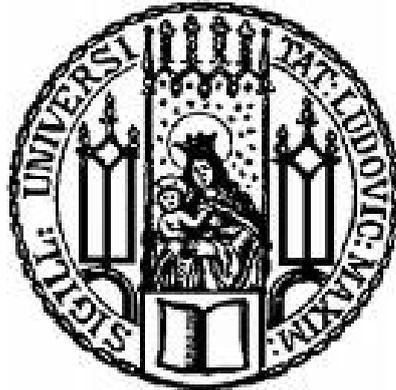


Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften



**Die Bedeutung der Endozytose  
für die proteolytische Spaltung des  
Amyloid Precursor Proteins**

vorgelegt von  
Stephanie Neumann  
aus Gräfelfing

München  
Dezember 2007

### Erklärung und ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den

---

(Stephanie Neumann)

Diese Arbeit wurde im Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität unter Anleitung von Dr. Stefan Lichtenthaler und Prof. Dr. Christian Haass durchgeführt, die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät für Biologie erfolgte durch Prof. Dr. Thomas Cremer.

Promotionsgesuch eingereicht: 19.12.2007

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2008

Erster Gutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Michael Schleicher

Sondergutachter: Prof. Dr. Christian Haass

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits teilweise in folgenden Publikationen veröffentlicht:

*A novel sorting nexin modulates endocytic trafficking and alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein*

Schöbel S, **Neumann S**, Hertweck M, Dislich B, Kuhn PH, Kremmer E, Seed B, Baumeister R, Haass C, Lichtenthaler SF.

*J Biol. Chemistry*, 2008 May 23;283(21):14257-68

*Amyloid precursor-like protein 1 influences endocytosis and proteolytic processing of the amyloid precursor protein*

**Neumann S**, Schöbel S, Jager S, Trautwein A, Haass C, Pietrzik CU, Lichtenthaler SF.

*J Biol. Chemistry*, 2006 Mar 17;281(11):7583-94

*Expression cloning screen for modifiers of amyloid precursor protein shedding*

Schöbel S, **Neumann S**, Seed B, Lichtenthaler SF.

*Int J Dev Neurosci*. 2006 Apr-May;24(2-3):141-8

<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1. <u>Die Alzheimer-Erkrankung</u></b>	<b>1</b>
1.1 Symptome der Alzheimer-Erkrankung	1
1.2 Neuropathologische Merkmale der Alzheimer-Erkrankung	2
1.3 Die Amyloidkaskade	3
1.4 Therapie der Alzheimer-Erkrankung	4
<b>2. <u>Das Amyloid-<math>\beta</math>-Vorläuferprotein</u></b>	<b>6</b>
2.1 Struktur und Funktion des Amyloid- $\beta$ -Vorläuferproteins	6
2.2 Subzellulärer Transport und proteolytische Spaltung von APP	7
2.2.1 Die $\alpha$ -Sekretase	9
2.2.2 Die $\beta$ -Sekretase	11
2.2.3 Die $\gamma$ -Sekretase	12
2.3 Endozytose von APP	14
2.4 APP Bindeproteine	17
<b>3. <u>Expressionsklonierung zur Identifizierung regulatorischer Proteine der APP-Spaltung</u></b>	<b>19</b>
<b>4. <u>Die Sorting-Nexin-Familie</u></b>	<b>21</b>
4.1 Membranassoziiierung der Sorting-Nexine	22
4.2 Sorting-Nexine vermitteln den endosomalen Proteintransport	23
<b>A. Zielsetzung</b>	<b>24</b>
<b>B. Material und Methoden</b>	<b>26</b>
<b>1. <u>Material</u></b>	<b>26</b>
1.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	26
1.2 Kits	28
1.3 Puffer	28
1.4 Antikörper	31
1.5 Säuger-Zelllinien	32
1.6 Plasmide	33
1.7 Oligonukleotide	37
1.8 Verbrauchsmaterial	40
1.9 Geräte	40

<b>2. Methoden</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>41</b>
2.1.1 Polymeraseketten Reaktion (PCR)	41
2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	41
2.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	42
2.1.4 Sequenzierung der DNA-Konstrukte	42
2.1.5 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	42
2.1.6 Dephosphorylierung von DNA	42
2.1.7 Ligation von DNA	43
2.1.8 Herstellung des kompetenten Bakterienstamms DH5 $\alpha$	43
2.1.9 Transformation des Ligationsproduktes in <i>E. coli</i>	43
2.1.10 Glyzerinkulturen von Bakterienklonen	44
2.1.11 Präparation von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi-Präp)	44
2.1.12 Isolierung von zellulärer RNA	44
2.1.13 Reverse Transkription (RT) von RNA	45
<b>2.2 Zellkultur</b>	<b>45</b>
2.2.1 Beschichtung von Kulturschalen mit Poly-L-Lysin	45
2.2.2 Kultivierung von Zellen	45
2.2.3 Transiente Transfektion mit rekombinanter DNA	45
2.2.4 Stabile Transfektion mit rekombinanter DNA	46
2.2.5 Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)	46
<b>2.3 Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>46</b>
2.3.1 Gewinnung von Gesamtproteinextrakten	46
2.3.2 Proteinkonzentration nach Bradford	47
2.3.3 Proteinkonzentration nach dem Bicinchonic Acid Assay (BCA-Assay)	47
2.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.3.5 Western Blot	48
2.3.6 Immunpräzipitation (IP) von Proteinen	49
2.3.7 Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität	50
2.3.8 Biotinylierung von Oberflächenproteinen	51
2.3.9 $\gamma$ -Sekretase Inhibition	51
<b>2.4 Immunfluoreszenz-basierte Methoden</b>	<b>52</b>
2.4.1 Herstellung und Auswertung eines Immunfluoreszenz-Präparates	52

2.4.2	APP-Antikörper-Endozytose-Assay	53
<b>D.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>
<b>1.</b>	<b><u>APLP1 als Stimulator der APP-Spaltung</u></b>	<b>56</b>
1.1	Die APP-Homologen stimulieren die Spaltung von AP-APP	56
1.2	APLP1 stimuliert die $\alpha$ -Sekretase Spaltung von endogenem APP	57
1.3	APLP1 hat keinen Einfluss auf stark überexprimiertes APP	58
1.4	Die zytoplasmatische Domäne von APLP1 induziert die APP-Spaltung	59
1.5	Die $\gamma$ -Sekretase-Aktivität ist nicht erforderlich für die APLP1-induzierte Zunahme der APP-Spaltung	62
1.6	Das zytoplasmatische GYENPXY-Motiv von APLP1 spielt eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung der APP-Spaltung	63
1.7	Das GYENPTY-Motiv der APLP1-zytoplasmatischen Domäne bindet Fe65	67
1.8	APLP1 inhibiert die Endozytose von APP	68
1.9	Die APLP1-vermittelte Stimulation der APP-Spaltung findet in Abhängigkeit von LRP statt	75
<b>2.</b>	<b><u>Die Sorting-Nexin-Untergruppe SNX9/18/33 beeinflusst die APP-Spaltung</u></b>	<b>77</b>
2.1	SNX33 bildet zusammen mit SNX9 und SNX18 eine SNX-Untergruppe	77
2.2	Nachweis der Expression einer bisher unbekanntes SNX18-Sequenz	78
2.3	SNX33 und SNX9 stimulieren die Ektodomänenspaltung von APP	83
2.4	SNX33 stimuliert nicht die Ektodomänenspaltung aller Typ-I-Transmembranproteine	83
2.5	Die SNX9/18/33-Untergruppe stimuliert die $\alpha$ -Spaltung von endogenem APP	85
2.6	Expression der SNX9/18/33-Untergruppe erhöht die Menge an Plasmamembran-APP	86
2.7	Die SNX9/18/33-Untergruppe verlangsamt die Endozytose von APP	88
2.8	Zelluläre Lokalisierung der SNX9/18/33-Untergruppe	93
2.9	SNX9 und SNX33 binden Dynamin	96

<b>E. Diskussion</b>	<b>98</b>
<b>1. <u>Effekte der Endozytosehemmung auf die</u></b>	
<b><u><math>\alpha</math>- und <math>\beta</math>-Sekretase-Spaltung von APP</u></b>	<b>98</b>
<b>2. <u>APLP1 konkurriert mit APP um Endozytose-relevante Proteine</u></b>	<b>103</b>
<b>3. <u>Exogenes SNX9/18/33 inhibiert die Dynamin-abhängige</u></b>	
<b><u>Endozytose</u></b>	<b>107</b>
<b>4. <u>Die Rolle der Endozytose für die Alzheimer-Krankheit</u></b>	<b>112</b>
<b>F. Zusammenfassung</b>	<b>114</b>
<b>G. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>116</b>
<b>H. Literaturverzeichnis</b>	<b>120</b>



## **A. Einleitung**

### **1. Die Alzheimer-Erkrankung**

Die Alzheimer-Erkrankung ist eine über Jahre fortschreitende Erkrankung des Gehirns, die vorrangig im Alter auftritt und durch die Abnahme der geistigen Leistungsfähigkeit gekennzeichnet ist. Sie wurde erstmals im Jahre 1906 durch den Neurologen Alois Alzheimer beschrieben (Alzheimer, 1907). Heute wissen wir, dass sie mit einem Anteil von über 60 % aller Demenzerkrankungen die häufigste Form der Demenz ist. Charakteristisch für eine Demenz ist die Abnahme von Gedächtnisleistung und Denkvermögen. Es werden zwei Formen der Alzheimer-Demenz (AD) unterschieden: die familiär vererbte AD und die sehr viel häufiger auftretende, sporadische AD. Bei der familiären AD beginnt die Krankheit aufgrund bestimmter Gendefekte schon zwischen dem 25. und dem 60. Lebensjahr. Diese Form der AD konnte weltweit in bisher 300 Familien nachgewiesen werden (Blennow et al., 2006). Größter Risikofaktor für die sporadische AD ist das Lebensalter. So verdoppelt sich der Anteil der Demenzkranken an der Bevölkerung im Abstand von jeweils 5 Altersjahren und nimmt von knapp über 1 % in der Altersgruppe der 65 bis 69-Jährigen auf mehr als 30 % unter den über 90-Jährigen zu ([http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/FactSheet\\_01\\_01.pdf](http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/FactSheet_01_01.pdf)). Aus diesem Grund wird die Zahl an Alzheimer-Patienten in Regionen mit steigender Lebenserwartung weiter anwachsen und zu einem immer größeren Problem werden.

#### **1.1 Symptome der Alzheimer-Erkrankung**

Die Alzheimer-Erkrankung wird entsprechend dem Schweregrad der Demenz in verschiedenen Stadien eingeteilt. Im ersten Stadium der milden oder frühen Demenz ist vor allem das Kurzzeitgedächtnis beeinträchtigt. Patienten erinnern sich nicht mehr an ein Gespräch oder Vorhaben und haben Schwierigkeiten neue Informationen zu behalten. In den nächsten Jahren schreitet die Krankheit zu einer mittelgradig schweren Demenz mit ausgeprägten Merkfähigkeits-, Orientierungs- und Sprachfindungsstörungen fort. Auch das korrekte Ausführen von alltäglichen Bewegungsabläufen bereitet zunehmend Probleme. Die Persönlichkeit und das Erscheinungsbild der Patienten können hingegen lange Zeit erhalten bleiben. Im weiteren Verlauf der Krankheit kommen Störungen von motorischen Funktionen wie Laufen und Handarbeit dazu. Die Patienten verändern sich emotional, verlieren Interesse an ihrer Umgebung und werden häufig aggressiv. Im letzten Stadium der schweren Demenz ist der Patient psychisch völlig desorientiert und auch seine motorischen Funktionen sind so

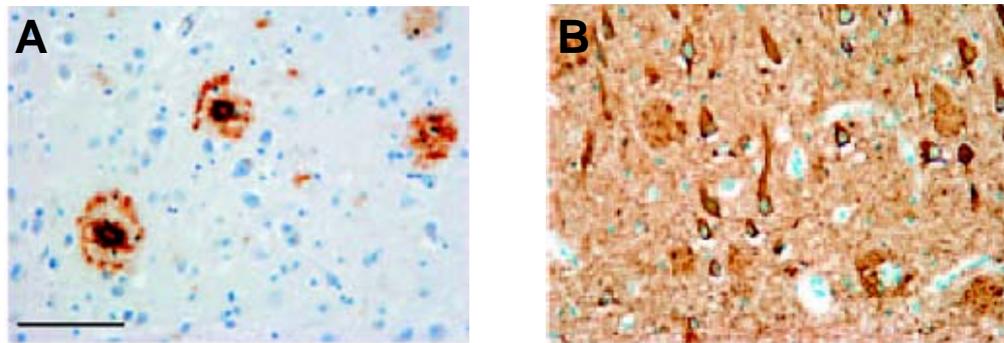
eingeschränkt, dass er zum Pflegefall wird. Häufigste Todesursache von Alzheimer-Patienten ist eine Infektion der Atemwege ([http://www.alzheimerforum.de/2/2/wdakude\\_k4.html](http://www.alzheimerforum.de/2/2/wdakude_k4.html)).

### **1.2 Neuropathologische Merkmale der Alzheimer-Erkrankung**

Die neuropathologische Diagnose der Alzheimer-Erkrankung erfolgt anhand von zwei charakteristischen Proteinablagerungen in Bereichen des limbischen und des assoziativen Kortex. Man nennt diese Ablagerungen neuritische Plaques und neurofibrilläre Bündel (Braak et al., 1996). Neuritische Plaques sind extrazelluläre Ablagerungen eines aggregierten Peptides, dem Amyloid- $\beta$ -Peptid ( $A\beta$ ) (Glennner and Wong, 1984; Masters et al., 1985). In neuritischen Plaques kommt  $A\beta$  vorrangig in einer 42 Aminosäure langen Form ( $A\beta_{42}$ ), die besonders leicht aggregiert (Jarrett et al., 1993; Lansbury, 1997) und zu einem geringen Anteil in einer 40 Aminosäure langen Form ( $A\beta_{40}$ ) vor.  $A\beta$  wird von Neuronen und Gliazellen unter physiologischen Bedingungen sezerniert (Busciglio et al., 1993; Golde et al., 1992; Haass et al., 1992; Seubert et al., 1993; Shoji et al., 1992) und kann sich aufgrund seiner hydrophoben Struktur zu  $\beta$ -Faltblattfibrillen zusammen lagern. Bei Alzheimer-Patienten bilden diese  $A\beta$ -Fibrillen den mikroskopisch dichten Amyloidkern neuritischer Plaques, der von veränderten Neuriten, degenerierten Nervenzellkörpern (Braak et al., 1996) und aktivierten Mikrogliazellen umgeben ist (Abb. 1A) (Pike et al., 1994). Neben neuritischen Plaques treten auch nicht-fibrilläre, amorphe  $A\beta$ -Ablagerungen auf, die man diffuse Plaques nennt. Sie enthalten nur  $A\beta_{42}$ , sind nicht von veränderten Neuronen und aktivierten Gliazellen umgeben und gelten als Vorstufe der neuritischen Plaques (Giaccone et al., 1989).

Neurofibrilläre Bündel sind das zweite neuropathologische Kennzeichen der Alzheimer-Erkrankung. Es handelt sich um intrazelluläre Ablagerungen des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau (Grundke-Iqbal et al., 1986). Unter nicht-pathologischen Bedingungen bindet Tau an Mikrotubuli und stabilisiert das axonale Zytoskelett von Neuronen. Im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung wird Tau hyperphosphoryliert und lagert sich zu 10 nm dicken, unlöslichen Filamenten zusammen, die in Paaren helikale Bündel bilden (Abb. 1B) (Friedhoff et al., 2000). Dies führt zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli und in Folge dessen zu einem reduzierten Stofftransport und einer gestörten Reizweiterleitung in den Neuronen. Die Ursache der Tau-Hyperphosphorylierung ist nicht vollständig verstanden. Man geht aber davon aus, dass sie sekundär zur Amyloidablagerung, als Folge von veränderten Kinase- und Phosphataseaktivitäten in geschädigten Neuronen stattfindet (Selkoe, 2001). Neben der Alzheimer-Erkrankung finden sich neurofibrilläre Bündel auch in anderen

neurodegenerativen Krankheiten, wie zum Beispiel der Frontotemporalen Demenz (Morris et al., 2001).



