

# Strukturelle und funktionelle Aspekte der Metall-induzierten Oligomerisierung von **APP, APLP1 und APLP2**

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

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

vorgelegt von

**Magnus Christopher Mayer**

aus Braunschweig

April 2013



Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerd Multhaup im Zeitraum März 2010 - April 2013 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. Markus Wahl

Disputation am: 29. Mai 2013



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1. Die Alzheimer-Krankheit . . . . .	5
1.2. Das A $\beta$ -Peptid als molekulare Ursache der Alzheimer-Krankheit . . . . .	6
1.3. Die APP-Gen-Familie . . . . .	8
1.3.1. Struktur und Lokalisation von APP, APLP1 und APLP2 . . . . .	8
1.3.2. Physiologische Funktionen von APP, APLP1 und APLP2 . . . . .	11
1.4. Zielsetzung . . . . .	14
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>15</b>
2.1. Zink- und Kupferionen induzieren die Bildung von APLP1- und APLP2-Clustern	15
2.2. Einfluss von Zink auf die Oligomerisierung von APP, APLP1 und APLP2 . .	17
2.2.1. Einfluss von Zink auf die Lokalisation von APLP1 in Neuronen . . . .	17
2.2.2. Einfluss von Zink auf die Oligomerisierung von APLP1 . . . . .	18
2.2.3. Einfluss von Eisen auf die Oligomerisierung von APLP1 . . . . .	20
2.2.4. Quantitative Analyse der Zink-induzierten Oligomerisierung . . . . .	20
2.2.5. Zink-induzierte Heterooligomerisierung von APP, APLP1 und APLP2	22
2.3. Lokalisation der Zinkbindungsstelle in APLP1 . . . . .	23
2.3.1. Eingrenzung der kritischen Region für die Oligomerisierung von APLP1	23
2.3.2. Identifizierung der Zink-bindenden Region von APLP1 . . . . .	25
2.4. Untersuchung der Metallbindungseigenschaften der E2-Domäne . . . . .	28
2.4.1. Heterologe Produktion von APLP1 E2 . . . . .	28
2.4.2. Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2 . . . . .	30
2.4.3. Untersuchung der Bindung von Metallionen an APP E2 . . . . .	30

2.4.4.	Untersuchung der Bindung von Zinkionen an die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2 . . . . .	33
2.4.5.	Untersuchung der Bindung von Kupferionen an die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2 . . . . .	35
2.4.6.	Einfluss von Zink auf die Oligomerisierung der E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2. . . . .	35
2.5.	Einfluss von Zink auf die <i>trans</i> -Oligomerisierung von APLP1 . . . . .	39
2.6.	Expression und Oligomeranalyse der E1-Domäne von APLP1 . . . . .	41
2.6.1.	Expression der E1-Domäne von APLP1 . . . . .	41
2.6.2.	Untersuchung der Oligomerisierung von APLP1 E1 . . . . .	42
<b>3.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>43</b>
3.1.	APP, APLP1 und APLP2 als Zink-abhängige Oligomere im Gehirn . . . . .	43
3.2.	Die E2-Domäne als Sensor für Metallionen . . . . .	45
3.2.1.	Lokalisation der Zinkbindungsstelle für die Zink-abhängige Oligomerisierung . . . . .	45
3.2.2.	Konformationsänderungen in der E2-Domäne durch die Bindung von Metallionen . . . . .	46
3.2.3.	Zink-abhängige Oligomerisierung von APLP1 über eine neue Zinkbindungsstelle in der E2-Domäne . . . . .	48
3.3.	APP und APLPs als Zink-abhängige Proteine der extrazellulären Matrix . . .	49
3.4.	APP und APLPs als synaptische Adhäsionsproteine . . . . .	50
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>55</b>
4.1.	Material . . . . .	55
4.1.1.	Chemikalien, Proteine und Kits . . . . .	55
4.1.2.	Pufferlösungen . . . . .	55
4.1.3.	Antikörper . . . . .	55
4.1.4.	Primer . . . . .	56
4.1.5.	Plasmidvektoren und Expressionskonstrukte . . . . .	57
4.1.6.	Bakterienstämme und Nährmedien . . . . .	57
4.1.7.	Hefestämme und Nährmedien . . . . .	58
4.1.8.	Zelllinien . . . . .	58
4.1.9.	Versuchstiere . . . . .	59
4.1.10.	Verbrauchsmaterialien . . . . .	59
4.1.11.	Geräte . . . . .	59

4.1.12. Software . . . . .	61
4.2. Molekularbiologische Methoden . . . . .	62
4.2.1. Klonierungsstrategien . . . . .	62
4.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	63
4.2.3. Spaltung und Ligation von DNA . . . . .	64
4.2.4. TOPO-Klonierung . . . . .	64
4.2.5. Transformation von kompetenten Zellen durch Hitzeschock . . . . .	64
4.2.6. Vervielfältigung, Präparation und Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA . . . . .	65
4.2.7. DNA-Gelelektrophorese und Reinigung von DNA aus Agarosegelen . . . . .	65
4.2.8. Sequenzierung und Plasmidkontrollen . . . . .	66
4.3. Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i> und <i>Pichia pastoris</i> . . . . .	66
4.3.1. Proteinexpression in <i>E. coli</i> und Aufschluss der Bakterienzellen . . . . .	66
4.3.2. Proteinexpression in <i>P. pastoris</i> . . . . .	66
4.4. Chromatographische Verfahren . . . . .	68
4.4.1. Aufreinigungsstrategien . . . . .	68
4.4.2. Affinitätschromatografie mit Heparin . . . . .	69
4.4.3. Affinitätschromatografie mit Blue-Sepharose® . . . . .	69
4.4.4. Lektinaffinitätschromatografie . . . . .	69
4.4.5. Kupfer-IMAC . . . . .	69
4.4.6. Zink-IMAC mit proteolytischem Verdau . . . . .	70
4.4.7. Affinitätschromatografie mit Protein A . . . . .	70
4.4.8. Größenausschlusschromatografie (SEC) . . . . .	71
4.5. Massenspektrometrische Analyse von Proteinen . . . . .	72
4.5.1. Entsalzung und Aufkonzentrierung der Probe . . . . .	72
4.5.2. Probenvorbereitung und Messung . . . . .	72
4.6. Proteinbiochemische Methoden . . . . .	72
4.6.1. Peptidsynthese . . . . .	72
4.6.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen . . . . .	72
4.6.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	73
4.6.4. Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie . . . . .	73
4.6.5. Western-Blot . . . . .	73
4.7. Spektroskopische Methoden . . . . .	74
4.7.1. Circular dichroismus-Messungen . . . . .	74
4.7.2. Oberflächenplasmonresonanz-Analysen . . . . .	74

4.8. Kultivierung von eukaryotischen Zellen . . . . .	75
4.8.1. HEK293-Zellen . . . . .	75
4.8.2. Primäre Neuronen . . . . .	76
4.9. Produktion von polyklonalen Antikörpern . . . . .	77
4.9.1. Auswahl und Präparation der Antigene . . . . .	77
4.9.2. Immunisierung und Gewinnung der Antiseren . . . . .	77
4.10. Fluoreszenzmikroskopie und FRET-Messungen . . . . .	78
4.10.1. LSM-Messungen . . . . .	78
4.10.2. Messung von Fluoreszenz in Zellkontakten . . . . .	78
4.10.3. FRET-Messungen . . . . .	78
4.11. Statistische Analysen . . . . .	79
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>A. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>B. Publikationen</b>	<b>101</b>
<b>C. Lebenslauf</b>	<b>103</b>
<b>D. Danksagung</b>	<b>105</b>
<b>E. Erklärung der Selbstständigkeit</b>	<b>107</b>

# Zusammenfassung

Das Amyloid-Vorläuferprotein (APP) und die APP-ähnlichen Proteine 1 und 2 (APLP1 und APLP2) bilden eine evolutionär hoch konservierte Familie von Transmembranproteinen bei Säugetieren. Es wird angenommen, dass APP der entscheidende molekulare Faktor bei der Ausbildung der Alzheimer-Krankheit ist, da es das neurotoxische  $A\beta$ -Peptid enthält, das bei Alzheimer-Patienten zu Plaques aggregiert. APP, APLP1 und APLP2 bilden in lebenden Zellen native Homo- und Heterodimere und enthalten Bindungsstellen für diverse extrazelluläre Liganden. Die Auswirkungen der Ligandenbindung sind bislang jedoch nicht verstanden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Metallionen auf die Struktur und Funktionen von APP und APLPs in der Zelle untersucht. Es konnte in Messungen an lebenden Zellen gezeigt werden, dass APP, APLP1 und APLP2 in Gegenwart von Zink innerhalb von Sekunden oligomere Komplexe aus Homo- und Heterooligomeren ausbilden. Dabei wurde bereits bei niedrigen mikromolaren Zinkkonzentrationen die Bildung von APP- und APLP1-Oligomeren induziert, wohingegen deutlich höhere Zinkkonzentrationen für die Oligomerisierung von APLP2 benötigt wurden. Die Zink-abhängige Oligomerisierung von APLP1 wird über eine neue Zinkbindungsstelle im C-terminalen Bereich der E2-Domäne vermittelt, wobei bei hohen Zinkkonzentrationen weitere intermolekulare Kontakte auftreten können.

Der Mechanismus der Zink-abhängigen Oligomerisierung von APP und APLP1 wurde mit rekombinanten E2-Domänen charakterisiert. Zinkionen banden direkt an die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2 und bewirkten strukturelle Änderungen in der Domäne. Durch die Zinkionen erfolgte eine Dimerisierung der E2-Domänen von APP und APLP1, aber nicht von APLP2. Die zusätzliche Dimerisierungsstelle induzierte eine Oligomerisierung der dimeren Vollängenproteine.

Die physiologische Relevanz der Zink-abhängigen Oligomerisierung wurde durch ihren Einfluss auf die Lokalisation von APLP1 in der Plasmamembran gezeigt. Zinkionen vermittelten die Anreicherung von APLP1 in Zellkontaktbereichen bei Zinkkonzentrationen, die bei neuronaler Aktivität in der Synapse entstehen. APLP1 wird exklusiv im zentralen Nervensystem exprimiert und liegt vorwiegend in der Plasmamembran vor. Dies legt eine Funktion von APLP1 als ein durch Zink reguliertes synaptisches Adhäsionsprotein nahe.



## Summary

The amyloid precursor protein (APP) and the APP-like proteins 1 and 2 (APLP1 and APLP2) are the mammalian representatives of an evolutionarily conserved family of transmembrane proteins. APP is hypothesized to be the decisive molecular factor in the etiology of Alzheimer Disease by harboring the neurotoxic  $A\beta$  peptide, which aggregates to plaques in Alzheimer Disease patients. In living cells, APP, APLP1 and APLP2 form native homo- and heterodimers and they contain binding sites for several extracellular ligands. However, the consequences of ligand binding are not understood.

Here, the influence of metal ions on structure and function of APP and APLPs in the cell was studied. It was shown by live-cell analyses that in presence of zinc APP, APLP1 and APLP2 form homo- and heterooligomeric complexes within seconds. Whereas low micromolar zinc concentrations induced formation of APP and APLP1 oligomers, far higher concentrations were required to mediate APLP2 oligomerization. Zinc-induced oligomerization is mediated by a novel zinc binding site in the C-terminal region of the E2 domain. At higher zinc concentrations formation of additional intermolecular contacts was observed.

The mechanism of zinc-mediated oligomerization was characterized with recombinant E2 domains of APP, APLP1 and APLP2. Zinc ions bound directly to the E2 domains of APP, APLP1 and APLP2 and induced structural rearrangements of the domain. A dimerization of APP and APLP1 E2 domains was induced by zinc ions, but no dimerization of the APLP2 E2 domain was observed. The additional dimerization site led to oligomerization of the dimeric full length proteins.

The physiological relevance of zinc-mediated oligomerization was shown by its influence on the localization of APLP1 in the plasma membrane. Zinc ions mediated enrichment of APLP1 in cell contacts at concentrations occurring at the synapse during neuronal activity. APLP1 is exclusively expressed in the central nervous system and mainly localized to the plasma membrane. This suggests a function for APLP1 as a zinc-regulated synaptic adhesion protein.



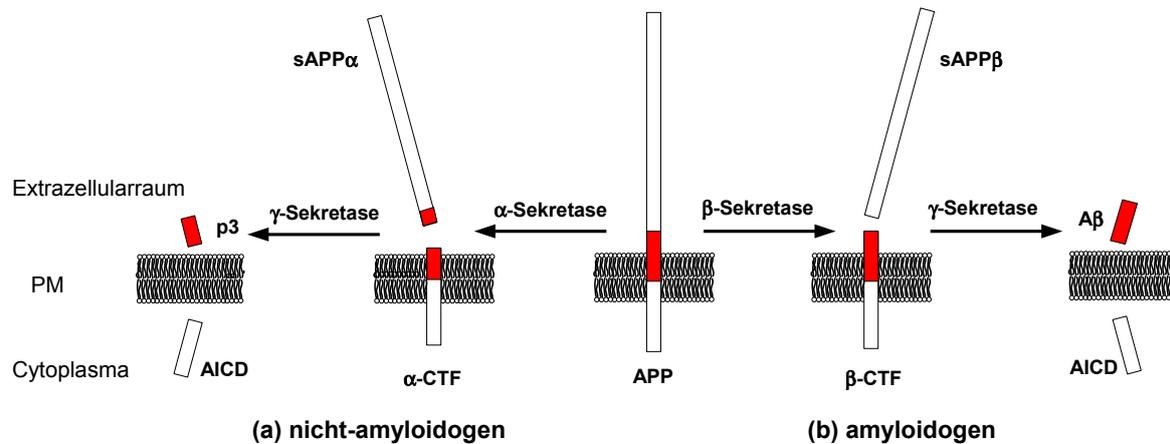
# 1. Einleitung

## 1.1. Die Alzheimer-Krankheit

Derzeit leiden nach Berechnungen der Deutschen Alzheimer-Gesellschaft e.V. über 1,4 Millionen Menschen in Deutschland an einer Demenzerkrankung (<http://www.deutsche-alzheimer.de>, Stand 2012). Insgesamt geht man von 35,6 Millionen Erkrankten weltweit aus (*World Health Organization*, 2012). Altern stellt den größten Risikofaktor für die Entwicklung einer Demenzerkrankung dar, nur ca. 2-10% der Erkrankungen treten vor dem 65. Lebensjahr auf (*Mayeux und Stern*, 2012; *World Health Organization*, 2012). Auf Grund der demographischen Entwicklung schätzt man, dass sich die Zahl der Demenzkranken bis zum Jahr 2030 etwa verdoppeln wird (*World Health Organization*, 2012). Etwa 60-70% der Demenzerkrankungen sind auf die Alzheimer-Krankheit zurückzuführen (*Barker et al.*, 2002). Symptomatisch für die Alzheimer-Krankheit sind ein schwerer Verlust des Erinnerungsvermögens und der Lernfähigkeit sowie Orientierungslosigkeit und eine starke Beeinträchtigung des Urteilsvermögens der Patienten. Dies geht mit Veränderungen im sozialen Verhalten wie Depression, sozialem Rückzug und erhöhter Aggressivität einher (*McKhann et al.*, 2011).

Gehirne von Alzheimer-Patienten weisen einen massiven Verlust von Synapsen und Neuronen auf, der besonders stark in der Großhirnrinde und im Hippocampus auftritt und mit einer ausgeprägten Atrophie des Cortex und anderer Gehirnregionen einhergeht (*Blennow et al.*, 2006). Bereits Alois Alzheimer beschrieb die histologisch auffälligen Veränderungen durch die Krankheit in Form von amyloiden Ablagerungen („Plaques“) und unlöslichen intrazellulären Neurofibrillen („Tangles“) (*Alzheimer*, 1907). Die intrazellulären Neurofibrillen werden aus aggregiertem hyperphosphoryliertem Tau-Protein gebildet (*Goedert und Spillantini*, 2000) und treten sowohl bei Alzheimer-Patienten als auch bei anderen Demenzpatienten auf, z.B. bei Patienten, die unter der Pick-Krankheit leiden, einer Form der frontotemporalen Demenz (*Goedert und Spillantini*, 2006). Im Gegensatz dazu sind die vornehmlich extrazellulären amyloiden Plaques ein spezifisches Merkmal der Alzheimer-Krankheit und der zerebralen Amyloidangiopathie, die häufig mit der Alzheimer-Krankheit einhergeht (*Smith und Greenberg*, 2009). Die Hauptkomponente der Plaques stellt das Amyloid- $\beta$ -Peptid ( $A\beta$ ) dar (*Glennner und Wong*, 1984; *Masters et al.*, 1985), das durch Proteolyse des Amyloid-Vorläuferproteins

## 1. Einleitung



**Abbildung 1.1.: Prozessierung von APP.** Die APP-Ektodomäne kann sowohl von der  $\alpha$ -Sekretase (a) als auch von der  $\beta$ -Sekretase (b) freigesetzt werden. Bei der amyloidogenen Prozessierung wird das  $\beta$ -C-terminale Fragment ( $\beta$ -CTF) anschließend von der  $\gamma$ -Sekretase weiter prozessiert. Dabei entstehen verschiedene Spezies der toxischen A $\beta$ -Peptide sowie die intrazelluläre Domäne von APP (AICD). Das  $\alpha$ -CTF wird von der  $\gamma$ -Sekretase in das nicht-amyloidogene p3-Peptid und AICD gespalten. PM: Plasmamembran.

(APP) entsteht (Kang et al., 1987).

## 1.2. Das A $\beta$ -Peptid als molekulare Ursache der Alzheimer-Krankheit

Viele Befunde weisen auf eine zentrale Rolle des A $\beta$ -Peptids bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit hin. Unter Anderem führen diverse Mutationen im *APP*-Gen und in den Genen für Presenilin 1 und 2, welche die Freisetzung des A $\beta$ -Peptids bewirken, zu der sogenannten familiären Alzheimer-Krankheit (FAD) (Goate et al., 1991; Sherrington et al., 1995; Levy-Lahad et al., 1995). Die FAD-Mutationen gehen mit einer veränderten A $\beta$ -Produktion oder -Aggregation einher und führen zu einer ungewöhnlich frühen Ausbildung der Krankheit im Alter von 30-60 Jahren. Außerdem wurde kürzlich eine Punktmutation im *APP*-Gen entdeckt, die das Risiko an der Alzheimer-Krankheit zu erkranken etwa um den Faktor 5 verringert (Jonsson et al., 2012). Diese Punktmutation führt unmittelbar zu einer verringerten A $\beta$ -Produktion und unterstreicht damit die zentrale Rolle des A $\beta$ -Peptids für die Entstehung und Ausbildung der Alzheimer-Krankheit.

Das APP wird vorwiegend über zwei Wege durch Sekretasen prozessiert (Abbildung 1.1). Zunächst erfolgt ein Schnitt in der Ektodomäne durch die  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretase, wodurch ein lösliches APP-Fragment (sAPP) freigesetzt wird. Bei dieser als „ectodomain shedding“ bezeichneten Spaltung entstehen unterschiedlich lange sAPPs und C-terminale Fragmente (CTFs), da die beiden Enzyme an unterschiedlichen Stellen schneiden. In Neuronen wird die

## 1.2. Das A $\beta$ -Peptid als molekulare Ursache der Alzheimer-Krankheit

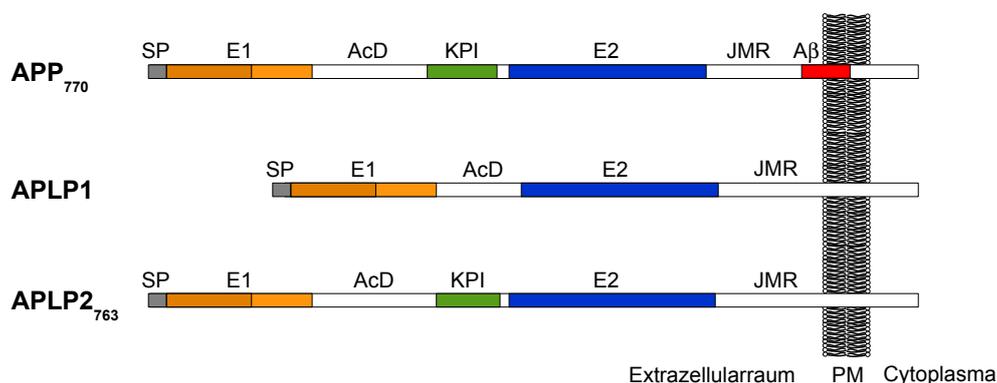
$\alpha$ -Sekretase-Aktivität maßgeblich durch ADAM10 und der  $\beta$ -Sekretase-Schnitt vorwiegend durch BACE1 ausgeführt, wobei das  $\beta$ -CTF durch ADAM10 nachgeschnitten werden kann (Vassar et al., 1999; Kuhn et al., 2010).

Nach dem „ectodomain shedding“ werden die C-terminalen Fragmente durch die  $\gamma$ -Sekretase weiter prozessiert. Die  $\gamma$ -Sekretase ist ein Proteinkomplex, der aus den vier Untereinheiten Aph-1, Nicastrin und Pen-2 und dem katalytisch aktiven Presenilin besteht (Wolfe et al., 1999; Edbauer et al., 2003). Dieses Enzym ist außergewöhnlich, da es das APP innerhalb der Transmembransequenz spaltet. Hierbei wird die intrazelluläre Domäne (AICD) freigesetzt und aus dem  $\beta$ -CTF entstehen A $\beta$ -Peptide unterschiedlicher Länge. Die  $\gamma$ -Sekretase ist ein prozessives Enzym, einem Modell nach spaltet sie APP hauptsächlich in zwei verschiedenen Produktlinien (Qi-Takahara et al., 2005; Takami et al., 2009). Der Schnitt an der Aminosäureposition 48 des  $\beta$ -CTFs führt über A $\beta$ 45 zur Bildung von A $\beta$ 42 und A $\beta$ 38, wohingegen ein Schnitt an der Position 49 vorwiegend zur Bildung von A $\beta$ 46, A $\beta$ 43, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 37 führt (Qi-Takahara et al., 2005; Chávez-Gutiérrez et al., 2012). Das hierbei entstehende A $\beta$ 42-Peptid bildet die Hauptkomponente der amyloiden Plaques von Alzheimer-Patienten (Roher et al., 1993a,b). Hierbei bildet A $\beta$ 42 zunächst lösliche Oligomere, die anschließend zu Fibrillen weiter aggregieren (Walsh et al., 1997, 1999). Die Toxizität wird neueren Studien zu Folge nicht durch die Plaques vermittelt, sondern durch oligomere lösliche Formen der A $\beta$ -Peptide (Walsh et al., 2002; Cleary et al., 2005; Harmeyer et al., 2009). Dabei hat die Stöchiometrie von A $\beta$ 40 zu A $\beta$ 42 und A $\beta$ 38 zu A $\beta$ 42 einen großen Einfluss auf die Aggregation und Toxizität der A $\beta$ -Oligomere (Kuperstein et al., 2010; Chávez-Gutiérrez et al., 2012). Die Hypothese, dass A $\beta$ -Oligomere die toxische Spezies darstellen, wird dadurch unterstützt, dass die neuronale Degeneration schon vor dem Auftreten der Plaques beginnt (Schmitz et al., 2004). Obwohl zu diesem Zeitpunkt noch keine ausgeprägte Plaque-Pathologie beobachtet wird, ist bereits der A $\beta$ 42-Metabolismus im Gehirn verändert (Bateman et al., 2012).

Die Produktion der verschiedenen A $\beta$ -Spezies wird durch mehrere Faktoren beeinflusst, z.B. durch die Interaktion mit den APP-Homologen APLP1 und APLP2. Koexpression von APP mit APLP1 oder APLP2 bewirkt eine verringerte A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Freisetzung (Kaden et al., 2009).

Es ist bislang unverstanden, wie das A $\beta$ -Peptid und APP im Detail zur Ausbildung der Krankheit führen und es gibt derzeit keine kausale Therapie der Alzheimer-Krankheit (Corbett et al., 2012). Für ein besseres Verständnis der molekularen Zusammenhänge der Alzheimer-Krankheit und für die Entwicklung von Medikamenten, die gegen die Prozessierungsprodukte von APP gerichtet sind, ist es von großem Interesse, die physiologische Funktion von APP und seinen Homologen aufzuklären.

## 1. Einleitung



**Abbildung 1.2.: Domänenstruktur von APP, APLP1 und APLP2.** Schema der homologen Typ-I Transmembranproteine APP, APLP1 und APLP2. SP: Signalpeptid, E1: E1-Region mit der Wachstumsfaktor-ähnlichen Domäne (dunkelorange) und der Kupferbindedomäne (hellorange), AcD: saure Region, KPI: Kunitz-Proteaseinhibitor-Domäne, E2: E2-Domäne, JMR: juxtamembrane Region, A $\beta$ : A $\beta$ -Region, PM: Plasmamembran

### 1.3. Die APP-Gen-Familie

APP ist Teil einer Gen-Super-Familie, die drei Vertreter in der Klasse der Säugetieren hat: APP und die homologen „amyloid precursor like proteins“ APLP1 und APLP2 (Wasco *et al.*, 1992, 1993; Coulson *et al.*, 2000). Alle drei Proteine haben untereinander eine hohe Aminosäuresequenzidentität von 55-70% und eine ähnliche Domänenstruktur (Abbildung 1.2). Während in niederen Organismen wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* jeweils nur ein einzelnes APP/APLP-Gen vorhanden ist (Daigle und Li, 1993; Rosen *et al.*, 1989), findet man im Krallenfrosch *Xenopus laevis* ein preAPP- und ein preAPLP-Gen. Somit hat in der Evolution zu *X. laevis* eine Duplikation des APP/APLP-Gens stattgefunden (Collin *et al.*, 2004). Das preAPLP-Gen duplizierte sich offenbar ein weiteres Mal zu dem APLP1- und APLP2-Gen der Säugetiere (Collin *et al.*, 2004).

#### 1.3.1. Struktur und Lokalisation von APP, APLP1 und APLP2

APP, APLP1 und APLP2 sind glykosylierte Typ-I Transmembranproteine mit einer großen extrazellulären Domäne und einem kurzen intrazellulären C-Terminus (Abbildung 1.2). Die drei Proteine haben den gleichen modularen Aufbau, APP und APLP2 kommen jedoch in unterschiedlichen Spleißvarianten vor (Sandbrink *et al.*, 1994a,b). Die längsten Isoformen APP<sub>770</sub> und APLP2<sub>763</sub> werden ubiquitär exprimiert, im Gehirn bilden APP<sub>695</sub> (ohne KPI-Domäne) und APLP2<sub>763</sub> den größten Anteil des exprimierten APP und APLP2 (Kang und Müller-Hill, 1990; Sandbrink *et al.*, 1994a,b). Im Gehirn findet man außerdem hohe APLP1-Expressionsraten, wohingegen in anderen Geweben nur sehr geringe APLP1-Mengen detektiert werden (Lorent *et al.*, 1995; Su *et al.*, 2004).

### 1.3. Die APP-Gen-Familie

APLP1 und APLP2 werden analog zu APP durch die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase prozessiert (Eggert et al., 2004; Pastorino et al., 2004; Endres et al., 2005; Yanagida et al., 2009; Kuhn et al., 2012). Die A $\beta$ -Sequenz ist jedoch in APLP1 und APLP2 nicht konserviert, sodass die toxischen A $\beta$ -Peptide nur aus APP gebildet werden können (Yanagida et al., 2009; Minogue et al., 2009; Okochi et al., 2012).

Im Aminosäuresequenzvergleich wird deutlich, dass es mehrere stark konservierte Bereiche in der Proteinsequenz von APP, APLP1 und APLP2 gibt (Abbildung 1.3). Die größte Sequenzhomologie findet sich in der zentralen E2-Domäne, die Bindungsstellen für Heparin und Kollagen enthält (Multhaup et al., 1995; Beher et al., 1996; Xue et al., 2011). Die starke Konservierung der E2-Domäne zeigt sich auch in den Sekundär- und Tertiärstrukturen von APP E2 und APLP1 E2 (Abbildung 1.4). Die E2-Domänen enthalten jeweils sechs  $\alpha$ -helikale Segmente und haben eine gestreckte Form, welche durch die zentrale Helix entsteht, die zwei kompakte Subdomänen zusammenhält. Die zentrale Helix ist bei APLP1 jedoch weniger gebogen und die E2-Subdomänen sind weiter voneinander entfernt als bei APP E2 (Lee et al., 2011).

Der N-terminale Bereich von APP enthält eine Wachstumsfaktor-ähnliche Subdomäne, auf deren Oberfläche sich viele basische Aminosäurereste befinden, sodass sie mit Glykosaminoglykanen der extrazellulären Matrix interagieren könnte (Rossjohn et al., 1999). Daran anschließend befindet sich die Kupferbindedomäne, in der zwei Metallbindungsstellen für Kupfer und Zink enthalten sind, sowie eine niedrig affine Heparinbindungsstelle (Bush et al., 1993; Hesse et al., 1994; Small et al., 1994; Barnham et al., 2003). Die beiden Subdomänen bilden die eine kompakte Faltungseinheit, die E1-Domäne. Diese weist eine hohe strukturelle Konservierung von APP zu APLP2, jedoch eine geringere strukturelle Konservierung von APP zu APLP1 auf (Dahms et al., 2010).

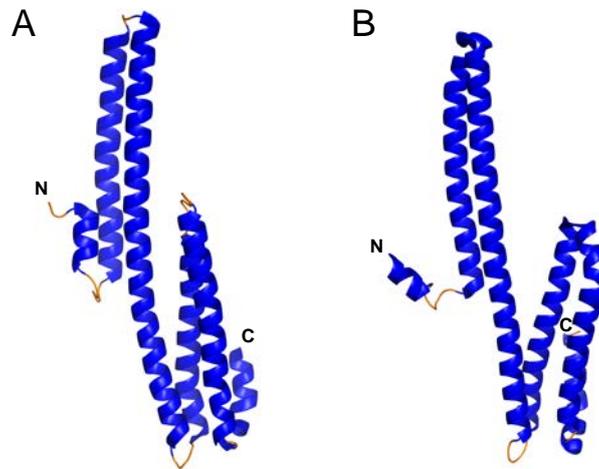
Die E1- und die E2-Domäne werden durch einen Bereich mit einem sehr hohen Anteil saurer Aminosäurereste voneinander getrennt, der bei den längeren APP- und APLP2-Isoformen außerdem die Kunitz-Proteaseinhibitor-Domäne (KPI) enthält (Kitaguchi et al., 1988). Die A $\beta$ -Region enthält außerdem eine Metallbindungsstelle für Zink und Kupfer (Bush et al., 1994a; Atwood et al., 2000) und Zink- und Kupferionen erhöhen die Aggregation von freigesetzten A $\beta$ -Peptiden (Bush et al., 1994c; Atwood et al., 1998).

Ein dritter stark konservierter Bereich ist die intrazelluläre Domäne, die nach dem  $\gamma$ -Sekretase-Schnitt als AICD freigesetzt wird. AICD wird eine mögliche Funktion bei der Genregulation zugeschrieben, da es im Komplex mit Fe65 und der Histonacetyltransferase Tip60 in den Zellkern translozieren und die Expression von Reportergenen aktivieren kann (Cao und Südhof, 2001; Goodger et al., 2009). Die intrazellulären Spaltprodukte von APLP1 und APLP2

# 1. Einleitung

APP	-----MPLGLALLLLAAWTARALE-----VPTDCNAGLLAEPQIA	35
APLP1	MGPASPAARGLSRRPGQPPLPLLLPLLLLLLRA--QPAL--GSLA--GGSPCAAEAFGSAQVA	57
APLP2	-----MAATGTA-----AAAATGRLLLLLLVGLTAPALALAGYLEALAANAAGTGFVAEAPQIA	53
APP	MFCGRLLNMHMNVQNGKWDSDPSSGKTCIDTKEGILQYCOEVPYELQITNVVEANQPVTIQNWCK	99
APLP1	GLCGRLTLHRDLRTGRWEPPDQRSRRCLRDPQRVLEYCRQMYPELQIARVEATQAIIPMERWCG	121
APLP2	MFCGKLLNMHVNIQTGKWEPPDTGKSCFETKEEVLQYCOEMYPELQITNVMEANQRVSIIDNWR	117
APP	RGRKQ-CKTHPHFVTPYRCLVGEFVSDALLVDPKCKFLHQERMDVCEHLHWHTVAKETCSEKS	162
APLP1	GSRSGSCAHPHQVVPFRCLPGEFVSEALLVPEGCRFLHQERMDQCESSTRRHQEAQAEACSSQG	185
APLP2	RDKKQ-CKS--REVTPEFKCLVGEFVSDVLLVPEKCKQFFHKERMVCEHGHWHHTVVKAECLTQG	178
APP	TNLHDYGMLLPCGIDKFRGVEFVCCPLAEESDNVDSADAEEEDSDVWVGADTDYADGSEDKVV	226
APLP1	LILHSGMLLPCGSDRFRGVEYVCCPPGTPDPSGTAVGD-PSTRSWPPGSRV-----	237
APLP2	MTLLYSYGMLLPCGVDFHGTVEVCCPQTKIIGSVSKEEEEEDEEEEEDEEEDYDVK----S	238
APP	EVAEEEEVAEVEE-EADDEDEDEGDEVEEEAEEPYEEAT-----ERTTSIATTTTITTESV	283
APLP1	-----EGAEDEEEESFPPQVDDYFVEPPQAEET-VPPE-----	274
APLP2	EFPTAEADLEDFTEAAVDDEDEEEEGEEVVEDRDYIYDFTFKGDDYNEENPTEEGSDGTMSDKEI	302
APP	EEVREVCSEQAETGPCRAMISRWFVDVTEGKCAPFFYGGCGGNRNNFDTEYCMAVCGSAMSQ	347
APLP1	-----SHTLAVVVGK----	283
APLP2	THDVKAVCSQEAETGPCRAVMPRWYFDLSKGKCVRFIYGGCGGNRNNFESDYCMAVCKAMIPP	366
APP	SLKTTQEPLARDPVKLP--TAASTPDAVDKYLETPGDENEHAHFQAKERLEAKHRE RMSQVMR	411
APLP1	-----VTPRPTDGVDIYFGMPGEISEHEGFLRAKMDLEERMRQINEVMR	330
APLP2	TPL-----PTNDVDVYFETSADDNEHARFQAKAEQLERHRNRMDRVKK	410
APP	EWEAEERQAKNLPKADKKAVIQHFQEKVESLEQEAANERQQLVETHMARVEAMLNDRRRLALEN	475
APLP1	EWAMADNQSKNLPKADQALNBFQSIQTLLEEQVSGERQRLVETHATRVIALLINDORRAALEG	394
APLP2	EWEAEELQAKNLPKAEERQTLIQHFQAMVKALEKEAASEKQQLVETHLARVEAMLNDRRRLMALEN	474
APP	YITALQAVPPRPRHVFNMLKKYVRAEQKDRQHTLKKHFEHVRMVDPKAAQLRSQVMTHLRVIEE	539
APLP1	FLAALQADPPQAERVLALRRYLRAEQEQRHTLRHYQHVAAVDPEKAAQMRFOVHTHLQVIEE	458
APLP2	YLAALQSDPPRPRHRILOALRRYVRAENKDRLHTIRHYQHVLAVDPEKAAQMSQVMTHLHVIEE	538
APP	RMNQSLSLLYNVPAAVEEIQDEVDLELQKEQNYSDVLANMISEPRISYGNDALMPSLTETKTT	603
APLP1	RVNQSLGLLDQNPHTAQELRPQTQELLSHEHLGPSELEAPAPGG-----	502
APLP2	RRNQSLSLLYKVPYVAQEIQEEIDLELQEQRADMDQFTASISSETPV-----D	585
APP	VELLPVNGEFLSDDLPWHSEFGADSVPAANTENEVEPVDPARFAA-DRGLTTRPGSGHTNIKTEET	666
APLP1	-----SSEDKGGLQPPDS-----KDDTPMTLPKGSTEQDAASPEK---EKM	540
APLP2	VRVS-SEESEEIIPPHFHPFALP--ENEDTQ--PELYHPMKKGSVGEQD-GGLIGAEKVI	643
APP	-SEVKMDA-----EFRHDSGY-----EVHHQKLVFFAEDVGSNKGALITGLMVG	709
APLP1	NPLEQY-----ERKVNASVPRGFPFHSSIQRDELA--PAGTQVSRBAVSGLLIMG	589
APLP2	NSKNKVDENMVIDETLDVKEMIFNAERVGGL-----EERESVGPLREDFSLSSSALIGLLVIA	702
APP	VVIATVIVITLVML-KKKQYTSIHHGVVEVDAAVTPEERHLSKMQONGYENPTYKFFEOMQN	770
APLP1	AGGGSILVLSMILLRRKKPYGATSHGVVEVDPMLTLEEQQRLRELQRHGYENPTYRFLERP-	650
APLP2	VAIATVIVISLVML-RKRQYGTISHGIVEVDPMLTPEERHLNKMONGYENPTYKYLEQMQI	763

Abbildung 1.3.: Aminosäuresequenzvergleich von APP, APLP1 und APLP2. Sequenzalignment von humanem APP<sub>770</sub>, APLP1 und APLP2<sub>763</sub> mit Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Markiert sind identische Aminosäurereste in allen (schwarz) bzw. zwei (dunkelgrau) Proteinen und konservierte Aminosäureaustausche (hellgrau). Stark konservierte Bereiche befinden sich vornehmlich in der E1- (orange), KPI- (grün) und E2-Domäne (blau) und im intrazellulären C-terminalen Bereich. Rot: A $\beta$ 42-Sequenz von APP.



