: The seventh EIBSEE Meeting on CELLULAR MECHANISMS OF ALZHEIMER’S DISEASE (28.11.-1.12.2007)

D. Kaden, L.M. Munter, P. Voigt, M. Schaefer, M. Joshi, B. Reif, M. Beyermann, G. Multhaup. “Identification of key domains involved in homodimerization of APP”

Poster Präsentation: The 10th International conference on Alzheimers Disease and Related Disorders”, Madrid, Spanien (15.-20.07.2006)

D. Kaden, L.M. Munter, P. Voigt, M. Schaefer, G. Multhaup “Homo- and Heterophilic Interactions of APP-Family-Proteins”

9.2. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

9.3. Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Gerd Multhaupt bedanken - für die Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie seine ständige Unterstützung und Bereitschaft zu ausgiebigen Diskussionen.

Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Das Proteasom-Praktikum in dieser Arbeitsgruppe war einer der Gründe warum ich mich für eine biochemische Doktorarbeit entschieden habe.

Ich möchte die Gelegenheit nutzen mich ausführlich bei allen meinen Arbeitskollegen zu bedanken. Zuerst möchte ich Lisa Münter und Carina Treiber, die schon seit Beginn meiner Dissertation in der Arbeitsgruppe sind, erwähnen. Ich kann mich an kaum eine Situation erinnern in der Lisa nicht bereit gewesen wäre die Probleme des Laboralltags zu diskutieren. Für die stetige Bereitschaft dieses Zuhörens und Korrigierens von Postern, Veröffentlichungen und Doktorarbeiten, die manchmal auch zu heruntergefallenen Zellkulturschalen oder umgekippten Pipetteneimern führten, möchte ich dir wirklich ganz herzlich danken. Mit Carina habe ich viele Zeitaufreibende F-Praktika durchgeführt, die letztendlich doch immer viel Freude bereitet haben. Bedanken möchte ich mich bei ihr natürlich auch für die ausführliche Hilfe bei den Biacore-Messungen. Bei Anja Harmeier und Tobias Bethge sowie Matthias Kaup möchte ich mich im Besonderen für die unvergleichliche Laboratmosphäre sowie die ebenfalls vielen intensiven Diskussionen bedanken. Ein großer Dank gebührt auch Chris Weise, der nie ermüdete mit mir die von ihm gemessenen MALDI-Spektren durchzugehen. Nicht zu vergessen natürlich Gerd Buchlow, der mit seinem Zauberfinger noch jedes Gerät wieder repariert hat und einen Großteil der Sequenzierungen für mich durchgeführt hat. Andrea Senge hat mir oft die Zellkultur abgenommen und auch war auch sonst immer da, wenn es irgendwo notwendig war. Vielen Dank dafür. Thomas Wons, Nadja Agua, Kerstin May-Witt, Anne Botev, Markus Strauss, Ariane Schmechel (mit der ich die APLP2-Antikörper generiert habe) und Andreas Simons möchte ich natürlich ebenfalls für eine fast immer entspannte Arbeitsatmosphäre danken. Und natürlich vielen Dank an „meine“ Studenten in Mitarbeiterinnen Janna Hachmann, Julia Drebes, Laura Jänicke und unseren lieben Hiwis Christian Barucker, Claudia Zahn und Tobias Ludwig.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Philipp Voigt und Prof. Dr. Michael Schaefer, da ich in dieser Arbeitsgruppe sowohl das Wissen als auch die ausgezeichneten technischen Geräte benutzen durfte. Bei Philipp möchte ich mich für die unzähligen ausgiebigen LSM-Messungen und immer spannenden Diskussionen bedanken, hoffen wir dass es ein „Cell“ wird ;-). Ich möchte mich aber bei Nadine Albrecht für das Aussäen unzähliger HEK-Zellen danken. Nicht zu vergessen alle anderen dieser wirklich tollen Arbeitsgruppe, die mich immer freundlich aufgenommen haben.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Familie und besonders meinen Eltern bedanken, die mich in diesen vier Jahren in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Außerdem danke ich auch all meinen Freunden, die mich in dieser Zeit auch immer wieder unterstützt und motiviert haben.

9.4. Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst habe.

Diese Arbeit wurde bisher noch an keiner anderen Universität vorgelegt.

Berlin, 07.12.2007

Daniela Kaden