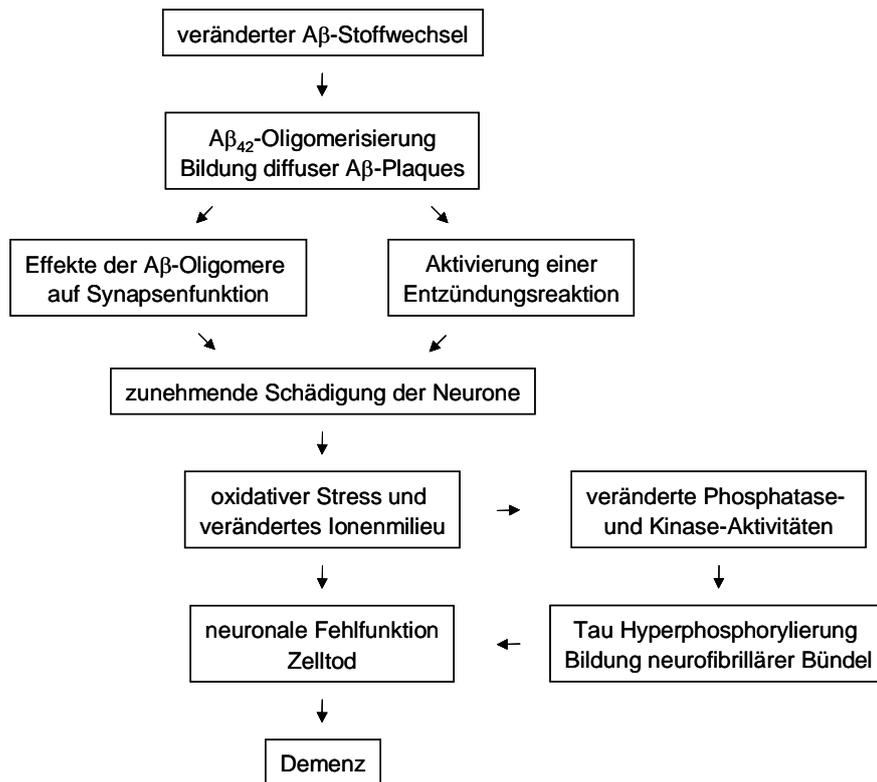
**Abb. 1 Histopathologische Charakteristika der Alzheimer-Demenz**

Hochauflösende mikroskopische Aufnahme  $A\beta$ -positiver neuritischer Plaques (A) und Tau-positiver neurofibrillärer Bündel und veränderter Neuriten (B). Der Größenmarker entspricht 100  $\mu\text{m}$  (aus: Haass and Selkoe, 2007)

### 1.3 Die Amyloidkaskade

Während die Symptome der Alzheimer-Erkrankung und deren neuropathologisches Erscheinungsbild schon seit 100 Jahren bekannt sind, haben wir erst in den letzten Jahren begonnen die Ursache und den Zusammenhang zwischen Plaquebildung und Gedächtnisverlust zu verstehen. Bedeutsam für neuartige Therapieansätze ist die Erkenntnis, dass die primär schädigende Wirkung nicht von Amyloidplaques ausgeht, sondern dass lösliche  $A\beta$ -Oligomere die eigentlich toxischen Species sind (Haass and Selkoe, 2007). Amyloidplaques dagegen bilden ein Reservoir für reaktive  $A\beta$ -Oligomere. Man fasst die Entstehung der Alzheimer-Krankheit in der sogenannten Amyloidkaskade (Haass and Selkoe, 2007; Hardy and Selkoe, 2002), die in Abbildung 2 dargestellt ist, zusammen. Am Anfang der Kaskade stehen Veränderungen im  $A\beta$ -Stoffwechsel, wie zum Beispiel eine vermehrte  $A\beta$ -Bildung, ein reduzierter Abbau von  $A\beta$  oder eine Verschiebung des  $A\beta$ -Gleichgewichts zugunsten von  $A\beta_{42}$ .  $A\beta_{42}$  lagert sich zu löslichen Oligomeren zusammen und bildet die ersten mikroskopisch sichtbaren, diffusen  $A\beta_{42}$ -Ablagerungen (Hardy and Higgins, 1992; Selkoe, 1991). Die  $A\beta_{42}$ -Oligomere beeinträchtigen die Reizweiterleitung an Synapsen (Kamenetz et al., 2003; Walsh et al., 2002) und verursachen vermutlich die Frühsymptome der Alzheimer-Erkrankung. Im nächsten Schritt wandeln sich diffuse Plaques durch  $A\beta$ -Fibrillenbildung in neuritische Plaques um. Die  $A\beta$ -Fibrillen der neuritischen Plaques aktivieren Mikrogliazellen und Astrozyten und lösen damit eine lokale Entzündungsreaktion aus, die die umliegenden Neurone schädigt. Zeichen dieser Neuronschädigung sind ein

verändertes intrazelluläres Ionenmilieu, oxidativer Stress und die Bildung neurofibrillärer Bündel durch Tau-Hyperphosphorylierung. Als Folge kommt es zu einer Reduktion von Synapsen und Nervenzellfortsätzen oder zum Absterben der betroffenen Nervenzellen. Warum die Ablagerung von A $\beta$  im Gehirn in Regionen der Gedächtnisbildung beginnt und erst später in anderen Regionen auftritt, ist bisher nicht verstanden.



**Abb. 2 Schematische Darstellung der Amyloidkaskade**  
(modifiziert nach: Haass and Selkoe, 2007)

#### 1.4 Therapie der Alzheimer-Erkrankung

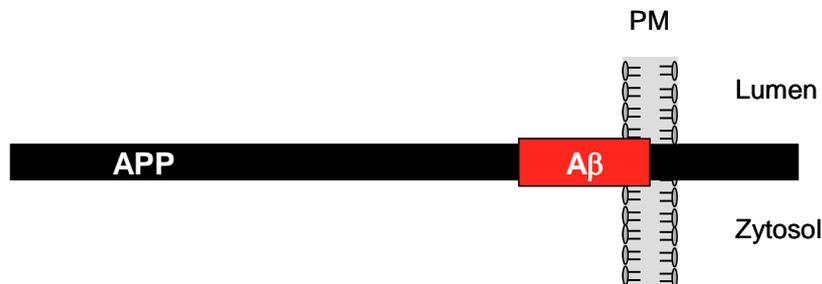
Da es bisher keinen wirksamen Ansatz gibt, die Bildung oder Ablagerung von A $\beta$  zu beeinflussen, zielen gängige Therapieansätze auf eine Verzögerung des Krankheitsverlaufs ab. Die frühen Symptome der Alzheimer-Demenz können durch bestimmte Arzneimittel gemildert werden. Dazu zählen Acetylcholinesterase-Inhibitoren und Glutamat-Antagonisten (Selkoe and Schenk, 2003). Aufgrund von Nervenzellschädigung herrscht an manchen Synapsen ein Mangel an dem Neurotransmitter Acetylcholin, an anderen Synapsen hingegen ein Überschuss an dem Neurotransmitter Glutamat. Mit Hilfe von Acetylcholinesterase-Inhibitoren wird der Abbau von Acetylcholin im synaptischen Spalt verzögert und somit eine bessere Reizweiterleitung ermöglicht. Glutamat-Antagonisten verhindern dagegen eine schädliche Überreizung von Glutamat-Rezeptoren anderer Neuronentypen.

Seit einigen Jahren wird intensiv an der Entwicklung von Wirkstoffen geforscht, die die Bildung von A $\beta$  reduzieren. Dabei wird eine direkte Inhibition der APP-spaltenden Proteasen beabsichtigt. In einem weiteren Ansatz versucht man die Lipidzusammensetzung der Zellmembranen so zu verändern, dass APP nicht mit den Proteasen kolokalisiert, die die Bildung von A $\beta$  katalysieren. Da bekannt ist, dass ein hoher Cholesteringehalt der Zellmembran die Spaltung von APP zu A $\beta$  begünstigt (Ehehalt et al., 2003; Fassbender et al., 2001) wird zum Beispiel an Cholesterin senkenden Wirkstoffen geforscht. Neuartige Therapieansätze beabsichtigen eine Reduktion der löslichen A $\beta$ -Oligomere. Dies könnte zum Beispiel durch die Entwicklung von Wirkstoffen, die die A $\beta$ -Aggregation (McLaurin et al., 2006) oder die Anlagerung von A $\beta$ -Oligomeren an die Zellmembran verhindern, erreicht werden. Untersucht werden auch Wirkstoffe, die die Bildung des schädlicheren A $\beta_{42}$  zugunsten nicht so schädlicherer, kürzerer A $\beta$ -Species verschieben (Weggen et al., 2001). Besonders viel versprechend sind erste Versuche A $\beta$ -Oligomere gezielt durch Immunisierung gegen A $\beta$  zu beseitigen. Sowohl in AD-Tiermodellen, als auch in ersten, noch vorläufigen klinischen Studien konnte eine Verbesserung der Alzheimer-Symptome nach A $\beta$ -Immuntherapie nachgewiesen werden (Hock et al., 2003; Nicoll et al., 2003; Schenk et al., 1999).

## 2. Das Amyloid- $\beta$ -Vorläuferprotein

### 2.1 Struktur und Funktion des Amyloid- $\beta$ -Vorläuferproteins

1987 ergaben molekularbiologische Untersuchungen, dass die A $\beta$ -Peptidsequenz Teil eines größeren Vorläuferproteins, dem *Amyloid  $\beta$  Precursor Protein* (APP) ist (Goldgaber et al., 1987; Kang et al., 1987; Robakis et al., 1987; Tanzi et al., 1987). A $\beta$  wird durch proteolytische Spaltung aus APP freigesetzt. APP ist ein Typ-I-Membranprotein mit einem Signalpeptid, einer großen N-terminalen Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. Die A $\beta$ -Sequenz beginnt in dem membrannahen Teil der Ektodomäne und endet innerhalb der Transmembrandomäne (Abb. 3).



**Abb. 3** Schematische Darstellung des Amyloid Precursor Proteins

(APP). Die A $\beta$ -Peptidregion ist in rot markiert. PM: Plasmamembran.

Durch alternatives Spleißen der APP-mRNA entstehen Isoformen aus 695, 751 und 770 Aminosäuren, wobei APP<sub>751</sub> und APP<sub>770</sub> vor allem in nicht-neuronalen Zellen exprimiert werden und APP<sub>695</sub> fast ausschließlich in neuronalen Zellen vorkommt (Wertkin et al., 1993). APP ist in der Evolution hoch konserviert und bildet zusammen mit den zwei homologen Genen für *APP-like Proteine-1* (APLP1) und APLP2 eine Genfamilie (Sprecher et al., 1993; Wasco et al., 1992). Während alle drei Proteine eine hohe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz in der zytoplasmatischen und der Ektodomäne aufweisen, enthält nur APP die A $\beta$ -Sequenz.

Obwohl seit vielen Jahren intensiv an APP und den APLPs geforscht wird, konnte deren physiologische Funktion bisher nicht eindeutig geklärt werden. Im Mausmodell resultiert der Verlust von nur einem Gen der APP-Familie in keinem auffälligen Phänotyp, wohingegen das kombinierte Ausschalten von APP und APLP2 oder APLP1 und APLP2 zum Tod der Mäuse nach der Geburt führt (Müller et al., 1998). Dies deutet auf eine wichtige Funktion der APP-Familie hin, die redundant von APLP2 und APP oder APLP2 und APLP1 ausgeführt werden kann. Untersuchungen im Tier- und in Zellkulturmodellen verweisen auf eine Rolle der APP-

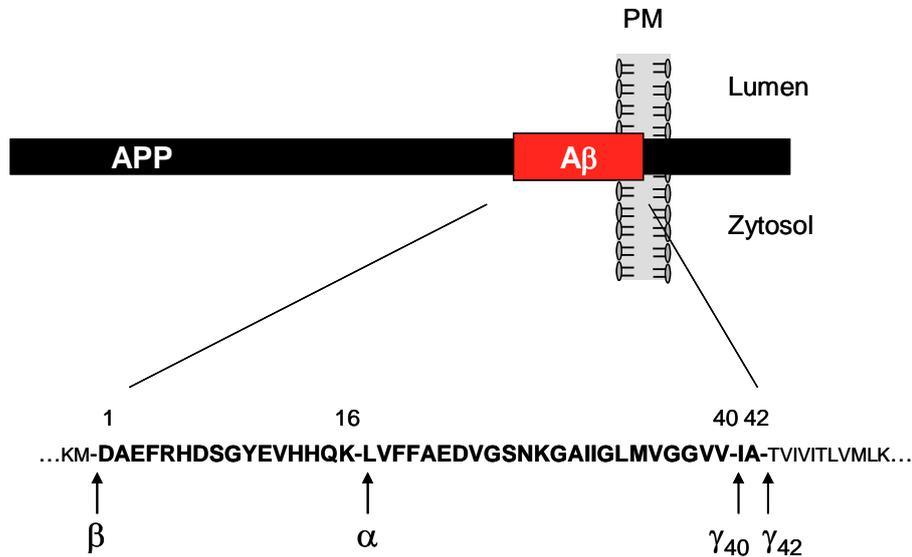
Familie in der Zelladhäsion und Zellmigration. So zeigen APP/APLP2 und APP/APLP1/APLP2 defiziente Tiere Störungen bei der Ausbildung von Synapsen und dem Wachstum von Neuriten (Herms et al., 2004). In zellbiologischen Studien konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Proteine der APP-Familie durch Homo- und Heterodimerisierung an der Plasmamembran Zell-Zellkontakte ausbilden und dadurch Zelladhäsion vermitteln (Soba et al., 2005). Da in APP-defizienten Nervenzellen mehr Synapsen pro Nervenzelle und ein Anstieg der synaptischen Aktivität beschrieben wurden, könnte APP auch für die synaptische Transmission von Bedeutung sein (Kamenetz et al., 2003). A $\beta$  scheint in diesen Prozessen eine wichtige modulatorische Rolle zu spielen (Priller et al., 2006). Und schließlich sind für eine Form der löslichen Ektodomäne von APP neuroprotektive und neurothrophe Funktionen beschrieben worden (Furukawa et al., 1996; Meziane et al., 1998; Stein et al., 2004). Eine erst kürzlich erschienene Studie in APP-transgenen Mäusen deutet sogar darauf hin, dass die lösliche APP-Ektodomäne allein die physiologische Funktion von APP vermitteln kann (Ring et al., 2007).

### **2.2 Subzellulärer Transport und proteolytische Spaltung von APP**

APP wird aufgrund seiner N-terminalen Signalsequenz in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert und auf seinem Weg zur Plasmamembran durch N- und O-Glykosylierung, durch Sulfatierung und Phosphorylierung weiter modifiziert (Selkoe, 1999; Weidemann et al., 1989). Nur etwa 30% der gebildeten APPe werden erfolgreich zur Plasmamembran geliefert, wo sie sehr schnell umgesetzt werden und deswegen eine kurze Halbwertszeit besitzen (Herreman et al., 2003; Knops et al., 1992; Weidemann et al., 1989). So kann APP an der Plasmamembran von Proteasen geschnitten und innerhalb weniger Minuten mittels Clathrin-abhängiger Endozytose in frühe Endosomen aufgenommen werden (Vetrivel and Thinakaran, 2006). Von den frühen Endosomen wird APP in Transportvesikeln zurück zur Plasmamembran transportiert (*Recycling*) (Koo and Squazzo, 1994; Perez et al., 1996) oder gelangt über späte Endosomen zum Lysosom, wo es durch lysosomale Proteasen abgebaut wird.

APP wird an der Plasmamembran und in den Endosomen von drei verschiedenen Proteasen geschnitten, die man  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase nennt. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase schneiden APP innerhalb der Ektodomäne nahe der Transmembrandomäne (Abb. 4). Dabei wird die Ektodomäne von APP als lösliches Fragment sezerniert (sAPP $\alpha$  oder sAPP $\beta$ ) und in der Membran bleibt ein verkürztes APP-C-terminales Fragment (CTF $\alpha$  oder CTF $\beta$ ) zurück. Diesen Prozess nennt man auch Ektodomänenspaltung. Entscheidend für die Entstehung der

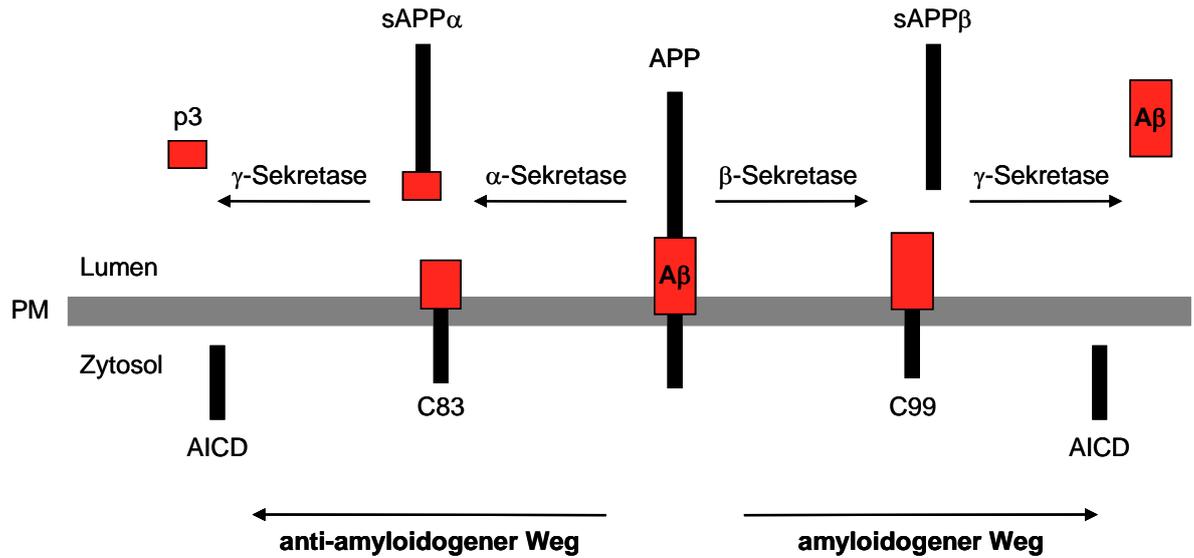
Alzheimererkrankung ist, dass die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase APP an unterschiedlichen Stellen schneiden. Nur der  $\beta$ -Sekretase-Schnitt führt zur Bildung des schädlichen A $\beta$ -Peptids. Der  $\alpha$ -Sekretase-Schnitt hingegen findet innerhalb der A $\beta$ -Peptidsequenz statt und zerstört so die A $\beta$ -Domäne.



**Abb. 4 Schematische Darstellung der Sekretase-Schnittstellen innerhalb der A $\beta$ -Peptidsequenz**

Schematische Darstellung der  $\alpha$ -Sekretase- ( $\alpha$ ),  $\beta$ -Sekretase- ( $\beta$ ) und  $\gamma$ -Sekretase-Schnittstellen ( $\gamma$ ) in der A $\beta$ -Peptidsequenz. Der  $\gamma$ -Sekretase-Schnitt findet an verschiedenen Positionen der A $\beta$ -Sequenz statt, wobei A $\beta$ -Fragmente unterschiedlicher Aminosäurelänge entstehen (A $\beta_x$ ). Die unterschiedlichen  $\gamma$ -Sekretase-Schnittstellen sind mit  $\gamma_x$  gekennzeichnet. Die A $\beta$ -Peptidsequenz ist fett dargestellt. Die Zahlen über der Sequenz geben die Aminosäureposition der A $\beta$ -Sequenz der Schnittstellen an. PM: Plasmamembran.