**Abbildung 1.4.: Strukturen der E2-Domänen von APP und APLP1.** Die Röntgenkristallstrukturen von APP E2 (A, aus PDB-Eintrag 3NYL, Wang und Ha (2004), Auflösung: 2,8 Å) und APLP1 E2 (B, PDB-Eintrag 3PMR, Lee et al. (2011), Auflösung: 2,1 Å) weisen eine elongierte Proteinform mit einem hohen Anteil von  $\alpha$ -helikalen Segmenten auf.

(ALID1/2) beeinflussen vermutlich ebenfalls die Genregulation (Scheinfeld et al., 2002; Li und Südhof, 2004). Am C-Terminus der intrazellulären Domäne befindet sich ein NPXY-Motiv für Clathrin-vermittelte Internalisierung. Diverse Kinasen und Adaptorproteine können an diese Sequenz des Volllängenproteins binden, unter anderem Disabled1 und X11/Mint, die eine Funktion bei der neuronalen Entwicklung bzw. Exozytose von synaptischen Vesikeln haben (Zhang et al., 1997; Howell et al., 1999).

### 1.3.2. Physiologische Funktionen von APP, APLP1 und APLP2

Auf Grund der Struktur von APP als Transmembranprotein mit einem großen, glykosylierten, extrazellulären Anteil und einer Vielzahl saurer Aminosäuren wurde bereits bei der Klonierung der APP cDNA postuliert, dass APP eine Rolle als Rezeptor an der Zelloberfläche ausüben könnte (Kang et al., 1987). Mehrere mögliche Proteinliganden wurden identifiziert, unter Anderem die extrazellulären neuronalen Proteine F-Spondin und Reelin, welche als Signalmoleküle die Morphologie von Neuronen beeinflussen können (Ho und Südhof, 2004; Hoe et al., 2005, 2009). Außerdem können die freigesetzten Ektodomänen von APP, APLP1 und APLP2 als Liganden an das Volllängenprotein binden. Hierbei wird die Interaktion von APP, APLP1 und APLP2 mit Integrin  $\beta I$  kompetiert, welche die Länge des Axons in Neuronen beeinflusst (Young-Pearse et al., 2008). Einen Einfluss auf die Morphologie von Neuronen durch sAPP und sAPLPs wurde auch in anderen Studien beschrieben (Ring et al., 2007; Gakhar-Koppole et al., 2008; Tyan et al., 2012).

Als weitere Liganden für APP und APLPs wurden Metallionen identifiziert, unter Anderem

## 1. Einleitung

Kupfer- und Zinkionen (*Bush et al.*, 1993, 1994b; *Hesse et al.*, 1994). An der Kupferbindungsstelle in der E1-Domäne von APP kann  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert werden und APP und APLP2 können eine Funktion beim Kupferexport einnehmen (*Multhaup et al.*, 1996; *Treiber et al.*, 2004). Einer weiteren Studie zu Folge kann APP als Ferroxidase die Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  katalysieren und dabei überschüssiges Eisen aus Zellen exportieren (*Duce et al.*, 2010). APP, APLP1 und APLP2 besitzen zudem Bindungsstellen für Komponenten der extrazellulären Matrix (*Multhaup et al.*, 1995; *Beher et al.*, 1996; *Xue et al.*, 2011), die eine Funktion von APP und APLPs in der Zell-Matrix-Interaktion nahe legen. Zink verstärkt die Bindung von Heparin an APP, APLP1 und APLP2 und könnte daher eine modulatorische Rolle bei der Interaktion von APP und APLPs mit Komponenten der extrazellulären Matrix spielen (*Bush et al.*, 1994b).

In Gliazellen werden zudem die L-APP und L-APLP2-Isoformen exprimiert. Diese werden durch eine Chondroitin-Sulfat-Glykosaminoglykan-Kette modifiziert und sind Bestandteil der extrazellulären Matrix im Gehirn (*Pangalos et al.*, 1995a,b; *Shioi et al.*, 1995).

APP, APLP1 und APLP2 liegen in lebenden Zellen hauptsächlich in dimerer Form vor (*Scheuermann et al.*, 2001; *Soba et al.*, 2005; *Munter et al.*, 2007; *Gralle et al.*, 2009; *Kaden et al.*, 2009). Die Dimerisierung von APP und APLP2 erfolgt dabei maßgeblich über eine Dimerisierungsstelle in der E1-Domäne und eine Reduktion der Dimerisierung verringert den  $\beta$ -Sekretase-Schnitt (*Kaden et al.*, 2008, 2009). Demgegenüber hängt die Dimerisierung von APLP1 kaum von der E1-Region ab, sondern von weiter C-terminal gelegenen Bereichen (*Kaden et al.*, 2009). Die E2-Domänen von APP und APLP1 bilden bei hohen Proteinkonzentrationen ebenfalls Dimere, wobei die Dimerisierung in der Zelle auf Grund der schwachen Assoziation nur von geringer physiologischer Relevanz ist (*Lee et al.*, 2011). Eine dritte Dimerisierungsstelle befindet sich in der  $\text{A}\beta$ -Region von APP und beeinflusst direkt den  $\gamma$ -Sekretaseschnitt und somit die Länge der entstehenden  $\text{A}\beta$ -Spezies (*Munter et al.*, 2007; *Richter et al.*, 2010).

Eine Interaktion zwischen zwei Proteinen, die sich in der gleichen Membran befinden (*cis*-Konfiguration), tritt bei allen Homo- und Heterodimerpaaren auf. Zudem konnte eine direkte Interaktion von Proteinen zwischen benachbarten Zellen (*trans*) für APLP1 nachgewiesen werden (*Kaden et al.*, 2009). Mehrere indirekte Befunde deuten jedoch darauf hin, dass APP und APLP2 ebenfalls *trans*-Interaktionen ausbilden können (*Soba et al.*, 2005; *Wang et al.*, 2009), wenn auch in geringerem Maße. Auf Grund ihrer Dimerisierungseigenschaften wurde postuliert, dass APP und APLPs eine Funktion als Zelladhäsionsproteine ausüben könnten. Eine geringere Ausbildung der *trans*-Dimere von APP und APLP2 würde auch mit der Lokalisation der drei Proteine in der Zelle korrelieren: APLP1 befindet sich fast ausschließlich in

der Plasmamembran von lebenden Zellen. Demgegenüber ist APP hauptsächlich in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert und APLP2 befindet sich sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Kompartimenten (*Kaden et al., 2009*).

Um die physiologische Funktion von APP, APLP1 und APLP2 im lebenden Organismus zu untersuchen, wurden diverse Knockout-Mauslinien (KO) generiert. Einzel-KOs von APP, APLP1 oder APLP2 sind lebensfähig und zeigen keinen auffälligen Phänotyp (*Zheng et al., 1995; von Koch et al., 1997; Heber et al., 2000*). Im Gegensatz dazu sind der Dreifach-KO  $APP^{-/-}/APLP1^{-/-}/APLP2^{-/-}$  und die Doppel-KOs  $APP^{-/-}/APLP2^{-/-}$  und  $APLP1^{-/-}/APLP2^{-/-}$  perinatal letal, wohingegen  $APP^{-/-}/APLP1^{-/-}$ -Mäuse lebensfähig sind und keine starken Beeinträchtigungen aufweisen (*Heber et al., 2000; Herms et al., 2004*). Die Dreifach-KO-Mäuse sowie die  $APP^{-/-}/APLP2^{-/-}$  Doppel-KO-Mäuse weisen dabei eine Beeinträchtigung der neuronalen Entwicklung auf (*Herms et al., 2004; Wang et al., 2005*). Diese Befunde weisen darauf hin, dass APP und APLPs überlappende Funktionen haben und sich gegenseitig ersetzen können. APLP2 nimmt dabei eine zentrale Rolle ein, indem es sowohl den Verlust von APP als auch von APLP1 kompensieren kann, wohingegen APP und APLP1 vermutlich unterschiedliche Funktionen ausüben. Interessanterweise führt der hemizygot Triple-KO  $APP^{-/-}/APLP1^{-/-}/APLP2^{+/-}$  zu früher postnataler Letalität (*Heber et al., 2000; Herms et al., 2004*), was auf Haploinsuffizienz von APLP2 schließen lässt, wenn es sowohl die Funktionen von APP als auch von APLP1 ersetzen muss. Dies ist im Einklang mit der Beobachtung, dass in den KO-Mäusen keine kompensatorische Hochregulation der Expression von nicht-ausgeschalteten APP/APLPs stattfindet (*Heber et al., 2000*).

Studien mit konditionellen KOs und *in utero* „knockdowns“ durch shRNAs legen eine Funktion von APP und APLPs bei der neuronalen Entwicklung, Regulation der Morphologie von Neuronen und Synapsen sowie bei der synaptischen Plastizität in hippocampalen Neuronen nahe (*Young-Pearse et al., 2007; Wang et al., 2009; Weyer et al., 2011; Tyan et al., 2012*). Eine wichtige redundante Funktion von APP und APLP2 ist die Regulation der Differenzierung von neuronalen Stammzellen zu reifen kortikalen Neuronen während der Entwicklung der Großhirnrinde (*Shariati et al., 2013*).

Das am wenigsten verstandene Protein ist in diesem Zusammenhang APLP1. Mehrere Befunde sprechen dafür, dass APLP1 eine vergleichsweise distinkte Funktion gegenüber APP und APLP2 einnimmt: APLP1 wird ausschließlich im Gehirn exprimiert und nicht alternativ gespleißt. APLP1 weist im embryonalen und adulten Gehirn eine andere Lokalisation auf (*Lorent et al., 1995; López-Sánchez et al., 2005; Diez-Roux et al., 2011*) und die Expression wird in differenzierten Neuronen unterschiedlich reguliert im Vergleich zu APP und APLP2 (*Adlerz et al., 2003*).

## 1. Einleitung

Trotz der Vielzahl an durchgeführten Studien bleiben die Befunde aus Mausstudien, zellbiologischen und biochemischen Analysen bislang fragmentarisch und teilweise widersprüchlich, so dass sich kein zusammenhängendes Bild für die Funktionen von APP, APLP1 und APLP2 ergibt.

### 1.4. Zielsetzung

Ein bislang kaum verstandener Aspekt der Alzheimer-Krankheit ist die Rolle von APP und den Homologen APLP1 und APLP2 im Gehirn des Menschen. Dabei ist unter Anderem unklar, wie sich die Bindung verschiedener Liganden an APP und APLPs auf deren Funktionen in der Zelle auswirkt. Wie zuvor beschrieben, wurden bereits verschiedene Metallionen als Bindungspartner von APP, APLP1 und APLP2 identifiziert, jedoch ist nur wenig über die physiologischen Konsequenzen dieser Protein-Metall-Bindungen bekannt.

In dieser Arbeit sollten daher die Auswirkungen der Bindung von Metallionen auf die Struktur, Lokalisation und Funktion der Proteine der APP-Familie in der Zelle untersucht werden. Dazu sollten zwei verschiedene Modellsysteme verwendet werden.

Zum einen sollten *in vitro*-Analysen mit rekombinanten Domänen von APP, APLP1 und APLP2 durchgeführt werden, um die Bindung von Metallionen an die Proteine und deren Konsequenzen auf die Struktur der Domänen zu charakterisieren. Zum Anderen sollten Messungen in lebenden eukaryotischen Zellen durchgeführt werden, um den Einfluss der Metallionen auf die Lokalisation der Vollängenproteine und auf deren Funktion als *cis*- und *trans*-interagierende oligomere Komplexe in der Plasmamembran zu analysieren. Die Effekte von Metallionen auf die Proteine der APP-Familie sollten dabei auch quantitativ analysiert werden, um sie im Zusammenhang mit der Physiologie der Metallionen im Gehirn zu bewerten.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Zink- und Kupferionen induzieren die Bildung von APLP1- und APLP2-Clustern

Die in dem Abschnitt 2.1 dargestellten Analysen wurden von Dr. Daniela Kaden und Dr. Philipp Voigt im Labor von Prof. Dr. Michael Schaefer (Charité Berlin, jetzt Universität Leipzig) durchgeführt und ausgewertet. Sie bildeten den Ausgangspunkt der von mir in den folgenden Kapiteln dargestellten Untersuchungen.

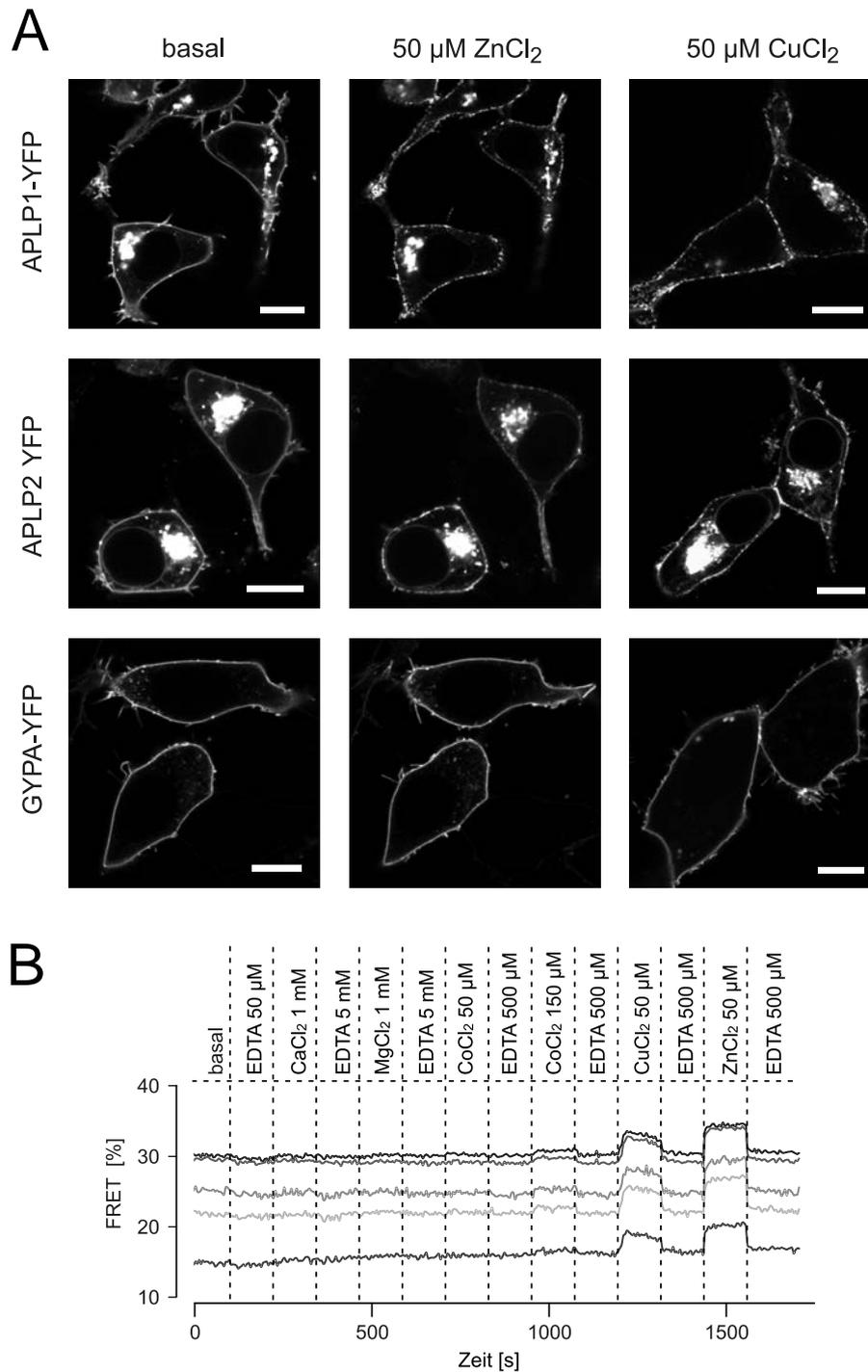
Um die Funktion von APLP1 und APLP2 im zellulären Kontext zu charakterisieren, wurde der Einfluss von Liganden auf die subzelluläre Lokalisation von YFP-markiertem APLP1 und APLP2 in HEK293-Zellen untersucht. Aus anderen Studien war bekannt, dass die Fluoreszenzmarkierung am C-Terminus (Abbildung 2.8) die Lokalisation von APLPs in der Zelle nicht beeinflusst (*Kaden et al.*, 2009).

Erhöhte Konzentrationen von Zink- und Kupferionen führten zur Bildung von mikroskopisch sichtbaren APLP1- und, weniger deutlich, APLP2-Clustern in der Plasmamembran von lebenden Zellen. Als Kontrolle wurde Glycophorin A untersucht, ein anderes Typ-I Transmembranprotein, das an der Plasmembran lokalisiert ist. Glycophorin A bildete keine Cluster bei den gleichen Zink- und Kupferkonzentrationen.

Mit der Bildung von Clustern ging eine Erhöhung der FRET-Effizienz von APLP1- und APLP2-FRET-Paaren einher (*Dissertation Kaden*, 2008) (Abbildung 2.1). Dieser Effekt trat nicht bei hohen Konzentrationen von Calcium- oder Magnesiumionen auf und nur schwach bei hohen Kobaltkonzentrationen, die weit außerhalb physiologisch relevanter Kobaltkonzentration liegen (*Parr und Taylor*, 1964).

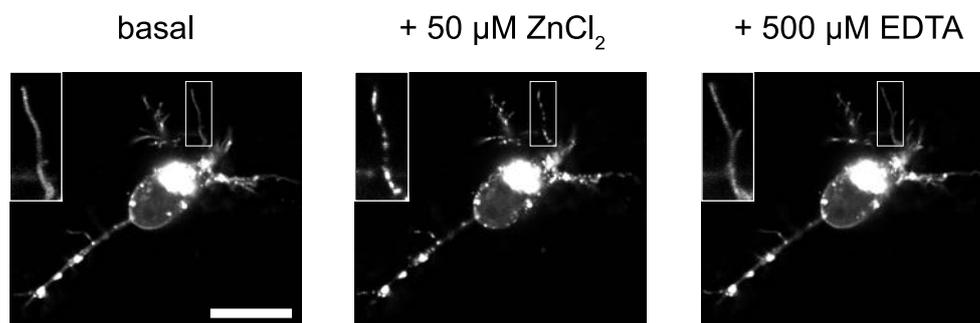
Da die Oligomerisierung von APLP1 am stärksten in Gegenwart von extrazellulären Zinkionen auftrat und weitaus höhere Konzentrationen an gebundenen und freien Zinkionen im Gehirn vorliegen als an Kupferionen (*Que et al.*, 2008; *Akatsu et al.*, 2012), wurde sich in den folgenden Analysen auf den Einfluss von Zink auf APP, APLP1 und APLP2 konzentriert.

## 2. Ergebnisse



**Abbildung 2.1.: Zink und Kupfer induzieren Clustern und Oligomerisierung von APLP1 und APLP2.** (A) Konfokale LSM-Bilder von APLP1-YFP bzw. APLP2-YFP überexprimierenden HEK293-Zellen vor und nach Applikation von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  und 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ . Ein weiteres Typ-I Transmembranprotein, Glycophorin A (GYPA), wurde als Negativkontrolle verwendet und clusterte nicht in Gegenwart von Zink und Kupfer; Abbildung modifiziert aus Kaden (2008). Messbalken: 10  $\mu\text{m}$  (B) Dynamische FRET-Analysen mit APLP1-CFP und APLP1-YFP; dargestellt sind Einzelzellmessungen in Gegenwart der angegebenen Metallionen bzw. EDTA als Metallionen-Chelator; Messung und Auswertung von Dr. Daniela Kaden und Dr. Philipp Voigt nach Kaden (2008).

## 2.2. Einfluss von Zink auf die Oligomerisierung von APP, APLP1 und APLP2



**Abbildung 2.2.: Extrazelluläres Zink induziert Clustern von APLP1 in Neuronen.** Primäre hippocampale Neuronen wurden aus Rattenembryonen isoliert und mit APLP1-YFP nukleofektiert. Repräsentative konfokale LSM-Bilder aus drei unabhängigen Transfektionen vor und nach Applikation von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  und 500  $\mu\text{M}$  EDTA sind gezeigt. Weißer Kasten: vergrößerter Ausschnitt eines Dendrits; Messbalken: 10  $\mu\text{m}$

## 2.2. Einfluss von Zink auf die Oligomerisierung von APP, APLP1 und APLP2

### 2.2.1. Einfluss von Zink auf die Lokalisation von APLP1 in Neuronen

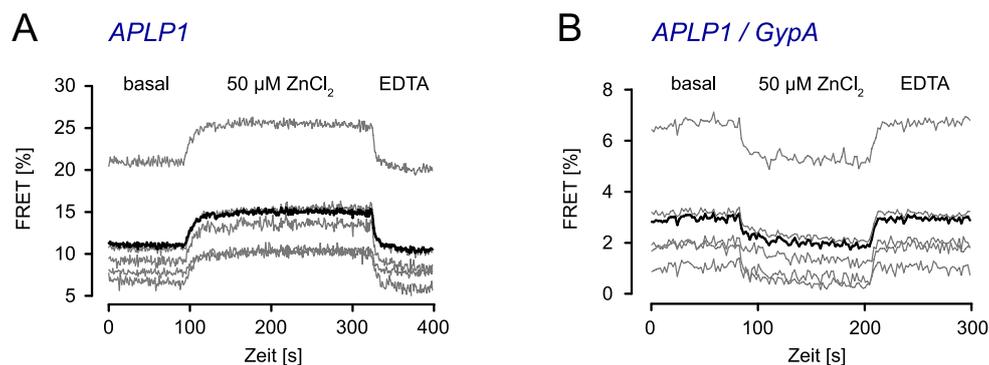
APLP1 wird nahezu ausschließlich in Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert (Kim *et al.*, 1995; Bayer *et al.*, 1997; McNamara *et al.*, 1998; Su *et al.*, 2004). An die Vorexperimente anknüpfend wurde daher der Effekt von Zink auf die Lokalisation von APLP1 in der neuronalen, für APLP1 physiologischen, Membranumgebung untersucht. Hierbei sollte aufgeklärt werden, ob der Clustereffekt nur in der Plasmamembran von HEK293-Zellen auftritt oder auch in der Plasmamembran von Neuronen vorkommt.

Dazu wurden hippocampale Neuronen aus Rattenembryonen verwendet und mit APLP1-YFP durch Nukleofektion transfiziert. Die Verteilung von APLP1-YFP in der neuronalen Membran wurde mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht.

Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  zu APLP1-YFP überexprimierenden Neuronen führte innerhalb von Sekunden zu einer starken Umverteilung der APLP1-Moleküle in der neuronalen Membran. Es bildeten sich mikroskopisch sichtbare APLP1-Cluster in der Plasmamembran des Somas und der Nervenzellfortsätze aus (Abbildung 2.2). Chelatierung der Metallionen durch EDTA löste die Cluster auf und stellte die ursprüngliche Verteilung des APLP1 in der Membran wieder her. Auffällig war, dass die Bildung von APLP1-YFP-Clustern in Zellen mit niedriger APLP1-YFP Expression vergleichsweise schwächer ausfiel. Möglicherweise interagieren hier die fluoreszierenden APLP1-Moleküle in einem höherem Verhältnis mit dem endogenen, d.h. fluoreszenzmikroskopisch „unsichtbaren“, APLP1 und die sichtbaren Cluster treten daher schwächer auf.

Zusammengefasst zeigt die Messung, dass das Zink-induzierte Clustern von APLP1 nicht

## 2. Ergebnisse



**Abbildung 2.3.: Zink induziert Oligomerisierung von APLP1.** SE FRET-Analysen in transfizierten HEK293-Zellen mit APLP1-CFP und APLP1-YFP (A) bzw. APLP1-CFP und GypA-YFP (B); dargestellt sind FRET-Effizienzen der einzelnen Zellen (grau) und des Mittelwertes (schwarz) einer Messung während Zink- und anschließender EDTA-Zugabe. Gezeigt sind repräsentative Messungen aus mind. drei unabhängigen Transfektionen.

nur in der Membranumgebung von HEK293-Zellen vorkommt, sondern dem Verhalten von APLP1 in der neuronalen Membran entspricht. Somit eignen sich HEK293-Zellen gut als Modellsystem zur Untersuchung der Effekte von Zink auf das Verhalten von APLP1 in der Plasmamembran.

### 2.2.2. Einfluss von Zink auf die Oligomerisierung von APLP1

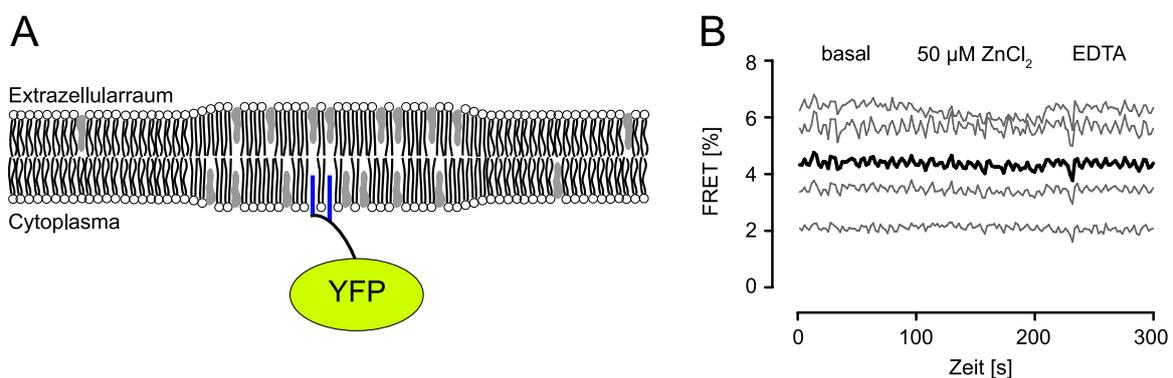
Um die erhöhte Oligomerisierung von APLP1 in Gegenwart von Zinkionen zu untersuchen, wurden FRET-Analysen mit der „sensitized emission“ (SE) Methode nach *Wouters et al.* (2001) in HEK293-Zellen durchgeführt. Diese Methode ist zwar zur Bestimmung absoluter FRET-Effizienzen nur eingeschränkt verwendbar, jedoch gut geeignet für die Analyse relativer Unterschiede der FRET-Effizienz bei unterschiedlichen Pufferbedingungen mit hoher zeitlicher Auflösung. Als FRET-Paar wurde APLP1 mit fusioniertem CFP (FRET-Donor) bzw. YFP (FRET-Akzeptor) verwendet.

APLP1-CFP und APLP1-YFP zeigen ein basales FRET-Signal von ca. 10%, das auf bereits bestehende APLP1-Dimere hinweist (Abbildung 2.3A). Ein Austausch des Messpuffers („artificial CSF“, aCSF) zu zinkhaltigem aCSF führte zu einem FRET-Anstieg auf ca. 15%. Dies deutet entweder auf eine Veränderung des Monomer-Dimer-Gleichgewichts von APLP1 hin oder auf die Bildung von höheren Oligomeren aus bereits bestehenden Metall-unabhängigen APLP1-Dimeren. Die Bildung von mikroskopisch sichtbaren, distinkten Clustern (Abbildung 2.2 und *Kaden, 2008*) unterstützt die zweite Hypothese. APLP1-Dimere würden mit dem verwendeten mikroskopischen System nicht beobachtet werden, da sie nicht als einzelne Punkte aufgelöst werden können. Abgesehen davon kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine

## 2.2. Einfluss von Zink auf die Oligomerisierung von APP, APLP1 und APLP2

Zinkbindung an APLP1 eine veränderte Konformation des APLP1 bewirkt, welche die Nähe der Fluorophore und somit die FRET-Effizienz beeinflusst. Diese Erklärung erscheint aber unwahrscheinlich angesichts des hohen FRET-Anstiegs und der Tatsache, dass der kurze cytosolische C-Terminus von APLP1, an den die Fluorophore gekoppelt sind, nur wenig konformationelle Flexibilität hat. Die Cluster weisen somit auf große multimere Komplexe hin, die zufriedenstellend nur durch höhere Oligomerisierung erklärt werden können.

Um die Spezifität der Zink-induzierten Oligomerisierung zu testen, wurde Glycophorin A-YFP in Gegenwart von APLP1-CFP exprimiert. APLP1 und Glycophorin A interagieren nicht miteinander (*Kaden et al.*, 2009), das niedrige basale FRET-Signal spiegelt die geringe Wahrscheinlichkeit von zufälligen Begegnungen des Donor- und Akzeptor-Moleküls in der Plasmamembran wider (Abbildung 2.3B). Interessanterweise führt die Zugabe von Zink zu einer Verringerung der FRET-Effizienz zwischen APLP1-CFP und Glycophorin A-YFP. Die Zinkbindung führt somit nicht zu einer generellen, unspezifischen Oligomerisierung von Transmembranproteinen und unterstreicht damit die Spezifität der Zink-induzierten Oligomerisierung für APLP1. Die Verringerung der FRET-Effizienz könnte zum Einen darauf zurück zu führen sein, dass der Anteil der APLP1-Moleküle, die sich im Inneren von multimeren APLP1-Clustern befinden, nicht für zufällige Zusammentreffen mit Glycophorin A zur Verfügung steht. Eine andere Hypothese wäre, dass ein geringeres FRET-Signal durch eine Translokation von APLP1 in distinkte Membrankompartimente ausgelöst wird und somit zufälligen Zusammentreffen mit Glycophorin A entzogen wird.



**Abbildung 2.4.: Zink-induzierte APLP1-Oligomere reichern sich nicht in Lipid-Rafts an.** (A) Schematische Darstellung des Lipid-Raft-Markers myr-palm-YFP in cholesterolreichen Membrandomänen; blau: Acylreste des Peptids der Lyn-Kinase. (B) SE FRET-Messung von APLP1-CFP / myr-palm-YFP exprimierenden HEK293-Zellen während Zinkzugabe. Gezeigt sind Einzelmessungen (grau) und Mittelwert (schwarz) einer repräsentativen Messung aus vier unabhängigen Transfektionen.

## 2. Ergebnisse

Um dieser Möglichkeit nachzugehen und eine eventuelle Lokalisation von APLP1-YFP in cholesterolreichen Membrandomänen, so genannte Lipid-Rafts, zu untersuchen, wurde ein FRET-Marker für die innere Lipid-Raft-Membran verwendet (Abbildung 2.4A). Das Marker-konstrukt besteht aus einem myristoylierten und palmitoylierten Peptid der Lyn-Kinase als Fusionsprotein mit YFP (myr-palm-YFP), welches in Lipid-Rafts lokalisiert ist. Eine erhöhte FRET-Effizienz zeigt eine Assoziation des untersuchten Proteins, das als CFP-Fusionsprotein exprimiert wird, mit Lipid-Rafts an (Zacharias *et al.*, 2002; Engel *et al.*, 2010).

Die FRET-Effizienz zwischen APLP1-CFP und myr-palm-YFP erhöhte sich nicht in Gegenwart von  $ZnCl_2$  (Abbildung 2.4B). Somit tritt keine erhöhte Assoziation von APLP1 mit Lipid-Rafts bei Zinkzugabe auf.

### 2.2.3. Einfluss von Eisen auf die Oligomerisierung von APLP1

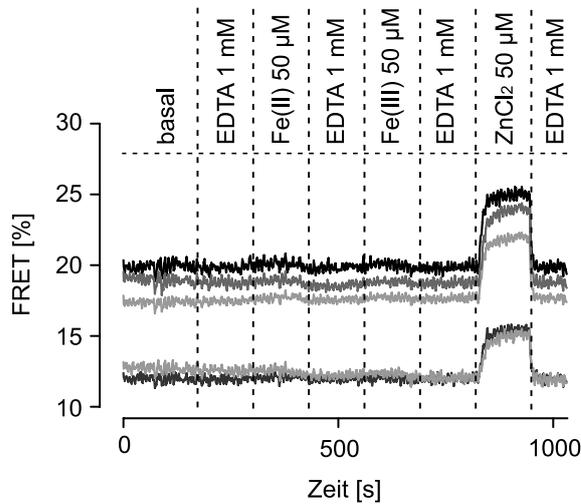
Die in Abschnitt 2.1 dargestellten FRET-Analysen zeigten, dass die Zink-induzierte Oligomerisierung spezifisch für Zink- und Kupferionen ist. Hohe Calcium- und Magnesiumkonzentrationen haben keinen Einfluss auf das Clustern und das FRET-Signal von APLP1 (Abbildung 2.1).

Duce *et al.* (2010) beschrieben eine Ferroxidase-Funktion für das APLP1-Homolog APP, das die Bildung von  $Fe^{3+}$  aus  $Fe^{2+}$  katalysiert. Interessanterweise soll die Ferroxidase-Funktion durch die hoch konservierte E2-Domäne vermittelt werden, wobei Zink die Ferroxidase-Aktivität inhibiert. Daher wurde untersucht, ob Eisen einen ähnlichen Effekt auf die APLP1-Oligomerisierung ausübt wie Zink. Dazu wurden SE FRET-Messungen mit APLP1 in Gegenwart von  $Fe^{2+}$  und  $Fe^{3+}$  durchgeführt, wobei die Eisenionen als  $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$  bzw.  $(NH_4)Fe(SO_4)_2$  gelöst wurden. Beide Eisenionen zeigten keinen Effekt auf die FRET-Effizienz von APLP1 und beeinflussen somit in der untersuchten Konzentration nicht die Oligomerisierung von APLP1 (Abbildung 2.5).

### 2.2.4. Quantitative Analyse der Zink-induzierten Oligomerisierung von APP, APLP1 und APLP2

Um die effektive Zinkkonzentration für die Zink-induzierte Oligomerisierung der Proteine der APP-Familie zu bestimmen, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven des Effekts aufgenommen. APLP1-CFP und APLP1-YFP transfizierte Zellen wurden mit aCSF mit unterschiedlichen Zinkkonzentrationen umspült und der Anstieg der FRET-Effizienz wurde gegenüber der Zinkkonzentration gemessen (Abbildung 2.6A). Es ergab sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf, an den eine Hillkurve mit 3 Parametern angepasst werden konnte (siehe Abschnitt 4.10.3). Diese ergibt als charakteristischen Parameter unter Anderem die effektive Konzentration, bei

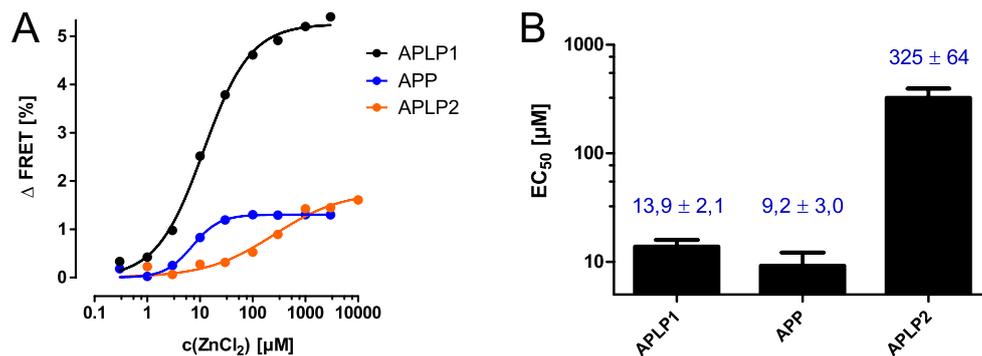
## 2.2. Einfluss von Zink auf die Oligomerisierung von APP, APLP1 und APLP2



**Abbildung 2.5.: Eisenionen beeinflussen die Oligomerisierung von APLP1 nicht.** SE FRET-Analysen in APLP1-CFP/YFP exprimierenden HEK293-Zellen bei Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{ZnCl}_2$ . Gezeigt sind repräsentative Einzelmessungen einer Messung aus drei unterschiedlichen Transfektionen.

welcher der Effekt halbmaximal auftritt ( $\text{EC}_{50}$ ).