Das  $\alpha$ - oder  $\beta$ -geschnittene APP-C-terminale Fragment kann dann von der  $\gamma$ -Sekretase innerhalb der Transmembrandomäne geschnitten werden (Abb. 5). Wieder entstehen zwei Fragmente, ein kleines Peptid, das sezerniert wird (p3 im Falle von CTF $\alpha$  (Haass et al., 1993) oder A $\beta$  im Falle von CTF $\beta$ ) und die APP-intrazelluläre-Domäne (AICD), die als lösliches Fragment ins Zytosol gelangt (Sastre et al., 2001). p3 aggregiert im Gegensatz zu A $\beta$  nicht und wird schnell abgebaut. Der  $\alpha$ -Sekretase-katalysierte Weg, der nicht zur Entstehung von A $\beta$  führt, wird anti-amyloidogener Weg genannt. Der  $\beta$ -Sekretase-katalysierte Weg hingegen, der A $\beta$  bildet, wird als amyloidogener Weg bezeichnet.



**Abb. 5 Schematische Darstellung der proteolytischen Prozessierung von APP**

APP kann in zwei alternativen Wegen prozessiert werden. In dem anti-amyloidogenen Weg schneidet zuerst die  $\alpha$ -Sekretase die APP-Ektodomäne innerhalb der A $\beta$ -Sequenz. sAPP $\alpha$  wird sezerniert und in der Membran verbleibt ein C-terminales Fragment aus 83 Aminosäuren (C83) zurück. In dem amyloidogenen Weg schneidet die  $\beta$ -Sekretase APP an der N-terminalen Seite der A $\beta$ -Sequenz. Das gebildete sAPP $\beta$  wird sezerniert und ein Fragment aus 99 Aminosäuren (C99) verbleibt in der Membran. C83 und C99 werden anschließend innerhalb der Transmembrandomäne von der  $\gamma$ -Sekretase geschnitten. Im Falle von C83 wird p3 und im Falle von C99 A $\beta$  sezerniert. In beiden Fällen wird die APP intrazelluläre C-terminale Domäne (AICD) ins Zytosol freigesetzt.

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase konkurrieren um die Ektodomänenspaltung von APP (Skovronsky et al., 2000), wobei ein Großteil von APP durch die  $\alpha$ -Sekretase prozessiert wird. Außerdem finden der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase-Schnitt in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten statt. Während die  $\alpha$ -Sekretase APP im sekretorischen Weg an oder nahe der Plasmamembran schneidet (Sisodia, 1992), findet der  $\beta$ -Sekretase-Schnitt von endogenem APP vor allem im sauren Milieu der Endosomen statt (Haass et al., 1995b; Koo and Squazzo, 1994).

### 2.2.1 Die $\alpha$ -Sekretase

Die  $\alpha$ -Sekretase schneidet APP innerhalb der A $\beta$ -Domäne und verhindert so die Bildung von A $\beta$ . Das lösliche APP-Spaltfragment sAPP $\alpha$  wird sezerniert und besitzt neuroprotektive Wirkung (Furukawa et al., 1996; Meziane et al., 1998; Stein et al., 2004). Daher katalysiert die  $\alpha$ -Sekretase den nicht schädlichen, anti-amyloidogenen Prozessierungsweg von APP. Die  $\alpha$ -Sekretasen schneiden ihre Substrate unabhängig von einer bestimmten Aminosäurekonsensussequenz 12-13 Aminosäurereste von der Membran entfernt. Im Falle von APP findet der  $\alpha$ -Sekretase-Schnitt innerhalb der A $\beta$ -Domäne zwischen den Aminosäureresten Lys16 und Leu17 statt (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1990). Des

Weiteren weisen  $\alpha$ -Sekretase-Substrate eine  $\alpha$ -helikale Konformation im Bereich der Spaltstelle auf (Sisodia, 1992). Bisher wurden drei Enzyme mit  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität für APP identifiziert, die zur Familie der ADAM (A Disintegrin and Metalloproteinase) Proteinasen gehören, nämlich ADAM10 (Lammich et al., 1999), ADAM17/TACE (tumor necrosis factor- $\alpha$  convertase) (Buxbaum et al., 1998), und ADAM9 (Allinson et al., 2003). Die ADAM-Proteasen wiederum gehören zur Familie der Zinkmetalloproteasen. Sie sind Typ-I-Transmembranproteine mit einer Signalsequenz, einer Prodomäne, einer großen luminalen Domäne, die auch die katalytisch aktive Metalloproteasedomäne enthält, einer Transmembrandomäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (Seals and Courtneidge, 2003). Die Prodomäne enthält einen konservierten Cysteinrest, der das Zinkion der katalytischen Domäne koordiniert und die Metalloproteasedomäne in einer inaktiven Konformation hält. Im trans-Golgi wird die Prodomäne von einer Furin-ähnlichen Protease abgespalten und die ADAM-Protease aktiviert (Seals and Courtneidge, 2003). Die  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität findet daher vorrangig in den späten Kompartimenten des sekretorischen Weges und an der Plasmamembran statt (Sisodia, 1992). Die zytoplasmatische Domäne variiert am stärksten unter den verschiedenen ADAM-Proteasen. Sie enthält Motive der Protein-Protein Interaktion und dient der Signalweiterleitung und des zellulären Transports der ADAM-Proteasen. ADAM9, 10 und 17 besitzen zum Beispiel PxxP-Motive und phosphorylierbare Serine, Threonine und Tyrosinreste und bieten damit Bindestellen für SH3- und SH2-Domänen-enthaltende Proteine (Howard et al., 1999). Das menschliche Genom kodiert für 19 verschiedene ADAM-Proteasen, die zum Teil in unterschiedlichen Spleißvarianten vorkommen und oft nur gewebespezifisch exprimiert werden. ADAM9, 10 und 17 weisen allerdings ein breites Expressionsprofil auf und könnten daher potentiell in allen Geweben die APP-Ektodomäne spalten. Das aktive Zentrum der Metalloproteasedomäne besteht aus drei konservierten Histidinresten, die in dem HExxHxxGxxH Motiv liegen und einem Methioninrest, der in einer Schleife dem Histidinmotiv gegenüberliegt (Seals and Courtneidge, 2003). Nur 12 der 19 menschlichen ADAM-Proteasen enthalten dieses Motiv und sind deswegen potentiell aktive Proteasen. Die ADAM-Proteasen katalysieren die Ektodomänenspaltung von sehr verschiedenen Typ-I-Transmembranproteinen, zu denen Zytokine und Zytokinrezeptoren (TNF $\alpha$ ), Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (TGF $\alpha$ ), extrazelluläre Matrixproteine (Collagen IV), Adhäsionsproteinen und Proteine der Zellmigration und Zelldetermination (Notch, Delta) gehören. Aufgrund der Diversität und Vielzahl der ADAM-Substrate vermitteln ADAM-

Proteasen sehr unterschiedliche Funktionen in der Zelle (Seals and Courtneidge, 2003). Über die Regulation von ADAM-Proteasen ist nur sehr wenig bekannt. Man geht von einer konstitutiven und einer regulierbaren Aktivität aus. So führt z.B. eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und der Protein Kinase A (PKA) zu verstärkter ADAM-Aktivität (Felsenstein et al., 1994; Hung et al., 1993; Jacobsen et al., 1994; Nitsch et al., 1992).

### 2.2.2 Die $\beta$ -Sekretase

Die  $\beta$ -Sekretase schneidet APP am N-terminalen Ende der A $\beta$ -Domäne. Ein lösliches Fragment sAPP $\beta$  wird freigesetzt und in der Membran bleibt ein 99 Aminosäure langes APP-C-terminales Fragment (C99) zurück, das noch die gesamte A $\beta$ -Domäne enthält. Die  $\beta$ -Sekretase katalysiert so den ersten Schritt der schädlichen A $\beta$ -Bildung. 1999 konnte als zugehörige Protease APP cleaving enzyme 1 (BACE 1) identifiziert werden (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar, 2001; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). BACE1 gehört zur Familie der Pepsin-ähnlichen Aspartylproteasen, wobei BACE1 im Gegensatz zu anderen Aspartylproteasen eine membranverankerte Protease mit luminaler enzymatischer Aktivität ist. BACE1 ist ein 501 Aminosäure langes Typ-I Transmembranprotein, mit einem N-terminalen Signalpeptid, einer Prodomäne, einer großen katalytischen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer kleinen zytoplasmatischen Domäne. In der katalytischen Domäne befinden sich die für Aspartylproteasen charakteristischen Aminosäuresequenzen DTSG und DTGS (Hussain et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Im Gegensatz zur  $\alpha$ -Sekretase weist BACE1 eine hohe Substratspezifität auf. BACE1 erkennt das Aminosäuremotiv VKM\*DA in der APP Ektodomäne, wobei die Schnittstelle mit einem \* markiert ist (Citron et al., 1995). BACE1 besitzt ein pH-Optimum im leicht sauren Bereich bei pH 4,5-5,5. Als Folge findet der  $\beta$ -Sekretase-Schnitt von endogenem wildtyp APP vor allem im sauren Kompartiment der Endosomen und zu einem geringen Anteil im TGN statt (Haass et al., 1995a; Koo and Squazzo, 1994). In einer besonders früh beginnenden Variante der familiär vererbten Alzheimer-Demenz, der Schwedischen Mutation, in der die  $\beta$ -Sekretase Schnittstelle von VKMDA zu VNLDA mutiert ist, wird APP besonders gut von BACE1 gebunden und kann schon im ER geschnitten werden (Citron et al., 1992; Haass et al., 1995b; Vassar et al., 1999). BACE1 wird mit einem Propeptid in das Lumen des ER translatiert. Erst bei Verlassen des ERs wird die Prodomäne von einer Furin-ähnlichen Protease abgespalten (Capell et al., 2000). Der Transport von BACE1 in sekretorische Kompartimente wird über eine Bindung des

Sortierproteins Golgi-localized  $\gamma$ -ear-containing ARF-binding protein (GGA1) an das Dileucin Motiv DISLL in der zytoplasmatischen Domäne von BACE1 beeinflusst (He et al., 2002; Shiba et al., 2004; von Arnim et al., 2006; von Arnim et al., 2004). Über Serinphosphorylierung dieses Sortiermotivs kann die Interaktion von BACE1 und GGA1 moduliert werden (He et al., 2005; von Arnim et al., 2004). Auch der Transport von BACE1 innerhalb der endosomalen Kompartimente scheint über reversible Phosphorylierung der BACE1-zytoplasmatischen Domäne reguliert zu werden (Walter et al., 2001). Die BACE1-mRNA wird in den meisten Gewebetypen exprimiert, wobei die höchste BACE1-Aktivität in neuronalem Gewebe nachweisbar ist (Haass et al., 1992; Seubert et al., 1993). Neben einer transkriptionellen Regulation (Grilli et al., 1995; Sastre et al., 2006; Toliver-Kinsky et al., 2000), wird die BACE1-Expression zusätzlich auf translationaler Ebene reguliert, indem sowohl Guanin- und Cytosin-reiche Abschnitte als auch mehrere ATG-Codons der BACE1-5'UTR die Translationseffizienz der BACE1-mRNA reduzieren (De Pietri Tonelli et al., 2004; Lammich et al., 2004; Rogers et al., 2004).

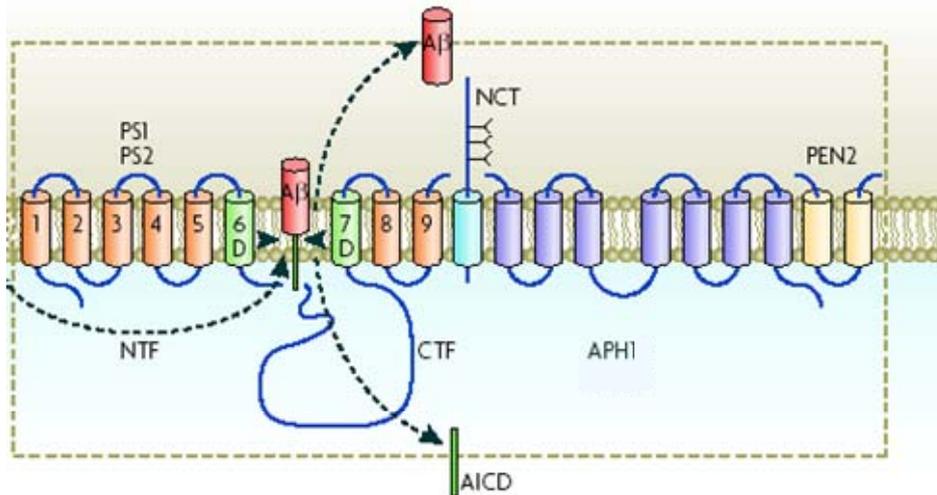
Neben APP wurden als weitere BACE1 Substrate unter anderem, P-Selektin-Glykoprotein Ligand-I (PSGL-I) (Lichtenthaler et al., 2003), die Sialyltransferase ST6 GalI (Kitazume et al., 2001) und LRP (low density lipoprotein receptor-related protein) (von Arnim et al., 2005) identifiziert. Die physiologische Funktion von BACE1 konnte erst kürzlich genauer definiert werden. So belegen neueste Erkenntnisse in BACE1-defizienten Mäusen eine Rolle von BACE1 in der Prozessierung von Neuregulin und damit der Myelinisierung des peripheren Nervensystems (Hu et al., 2006; Willem et al., 2006).

### 2.2.3 Die $\gamma$ -Sekretase

Die  $\alpha$ -Sekretase- oder  $\beta$ -Sekretase-Aktivität katalysiert zuerst die Abspaltung der APP-Ektodomäne. Die in der Membran zurückbleibenden C-terminalen Fragmente von APP werden dann innerhalb der Transmembranregion von der  $\gamma$ -Sekretase geschnitten. Im Falle des von der  $\beta$ -Sekretase vorgeschrittenen C99 führt der  $\gamma$ -Sekretase-Schnitt zur Freisetzung von A $\beta$ . Der  $\gamma$ -Sekretase-Schnitt weist keine strenge Sequenzspezifität auf, sondern kann an mehreren Stellen der APP-Transmembranregion stattfinden (Esler and Wolfe, 2001). Es entstehen deswegen A $\beta$ -Fragmente unterschiedlicher Aminosäurelänge, wobei A $\beta$ <sub>42</sub> etwa 10 % der Gesamtmenge von A $\beta$  ausmacht, während 90 % des gebildeten A $\beta$  auf A $\beta$ <sub>40</sub> fallen. Da A $\beta$ <sub>42</sub> mehr hydrophobe Aminosäurereste enthält, zeigt A $\beta$ <sub>42</sub> die höchste Aggregationsbereitschaft unter den A $\beta$ -Fragmenten (Jarrett et al., 1993). In den letzten Jahren

wurde die Identität der  $\gamma$ -Sekretase geklärt. Es handelt sich um einen hochmolekularen Proteinkomplex (Capell et al., 1998; Li et al., 2000; Yu et al., 1998), der bestehend aus den vier Transmembranproteinen, Presenilin (PS), Nicastrin (NCT) (Yu et al., 2000), PEN-2 und APH-1 (Francis et al., 2002; Goutte et al., 2002) volle Aktivität besitzt (Edbauer et al., 2003) (Abb. 6). PS ist die katalytisch aktive Untereinheit der  $\gamma$ -Sekretase und gehört zur Familie der GxGD-Aspartylproteasen (Haass and Steiner, 2002; Wolfe, 2006). Sie schneiden ebenso wie Proteine der Signalpeptid-Peptidasefamilie, der Rhomboidfamilie und der Site-2-Protease-Familie ihre Substrate innerhalb der Transmembranregion und werden deswegen auch *intramembrane cleaving Proteases* oder *i-ClePs* genannt (Weihofen and Martoglio, 2003). Es existieren zwei Spleißvarianten von PS, die man mit PS1 und PS2 bezeichnet. Sowohl PS1 als PS2 enthält 9 Transmembrandomänen (TMD) (Henricson et al., 2005; Laudon et al., 2005; Oh and Turner, 2005) wobei durch Endoproteolyse ein N-terminales Fragment aus TMD 1-6 und ein C-terminales Fragment aus TMD 7-9 gebildet wird (Thinakaran et al., 1996). Die katalytisch aktiven Aspartatreste sind in TMD 6 und 7 enthalten (Steiner and Haass, 2000; Wolfe et al., 1999). Im ER wird PS durch Anlagerung an einen schon vorgeformten Komplex aus NCT und APH-1 (LaVoie et al., 2003) stabilisiert. Erst nachdem sich Pen-2 an diesen trimeren Komplex angelagert hat, findet die Endoproteolyse des PS-Holoproteins statt (Luo et al., 2003; Takasugi et al., 2003), wobei Pen2 die entstandenen C- und N-terminalen Presenilinfragmente stabilisiert (Prokop et al., 2005; Prokop et al., 2004). Nach vollständiger Assemblierung im ER wird der  $\gamma$ -Sekretase-Komplex zur Plasmamembran transportiert. Die  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität ist an der Plasmamembran und in endosomalen und lysosomalen Kompartimenten nachweisbar (Chyung et al., 2005; Kaether et al., 2006b; Pasternak et al., 2003). Neben APP sind weitere Substrate des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes identifiziert worden. Dazu zählen Notch, APLP1 und APLP2, ErbB4, E- und N-Cadherine, LRP *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP), CD44 (Kopan and Ilagan, 2004) und der Interleukin-1 Rezeptor II (IL-1R2) (Kuhn et al., 2007). Da  $\gamma$ -Sekretase-defiziente Mäuse einen Notch ähnlichen Phänotyp mit embryonalen Entwicklungsschäden aufweisen, geht man davon aus, dass  $\gamma$ -Sekretase-vermittelte Spaltung von Notch besonders kritisch für die Embryonalentwicklung ist (Shen et al., 1997; Wong et al., 1997).  $\gamma$ -Sekretase-Substrate sind ausschließlich Typ-I-Transmembranproteine, die durch vorangegangene Ektodomänenspaltung nur noch als C-terminale Fragmente mit relativ kurzen luminalen Domänen vorliegen (Struhl and Adachi, 2000). Man nimmt an, dass die große luminaire Domäne von NCT den N-Terminus der  $\gamma$ -Sekretase-Substrate bindet und erst ab einer bestimmten Größe

als Substrat akzeptiert (Shah et al., 2005). Des Weiteren ist für APP bekannt, dass auch der membrannaher Anteil der APP-luminalen Domäne kritisch für die Interaktion zwischen Substrat und  $\gamma$ -Sekretase ist (Ren et al., 2007). Aufgrund der Diversität der  $\gamma$ -Sekretase-Substrate geht man davon aus, dass die  $\gamma$ -Sekretase selbst eine generelle Funktion in der Zelle erfüllt und für den Abbau von membranverankerten Fragmenten von Typ-I-Transmembranproteinen verantwortlich ist.



**Abb. 6 Vereinfachte Darstellung des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes**

Presenilin, Nicastrin, PEN2 und Aph1 bilden den katalytisch aktiven  $\gamma$ -Sekretase-Komplex. Durch die Intramembranproteolyse von C99 durch die  $\gamma$ -Sekretase wird A $\beta$  freigesetzt. ICD: Intrazelluläre Domäne, CTF: C-terminales Fragment, NTF: N-terminales Fragment (aus: Haass and Selkoe, 2007).

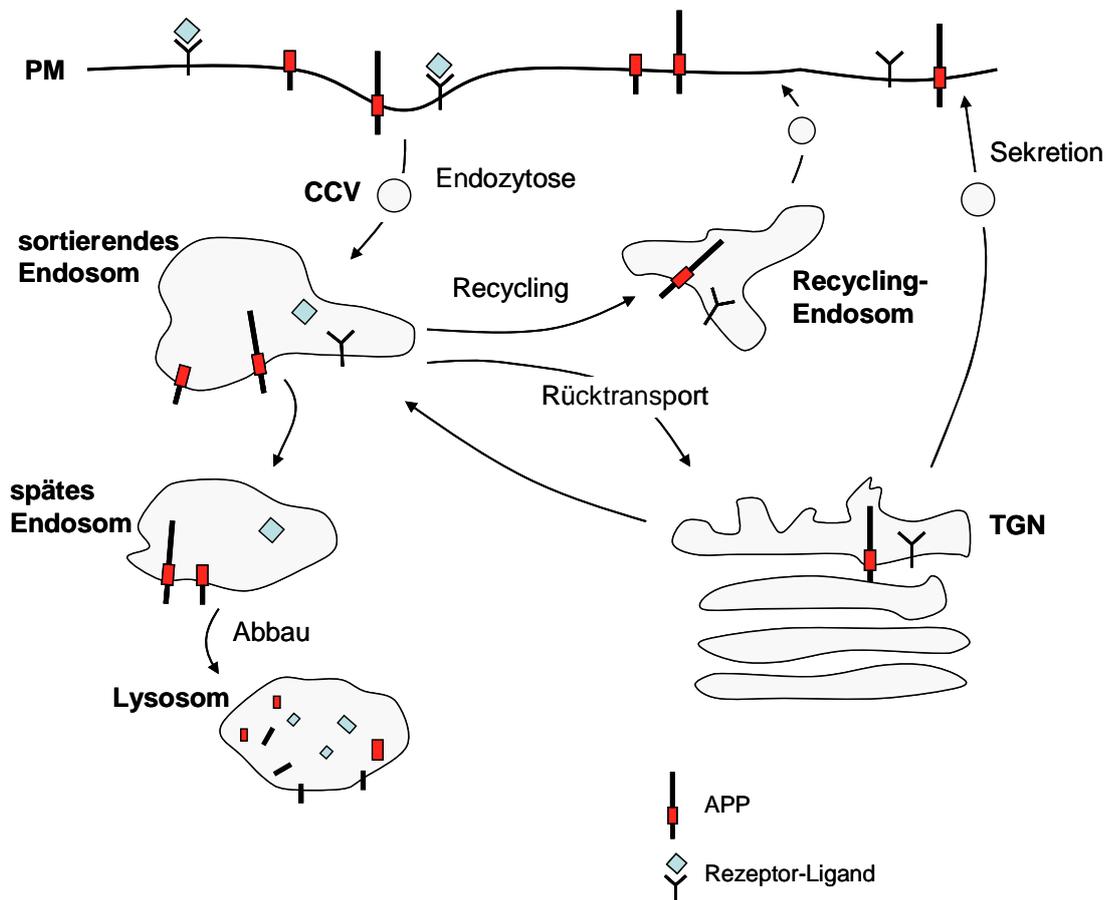
### 2.3 Endozytose von APP

Für die Bildung von A $\beta$  ist es essentiell, ob APP dem  $\alpha$ -Sekretase-Prozessierungsweg oder dem  $\beta$ -Sekretase-Prozessierungsweg folgt. Da der  $\alpha$ -Sekretase-Schnitt vorwiegend an der Plasmamembran stattfindet und der  $\beta$ -Sekretase-Schnitt in den sauren Kompartimenten des endosomalen Systems, fällt dem Transport von APP von der Plasmamembran in die Endosomen eine entscheidende Rolle in der Weichenstellung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Prozessierungsweg zu. Auf die molekularen Vorgänge der APP-Endozytose soll deswegen im Folgenden ausführlicher eingegangen werden.

APP wird im sekretorischen Weg an die Plasmamembran transportiert und von dort mittels Clathrin-abhängiger Endozytose in endosomale Kompartimente aufgenommen (Vetrivel and Thinakaran, 2006). Die drei Hauptkomponenten der Clathrin-abhängigen Endozytose sind das Strukturprotein Clathrin, der Adapterprotein Komplex 2 (AP2) und die GTPase Dynamin (Conner and Schmid, 2003). In bestimmten, Aktin-reichen Regionen der Plasmamembran kommt es zu einer Konzentration von Oberflächenrezeptoren und zur Assemblierung von

Clathrin zu einem Netz unterhalb der Plasmamembran (*Clathrin Coat*). Man nennt diese Regionen *Clathrin Coated Pits*. AP2 initiiert die Zusammenlagerung von Clathrin und koppelt das Clathrinnetz an die Oberflächenrezeptoren. AP2 besteht aus vier Untereinheiten, die  $\alpha$ -Untereinheit bindet an das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) der Plasmamembran, die  $\beta$ -Untereinheit bindet Clathrin, die  $\mu$ 2-Untereinheit bindet an Tyrosin-abhängige Sortiermotive in den zytoplasmatischen Domänen von Oberflächenrezeptoren wie APP und die  $\delta$ 2-Untereinheit stabilisiert den AP2-Komplex (Kirchhausen, 1999). Clathrin besteht aus drei schweren und drei leichten Ketten, die eine dreiarmige Struktur, das Clathrintriskelion bilden. Nach Anlagerung an AP2 bilden die Clathrintriskelions ein gekrümmtes Netz und führen so zu einer Invagination der Plasmamembran (Brodsky et al., 2001). Unter Mitwirkung von Dynamin schnürt sich der *Clathrin Coated Pit* von der Plasmamembran ab und bildet einen *Clathrin Coated Vesicle* (CCV). Dynamin ist eine besonders große GTPase, die neben der GTPase-Domäne eine PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-bindende Pleckstrinhomologe (PH)-Domäne, eine GTPase-Effektordomäne (GED) und eine Protein-Protein-Interaktion-vermittelnde Prolin/Arginin-reiche Domäne (PRD) enthält. Über die PRD interagiert Dynamin mit SH3-Domänen-enthaltenden Adapterproteinen. Diese Interaktion vermittelt die Assoziierung von Dynamin mit stark gekrümmten Membranbereichen, wie zum Beispiel der Membraneinstülpung des *Clathrin Coated Pit*. Dynamin lagert sich in einer Ringstruktur am Hals eines sich abschnürenden *Clathrin Coated Pit* zusammen (Hinshaw and Schmid, 1995). Über den Mechanismus der Dynamin-vermittelten Vesikelabschnürung herrscht noch Unklarheit. In einem Modell wirkt Dynamin wie ein Mechanoenzym, das durch seine Selbstassemblierung die Vesikel von der Plasmamembran wegdrückt (Stowell et al., 1999; Sweitzer and Hinshaw, 1998). In einem alternativen Modell rekrutiert die aktive GTP-gebundene Form von Dynamin weitere Effektorproteine, wie zum Beispiel Aktin-bindende Proteine an den Vesikel und koordiniert so die Abschnürung des Vesikels (Sever et al., 1999). In beiden Fällen ist die Hydrolyse des gebundenen GTP notwendig, denn ein GTP-Hydrolyse-mutantes Dynamin (DynK44A) inhibiert die Clathrin-abhängige Endozytose (Damke et al., 1994). Der CCV wird mit Hilfe des Aktinzytoskeletts von der Plasmamembran ins Zytosol transportiert. Nachdem sich der *Clathrin Coat* im Zytosol von dem CCV abgelöst hat, fusioniert der Vesikel mit frühen Endosomen. Frühe Endosomen werden auch sortierende Endosomen genannt, da in frühen Endosomen die endozytierten Oberflächenproteine in bestimmten Membranbereichen sortiert und von dort an verschiedene endosomale Kompartimente weitertransportiert werden. In Bereichen tubulärer Membranausstülpung kommt es zur Konzentration von Membran-

proteinen, die über vesikulären Transport in *Recycling*-Endosomen zurück zur Plasmamembran transportiert werden. In vesikulären Bereichen des frühen Endosoms verbleiben solche Oberflächenproteine, die über Fusionsvorgänge zum späten Endosom und von dort zum Lysosom gelangen. Im Lysosom erfolgt dann der proteolytische Abbau der endozytierten Proteine. Bestimmte Membranproteine gelangen vom späten Endosom über vesikulären Transport zum trans-Golgi Netzwerk (TGN). Man nimmt an, dass ein Großteil des endozytierten APPs und der APP-C-terminalen Fragmente über *Recycling*-Endosomen oder über den Transport zum TGN zurück zur Plasmamembran gelangen. Die Halbwertszeit von APP in der Zelle ist allerdings recht kurz, da APP an der Plasmamembran und in den endosomalen Kompartimenten von den Sekretasen geschnitten wird. In Abbildung 7 ist der endosomale Transport von APP schematisch dargestellt.



**Abb. 7 Endosomale Sortierung von Rezeptoren**

Zelloberflächenrezeptoren werden mittels Clathrin-abhängiger Endozytose in sortierende Endosomen aufgenommen. Sie werden entweder über *Recycling*-Endosomen zurück zur Plasmamembran transportiert, oder erreichen über späte Endosomen die Lysosomen, wo sie abgebaut werden. Ein Teil der Rezeptoren gelangt auch vom frühen oder sortierenden Endosom zum TGN. Zellkompartimente sind mit Fettschrift gekennzeichnet, Pfeile markieren mögliche Transportprozesse. PM: Plasmamembran, CCV: *Clathrin Coated Vesicle*, TGN: Trans-Golgi-Netzwerk.

Für die Endozytose von APP ist das NPTY-Aminosäuremotiv der zytoplasmatischen Domäne notwendig. Mutiert man den Tyrosinrest in NPXY zu Alanin, wird APP nicht mehr effizient internalisiert, sondern akkumuliert an der Plasmamembran. Als Folge findet eine vermehrte Sekretion der APP-Ektodomäne und eine verminderte A $\beta$ -Sekretion statt (Koo and Squazzo, 1994; Perez et al., 1996). Auch die Expression einer NPTY-defizienten APP-Mutante in APP *knock out* Mäusen verlängert die APP-Halbwertszeit und führt zu deutlich reduzierten A $\beta$ -Mengen im Gehirn dieser Mäuse (Ring et al., 2007). NPTY gehört zur Klasse der Tyrosin-anhängigen Sortiersignale (Bonifacino and Traub, 2003). NPTY-Motive vermitteln nur in einer kleinen Anzahl von Typ-I-Membranproteinen die Endozytose. Dazu zählen neben der APP-Familie auch noch die low density lipoprotein (LDL)-Rezeptor-Familie und die Integrin- $\beta$ -Familie. Der Insulin- und der EGF-Rezeptor enthalten zusätzlich zu anderen Internalisierungsmotiven ebenfalls NPXY-Motive, die aber nur eine untergeordnete Rolle bei deren Endozytose spielen (Bonifacino and Traub, 2003). NPXY-Signale treten meist in mittel bis kurzen zytoplasmatischen Domänen auf und haben mindestens einen Abstand von zehn Aminosäuren zur Transmembrandomäne. Das zur LDL-Rezeptor-Familie gehörende LRP-1 besitzt zwei NPXY-Motive in seiner zytoplasmatischen Domäne. Die Interaktion von Sortiermotiven, wie dem NPXY-Motiv, zu ihren Erkennungsproteinen findet mit einer sehr geringen Affinität statt und ist deswegen schwer nachzuweisen. Durch gezielte Bindungsstudien des LDL-Rezeptor-NPXY-Motivs mit Komponenten des *Clathrin Coats* konnte die N-terminale globuläre Domäne der Clathrin schweren Kette und die  $\mu$ 2-Untereinheit des AP2-Komplexes als potentielle NPXY-Bindeproteine identifizieren werden (Boll et al., 2002; Kibbey et al., 1998). Alternativ zur Erkennung des NPXY-Motivs durch *Clathrin Coat*-Komponenten werden Proteine mit einer Phosphotyrosin-bindenden (PTB) Domäne diskutiert. Einige dieser PTB-Domänen-interagierenden Proteine binden nicht phosphorylierte NPXY-Signale und kolokalisieren oder interagieren mit Komponenten des *Clathrin Coats* an der Plasmamembran. So konnte eine Rolle des PTB-Domänen-Proteins Dab2 für die Endozytose des LDL-Rezeptors nachgewiesen werden (Mishra et al., 2002). Als weiteres PTB-enthaltendes Protein, das an Komponenten des *Clathrin Coats* bindet und als Kandidat zur Erkennung von Tyrosinsignalen diskutiert wird, ist Numb (Santolini et al., 2000).

### **2.4 APP-Bindeproteine**

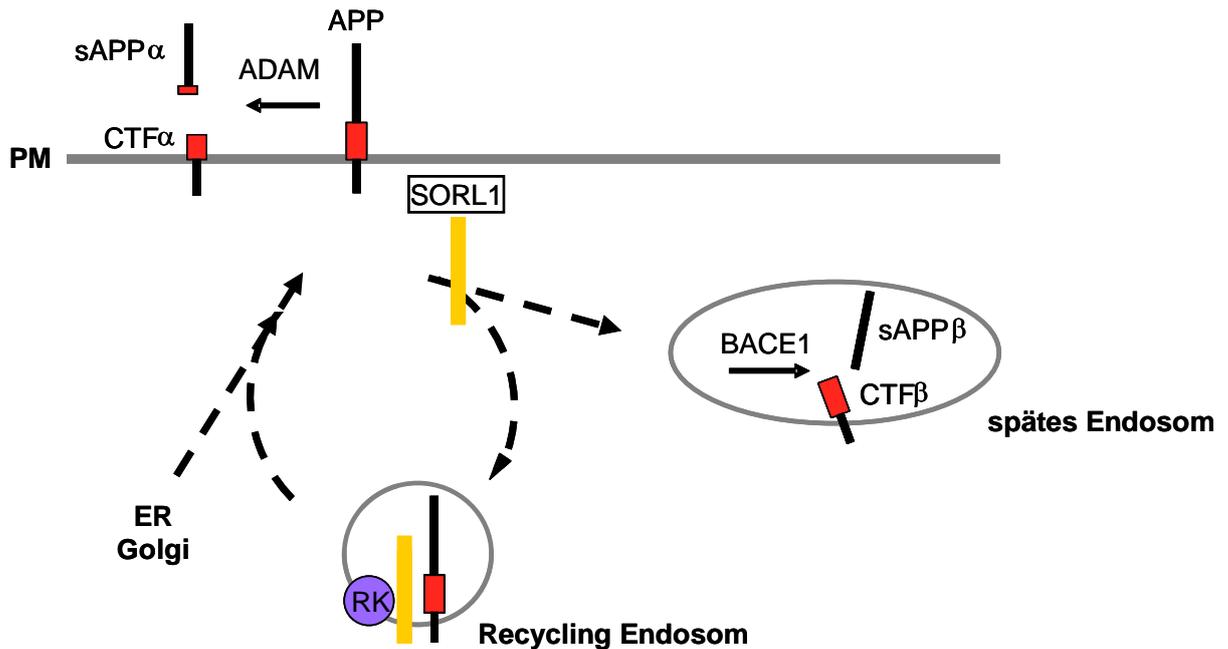
Im Falle von APP sind mehrere zytosolische Adapterproteine bekannt, die an das NPXY-Signal der APP-zytosolischen Domäne binden und die Prozessierung von APP verändern.

Dazu zählen Proteine der Fe65-, der X11- und der JIP-Familie (King and Turner, 2004). Was der molekulare Mechanismus dieser Effekte ist und ob die Interaktion von APP mit diesen Adapterproteinen die Endozytose von APP beeinflusst, wurde bisher nicht experimentell überprüft.