Analog zu APLP1 wurden die Messungen für APP und APLP2 durchgeführt. Für beide Homologe ergab sich ebenfalls ein Anstieg der FRET-Effizienz, wobei dieser geringer ausfiel als bei APLP1 (Abbildung 2.6A). APP und APLP2 liegen zu einem höheren Anteil intrazellulär vor als APLP1, sodass ein geringerer Anteil der Proteine extrazelluläres Zink binden kann als bei APLP1. Die Höhe des FRET-Anstiegs hat somit nur eine geringe Aussagekraft für die Stärke der Zink-induzierten Oligomerisierung der Proteine an der Plasmamembran. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert eignet sich daher besser zur vergleichenden Beschreibung der Sensitivität von APP, APLP1 und APLP2 für Zink.



**Abbildung 2.6.: Zink induziert die Oligomerisierung von APP, APLP1 und APLP2.** (A) Halblogarithmische Auftragung des FRET-Anstiegs von APP, APLP1 und APLP2 gegenüber der Zinkkonzentration (●); Näherung durch eine Hill-Gleichung mit 3 Parametern. (B) Vergleich der  $\text{EC}_{50}$ -Werte für FRET-Anstieg nach Zinkzugabe; Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=4-6$  Experimente mit je 6-12 Zellen).

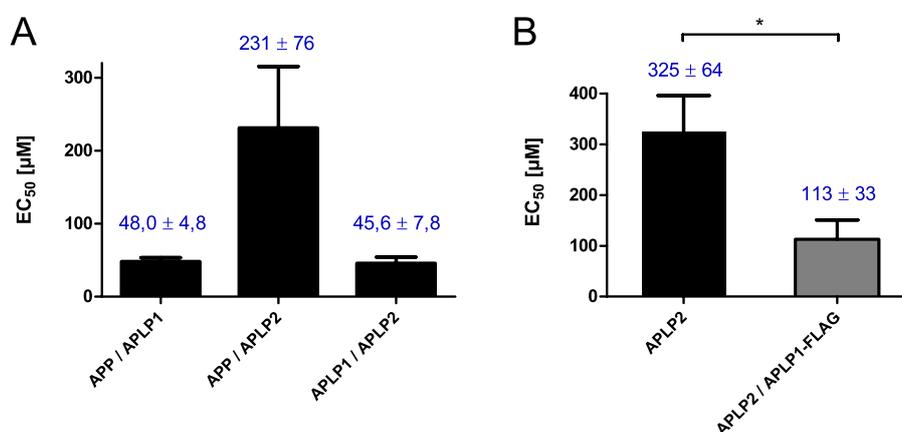
Es zeigte sich, dass Zink neben der bereits bekannten Oligomerisierung von APLP1 und APLP2 (Abbildung 2.1) auch eine vermehrte Oligomerisierung von APP induzierte. Dies ist

## 2. Ergebnisse

bemerkenswert, da APP bei der Aufnahme von fluoreszenzmikroskopischen Bildern nicht in ausreichender Menge an der Plasmamembran detektierbar war, um eine mögliche Clusterbildung zu analysieren (Kaden, 2008). Hier konnten nun die Zinkkonzentrationen vergleichend bestimmt werden, die benötigt werden um die Oligomerisierung von APP, APLP1 und APLP2 zu induzieren. Zink bewirkte eine erhöhte Oligomerisierung von APP und APLP1 bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen mit einem  $EC_{50}$  von ca. 10  $\mu\text{M}$ . Diese Konzentration liegt im physiologisch relevanten Bereich, in Synapsen werden nach der Exozytose von Zinkgefüllten Vesikeln Konzentrationen von bis zu 100  $\mu\text{M}$  Zink gemessen (Sensi et al., 2011). Im Gegensatz dazu wird die Oligomerisierung von APLP2 erst bei höheren, physiologisch weniger relevanten, Konzentrationen induziert, die nur innerhalb von Zinkgefüllten Vesikeln vorliegen (Sindreu und Storm, 2011).

### 2.2.5. Zink-induzierte Heterooligomerisierung von APP, APLP1 und APLP2

APP, APLP1 und APLP2 bilden untereinander sowohl homophile als auch heterophile Kontakte in allen Kombinationen aus (Soba et al., 2005; Kaden et al., 2009). Um zu testen, ob Zink neben der Bildung von Homooligomeren auch die Bildung von Heterooligomeren induziert, wurden SE FRET-Analysen mit gemischten Donor-Akzeptor-Paaren von Proteinen der APP-Familie durchgeführt.



**Abbildung 2.7.: Zink induziert Heterooligomerisierung von APP, APLP1 und APLP2.** SE FRET Analysen mit transfizierten HEK293-Zellen; Vergleich der  $EC_{50}$ -Werte des FRET-Anstiegs nach Zinkzugabe für dargestellte FRET-Paare (A) bzw. APLP2 in Gegenwart und Abwesenheit von nicht-fluoreszierendem APLP1-FLAG (B). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von  $n=4-5$  Experimenten mit je 6-10 Zellen (\* $p<0,05$ ; Welch's  $t$ -test).

Es zeigte sich, dass Zink die Bildung von APP-APLP1 und APLP1-APLP2 Heterooligomeren bei physiologisch relevanten Konzentrationen mit  $EC_{50}$ -Werten von ca. 50  $\mu\text{M}$  induzierte, wohingegen die APP-APLP2 Heterooligomerisierung erst bei höheren Zinkkonzentrationen ver-

### 2.3. Lokalisation der Zinkbindungsstelle in APLP1

stärkt wird (Abbildung 2.7A). Dies bedeutet, dass APLP2 bei niedrigen Zinkkonzentrationen mit APLP1 Heterooligomere bildet, jedoch kaum APP-APLP2 Heterooligomere und APLP2-Homooligomere ausbildet. Um zu testen, ob APLP1 dabei neben dem Heterooligomerkontakt auch APLP2-Moleküle direkt in räumliche Nähe bringt, wurde nicht-fluoreszierendes APLP1 mit einem APLP2-Donor-Akzeptor-Paar koexprimiert. Die Expression des FRET-inaktiven APLP1 führte zu einer APLP2-Oligomerisierung bei niedrigeren Zinkkonzentrationen (Abbildung 2.7B), sodass APLP1 ebenfalls als Vermittler der APLP2-Oligomerisierung fungierte.

## 2.3. Lokalisation der Zinkbindungsstelle in APLP1

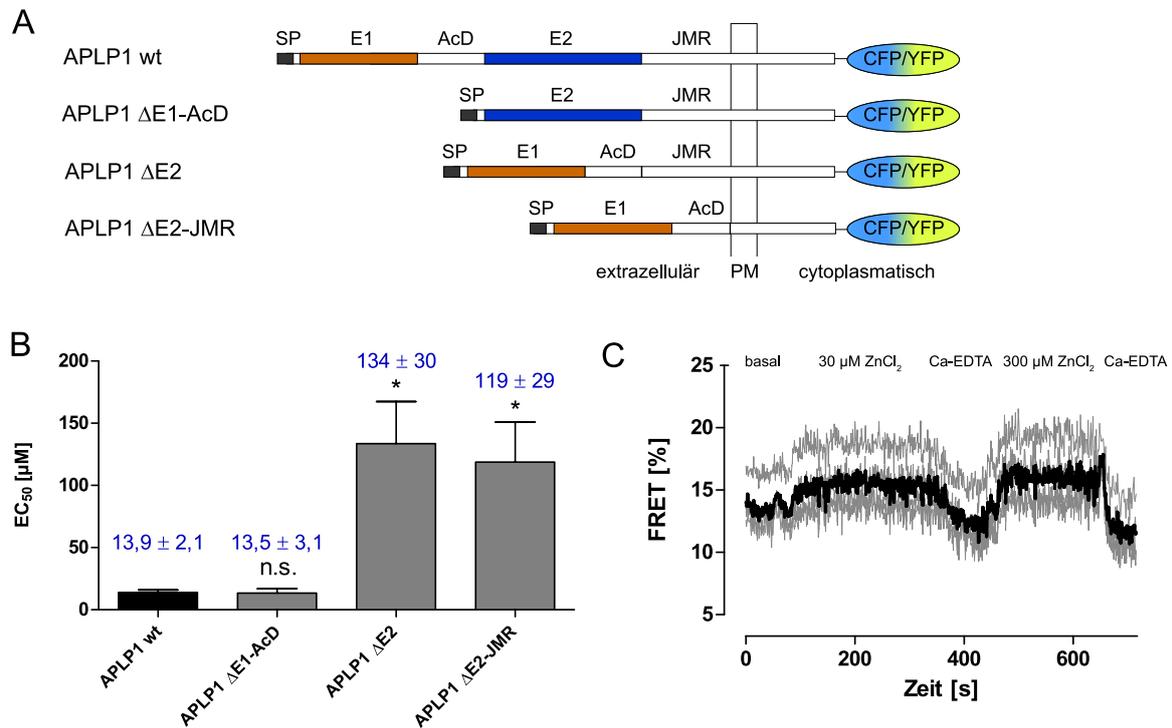
*Bush et al.* (1994b) beschrieben eine Zinkbindungsstelle in der E1-Domäne des extrazellulären Bereichs von APP, APLP1 und APLP2 (Abbildung 2.8A). Ein experimenteller Beleg liegt jedoch nur für APP vor (*Bush et al.*, 1993). Vorexperimente zeigten, dass eine Deletion der E1-Domäne von APLP1 überraschenderweise nicht zu einer Schwächung der Zink-induzierten Oligomerisierung führten (*Kaden, Voigt*; unveröffentlichte Ergebnisse). Auf Grund seiner Lokalisation an der Plasmamembran und Rolle als Vermittler der APLP2-Oligomerisierung ist mutmaßlich APLP1 der wichtigste Zink-Sensor unter den drei Proteinen der APP-Familie. Daher wurde im Folgenden die Zinkbindungsstelle gesucht, die zu einer Oligomerisierung von APLP1 führt.

### 2.3.1. Eingrenzung der kritischen Region für die Oligomerisierung von APLP1 durch Zink

Um die Beteiligung der einzelnen Domänen von APLP1 an der Zink-vermittelten Oligomerisierung im Detail zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten der extrazellulären Bereiche des APLP1 generiert (Abbildung 2.8A). Deletion der E1-Domäne und der angrenzenden sauren Region (AcD) führte zu keiner Erhöhung des EC<sub>50</sub>-Werts (Abbildung 2.8B). Demgegenüber bewirkte die Deletion der E2-Domäne eine Verringerung der Zinksensitivität von APLP1 um ca. den Faktor 10. Das Fehlen der angrenzenden juxtamembranen Region (JMR) führte zu keiner weiteren Verringerung der Zinksensitivität. Dies legt nahe, dass die Zink-induzierte Oligomerisierung von APLP1 primär durch die E2-Domäne vermittelt wird.

Der FRET-Anstieg ist jedoch nicht komplett depletiert, sondern zu höheren Zinkkonzentrationen verschoben. Eine Erklärung dafür wäre, dass Zinkionen bei hohen Konzentrationen unspezifisch an Calcium- oder Magnesiumbindungsstellen des Proteins binden. Um dies zu testen, wurde APLP1  $\Delta$ E2-JMR in Gegenwart von hohen Calcium- und Magnesiumkonzentrationen mit Zink inkubiert. Chelatierung des Zink erfolgte mit Calcium-gesättigtem EDTA,

## 2. Ergebnisse



**Abbildung 2.8.: Die E2-Domäne vermittelt Zink-induzierte Oligomerisierung von APLP1.** (A) Schematische Darstellung der APLP1-Deletionsmutanten mit C-terminalem CFP bzw. YFP-Tag. (B) SE FRET-Analysen in transfizierten HEK293-Zellen bei Zinkzugabe. Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte der APLP1-Deletionsmutanten weist auf Beteiligung der E2-Domäne an der Zink-induzierten Oligomerisierung hin. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler von n=4-6 Experimenten mit je 6-12 Zellen (n.s. nicht signifikant; \*p<0,05; Welch's t-test). (C) SE FRET-Analysen mit APLP1Δ290-580-CFP/YFP exprimierenden HEK293-Zellen in Calcium- und Magnesium-haltigem Messpuffer. Nach Zinkzugabe wurde das gebundene Zink durch Calcium-gesättigtes EDTA chelatiert, um die Ca<sup>2+</sup>-Bindung nicht zu beeinflussen. Gezeigt sind Einzelzellmessungen (grau) und Mittelwert (schwarz) einer repräsentativen Messung aus drei unterschiedlichen Transfektionsansätzen. PM: Plasmamembran, AcD: saure Domäne, JMR: juxtamembrane Region, SP: Signalpeptid

das auf Grund seiner höheren Affinität zu Zink gegenüber Calcium und Magnesium das an das APLP1 gebundene Zink, jedoch nicht gebundenes Calcium oder Magnesium, entfernen kann. Die Zugabe von Calcium und Magnesium führte zu keiner verringerten Oligomerisierung von APLP1ΔE2-JMR in Gegenwart hoher Zinkkonzentrationen (Abbildung 2.8C). Die Oligomerisierung von APLP1 E2-Deletionsmutanten bei hohen Zinkkonzentrationen ist daher eher durch das Vorhandensein anderer, schwach affiner, Zinkbindungsstellen in anderen Bereichen der Ektodomäne erklärbar (vgl. Abschnitt 3.2).

### 2.3.2. Identifizierung der Zink-bindenden Region von APLP1

Frühere Messungen zeigten, dass ein rekombinantes Protein mit der E2-Domäne und juxtamembranen Region von APLP1 (APLP1 E2-JMR) pH-abhängig Zink bindet (*Diplomarbeit Mayer, 2009*). Um die an der Zinkbindung beteiligten Aminosäuren zu identifizieren, wurde APLP1 E2-JMR auf Zink-beladener Sepharose® immobilisiert und mit einer Protease verdaut. Nicht-zinkbindende Bereiche wurden durch Waschen mit einer Lösung hoher Ionenstärke entfernt, sodass elektrostatische Wechselwirkungen der Peptide mit Zink kompetiert wurden. (Abbildung 2.9).

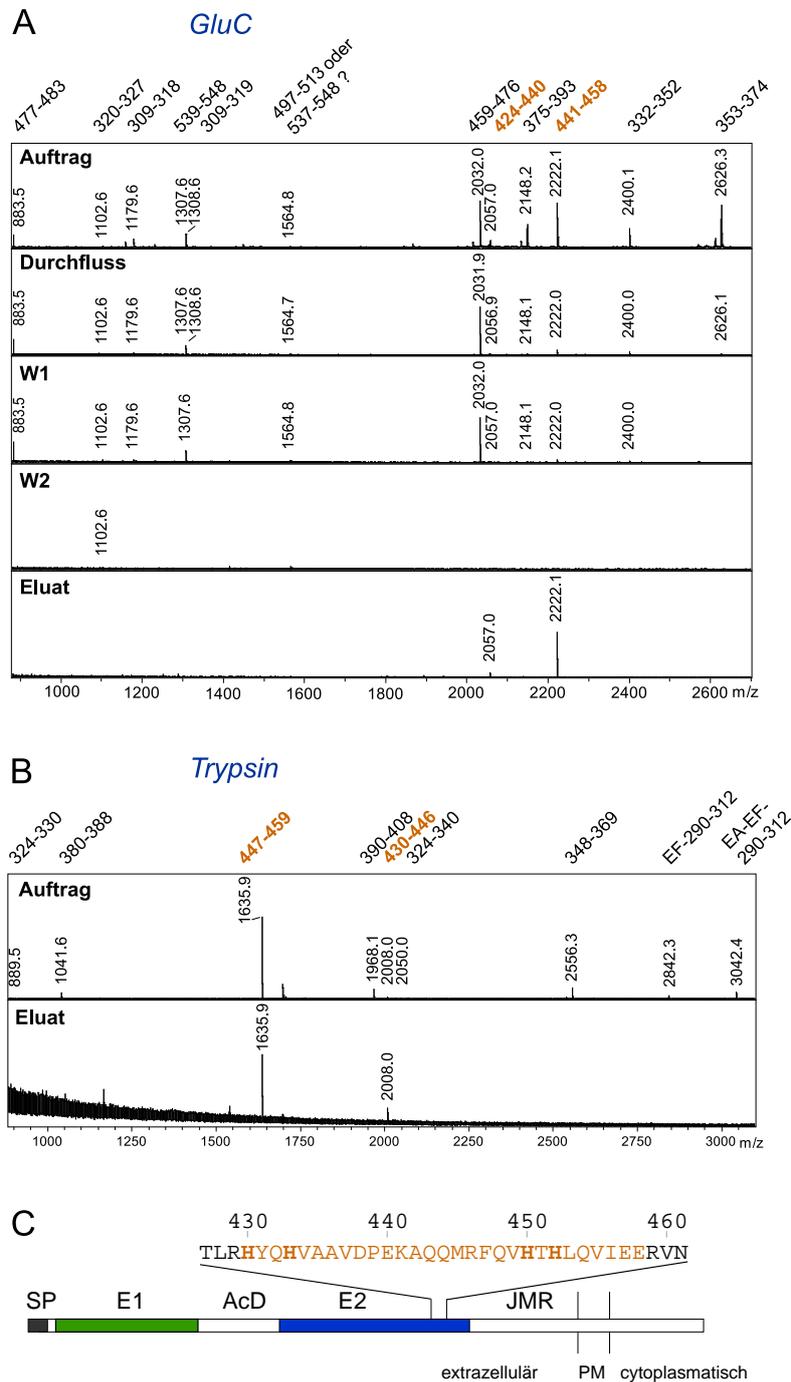
Die massenspektrometrisch identifizierten Peptide nach GluC- und Trypsin-Verdau überlappen sich in den Aminosäureresten 430-458 der APLP1 wt Sequenz, die hier als zinkbindende Region von APLP1 postuliert wird. Eine Elution von APLP1 E2-JMR von der zinkbeladenen Säule kann ebenfalls durch Senkung des pH-Werts auf  $\leq 6,0$  erreicht werden (*Mayer, 2009*). Dies legt eine Beteiligung von Histidinresten an der Zinkbindung nahe, die neben Cysteinen am häufigsten koordinative Bindungen mit Zinkionen ausbilden (*Vallee und Falchuk, 1993; Auld, 2001*). In der identifizierten Region befinden sich vier Histidinreste, von denen die Histidine an den Positionen 430, 433 und 452 in den Proteinen der APP-Familie konserviert sind (Abbildungen 2.9C, 2.10A).

Um eine Beteiligung der identifizierten Histidine an der Zink-vermittelten Oligomerisierung zu untersuchen, wurden diese Reste in der APLP1-Sequenz zu Alanin mutiert. Es zeigte sich, dass durch Punktmutation der vier Histidinreste die Sensitivität von APLP1 für Zink um den gleichen Faktor verringert wird wie bei der Deletion der vollständigen E2-Domäne mit der juxtamembranen Region. Außerdem zeigte die 4xHis-Mutante keine deutliche Clusterbildung in Gegenwart von  $50 \mu\text{M ZnCl}_2$  (Abbildung 2.10C). Erhöhung der Zinkkonzentration auf  $200 \mu\text{M}$  induzierte jedoch die Bildung von APLP1-Clustern, wobei der Effekt im Vergleich zu APLP1 wt schwächer ausgeprägt war.

Um den Einfluss des einzigen nicht-konservierten Histidins, His450, innerhalb der APP-Familie zu untersuchen, wurde ein einzelner Aminosäureaustausch in der APLP1 wt Sequenz vorgenommen, H450A. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert der H450A-Mutante war signifikant erhöht im Vergleich zum Wildtyp-Protein, jedoch wesentlich geringer als für die 4xHis-Mutante (Abbildung 2.10B). Histidin 450 ist somit an der Zink-vermittelten Oligomerisierung von APLP1 beteiligt, die Histidine an den Positionen 430, 433 und 452 tragen ebenfalls dazu bei.

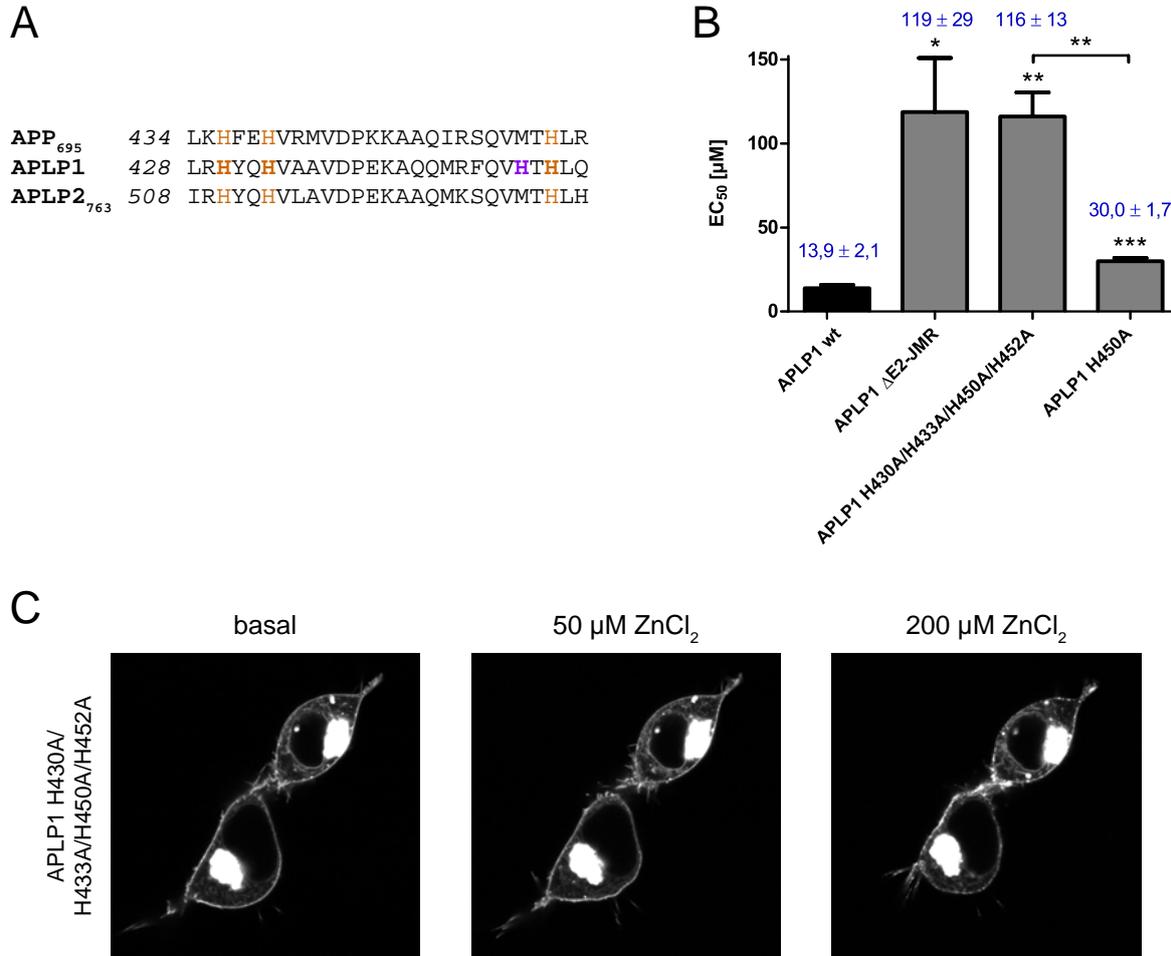
Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass APLP1 eine bislang unbekannte Zinkbindungsstelle im C-terminalen Bereich der E2-Domäne besitzt, die durch vier Histidine gebildet wird. Diese Bindungsstelle vermittelt die Oligomerisierung von APLP1 durch Zink bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen von extrazellulärem Zink.

## 2. Ergebnisse



**Abbildung 2.9.: Identifikation der Zinkbindungsstelle in der E2-Domäne von APLP1.** (A,B) Massenspektrometrische Analyse der Proteolyse von APLP1 E2-JMR durch GluC (A) und Trypsin (B) auf einer Zinksäule. Unspezifisch gebundene Peptide wurden durch Erhöhung der NaCl-Konzentration von der Säule gewaschen (W1,W2). Zink-bindende Peptide (orange) wurden mit EDTA-haltigem Puffer eluiert. Massen für APLP1-Peaks in den einzelnen Fraktionen sind mit zugehöriger Nummerierung aus der APLP1 wt-Sequenz angegeben. Gezeigt sind repräsentative Spektren aus mind. drei unabhängigen Experimenten. (C) Primärsequenz der identifizierten Zink-bindenden Region aus APLP1 E2-JMR (orange). PM: Plasmamembran, AcD: saure Domäne, JMR: juxtamembrane Region, SP: Signalpeptid

### 2.3. Lokalisation der Zinkbindungsstelle in APLP1



**Abbildung 2.10.: Zink-induzierte Oligomerisierung wird durch Histidine im C-terminalen Bereich der E2-Domäne von APLP1 vermittelt.** (A) Sequenzanalyse der histidinreichen Region am C-Terminus der E2-Domäne von APP, APLP1 und APLP2. Histidine an den Positionen 430, 433, 452 der APLP1-Sequenz sind in APP und APLP2 konserviert (orange), His450 ist nur in APLP1 vorhanden (violett). (B,C) APLP1-Mutanten wurden als CFP/YFP-Fusionsproteine in HEK293-Zellen exprimiert und mit Zink inkubiert. (B) Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte von SE FRET-Analysen mit APLP1-Mutanten. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler von n=4-6 Experimenten mit je 6-12 Zellen (n.s. nicht signifikant; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; Welch's t-test). (C) Repräsentative konfokale LSM-Bilder vor und nach Zugabe von 50µM bzw. 200µM ZnCl<sub>2</sub>, aus fünf unterschiedlichen Transfektionsansätzen.

## 2. Ergebnisse

### 2.4. Untersuchung der Metallbindungseigenschaften der E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2

Um den Mechanismus der Zink-vermittelten Oligomerisierung zu charakterisieren, wurden *in vitro* Analysen mit den rekombinanten E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2 durchgeführt. Die E2-Proteine wurden dazu heterolog in der methylo-trophen Hefe *Pichia pastoris* exprimiert.

#### 2.4.1. Heterologe Produktion von APLP1 E2

Frühere Versuche eine stabile, rekombinante E2-Domäne von APLP1 zu generieren, schlugen fehl (Mayer, 2009). Hoopes *et al.* (2009) beobachteten bei der Produktion einer E2-Domäne des APP-Homologen APL-1 aus *Caenorhabditis elegans*, dass bei APL-1 E2 im Vergleich zu APP E2 die C-terminale Helix verlängert ist und für eine definierte Faltung der Domäne benötigt wird.

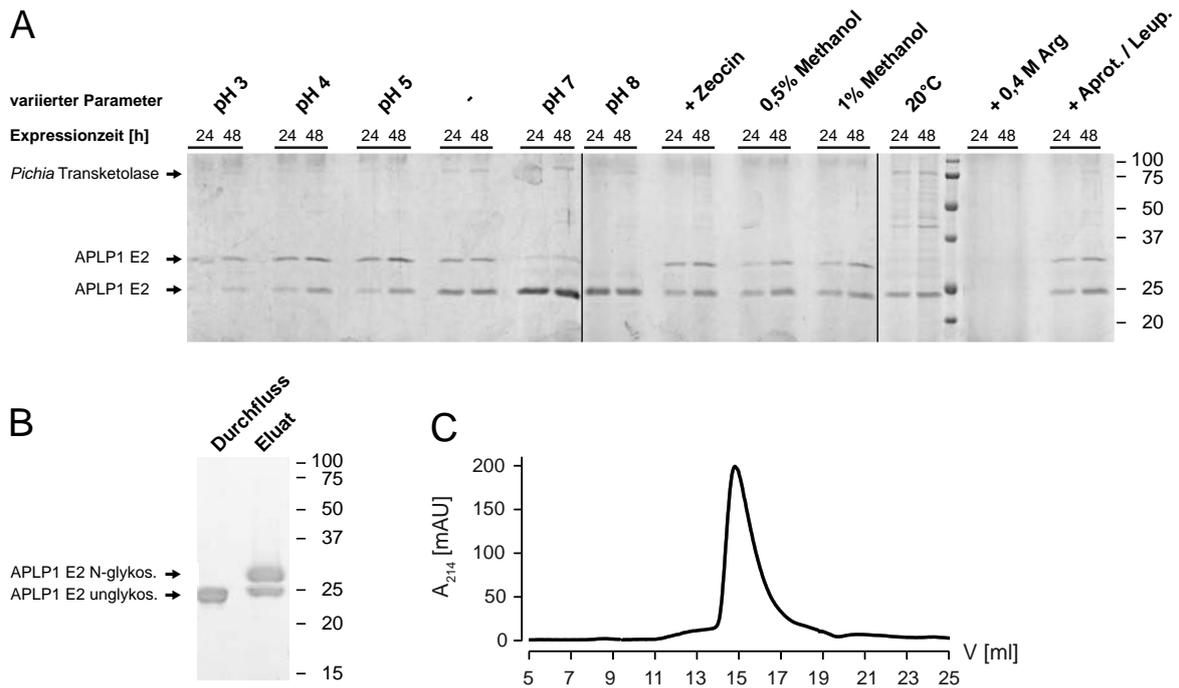
Daher wurde ein Expressionskonstrukt für APLP1 E2 mit einem verlängerten C-Terminus generiert und getestet (vgl. Abschnitt 4.1.5). Dieses wurde stabil exprimiert und lieferte eine Mischung aus N-glykosyliertem und unglykosyliertem Protein (Abbildung 2.11A,B).

Für eine effiziente Expression von APLP1 E2 wurden verschiedene Expressionsbedingungen geprüft, die in anderen Zusammenhängen bei der heterologen Proteinexpression in *Pichia* verwendet wurden (Shi *et al.*, 2003; Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Es konnte eine gute Expression mit geringer Verunreinigung durch *Pichia*-Proteine bei einer Verringerung der Methanol-Konzentration von 2% auf 0,5% erreicht werden (Abbildung 2.11A). Durch Erhöhung des pH-Werts auf pH 7 wurde die Expression des unglykosylierten Proteins erhöht bei gleichzeitiger Verringerung der Expression von N-glykosyliertem APLP1 E2.

Das aufgereinigte Protein zeigte eine definierte Faltung mit einem hohen Anteil  $\alpha$ -helikaler Bereiche (Abbildung 2.18), und weist damit große Ähnlichkeit in der Gesamtsekundärstruktur zu den Homologen APP und APL-1 auf (Wang und Ha, 2004; Hoopes *et al.*, 2009). APLP1 E2 eluierte von einer Größenausschluss säule in einem einzelnen Peak, bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 42 kDa (Abbildung 2.11C). Durch Kopplung der Größenausschluss chromatografie (SEC) mit Messung der statischen Lichtstreuung (SLS) konnte Dr. Dirk Röser aus dem Labor von Dr. Manuel Than (Leibniz Institute for Age Research, Jena) ein Form-korrigiertes Molekulargewicht von 26,6 kDa bestimmen. Dieses zeigt gute Übereinstimmung mit dem theoretischen Molekulargewicht von 24,2 kDa für monomeres APLP1 E2.

Stabilitätsanalysen zeigten, dass das aufgereinigte unglykosylierte Protein in 5 mM Tris, 300 mM NaCl auf 10 mg/ml aufkonzentriert werden konnte und über Wochen stabil in Lösung

## 2.4. Untersuchung der Metallbindungseigenschaften der E2-Domäne



**Abbildung 2.11.: Expression der E2-Domäne von APLP1.** (A) Analyse verschiedener Expressionsbedingungen für die Expression von APLP1 E2; SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung der Kulturüberstände aus *Pichia pastoris*. Angegeben sind Variationen der Standardparameter  $T=29^{\circ}\text{C}$ , pH 6,0, 2% Methanol, kein Antibiotikum im Expressionsansatz. (B) Lectin-Affinitätschromatografie mit Concanavalin A-Sepharose<sup>®</sup> mit aufgereinigtem APLP1 E2; Analyse durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung. Die Lectin-Affinitätschromatografie führt zur Abtrennung von N-glykosyliertem APLP1 E2 in der Durchflussfraktion bei gleichzeitiger Anreicherung im Eluat. (C) SEC-Analyse des aufgereinigten APLP1 E2 auf einer Superose12-Säule.

## 2. Ergebnisse

blieb, sodass es sich gut für Röntgenstrukturanalysen eignete. Diese wurden in einer weiteren Kooperation mit Dr. Dirk Röser erfolgreich durchgeführt, gegenwärtig wird im Labor von Dr. Manuel Than die Struktur der E2-Domäne von APLP1 gelöst.

### 2.4.2. Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2

Da es bislang keine Antikörper gegen die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2 gab ([www.alzforum.org](http://www.alzforum.org), *Antibody Compendium*, März 2013) und diese für biochemische und zellbiologische Analysen benötigt wurden, war es notwendig neue Antikörper herzustellen. Hierbei wurde die Immunisierung zum Einen mit Peptiden aus verhältnismäßig gering konservierten Bereichen der E2-Domänen vorgenommen (Abbildung 2.12A) und zum Anderen mit der rekombinanten E2-Domäne von APP.

Die Antikörper gegen die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2 detektierten spezifisch die Vollängenproteine im Western-Blot aus HEK293-Zellysaten. Dabei wiesen die Peptid-Antikörper gegen APP und APLP1 eine deutlich größere Nachweisempfindlichkeit auf als der APLP2-Antikörper (Abbildung 2.12B,C,D). Die Antiseren zeigten auch Kreuzreaktivität zu einigen anderen humanen Proteinen, die ein anderes Molekulargewicht als APP, APLP1 und APLP2 aufwiesen. Zwei verschiedene Antiseren wurden durch Immunisierung mit rekombinanten APP E2 generiert, hier als DCRP und DCMD bezeichnet. DCRP enthielt sehr sensitive und spezifische Antikörper, wohingegen DCMD starke Kreuzreaktivität zu anderen humanen Proteinen und auch zu APLP2 aufwies (Abbildung 2.12F,G).

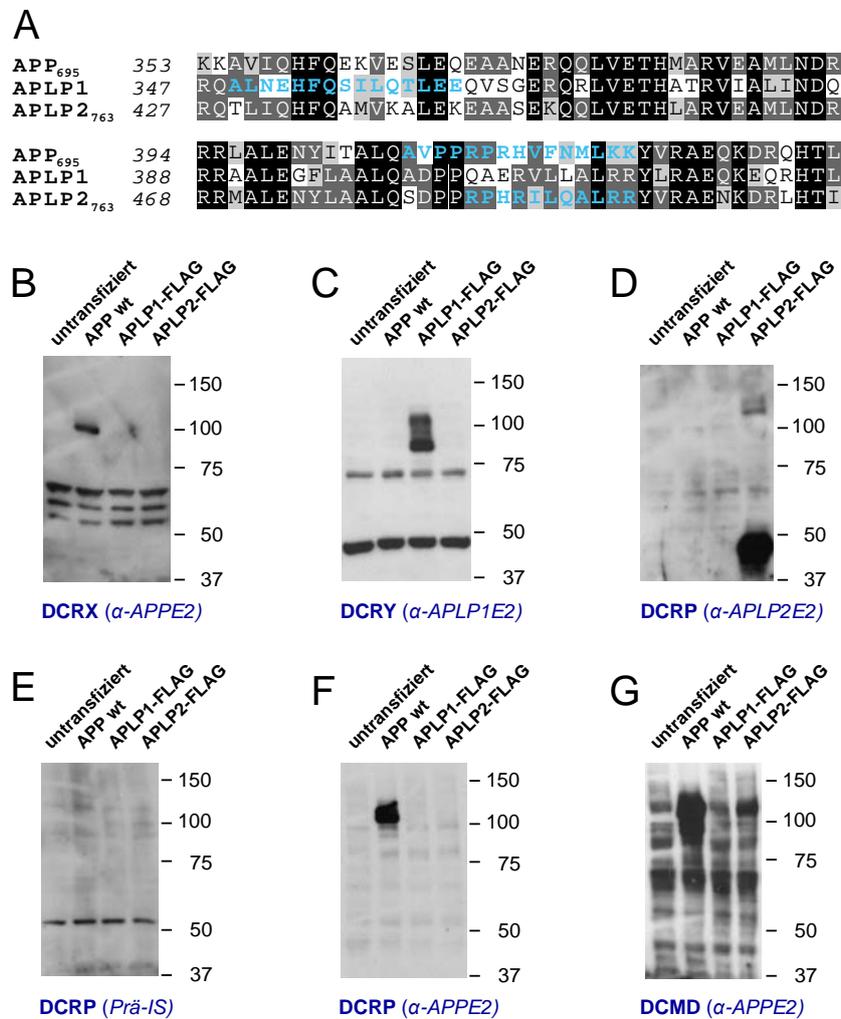
Die Peptidantikörper erkannten zudem im Western-Blot und in ELISA-Analysen spezifisch die rekombinanten E2-Domänen, wohingegen die Antiseren gegen die vollständige APP E2-Domäne schwache (DCRS) bzw. starke (DCMD) Kreuzreaktivität zeigten (Daten nicht gezeigt).