Fe65 besitzt zwei PTB-Domänen und eine WW-Domäne. Die C-terminale PTB-Domäne von Fe65 bindet an das GYENPTY-Motiv von APP unabhängig von einer Tyrosinphosphorylierung (Borg et al., 1996). Die zweite PTB-Domäne bindet das *low density lipoprotein receptor related* Protein (LRP) (Trommsdorff et al., 1998) und die WW-Domäne das Aktin-bindende Protein Mena. In Neuronen kolokalisiert Fe65 mit APP an Synapsen und in Aktin-reichen Lamellopodien (Kinoshita et al., 2001; Sabo et al., 2003). Damit vermittelt Fe65 die Bindung von APP an LRP und führt außerdem zu einer Assoziation von APP mit dem Aktinzytoskelett. Die Überexpression oder der *knock out* von Fe65 führen zu einer vermehrten Sekretion von sAPP (Guenette et al., 1999; Pietrzik et al., 2004; Sabo et al., 1999). Dieser Effekt ist abhängig von LRP (Pietrzik et al., 2004). LRP ist ein Oberflächenrezeptor, der an Proteine wie APP, Apolipoprotein E und  $\alpha$ 2-Macroglobulin bindet und deren Transport zwischen der Plasmamembran und dem endosomalen Kompartiment steuert (Herz and Strickland, 2001). In einem kürzlich vorgestellten Modell koppelt Fe65 APP an LRP und beeinflusst dadurch Prozessierung und Internalisierung von APP (Pietrzik et al., 2004; Ulery et al., 2000). Es ist nicht bekannt, ob die Bindung von APP an LRP und damit die Prozessierung von APP durch andere LRP-Liganden beeinflusst wird. X11 $\alpha$  bindet mit seiner PTB-Domäne an die vier Aminosäuren YENP des GYENPTY-Signals von APP (Zhang et al., 1997) und interagiert auch mit der aktivierten Form der *ADP-ribosylation factor* (Arf) GTPasen am trans-Golgi (Hill et al., 2003). Überexpression von X11 $\alpha$  erhöht die Menge an Gesamt-APP, verlängert die APP-Halbwertszeit und reduziert die Menge an sAPP $\alpha$ - und A $\beta$ -Sekretion (Borg et al., 1998; Sastre et al., 1998). Diese Ergebnisse sprechen für eine modulatorische Rolle von X11 $\alpha$  im sekretorischen Transport von APP, wobei auch eine Rolle im endozytotischen Weg diskutiert wird (King et al., 2003).

Neben diesen zytosolischen Adapterproteinen ist ein Typ-I-Transmembranprotein bekannt, das an APP bindet und den endosomalen Transport von APP steuert (Andersen et al., 2006; Rogueva et al., 2007). SORL1 (auch sorLA, LR11) gehört zur LRP-Familie und kolokalisiert mit APP in endosomalen Kompartimenten (Offe et al., 2006). Die Expression von SORL1 führt zu einer Zunahme des Golgi-lokaliserten APPs und einer Abnahme der sAPP $\alpha$ -, sAPP $\beta$ - und A $\beta$ -Sekretion, sowie einer Abnahme des Zelloberflächen-APPs (Andersen et al.,

2005; Rogaeva et al., 2007; Spoelgen et al., 2006). Ein *knock down* von SORL1 hingegen resultiert in der vermehrten  $\beta$ -Sekretase Prozessierung von APP (Rogaeva et al., 2007). In einem kürzlich beschriebenen Modell bindet SORL1 in dem endosomalen Kompartiment sowohl APP als auch den Retromer-Komplex und dirigiert APP in den Transportweg zurück zum TGN (Rogaeva et al., 2007). SORL1 reduziert damit den Anteil an APP, der durch  $\beta$ -Sekretase prozessiert werden kann (Abb. 8).



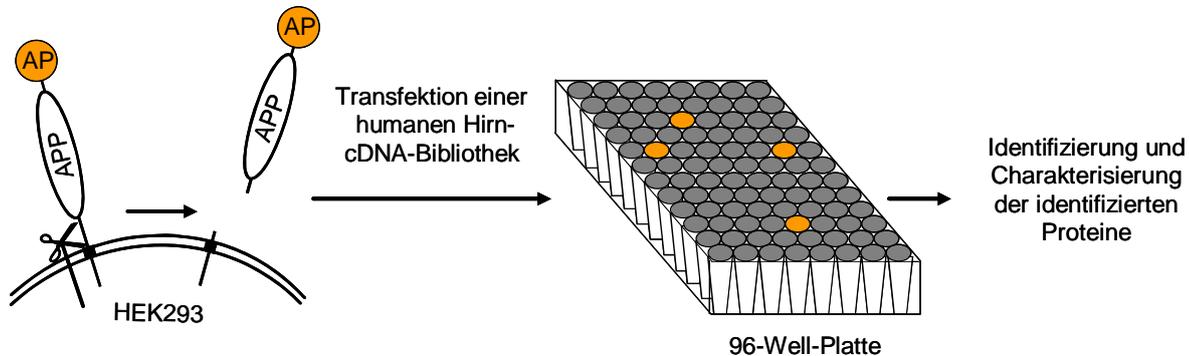
**Abb. 8 SORL1 dirigiert APP in den Recycling-Transportweg**

In den endosomalen Kompartimenten bindet der Sortierrezeptor SORL1 an APP und den Retromer-Komplex (RK) und dirigiert APP in den Recyclingweg zurück zur Plasmamembran. Horizontale Pfeile kennzeichnen die Spaltung von APP durch ADAM oder BACE1. Zellkompartimente sind mit Fettschrift gekennzeichnet, gestrichelte Pfeile markieren mögliche Transportprozesse. ER: Endoplasmatisches Retikulum, PM: Plasmamembran (modifiziert nach: Rogaeva et al., 2007).

### 3. Expressionsklonierung zur Identifizierung regulatorischer Proteine der APP-Spaltung

Bisher ist nur sehr wenig über die Regulation der APP-Prozessierung durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase bekannt. Um neue Regulatoren der APP-Ektodomänenspaltung zu identifizieren, wurde von Dr. Stefan Lichtenthaler vor Beginn dieser Doktorarbeit ein Expressionsklonierungs-Screen durchgeführt. Da die Ergebnisse des Screens die Grundlage der vorliegenden Doktorarbeit bilden, wird im Folgenden der Screen kurz erläutert. In diesem Expressionsklonierungs-Screen wurde eine APP-Spaltungs-Reporterzelllinie mit Klonen einer

cDNA-Bibliothek transfiziert und solche Klone identifiziert, die eine Änderung der APP-Spaltung verursachten.



**Abb. 9 Prinzip des Expressionklonierungs-Screens**

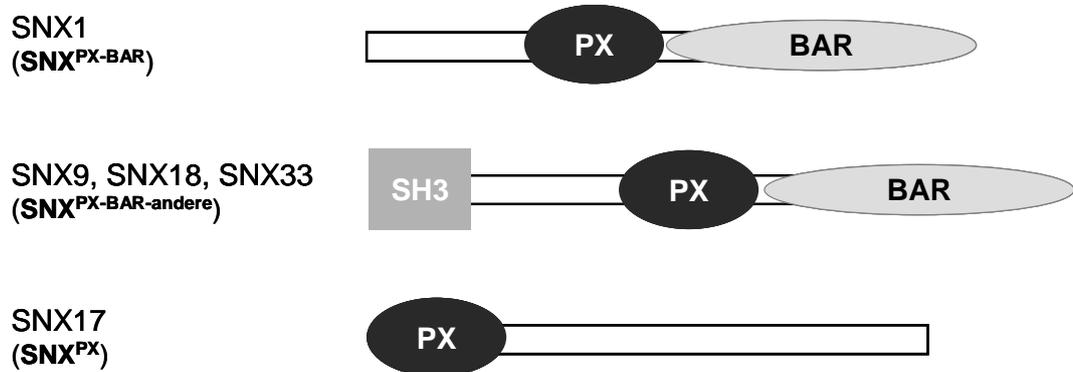
HEK293-Zellen exprimieren stabil ein Fusionsprotein, bestehend aus APP, an dessen Ektodomäne N-terminal sekretorische Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Nach Transfektion der cDNA-Bibliothek kann die AP-Aktivität im Überstand als Maß der APP-Ektodomänensekretion bestimmt werden.

Als Reporterzelllinie wurde eine HEK293-Zelllinie etabliert, die stabil ein Fusionsprotein (AP-APP) aus dem Reporterenzym sekretorischer Alkalischer Phosphatase (AP) und APP exprimiert (Abb.9). Der Expressionslevel von AP-APP in der Reporterzelllinie lag ungefähr 3-5 mal über dem Expressionslevel von endogenem APP (Schobel et al., 2006). Um die AP-APP-Reporterzelllinie resistent gegenüber Apoptose-auslösenden Proteinen aus der cDNA-Bibliothek zu machen, wurde zusätzlich die DNA der zwei anti-apoptotischen Proteine Bcl-XL und CrmA stabil transfiziert. Bei der cDNA-Bibliothek handelte es sich um eine humane Gehirn-cDNA-Bibliothek aus insgesamt  $10^6$  cDNA-Klonen. Die AP-APP-Reporterzelllinie wurde in 96-well Platten ausgesät und in mehreren Screeningrunden mit Klonen der cDNA-Bibliothek transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurde der Überstand der Zellen abgenommen und die AP-Aktivität im Überstand bestimmt. Die DNA der Schalen, in denen eine Änderung der AP-Aktivität gegenüber Kontroll-transfizierten Schalen auftrat, wurde isoliert und sequenziert. In diesem Screen wurden mehrere cDNAs gefunden, deren Expression die Ektodomänenspaltung von APP stimulieren. Unter ihnen waren zwei schon bekannte Regulatoren der APP-Spaltung, die  $\beta$ -Sekretase BACE1 und die katalytisch  $\alpha$ -Untereinheit der PKA. Diese zwei Stimulatoren zeigen, dass der Screen in der Lage ist, physiologisch relevante Proteine der APP-Spaltung zu detektieren, und validieren damit den Screeningansatz. Außerdem wurden zwei Endozytose-relevante Proteine identifiziert. Eine Mutante von Dynamin, der die N-terminale GTPase-Domäne fehlt (Dyn $\Delta$ NT) und das Homologe von Numb, Numb-like. Des Weiteren wurden das APP Homologe APLP1 und ein

bisher noch nicht charakterisiertes Mitglied der Sorting-Nexin-Unterfamilie SNX9/18/33 als Stimulatoren der APP-Spaltung nachgewiesen. Da in dieser Doktorarbeit auch die SNX9/18/33-Untergruppe untersucht wurde, sind im folgenden Kapitel die für diese Arbeit relevanten Grundlagen der SNX-Familie zusammengefasst.

#### 4. Die Sorting-Nexin-Familie

Bei der Sorting-Nexin- (SNX) Familie handelt es sich um eine Gruppe sehr diverser zytosolischer Proteine, die durch das Vorhandensein einer Phosphoinositol-bindenden (PX) Domäne charakterisiert ist. Im Menschen wurden rund 30 verschiedene SNXe identifiziert, die man aufgrund ihrer Domänenstruktur in drei Klassen einteilen kann. In der ersten Klasse sind solche SNXe zusammengefasst, die neben einer PX-Domäne eine C-terminale Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) Domäne enthalten (SNX<sup>PX-BAR</sup>). Die zweite Klasse umfasst die SNXe, die nur eine PX-Domäne enthalten (SNX<sup>PX</sup>) und die dritte Gruppe enthält SNXe, die neben der PX-Domäne noch andere Domänen enthalten (SNX<sup>PX-andere</sup>) (Seet and Hong, 2006). Proteine der SNX-Familie vermitteln Membran- und Proteintransport in den endosomalen Kompartimenten der Zelle (Carlton et al., 2005). In Abbildung 10 ist die Domänenstruktur, der in dieser Doktorarbeit untersuchten SNXe schematisch dargestellt.



**Abb. 10 Domänenstruktur der in dieser Arbeit untersuchten Sorting-Nexine**

Gezeigt sind die unterschiedlichen Domänen verschiedener SNXe. SNX1 enthält neben der PX-Domäne eine C-terminale BAR-Domäne, SNX9, SNX18 und SNX33 enthalten zusätzlich noch eine N-terminale SH3-Domäne. SNX17 enthält nur die PX-Domäne. PX: Phosphoinositol-bindend; BAR: Bin/Amphiphysin/Rvs; SH3: Src Homologie 3 Domäne.

#### 4.1 Membranassoziiierung der Sorting-Nexine

Allen SNXen gemeinsam ist die Phospholipid-bindende PX-Domäne. PX-Domänen wurden als erstes in zwei Untereinheiten (p40<sup>phox</sup> und p47<sup>phox</sup>) des Phagozyte-NADPH-Oxidase (Phox)-Komplexes identifiziert (Ponting, 1996). Es handelt sich um ein stark konserviertes Motiv von 100 bis 140 Aminosäuren, das spezifisch an Phosphoinositide (PI) der Zellmembran bindet und damit die Membranassoziiierung der PX-enthaltenden Proteine vermittelt (Seet and Hong, 2006). Die verschiedenen Membranen der Zelle weisen eine charakteristische PI-Zusammensetzung auf, die Transportproteinen, wie den PX-Domänen-Proteinen als Anlagerungsstellen dienen und damit die zelluläre Lokalisierung dieser Transportproteine bestimmen. So bindet die PX-Domäne von SNX1 bevorzugt PtdIns(Shah et al.)P und dirigiert damit SNX1 zu frühen Endosomen (Cozier et al., 2002; Zhong et al., 2002), während SNX9 mit *Clathrin Coated Pits* der Plasmamembran kolokalisiert (Lundmark and Carlsson, 2003).

Die Struktur der bis heute bekannten PX-Domäne weist eine charakteristische Faltung auf. Die PX-Domäne besteht aus einer Tasche eines N-terminalen drei-strangigen  $\beta$ -Faltblatts und einer helikalen Untereinheit aus drei  $\alpha$ -Helixen. In dieser Tasche bilden stark konservierte Argininreste eines Arg-Arg-(Tyr/Phe)-Ser-(Asp/Glu)-Phe-Motivs Wasserstoffbrücken zu den Phosphatresten und den Inositol-Hydroxyl-Gruppen der PI aus (Bravo et al., 2001; Lu et al., 2002). Mutationen dieser Argininreste verhindern sowohl PI-Bindung als auch endosomale Lokalisierung von SNX1 (Zhong et al., 2002). Die Bindung zwischen der PX-Domäne und den PI findet meist mit einer geringen Affinität statt und kann durch die Interaktion anderer Membran-bindender Domänen, wie der BAR-Domäne der SNX<sup>BAR</sup>-Untergruppe verstärkt werden. BAR-Domänen binden vor allem an gekrümmte Membranbereiche und sind selber in der Lage eine Membrankrümmung oder Abschnürung zu initiieren (Peter et al., 2004). Zusätzlich vermitteln BAR-Domänen die Dimerisierung von SNXen. Bisher sind zwei Mechanismen bekannt, wie die Membranassoziiierung von PX-Domänen enthaltenden Proteinen reguliert werden kann. Einmal kann durch die Stimulierung verschiedener Rezeptor-Tyrosin-Kinasen die PI-Zusammensetzung der Plasmamembran verändert und damit die Affinität bestimmter PX-Domänen zur Plasmamembran erhöht werden (Gray et al., 1999; Oatey et al., 1999). Zum anderen kann die PI-Bindestelle der PX-Domäne durch die Interaktion mit anderen Proteinen blockiert werden. So liegt z.B. SNX9 im Zytosol in Form eines inaktiven Komplexes mit Aldolase vor. Phosphorylierung von SNX9 verhindert die Bindung der SNX9-PX-Domäne an die Aldolase und erlaubt die Membranassoziiierung und Aktivierung von SNX9 (Lundmark and Carlsson, 2004).

## 4.2 Sorting-Nexine vermitteln den endosomalen Proteintransport

SNXe liegen in der Zelle in einer löslichen zytosolischen Form vor, die über die PX-Domäne mit Membranen bestimmter Kompartimente des endozytotischen Weges assoziieren kann. In Überexpressions- und *knock down*-Studien verschiedener SNXe konnte die Inhibition von jeweils bestimmten Transportvorgängen in diesen Kompartimenten beobachtet werden. Der molekulare Mechanismus der SNX-vermittelten Effekte ist allerdings nur in wenigen Fällen bekannt. Innerhalb der SNX-Familie ist die Funktion von SNX1 besonders gut untersucht. So ist SNX1 zusammen mit SNX2 Teil des Retromer-Komplexes und vermittelt den Rücktransport von Proteinen aus dem sortierenden Endosom zum TGN (Haft et al., 2000). Zusätzlich wurde in Überexpressionsstudien eine Rolle für SNX1 in dem endosomal-lysosomalen Transport des EGF-Rezeptors (EGFR) und von PAR-1 gezeigt. SNX1 bindet spezifisch an das lysosomale Sortiersignal des EGFRs und stimuliert dessen Abbau, beeinflusst aber nicht die Endozytose des EGFRs. Damit scheint SNX1 an mehreren endosomalen Transportvorgängen beteiligt zu sein. SNX9 hingegen interagiert an der Plasmamembran mit Komponenten des *Clathrin Coats* und spielt eine Rolle bei der Clathrin-abhängigen Endozytose mehrerer Oberflächenrezeptoren (Lin et al., 2002; Lundmark and Carlsson, 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass SNX9 Dynamin bindet und die Membranassoziiierung und die Aktivität von Dynamin beeinflusst (Lundmark and Carlsson, 2004; Soulet et al., 2005). SNX17 wiederum ist in frühen Endosomen lokalisiert, bindet an das NPXY-Motiv von Mitgliedern der LDLR-Familie und dirigiert diese Proteine in den Recycling-Weg zurück zur Plasmamembran (Burden et al., 2004; Stockinger et al., 2002; van Kerkhof et al., 2005). Diese Beispiele zeigen, dass SNXe nur in bestimmten Kompartimenten des endozytotischen Weges lokalisiert sind und dort den Transport von Membranproteinen vermitteln.

## B. Zielsetzung

APP kann in zwei alternativen Wegen prozessiert werden. Wird APP zuerst von der  $\alpha$ -Sekretase geschnitten, entsteht das neuroprotektive sAPP $\alpha$ -Fragment. Wird die Ektodomäne von APP hingegen von der  $\beta$ -Sekretase geschnitten, entsteht das neurotoxische A $\beta$ -Peptid. Damit man in Zukunft die Entstehung der A $\beta$ -Plaques beeinflussen kann, ist es essentiell zu verstehen, wie APP in den  $\alpha$ - oder in den  $\beta$ -Sekretase-Weg dirigiert wird. Bisher ist allerdings sehr wenig über die Regulation dieser alternativen Prozessierungswege bekannt. Man weiß, dass die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase um die Spaltung von APP konkurrieren. Blockiert man zum Beispiel das endosomale Recycling von APP, kommt es zu einer Zunahme des  $\beta$ -Schnitts, es wird mehr sAPP $\beta$  und mehr A $\beta$  gebildet (Rogaeva et al., 2007). Außerdem ist bekannt, dass die  $\alpha$ -Sekretase-Prozessierung von APP durch Aktivierung bestimmter Signaltransduktionswege gesteigert werden kann. Die molekularen Mechanismen und die daran beteiligten Proteine konnten bisher nicht im Detail identifiziert werden. Um solche regulatorischen Proteine der APP-Ektodomänenspaltung zu identifizieren, wurde von Dr. Stefan Lichtenthaler vor Beginn dieser Doktorarbeit ein Expressionsklonierungs-Screen durchgeführt. Dazu wurde eine APP-Spaltungs-Reporterzelllinie mit Klonen einer humanen Gehirn-cDNA-Bibliothek transfiziert und solche cDNAs isoliert, die eine Änderung der APP-Spaltung verursachten (Lichtenthaler et al., 2003; Neumann et al., 2006; Schobel et al., 2006). In diesem Screen wurden das APP-Homologe APLP1 (Neumann et al., 2006) und das bisher nicht charakterisierte Mitglied der Sorting-Nexin (SNX) Familie SNX33 (Schobel et al., Manuskript eingereicht) als neuartige Stimulatoren der APP-Spaltung identifiziert. Ziel dieser Doktorarbeit war eine genaue Beschreibung der APP-Spaltung bei Expression von APLP1 und SNX33, sowie die Identifizierung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen.

Als erstes sollte geklärt werden, ob APLP1 und SNX33 nur die APP-Spaltung in der Reporterzelllinie verändern, oder auch die Spaltung von endogenem APP beeinflussen. Dabei war von besonderem Interesse, ob es sich um eine Aktivierung der generellen APP-Ektodomänenspaltung handelt oder ob APLP1 und SNX33 spezifisch auf die  $\alpha$ -Sekretase- oder  $\beta$ -Sekretase-Spaltung von APP wirken und damit die anti-amyloidogene oder die amyloidogene Prozessierung von APP fördern. Des Weiteren sollte die Spezifität dieser Effekte untersucht werden. Im Falle von APLP1 sollte herausgefunden werden, ob APP und APLP2 die Prozessierung von APP ebenfalls beeinflussen und wie sich die Expression anderer Typ-1-Transmembranproteine auf die APP-Spaltung auswirkt. Um Hinweise auf einen möglichen molekularen Mechanismus des APLP1-vermittelten Effekts zu bekommen, sollten

die für die APP-Spaltungszunahme verantwortlichen Domänen von APLP1 identifiziert werden. In einem weiteren Schritt sollten dann Bindeproteine gefunden werden, die mit diesen Domänen interagieren und den Effekt auf die APP-Spaltung vermitteln.

Im Falle von SNX33 war es von Interesse, wie sich SNX9 und SNX18, sowie weniger homologe SNXe im Bezug auf die APP-Spaltung verhielten. Da alle bisher untersuchten SNXe den endosomalen Transport von Oberflächenrezeptoren modulieren, sollte getestet werden ob SNX9/18/33 eine Rolle bei dem endosomalen Transport von APP spielt und auf diese Weise die APP-Spaltung beeinflussen könnte.

## C. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

<u>Material</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Acrylamid-Lösung (30% in dH <sub>2</sub> O)	O-BioGen
Agarose NA	Amersham Biosciences
Alkalische Phosphatase-Substrat	Roche
APS	Roche
Ampizillin	Roth
ATP	Roche
BamHI	MBI Fermentas
Biotin (EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin)	Pierce
BSA	Uptima, Interchim
CaCl <sub>2</sub>	J.T. Baker
DABCO	Sigma
DAPT	Dr. Boris Schmidt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
αDMEM	Invitrogen
T4-DNA Ligase (5U/μl)	Roche
T4-DNA Ligase Puffer	Roche
dNTP	Roche
EcoRI	MBI Fermentas
FCS	Gibco
Gelatin (Teleostean gelatin)	Sigma
L-Glutathion, reduziert	Sigma
Glutathion Sepharose 4B (GSH-Sepharose)	Amersham Biosciences
Glycin	Biomol
Glyzerin	Roth
HCl	Merck
HEPES	Biomol
HindIII	MBI Fermetas
Hygromyzin	Invitrogen
KCl	Merck
IPTG, dioxanfrei	Roth
Isopropanol	Merck
Lipofectamin 2000	Invitrogen

## Material und Methoden

---

1 kB-DNA-Leiter	Gibco Invitrogen Corporation
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	J.T. Baker
Magermilchpulver (instant)	Frema
β-Mercaptoethanol	Merck
MgCl <sub>2</sub>	Merck
MgSO <sub>4</sub>	Merck
MnCl <sub>2</sub>	Sigma
Molekulargewichtsstandard Marker (See Blue Plus 2)	Invitrogen
Mowiol	Hoechst
NaCl	Roth
NaHPO <sub>4</sub>	Sigma
NcoI	New England Biolabs
NH <sub>4</sub> Cl	Merck
NotI	MBI Fermentas
NP-40	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	J.T. Baker
PAS	Sigma.Aldrich
P/S	Gibco
Peroxidase-gekoppelte anti-Kaninchen IgG (1mg/ml)	Promega
Peroxidase-gekoppelte anti-Maus IgG (1mg/ml)	Promega
Peroxidase-gekoppelte anti-Ratten IgG (1mg/ml)	Promega
PGS	Amersham Biosciences
PMA	Sigma
pNPP	Sigma
pI	Roche
Proteinmarker	Invitrogen
Puromyzin (50 µg/ml)	Invitrogen
Pwo-Polymerase (1U/µl)	PeqLab
10x Pwo-Polymerase Reaktions-Puffer	PeqLab
Random Primer DNA Labeling System	Invitrogen
RNAse H	Invitrogen
Saccharose	Merck
SAP (1U/µl)	Roche
SAP (1U/µl)-Puffer	Roche
SDS	Calbiochem
SFII	New England Biolabs

STEN	Biorad
Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare Bio-Sciences AB
TEMED	Merck
Tricin	Biomol
Tris	Biomol
Tris-Borat	Merck
Triton X-100	Merck
Trypsin	Invitrogen
Tween-20	Merck
XbaI	MBI Fermentas

## 1.2 Kits

<u>Kits</u>	<u>Bezugsquelle</u>
NucleoBond AX500 Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
BCA Kit	Uptima, Interchim
ECL Detektionsreagenz	Amersham Biosciences
ECL plus Detektionsreagenz	Amersham Biosciences
RNAeasy Kit	Quiagen
Superscript first strand synthesis kit	Invitrogen
DNase Kit	Invitrogen

## 1.3 Puffer

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Puffer.**

Angegeben ist der Name und die Zusammensetzung der Puffer.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Acrylamid-Lösung	30% (w/v) Acrylamid-BIS-Acrylamid in dH <sub>2</sub> O
Ammoniumchlorid-Lösung	50 mM NH <sub>4</sub> Cl in PBS
Ampizillin-Lösung (Stammlösung 1000x)	100 mg/ml Ampizillin gelöst in 70% Ethanol
APS	10% Stammlösung in H <sub>2</sub> O
Alkalische Phosphatase-Substrat	1 Tablette in 1 ml H <sub>2</sub> O lösen, 1:500 einsetzen
Biotin-Lösung (EZ-Link <sup>TM</sup> Sulfo-NHS-SS-Biotin)	0,5 mg/ml in PBS-Puffer
Block-Puffer für Western Blot (Blockierlösung)	5% Magermilchpulver in PBST
Blockreagenz für	2% BSA

Material und Methoden

Immunfluoreszenz	2% FCS 0,2% Gelatine gelöst in PBS
DNA-Proben-Puffer (4x)	30% (v/v) Glycerin, 10 mM EDTA, 0,05% Orange G in dH <sub>2</sub> O
Einfriermedium	FCS mit 5% DMSO
Elektrophorese-Lauf-Puffer	25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 0,1% SDS in dH <sub>2</sub> O
Glutathion-Puffer	1,54 g Glutathion, 0,53 g NaCl, 100 µl 1,25 M CaCl <sub>2</sub> , 100 µl 1,25 M MgCl <sub>2</sub> 0,2 g BSA mit NaOH auf pH 8,6 in dH <sub>2</sub> O
Glycerin-Lösung	50% (w/v) Glycerin in dH <sub>2</sub> O
Glycin-Lösung	20 mM Glycin in PBS-Puffer
Grundmedium	DMEM 10% FCS 50 U/ml Penizillin 50 µg/ml Streptomycin
LB-Medium	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl pH 7,0
LB-Medium mit Ampizillin	LB-Medium 100 µg/ml Ampizillin
Lysis-Puffer	50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM EDTA
Mowiol-Lösung	15% Mowiol 50 mg/ml DABCO in dH <sub>2</sub> O
NP-40 (Nonidet P-40)	10% (w/v) Stammlösung in dH <sub>2</sub> O
PBST	PBS –Puffer 0,05% Tween-20
PCM	PBS-Puffer 1 mM CaCl <sub>2</sub> 0,5 mM MgCl <sub>2</sub>
PAS (Protein A Sepharose)	2 mg PAS in 1 ml 20% EtOH gelöst; vor Gebrauch 3x mit PBS waschen
PBS	140 mM NaCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,75 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4 mit HCl eingestellt in dH <sub>2</sub> O (autoklaviert)
PBS-EDTA	PBS (steril), 25 mM EDTA
Penizillin/Streptomycin (P/S)	5000 U/ml Penizillin 5 mg/ml Streptomycin
PGS	2 mg PGS in 1 ml 20% EtOH gelöst;

(Protein G Sepharose)	vor Gebrauch 3x mit PBS waschen
pNPP (p-Nitrophenyl-Phosphat)	5 mg/ml pNPP in Substratpuffer
Poly-L-Lysin-Lösung	100 µg/ml Poly-L-Lysin gelöst in PBS (steril)
Primärantikörper	0,25% (w/v) BSA 0,05% (w/v) Natriumazid Antikörper (vgl. Tab. 4/5) in PBST
Sammelgel-Puffer („High Tris Buffer“)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS in dH <sub>2</sub> O
4x SDS-Proben-Puffer	Für 10 ml: 4 ml 20% (v/v) Glyzerin, 4 ml 20% (w/v) SDS 1 ml β-Mercaptoethanol, 1,25 ml 1M Tris pH 6,8, 10 µl 10% Bromphenolblau
Sekundärantikörper	0,25% (w/v) BSA Antikörper (vgl. Tab. 6) in PBST
SOB-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 2,5 mM KCl ad 1 l H <sub>2</sub> O, (autoklavieren)
STEN	0,05M Tris HCl pH 7,6 0,15 M NaCl 2 mM EDTA 0,2 % NP40
STEN-NaCl	NaCl in STEN
STEN-SDS	0,1 % SDS in STEN
Streptavidin Sepharose High Performance	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS in dH <sub>2</sub> O
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris 1 M CH <sub>3</sub> COOH 50 mM EDTA
TB-Puffer	10 mM HEPES, 15 mM CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 250 mM KCl, pH-Wert 6,7 mit KOH einstellen, 55 mM MnCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O steril filtrieren
TBE-Puffer	9 mM Tris-Borat 2 mM EDTA in dH <sub>2</sub> O
Transfer-Puffer	25 mM Tris, 0,2 M Glycin
Transformationsmedium	DMEM ohne Zusätze
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8

(„Low Tris Buffer“)	0,4% (w/v) SDS in dH <sub>2</sub> O
Triton-Lösung (Immunfluoreszenz)	0,2% Triton X-100 in PBS
Trypsin-Lösung	0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA * 4Na in Hanks' B.S.S.

#### 1.4 Antikörper

**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.**

Angegeben ist die Bezeichnung des Antikörpers, das Zielprotein gegen welches der Antikörper gerichtet ist, die zur Immunpräzipitation (IP), Western Blot (WB) oder zur Immunfluoreszenz (IF) verwendete Verdünnung des Antikörpers, die Wirtsspezies, sowie die Bezugsquelle des Antikörpers. Alle verwendeten Maus und Ratten-Antikörper sind monoklonal, alle verwendeten Kaninchen-Antikörper polyklonal.

Bezeichnung	Zielprotein	IP	WB	IF	IgG	Bezugsquelle
192 wt	sAPP $\beta$	---	1:100	---	Kaninchen	Dr. D. Schenk (Seubert et al., 1993)
2A1	SH3-Domäne von SNX33	1:10	1:200	1:1	Ratte	Dr. E. Kremmer
22C11	APP	---	1:5000	---	Maus	Dr. K. Beyreuther
5313	APP Ektodomäne	---	---	1:300	Kaninchen	Eurogentec (Capell et al., 2000)
6687	APP C-Terminus	1:400	1:1000	---	Kaninchen	Eurogentec (Water, 2000)
6C6	SNX9	---	1:100	---	Ratte	Dr. E. Kremmer,
67	SNX33	1:200	1:500	---	Kaninchen	Eurogentec
Ab150	A $\beta$ ähnliche Domäne von APLP1	---	1:1000	---	Kaninchen	Simone Eggert, Dr. K. Beyreuther
$\alpha$ -Adaptin	$\alpha$ -Adaptin	---	---	1:300	Maus	Affinity Bioreagents
$\beta$ -Aktin	humanes $\beta$ - Aktin	---	1:1000	---	Maus	Sigma
Dyn	Dynamin	---	1:1000	---	Kaninchen	Cell Signaling
Dyn (Hudy 1)	Dynamin 1	1 mg/ml	---	---	Maus	Upstate
EEA1	Early endosomal antigen 1	---	---	1:300	Kaninchen	BD Transduction Laboratories
EGFR	EGFR	---	1:1000	---	Maus	BD Transduction Laboratories
Flag	Flag- Markierung	1:100	1:1000	---	Maus	Sigma

HA.11	HA-Markierung	1:300	1:1000	1:100	Maus	Covance
LRP1704	LRP C-Terminus	1:300	1:1000	---	Kaninchen	Dr. C. Pietrzik
IR	IR	---	1:250	---	Maus	BD Transduction Laboratories
Clathrin	Clathrin	---	---	1:1000	Maus	Affinity Bioreagents
W02	sAPP $\alpha$	---	1 $\mu$ g/ml	---	Maus	Dr. K. Beyreuther

**Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper.**

Angegeben ist der Name, Zielprotein und Wirtsspezies der verwendeten Sekundärantikörper. Außerdem ist die Verwendung mit entsprechender Verdünnung sowie die Bezugsquelle angegeben. HRP: Meerrettich-Peroxidase.

Bezeichnung	Zielprotein	Wirtsspezies	Applikation	Verdünnung	Firma
Anti-mouse-HRP	Maus IgG	Ziege	WB	1:10000	Promega, DAKO
Anti-rabbit-Alexa488	Kaninchen IgG	Ziege	IF	1:1000	Molecular Probes
Anti-rabbit-Alexa555	Kaninchen IgG	Ziege	IF	1:1000	Molecular Probes
Anti-rabbit-HRP	Kaninchen IgG	Ziege	WB	1:10000	Promega
Anti-rat-HRP	Ratten IgG	Ziege	WB	1:5000	Jackson Immuno Research
Anti-hIgG Fc	Mensch IgG Fc	Ziege	WB	1:5000	Cappel

## 1.5 Säuger-Zelllinien

**Tabelle 4: Übersicht über verwendete Zelllinien.**

Angegeben ist der Name und die Herkunft der Zelllinie sowie das Medium und die Bezugsquelle der Zelllinie.

Zelllinie	Herkunft	Medium	Bezugsquelle
HEK293E (stabil transfiziert mit EBNA1-Protein)	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM, 10% FCS, P/S (50 U/ml / 50 $\mu$ g/ml)	ATCC
COS	Affen-Nierenzellen	DMEM, 10% FCS, P/S (50 U/ml / 50 $\mu$ g/ml)	ATCC
CHO K1	Hamster-Ovarzellen	DMEM, 10% FCS	Dr. S. Leppla
CHO 13-5-1	Hamster-Ovarzellen defizient in LRP	DMEM, 10% FCS	Dr. S. Leppla

**Tabelle 5: Übersicht über verwendete genetisch veränderte Zelllinien.**

Angegeben ist der Name der stabilen Zelllinie, der Name der jeweiligen Mutterzelllinie, das exogen exprimierte Protein, das verwendete Selektionsmedium und die Bezugsquelle der Zelllinie. AP: Alkalische Phosphatase; TNFR2: Tumor necrosis factor receptor 2.