Somit konnten die Peptidantikörper sowie das DCRP-Antiserum erfolgreich für die Detektion der E2-Domänen sowie der Vollängenproteine APP, APLP1 und APLP2 eingesetzt werden.

### 2.4.3. Untersuchung der Bindung von Metallionen an APP E2

In einer Studie wurde die E2-Domäne von APP in Gegenwart von Cadmiumionen kristallisiert, was eine veränderte Struktur der Domäne zu Folge hatte im Vergleich zu der Röntgenkristallstruktur in Abwesenheit von Metallionen. Die am Protein gebundenen Cadmiumionen konnten teilweise durch Zink und Kupfer ersetzt werden (*Dahms et al.*, 2012). Um eine direkte Bindung von Zink- und Kupferionen an APP E2 in Lösung zu testen, wurden Oberflächenplasmonresonanzmessungen (SPR) mit dem BIACORE-System durchgeführt. Hierzu wurde

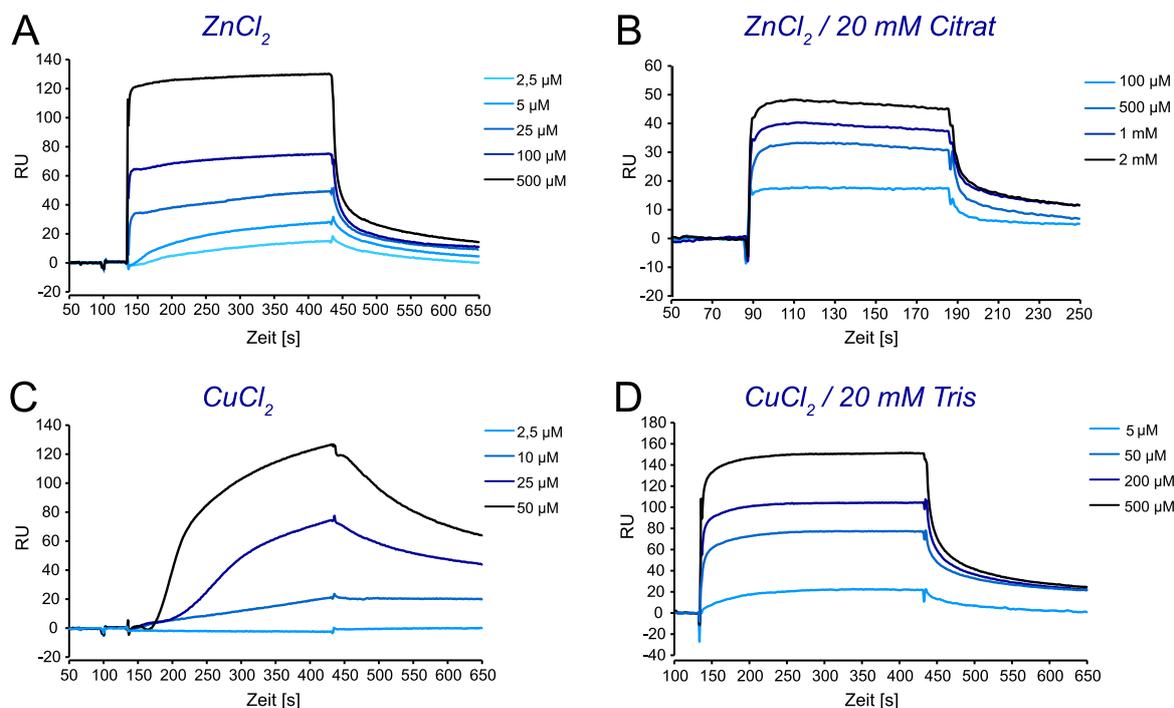
## 2.4. Untersuchung der Metallbindungseigenschaften der E2-Domäne



**Abbildung 2.12.: Charakterisierung von polyklonalen Antikörpern gegen die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2.** (A) Sequenzvergleich eines Bereichs der E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2 mit Clustal Omega; konservierte Reste in zwei Proteinen (dunkelgrau) bzw. allen Homologen (schwarz), sowie chemisch ähnliche Aminosäuren (hellgrau) sind angezeigt. Für die Immunisierung wurden synthetische Peptide (blau) aus immunogenen Bereichen mit geringer Konservierung verwendet und an KLH gekoppelt. (B-G) Western-Blot-Analyse von Zellysaten aus untransfizierten, APP wt, APLP1-FLAG und APLP2-FLAG transfizierten HEK293-Zellen. Die Antiseren gegen Peptide von APP E2 (B), APLP2 E2 (D), und das Protein-A gereinigte Antiserum gegen APLP1 E2 (C) sowie die Antiseren gegen rekombinantes APP E2 (F,G) erkennen die zugehörigen Vollängenproteine. Im Serum vor der Immunisierung (Prä-IS) befanden sich keine Antikörper, die Proteine der APP-Familie detektieren (E).

## 2. Ergebnisse

eine rekombinante E2-Domäne von APP, die von Sven Dahms aus dem Labor von Dr. Manuel Than (Leibniz Institute for Age Research, Jena) hergestellt wurde, über Aminkopplung kovalent auf die Oberfläche eines Sensorchips gebunden. Über das gekoppelte Protein wurden Metallionenlösungen verschiedener Konzentrationen gegeben.



**Abbildung 2.13.: Metallionen binden an APP E2 und induzieren Konformationsänderungen.** Bindung von Zink- (A) und Kupferionen (C) an immobilisiertes APP E2 in einem SPR-Biacore-System. Zur Unterdrückung schwacher Wechselwirkungen wurden mittelstarke Chelatoren für Zink (20 mM Citrat, B) und Kupfer (20 mM Tris, D) verwendet. Die angegebenen Konzentrationen der Metallionen wurden für 300 s (A,C,D) bzw. 100 s (B) über den Sensorchip gegeben. Anschließend erfolgte eine Dissoziation der Metallionen von den Proteinen im Messpuffer. Dargestellt sind repräsentative Sensorgramme aus mind. drei unabhängigen Messungen.

Das SPR-Signal zeigte einen hohen Anstieg auf bis zu ca. 130 RU in Gegenwart hoher Zink- und Kupferkonzentrationen (Abbildung 2.13A,C). Daraus folgt zunächst, dass Zink und Kupfer direkt an APP E2 binden. Das Molekulargewicht der an den Chip gebundenen Moleküle ist proportional zu dem SPR-Signal der Bindung eines Analyten. Daher würde die Bindung eines einzelnen Zink- oder Kupferions an jeweils alle immobilisierten APP E2-Proteine einen Anstieg von maximal 16 RU ergeben (vgl. Abschnitt 4.7.2). Der hohe Anstieg von ca. 130 RU könnte somit einerseits durch Bindung mehrerer Metallionen an unterschiedliche Bereiche des Proteins erklärt werden. Andererseits ist bekannt, dass Konformationsänderungen der Moleküle auf dem Sensorchip zu Unterschieden im SPR-Signal führen können (Mannen *et al.*, 2001). Auf strukturelle Änderungen des APP E2 deuten auch die komplexen Bindungskurven

#### 2.4. Untersuchung der Metallbindungseigenschaften der E2-Domäne

hin, die kein „Fitting“ nach einem kinetischen Standardmodell erlaubten.

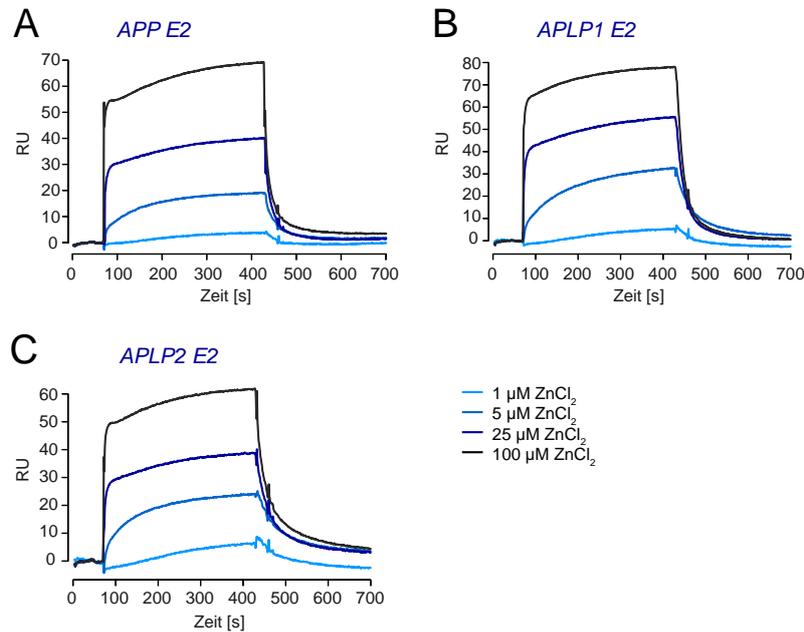
Um den Anteil der Bindung von Zink und Kupfer an schwache Metallbindungsstellen des Proteins zu analysieren, wurden dem Messpuffer spezifische Chelatoren für Zink (Citrat) und Kupfer (Tris) zugesetzt, welche die Bindung an schwache Metallbindungsstellen kompetieren. In Gegenwart der Liganden reduzierte sich die Komplexität der Bindungskurven (Abbildung 2.13B,D) und der Anstieg des SPR-Signals fiel für Zink geringer aus, so dass der hohe Anstieg ohne Citrat teilweise mit der Besetzung schwacher Zinkbindungsstellen erklärt werden kann. Allerdings fällt der Anstieg des SPR-Signals für Zink und Kupfer in Gegenwart der Liganden höher aus als bei der Bindung einzelner Metallionen. Die SPR-Messungen deuten somit auf eine direkte Bindung von Zink und Kupfer an APP E2 hin, die mit einer strukturellen Änderung des Proteins auf dem Sensorchip einhergeht.

##### 2.4.4. Untersuchung der Bindung von Zinkionen an die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2

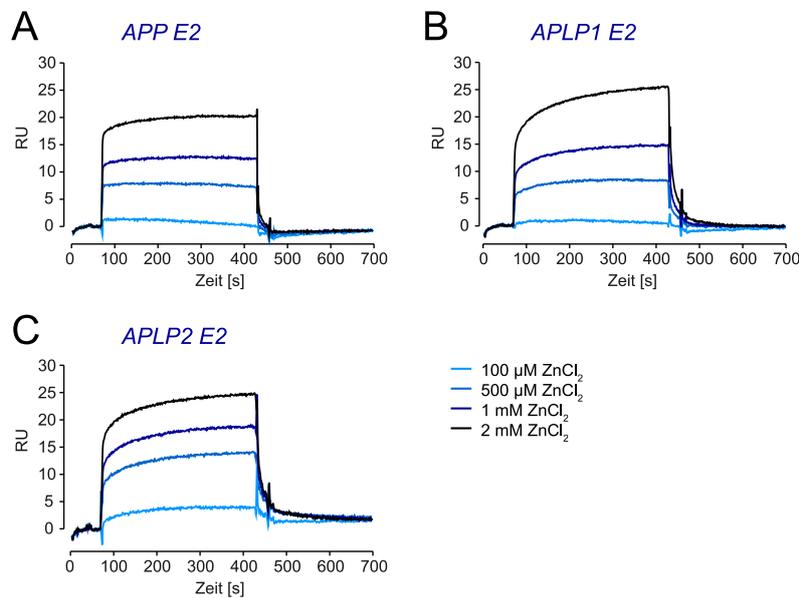
APLP2 zeigte in den FRET-Analysen eine weitaus geringere Sensitivität gegenüber Zink im Vergleich zu APP und APLP1 (vgl. Abschnitt 2.2.4). Um Unterschiede in der Bindung von Zinkionen an die E2-Domänen von APLP1 und APLP2 zu untersuchen und mit der Bindung an APP zu vergleichen, wurden SPR-Analysen mit den in *P. pastoris* exprimierten Proteinen durchgeführt. Es wurden vergleichbare Mengen der E2-Domänen von APP (3600 RU), APLP1 (3400 RU) und APLP2 (2900 RU) auf dem Sensorchip über Aminkopplung immobilisiert.

Zinkzugabe führte zu einem hohen Anstieg des SPR-Signals, was auf eine direkte Bindung von Zink an die immobilisierten Proteine hinweist (Abbildung 2.14). Es zeigten sich keine Unterschiede in der Zinkbindung zwischen den drei verschiedenen E2-Domänen. Auch nach Zugabe von Citrat als Zinkligand wurden keine Unterschiede in den Sensorgrammen von APP, APLP1 und APLP2 E2 beobachtet (Abbildung 2.15). Citrat-Zugabe führte hier analog wie bei den vorherigen Versuchen mit APP E2 zu einer Verringerung des SPR-Signals, wobei auch hier bei Zinkbindung Konformationsänderungen des immobilisierten Proteins auftreten. Daraus lässt sich zum Einen schlussfolgern, dass die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2 direkt Zinkionen binden. Dabei unterscheidet sich die Assoziation und Dissoziation der Zinkbindung an die Proteine nicht, so dass die großen Unterschiede in der Oligomerisierung der Volllängenproteine nicht durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten der E2-Domänen für Zink erklärt werden können.

## 2. Ergebnisse



**Abbildung 2.14.: Bindung von Zink an APP, APLP1 und APLP2 E2.** Bindungsanalysen von Zinkionen an immobilisierte E2-Domänen von APP (A), APLP1 (B) und APLP2 (C) in einem SPR-System. Lösungen mit unterschiedlichen Zinkkonzentrationen wurden für 300 s injiziert. Anschließend erfolgte eine Dissoziation der Zinkionen im Messpuffer. Dargestellt sind repräsentative Sensorgramme aus mind. drei unabhängigen Messungen.

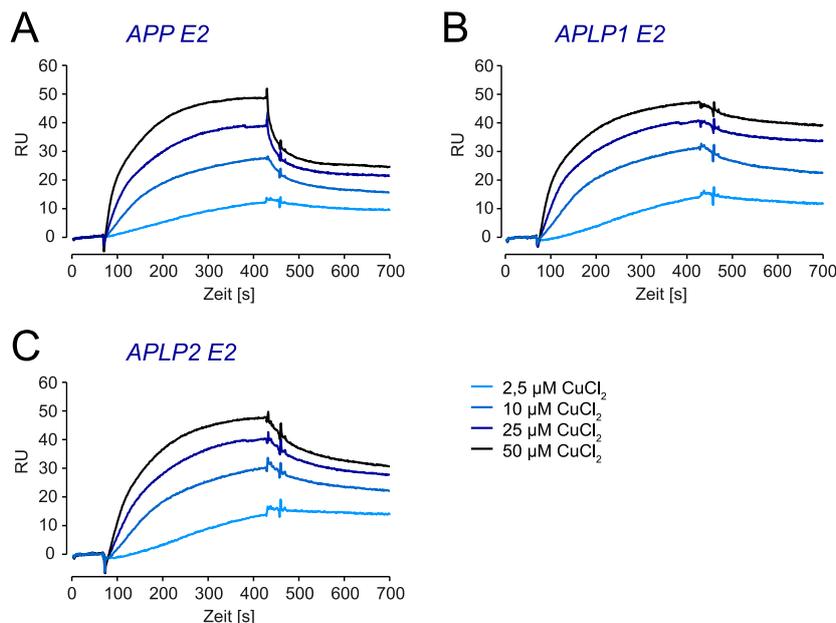


**Abbildung 2.15.: Bindung von Zink an APP, APLP1 und APLP2 E2 in Gegenwart von Citrat.** Bindungsanalysen von Zinkionen an immobilisierte E2-Domänen von APP (A), APLP1 (B) und APLP2 (C) in einem SPR-System. Zur Unterdrückung von schwachen Metall-Protein-Wechselwirkungen wurden die Messungen in Gegenwart von 20 mM Citrat durchgeführt. Lösungen mit unterschiedlichen Zinkkonzentrationen wurden für 300 s injiziert. Anschließend erfolgte eine Dissoziation der Zinkionen im Messpuffer. Dargestellt sind repräsentative Sensorgramme von mind. drei unabhängigen Messungen.

## 2.4. Untersuchung der Metallbindungseigenschaften der E2-Domäne

### 2.4.5. Untersuchung der Bindung von Kupferionen an die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2

Um zu untersuchen, ob die E2-Domänen von APLP1 und APLP2 ebenfalls Kupfer binden oder ob eine Kupferbindung nur an die E2-Domänen von APP erfolgt, wurden SPR-Messungen der rekombinanten Proteine mit Kupferionen durchgeführt.



**Abbildung 2.16.: Bindung von Kupfer an APP, APLP1 und APLP2 E2.** Bindungsanalysen von Kupferionen an immobilisierte E2-Domänen von APP (A), APLP1 (B) und APLP2 (C) in einem SPR-System. Lösungen mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen wurden für 300 s injiziert. Anschließend erfolgte eine Dissoziation der Kupferionen im Messpuffer. Dargestellt sind repräsentative Sensorgramme von mind. drei unabhängigen Messungen.

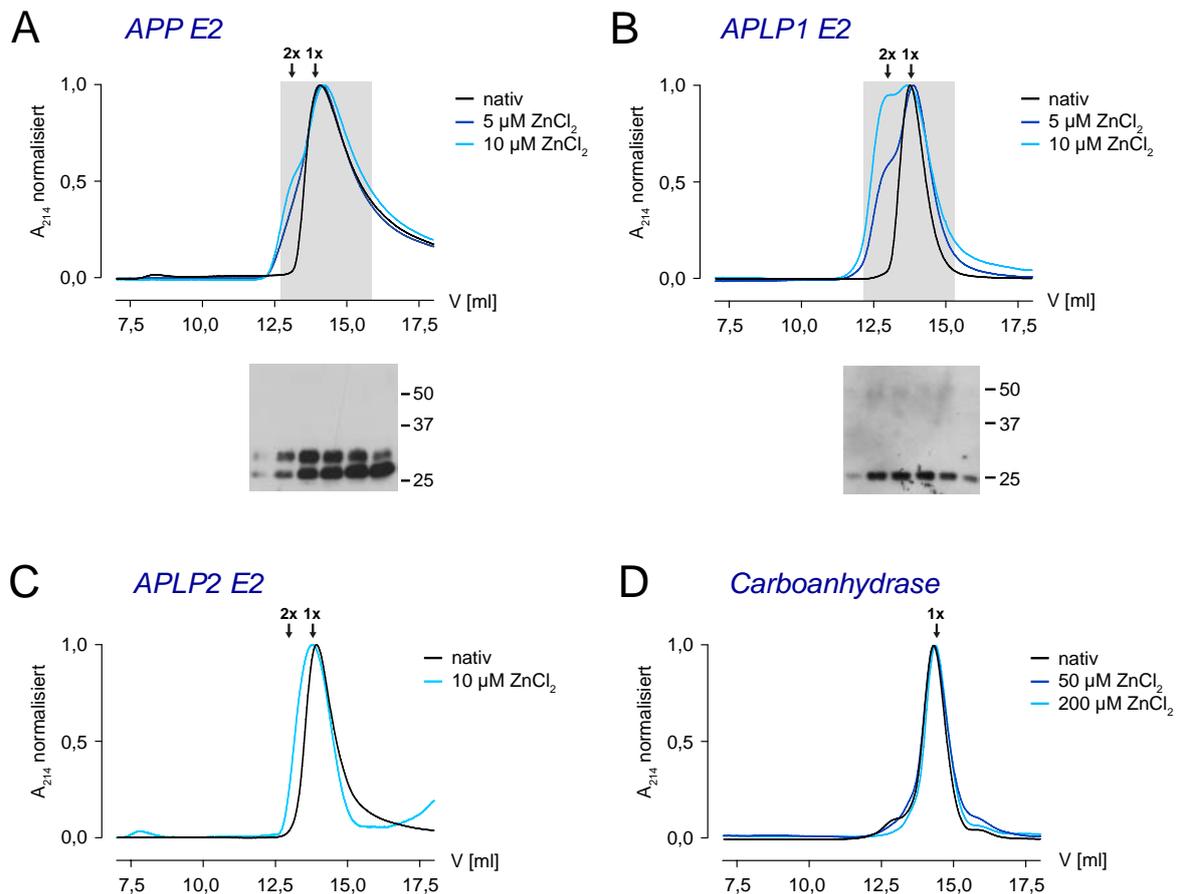
Alle rekombinanten E2-Proteine banden Kupfer und zeigten eine ähnliche Assoziationskurve. Die Kurve wies keine einfache Assoziationskinetik auf (auffällig ist insbesondere der sigmoidale Kurvenverlauf bei 2,5 µM CuCl<sub>2</sub> in Abbildung 2.16). Dies lässt wiederum auf Konformationsänderungen der E2-Domäne durch die Kupferbindung schließen. Auffällig ist, dass sich die Kurven in der Dissoziation des Kupfers unterscheiden. Bei APLP2 und insbesondere APLP1 ist eine langsamere Dissoziation zu beobachten als bei APP, was auf eine stärkere Kupferbindung an APLP1 E2 und APLP2 E2 als an die E2-Domäne von APP schließen lässt.

### 2.4.6. Einfluss von Zink auf die Oligomerisierung der E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2.

Da sich die Bindung von Zink an die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2 nicht unterscheidet, wurde untersucht, ob Zink direkt die Oligomerisierung der E2-Domänen beeinflusst.

## 2. Ergebnisse

Hierzu wurden SEC-Spektren der nativen Proteine aufgenommen und mit den Chromatogrammen der Proteine in Gegenwart von Zink verglichen. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Zinkbindung einen Einfluss auf die Oligomerisierung eines anderen Zink-bindenden Proteins mit ähnlichem Molekulargewicht, der Carboanhydrase, hat (Abbildung 2.17).



**Abbildung 2.17.: Zink induziert die Bildung von stabilen APP E2 und APLP1 E2 Dimeren.** SEC-Chromatogramme von APP E2 (A), APLP1 E2 (B), APLP2 E2 (C) und Carboanhydrase (D) mit und ohne Zink. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Spektren auf den jeweils höchsten Wert der Kurve normiert. Für Western-Blot-Analysen wurden die Peakfraktionen des Laufs mit der höchsten Zinkkonzentration verwendet, APP E2: 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  (Nachweis mit DCRS-Antiserum), APLP1 E2: 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  (DCRY). Gezeigt sind repräsentative Chromatogramme aus mind. drei unabhängigen Messungen.

Die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2 eluieren jeweils in einem einzelnen „Peak“ von der Größenausschluss säule bei einem Molekulargewicht, das der monomeren Form der E2-Domäne entspricht (vgl. Abschnitt 2.4.1). Nach Inkubation der E2-Domänen mit niedrigen mikromolaren Zinkkonzentrationen wurde ein zweiter „Peak“ in den Chromatogrammen von APLP1 E2 und APP E2 beobachtet. Die Proteine in diesem zweiten „Peak“ eluieren bei einem Volumen, das dem Molekulargewicht des Dimers entspricht. Dieser zweite „Peak“ trat nicht in den Chromatogrammen der Carboanhydrase und des APLP2 E2 auf, selbst nach

#### 2.4. Untersuchung der Metallbindungseigenschaften der E2-Domäne

Erhöhung der Zinkkonzentration auf 200  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  im Ansatz der Carboanhydrase. Zugabe hoher Zinkkonzentrationen zu APLP2 E2 führte nicht zur Bildung eines zweiten Peaks, jedoch zu partieller Präzipitation des Proteins (Daten nicht gezeigt).

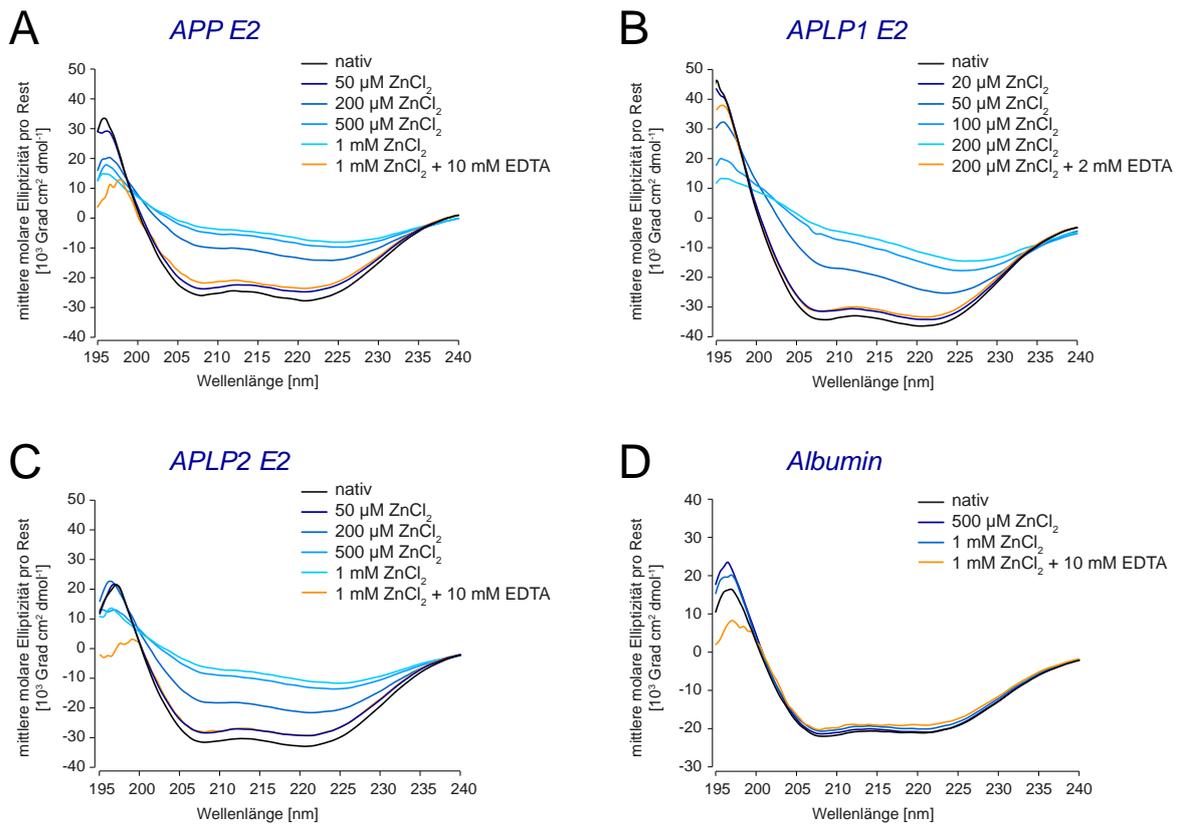
In Western-Blot-Analysen wurden die E2-Domänen jeweils nur in monomerer Form detektiert, wobei bei APLP1 E2 zusätzlich eine sehr schwache Dimerbande auftrat. Diese trat jedoch auch ohne Zink auf und war nicht spezifisch für den Ansatz von APLP1 E2 mit Zink. Die Zink-induzierte dimere Form kann durch SDS-PAGE und Western-Blot offenbar nicht detektiert werden, da die Zinkbindung mit einer schnellen Assoziation und Dissoziation sehr dynamisch ist (Abbildung 2.14), sodass die Dimere nach Verdünnen des Zinks schnell wieder monomerisieren.

Eine höhere Oligomerisierung der E2-Domänen in Gegenwart von Zink wurde durch die Aufnahme von Circular dichroismus (CD)-Spektren bei ansteigender Zinkkonzentration verfolgt (Abbildung 2.18). Alle rekombinanten E2-Domänen sowie das Metalloprotein Albumin zeigen im nativen Zustand Spektren, die auf einen sehr hohen Anteil von  $\alpha$ -Helices an der Sekundärstruktur schließen lassen. Dies stimmt mit den gemessenen Kristallstrukturen der E2-Domänen aus der APP-Familie überein (*Wang und Ha, 2004; Hoopes et al., 2009; Lee et al., 2011*).

Die Zugabe von Zink führte bei den E2-Domänen, jedoch nicht bei Albumin, zu einer Verflachung des ersten Minimums und Verschiebung des zweiten Minimums zu höheren Wellenlängen. Damit einher ging eine Trübung der Proteinlösung bei hohen Zinkkonzentrationen, was auf die Bildung von Proteinaggregaten durch Zinkzugabe schließen lässt. Die hier erhaltenen Spektren in Gegenwart hoher Zinkkonzentrationen sind typisch für  $\alpha$ -helikale Aggregate oder Fasern (*Pandya et al., 2000; Potekhin et al., 2001*). Dieser Effekt wird bei APLP1 E2 bei geringeren Zinkkonzentrationen induziert im Vergleich zu APP E2 und APLP2 E2, wobei die hierfür benötigten Zinkkonzentrationen etwa eine Größenordnung höher sind als bei der Bildung von APP und APLP1 E2-Dimeren, die durch SEC gezeigt wurde (Abbildung 2.17).

Aus den SPR-Analysen und den Oligomerisierungsstudien ergeben sich folgende Schlussfolgerungen: Die direkte Bindung von Zinkionen an die rekombinanten E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2 unterscheidet sich nicht. Zink induziert jedoch ein unterschiedliches Dimerisierungs- und Aggregationsverhalten. APP E2 und APLP1 E2 bildeten bei niedrigen Zinkkonzentrationen in der SEC Dimere, wohingegen dies für APLP2 E2 nicht beobachtet werden konnte. Dies kann das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten der Vollständigproteine APP, APLP1 und APLP2 erklären (Abschnitt 2.2.4). Auffällig ist hierbei, dass die

## 2. Ergebnisse



**Abbildung 2.18.: Zink induziert Oligomerisierung und Aggregation der E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2.** CD-Spektren von APP E2 (A), APLP1 E2 (B), APLP2 E2 (C) und Albumin (D) vor und nach Zugabe von Zinkchlorid und EDTA in den angegebenen Konzentrationen. Dargestellt sind repräsentative Spektren von mind. vier unabhängigen Messungen.

## 2.5. Einfluss von Zink auf die *trans*-Oligomerisierung von APLP1

Dimerisierung der E2-Domänen von APP und APLP1 bei etwa der gleichen Zinkkonzentration induziert wird wie die Oligomerisierung der Volllängenproteine. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass das Clustern und die Oligomerisierung der Volllängenproteine primär durch die E2-Domäne vermittelt werden.

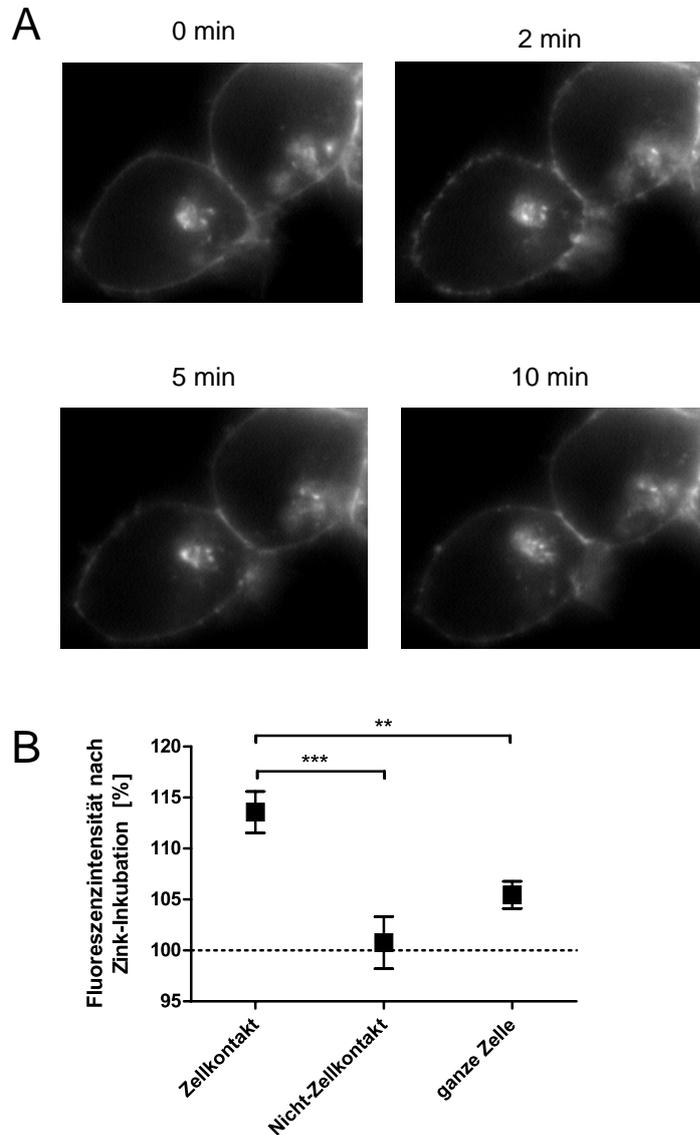
Eine höhere Oligomerisierung der E2-Domänen allein konnte ebenfalls beobachtet werden, jedoch bei höheren Zinkkonzentration als bei der Bildung von E2-Dimeren von APP und APLP1. Dies resultiert möglicherweise aus der Bindung von Zink an andere, schwächere, Zinkbindungsstellen in der E2-Domäne, die weitere intermolekulare Kontakte ermöglichen und sich bezüglich ihrer Affinität zwischen APP und APLP1 unterscheiden.

## 2.5. Einfluss von Zink auf die *trans*-Oligomerisierung von APLP1

Proteine der APP-Familie können neben der *cis*-Dimerisierung auch in *trans*-Orientierung Dimere bilden und dadurch interzelluläre Kontakte ausbilden (Soba *et al.*, 2005; Kaden *et al.*, 2009). Damit zusammenhängend schlagen Wang *et al.* (2009) eine mögliche Funktion von APP als synaptisches Adhäsionsmolekül (SAM) vor, die auch APLP1 und APLP2 einschließen könnte. Es ist jedoch unklar, ob dies eine konstitutive Funktion der Proteine ist, oder ob die *trans*-Interaktion ein dynamischer Prozess ist, der durch intra- oder extrazelluläre Stimuli reguliert wird. Um zu untersuchen, ob Zink neben dem zuvor beschriebenen Einfluss auf die *cis*-Dimerisierung auch einen Einfluss auf die *trans*-Interaktion von APLP1 in Zellkontaktbereichen hat, wurde die Fluoreszenzintensität von APLP1-YFP in Zellkontakten nach Zinkzugabe untersucht (Abbildung 2.19).

Zugabe von extrazellulärem Zink führte zu einer deutlich sichtbaren Anreicherung von APLP1-YFP in Zellkontaktbereichen im Vergleich zu anderen subzellulären Bereichen.

## 2. Ergebnisse



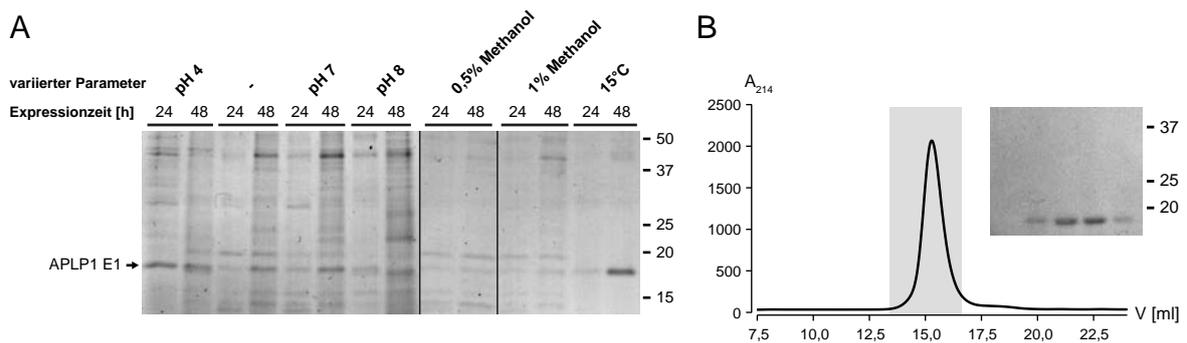
**Abbildung 2.19.: Zink induziert APLP1-Lokalisation in Zellkontakten.** (A) Epifluoreszenzbilder von APLP1-YFP exprimierenden HEK293-Zellen während Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  zum Messpuffer der lebenden Zellen; 0 min entspricht dem Zeitpunkt unmittelbar vor Zinkapplikation. (B) Quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten in Zell- bzw. Nichtzellkontaktbereichen und der ganzen Zelle 20 min nach Zinkzugabe. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von  $n=34$  Zellen (\*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; Welch's t-test)

## 2.6. Expression und Oligomeranalyse der E1-Domäne von APLP1

Es ist bekannt, dass APLP1 auch Zink-unabhängig dimerisiert (*Soba et al.*, 2005; *Kaden et al.*, 2009). Jedoch ist bislang unklar, welcher Bereich von APLP1 homophile Kontakte im Zink-unabhängigen APLP1-Dimer vermittelt. *Soba et al.* (2005) zeigten eine maßgebliche Rolle der E1-Domäne bei der Dimerisierung von APLP1, wobei andere Untersuchungen eine Dimerisierung über die E2-Domäne nahe legen (*Kaden et al.*, 2009). Die zuvor durchgeführten *in vitro* Analysen mit rekombinantem APLP1 E2 sprechen gegen eine Dimerisierung des Volllängenproteins über die E2-Domäne (Abbildung 2.17). Dies wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass bei den E2-Deletionsmutanten kein deutlich verringertes FRET-Signal gegenüber dem Volllängenprotein beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).