Name	Mutterzelllinie	Exogen exprimiertes Protein	Medium	Bezugsquelle
HEK293E/AP-APP	HEK293E	AP-APP, Bcl-X <sub>L</sub> /CrmA	DMEM, 10% FCS, P/S (50 U/ml / 50 µg/ml), 0,3 µg/ml Puromycin, 40 µg/ml Hygromycin	Dr. S. Lichtenthaler
HEK293E/AP-L-Selektin	HEK293E	AP-L-Selektin	DMEM, 10% FCS, P/S (50 U/ml / 50 µg/ml), 0,3 µg/ml Puromycin, 40 µg/ml Hygromycin	Dr. S. Lichtenthaler
HEK293E/AP-TNFR2	HEK293E	AP-TNFR2	DMEM, 10% FCS, P/S (50 U/ml / 50 µg/ml), 0,3 µg/ml Puromycin, 40 µg/ml Hygromycin	Dr. S. Lichtenthaler
HEK293E/APP695	HEK293E	APP <sub>695</sub> wt	DMEM, 10% FCS, P/S (50 U/ml / 50 µg/ml), 100 µg/ml Hygromycin	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt

## 1.6 Plasmide

**Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Plasmide.**

Angegeben ist die Bezeichnung des Plasmids, der Name des Vektors und der Name der cDNA-Sequenz, falls bekannt die Restriktionsschnittstellen, mit denen die gewünschte cDNA-Sequenz in den Vektor eingefügt wurde, sowie die Bezugsquelle des Plasmids.

Plasmid	Vektor	cDNA	Restriktionsenzyme	Bezugsquelle
P12-BACE1-HA	peak12	BACE1 C-terminal HA-markiert	HindIII; XbaI	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
P12-BACE1	peak12	BACE1	HindIII; XbaI	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
P12-ADAM10	peak12	ADAM10	HindIII; XbaI	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
P12-ADAM10-HA	peak12	ADAM10 C-terminal HA-markiert	HindIII; XbaI	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
P8-APLP1	peak8	APLP1		cDNA-Bibliothek (Edgebio)
P8-788-B8	peak8	SNX33		cDNA-Bibliothek (Edgebio)
P12-APP695	peak12	APP <sub>695</sub>	KpnI, EcoRI	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
P12-APP695-HA	peak12	APP <sub>695</sub>	Hind XbaI	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler

P12-APLP1-HA	peak12	APLP1 C-terminal HA-markiert	HindIII, XbaI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-APLP1-GFP	peak12	APLP1 C-terminal GFP-markiert	HindIII, XbaI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-APLP2-HA	peak12	APLP2 C-terminal HA-markiert	HindIII, XbaI	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
P12-HA-L-Selektin	peak12	L-Selektin N-terminal HA-markiert	HindIII, XbaI	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
P12-sIg7-APLP1	peak12	Fusionsprotein aus der IgG1-Ektodomäne, der CD7-Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne von APLP1	MluI, NotI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-sIg7-APLP1(Y/S)	peak12	Fusionsprotein aus der IgG1-Ektodomäne, der CD7-Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne von APLP1, wobei Tyrosin 638 von APLP1 zu Serin mutiert ist	MluI, NotI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-sIg7-IR	peak12	Fusionsprotein aus der IgG1-Ektodomäne, der CD7-Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne des IRs	MluI, NotI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-sIg7-IR(S/Y)	peak12	Fusionsprotein aus der IgG1-Ektodomäne, der CD7-Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne des	MluI, NotI	im Rahmen dieser Arbeit generiert

		IRs, wobei Serin zwei AS vor dem NPXY-Motiv zu tyrosin mutiert ist		
P12-sIg7-ADAM17	peak12	Fusionsprotein aus der IgG1-Ektodomäne, der CD7-Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne von ADAM17	MluI, NotI	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
P12-HA-APLP1-CTF106	peak12	APLP1-C-terminales-Fragment aus den C-terminalen 106 Aminosäuren	XbaI, NotI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-HA-APLP1-CTF106 $\Delta$ cyto	peak12	APLP1-C-terminales-Fragment	Xba, Not	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-HA-APLP1-CTF106ER	peak12	APLP1-C-terminales-Fragment aus den C-terminalen 106 Aminosäuren mit einem ER-Retentionsmotiv	XbaI, NotI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-GFP-ICD	peak12	Fusionsprotein aus der APLP1-zytoplasmatischen Domäne und GFP		erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
P12-APLP1-GFP	peak12	APLP1 C-terminal GFP markiert	HindIII, XbaI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
pcIneo-LRP-CT	pcIneo	C-terminales Fragment von LRP	EcoRI-NotI	erhalten von C. Pietrzik
PCB1-Dyn	PCB1	Dynamin1		erhalten von Dr. M. Caron
PCB1-DynK44A	PCB1	Dominant negative Mutante von Dynamin1(K44A)		erhalten von Dr. M. Caron
pcDNA3-Fe65-	pcDNA3	Fe65 C-terminal		erhalten von C.

Flag		mit Flag markiert		Pietrzik
pRK5-hIR	pEK5	IR		erhalten von Dr. A. Ullrich
pcDNA3-EGFR	pcDNA3	EGFR		erhalten von Dr. G. Gill
pCEP4-APLP1	pCEP4	APLP1		erhalten von Dr. S. Eggert, Dr. K. Beyreuther
pCEP4-APLP1 $\Delta$ NPTY	pCEP4	Mutante von APLP1 ohne GYENPTY Motiv		erhalten von Dr. S. Eggert, Dr. K. Beyreuther
pCEP4-APLP2	pCEP4	APLP2		erhalten von Dr. S. Eggert, Dr. K. Beyreuther
pOTB-SNX9	pOTB	SNX9		ATCC (ID 3832234)
pOTB-SNX1	pOTB	SNX1		ATCC (ID 2964409)
pOTB-SNX17	pOTB	SNX17		RZBD
pCMV6XL4-SNAG1	pCMV6XL4	SNX18B		erhalten von Xantos
P12-Dyn-HA	peak12	Dynamin C-terminal HA-markiert	HindIII; XbaI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-DynK44A-HA	peak12	DynaminK44A C-terminal HA – markiert	HindIII; XbaI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-DynK44A-GFP	peak12	DynaminK44A C-terminal GFP –markiert	HindIII, XbaI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-Kon	peak12	Kontroll Sequenz	HindIII; NotI	erhalten von Dr. B. Seed
P12-GFP	peak12	GFP	HindIII; NotI	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
P12-PKC $\alpha$	peak12	PKCa	HindIII; NotI	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
P12-SNX1-HA	peak8	SNX1	NcoI; XbaI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-SNX9	pOTB	SNX9	HindIII, NotI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-SNX9-HA	peak12	SNX9 C-terminal HA-markiert	HindIII; XbaI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-SNX17-HA	peak12	SNX17 C-terminal HA-markiert	HindIII; XbaI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-SNX18-HA	peak12	SNX18 C-terminal HA-	EcoRI; XbaI	im Rahmen dieser Arbeit generiert

		markiert		
P12-SNX33	peak12	SNX33	HindIII; NotI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-SNX33 $\Delta$ SH3-HA	peak12	SNX33 ohne SH3 Domäne C-terminal HA-markiert	HindIII; XbaI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-SNX33-GFP	peak12	SNX33 C-terminal GFP-markiert	XbaI; NotI	im Rahmen dieser Arbeit generiert
P12-SNX33-HA	peak12	SNX33 C-terminal HA-markiert	HindIII; XbaI	im Rahmen dieser Arbeit generiert

## 1.7 Oligonukleotide

**Tabelle 7: Beschreibung der verwendeten Oligonukleotide**

Angegeben ist der Name des neu klonierten Plasmids, die in der PCR verwendeten Oligonukleotide sowie der Name des zur Klonierung verwendeten Plasmids.

Plasmidname	Oligonukleotid-Sequenzen	cDNA
P12-Dynamin-HA	<b>Dyn1 rattus HindIII fw lang:</b> 5'- GCA TCA AGC TTC CAC CAT GGG CAA CCG CGG CAT GGA AG-3' <b>DynK44A_XbaI_rev_Sue</b> 5'-GAG CTC TAG ACC GAG GTC GAA GGG GGG CCT GGG GCT C-3'	pCB1-Dynamin
P12-DynaminK44A-HA	<b>Dyn1 rattus HindIII fw lang:</b> 5'- GCA TCA AGC TTC CAC CAT GGG CAA CCG CGG CAT GGA AG-3' <b>DynK44A_XbaI_rev_Sue</b> 5'-GAG CTC TAG ACC GAG GTC GAA GGG GGG CCT GGG GCT C-3'	pCB1-DynaminK44A
P12-SNX1-HA	<b>SNX1-NcoI</b> 5'-GCT CCA CAA TGG CGT CGG GTG GTG GTG-3' <b>SNX1rev Xba neu</b> 5'-GTG CTC TAG AGA GAT GGC CTT TGC CTC AG-3'	pOTB-SNX1
P12-SNX18-HA	<b>SNX18_BamHI fw</b> 5'-GGA TCC CGT CAT GGA CCT ATT AGC-3' <b>SNX18 Xba rev new Sue</b> 5'-GAG CTC TAG ACC ATC ATA TCT AGC GGC TAA TG-3'	pCMV6XL4 SNAG1
P12-SNX33	<b>SNX788B8CTXba</b> 5'-GCT CTA GAC CGA GGT TGT CAT ACA TGC GCA G-3' <b>SNX788B8NTHind</b> 5'-GCA TCA AGC TTC CAC CAT GGC ACT	P8-SNXB8

	GAA AGG CCG-3'	
P12-SNX33-GFP	<b>GFPXbaI</b> 5'-CTA GTC TAG AGA TGG TGA GCA AGG GCG-3' <b>p12-Not</b> 5'-TGG ATG CAG GCT ACT CTA GGG-3'	P12-GFP
P12-SNX33-HA	<b>SNX788B8CTXba</b> 5'-GCT CTA GAC CGA GGT TGT CAT ACA TGC GCA G-3' <b>SNX788B8NTHind</b> 5'-GCA TCA AGC TTC CAC CAT GGC ACT GAA AGG CCG-3'	P8-SNXB8
P12-SNX33-ΔSH3- HA	<b>SNX788B8ΔSH3-Hind-f</b> 5'-GCA TCA AGC TTC CAC CAT GGC ACT GTC TGG CAT CAG CAC CAA CC-3' <b>SNX788B8CTXba</b> 5'-GCT CTA GAC CGA GGT TGT CAT ACA TGC GCA G-3'	P8-SNXB8
P12-SNX9-HA	<b>SNX9-Hind-F</b> 5'-GCA TCA AGC TTC CAC CAT GGC CAC CAA GGC-3' <b>SNX9-Xba-R</b> 5'-TGC TCT AGA CCC ATC ACT GGA AAG CGG C-3'	pOTB7- SNX9
P12-APLP1-HA	<b>APLP1_Xba_rev:</b> TGCTCTAGAGGTCGTTCCCTCCAGGAAG <b>APLP1_BamHI_fw:</b> GCCGCCGTGGATCCCGAG	p8-APLP1
P12-APLP1-GFP	<b>APLP1_Xba_rev:</b> TGCTCTAGAGGTCGTTCCCTCCAGGAAG <b>APLP1_BamHI_fw:</b> GCCGCCGTGGATCCCGAG	p8-APLP1
P12-sIg7-APLP1	<b>APLP1 cyto Fw MluI:</b> GTCGACGCGTAGGAAGAAGCCCTACGGG GC <b>APLP1rev:</b> CGCTGCGGCCGCTCAGGGTCGTTCCCTCCA G	p8Aplp1
P12-sIg7- APLP1(Y/S)	<b>APLP1 cyto Fw MluI:</b> GTCGACGCGTAGGAAGAAGCCCTACGGG GC <b>APLP1 NPTYYS Not rev:</b> GCATGCGGCCGCTCAGGGTCGTTCCCTCC AGGAAGCGGTAAGTGGGGTTCT CAGAGCCGTGCCGCTGCAGTTCG	P12-sIG7- APLP1-CTF
P12-sIg7-IR	<b>IRcytofwMluI:</b> GTCGACGCGTAGGCAGCCAGATGGGCCG C, <b>IRCTNotrev (insulin receptor):</b> GCATGCGGCCGCTTAGGAAGGATTGGAC	pRKS-IR

	CG	
P12-sIg7-IR(S/T)	<b>IRcytofwYSMutMluI:</b> GTCGACGCGTAGGCAGCCAGATGGGCCG CTGGGACCGCTTTACGCTTATT CAAACCCTGAGTATCTCAGTG <b>IRCTNotrev (insulin receptor):</b> GCATGCGGCCGCTTAGGAAGGATTGGAC CG	pRKS-IR
P12-HA-APLP1-CTF106	<b>APLP1<math>\beta</math>CTFXbafw:</b> CTAGTCTAGAGCAGTATGAGCGAAAGGTG <b>APLP1rev:</b> CGCTGCGGCCGCTCAGGGTCGTTCTCCA G	p8Apl1
P12-HA-APLP1-CTF106 $\Delta$ zyto	<b>Apl1<math>\beta</math> CTF Xba fw:</b> CTAGTCTAGAGCAGTATGAGCGAAAGGT G <b>APLP1 delta cyto rev:</b> CGCTGCGGCCGCTCAGGGCTTCTTCTGC GCAG	p8APLP1
P12-HA-APLP1-CTF106ER	<b>APLP1<math>\beta</math>CTFXbafw:</b> CTAGTCTAGAGCAGTATGAGCGAAAGGT G <b>APLP1ER rev:</b> CCTGCGGCCGCTCAGTTCTGCTTCTTGCC GGTTCGTTCTCCAGG	p8APLP1
P12-SNX17-HA	<b>SNX17EcoRI:</b> GCATCGAATTCCACCATGCACTTTTCCAT TCCC <b>SNX17Hind:</b> GCATCAAGCTTCCACCATGCACTTTTCCA TTCCCG <b>SNX17Xba:</b> GTGCTCTAGAAGATCCTCATCTCCAATGC C	pOTB-SNX17
P12-APP695-HA	<b>peak12Hind:</b> CATTCTCAAGCCTCAGACAGTGG <b>p12APP-XbaI rev:</b> TGCTCTAGATTCTGCATCTGCTCAAAGAA C	p12APP695
P12-DynK44A-GFP	<b>DynK44A_XbaI_rev_Susanne:</b> GAGCTCTAGACCGAGGTCTGAAGGGGGGC CTGGGGCTC <b>Dyn1 rattus HindIII fw lang:</b> GCATCAAGCTTCCACCATGGGCAACCGC GGCATGGAAG	pCB1DynK44 A

### 1.8 Verbrauchsmaterial

<u>Material</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Deckgläser	Menzel-Gläser
Einfriergefäße (Qualifreeze)	Qualilab
Einwegpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Einweg-PP-Röhrchen steril (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Filme Super RX	Fuji
Gel-Blottingpapier	Schleicher & Schuell
Glasplättchen (Ø 10 mm)	Marienfeld
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell
Objektträger	Menzel-Gläser
Pasteurpipetten	Volac
Pipettenspitzen	Sarstedt
PVDF Immobilon, Transfermembran	Milipore
Quick Spin Säulen	Roche
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt
RNA Shredder Säulen	Quiagen
96 Well Platten (Proteinbestimmung)	Nunc
Zellkulturschalen (96 Well, 24 Well, 6 cm, 10 cm)	Nunc
Zellschaber	Corning Incorporated

### 1.9 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Bunsenbrenner	Heraeus
Dokumentation (Quickstore plus II)	MS Laborgeräte
Drucker Geldokumentationsanlage	Mitsubishi
Elektrophoresekammern	Owl Separation Systems, Inc.
Filmentwicklungsgerät (Curix 60)	Agfa
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Leica DMRB
Gefrierschrank (Arktis)	AEG
Gelkammer	Biorad
-80 °C-Gefrierschrank	Heraeus
Heizblöcke	Stuart Scientific, NeoLab
37 °C-Inkubator	Heraeus
Kamera (CCD Video Camera Module)	MS Laborgeräte
Kühlschrank (Santolini et al.)	AEG
Kühlzentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus
Mikrowelle	Alaska
PCR-Maschine (Mastercycler personal)	Eppendorf
pH-Elektrode	Schott
Photometer	Tecom Spectra
Pipettierhilfe (Accu-Jet)	Brand
Scanner	Hewlett Packard
Schüttelinkubator Certomat BS-1	B. Braun Biotech International
Sonifier (Cell Disruptor B 15)	Branson
Spannungsquelle	Biorad
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments
Thermomixer kompakt	Eppendorf

Transferkammer	BioRad
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus
Überkopfschüttler (Reax2)	Heidolph
UV-Schirm	Intas
Vortex VF2	IKA-Labortechnik
Wasserbad	GFL
Zählkammer (Neubauer)	Optik Labor
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Instruments

## **2. Methoden**

### **2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### 2.1.1 Polymeraseketten Reaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionsansätze wurden gemischt und in einem Thermocycler entsprechend dem unten angegebenen Programm prozessiert. Die Produkte der jeweiligen PCR wurden anschließend mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt (C.2.1.2) und die entstandenen DNA Fragmente direkt analysiert oder aus dem Gel isoliert (C.2.1.3).

#### Reaktionsansatz:

1 µl cDNA (ca. 100-500 ng/µl)  
1 µl 5'-Oligonukleotid (fw; 100 µM)  
1 µl 3'-Oligonukleotid (rw; 100 µM)  
1 µl dNTP-Mix (10 mM)  
1 µl Pwo-Polymerase (1U/µl)  
5 µl Reaktionspuffer, komplett (10x)  
mit dH<sub>2</sub>O auf 50 µl Endvolumen auffüllen

#### PCR Programm:

1 Zyklus: 95 °C, 3 min  
30 Zyklen: 95 °C, 30 sec  
52 °C, 30-60 sec  
72 °C, 2 min  
1 Zyklus: 72 °C, 10 min

#### 2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung und Analyse von linearen DNA-Fragmenten, superhelikaler Plasmid-DNA und zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurden 1-1,5%-ige Agarosegele in TBE-Puffer und 0,2 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 1/4 Volumen 4-fach DNA-Probenpuffer versetzt. Als Größenstandard diente eine 1kb-DNA-Leiter. Die Elektrophorese erfolgte bei 120V in TAE-Puffer in Agarosegelkammern.