### 2.6.1. Expression der E1-Domäne von APLP1

Um eine mögliche Dimerkontaktstelle in der E1-Domäne von APLP1 zu identifizieren, wurde die E1-Domäne heterolog in *Pichia* exprimiert. Es wurden verschiedene Parameter bei der *P. pastoris*-Kultivierung variiert, um geeignete Expressionsbedingungen zu finden (Abbildung 2.20A). Eine Verringerung der Temperatur auf 15°C während der Expression führte zu einer drastischen Steigerung der Ausbeute und Reinheit des exprimierten APLP1 E1 gegenüber den Standardbedingungen.



**Abbildung 2.20.: Expression und Oligomeranalyse von APLP1 E1.** (A) Analyse unterschiedlicher Expressionsbedingungen für die Expression von APLP1 E1; SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung der Kulturüberstände aus *P. pastoris*. Angegeben sind Variationen der Standardparameter  $T=29^{\circ}C$ , pH 6,0, 2% Methanol. (B) SEC-Analyse des aufgereinigten APLP1 E1 auf einer Superose12-Säule und SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung der Peakfraktionen (grauer Hintergrund).

## 2. Ergebnisse

### 2.6.2. Untersuchung der Oligomerisierung von APLP1 E1

Das aufgereinigte Protein wurde durch SEC auf seinen Oligomerisierungszustand untersucht. Das Expressionskonstrukt hat als Monomer ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 19,5 kDa. Die E1-Domäne von APLP1 eluierte in einem einzelnen Peak mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 23 kDa (Abbildung 2.20B), was auf ein E1-Monomer hinweist. Dieses Ergebnis spricht gegen eine Dimerkontaktstelle in der E1-Domäne von APLP1 und folglich für einen anderen Mechanismus der Dimerisierung als bei den Homologen APP und APLP2. Dies wird dadurch unterstützt, dass die beschriebene Dimerkontaktstelle in der E1-Domäne von APP nur schwach in APLP1 konserviert ist (*Dahms et al.*, 2010).

## 3. Diskussion

APP, APLP1 und APLP2 binden eine Vielzahl extrazellulärer Liganden, aber die funktionellen Konsequenzen dieser Interaktionen sind bislang weitestgehend unverstanden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Metallionen auf die Proteine der APP-Familie untersucht. Es zeigte sich, dass Zink direkt die Lokalisation der Proteine an der Zelloberfläche beeinflusst, indem es zur Bildung multimerer Komplexe in der Plasmamembran führt. Dabei stellt dieser Effekt keine Besonderheit der Membranumgebung von HEK293-Zellen dar, sondern tritt auch in primären Neuronen auf, in denen diese Proteine exprimiert werden. Die durch Zinkionen induzierte Oligomerisierung von APLP1 wird dabei maßgeblich durch eine bislang unbekannte Zinkbindungsstelle in der E2-Domäne vermittelt.

### 3.1. APP, APLP1 und APLP2 als Zink-abhängige Oligomere im Gehirn

Im Gehirn kommt Zink in zwei funktionell unterschiedlichen Formen vor, als freies und als an Proteine gebundenes Zink. Generell werden in Neuronen und auch in anderen eukaryotischen Zellen hohe intrazelluläre Zinkkonzentrationen im Bereich von 100-300  $\mu\text{M}$  gemessen (*Ehmann et al.*, 1984; *Krezel und Maret*, 2006). Der weitaus größte Anteil des Zinks ist als Kofaktor fest an Proteine gebunden und steht nicht für die Bindung an andere Proteine zur Verfügung. Die Konzentration von cytoplasmatischem „freiem“ Zink in Neuronen liegt daher mehrere Größenordnungen unter der Gesamtzinkkonzentration und wird auf ca. 1 nM geschätzt (*Krezel und Maret*, 2006). Im Gegensatz zu diesem als statisch bezeichneten Zinkpool können Zinkionen in verschiedenen Neuronen ähnlich wie Neurotransmitter in Vesikeln gespeichert und bei synaptischer Aktivität aus der Präsynapse ausgeschüttet werden (*Assaf und Chung*, 1984; *Sindreu und Storm*, 2011). Bei der Freisetzung von vesikulärem Zink in den synaptischen Spalt können extrazellulär somit sehr hohe Konzentrationen von bis zu 100  $\mu\text{M}$  „freiem“ Zink entstehen (*Sensi et al.*, 2011). Diesem reaktiven Zink wurde ursprünglich als Hauptfunktion die Modulation der Reizweiterleitung in glutamatergen Synapsen zugeschrieben, da Zink die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren beeinflusst (*Peters et al.*, 1987). Später

### 3. Diskussion

zeigte sich, dass Zinkvesikel auch in nicht-glutamatergen Synapsen vorkommen und Zink auch diverse andere neuronale Funktionen beeinflusst (*Lu et al.*, 2000; *Besser et al.*, 2009). Wie Zink die Physiologie und Struktur von Neuronen beeinflusst, ist bislang kaum verstanden (*Sindreu und Storm*, 2011).

Hier wurden die Proteine der APP-Familie als Bindungspartner von Zink in lebenden Zellen identifiziert. Anhand von FRET-Messungen und anderen fluoreszenzmikroskopischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die neuronal am stärksten exprimierten Isoformen von APP, APLP1 und APLP2 in Gegenwart von Zink höhere Oligomere bilden. Dabei wurden APP und APLP1 bereits in Gegenwart niedriger mikromolarer Zinkkonzentrationen geclustert, wohingegen APLP2 erst bei höheren Zinkkonzentrationen multimere Komplexe ausbildete. Eine Assoziation dieser Cluster mit cholesterolreichen Membrandomänen wurde nicht beobachtet. Eine Limitierung der hier beschriebenen Experimente ist, dass sie zum überwiegenden Teil in HEK293-Zellen durchgeführt wurden, welche nicht die Besonderheiten neuronaler Zellen aufweisen, in denen diese Proteine *in vivo* exprimiert werden, mit z.B. prä- und postsynaptischen Bereichen und der Spezialisierung dieser Zellen auf die Integration und Weiterleitung von Informationen. Es zeigte sich jedoch, dass dieser Clustereffekt auch in der Plasmamembran von Neuronen auftritt, so dass angenommen wird, dass sich die Ergebnisse aus dem hier verwendeten Modellsystem auf die Situation im Gehirn übertragen lassen.

Interessanterweise wurde ähnlich zu dem Effekt auf APP, APLP1 und APLP2 bereits ein Effekt von Zink auf die Oligomerisierung von anderen neuronalen Proteinen beschrieben, und zwar für Mitglieder der ProSAP/Shank Proteinfamilie (*Baron et al.*, 2006; *Grabrucker et al.*, 2011). Es wurde postuliert, dass ProSAP1/Shank2 und ProSAP2/Shank3 in Abhängigkeit von Zink ausgedehnte oligomere Proteinkomplexe an der Postsynapse bilden, welche die Struktur der postsynaptischen Dichte (PSD) beeinflussen und wichtig für die Synaptogenese und Stabilität von unreifen Synapsen sind (*Grabrucker et al.*, 2011). APP, APLP1 und APLP2 sind sowohl in präsynaptischen als auch in postsynaptischen Kompartimenten lokalisiert (*Kim et al.*, 1995; *Bayer et al.*, 1997; *Lyckman et al.*, 1998; *Hoe et al.*, 2008) und wären somit ebenfalls Bindungspartner für „freies“ Zink, das in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird. Daher könnte Zink generell eine strukturgebende Funktion an der Synapse ausüben, indem es verschiedene strukturelle Netzwerke stärkt, wie die ProSAP/Shank- und APP/APLP-Oligomerkomplexe.

Angesichts der unterschiedlichen Zinksensitivitäten würde man erwarten, dass sich in der neuronalen Membran vorwiegend APP- und APLP1-Oligomere und nur in geringem Maße APLP2-Oligomere bilden. Wie einleitend beschrieben, weisen APP, APLP1 und APLP2 jedoch unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen auf. APLP1 ist hauptsächlich in der Plas-

### 3.2. Die E2-Domäne als Sensor für Metallionen

mamembran lokalisiert, APLP2 kommt an der Plasmamembran und in intrazellulären Kompartimenten vor und APP wird vorwiegend in intrazellulären Kompartimenten exprimiert (Kaden *et al.*, 2009). In primären Neuronen ist endogenes APP fast ausschließlich im Golgi-Apparat und in späten Endosomen lokalisiert (Guo *et al.*, 2012). Daher werden sich in Gegenwart von Zink in der neuronalen Plasmamembran hauptsächlich Oligomere von APLP1 bilden und nur in geringem Maße APP-Oligomere. Bei höheren Zinkkonzentrationen würden sich auch APLP2-Oligomere ausbilden.

Ein weiteres Ergebnis ist, dass Zink ebenfalls die Bildung von heterooligomeren Komplexen in der Plasmamembran induzierte. Dabei reagierten APP:APLP1- und APLP1:APLP2-Heterooligomere um den Faktor 4-5 sensitiver auf Zink als APP:APLP2-Heterooligomere. Zudem konnte APLP1 die Zink-abhängige Oligomerisierung von APLP2 vermitteln. Die zentrale Bedeutung von APLP1 bei der Zink-abhängigen Oligomerisierung wird auch durch einen anderen Befund deutlich: Koexpression von APLP1 führt dazu, dass sich die Menge von APP an der Plasmamembran erhöht (Kaden *et al.*, 2009), sodass in Gegenwart von APLP1 mehr Zink-induzierte APP-Oligomere gebildet werden können. APLP1 scheint somit das zentrale Effektormolekül für extrazelluläres Zink in Neuronen zu sein, indem es zum Einen selbst in Abhängigkeit von Zink multimere Komplexe an der Plasmamembran bildet und zum Anderen die Menge Zink-induzierter Oligomere von APP und APLP2 an der Plasmamembran reguliert.

## 3.2. Die E2-Domäne als Sensor für Metallionen

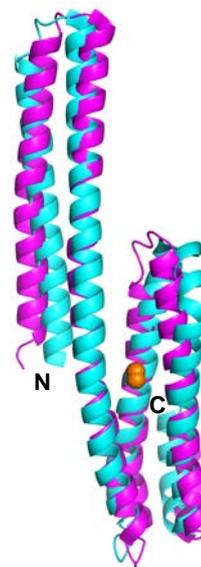
### 3.2.1. Lokalisation der Zinkbindungsstelle für die Zink-abhängige Oligomerisierung

Analysen mit APLP1-Deletionsmutanten ergaben, dass die Zink-induzierte Oligomerisierung von APLP1 nicht über die bekannte Zinkbindungsstelle in der E1-Domäne vermittelt wird (Bush *et al.*, 1994b), sondern durch eine zusätzliche Zinkbindungsstelle, die in der E2-Domäne entdeckt wurde. Die Deletion der E2-Domäne führte in den Messungen jedoch nicht zu einem vollständigen Verlust der Bildung von APLP1-Oligomeren, sondern nur zu einer Verringerung der Zink-Sensitivität um den Faktor 10.

Eine mögliche Erklärung für die Zink-induzierte Oligomerisierung der Deletionsmutante bei hohen Zinkkonzentrationen wäre das Vorhandensein von weiteren niedriger affinen Zinkbindungsstellen in APLP1, welche die Hauptbindungsstelle in der E2-Domäne ersetzen können. Eine andere denkbare Erklärung wäre ein allosterischer Effekt, indem durch den Verlust eines regulatorischen Bereichs in der E2-Domäne die Affinität einer Zinkbindungsstelle in einem

### 3. Diskussion

**Abbildung 3.1.: Vergleich der E2-Domänen von APP in metallfreier und Zink-gebundener Form.** Alignment der Röntgenkristallstrukturen von APP E2 ohne Metallionen nach Wang und Ha (2004), PDB-Eintrag 3NYL (pink), und von APP E2 mit gebundenem Zinkion (orange) nach Dahms et al. (2012), PDB-Eintrag 3UMI (türkis). Die Zink-gebundene Struktur wurde durch Kokristallisation von APP E2 mit Cadmiumionen und anschließendem „Soaken“ der Kristalle mit Zinkchlorid erhalten. Das hier dargestellte Zinkion ersetzte vollständig ein an dieser Stelle gebundenes Cadmiumion im Ausgangskristall. Eine zweite Zinkbindungsstelle, in der ein Cadmiumion partiell durch Zink ersetzt wurde, befindet sich im C-terminalen Bereich der Domäne.

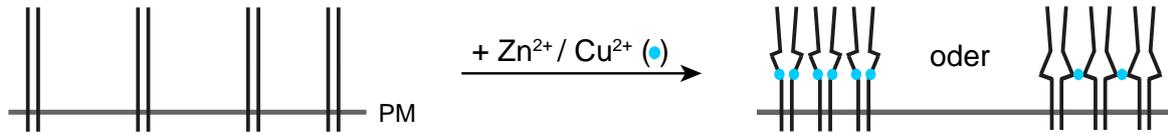


anderen Bereich des Proteins modifiziert werden könnte. Dieser Hypothese widerspricht jedoch, dass die Deletion anderer Bereiche des Proteins keinen Einfluss auf die Zink-abhängige Oligomerisierung hatte. Außerdem wurde *in vitro* gezeigt, dass die rekombinante E2-Domäne von APLP1 direkt Zink bindet, was unmittelbar zu einer Dimerisierung der Domäne führte. Diese Befunde legen nahe, dass die Zinkbindung und Oligomerisierung von APLP1 direkt über die E2-Domäne vermittelt wird und die Bindungsstelle in der E2-Domäne bei hohen Zinkkonzentrationen durch andere, schwächere Bindungsstellen ersetzt werden kann.

#### 3.2.2. Konformationsänderungen in der E2-Domäne durch die Bindung von Metallionen

Die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2 banden *in vitro* Zink- und Kupferionen in niedrigen mikromolaren Konzentrationen, was mit strukturellen Änderungen der E2-Domänen einherging, die sich in den SPR-Analysen zeigten. Dies ist im Einklang mit Kristallisationsstudien der E2-Domäne von APP in Gegenwart von Metallionen (Dahms et al., 2012). Die E2-Domäne von APP weist in Zink- und Kupfer-gebundener Form eine etwas kompaktere Gesamtstruktur im Vergleich zu der metallfreien E2-Struktur auf (Wang und Ha, 2004; Dahms et al., 2012), wobei die N-terminale Helix sich näher an der zentralen Helix befindet (Abbildung 3.1). Die Struktur wird durch die Metallbindung insgesamt rigider, worauf auch der deutlich verringerte *B*-Faktor für das gesamte Protein in den Metall-gebundenen Strukturen hindeutet (Dahms et al., 2012). Um die Struktur der Zink-gebundenen E2-Domäne von APLP1 zu charakterisieren, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Manuel Than (Leibniz Institute for Age Research, Jena) die E2-Domäne von APLP1 kristallisiert

### 3.2. Die E2-Domäne als Sensor für Metallionen



**Abbildung 3.2.: Modell zur Oligomerisierung von APP und APLP1.** Unter nativen Bedingungen liegen APP und APLP1 vorwiegend als Homo- oder Heterodimere in der Membran vor. Bindung von extrazellulärem Zink oder Kupfer führt zur Ausbildung weiterer homophiler Kontakte, so dass sich die Dimere zu höheren oligomeren Komplexen zusammenlagern. Dabei führt die Bindung der Metallionen zu strukturellen Änderungen in der E2-Domäne, was zur Ausbildung einer neuen homophilen Interaktionsfläche führen könnte. Alternativ könnte ein Metallion direkt durch zwei benachbarte APP/APLP1-Moleküle komplexiert werden und dadurch einen intermolekularen Kontakt herstellen. PM: Plasmamembran

und vermessen. Die Kristallisation gelang kürzlich auch einer anderen Arbeitsgruppe (Lee *et al.*, 2011). Versuche, die APLP1 E2-Kristalle mit zinkhaltiger Lösung zu „soaken“, um die Zinkbindungsstelle auf molekularer Ebene sichtbar zu machen, schlugen bislang fehl, da der Kristall durch das „Soaken“ zerstört wurde. Vermutlich sind die durch die Bindung der Zinkionen ausgelösten Konformationsänderungen in der Proteindomäne so stark, dass die Ordnung der Proteine und somit der Kristall dabei zerstört wurde.

In chromatographischen Analysen zeigte sich, dass durch die strukturellen Änderungen eine Dimerisierung der E2-Domänen von APP und APLP1 ausgelöst wird. APP, APLP1 und APLP2 liegen in lebenden Zellen bereits überwiegend als Homo- oder Heterodimere in Abwesenheit von Zink oder Kupfer vor (Soba *et al.*, 2005; Munter *et al.*, 2007; Kaden *et al.*, 2009). Quantitativen Analysen mit FLIM-FRET („fluorescence lifetime imaging microscopy“) zufolge liegt APP in der Zelle zu 60-70% als Dimer und zu 30-40% als Monomer vor, wobei der Anteil von dimerem APP in der Plasmamembran höher ist und ca. 90% beträgt (Gralle *et al.*, 2009). Durch die neue Dimerisierungsstelle in der E2-Domäne werden die vorhandenen APP- und APLP1-Dimere in Gegenwart von Zink oder Kupfer zu höheren Oligomeren komplexiert (Abbildung 3.2). Dies könnte durch zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen: Zum Einen könnte im Zuge der ausgelösten strukturellen Änderungen eine neue homophile Interaktionsstelle entstehen. Zum Anderen könnten zwei APP/APLP1-Moleküle direkt über ein Zink- oder Kupferion verknüpft werden (Abbildung 3.2).

In der E2-Domäne von APLP2 werden durch die Metallbindung zwar strukturelle Änderungen ausgelöst, diese führen aber nicht unmittelbar zu einer Dimerisierung der E2-Domäne und Oligomerisierung des Volllängenproteins bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen. Hier wird somit keine Interaktionsstelle ausgebildet bzw. die Komplexierung eines Metallions durch zwei benachbarte APLP2-Moleküle ist sterisch behindert. Allerdings wurde bei höheren Zinkkonzentrationen die Bildung von  $\alpha$ -helikalen Multimeren/Aggregaten der E2-Domäne

### 3. Diskussion

beobachtet. Dies könnte im Zusammenhang mit der Besetzung schwacher intermolekularer Metallbindungsstellen stehen, die auch bei der Kristallisation der E2-Domäne von APP in Gegenwart hoher Cadmiumkonzentrationen beobachtet wurden (*Dahms et al.*, 2012). Alternativ könnte die Zink-abhängige Oligomerisierung von APLP2 bei hohen Zinkkonzentrationen durch andere Bereiche des Proteins vermittelt werden, analog zu der APLP1 $\Delta$ E2-Mutante. Durch die Metall-induzierten Konformationsänderungen könnten sich auch die Bindungseigenschaften der E2-Domäne für weitere Liganden ändern. Tatsächlich beschrieben *Ho und Südhof* (2004), dass die Bindung von F-Spondin an die E2-Domäne von APP in Gegenwart des Metallionen-Chelators EGTA *in vitro* stark verringert war. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die von ihnen verwendete rekombinante E2-Domäne eingangs in Zink- oder Kupfer-gebundener Form vorlag.

#### 3.2.3. Zink-abhängige Oligomerisierung von APLP1 über eine neue Zinkbindungsstelle in der E2-Domäne

Im C-terminalen Bereich der E2-Domäne von APLP1 wurde in dieser Arbeit eine neue Zinkbindungsstelle identifiziert, die von den vier Histidinen His430, His433, His450 und His452 gebildet wird. Diese Metallbindungsstelle vermittelt die Zink-abhängige Oligomerisierung des Volllängenproteins. Die Punktmutation der vier Histidinreste verringerte die Zinksensitivität des Volllängenproteins um den gleichen Faktor wie die Deletion der vollständigen E2-Domäne mit oder ohne der angrenzenden juxtamembranen Region.

Aus der Kristallstruktur von APLP1 E2 in Abwesenheit von Metallionen ergibt sich für die identifizierten Aminosäuren keine offensichtliche Metallbindungsstelle (*Lee et al.*, 2011). Die Histidinreste befinden sich zwar in räumlicher Nähe, sind jedoch nicht zueinander orientiert, sodass die Bindung von Metallionen mit strukturellen Änderungen einher gehen müsste.

Die hier identifizierte Zinkbindungsstelle in der E2-Domäne von APLP1 überlappt teilweise mit der Zinkbindungsstelle in der E2-Domäne von APP (*Dahms et al.*, 2012). Das Zinkion im APP-Kristall wird unter anderem von His436 (His531 in APP<sub>770</sub>) gebunden, das als His430 in APLP1 konserviert ist. Weitere Übereinstimmungen in der Zinkbindungsstelle treten jedoch nicht auf. Im Sequenzvergleich wird deutlich, dass die Histidinreste an den Positionen 430, 433 und 452 von APLP1 in APP und APLP2 konserviert sind, wohingegen His450 als Methioninrest in APP und APLP2 vorliegt (Abbildung 2.10). FRET-Analysen mit Punktmutanten zeigten, dass His450 an der Zink-vermittelten Oligomerisierung von APLP1 beteiligt ist. Das impliziert, dass an der Zink-vermittelten Oligomerisierung von APP, welche bei den gleichen Zinkkonzentrationen vermittelt wird wie bei APLP1, möglicherweise auch andere Bereiche der Domäne beteiligt sind als bei APLP1, da hier ein wichtiger Aminosäurerest der

### 3.3. APP und APLPs als Zink-abhängige Proteine der extrazellulären Matrix

Zinkbindungsstelle von APLP1 nicht vorhanden ist.

Evolutionär betrachtet ist *APLP1* vermutlich das jüngste Gen, das von *APLP2* durch ein Genduplikationsevent getrennt wurde (vgl. Abschnitt 1.3). Viele Befunde weisen darauf hin, dass APP und APLP2 miteinander funktionell stärker vernetzt sind als mit APLP1. Einen Hinweis darauf liefert die höhere Aminosäuresequenzidentität zwischen APP und APLP2 mit 68% gegenüber 55-60% zu APLP1 (*Walsh et al.*, 2007). Außerdem haben APP und APLP2 funktionelle Gemeinsamkeiten, die nicht von APLP1 ersetzt werden können, wie z.B. eine Funktion beim Export von intrazellulären Kupferionen (*Treiber et al.*, 2004) und Regulation der Differenzierung neuronaler Stammzellen zu kortikalen Neuronen (*Shariati et al.*, 2013). Im Gegensatz zu den APP-/APLP2-spezifischen Funktionen wird die in dieser Arbeit beschriebene Zinksensorfunktion maßgeblich von APLP1 ausgeübt, da APP in Neuronen fast ausschließlich intrazellulär vorliegt und APLP2 eine deutlich geringere Zinksensitivität hat als APLP1. Die Bildung eines neuen Histidinrests in der APLP1-Sequenz während der Evolution ist ein Hinweis darauf, dass sich APLP1 unter den Proteinen der APP-Familie auf die Bindung von extrazellulärem Zink spezialisiert hat.

Daher postuliere ich, dass APLP1 im physiologischen Kontext den wichtigsten Zinkrezeptor der APP-Familie darstellt.

### 3.3. APP und APLPs als Zink-abhängige Proteine der extrazellulären Matrix

Wie einleitend beschrieben, wird APP, APLP1 und APLP2 eine Beteiligung an der extrazellulären Matrix im Gehirn zugeschrieben. Bereits *Bush et al.* (1994b) zeigten, dass die Bindung von Heparin an APP, APLP1 und APLP2 durch Zink verstärkt wird und wiesen diesen Effekt der E1-Domäne zu, die sowohl die niedrig affine Heparinbindungsstelle als auch die von ihnen postulierte Zinkbindungsstelle enthält. *Xue et al.* (2011) zeigten kürzlich, dass Heparin ein rekombinantes Protein mit der E2-Domäne von APLP1 dimerisieren kann, und dass die Heparinbindung unter Anderem über die Histidinreste 430 und 433 erfolgt, die in dieser Arbeit als Teil der Zinkbindungsstelle in der E2-Domäne identifiziert wurden. Daher könnte der von *Bush et al.* (1994b) beschriebene Effekt von Zink auf die Heparinbindung von APLP1, und möglicherweise auch von APP und APLP2, nicht durch die E1-Domäne, sondern durch die in dieser Arbeit charakterisierte Zinkbindungsstelle in der E2-Domäne vermittelt werden. Außerdem ergibt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit und der von *Xue et al.* (2011), dass der C-terminale Bereich der E2-Domäne eine zentrale Regulationsstelle für die Liganden-abhängige Oligomerisierung von APLP1 darstellt.

### 3. Diskussion

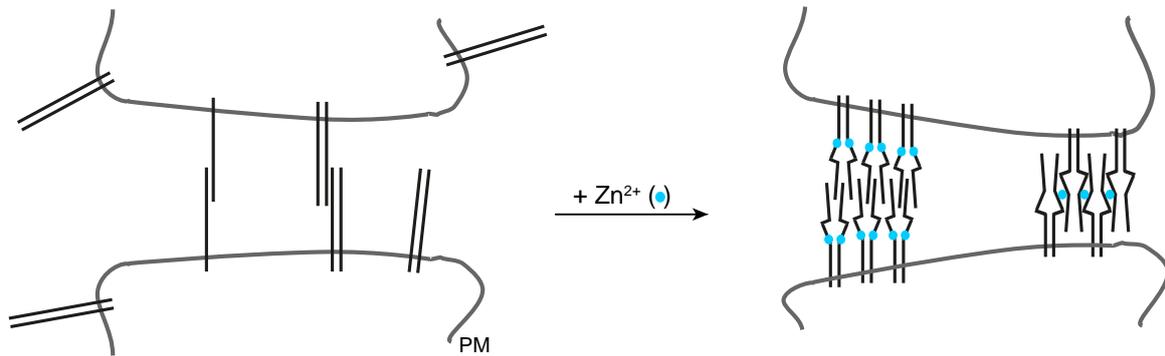
Interessanterweise können einige Proteine der extrazellulären Matrix in nicht-neuronalen Geweben durch Zink dimerisiert/oligomerisiert werden, was deren Bindung an andere Komponenten der Matrix beeinflusst (*Dugan et al.*, 2003; *Graille et al.*, 2010). Eine modulatorische Rolle von Zink auf Proteine der extrazellulären Matrix im Gehirn wurde bislang nicht beschrieben, wobei gerade hier lokal sehr hohe Zinkkonzentration erreicht werden. Eine Verknüpfung der extrazellulären Matrix mit der Zinkphysiologie des Gehirns könnte nach den hier dargestellten Ergebnissen von den Proteinen der APP-Familie vermittelt werden, insbesondere von APLP1. Daher wäre es interessant, die Beteiligung von APLP1 an der extrazellulären Matrix des Gehirns näher zu untersuchen und die Rolle der Zinkbindung und der dadurch ausgelösten Oligomerisierung in diesem Zusammenhang zu analysieren.

Ebenfalls kaum verstanden ist die Bedeutung der L-APP und L-APLP2-Isoformen, die mit einer Chondroitin-Sulfat-Glykosaminoglykan-Kette modifiziert sind und im Gehirn hauptsächlich von Astrozyten exprimiert werden (*Sandbrink et al.*, 1994a,b; *Shioi et al.*, 1995). Diese enthalten ebenfalls die E2-Domäne mit der hier charakterisierten Zinkbindungsstelle und könnten im Gehirn die extrazelluläre Matrix mit der Zinkphysiologie verbinden, indem sie einerseits die Konzentration von freien extrazellulären Zinkionen regulieren und andererseits selbst durch Zink moduliert werden könnten. Es wäre daher ebenfalls interessant, den Einfluss von Zinkionen auf die Oligomerisierung von L-APP und L-APLP2 und die Auswirkungen der Oligomerisierung auf deren Funktion in der extrazellulären Matrix des Gehirns zu untersuchen.

### 3.4. APP und APLPs als synaptische Adhäsionsproteine

Mehrere Studien legen eine mögliche Funktion von APP, APLP1 und APLP2 bei der Ausbildung von Kontakten zwischen benachbarten Zellen nahe. Bei Überexpression von APP, APLP1 oder APLP2 ist eine verstärkte Aggregation von *Drosophila* Schneider-Zellen zu beobachten, wobei dieser Effekt bei APLP1 und APLP2-Überexpression im Vergleich zur APP-Überexpression sehr viel stärker ausfällt (*Soba et al.*, 2005). Eine direkte Interaktion von Proteinen der APP-Familie in *trans*-Orientierung konnte in Säugetierzellen jedoch nur für APLP1 nachgewiesen werden, was möglicherweise mit der geringeren Expression von APP und APLP2 an der Plasmamembran im Zusammenhang steht (*Kaden et al.*, 2009). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die laterale Diffusion der APLP1-Moleküle in den Zellkontaktbereichen verringert ist, was darauf hindeutet, dass APLP1 an der Stabilisierung der interzellulären Kontakte beteiligt ist (*Kaden et al.*, 2009). Außerdem legen Studien mit konditionellen „knock-outs“ von APP in der Prä- oder Postsynapse der neuromuskulären Endplatte

### 3.4. APP und APLPs als synaptische Adhäsionsproteine



**Abbildung 3.3.: Modell zur *trans*-Oligomerisierung von APLP1.** Unter nativen Bedingungen liegt APLP1 als Dimer in *cis*- und *trans*-Orientierung in der Membran vor. Es ist unklar, ob *trans*-Oligomere durch Assoziation von monomeren oder dimeren APLP1-Molekülen gebildet werden. Bindung von extrazellulärem Zink führt zur Bildung höherer oligomerer APLP1-Komplexe, die in Zellkontaktbereichen angereichert werden. Dies geschieht mutmaßlich durch die Bildung von *trans*-Oligomeren. Dies könnte durch strukturelle Änderungen des Proteins bei der Zinkbindung oder durch direkte Komplexierung zweier APLP1-Moleküle über Zink vermittelt werden. PM: Plasmamembran

auf einem APLP2<sup>-/-</sup>-Hintergrund nahe, dass APP und APLP1 dort homo- und heterophile transsynaptische Kontakte ausbilden und dadurch die Morphologie der Synapse beeinflussen können (Wang *et al.*, 2009).

Eine Frage, die in diesen Studien nicht beantwortet werden konnte, ist, ob APLP1 eine konstitutive Funktion in der Vermittlung von Zellkontakten hat, oder ob die Zelladhäsionsfunktion durch Liganden reguliert wird. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Zink neben der Induktion der *cis*-Oligomerisierung die Anreicherung von APLP1 in Zellkontaktbereichen bewirkt. Dies weist darauf hin, dass APLP1-Moleküle durch *trans*-Kontakte festgehalten werden und spricht dafür, dass APLP1 ein dynamisches Adhäsionsprotein ist, das durch Stimuli Zellkontakte bzw. synaptische Kontakte verstärken kann (Abbildung 3.3).

Dabei ist ähnlich wie bei der *cis*-Oligomerisierung unklar, ob die *trans*-Oligomere durch strukturelle Änderungen nach der Zinkbindung oder durch Komplexierung gegenüberliegender Moleküle durch Zinkionen entstehen. Der zweite Fall würde implizieren, dass die APLP1-Komplexe nur in engen Bereichen der Synapse entstehen können, da der durchschnittliche Abstand zwischen der Prä- und Postsynapse dafür zu groß wäre. Die durchschnittliche Größe des synaptischen Spaltes beträgt im Hippocampus 15-25 nm, wobei er sich in schmalen Bereichen auf unter 6 nm verengen kann (Rusakov und Kullmann, 1998; Zuber *et al.*, 2005). Röntgenstreuungsanalysen (SAXS) und Modellierungen der APP-Ektodomäne ergaben, dass der C-terminale Bereich der E2-Domäne von APP ca. 5 nm von der Plasmamembran entfernt liegt (Gralle *et al.*, 2006). Wenn man dies auf die Zink-abhängige Oligomerisierung von APLP1 anwendet, ergibt sich, dass der Abstand der Zellen bei einer *trans*-Dimerisierung

### 3. Diskussion

durch die E2-Domäne etwa 10 nm betragen kann, sodass APLP1 *trans*-Oligomere nur in engen Bereichen der Synapse auftreten könnten. Denkbar wäre jedoch auch, dass sich die strukturellen Änderungen bei der Zinkbindung auf weiter N-terminal gelegene Bereiche des Proteins auswirken, sodass auch größere Abstände im synaptischen Spalt überbrückt werden könnten.

In anderen Experimenten zeigte sich, dass durch die Zink-induzierte Oligomerisierung von APLP1 und APLP2 auch deren Prozessierung beeinflusst wird. In Gegenwart von Zink wird eine verringerte sAPLP1-Produktion und, schwächer ausgeprägt, eine verringerte sAPLP2-Produktion beobachtet (*Schauenburg*, unveröffentlichte Ergebnisse). Dies zeigt einerseits, dass die Zinkbindung die Konzentration der APLP-Ektodomänen beeinflusst, die an der Regulation der Morphologie und Physiologie von Neuronen beteiligt sind. Andererseits vermittelt Zink gleichzeitig eine Stabilisierung von APLP-Oligomeren und der von APLPs ausgebildeten Zellkontakte, indem es das „ectodomain shedding“ reduziert.

Die dadurch erhöhte Stabilität der Vollängenproteine unterstützt die Hypothese, dass APLP1 eine Funktion als Zink-abhängiges dynamisches Adhäsionsmolekül im zentralen Nervensystem ausübt. Diese Funktion wird vermutlich nicht von APP ersetzt werden können, da es hauptsächlich in intrazellulären Kompartimenten vorliegt. APLP2 hat zwar eine geringere Zinksensitivität, liegt aber auch zu einem gewissen Anteil an der Plasmamembran vor, so dass es möglicherweise als „Backup“ die Funktion von APLP1 ersetzen könnte. Dies könnte die schwachen phänotypischen Veränderungen bei APLP1<sup>-/-</sup>- und APLP2<sup>-/-</sup>-Mäusen, bei gleichzeitigen schweren Beeinträchtigungen des perinatal letalen Doppelknockouts APLP1<sup>-/-</sup>/APLP2<sup>-/-</sup>, erklären.

Auffällig ist, dass die Proteine der APP-Familie viele gemeinsame Merkmale mit bekannten synaptischen Adhäsionsmolekülen (SAMs) aufweisen, wie Cadherinen, Integrinen, Neurexin/Neurologin und Immunglobulindomänen enthaltenden Zelladhäsionsproteinen. SAMs enthalten meist eine große extrazelluläre Domäne, eine Transmembransequenz und einen kurzen cytoplasmatischen Anteil, der Interaktionsstellen für Gerüstproteine oder Signalmoleküle enthält (*Shapiro et al.*, 2007; *Tallafuss et al.*, 2010). Sie bilden häufig sowohl homophile als auch heterophile Kontakte aus, die sich funktionell ersetzen können (*Tallafuss et al.*, 2010). Einige SAMs bilden analog zu APLP1 sowohl *cis*- als auch *trans*-Oligomere aus, wobei interessanterweise bei Cadherinen die Wechselwirkungen zwischen zwei gegenüberliegenden Molekülen relativ schwach sind und die Stärke der *trans*-Verknüpfung durch die Interaktion vieler einzelner Cadherin-Moleküle zu Stande kommt (*Chen et al.*, 2005). Ein ähnliches Szenario erscheint auch für die Zink-abhängige *trans*-Interaktion von APLP1 plausibel. In den SPR-Messungen zeigte sich, dass die Zinkbindung sehr dynamisch ist mit einer schnellen Assoziations- und

### 3.4. APP und APLPs als synaptische Adhäsionsproteine

Dissoziationskinetik, was sich auch in einer schnellen Zusammenlagerung und Dissoziation der APLP1 *cis*-Oligomere in den FRET-Messungen ausdrückte. Die Anreicherung von APLP1-Molekülen in Zellkontaktbereichen in Gegenwart von Zink deutet auf die Ausbildung vieler einzelner *trans*-Kontakte an den Zellkontaktbereichen hin.

Eine weitere auffällige Gemeinsamkeit von APP/APLPs mit Cadherinen ist die Bindung von divalenten Metallionen, welche die Oligomerisierung und adhärierenden Eigenschaften der Proteine verstärkt. Dabei werden Cadherine durch Calciumionen reguliert (*Hatta et al.*, 1985). Die Cadherine liegen auf Grund der hohen Calciumkonzentrationen in Höhe von 1-2 mM im extrazellulären Raum des Gehirns überwiegend in Ca<sup>2+</sup>-gebundener Form vor (*Csenkér et al.*, 1982). Allerdings wurde auch beobachtet, dass sich die Anzahl und Stärke der Cadherin-vermittelten Kontakte bei synaptischer Aktivität erhöht, was mit der extrazellulären Calciumkonzentration zusammenhängen könnte (*Tanaka et al.*, 2000). Eine viel stärkere Dynamik wäre für Zink-regulierte APLP1-vermittelte synaptische Kontakte zu erwarten. Die Zinkkonzentration im synaptischen Spalt erhöhen sich bei der Ausschüttung von Zinkvesikeln um mehrere Größenordnungen und nur unter diesen Bedingungen würde man eine Induktion der Oligomerisierung von APLP1 erwarten.

Im Gegensatz zu Cadherinen tragen Neurexin/Neurologin-Oligomere weniger zur Strukturierung der Synapse bei, sondern eher zur Vermittlung von Signalen zwischen der Prä- und Postsynapse (*Shapiro et al.*, 2007). Eine Signalfunktion durch die Ausbildung von *trans*-Kontakten wäre auch eine mögliche Funktion für APLP1-*trans*-Oligomere. Die Beseitigung von Zinkionen aus dem synaptischen Spalt erfolgt relativ langsam (> 1 min) (*Vogt et al.*, 2000). Die APLP1-Oligomere sind allerdings nicht stabil, sondern dissoziieren innerhalb von wenigen Minuten bei Auswaschen des Zinks mit Messpuffer (Daten nicht gezeigt), sodass Zink-induzierte APLP1-Oligomere *in vivo* vermutlich nur für einige Minuten gebunden bleiben. Zink-abhängige APLP1-Oligomere würden somit weniger zur langzeitigen Assoziation der Prä- und Postsynapse beitragen, sondern mehr zur kurzzeitigen Verstärkung des Kontakts. Dadurch könnten weitere Adhäsionsproteine rekrutiert werden und/oder Signale über die Synapse vermittelt werden.

Basierend auf den Ergebnissen meiner Arbeit schlage ich eine Funktion für die Proteine der APP-Familie als Zink-abhängige synaptische Adhäsionsmoleküle vor. Diese Funktion würde primär durch APLP1 vermittelt werden, indem es zum einen homophile APLP1-Oligomere und zum Anderen heterophile Kontakte mit APP und APLP2 ausbildet.

### 3. *Diskussion*

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Chemikalien, Proteine und Kits

Chemikalien zum Ansetzen von Puffern und Reaktionslösungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, von Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Roth GmbH (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Fluka (Schweiz) in der Qualitätsstufe pro analysis bezogen.

Alle „Kits“ und Enzyme, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von Qiagen (Hilden), Macherey&Nagel (Düren), Stratagene (USA), Thermo Scientific (USA), Roche (Schweiz), New England Biolabs (USA), Promega (USA), GE Healthcare (München) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

#### 4.1.2. Pufferlösungen

Nicht gesondert aufgeführte Pufferlösungen wurden nach *Sambrook et al.* (1989) hergestellt.

#### 4.1.3. Antikörper

Alle verwendeten Erstantikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und in Verdünnungen von 1:1000 - 1:2000 im Western-Blot eingesetzt.

DCRX: polyklonaler Antikörper aus Kaninchen; Epitop: Aminosäuren 407-421 von humanem APP<sub>695</sub>

DCRY: polyklonaler Antikörper aus Kaninchen; über Protein A-Sepharose® gereinigt; Epitop: Aminosäuren 349-363 von humanem APLP1

DCRP: polyklonaler Antikörper aus Kaninchen; Epitop: Aminosäuren 485-495 von humanem APLP2<sub>763</sub>

#### 4. Material und Methoden

DCRP / DCMD: Antikörper aus Kaninchen; Epitop: rekombinante E2-Domäne von humanem APP<sub>695</sub> mit N-terminalem Methionin (Aminosäuren 316-498) aus *E. coli* (Corrigan et al., 2011)

$\alpha$ -Kaninchen-HRP: Mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter Zweitantikörper (Promega, USA) zur Detektion von Erstantikörpern aus Kaninchen im Western Blot, Verdünnung 1:10000

#### 4.1.4. Primer

HPLC-gereinigte Primer wurden von Sigma Aldrich (Deisenhofen) synthetisiert.

#### Primer für Subklonierungen in den Hefvektor pPICZ $\alpha$

Name des Primers	Sequenz
P1 APLP1 E2-fw EcoRI at 5'	GTCCGAATCCCCACAGACGGTGTGGATATTTAC
P8 APLP1 E2long-rv NotI [Stop] at 3'	GTATTAGCGGCCGCTCACAATTCACCTGGGACCCAG
fwsAPLP1EcoRI	TGAGCAATCTGAATTCAGCCTGGCCGGTGGGAGCC
P21 APLP1 E1bisAS211 rev NotI [Stop]	TCATGCGGCCGCTTAGGGACAGCACACATACTCCACA

#### Primer zur Erzeugung von Punktmutationen

Name des Primers	Sequenz
P11 APLP1 H450A fw	GATGCGCTTCCAGGTGGCTACCCACCTTCAAG
P12 APLP1 H450A rv	CTTGAAGGTGGGTAGCCACCTGGAAGCGCATC
P15 APLP1 H430A/H433A fw	CGCTGCGCGCCTACCAGGCTGTGGCCGCCGTGGATCCC
P16 APLP1 H430A/H433A rev	GCGGCCACAGCCTGGTAGGCGCGCAGCGTGTGCCTCTG
P17 APLP1 H450A/H452A fw	CTTCCAGGTGGCTACCGCCCTTCAAGTGATTGAGGAGAG
P18 APLP1 H450A/H452A rev	CACTTGAAGGGCGGTAGCCACCTGGAAGCGCATCTGCTG

#### Primer für Deletionsmutagenesen

Name des Primers	Sequenz
P40 APLP1 Delta290-494 fw	CACTCCCACCCCGAGGTTGGAAGCCCTGCCCTG
P41 APLP1 Delta290-494 rev	GGGCAGGGGCTTCCAACCTCGGGGTGGGAGTGACTTT
P50 APLP1 Delta290-580 fwd	TCACTCCCACCCCGAGGGCTGTATCGGGTCTGCTGA
P51 APLP1 Delta290-580 rev	GCAGACCCGATACAGCCCTCGGGGTGGGAGTGACTT

#### 4.1.5. Plasmidvektoren und Expressionskonstrukte

Als „Shuttle“-Vektor bei der Klonierung wurde der Vektor pCRII aus dem TOPO TA Klonierungssystem verwendet (Invitrogen, Karlsruhe). Für die Expression in *Pichia pastoris* wurden die Hefezellen mit dem linearisierten Vektor pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen, Karlsruhe) transformiert. Die Überexpression in humanen Zellen und Rattenzellen wurde durch Transfektion der Vektoren pcDNA3-CFP/YFP/FLAG (Invitrogen, Karlsruhe; modifiziert von Michael Schaefer, Universität Leipzig) und pEYFP (Clontech) durchgeführt. Zur Expression in *E. coli* wurde das Vektorsystem pRSET verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Konstrukte kloniert und verwendet:

Vektor	Insert
pPICZ $\alpha$ A	APLP1 E2 (Aminosäuren 290-495 von APLP1)
pPICZ $\alpha$ A	APLP1 E1 (Aminosäuren 39-211 von APLP1)
pcDNA3-CFP/YFP	APLP1 H450A
pcDNA3-CFP/YFP	APLP1 H430A/H433A/H450A/H452A
pcDNA3-CFP/YFP	APLP1 $\Delta$ E2
pcDNA3-CFP/YFP	APLP1 $\Delta$ E2-JMR

Folgende in dieser Arbeit verwendete Vektoren wurden von anderen Personen konstruiert:

Vektor	Insert	Quelle
pRSETA-d6a	APP E2 (Aminosäuren 316-498 von APP)	Chi Le Lan Pham, Australien
pcDNA3-CFP/YFP/-	APP	Lisa Münter, AG Multhaup
pcDNA3-FLAG/CFP/YFP	APLP1	Daniela Kaden, AG Multhaup
pcDNA3-FLAG/CFP/YFP	APLP1 $\Delta$ E1-AcD	Daniela Kaden, AG Multhaup
pcDNA3-CFP/YFP	APLP2	Daniela Kaden, AG Multhaup
pcDNA3-YFP	Glycophorin A	Michael Schaefer, Universität Leipzig
pEYFP	N-terminales Peptid der Lyn-Kinase	Michael Veit, FU Berlin

#### 4.1.6. Bakterienstämme und Nährmedien

Für Subklonierungen und Mutagenesen wurden die Abkömmlinge Alpha-Select (Bioline, USA) und Top10 (Invitrogen, Karlsruhe) des *E. coli* K12-Stamms verwendet, für die Proteinexpression wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS verwendet. Abhängig von dem verwendeten Selektionsmarker wurden folgende Nährmedien eingesetzt:

LB-Medium: 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl

für Ampicillin, Kanamycin und Chloramphenicol

LB „low salt“-Medium: 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl

## 4. Material und Methoden

für Zeocin

### 4.1.7. Hefestämme und Nährmedien

Zur Herstellung von rekombinanten Proteinen wurde die Hefeart *Pichia pastoris*, Stamm SMD1168 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Hefelinien erzeugt:

SMD1168 pPICZ $\alpha$ A-APLP1E2 und SMD1168 pPICZ $\alpha$ A-APLP1E1

Die folgenden Hefelinien wurden übernommen:

Hefezelllinie	Quelle
SMD1168 pPICZ $\alpha$ A-APPE2 (Aminosäuren 290-491 von APP <sub>695</sub> )	Daniela Kaden, AG Multhaup
SMD1168 pPICZ $\alpha$ A-APLP1E2-JMR (Aminosäuren 290-566 von APLP1)	Diplomarbeit Magnus Mayer
SMD1168 pPICZ $\alpha$ A-APLP2E2 (Aminosäuren 370-565 von APLP2 <sub>763</sub> )	Diplomarbeit Magnus Mayer

Dabei wurden folgende Nährmedien eingesetzt:

YPD-Medium:	1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Bacto-Pepton, 2% (w/v) Glukose
Selektionsmedium (YPDS):	YPD mit 1 M Sorbitol, 2% (w/v) Agar, 100 $\mu$ g/ml Zeocin
BMGY-Medium:	1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Bacto-Pepton, 100 mM Kaliumphosphat pH 6,0, 1,34% Stickstoffbasismedium für Hefe (YNB) von Invitrogen (Karlsruhe), $4 \cdot 10^{-5}$ % (w/v) Biotin, 1% (v/v) Glycerin
BMMY-Medium:	1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Bacto-Pepton, 100mM Kaliumphosphat pH 6,0, 1,34% YNB (Invitrogen, Karlsruhe), $4 \cdot 10^{-5}$ % (w/v) Biotin, 2% (v/v) Methanol
BMMY pH 7, 0,5% MetOH:	wie BMMY, aber mit Kaliumphosphat pH 7,0 und 0,5% (v/v) Methanol
Einfriermedien:	15% (v/v) Glycerol in 85% (v/v) YPD- bzw. BMGY-Medium

Alle Medien wurden vor Gebrauch mit 1x Penicillin/Streptomycin (PAA, USA) versetzt.

### 4.1.8. Zelllinien

Für die eukaryotische Zellkultur wurde die humane embryonale Nieren-Zelllinie HEK293 verwendet, ATCC-Nummer: CRL-1573 (ATCC, Rockville, USA).

Nährmedium: DMEM mit 10% fetalem Kälberserum und 2 mM Glutamin

Zellkulturmedium, Trypsin/EDTA und PBS wurden von Biochrom (Berlin) und PAA (USA) bezogen.

#### 4.1.9. Versuchstiere

- Rattenembryonen von schwangeren Wistar-Ratten (Tierstall des Rudolf-Boehm-Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Leipzig)
- Kaninchen HsdJf:NZW (Harlan Laboratories, Deutschland)

#### 4.1.10. Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Plastikwaren (Reaktionsgefäße, Petrischalen, etc.) wurden von Sarstedt (Nümbrecht), TPP (Schweiz) oder Greiner (Österreich) bezogen, sofern nicht anders angegeben.

- Elektroporationsküvetten 0,2 cm GenePulser Cuvettes (Biorad, München)
- Filterpapier Whatman 3MM (Whatman Int. Ltd., GB)
- Nitrocellulosemembran porablot NCP (Macherey-Nagel, Düren)
- Pipettenspitzen (Roth GmbH, Karlsruhe; Steinbrenner, Wiesenbach)
- Röntgenfilme „Konica Minolta Medical Film“
- verstärkte 50ml-Reaktionsgefäße zum Zentrifugieren (VWR, USA)
- Amicon Ultra Zentrifugenterrörchen, 3.000, 10.000 und 30.000 MWCO für 0,5, 4 und 15 ml (Millipore, Schwalbach)
- Sterilfilter, Minisart, Porengröße 0,2 µm (Sartorius, Göttingen)
- Sterilfilter, 500 ml Steritop 0,22 µm (Millipore, Schwalbach)
- Mini-Leer-Säulen (Biorad, München)
- Cryo-Rörchen: CryoTube Vials (Nunc, Wiesbaden)
- Mikrotiterplatten für ELISA (Nunc, Wiesbaden)
- 96-deep-well Platten (Nunc, Wiesbaden)
- Omix 100 µl C18 Pipettenspitzen (Varian, USA)

#### 4.1.11. Geräte

- Autoklav: Varioklav 135S (H+P, Oberschleisheim)
- BIAcore 3000 (GE Healthcare, München)
- Brutschränke für Bakterien- und Hefekultur: Modell 600 (Memmert, Schwabach)
- Brutschrank für eukaryotische Zellkultur HERA Cell 240 (Heraeus, USA)
- CASY®Cell Counter, Model DT (Roche, Schweiz)

#### 4. Material und Methoden

- Flüssigkeits-Chromatografieanlagen (FPLC) Äkta P-920 und Äkta Explorer P-900 (Pharmacia, Freiburg) mit Blue Sepharose®-Säule HiTrap Blue HP, HiTrap Protein A-Säule, Größenausschluss Säulen Superdex 200 HiLoad XK 16/60 und Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare, München) und selbst angefertigter Heparin Hyper D-Säule (Pall, USA)
- Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR (Cawo, Schrobenehausen)
- Epifluoreszenzmikroskop DMI6000B invers mit externer Metallhalogenidlampe EL6000 und externem Filterrad CFP/YFP, Bedienung über LAS AF Application Suite inkl. SE FRET Wizard (Leica Microsystems, Wetzlar)
- Feinwaage MC1 AC120S (Sartorius, Göttingen)
- French Press für Zellaufschluss von Bakterien, French Pressure Cell-Press (SLM Amico, USA)
- Geldokumentationsanlage AlphaImager 2200 (Biozym, Hamburg)
- GenePulser und GenePulser II für Elektroporation (Biorad, München)
- Grobwaage L2200P (Sartorius, Göttingen)
- Heizblock UBD2 (Grant, UK)
- Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM-510 meta cLSM (Carl Zeiss Microscopy, Jena), ausgestattet mit einem  $\alpha$ -Plan-Fluor 100 x/1.45 Objektiv
- Kühlzentrifuge Centrifuge 5417 R (Eppendorf, Hamburg)
- Küvettenphotometer SmartSpec 3000 (Biorad, München)
- Lichtmikroskop Axioskop (Carl Zeiss Microscopy, Jena)
- Massenspektrometer Bruker Ultraflex II, MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonic, Bremen)
- Mikrozentrifuge FugeOne (StarLab, UK)
- Millipore water purification systems, Q Gard 1 (Millipore, USA)
- Mini-Protean Tetra Cell (Biorad, München)
- Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer (PEQLAB, Erlangen)
- Netzgerät Power Supply EPS 301 (Amersham, USA) für SDS-PAGE
- Netzgerät Power Supply 2000/200 (Biorad, München) für Agarosegelelektrophorese
- Nucleofector II (Lonza, Schweiz)
- Plattenphotometer Anthos HT2 (Anthos, Krefeld)
- PCR-Maschine Mastercycler oder Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg)
- Perfusionskammer RC-25F mit P4-Adapter (Warner Instruments, USA)
- Perfusions-Kontrollsystem mit 8 Ventilen VC-8T (Warner Instruments, USA)
- Pipetten: Pipetman P2, P10, P20, P200 & P1000 (Gilson, USA)

- Schüttelgeräte für Bakterien- und Hefekulturen: HR225, HR250 (Infors, Bottmingen), Certomat BS-1 (B. Braun Biotech International, Melsungen)
- Spektropolarimeter J-810 (JASCO, Japan) mit Peltierelement PTC-4235 (JASCO, Japan) und Umwälzkühler Thermo HAAKE WKL 26 (Thermo Scientific, Deutschland)
- Sterilwerkbank Herasafe (Heraeus, USA)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg)
- Tischzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, USA)
- Transblot-Apparatur, (Bio-Rad, München)
- Überkopfschüttler Reax 2 (Heidolph, Schwabach)
- Ultrazentrifuge J2-MC (Beckman, München) mit JA-10 Festwinkelrotor (Beckman, München) und F13B-14x50cy mL Festwinkelrotor (FiberLite, USA)
- Vakuumpumpe SpeedVac (Savant) mit Kühlfalle RVT400 Thermo (Savant)
- Vakuumpumpe CVC2 vacuubrand (ABM, Marktredwitz)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA)
- Zentrifuge Megafuge 1.0 (Heraeus, USA)

#### 4.1.12. Software

- Proteinanalytik und Tools zur Analyse von Massenspektren: ProtParam, PeptideMass, FindPeptide, Delta Mass und ProteinProspector
- Vorhersage von Antigenizität, Zugänglichkeit von Epitopen und möglicher Kreuzreaktivität: EMBOSS antigenic (*Parker et al.*, 1986; *Kolaskar und Tongaonkar*, 1990), RankPep (*Reche et al.*, 2002), BLASTp (National Library of Medicine)
- Visualisierung und Überlagerung von 3-dimensionalen Proteinstrukturen: PyMOL
- Proteinsequenzvergleiche: ClustalOmega 1.1 (*Sievers et al.*, 2011), Boxshade
- DNA-Sequenzanalysen SE Central Clone Manager 5, Primer Designer 4, Align Plus 4
- Datenauswertungen: GraphPad Prism 5, Origin 6, Microsoft Excel 2010
- Internetdatenbanken: UniProt, NCBI, RCSB PDB
- Literaturverwaltungsprogramme: JabRef 2.9, Zotero 3
- Bildbearbeitung: Adobe Illustrator CS5 und Photoshop CS5, Axiovision und ImageJ für Mikroskopiebilder
- Textverarbeitung: TeXnic Center 2.0 mit L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X-Distribution MikTeX 2.9

## 4.2. Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1. Klonierungsstrategien

#### 4.2.1.1. Klonierung der Hefeexpressionsvektoren

Zur Expression der E1- und E2-Domäne von APLP1 in *Pichia pastoris* wurden diese Bereiche in den Hefeexpressionsvektor pPICZ $\alpha$ A kloniert. Dazu wurden die E1- und E2-Regionen von APLP1 aus pcDNA3-FLAG APLP1 zunächst durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (siehe Kapitel 4.2.2) vervielfältigt. Die verwendeten Primer enthielten dabei am 3'-Ende des codierenden Stranges ein Stop-Codon und zusätzlich wurden an den 5'- und 3'-Enden Überhänge mit Restriktionsschnittstellen für EcoRI und NotI eingebaut. Diese ermöglichten die Ligation der DNA-Fragmente in die „Multiple Cloning Site“ des Hefeexpressionsvektors pPICZ $\alpha$  im Leseraster mit dem  $\alpha$ -Faktor aus *Saccharomyces cerevisiae*, der eine Sekretion des exprimierten Proteins in das Kulturmedium bewirkt.

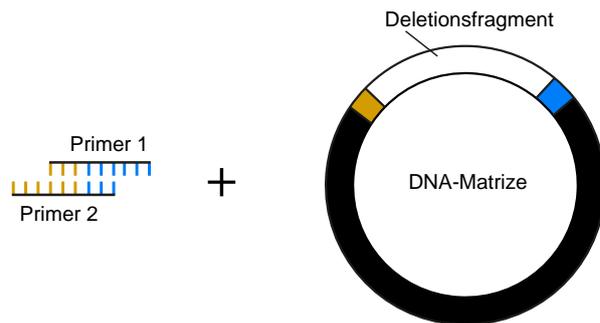
Da die direkte Ligation des Fragments misslang, wurde ein Zwischenschritt über den TOPO-Vektor pCRII durchgeführt. Hierbei wurden die in der PCR entstandenen Fragmente durch die TOPO-Reaktion in den Vektor inseriert und anschließend vervielfältigt. Dies ermöglichte einen effektiveren Schnitt der Restriktionsenzyme als in dem reinen PCR-Produkt und dadurch eine erfolgreiche Ligation der DNA-Fragmente mit dem verdauten Hefeexpressionsvektor.

#### 4.2.1.2. Einfügen von Punktmutationen

Die Mutation von einzelnen Aminosäuren in der APLP1-Sequenz wurde mit einer ortsspezifischen Mutagenese-PCR („Site-directed mutagenesis“) durchgeführt. Hierbei wurde eine Mutation durch Verwendung von Primern induziert, die an der geeigneten Stelle der DNA-Sequenz eine oder mehrere Basenfehlpaarungen enthielten, sodass das Amplifikat die gewünschte Mutation erhielt. Die Primer wurden nach der modifizierten Primerdesignmethode von *Zheng et al.* (2004) konstruiert. Dabei wurden partiell komplementäre Vorwärts- und Rückwärts-Primer mit der gewünschten Punktmutation im Überlappungsbereich der Primer verwendet. Mit diesen wurde der vollständige Expressionsvektor durch PCR amplifiziert und lag danach als unmethylierte DNA vor. Mit dem Restriktionsenzym DpnI wurde spezifisch die methylierte DNA-Vorlage verdaut, sodass anschließend nur das mutierte PCR-Produkt vorlag, das direkt in Bakterienzellen transformiert werden konnte.

### 4.2.1.3. Erzeugung der Deletionsmutanten

Lange Deletionen in der APLP1-Sequenz wurden durch PCR-vermittelte Deletionsmutagenese erzeugt (Hansson *et al.*, 2008). Hierbei wurde eine Mutagenese-PCR mit einem Primerpaar durchgeführt, das die Sequenzen enthält, die sich neben der zu deletierenden DNA befinden (Abbildung 4.1). Nach einer PCR des gesamten Expressionsplasmids mit anschließendem



**Abbildung 4.1.: Konstruktion der Deletionsmutanten durch Mutagenese-PCR.** Die Deletion wird durch eine PCR erzeugt, mit Hilfe von Primern, die komplementär zu den flankierenden Sequenzen des Deletionsfragments sind.

Verdau der DNA-Vorlage durch DpnI blieb ausschließlich die linearisierte DNA ohne das deletierte DNA-Fragment übrig. Auf Grund des durch die Primer erzeugten Überhangs konnte sich das Amplifikat wieder zu einer zirkulären DNA zusammenlagern und in Bakterienzellen transformiert werden.

## 4.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### PCR zur einfachen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten

Zur Amplifikation der E1- und E2- Regionen von APLP1 wurden PCRs mit 2,5 U GoTaq-Polymerase (Promega, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt mit je 10 pmol Primer und 10 nmol Plasmid-DNA. Die Amplifikation erfolgte über 29 Zyklen der Folge 30 sec Denaturierung bei 95°C, 30 sec „Annealing“ bei 57-60°C, 75 sec Polymerisation bei 72°C.

### Mutagenese-PCR

Für die Erzeugung von Punktmutationen und Deletionsmutationen wurden PCRs mit der *PfuUltra II Fusion Polymerase* (Stratagene, USA) durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde in einem Reaktionsvolumen von 25 µl nach Herstellerangaben angesetzt. Die Amplifikation erfolgte über 18 Zyklen der Folge 20 sec Denaturierung bei 95°C, 30 sec „Annealing“ bei 55-60°C, 4 min Polymerisation bei 72°C, gefolgt von einer abschließenden Inkubation bei 72°C für 4 min.

## 4. Material und Methoden

### 4.2.3. Spaltung und Ligation von DNA

Restriktionsverdau der Plasmidvektoren und der amplifizierten Fragmente wurden mit Restriktionsenzymen von New England Biolabs (USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden in der Regel jeweils 1-5 U Enzym je  $\mu\text{g}$  DNA verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1-16 Stunden bei der angegebenen Temperatur.

DNA-Fragmente und verdaute Plasmidvektoren wurden in Verhältnissen 3:1 bis 10:1, bezogen auf die Anzahl der Moleküle, gemischt und mit 3 U T4-Ligase (Promega, USA) ligiert. Die Ligationsreaktion wurde nach Herstellerangaben für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit anschließender Inkubation über 12-24 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt.

### 4.2.4. TOPO-Klonierung

Für die TOPO-Reaktion wurde der Vektor pCRII (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, zusammen mit einem PCR-Produkt, das einen Desoxyadenosinüberhang aus einer PCR mit Taq-Polymerase enthält. Der TOPO-Vektor liegt linearisiert mit der fusionierten *Vaccinia* Virus Topoisomerase I an den 3'-Enden vor, wobei der letzte Desoxythymidinrest des Vektors ungepaart ist, so dass er mit dem PCR-Produkt hybridisieren kann. Die Topoisomerasen katalysieren hierbei die Verknüpfung des Vektors mit dem PCR-Produkt an beiden Enden. Dabei wird das Enzym abgespalten und eine zirkuläre DNA entsteht, die in Bakterienzellen transformiert und vervielfältigt werden kann. Die TOPO-Klonierung wurde nach Herstellerangaben (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt.

### 4.2.5. Transformation von kompetenten Zellen durch Hitzeschock

12-25  $\mu\text{l}$  chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (Bioline, USA; Invitrogen, Karlsruhe) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-2  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA versetzt. Anschließend wurde der Ansatz 30 Minuten auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock im  $42^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad für 45 Sekunden. Unmittelbar danach wurden die Bakterien auf Eis gestellt, nach 2 Minuten mit 500  $\mu\text{l}$  vorgewärmtem LB bzw. LB „low salt“-Medium versetzt und anschließend für 30-60 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. 100-250  $\mu\text{l}$  der Bakterienkultur wurden auf LB-Agar-Platten mit geeignetem Selektionsantibiotikum ausplattiert und anschließend über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

#### 4.2.6. Vervielfältigung, Präparation und Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Von einer Agarplatte wurde ein Einzelklon der Bakterien in 3 ml oder 150 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum überführt und bei 37°C, 200 rpm auf einem Schütteltisch über Nacht wachsen gelassen.

Die Isolation und Aufreinigung der Plasmid-DNA aus 3 ml-Kulturen erfolgte unter Verwendung der Puffer des PC500-Maxi Kits (Macherey Nagel, Düren). 1,5 ml Bakterienkultur wurden für 8 Minuten bei 4500 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer S1 (50 mM Tris/Cl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µM RNase A) resuspendiert und mit 300 µl Puffer S2 (200 mM NaOH, 1% SDS) für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Durch Zugabe von 300 µl Puffer S3 (2,8 M Kaliumacetat pH 5,1) wurden die Proteine und die genomische DNA gefällt, der Ansatz wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mehrmals für 10-20 Minuten bei 14000 rpm, 4°C zentrifugiert. Im Überstand befand sich die Plasmid-DNA, die durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt wurde. Die DNA wurde durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 20000xg, 12°C, pelletiert und mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde anschließend getrocknet und in 30-50 µl sterilem Wasser gelöst.

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus dem 150 ml-Ansatz erfolgte mit den Kits Nucleobond XtraMidi bzw. XtraMidi EF nach Herstellerangaben (Macherey Nagel, Düren).

Die Konzentration der DNA wurde mittels NanoDrop durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die Konzentration der DNA berechnet sich dabei aus dem Zusammenhang  $1 \text{ OD bei } 260 \text{ nm} \cong 50 \text{ µg/ml DNA}$ . Die Reinheit der DNA wurde durch das Verhältnis der Extinktionen  $\frac{260\text{nm}}{280\text{nm}}$  bewertet, das bei reiner Plasmid-DNA ca. 1,9 beträgt.

#### 4.2.7. DNA-Gelelektrophorese und Reinigung von DNA aus Agarosegelen

**TAE-Puffer:** 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA pH 8,0  
**6x DNA-Probenpuffer:** 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 60% (v/v) Glycerin,  
0,1 mM EDTA, pH 8,0

Linearisierte DNA und DNA-Fragmente wurden über Gelelektrophorese in TAE-Puffer mit 0,8-1,5%-igen Agarosegelen (w/v) aufgetrennt. Die Zugabe von 0,0013% (v/v) RedSafe (ChemBio, UK) in das Agarosegel ermöglichte die Detektion der DNA bei UV-Licht.

Für präparative Anwendungen wurde das DNA-enthaltende Gelstück ausgeschnitten, die DNA mit dem QIAGEN Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt und ggf. im Vakuumkonzentrator aufkonzentriert.

## 4. Material und Methoden

### 4.2.8. Sequenzierung und Plasmidkontrollen

Die in Vektoren insertierten DNA-Fragmente wurden vollständig sequenziert und mit der Originalsequenz abgeglichen. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz) mit der Didesoxymethode nach Sanger (*Sanger et al.*, 1977) durchgeführt. Zusätzlich wurden die Plasmide zur Kontrolle, ob Insertionen oder Deletionen im Vektorrückgrat aufgetreten waren, mit Restriktionsenzymen verdaut und durch DNA-Gelelektrophorese analysiert.

## 4.3. Proteinexpression in *Escherichia coli* und *Pichia pastoris*

### 4.3.1. Proteinexpression in *E. coli* und Aufschluss der Bakterienzellen

Zur Expression der E2-Domäne von APP in Bakterien wurden 100 ml LB/Ampicillin mit einem Einzelklon von pRSETA-d6a transformierten BL21(DE3)pLysS-Zellen angeimpft und bei 33°C, 200 rpm über Nacht inkubiert. 25 ml dieser Vorkultur wurden zu 1 l LB/Ampicillin gegeben, bei 33°C, 200rpm wachsen gelassen, bis  $OD_{600} \approx 0,6$  betrug und mit 1 mM IPTG induziert. Nach 3 Stunden wurden die Bakterienzellen bei 5000xg abzentrifugiert und in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 mit 2x Protease-Inhibitor Complete (Roche, Schweiz) aufgenommen. Die Zellen wurden in 3 Zyklen mit einer French Press aufgeschlossen, das Lysat wurde 45 Minuten bei 23000xg, 4°C abzentrifugiert. Die Proteine befanden sich im Überstand, der mit einem 0,22 µm Filter filtriert wurde.

### 4.3.2. Proteinexpression in *P. pastoris*

Bei der Proteinexpression mit der methylotrophen *Pichia pastoris* kann die starke Aktivierung des *AOX1*-Promotors in Gegenwart von Methanol genutzt werden. Dabei wurden die zu exprimierenden Gene hinter den *AOX1*-Promotor und die DNA-Sequenz des  $\alpha$ -Faktors aus *S. cerevisiae* kloniert. Die Fusion mit dem  $\alpha$ -Faktor bewirkt, dass die Polypeptidkette in den sekretorischen Weg gelangt und schließlich sekretiert wird. Die Signalpeptidasen KEX2 und STE13 prozessieren hierbei das  $\alpha$ -Faktor-Peptid (*Brake et al.*, 1984), wobei abhängig von der Sequenz des exprimierten Proteins dabei eine unvollständige Prozessierung auftreten kann (*Brocca et al.*, 1998). Dies trat bei der Expression der E2-Domäne von APLP1 auf. Massenspektrometrische Analysen zeigten, dass der N-Terminus des exprimierten Proteins als Gemisch aus der erwarteten Sequenz und der um die Aminosäurereste EA N-terminal verlängerten Sequenz vorlag.

### 4.3. Proteinexpression in *Escherichia coli* und *Pichia pastoris*

#### 4.3.2.1. Kultivierung und Lagerung von *P.pastoris*

25 ml YPD-Medium wurden mit einem Einzelklon oder 30  $\mu$ l Glycerolkultur angeimpft und ca. 8 Stunden bei 29°C, 150 rpm inkubiert. 500 ml YPD-Medium wurden mit 5-10 ml Vorkultur versetzt und wachsen gelassen bis die  $OD_{600} \approx 1,0$  betrug. Die Hefezellen befanden sich zu dem Zeitpunkt in der optimalen Wachstumsphase und wurden durch Zentrifugation bei 1500xg, 4°C geerntet.

Zur Herstellung von lagerfähigen Glycerolstocks wurden pelletierte Hefezellen in 5 ml Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C.

#### 4.3.2.2. Herstellung elektrokompetenter Hefezellen und Elektrotransformation

Hefezellen wurden zum Zeitpunkt des optimalen Wachstums geerntet (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Die Pellets wurden nacheinander in 500 ml und 250 ml eiskaltem Wasser und anschließend in 20 ml eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert, wobei die Zellen zwischendurch jeweils bei 1500xg, 4°C abzentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Hefezellen in ca. 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert, auf Eis gelagert, und innerhalb von 3 Tagen für die Transformation verwendet.

Die DNA für die Transformation wurde zunächst durch Restriktionsverdau linearisiert und über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Bei der Transformation wurden 5-10  $\mu$ g (maximal 10  $\mu$ l) DNA in 50  $\mu$ l kompetenten Zellen gemischt und auf Eis in einer 0,2 cm Elektroporationsküvette für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem elektrischen Impuls mit 400  $\Omega$ , 25  $\mu$ F, 1,5 kV für 5-7 msec ausgesetzt, sofort mit 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol versetzt und bei 29°C inkubiert. Nach 2-3 Stunden wurden die transformierten Zellen ausplattiert und auf YPDS-Agarplatten mit 100  $\mu$ g/ml Zeocin für 3 bis 6 Tage bei 29°C wachsen gelassen.

#### 4.3.2.3. Klonselktion und Proteinexpression in *P. pastoris*

Zunächst wurde eine erfolgreiche Expression des transformierten Gens in den Hefezellen getestet. Dazu wurden je 10 ml BMGY mit Einzelklonen angeimpft und bei 29°C, 150 rpm inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen bei 1500xg, 10 min pelletiert und in 25 ml BMMY aufgenommen, wobei  $OD_{600} \approx 1,0$  betrug. Die Expression erfolgte für 24-48 Stunden bei 29°C, 150 rpm. Die für die Expression nicht verwendeten Zellen wurden eingefroren und bei -80°C gelagert (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Der Einzelklon mit der stärksten Proteinexpression wurde durch SDS-PAGE mit Coomassiefärbung oder Blot-Analysen ermittelt und für

#### 4. Material und Methoden

die weiteren Proteinexpressionen verwendet.

Für eine Expressionskultur wurden 50 ml BMGY mit einer Glycerolkultur angeimpft und bei 29°C, 150 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1500xg, 10 min abzentrifugiert und in 50 ml-1,5 l BMMY, bzw. BMMY pH 7 mit 0,5% Methanol (APLP1 E2), resuspendiert, so dass die  $OD_{600} \approx 1,0$  betrug. Die Proteinexpression erfolgte in der Regel für 24 h bei 29°C (E2-Proteine) oder 48 h bei 15°C (APLP1 E1).

Zur Ermittlung geeigneter Expressionsbedingungen wurden BMMY-Lösungen mit unterschiedlichen Methanolkonzentrationen bzw. unterschiedlichen pH-Werten des Kaliumphosphatpuffers verwendet. Zusätzlich wurde getestet, ob die Zugabe von 100 µg/ml Zeocin zu dem Vorkulturmedium oder die Zugabe von 0,4 M Arginin oder 500 nM Aprotinin und 50 µM Leupeptin zu dem Expressionsmedium die Ausbeute oder Reinheit der Expression verbessert. Die Ansätze wurden bei 15°C, 20°C oder 29°C inkubiert und nach 24 und 48 Stunden analysiert.

Die Expressionsansätze wurden bei 4°C mit 1500xg zentrifugiert. Der Kulturüberstand mit den sekretierten Proteinen wurde zur sofortigen Analyse direkt mit SDS-Probenpuffer versetzt oder für die weitere Aufreinigung durch einen 0,22 µm-Filter filtriert.

### 4.4. Chromatographische Verfahren

#### 4.4.1. Aufreinigungsstrategien

Die rekombinante E2-Domäne von APP aus *E. coli* wurde über eine Heparin-Affinitätschromatografie und anschließende Größenausschlusschromatografie (SEC) mit einer Superdex200-Säule aufgereinigt.

Sämtliche E2-Domänen aus *P. pastoris* wurden zunächst über eine Blue-Sepharose®-Säule vorgereinigt. Für die Präparation von APLP1 E2 zur Kristallisation wurde das Eluat danach über eine Concanavalin A Sepharose®-Säule von den geringen Mengen glykosylierten Proteins getrennt. Anschließend wurde eine SEC mit einer Superdex200-Säule durchgeführt.

APLP1 E1 wurde zunächst über eine Affinitätschromatografie mit immobilisierten Kupferionen (Cu-IMAC) vorgereinigt. Anschließend wurde eine Heparin-Affinitätschromatografie durchgeführt.

Chromatografien wurden mit einem automatisierten Flüssigkeitschromatographiesystem (FPLC) durchgeführt, sofern nicht anders angegeben. Die gesammelten Protein-haltigen Fraktionen wurden jeweils über SDS-PAGE mit Coomassiefärbung auf Ausbeute und Reinheit untersucht. Geeignete Fraktionen wurden über der semipermeablen Membran eines Größenaus-

schlussfilters (Amicon Filter von Millipore, USA) aufkonzentriert.

#### 4.4.2. Affinitätschromatografie mit Heparin

**Waschpuffer:** 10 mM Na-Phosphat pH 7,0 (APP E2) bzw.

20 mM Tris/Cl, 50 mM NaCl pH 6,8 (APLP1 E1)

**Elutionspuffer:** 10 mM Na-Phosphat, 2 M NaCl pH 7,0 (APP E2) bzw.

20 mM Tris/Cl, 1 M NaCl pH 6,8 (APLP1 E1)

Das Zelllysate (APP E2) bzw. Eluat (APLP1 E1) wurde auf eine mit Waschpuffer äquilibrierte Heparin HyperD-Säule aufgetragen und anschließend mit dem 2-3-fachen Säulenvolumen gewaschen. Das Protein wurde mit einem kontinuierlichen Salzgradienten über das 2-5-fache Säulenvolumen eluiert, bis der Waschpuffer vollständig durch den Elutionspuffer ersetzt war.

#### 4.4.3. Affinitätschromatografie mit Blue-Sepharose®

**Waschpuffer:** 50 mM Tris/Cl pH 6,8

**Elutionspuffer:** 50 mM Tris/Cl, 2 M NaCl pH 6,8

100-600 ml Hefekulturüberstand wurden über 1-3 kombinierte, äquilibrierte 5 ml HiTrap Blue HP-Säulen gegeben, auf denen der blaue Farbstoff Cibacron Blue F3GA immobilisiert ist und mit dem 5-10-fachen Säulenvolumen Waschpuffer gespült. Die Elution erfolgte über einen linearen Salzgradienten über das 2-6-fache Säulenvolumen.

#### 4.4.4. Lektinaffinitätschromatografie

**Waschpuffer:** 20 mM Tris/Cl, 500 mM NaCl pH 7,2

**Elutionspuffer:** 20 mM Tris/Cl, 500 mM NaCl pH 7,2 mit 0,5 M Methyl- $\alpha$ -D-Mannose (E/M) bzw. 0,5 M Methyl- $\alpha$ -D-Glukose (E/G)

Um glykosyliertes und unglykosyliertes APLP1 E2 zu trennen, wurde eine Lektinaffinitätschromatografie mit Concanavalin A-Sepharose® ohne Verwendung des FPLC-Systems durchgeführt. Das Proteingemisch wurde auf die mit Waschpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen, in der Durchflussfraktion wurde das unglykosylierte Protein gesammelt. Die abgetrennten glykosylierten E2-Proteine wurden durch Waschen mit 3-fachem Säulenvolumen Elutionspuffer E/M und E/G eluiert.

#### 4.4.5. Kupfer-IMAC

**Waschpuffer:** 50 mM Natriumacetat, 1 M NaCl pH 6,8

**Elutionspuffer:** 50 mM Natriumacetat, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 6,8

#### 4. Material und Methoden

Chelatierende Sepharose® (Pharmacia, Freiburg) wurde mit Kupferchloridlösung beladen und ungebundene Kupferionen wurden mit destilliertem Wasser und Waschpuffer herunter gewaschen. Anschließend wurde eine IMAC im „batch“-Verfahren durchgeführt. 500 ml Hefekulturüberstand wurden eine Stunde mit 30 ml Cu<sup>2+</sup>-Sepharose® im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend auf eine Tropfsäule gegeben und mit dem 5-fachen Säulenvolumen gewaschen. Die Elution erfolgte mit dem 2-fachen Säulenvolumen Elutionspuffer.

##### 4.4.6. Zink-IMAC mit proteolytischem Verdau

**Waschpuffer:**     **W1:** 50 mM Natriumacetat, 100 mM NaCl pH 7,0

**W2:** 50 mM Natriumacetat, 500 M NaCl pH 7,0

**W3:** 50 mM Natriumacetat, 1 M NaCl pH 7,0

**Elutionspuffer:** 50 mM Natriumacetat, 10 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 7,0

200 µl chelatierende Sepharose® wurden in einer Minisäule mit Zink-Ionen beladen und mit Wasser gewaschen. Die Säule wurde mit Waschpuffer äquilibriert und mit 30 µg APLP1 E2-JMR beladen. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Säule mit 10-fachem Säulenvolumen W1 und anschließend mit 5-fachem Säulenvolumen 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat gewaschen. In die Säule wurde anschließend ein kurzes Stück 150 µl GluC- oder Trypsin-Lösung in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (je 10 ng/µl) einlaufen gelassen. Die Säule wurde an beiden Enden verschlossen und über Nacht bei 25°C (GluC) bzw. 37°C (Trypsin) unter Schütteln bei 80 rpm inkubiert. Der Durchfluss wurde gesammelt und anschließend wurden lose gebundene Peptide durch zweimaliges Waschen mit je 300 µl W1, W2 und W3 von der Säule entfernt. Die Zink-bindenden Peptide wurden zusammen mit dem Zink mit EDTA-haltigem Elutionspuffer von der Säule eluiert.

Für den Kontrollansatz wurden 15 µl APLP1 E2-JMR in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat umgepuffert und mit 0,75 µl GluC oder Trypsin bei 25°C bzw. 37°C über Nacht verdaut.

##### 4.4.7. Affinitätschromatografie mit Protein A

**Waschpuffer:**     20 mM Natriumphosphat pH 7,4

**Elutionspuffer:** 100 mM Natriumcitrat pH 3,0

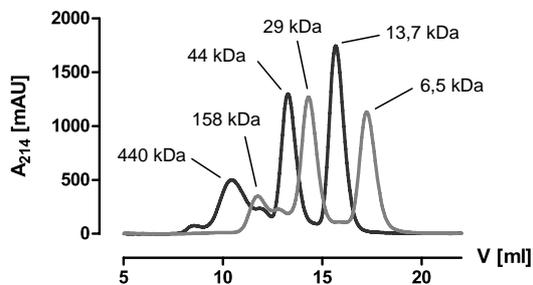
30 ml Antiserum mit α-APLP1 E2 Antikörper (DCRY) wurden auf eine in Waschpuffer äquilibrierte 1 ml Protein A-Sepharose®-Säule aufgetragen. Die gebundenen Antikörper wurden

mit 5 Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen und mit Elutionspuffer von dem Säulenmaterial gelöst. Das Antikörpereluat wurde sofort neutralisiert mit 1 M Tris/Cl pH 9,0, gegen PBS dialysiert und über einen Größenausschlussfilter aufkonzentriert. Der aufgereinigte Antikörper zeigte ein ca. 2-3-fach stärkeres Signal bei gleichem Hintergrund im Vergleich zu dem Antiserum.

#### 4.4.8. Größenausschlusschromatografie (SEC)

Größenausschlusssäulen wurden mit Laufpuffer äquilibriert und 2 ml (Superdex200) bzw. 400 µl (Superose12) Proteinlösung wurden bei Flussgeschwindigkeiten von 1,0 ml/min (Superdex200) bzw. 0,5 ml/min (Superose12) aufgetrennt. Präparative SECs wurden in PBS (APP E2 aus *E. coli*), 5 mM Tris/Cl, 300 mM NaCl pH 6,8 (E2-Proteine aus *P. pastoris*) oder 20 mM Tris/Cl, 1 M NaCl pH 6,8 (APLP1 E1) durchgeführt.

Für analytische SECs wurde als Laufpuffer 50 mM Natriumacetat, 150 mM NaCl pH 6,8 mit und ohne Zugabe von Zinkchlorid verwendet. Dabei wurden die analysierten Proteine zuvor in den SEC-Laufpuffer über Größenausschlussfilter umgepuffert. 4 µM Proteinlösung wurden 20 min bei Raumtemperatur mit oder ohne ZnCl<sub>2</sub> im Überkopfschüttler inkubiert. Vor dem Säulenauftrag wurde die Proteinlösung bei 20000xg, 10 min zentrifugiert und ggf. entstandenes Präzipitat (APLP2 E2, 200 µM ZnCl<sub>2</sub>) wurde verworfen.



**Abbildung 4.2.: Kalibrierung der Größenausschluss säule.** Dargestellt sind zwei exemplarische Kalibrierläufe aus je mind. drei unabhängigen Kalibrierläufen. Die Superose12-Säule wurde mit den Eichproteinen Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) kalibriert.

Das apparente Molekulargewicht des analysierten Proteins wurde durch Vergleich seines Elutionsvolumens mit den Elutionsvolumina verschiedener Proteinstandards ermittelt (siehe Abbildung 4.2; LMW und HMW Gel Filtration Calibration Kit, GE Healthcare, München). Dabei wurde eine Kalibriergerade aus den Verteilungskoeffizienten  $K_{av}$  der Eichproteine nach

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

gegen  $\log(\text{Molekulargewicht})$  erstellt mit  $V_0$ : Ausschlussvolumen,  $V_e$ : Elutionsvolumen,  $V_t$ : Säulenvolumen. Das Ausschlussvolumen der Säule wurde durch einen Lauf mit Blue Dextran ermittelt.

## 4.5. Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

### 4.5.1. Entsalzung und Aufkonzentrierung der Probe

Proteolytische Fragmente wurden an „reversed phase“ C18-Säulen in Pipettenspitzen (OMIX 100 µl Tips von Varian, USA) gebunden. Die C18-Säulen wurden nach Herstellerangaben präpariert und gewaschen und anschließend mit 100 µl 0,1%TFA in 70% Acetonitril eluiert und im Vakuumkonzentrator eingengt.

### 4.5.2. Probenvorbereitung und Messung

Proteinlösungen wurden im Verhältnis 1:1 mit gesättigter Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure-Lösung (CCA) in TA-Puffer (33% Acetonitril in 0,1% TFA) vermischt und auf die Probenplatte aufgetragen. Durch Evaporation des Lösungsmittels bildeten sich Matrix-Protein-Kristalle („dried droplet“-Methode).

Messungen erfolgten an einem Bruker Ultraflex II MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonic, Bremen) im Reflektor-Modus. Die Sequenz von Zink-bindenden Peptiden wurde durch die Aufnahme von Fragmentationenspektren mit der LIFT-Technologie (Bruker Daltonic, Bremen) bestätigt.

## 4.6. Proteinbiochemische Methoden

### 4.6.1. Peptidsynthese

Für die Immunisierung verwendete synthetische Peptide wurden von der Firma PSL (Heidelberg) hergestellt. Die Reinheit und das Molekulargewicht der Peptide wurde durch MALDI-MS überprüft.

### 4.6.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Proteinkonzentrationen von aufgereinigten Proteinen in Lösung wurden durch Messung der Extinktion bei 280 nm am NanoDrop (PEQLAB, Erlangen) bestimmt. Dabei wurde der molare Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm ( $\epsilon_{280nm}$ ) mit dem Programm ProtParam nach folgender Formel berechnet:

$$\epsilon_{280nm}(Protein) = N(Tyrosinreste) * 1490 + N(Tryptophanreste) * 5500 \\ + N(Disulfidbruecken) * 125$$

### 4.6.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

- SDS-Laufpuffer:** 0,1% (w/v) SDS, 190 mM Glycin, 25 mM Tris/Cl pH 6,8  
**4x Probenpuffer:** 200 mM Tris/Cl pH 6,8, 6,4% (w/v) SDS, 32% (v/v) Glycerin, 0,006% (w/v) Bromphenolblau, 20% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

Proteinlösungen wurden mit Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Es wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese in 8-15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen nach *Laemmli* (1970) durchgeführt bei konstant gehaltener Stromstärke von 15-30 mA pro Gel. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker „Dual Color Precision Plus<sup>TM</sup>“ verwendet (Bio-Rad, München).

### 4.6.4. Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie

Proteine in Polyacrylamidgelen wurden mit kolloidalem Coomassie mit der „GelCode Blue Safe Protein Stain“-Lösung (Thermo Scientific, Deutschland) nach Herstellerangaben gefärbt.

### 4.6.5. Western-Blot

- Transferpuffer:** 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 10% Ethanol (v/v)  
**ECL-Reagenz:** 1 ml A (0,25 mg/ml Luminol in 0,1 M Tris/Cl pH 8,6) + 0,3  $\mu$ l 35%-iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100  $\mu$ l B (1,1 mg/ml p-Hydroxycoumarinsäure in 20 ml DMSO)

Proteine aus einem Polyacrylamidgel wurden im Nass-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dabei wurde der Transfer bei 380 mA für drei Stunden oder bei 180 mA über Nacht durchgeführt. Die erfolgreiche Übertragung der Proteine wurde durch Färbung der Membran mit 2% Ponceaulösung kontrolliert.

Die Membran wurde anschließend mit 10% (w/v) Magermilchpulver in PBS-T (0,1% Tween-20) eine Stunde blockiert, kurz mit PBS gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper in der angegebenen Konzentration (siehe Antikörperliste in Abschnitt 4.1.3) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen und eine Stunde mit dem Zweitantikörper  $\alpha$ -Kaninchen-HRP inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T und einmaligem Waschen mit PBS für jeweils 10 min wurden die Antikörper-markierten Proteine mit ECL-Reagenz auf einem Röntgenfilm durch Chemolumineszenz detektiert.

## 4.7. Spektroskopische Methoden

### 4.7.1. Circular dichroismus-Messungen

Circular dichroismus (CD) ist die Eigenschaft von chiralen Molekülen links und rechts zirkular polarisiertes Licht bei bestimmten Wellenlängenbereichen unterschiedlich stark zu absorbieren. Sekundärstrukturelemente von Proteinen liefern charakteristische CD-Spektren im fernen UV-Bereich, die eine Abschätzung des Anteils verschiedener Sekundärstrukturelemente im Protein ermöglichen. CD-Spektren mit einem Maximum bei ca. 190 nm und Minima bei ca. 208 nm und 220 nm deuten auf eine von  $\alpha$ -Helices dominierte Sekundärstruktur hin, wohingegen ein Maximum bei ca. 195 nm und ein Minimum bei 215 nm auf eine  $\beta$ -Faltblatt-reiche Struktur hinweist.

Die CD-Spektren wurden im fernen UV-Bereich (195-240 nm) bei 20°C an einem J-810 Spektropolarimeter (JASCO, Japan) aufgenommen. In einer UV-Küvette (Schichtdicke:  $d = 0,1 \text{ cm}$ ) wurde das in 20 mM Natriumacetat, 100 mM NaCl pH 6,8 umgepufferte Protein (Konzentration:  $c = 10 \text{ }\mu\text{M}$ ) vorgelegt und mit Zinkchlorid versetzt. Spektren wurden als Mittelwert von drei Einzelmessungen bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 100 nm/min, 100 mdeg Sensitivität und einer Zeitkonstante von 1 sec aufgenommen. Die Proteinspektren wurden dabei mit dem Spektrum des Messpuffers um den Hintergrund korrigiert. Die gemessene Elliptizität bei einer bestimmten Wellenlänge  $\Theta_\lambda$  wurde mit der Anzahl der Aminosäuren ( $N$ ) verrechnet und als mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest  $[\Theta_\lambda]$  ausgedrückt:

$$[\Theta_\lambda] = \frac{\Theta(\lambda) \cdot 100}{c \cdot d \cdot N} \left( \frac{\text{grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right)$$

### 4.7.2. Oberflächenplasmonresonanz-Analysen

Bindung von Metallionen an rekombinante E2-Proteine wurde durch Änderung der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) an einem BIAcore3000-Gerät (GE Healthcare, München) ermittelt. Hierzu wurden die E2-Domänen in 10 mM Na-Acetat pH 5,0 (10 mM Na-Acetat pH 5,5 bei APP E2 aus *E. coli*) umgepuffert und durch Aminkopplung an die carboxymethylierte Dextranoberfläche eines SCB CMD500L-Sensorchips (XanTec, Düsseldorf) kovalent gebunden. Dabei wurde die Chipoberfläche mit einem Gemisch aus 1 Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert und die Kopplung nach Herstellerangaben durchgeführt. Absättigung von aktivierten Bindestellen erfolgte durch 1 M Ethanolamin (pH 8,5). Kopplung von APP E2 aus *E. coli* ergab einen Anstieg des SPR-Signals des Sensorchips um 6000 RU. Die Immobilisierung der aus Hefe aufgereinigten E2-Proteine führte zu einem Anstieg von ca. 3600 RU (APP E2), 3400 RU

#### 4.8. Kultivierung von eukaryotischen Zellen

(APLP1 E2) und 2900 RU (APLP2 E2) und erfolgte in drei Messzellen des gleichen Sensorchips.

Bindungsanalysen wurden in artifiziellem CSF (aCSF) mit 10 mM Hepes, 135 mM NaCl, 6 mM KCl und 5,5 mM Glukose pH 7,1 (pH 6,8 bei Kupfermessungen mit 20 mM Tris des aufgereinigten APP E2 aus *E. coli* und bei sämtlichen Kupfermessungen der aufgereinigten E2-Proteine aus *P. pastoris*) durchgeführt, wobei der Messpuffer ggf. Chelatoren für Zink (20 mM Citrat) und Kupfer (20 mM Tris) enthielt. Metallionen in der angegebenen Konzentration wurden in aCSF verdünnt und mit einer Flussgeschwindigkeit von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  bei 25°C injiziert. Die Assoziation und Dissoziation der Metallionen wurde gemessen und nach der Dissoziation wurden die Proteine auf der Chipoberfläche durch aufeinanderfolgende Injektionen von 3 mM EDTA und 10 mM HCl regeneriert.

Von den Messspektren wurde der Hintergrund subtrahiert, der durch gleichzeitige Messung einer Referenzzelle ohne gekoppeltes Protein ermittelt wurde.

### 4.8. Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen wurden in einem Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub>, 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

#### 4.8.1. HEK293-Zellen

##### Kultivierung

HEK293-Zellen wurden jeweils bei ca. 90% Konfluenz passagiert, indem die Zellen durch Trypsin/EDTA abgelöst und anschließend in einer 1:10 - 1:25-Verdünnung neu ausgesät wurden.

##### Transfektion

Zellen wurden in Zellkulturtestplatten je nach Anwendung auf Polystyrol (Zelllysate) oder Deckgläschen (Mikroskopie) bis zu einer Konfluenz von 70 - 80% wachsen gelassen und anschließend transfiziert. Die Transfektion erfolgte transient mit Fugene 6 (Roche, Schweiz) nach Herstellerangaben oder mit Polyethylenimin (PEI). Bei der Transfektion mit PEI wurde ein DNA-PEI-Gemisch im Massenverhältnis von 1:4-1:6 in OptiMEM® (Invitrogen, Karlsruhe) angesetzt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und zu den Zellen gegeben. Proteinexpression erfolgte für ca. 24 Stunden.

#### 4. Material und Methoden

##### Herstellung von Zelllysaten

**Lysepuffer:** 50 mM Tris/Cl pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% NP-40, Complete (Roche, Schweiz)

Zellkulturschalen mit transfizierten Zellen wurden auf Eis gestellt und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend 20 min in 250 µl Lysepuffer auf Eis inkubiert und in dem Lysepuffer aufgenommen. Unlösliche Komponenten wurden durch Zentrifugation (20000xg, 10 min, 4°C) vom Lysat getrennt.

##### 4.8.2. Primäre Neuronen

Die Untersuchungen an hippocampalen Rattenneuronen erfolgten im Labor von Michael Schaefer (Universität Leipzig). Die Isolation der Hippocampi aus den Gehirnen wurde hierbei von Helga Sobottka durchgeführt.

##### Präparation

Isolierte Hippocampi aus Gehirnen von Rattenembryonen (E19) wurden in eiskaltem HBSS aufgenommen. Das HBSS wurde durch Zentrifugation bei 80xg, 5 min entfernt, mit 1,5 ml Trypsin/EDTA ersetzt und 20-30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin entfernt und die Proteolyse wurde durch 5-minütige Inkubation mit 0,8 mg/ml Trypsininhibitor (Invitrogen, Karlsruhe) gestoppt. Durch 3-malige Zentrifugation (80xg, 5 min) bei jeweiliger Zugabe von DMEM + 10% FBS wurde der Trypsininhibitor entfernt und anschließend wurden die Hippocampi in 1,5 ml DMEM mit 10% FBS durch 30-maliges Pipettieren homogenisiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in Medium aufgenommen und anschließend ausgezählt.

##### Transfektion und Kultivierung

**Nährmedium:** 1:1-Gemisch aus Medium I (DMEM/F12 (Invitrogen, Karlsruhe) mit 0,3% Glukose, 20% FBS, 50 µg/ml Gentamicin, 15 mM HEPES/NaOH pH 7,3) und Medium II (Neurobasalmedium (Invitrogen, Karlsruhe) mit 2% B27-Supplement, 2 mM GlutaMAX™)

1-3·10<sup>6</sup> Zellen wurden pelletiert, in 100 µl Nucleofector®Solution inkl. Zusatz aus dem „Rat Neuron Nucleofector®Kit“ (Lonza, Schweiz) resuspendiert und mit 3 µg DNA versetzt. Der Transfektionsansatz wurde in die Küvette überführt und mit dem Programm O-003 durch Nucleofektion transfiziert. Die Zellen wurden sofort in 500 µl Medium I aufgenommen und auf Poly-D-Lysin-beschichtete Deckgläschen in 2 ml Nährmedium ausgesät.

## 4.9. Produktion von polyklonalen Antikörpern

### 4.9.1. Auswahl und Präparation der Antigene

Für die Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen die E2-Domänen von APP, APLP1 und APLP2 wurden mit den Programmen EMBOSS Antigenic und RankPep Abschnitte des Proteins mit hoher Antigenizität vorhergesagt und auf ihre Konservierung innerhalb der APP-Familie untersucht. Mit BLASTp wurden die Sequenzen auf mögliche Homologien zu anderen Proteinen getestet. Bei geeigneten Peptiden wurde an Hand der Kristallstruktur von APP E2 (*Wang und Ha, 2004*) analysiert, ob sie (oder homologe Bereiche des APP E2) an der Oberfläche der Proteindomäne lokalisiert sind und somit als Epitop der E2-Domäne bei nativer Faltung zugänglich wären. Bei diesen Analysen stellten sich folgende Abschnitte der E2-Domänen als geeignet für die Herstellung von Antikörpern heraus:

APP<sub>695</sub>: Aminosäuren 407-421, APLP1: 349-363, APLP2<sub>763</sub>: 485-495

Diese Sequenzen wurden mit einem C-terminalen Cysteinrest synthetisiert (PSL, Heidelberg). Über das C-terminale Cystein wurden die Peptide an aktiviertes Schlitzschnecken-Hämocyanin (KLH) gekoppelt („Imject® Maleimide Activated mCKLH Kit“ von Thermo Scientific, Deutschland), das als Trägermolekül für die Haptene diente. Mit den Entsalzersäulen des Kits wurden die Proteine in den mitgelieferten „Purification Buffer“ (APP), PBS mit 10% DMSO (APLP1) oder PBS mit 20% DMSO (APLP2) umgepuffert. Die gekoppelten Peptide wurden steril filtriert und anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

Zur Immunisierung mit der rekombinanten E2-Domäne von APP wurde das in *E. coli* exprimierte und aufgereinigte (vgl. Abschnitt 4.4) Protein verwendet.

### 4.9.2. Immunisierung und Gewinnung der Antiseren

100-150 µg Protein wurden 1:1 mit inkomplettem Freundschem Adjuvans gemischt und den Kaninchen in 2-3 Depots subcutan appliziert. Von dem APLP2-Peptid konnten auf Grund seiner geringen Löslichkeit nur 50 µg Protein eingesetzt werden. Es wurden vier Immunisierungen mit einem Abstand von jeweils vier Wochen durchgeführt.

17 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Kaninchen durch finale Herzpunktion entblutet, die maßgeblich von Christian Barucker (AG Multhaup) durchgeführt wurde. Das entnommene Blut wurde anschließend für zwei Stunden bei 37°C und dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 1200xg, 20 min wurde das Serum gewonnen und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Antiseren erfolgte bei -20°C. α-APLP1E2-Antiserum wurde über eine Protein A-Säule affinitätsgereinigt (vgl. Abschnitt

## 4. Material und Methoden

4.4.7).

### 4.10. Fluoreszenzmikroskopie und FRET-Messungen

Transfizierte Neuronen und HEK293-Zellen wurden 1 Tag nach Transfektion gemessen. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in auf 37°C vorgewärmtem aCSF (vgl. Abschnitt 4.7.2), das ggf. mit Metallionen oder EDTA versetzt wurde.

#### 4.10.1. LSM-Messungen

Die Lokalisation von fluoreszierenden Proteinen in der lebenden Zelle wurde an einem inversen konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy, Jena) untersucht. Die Anregung der YFP-Moleküle erfolgte mit einem Argon-Laser bei 488 nm, die Emission wurde mit einem Breitbandfilter bei 505 nm aufgenommen.

#### 4.10.2. Messung von Fluoreszenz in Zellkontakten

Die Lokalisation von APLP1-YFP in Zellkontaktbereichen wurde mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar) vor und 20 Minuten nach Spülen mit 50 µM ZnCl<sub>2</sub> in aCSF analysiert. Hierbei wurden die Pixelintensitäten in Zellkontaktbereichen, angrenzenden Plasmamembranregionen oder über die ganzen Zellen aufsummiert.

#### 4.10.3. FRET-Messungen

Die Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)-Messungen wurden an einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar) durchgeführt, wobei CFP- und YFP-Anregung über ein externes Filterrad gesteuert wurde. Die FRET-Messungen erfolgten nach der „sensitized emission“-Methode (Wouters *et al.*, 2001), bei welcher direkt die bei FRET auftretende Verschiebung eines Anteils der CFP-Emission in das YFP-Emissionsspektrum gemessen wird. Hierfür werden zur Berechnung des FRET-Werts die Intensitätswerte von drei Bildern bei gleicher Belichtungszeit aufgenommen: CFP ( $CFP_{Anregung}/CFP_{Emission}$ ), FRET ( $CFP_{Anregung}/YFP_{Emission}$ ), YFP ( $YFP_{Anregung}/YFP_{Emission}$ ). Daraus kann das korrigierte FRET-Signal an einer Position  $i$  nach

$$FRET_{korrr}(i) = \frac{FRET(i) - CFP(i) \cdot R_D - YFP(i) \cdot R_E}{YFP(i)}$$

berechnet werden (Wouters *et al.*, 2001). Der direkt gemessene FRET-Wert wird hierbei korrigiert um das Überstrahlen der CFP-Emission in den YFP-Emissions-Kanal ( $R_D$ ) und

um die Anregung von YFP-Molekülen im CFP-Anregungs-Kanal ( $R_E$ ) in Abwesenheit von FRET.  $R_D$  wurde erhalten durch Messung von CFP- und YFP-Emission einer Probe, die nur das Donor-Fluorophor enthielt und  $R_E$  wurde ermittelt durch Messung einer Probe, die nur das Akzeptor-Fluorophor enthielt. Die Berechnungen der FRET-Werte in markierten Regionen wurden mit dem SE FRET Wizard der LAS AF Application Suite (Leica Microsystems, Wetzlar) durchgeführt.

Für die FRET-Messungen wurde ein Perfusionssystem (Warner Instruments, USA) verwendet, das einen schnellen Austausch des Messpuffers der Zellen ermöglichte.

Für die Dosis-Wirkungs-Analysen wurden nach initialer Abschätzung des  $EC_{50}$ -Konzentrationsbereichs Messungen mit 0,3  $\mu\text{M}$  - 3 mM  $\text{ZnCl}_2$  bzw. 1  $\mu\text{M}$  - 10 mM  $\text{ZnCl}_2$  (bei  $EC_{50} > 30 \mu\text{M}$ ) durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen für 5 min mit  $\text{ZnCl}_2$  inkubiert, gefolgt von jeweils 30 s Spülen mit EDTA und 30 s Spülen mit aCSF ohne Zusatz, bevor die nächste Zinkinkubation erfolgte.  $\Delta FRET$  wurde ermittelt aus  $FRET_{Zink} - FRET_{nach\ EDTA} = \Delta FRET$  und gegen den Logarithmus der Zinkkonzentration aufgetragen. An die Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde mit einem Levenberg-Marquardt-Algorithmus in dem Programm Origin 6 eine 3-Parameter Hill-Gleichung genähert nach

$$y = A \cdot \frac{x^n}{k^n + x^n}$$

mit  $A$ :  $\Delta FRET_{max}$ ,  $n$ : Hill-Koeffizient,  $k$ :  $EC_{50}$ .

## 4.11. Statistische Analysen

Alle Daten sind als Messwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Sämtliche statistische Analysen wurden als Vergleiche von zwei Datensätzen durch den modifizierten t-test mit Welch's Korrektur durchgeführt.

#### 4. *Material und Methoden*

# Literaturverzeichnis

- Adlerz, L., M. Beckman, S. Holback, R. Tehranian, V. Cortés Toro, und K. Iverfeldt (2003), Accumulation of the amyloid precursor-like protein APLP2 and reduction of APLP1 in retinoic acid-differentiated human neuroblastoma cells upon curcumin-induced neurite retraction., *Brain Res Mol Brain Res*, 119(1), 62–72.
- Akatsu, H., A. Hori, T. Yamamoto, M. Yoshida, M. Mimuro, Y. Hashizume, I. Tooyama, und E. M. Yezdimer (2012), Transition metal abnormalities in progressive dementias., *Biometals*, 25(2), 337–350, doi:10.1007/s10534-011-9504-8.
- Alzheimer, A. (1907), Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde., *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin*, 64, 146–148.
- Assaf, S. Y., und S. H. Chung (1984), Release of endogenous Zn<sup>2+</sup> from brain tissue during activity., *Nature*, 308(5961), 734–736.
- Atwood, C. S., R. D. Moir, X. Huang, R. C. Scarpa, N. M. Bacarra, D. M. Romano, M. A. Hartshorn, R. E. Tanzi, und A. I. Bush (1998), Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis., *J Biol Chem*, 273(21), 12,817–12,826.
- Atwood, C. S., R. C. Scarpa, X. Huang, R. D. Moir, W. D. Jones, D. P. Fairlie, R. E. Tanzi, und A. I. Bush (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(3), 1219–1233.
- Auld, D. S. (2001), Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites, *Biometals*, 14(3), 271–313.
- Barker, W. W., et al. (2002), Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank., *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 16(4), 203–212.

## Literaturverzeichnis

- Barnham, K. J., et al. (2003), Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. a regulator of neuronal copper homeostasis., *J Biol Chem*, 278(19), 17,401–17,407.
- Baron, M. K., T. M. Boeckers, B. Vaida, S. Faham, M. Gingery, M. R. Sawaya, D. Salyer, E. D. Gundelfinger, und J. U. Bowie (2006), An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density., *Science*, 311(5760), 531–535, doi:10.1126/science.1118995.
- Bateman, R. J., et al. (2012), Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease., *N Engl J Med*, 367(9), 795–804.
- Bayer, T. A., K. Paliga, S. Weggen, O. D. Wiestler, K. Beyreuther, und G. Multhaup (1997), Amyloid precursor-like protein 1 accumulates in neuritic plaques in Alzheimer's disease., *Acta Neuropathol*, 94(6), 519–524.
- Behr, D., L. Hesse, C. L. Masters, und G. Multhaup (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(3), 1613–1620.
- Besser, L., E. Chorin, I. Sekler, W. F. Silverman, S. Atkin, J. T. Russell, und M. Hershfinkel (2009), Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus., *J Neurosci*, 29(9), 2890–2901, doi:10.1523/JNEUROSCI.5093-08.2009.
- Blennow, K., M. J. de Leon, und H. Zetterberg (2006), Alzheimer's disease., *Lancet*, 368(9533), 387–403.
- Brake, A. J., J. P. Merryweather, D. G. Coit, U. A. Heberlein, F. R. Masiarz, G. T. Mullenbach, M. S. Urdea, P. Valenzuela, und P. J. Barr (1984), Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(15), 4642–4646.
- Brocca, S., C. Schmidt-Dannert, M. Lotti, L. Alberghina, und R. D. Schmid (1998), Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase., *Protein Sci*, 7(6), 1415–1422.
- Bush, A. I., G. Multhaup, R. D. Moir, T. G. Williamson, D. H. Small, B. Rumble, P. Pollwein, K. Beyreuther, und C. L. Masters (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(22), 16,109–16,112.

- Bush, A. I., W. Pettingell, Jr, M. D. Paradis, und R. E. Tanzi (1994a), Modulation of A beta adhesiveness and secretase site cleavage by zinc., *J Biol Chem*, 269(16), 12,152–12,158.
- Bush, A. I., W. H. Pettingell, M. de Paradis, R. E. Tanzi, und W. Wasco (1994b), The amyloid beta-protein precursor and its mammalian homologues. evidence for a zinc-modulated heparin-binding superfamily., *J Biol Chem*, 269(43), 26,618–26,621.
- Bush, A. I., W. H. Pettingell, G. Multhaup, M. d Paradis, J. P. Vonsattel, J. F. Gusella, K. Beyreuther, C. L. Masters, und R. E. Tanzi (1994c), Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc., *Science*, 265(5177), 1464–1467.
- Cao, X., und T. C. Südhof (2001), A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60., *Science*, 293(5527), 115–120.
- Chen, C. P., S. Posy, A. Ben-Shaul, L. Shapiro, und B. H. Honig (2005), Specificity of cell-cell adhesion by classical cadherins: Critical role for low-affinity dimerization through beta-strand swapping., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(24), 8531–8536, doi:10.1073/pnas.0503319102.
- Chávez-Gutiérrez, L., et al. (2012), The mechanism of gamma-secretase dysfunction in familial Alzheimer disease., *EMBO J*, 31(10), 2261–2274, doi:10.1038/emboj.2012.79.
- Cleary, J. P., D. M. Walsh, J. J. Hofmeister, G. M. Shankar, M. A. Kuskowski, D. J. Selkoe, und K. H. Ashe (2005), Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function., *Nat Neurosci*, 8(1), 79–84.
- Collin, R. W. J., D. van Strien, J. A. M. Leunissen, und G. J. M. Martens (2004), Identification and expression of the first nonmammalian amyloid-beta precursor-like protein APLP2 in the amphibian *Xenopus laevis*., *Eur J Biochem*, 271(10), 1906–1912.
- Corbett, A., et al. (2012), Drug repositioning for Alzheimer’s disease., *Nat Rev Drug Discov*, 11(11), 833–846, doi:10.1038/nrd3869.
- Corrigan, F., C. L. L. Pham, R. Vink, P. C. Blumbergs, C. L. Masters, C. van den Heuvel, und R. Cappai (2011), The neuroprotective domains of the amyloid precursor protein, in traumatic brain injury, are located in the two growth factor domains., *Brain Res*, 1378, 137–143, doi:10.1016/j.brainres.2010.12.077.
- Coulson, E. J., K. Paliga, K. Beyreuther, und C. L. Masters (2000), What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function., *Neurochem Int*, 36(3), 175–184.

## Literaturverzeichnis

- Csenkér, E., P. Diószeghy, I. Fekete, und F. Mechler (1982), Ion concentrations in serum and cerebrospinal fluid of patients with neuromuscular diseases., *Arch Psychiatr Nervenkr*, *231*(3), 251–258.
- Dahms, S. O., S. Hoefgen, D. Roeser, B. Schlott, K.-H. Guhrs, und M. E. Than (2010), Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(12), 5381–5386, doi: 10.1073/pnas.0911326107.
- Dahms, S. O., I. Könnig, D. Roeser, K.-H. Gührs, M. C. Mayer, D. Kaden, G. Multhaupt, und M. E. Than (2012), Metal binding dictates conformation and function of the amyloid precursor protein (APP) E2 domain., *J Mol Biol*, *416*(3), 438–452, doi: 10.1016/j.jmb.2011.12.057.
- Daigle, I., und C. Li (1993), *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor., *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(24), 12,045–12,049.
- Diez-Roux, G., et al. (2011), A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo., *PLoS Biol*, *9*(1), e1000582, doi:10.1371/journal.pbio.1000582.
- Duce, J. A., et al. (2010), Iron-export ferroxidase activity of beta-amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer’s disease, *Cell*, *142*(6), 857–867, doi: 10.1016/j.cell.2010.08.014.
- Dugan, T. A., V. W.-C. Yang, D. J. McQuillan, und M. Höök (2003), Decorin binds fibrinogen in a Zn<sup>2+</sup>-dependent interaction., *J Biol Chem*, *278*(16), 13,655–13,662, doi: 10.1074/jbc.M300171200.
- Edbauer, D., E. Winkler, J. T. Regula, B. Pesold, H. Steiner, und C. Haass (2003), Reconstitution of gamma-secretase activity., *Nat Cell Biol*, *5*(5), 486–488.
- Eggert, S., K. Paliga, P. Soba, G. Evin, C. L. Masters, A. Weidemann, und K. Beyreuther (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*(18), 18,146–18,156.
- Ehmann, W. D., M. Alauddin, T. I. Hossain, und W. R. Markesbery (1984), Brain trace elements in Pick’s disease., *Ann Neurol*, *15*(1), 102–104, doi:10.1002/ana.410150119.

- Endres, K., R. Postina, A. Schroeder, U. Mueller, und F. Fahrenholz (2005), Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases., *FEBS J*, *272*(22), 5808–5820.
- Engel, S., S. Scolari, B. Thaa, N. Krebs, T. Korte, A. Herrmann, und M. Veit (2010), FLIM-FRET and FRAP reveal association of influenza virus haemagglutinin with membrane rafts., *Biochem J*, *425*(3), 567–573, doi:10.1042/BJ20091388.
- Gakhar-Koppole, N., P. Hundeshagen, C. Mandl, S. W. Weyer, B. Allinquant, U. Müller, und F. Ciccolini (2008), Activity requires soluble amyloid precursor protein alpha to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway., *Eur J Neurosci*, *28*(5), 871–882, doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06398.x.
- Glenner, G. G., und C. W. Wong (1984), Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein., *Biochem Biophys Res Commun*, *120*(3), 885–890.
- Goate, A., et al. (1991), Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease., *Nature*, *349*(6311), 704–706.
- Goedert, M., und M. G. Spillantini (2000), Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease., *Biochim Biophys Acta*, *1502*(1), 110–121.
- Goedert, M., und M. G. Spillantini (2006), A century of Alzheimer's disease., *Science*, *314*(5800), 777–781.
- Goodger, Z. V., L. Rajendran, A. Trutzel, B. M. Kohli, R. M. Nitsch, und U. Konietzko (2009), Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway., *J Cell Sci*, *122*(Pt 20), 3703–3714, doi:10.1242/jcs.048090.
- Grabrucker, A. M., et al. (2011), Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation., *EMBO J*, *30*(3), 569–581, doi:10.1038/emboj.2010.336.
- Graille, M., M. Pagano, T. Rose, M. R. Ravaux, und H. van Tilbeurgh (2010), Zinc induces structural reorganization of gelatin binding domain from human fibronectin and affects collagen binding., *Structure*, *18*(6), 710–718, doi:10.1016/j.str.2010.03.012.
- Gralle, M., M. G. Botelho, und F. S. Wouters (2009), Neuroprotective secreted amyloid precursor protein acts by disrupting amyloid precursor protein dimers., *J Biol Chem*, *284*(22), 15,016–15,025.

## Literaturverzeichnis

- Gralle, M., et al. (2006), Solution conformation and heparin-induced dimerization of the full-length extracellular domain of the human amyloid precursor protein., *J Mol Biol*, 357(2), 493–508.
- Guo, Q., H. Li, S. S. K. Gaddam, N. J. Justice, C. S. Robertson, und H. Zheng (2012), Amyloid precursor protein revisited: neuron-specific expression and highly stable nature of soluble derivatives., *J Biol Chem*, 287(4), 2437–2445, doi:10.1074/jbc.M111.315051.
- Hansson, M. D., K. Rzeznicka, M. Rosenbäck, M. Hansson, und N. Sirijovski (2008), PCR-mediated deletion of plasmid DNA., *Anal Biochem*, 375(2), 373–375, doi:10.1016/j.ab.2007.12.005.
- Harmeier, A., et al. (2009), Role of amyloid-beta glycine 33 in oligomerization, toxicity, and neuronal plasticity., *J Neurosci*, 29(23), 7582–7590.
- Hatta, K., T. S. Okada, und M. Takeichi (1985), A monoclonal antibody disrupting calcium-dependent cell-cell adhesion of brain tissues: possible role of its target antigen in animal pattern formation., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(9), 2789–2793.
- Heber, S., et al. (2000), Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members., *J Neurosci*, 20(21), 7951–7963.
- Herms, J., B. Anliker, S. Heber, S. Ring, M. Fuhrmann, H. Kretschmar, S. Sisodia, und U. Müller (2004), Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members., *EMBO J*, 23(20), 4106–4115.
- Hesse, L., D. Beher, C. L. Masters, und G. Multhaup (1994), The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper., *FEBS Lett*, 349(1), 109–116.
- Ho, A., und T. C. Südhof (2004), Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(8), 2548–2553.
- Hoe, H.-S., D. Wessner, U. Beffert, A. G. Becker, Y. Matsuoka, und G. W. Rebeck (2005), F-spondin interaction with the apolipoprotein E receptor ApoEr2 affects processing of amyloid precursor protein., *Mol Cell Biol*, 25(21), 9259–9268, doi:10.1128/MCB.25.21.9259-9268.2005.

- Hoe, H.-S., et al. (2008), The effects of amyloid precursor protein on postsynaptic composition and activity, *Journal of Biological Chemistry*, 284(13), 8495–8506, doi:10.1074/jbc.M900141200.
- Hoe, H.-S., et al. (2009), Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth, *Journal of Neuroscience*, 29(23), 7459–7473, doi:10.1523/JNEUROSCI.4872-08.2009.
- Hoopes, J. T., X. Liu, X. Xu, B. Demeler, E. Folta-Stogniew, C. Li, und Y. Ha (2009), Structural characterization of the E2 domain of APL-1, a *C. elegans* homolog of human amyloid precursor protein, and its heparin binding site., *J Biol Chem*, 285(3), 2165–73.
- Howell, B. W., L. M. Lanier, R. Frank, F. B. Gertler, und J. A. Cooper (1999), The disabled 1 phosphotyrosine-binding domain binds to the internalization signals of transmembrane glycoproteins and to phospholipids., *Mol Cell Biol*, 19(7), 5179–5188.
- Jonsson, T., et al. (2012), A mutation in APP protects against Alzheimer’s disease and age-related cognitive decline, *Nature*, 488(7409), 96–99, doi:10.1038/nature11283.
- Kaden, D. (2008), Homo- und Heterophile Oligomerisierung von APP, APLP1 und APLP2: Charakterisierung von Kontaktstellen und Cis- und Transinteraktionen, Dissertation, FU Berlin.
- Kaden, D., P. Voigt, L.-M. Munter, K. D. Bobowski, M. Schaefer, und G. Multhaup (2009), Subcellular localization and dimerization of APLP1 are strikingly different from APP and APLP2., *J Cell Sci*, 122(Pt 3), 368–377.
- Kaden, D., et al. (2008), Homophilic interactions of the amyloid precursor protein (APP) ectodomain are regulated by the loop region and affect beta-secretase cleavage of APP., *J Biol Chem*, 283(11), 7271–7279.
- Kang, J., und B. Müller-Hill (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(3), 1192–1200.
- Kang, J., H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, und B. Müller-Hill (1987), The precursor of Alzheimer’s disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor., *Nature*, 325(6106), 733–736.

## Literaturverzeichnis

- Kim, T. W., K. Wu, J. L. Xu, G. McAuliffe, R. E. Tanzi, W. Wasco, und I. B. Black (1995), Selective localization of amyloid precursor-like protein 1 in the cerebral cortex postsynaptic density., *Brain Res Mol Brain Res*, *32*(1), 36–44.
- Kitaguchi, N., Y. Takahashi, Y. Tokushima, S. Shiojiri, und H. Ito (1988), Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity., *Nature*, *331*(6156), 530–532, doi:10.1038/331530a0.
- Kolaskar, A. S., und P. C. Tongaonkar (1990), A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens., *FEBS Lett*, *276*(1-2), 172–174.
- Krezel, A., und W. Maret (2006), Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn., *J Biol Inorg Chem*, *11*(8), 1049–1062, doi:10.1007/s00775-006-0150-5.
- Kuhn, P.-H., H. Wang, B. Dislich, A. Colombo, U. Zeitschel, J. W. Ellwart, E. Kremmer, S. Rossner, und S. F. Lichtenthaler (2010), ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons., *EMBO J*, *29*(17), 3020–3032, doi:10.1038/emboj.2010.167.
- Kuhn, P.-H., et al. (2012), Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons., *EMBO J*, *31*(14), 3157–3168, doi:10.1038/emboj.2012.173.
- Kuperstein, I., et al. (2010), Neurotoxicity of Alzheimer's disease Abeta peptides is induced by small changes in the Abeta42 to Abeta40 ratio., *EMBO J*, *29*(19), 3408–3420, doi:10.1038/emboj.2010.211.
- Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature*, *227*(5259), 680–685.
- Lee, S., Y. Xue, J. Hu, Y. Wang, X. Liu, B. Demeler, und Y. Ha (2011), The E2 domains of APP and APLP1 share a conserved mode of dimerization., *Biochemistry*, *50*(24), 5453–5464, doi:10.1021/bi101846x.
- Levy-Lahad, E., et al. (1995), Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus., *Science*, *269*(5226), 973–977.
- Li, Q., und T. C. Südhof (2004), Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1., *J Biol Chem*, *279*(11), 10,542–10,550.
- Lorent, K., L. Overbergh, D. Moechars, B. De Strooper, F. Van Leuven, und H. Van den Berghe (1995), Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members

- of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein., *Neuroscience*, *65*(4), 1009–1025.
- López-Sánchez, N., U. Müller, und J. M. Frade (2005), Lengthening of G2/mitosis in cortical precursors from mice lacking beta-amyloid precursor protein., *Neuroscience*, *130*(1), 51–60, doi:10.1016/j.neuroscience.2004.09.020.
- Lu, Y. M., F. A. Taverna, R. Tu, C. A. Ackerley, Y. T. Wang, und J. Roder (2000), Endogenous Zn(2+) is required for the induction of long-term potentiation at rat hippocampal mossy fiber-CA3 synapses., *Synapse*, *38*(2), 187–197, doi:3.0.CO;2-R.
- Lyckman, A. W., A. M. Confaloni, G. Thinakaran, S. S. Sisodia, und K. L. Moya (1998), Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily proteins in the central nervous system., *J Biol Chem*, *273*(18), 11,100–11,106.
- Macauley-Patrick, S., M. L. Fazenda, B. McNeil, und L. M. Harvey (2005), Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system., *Yeast*, *22*(4), 249–270.
- Mannen, T., S. Yamaguchi, J. Honda, S. Sugimoto, A. Kitayama, und T. Nagamune (2001), Observation of charge state and conformational change in immobilized protein using surface plasmon resonance sensor., *Anal Biochem*, *293*(2), 185–193, doi:10.1006/abio.2001.5141.
- Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald, und K. Beyreuther (1985), Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome., *Proc Natl Acad Sci U S A*, *82*(12), 4245–4249.
- Mayer, M. C. (2009), Charakterisierung der Zink- und Kupferbindung in der E2-Domäne der Proteine der APP-Familie, Diplomarbeit, FU Berlin.
- Mayeux, R., und Y. Stern (2012), Epidemiology of Alzheimer disease., *Cold Spring Harb Perspect Med*, *2*(8), doi:10.1101/cshperspect.a006239.
- McKhann, G. M., et al. (2011), The diagnosis of dementia due to Alzheimer’s disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease., *Alzheimers Dement*, *7*(3), 263–269, doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.
- McNamara, M. J., C. T. Ruff, W. Wasco, R. E. Tanzi, G. Thinakaran, und B. T. Hyman (1998), Immunohistochemical and in situ analysis of amyloid precursor-like protein-1 and

## Literaturverzeichnis

- amyloid precursor-like protein-2 expression in Alzheimer disease and aged control brains., *Brain Res*, 804(1), 45–51.
- Minogue, A. M., A. K. Stubbs, C. S. Frigerio, B. Boland, J. V. Fadeeva, J. Tang, D. J. Selkoe, und D. M. Walsh (2009), gamma-secretase processing of APLP1 leads to the production of a p3-like peptide that does not aggregate and is not toxic to neurons., *Brain Res*, 1262, 89–99.
- Multhaup, G., H. Mechler, und C. L. Masters (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(4), 247–257.
- Multhaup, G., A. Schlicksupp, L. Hesse, D. Beher, T. Ruppert, C. L. Masters, und K. Beyreuther (1996), The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I), *Science*, 271(5254), 1406–1409.
- Munter, L.-M., et al. (2007), GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42., *EMBO J*, 26(6), 1702–1712.
- Okochi, M., S. Tagami, K. Yanagida, T. Kodama, S. Sano, T. Tomonaga, T. Saido, und M. Takeda (2012), Characterization of Brain APL2beta, an Abeta-like peptide produced from APLP2, in *Alzheimer's Association International Conference, Poster P4-338*.
- Pandya, M. J., G. M. Spooner, M. Sunde, J. R. Thorpe, A. Rodger, und D. N. Woolfson (2000), Sticky-end assembly of a designed peptide fiber provides insight into protein fibrillogenesis., *Biochemistry*, 39(30), 8728–8734.
- Pangalos, M. N., S. Efthimiopoulos, J. Shioi, und N. K. Robakis (1995a), The chondroitin sulfate attachment site of appican is formed by splicing out exon 15 of the amyloid precursor gene., *J Biol Chem*, 270(18), 10,388–10,391.
- Pangalos, M. N., J. Shioi, und N. K. Robakis (1995b), Expression of the chondroitin sulfate proteoglycans of amyloid precursor (appican) and amyloid precursor-like protein 2., *J Neurochem*, 65(2), 762–769.
- Parker, J. M., D. Guo, und R. S. Hodges (1986), New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and x-ray-derived accessible sites., *Biochemistry*, 25(19), 5425–5432.

- Parr, R. M., und D. M. Taylor (1964), The concentrations of cobalt, copper, iron and zinc in some normal human tissues as determined by neutron-activation analysis., *Biochem J*, *91*(3), 424–431.
- Pastorino, L., et al. (2004), BACE (beta-secretase) modulates the processing of APLP2 in vivo., *Mol Cell Neurosci*, *25*(4), 642–649.
- Peters, S., J. Koh, und D. W. Choi (1987), Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons., *Science*, *236*(4801), 589–593.
- Potekhin, S. A., T. N. Melnik, V. Popov, N. F. Lanina, A. A. Vazina, P. Rigler, A. S. Verdini, G. Corradin, und A. V. Kajava (2001), De novo design of fibrils made of short alpha-helical coiled coil peptides., *Chem Biol*, *8*(11), 1025–1032.
- Qi-Takahara, Y., et al. (2005), Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase., *J Neurosci*, *25*(2), 436–445.
- Que, E. L., D. W. Domaille, und C. J. Chang (2008), Metals in neurobiology: probing their chemistry and biology with molecular imaging., *Chem Rev*, *108*(5), 1517–1549.
- Reche, P. A., J.-P. Glutting, und E. L. Reinherz (2002), Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs., *Hum Immunol*, *63*(9), 701–709.
- Richter, L., et al. (2010), Amyloid beta 42 peptide (Abeta42)-lowering compounds directly bind to Abeta and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization., *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(33), 14,597–14,602, doi:10.1073/pnas.1003026107.
- Ring, S., et al. (2007), The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice., *J Neurosci*, *27*(29), 7817–7826, doi:10.1523/JNEUROSCI.1026-07.2007.
- Roher, A. E., J. D. Lowenson, S. Clarke, A. S. Woods, R. J. Cotter, E. Gowing, und M. J. Ball (1993a), beta-amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease., *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(22), 10,836–10,840.
- Roher, A. E., K. C. Palmer, E. C. Yurewicz, M. J. Ball, und B. D. Greenberg (1993b), Morphological and biochemical analyses of amyloid plaque core proteins purified from Alzheimer disease brain tissue., *J Neurochem*, *61*(5), 1916–1926.

## Literaturverzeichnis

- Rosen, D. R., L. Martin-Morris, L. Q. Luo, und K. White (1989), A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor., *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(7), 2478–2482.
- Rossjohn, J., et al. (1999), Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein., *Nat Struct Biol*, *6*(4), 327–331.
- Rusakov, D. A., und D. M. Kullmann (1998), Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation., *J Neurosci*, *18*(9), 3158–3170.
- Sambrook, J., E. Fritsch, und T. Maniatis (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*., New York, Cold Spring Harbor Press.
- Sandbrink, R., C. L. Masters, und K. Beyreuther (1994a), Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4-amyloid protein precursor-like proteins., *J Biol Chem*, *269*(19), 14,227–14,234.
- Sandbrink, R., C. L. Masters, und K. Beyreuther (1994b), Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons., *J Biol Chem*, *269*(2), 1510–1517.
- Sanger, F., S. Nicklen, und A. R. Coulson (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors., *Proc Natl Acad Sci U S A*, *74*(12), 5463–5467.
- Scheinfeld, M. H., E. Ghersi, K. Laky, B. J. Fowlkes, und L. D’Adamio (2002), Processing of beta-amyloid precursor-like protein-1 and -2 by gamma-secretase regulates transcription., *J Biol Chem*, *277*(46), 44,195–44,201.
- Scheuermann, S., B. Hamsch, L. Hesse, J. Stumm, C. Schmidt, D. Beher, T. A. Bayer, K. Beyreuther, und G. Multhaup (2001), Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer’s disease., *J Biol Chem*, *276*(36), 33,923–33,929.
- Schmitz, C., et al. (2004), Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease., *Am J Pathol*, *164*(4), 1495–1502.
- Sensi, S. L., P. Paoletti, J.-Y. Koh, E. Aizenman, A. I. Bush, und M. Hershfinkel (2011), The neurophysiology and pathology of brain zinc, *Journal of Neuroscience*, *31*(45), 16,076–16,085, doi:10.1523/JNEUROSCI.3454-11.2011.

- Shapiro, L., J. Love, und D. R. Colman (2007), Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity., *Annu Rev Neurosci*, *30*, 451–474, doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.113034.
- Shariati, S. A. M., P. Lau, B. A. Hassan, U. Müller, C. G. Dotti, B. De Strooper, und A. Gärtner (2013), APLP2 regulates neuronal stem cell differentiation during cortical development., *J Cell Sci*, doi:10.1242/jcs.122440.
- Sherrington, R., et al. (1995), Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer’s disease., *Nature*, *375*(6534), 754–760.
- Shi, X., T. Karkut, M. Chamankhah, M. Alting-Mees, S. M. Hemmingsen, und D. Hegedus (2003), Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*., *Protein Expr Purif*, *28*(2), 321–330.
- Shioi, J., M. N. Pangalos, J. A. Ripellino, D. Vassilacopoulou, C. Mytilineou, R. U. Margolis, und N. K. Robakis (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*(20), 11,839–11,844.
- Sievers, F., et al. (2011), Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega., *Mol Syst Biol*, *7*, 539, doi:10.1038/msb.2011.75.
- Sindreu, C., und D. R. Storm (2011), Modulation of neuronal signal transduction and memory formation by synaptic zinc., *Front Behav Neurosci*, *5*, 68, doi:10.3389/fnbeh.2011.00068.
- Small, D. H., V. Nurcombe, G. Reed, H. Clarris, R. Moir, K. Beyreuther, und C. L. Masters (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*(4), 2117–2127.
- Smith, E. E., und S. M. Greenberg (2009), Beta-amyloid, blood vessels, and brain function., *Stroke*, *40*(7), 2601–2606, doi:10.1161/STROKEAHA.108.536839.
- Soba, P., et al. (2005), Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion., *EMBO J*, *24*(20), 3624–3634.
- Su, A. I., et al. (2004), A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes., *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(16), 6062–6067, doi:10.1073/pnas.0400782101.
- Takami, M., Y. Nagashima, Y. Sano, S. Ishihara, M. Morishima-Kawashima, S. Funamoto, und Y. Ihara (2009), gamma-secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release

## Literaturverzeichnis

- from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment., *J Neurosci*, *29*(41), 13,042–13,052.
- Tallafuss, A., J. R. L. Constable, und P. Washbourne (2010), Organization of central synapses by adhesion molecules., *Eur J Neurosci*, *32*(2), 198–206, doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07340.x.
- Tanaka, H., W. Shan, G. R. Phillips, K. Arndt, O. Bozdagi, L. Shapiro, G. W. Huntley, D. L. Benson, und D. R. Colman (2000), Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity., *Neuron*, *25*(1), 93–107.
- Treiber, C., A. Simons, M. Strauss, M. Hafner, R. Cappai, T. A. Bayer, und G. Multhaup (2004), Clioquinol mediates copper uptake and counteracts copper efflux activities of the amyloid precursor protein of Alzheimer’s disease., *J Biol Chem*, *279*(50), 51,958–51,964.
- Tyan, S.-H., et al. (2012), Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function., *Mol Cell Neurosci*, *51*(1-2), 43–52, doi:10.1016/j.mcn.2012.07.009.
- Vallee, B. L., und K. H. Falchuk (1993), The biochemical basis of zinc physiology., *Physiol Rev*, *73*(1), 79–118.
- Vassar, R., et al. (1999), Beta-secretase cleavage of Alzheimer’s amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE., *Science*, *286*(5440), 735–741.
- Vogt, K., J. Mellor, G. Tong, und R. Nicoll (2000), The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses., *Neuron*, *26*(1), 187–196.
- von Koch, C. S., H. Zheng, H. Chen, M. Trumbauer, G. Thinakaran, L. H. van der Ploeg, D. L. Price, und S. S. Sisodia (1997), Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice., *Neurobiol Aging*, *18*(6), 661–669.
- Walsh, D. M., A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Condron, und D. B. Teplow (1997), Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate., *J Biol Chem*, *272*(35), 22,364–22,372.
- Walsh, D. M., D. M. Hartley, Y. Kusumoto, Y. Fezoui, M. M. Condron, A. Lomakin, G. B. Benedek, D. J. Selkoe, und D. B. Teplow (1999), Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates., *J Biol Chem*, *274*(36), 25,945–25,952.

- Walsh, D. M., I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan, und D. J. Selkoe (2002), Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo., *Nature*, *416*(6880), 535–539.
- Walsh, D. M., A. M. Minogue, C. S. Frigerio, J. V. Fadeeva, W. Wasco, und D. J. Selkoe (2007), The APP family of proteins: similarities and differences., *Biochem Soc Trans*, *35*(Pt 2), 416–420.
- Wang, P., et al. (2005), Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-like protein 2., *J Neurosci*, *25*(5), 1219–1225.
- Wang, Y., und Y. Ha (2004), The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain., *Mol Cell*, *15*(3), 343–353.
- Wang, Z., B. Wang, L. Yang, Q. Guo, N. Aithmitti, Z. Songyang, und H. Zheng (2009), Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis, *Journal of Neuroscience*, *29*(35), 10,788–10,801, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2132-09.2009.
- Wasco, W., K. Bupp, M. Magendantz, J. F. Gusella, R. E. Tanzi, und F. Solomon (1992), Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor., *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(22), 10,758–10,762.
- Wasco, W., S. Gurubhagavatula, M. D. Paradis, D. M. Romano, S. S. Sisodia, B. T. Hyman, R. L. Neve, und R. E. Tanzi (1993), Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor., *Nat Genet*, *5*(1), 95–100.
- Weyer, S. W., et al. (2011), APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP., *EMBO J*, *30*(11), 2266–2280, doi: 10.1038/emboj.2011.119.
- Wolfe, M. S., W. Xia, B. L. Ostaszewski, T. S. Diehl, W. T. Kimberly, und D. J. Selkoe (1999), Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity., *Nature*, *398*(6727), 513–517, doi:10.1038/19077.
- World Health Organization (2012), Dementia - A public health priority, World Health Organization and Alzheimer's Disease International, *WHO Library*.

## Literaturverzeichnis

- Wouters, F. S., P. J. Verveer, und P. I. Bastiaens (2001), Imaging biochemistry inside cells., *Trends Cell Biol*, 11(5), 203–211.
- Xue, Y., S. Lee, und Y. Ha (2011), Crystal structure of amyloid precursor-like protein 1 and heparin complex suggests a dual role of heparin in E2 dimerization., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(39), 16,229–16,234, doi:10.1073/pnas.1103407108.
- Yanagida, K., et al. (2009), The 28-amino acid form of an APLP1-derived Abeta-like peptide is a surrogate marker for Abeta42 production in the central nervous system., *EMBO Mol Med*, 1(4), 223–235, doi:10.1002/emmm.200900026.
- Young-Pearse, T. L., J. Bai, R. Chang, J. B. Zheng, J. J. LoTurco, und D. J. Selkoe (2007), A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference., *J Neurosci*, 27(52), 14,459–14,469.
- Young-Pearse, T. L., A. C. Chen, R. Chang, C. Marquez, und D. J. Selkoe (2008), Secreted APP regulates the function of full-length APP in neurite outgrowth through interaction with integrin beta1., *Neural Dev*, 3, 15.
- Zacharias, D. A., J. D. Violin, A. C. Newton, und R. Y. Tsien (2002), Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells., *Science*, 296(5569), 913–916, doi:10.1126/science.1068539.
- Zhang, Z., C. H. Lee, V. Mandiyan, J. P. Borg, B. Margolis, J. Schlessinger, und J. Kuriyan (1997), Sequence-specific recognition of the internalization motif of the Alzheimer’s amyloid precursor protein by the X11 PTB domain., *EMBO J*, 16(20), 6141–6150, doi: 10.1093/emboj/16.20.6141.
- Zheng, H., et al. (1995), beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity., *Cell*, 81(4), 525–531.
- Zheng, L., U. Baumann, und J.-L. Reymond (2004), An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol, *Nucleic acids research*, 32(14), e115, doi: 10.1093/nar/gnh110, PMID: 15304544.
- Zuber, B., I. Nikonenko, P. Klauser, D. Muller, und J. Dubochet (2005), The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52), 19,192–19,197, doi:10.1073/pnas.0509527102.



## A. Abkürzungsverzeichnis

Δ	Deletionsmutante
Aβ	Amyloid-β-Peptid
AcD	saurer Proteinbereich („acidic domain“)
aCSF	künstliches Liquor cerebrospinalis („artificial CSF“)
ADAM10	„a disintegrin and metalloproteinase“
AICD	„APP intracellular domain“
ALIDs	„APP like intracellular domains“
AOX	Alkoholoxidase
Aph-1	„anterior-pharynx-defective“
APL-1	APP-Homolog in <i>Caenorhabditis elegans</i>
APLP1	„amyloid precursor-like protein 1“
APLP2	„amyloid precursor-like protein 2“
APP	Amyloid-Vorläuferprotein („amyloid precursor protein“)
BACE	β-Sekretase („β site APP cleaving enzyme“)
BMGY	Medium zur Kultivierung von Hefen
BMMY	Hefeexpressionsmedium
BSA	bovines Serumalbumin
CCA	4-Hydroxy-α-cyano-Zimtsäure
CD	Circulardichroismus
cDNA	„complementary DNA“
CFP	blaues („cyan“) fluoreszierendes Protein
cLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CSF	Liquor cerebrospinalis
CTF	C-terminales Fragment
CuBD	Kupferbindende Domäne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
E19	19. Lebenstag des Embryos
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EDC	1 Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
ER	Endoplasmatisches Reticulum
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD	familiäre Alzheimerkrankheit („familial Alzheimer Disease“)
FCS	fetales Kälberserum
FLAG	Peptid“tag“
FLIM	„fluorescence lifetime imaging microscopy“
FPLC	schnelle Protein-Flüssig-Chromatografie („Fast protein liquid chromatography“)

FRAP	„Fluorescence Recovery after Photobleaching“
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GFLD	Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne („growth factor like domain“)
GluC	<i>Staphylococcus aureus</i> Protease V8
GypA	Glycophorin A
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEK293	menschliche embryonale Nierenzelllinie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie („high performance liquid chromatography“)
HRP	Meerrettich-Peroxidase („horseradish-peroxidase“)
IMAC	Affinitätschromatografie mit immobilisierten Metallionen
JMR	juxtamembrane Region
kDa	Kilodalton
KLH	Schlitzschnecken-Hämocyanin aus <i>Megathura crenulata</i>
KO	„knock-out“
KPI	Kunitz Protease Inhibitor
LB	Medium zur Kultivierung von Bakterien („lysogeny broth“)
LSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
LTP	Langzeitpotenzierung („long term potentiation“)
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MetOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MWCO	„molecular weight cut-off“
myr-palm-YFP	myristoyliertes und palmitoyliertes Peptid der Lyn-Kinase, fusioniert mit YFP
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OD	optische Dichte
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PDB	„Protein Data Bank“
PEI	Polyethylenimin
Pen-2	„presenilin enhancer“
PM	Plasmamembran
Prä-IS	Serum vor der Immunisierung
PSD	postsynaptische Dichte
SAM	synaptisches Adhäsionsmolekül
sAPLP	lösliches APP-ähnliches Protein („soluble amyloid precursor like protein“)
sAPP $\alpha$	lösliches Amyloid-Vorläuferprotein $\alpha$ („soluble amyloid precursor protein $\alpha$ “)
sAPP $\beta$	lösliches Amyloid-Vorläuferprotein $\beta$ („soluble amyloid precursor protein $\beta$ “)
SAXS	„small-angle X-ray scattering“
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium-dodecylsulfate“)
SDS-PAGE	Natriumdodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SE	„sensitized emission“
SEC	Größenausschlusschromatografie
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
shRNA	„short hairpin“ RNA
SLS	statische Lichtstreuung
SP	Signalpeptid
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Transmembransequenz
TOF	Flugzeit „time of flight“

## A. Abkürzungsverzeichnis

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultra-violett
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
W1,W2	Waschpuffer
v/v	Volumenprozent
YFP	gelbes („yellow“) fluoreszierendes Protein
YPD	Medium zur Kultivierung von Hefen
Zeo	Zeocin

## Ein- und Dreibuchstabencode der 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
X		beliebige Aminosäure außer Prolin
Y	Tyr	Tyrosin

## Einbuchstabencode der DNA-Basen

C	Cytosin
T	Thymin
A	Adenin
G	Guanin

## B. Publikationen

### Artikel:

Dahms, S. O., Könnig I., Roeser D., Gührs K.-H., **Mayer, M. C.**, Kaden D., Multhaup G. und Than, M. E. (2012), „Metal binding dictates conformation and function of the amyloid precursor protein (APP) E2 domain.“, *Journal of Molecular Biology*, 416(3), 438-452

### Artikel in Vorbereitung:

**Mayer, M. C.**, Kaden D., Schauenburg L., Voigt P., Röser D., Than M. E., Schaefer M., Multhaup G., „The E2 domain of APLP1 is a zinc sensor to influence oligomerization, processing and targeting of APLP1 to intercellular contacts“

### Konferenzbeiträge:

NetWorks! Symposium of GRK 1123 „Cellular Mechanisms of Learning and Memory Consolidation in the Hippocampal Formation“ in Berlin, 14.-16.09.2012,

Vortrag: **Magnus Mayer**, Daniela Kaden, Philipp Voigt, Michael Schaefer, Gerd Multhaup  
„Zinc induces oligomerization of APP family proteins“

Alzheimer's Association International Conference in Vancouver, Kanada, 14.-19.07.2012,

Poster: **Magnus C. Mayer**, Daniela Kaden, Lisa M. Munter, Michael Schaefer, Gerd Multhaup  
„Zinc-dependent oligomerization of APP family proteins“

Berlin Neuroscience Forum in Liebenwalde, 05.-06.07.2012,

Poster: **Magnus C. Mayer**, Daniela Kaden, Lisa M. Munter, Michael Schaefer, Gerd Multhaup  
„Zinc-ions modulate oligomerization of APP family proteins“

Berlin Brain Days in Berlin, 07.-09.12.2011,

Poster: **Magnus Mayer**, Daniela Kaden, Lisa M. Munter, Michael Schaefer, Gerd Multhaup  
„Zinc-dependent oligomerization of APLP1“

*B. Publikationen*

7<sup>th</sup> Fabisch Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology in Potsdam,  
05.-07.10.2011,

Poster: **Magnus Mayer**, Daniela Kaden, Lisa M. Munter, Michael Schaefer, Gerd Multhaup  
„Zinc-dependent oligomerization of APLP1“

6<sup>th</sup> Fabisch Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology in Berlin,  
24.-26.09.2009,

Poster: **Magnus Mayer**, Daniela Kaden, Gerd Multhaup  
„Biochemical characterization of the E2 domain of APP protein family members“

## C. Lebenslauf

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

*C. Lebenslauf*

## D. Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Gerd Multhaup bedanken für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema in einem fachlich wie menschlich herausragenden Team zu forschen. Besonders bedanke ich mich für die mir gewährten Freiheiten, meine Ideen umzusetzen sowie für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Markus Wahl danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen der AG Multhaup Lydia Alnajjar, Veit Althoff, Dr. Christian Barucker, Dr. Tobias Bethge, Gerd Buchlow, Paul Dembny, Dr. Vivienne Engelschalt, Dr. Murat Eravci, Susanne Fehse, Dr. Anja Harmeier, Dr. Daniela Kaden, Filip Liebsch, Dr. Lisa Münter, Felix Oestereich, Dr. Luise Richter, Clara Schäfer, Linda Schauenburg, Andrea Senge, Holger Sieg, Dr. Anne Siekhaus, Draginja Wagner, Dr. Chris Weise möchte ich mich sehr für die gute Zusammenarbeit in einer tollen Arbeitsatmosphäre und die vielen wertvollen Diskussionen bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. Daniela Kaden für die Einarbeitung am FRET-Mikroskop und an der Biacore, für den ständigen Austausch über den Laboralltag und über die großen Zusammenhänge, und nicht zuletzt für die Durchsicht dieser Arbeit. Für den sehr produktiven Austausch von Ideen, Zellysaten und für die Diskussionen über APLPs möchte ich mich auch bei Linda Schauenburg bedanken. Christian Barucker danke ich sehr für die wertvolle Hilfe bei der Herstellung der Antikörper. Bei Gerd Buchlow möchte ich mich für viele große und kleine Reparaturen und seine Zauberkräfte im Umgang mit technischen Geräten bedanken. Andrea Senge danke ich für die Unterstützung im Labor mit Gelen, Puffern und Bestellungen. Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen ehemaligen Mitarbeitersstudenten Nils Niggemann, Sandra Paschkowsky und Christopher Schlemm für die engagierte Unterstützung bei der Laborarbeit. Ganz besonders danke ich auch meinem ehemaligen Chemielaboranten-Azubi Michael Sonntag, der mit viel Engagement und Fleiß die Proteinexpression und -aufreinigung verbessert hat. Außerdem möchte ich Ulla Gerling aus der AG Koksich für die Hilfe bei den CD-Messungen danken.

#### *D. Danksagung*

Prof. Dr. Michael Schaefer danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen und besonders für die Möglichkeit, in seinem Labor mit Neuronen zu arbeiten und die Messungen am konfokalen Mikroskop durchzuführen. Seinen Mitarbeiterinnen Helga Sobottka, Dr. Astrid Tannert, Anke Klein und Dr. Kerstin Hill möchte ich für die vielen Hilfen und Tipps dabei danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Manuel Than und seinen Mitarbeitern Dr. Sven Dahms und Dr. Dirk Röser für die gute Zusammenarbeit an den E2-Domänen.

Prof Dr. Petra Knaus und ihren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern danke ich für die Möglichkeit in ihrem Zellkulturlabor mit Lentiviren zu experimentieren.

Auch meiner Familie möchte ich für die Unterstützung und die Sicherheit danken, die mir während des Studium und der Promotion gegeben wurde. Dabei geht mein Dank besonders an Antje und unseren Sohn Emil für die schöne Zeit, die wir zusammen haben.

## E. Erklärung der Selbstständigkeit

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich diese Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich versichere, dass diese Arbeit in dieser oder anderer Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Berlin, 4. April 2013

Magnus Mayer