### 2.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpells aus dem Agarosegel geschnitten. Anschließend wurde die DNA mit dem Nucleospin Extract Kit nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

### 2.1.4 Sequenzierung der DNA-Konstrukte

Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz). Die Richtigkeit der Sequenzen wurde mit Hilfe des Programms „Blast 2 sequences“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) überprüft.

### 2.1.5 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für analytische Ansätze nach Plasmidpräparationen wurden Plasmid-DNA für ca. 1-2 h bei 37 °C mit Restriktionsendonukleasen im unten angegebenen Mengenverhältnis inkubiert. Für präparative Ansätze im Rahmen einer Klonierung wurden Plasmid-DNA oder PCR-Produkte für 4 h inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mit Hilfe eines Agarosegels analysiert oder isoliert (C.2.1.2 oder C.2.1.3).

#### Restriktionsverdau:

0,5-1 µg Plasmid DNA oder 5-10 µg PCR Produkt  
10 U Restriktionsenzym  
3 µl Restriktions-Puffer  
mit dH<sub>2</sub>O auf 30 µl Endvolumen auffüllen

### 2.1.6 Dephosphorylierung von DNA

Die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten DNA-Moleküle (C.2.1.5) wurden vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase (SAP) für 1 h bei 37 °C im Dephosphorylierungsansatz inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte Plasmid-DNA aufgereinigt (C. 2.1.2 und C.2.1.3).

#### Dephosphorylierungsansatz:

1 µg linearisierte Plasmid DNA  
1 µl SAP (1U/ µl)  
2 µl SAP Puffer  
mit dH<sub>2</sub>O auf 20 µl Endvolumen auffüllen

### 2.1.7 Ligation von DNA

Die Insertion des mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragments (C.2.1.5) in das linearisierte, dephosphorylierte Plasmid (C.2.1.5 und C.2.1.6) erfolgte unter der Verwendung der T4 DNA-Ligase. Dafür wurden Plasmid und Fragment DNA mit der T4 DNA Ligase und T4 DNA-Ligase Puffer im Ligationsansatz gemischt und für 2-3 h bei RT inkubiert. Der komplette Ligationsansatz wurde zur Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen (C. 2.1.9) verwendet.

#### Ligationsansatz:

100 ng Plasmid DNA  
500 ng DNA Fragment  
1 µl T4 DNA Ligase (5U/ µl)  
2 µl T4 DNA Ligase Puffer  
mit dH<sub>2</sub>O auf 50 µl Endvolumen auffüllen

### 2.1.8 Herstellung des kompetenten Bakterienstamms DH5α

100 ml SOB-Medium wurden mit einer *Escherichia coli* DH5α-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C/700 upm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakterienkultur mit SOB-Medium in einem Volumen von 250 ml auf die OD 0,1 verdünnt und bei 18 °C/250 upm für 20-24 h inkubiert. Erreichte die Bakterienkultur eine OD von 0,6-0,8, wurde die Kultur auf fünf 50 ml-Falkon-Gefäßen aufgeteilt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C/3500 upm für 20 min. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 80 ml TB-Puffer resuspendiert (4 °C) und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C/3500 upm für 20 Minuten wurde das Pellet in 20 ml TB-Puffer (4 °C) gelöst und 1,5 ml DMSO (Endkonzentration: 7%) zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte eine Aliquotierung der Bakteriensuspension in 200 µl-Aliquots bei 4 °C. Die Bakterienaliquots wurden umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.1.9 Transformation des Ligationsproduktes in *E. coli*

20 µl des Ligationsansatzes sowie ein Ligations-Kontrollansatz ohne Insertion wurden mit je 100 µl DH5α bei 4 °C (auf Eis) 60 Minuten lang inkubiert. Die Bakterien wurden 1 min bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Es folgte eine 2-minütige Inkubation der Transformationsansätze auf Eis. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium pro Ligationsansatz wurden die Bakterien 45 min bei 37 °C/700 upm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1 min bei 8000 upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet

in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampizillin (LB/Amp) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Über Nacht wuchsen auf den Platten einzelne Kolonien, die am nächsten Tag für eine Minipräparation weiterverwendet wurden (C.2.1.11).

### 2.1.10 Glycerinkulturen von Bakterienklonen

Einzelne Klone der LB/Amp-Platten wurden mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in 3 ml LB-Medium + 100 µg/ml Amp über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 600 µl Bakteriensuspension mit 400 µl 50%-iger Glycerinlösung gemischt und bei –20 °C eingefroren. Alternativ wurden 600 µl Bakteriensuspension vor einer DNA-Maxipräparation aus dem Kolben entnommen und mit einer 50%-igen Glycerinlösung gemischt.

### 2.1.11 Präparation von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi-Präp)

5 ml (Mini-Präp) oder 250 ml (Maxi-Präp) LB-Medium + 100 µg/ml Ampizillin wurden mit einzelnen Bakterienklonen der ausgestrichenen LB/Amp-Platte (C.2.1.9) angeimpft und über Nacht bei 37 °C/700 upm inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine DNA-Präparation unter der Verwendung von Nucleospin-Säulen (Mini-Präp) oder Nucleobond AX 500 Kits (Maxi-Präp) nach Angaben des Herstellers.

Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen auf positive Insertionen untersucht (C.2.1.5) und gegebenenfalls zur Sequenzierung geschickt (C.2.1.4).

### 2.1.12 Isolierung von zellulärer RNA

Die RNA verschiedener Zellkulturlinien wurde mit Hilfe des RNAeasy Kits isoliert. Dazu wurden die Zellen einer konfluenten 10 cm Zellkulturschalen mit Hilfe eines Zellschabers in 1 ml PBS abgelöst und durch Zentrifugation bei 1500 upm sedimentiert. Das PBS wurde abgenommen und die RNA nach den Angaben des RNAeasy Kits isoliert. Der Zellaufschluss im Rahmen der RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe von RNA-Schredder-Säulen. Zusätzlich wurde während der RNA-Isolierung die zelluläre DNA mit Hilfe des DNase-Kits nach Angaben des Herstellers verdaut. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde durch Absorptionsmessung überprüft. Dazu wurde die isolierte RNA 1/20 in dH<sub>2</sub>O verdünnt und die Absorption der RNA bei 260 und 280 nm mit Hilfe eines Photometers gemessen.

Zusätzlich wurde die Qualität der isolierten RNA durch Agarosegelelektrophorese untersucht. Dazu wurden 0,5 ng RNA bei 100 V in einem 2 % Agarosegel analysiert.

### 2.1.13 Reverse Transkription (RT) von RNA

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des Superscript first strand synthesis Kits entsprechend den Angaben des Herstellers in eine cDNA-Bibliothek umgeschrieben. Mit Hilfe von spezifischen Primern konnte dann in einer PCR (C.2.1.1) die Expression einer bestimmten cDNA nachgewiesen werden.

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Beschichtung von Kulturschalen mit Poly-L-Lysin

6 cm-Kulturschalen wurden vollständig mit Poly-L-Lysin-Lösung bedeckt (3 ml) und mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abnahme der Poly-L-Lysin-Lösung wurden die Schalen zweifach mit je 5 ml dH<sub>2</sub>O (steril) gewaschen und getrocknet.

### 2.2.2 Kultivierung von Zellen

Die verschiedenen Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Dazu wurden die Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen in den in Tabelle 4 und 5 angegebenen Medien in unterschiedlichen Verdünnungen ausgesät und im Inkubator gezüchtet. Waren die Zellen konfluent, wurden sie mit 5 ml PBS (steril) gewaschen und anschließend mit 1 ml PBS/EDTA gelöst. Im Falle der CHO-Zellen erfolgte eine Vereinzelnung der Zellen von der Kulturschale mittels 1,5 ml Trypsin-Lösung. Die so gelösten Zellen wurden dann in 5 ml Grundmedium aufgenommen und in unterschiedlichen Verdünnungen mit auf frische Zellkulturschalen für weitere Kultivierungen ausgesät.

### 2.2.3 Transiente Transfektion mit rekombinanter DNA

Die entsprechenden Zellen wurden in Poly-L-Lysin-beschichteten 24-Well-Platten bzw. in 6 cm-Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 60% kultiviert und mittels Lipofectamin 2000 unter der Verwendung von Transformationsmedium gemäß den Anweisungen des Herstellers transfiziert. Pro Transfektion im 24-Well-Format wurden 0,5 µg DNA eingesetzt, 6 cm-Schalen wurden jeweils mit 3 µg DNA transfiziert. Im Falle einer transienten Transfektion wurde das Transfektionsmedium ca. 20 h nach Transfektion durch Grundmedium ersetzt und die Zellen 48 h nach Transfektion analysiert. Eine Auswertung der Zellen für Immunfluoreszenz wurde 24 h nach Transfektion durchgeführt.

### 2.2.4 Stabile Transfektion mit rekombinanter DNA

Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurden die entsprechenden Zellen auf unbeschichteten 24-Well-Platten ausgesät und anschließend mit 0,5 µg DNA mittels Lipofectamin 2000 transfiziert (C.2.2.3). Die zu transfizierende DNA wurde vor der Transfektion mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert. 24 h nach Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel, 48 h nach Transfektion erfolgte ein Ablösen der Zellen mittels PBS/EDTA. Abgelöste Zellen wurden dann in 6-Well-Platten umgesetzt, wobei dem Medium nun das geeignete Selektionsreagenz beigelegt wurde. Der so entstandene stabile Zellpool wurden anschließend vermehrt und auf Expression des exogenen Proteins mittels Western Blot Analyse getestet. Zur Herstellung stabiler Einzelklone wurde der stabile Zellpool verdünnt (ca. 2 Zellen/100 µl) und 200 µl der Verdünnung in eine 96-Well-Platte transferiert. Nach ca. 1-2 Wochen wuchsen in einigen Wells stabile Einzelzellklone hoch, die dann auf die Expression des exogenen Proteins getestet wurden. Positive Klone wurden in 10 cm-Schalen ausgesät und mit Hilfe des Selektionsmediums weiterkultiviert.

### 2.2.5 Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden konfluent gewachsene Zellen einer 10 cm-Zellkulturschale mit sterilem PBS-Puffer gewaschen, in 1,5 ml PBS/EDTA-Lösung abgelöst und mit 5 ml Grundmedium versetzt. Die Zellsuspension wurde in der Zentrifuge bei RT 5 min und 200 xg sedimentiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml frischem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kulturen wurden in speziellen Einfriergefäßen über Nacht bei -80 °C gefroren und anschließend bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Gewinnung von Gesamtproteinextrakten

Sämtliche Arbeitsschritte zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten erfolgten auf Eis. Zellen einer 6 cm-Kulturschale wurden zunächst mit 1,5 ml PBS gewaschen, das PBS wurde abgesaugt und anschließend wurden 800 µl Lysispuffer auf die Zellen pipettiert. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Zellschabers. Die so gelösten Zellen wurden anschließend in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C/13000 upm für 5 min. Anschließend wurde der Proteinextrakt abgenommen und in ein frisches Eppendorfggefäß pipettiert, das Zellpellet wurde verworfen. Für die Gewinnung von Proteinextrakten aus 24-Well-Platten wurden 500 µl PBS und 300 µl

Lysispuffer verwendet, ansonsten erfolgten alle Arbeitsschritte wie oben beschrieben. Nach der Herstellung der Gesamtproteinextrakte erfolgte eine Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Proben mittels des BCA-Assays (C.2.3.3). Hergestellte Proteinextrakte wurden entweder umgehend weiter verarbeitet oder bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.2. Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurde die Gesamtproteinmenge mit Hilfe des Protein Assay Kits (Biorad) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Das Proteinlysate wurde in der Regel 1:100 mit Lysispuffer verdünnt. 10  $\mu\text{l}$  dieser Verdünnung wurden dann mit 200  $\mu\text{l}$  einer 1:4-Mischung aus Protein Assay Kit und  $\text{dH}_2\text{O}$  in eine 96-Well-Platte pipettiert und 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Messung der Extinktion bei 595 nm, so dass für eine Western Blot-Analyse äquivalente Mengen unterschiedlicher Proben geladen werden konnten.

### 2.3.3 Proteinkonzentration nach dem Bicinchonic Acid Assay (BCA-Assay)

Je 10  $\mu\text{l}$  eines Proteinlysats wurden in Doppelwerten in eine 96-Well-Platte pipettiert. Je 200  $\mu\text{l}$  einer 1:50-Verdünnung aus BCA-Reagenz B und -A (Uptima, Interchim) wurden mit Hilfe einer Multi-Kanal-Pipette auf die vorgelegten Proteinlysate pipettiert. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden zusätzlich Verdünnungen einer BSA-Standardlösung zwischen 0  $\mu\text{g/ml}$  und 2  $\mu\text{g/ml}$  in einer Einfachbestimmung angesetzt und ebenfalls mit dem BCA-Reagenz-Mix versetzt. Die 96-Well-Platte wurde anschließend 25 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte photometrisch bei 562 nm. Nach Extrapolation der Eichkurve konnte eine Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben erfolgen.

### 2.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrer molekularen Größe aufzutrennen erfolgte eine eindimensionale Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen. Für die SDS-PAGE wurde das Mini-Gelsystem von Biorad verwendet, welches einen Sammelgelbereich von ca. 1 cm sowie einen Trenngelbereich von ca. 7 cm aufweist. Es wurden ausschließlich Gele mit 15 Probentaschen mit einer Kamm-Dicke von 1,5 mm verwendet. Vor der Verwendung wurden die Glasplatten mit 70% -igem Ethanol von Rückständen befreit, das Trenngel bis zu einer Höhe von ca. 2 cm unterhalb des oberen Randes gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren (ca. 15 min) wurde das Isopropanol abgekippt, der über dem Trenngel

befindliche Raum mit saugfähigem Papier getrocknet, mit Sammelgel befüllt und ein Kamm eingefügt. Nach dem vollständigen Aushärten des Sammelgels (ca. 15-20 min) wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophoresepuffer befüllt und die Taschen des Gels wurden mehrmals damit gespült. Proteinextrakte wurden mit Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C gekocht und nach dem Abgleich der Proteinkonzentrationen auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurden 7 µl geladen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 90V und nach dem Eintritt der Proteine in das Trenngel bei 140V.

Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel ist in Tabelle 8 angegeben. Ansteigende Acrylamidkonzentrationen führen zu einer höheren Vernetzung des Gels und erlaubt somit eine verbesserte Auftrennung von kleinen Proteinen.

**Tabelle 8: Zusammensetzung von 8%- und 12% -igen SDS-Polyacrylamid-Gelen**

Die angegebenen Mengen reichen für je 2 Minigele (1,5 mm).

<b>Trenngel</b>	<b>8% Gel</b>	<b>12% Gel</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	7,8 ml	6 ml
<b>30% Acrylamid</b>	4,2 ml	6 ml
<b>Trenngelpuffer</b>	4,0 ml	4 ml
<b>10% APS</b>	60 µl	60 µl
<b>TEMED</b>	30 µl	30 µl
<b>Sammelgel</b>		
<b>H<sub>2</sub>O</b>	6,5 ml	6,5 ml
<b>30% Acrylamid</b>	1,2 ml	1,2 ml
<b>Sammelgelpuffer</b>	2,5 ml	2,5 ml
<b>10% APS</b>	60 µl	60 µl
<b>TEMED</b>	30 µl	30 µl

### 2.3.5 Western Blot

Nach der Auftrennung mittels Gelelektrophorese (C.2.3.4) wurden die Proteine in einer Transferkammer auf eine PVDF-Membran übertragen. Vor dem Transfer ist eine Aktivierung der Membran durch eine Inkubation von 10 sec in Isopropanol notwendig. Nach der Aktivierung wurde die Membran kurz mit VE-Wasser gespült und in Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer wurde das Mini-Gel-Transfersystem von Biorad verwendet.

### Transferaufbau:

- Anodenplatte
- poröser Schwamm in Transferpuffer äquilibriert
- zwei Lagen Gel Blotting-Papier in Transfer-Puffer äquilibriert
- PVDF-Membran mit Isopropanol aktiviert und in Transfer-Puffer äquilibriert
- SDS-Polyacrylamid-Gel
- zwei Lagen Gel Blotting-Papier in Transfer-Puffer äquilibriert
- poröser Schwamm in Transferpuffer äquilibriert
- Kathodenplatte

Der Transfer erfolgte bei konstantem Stromfluss von 400 mA für 60 min bei RT. Nach erfolgtem Transfer wurde die PVDF-Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen 30 min bei RT in Blockierlösung geschüttelt. Die so vorbehandelte Membran wurde 2 x mit PBST gewaschen und 2 x 5 min mit PBST auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte ein Waschen der Membran für 3 x 10 min mit PBST. Der entsprechende HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde anschließend für 45 min bei RT auf die PVDF-Membran gegeben. Schließlich wurde erneut viermal je 5 min mit PBST-Puffer gewaschen. Die Detektion der mit den Antikörpern gekoppelten Proteine erfolgte unter der Verwendung des ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents nach Angaben des Herstellers unter der Verwendung von Super RX Röntgenfilmen. Zum Nachweis schwacher Signale wurde das ECL plus Western Blotting Detection System verwendet.

### 2.3.6 Immunpräzipitation (IP) von Proteinen

Zur Anreicherung eines gewünschten Proteins aus einem Gesamtproteinextrakt (C.2.3.1) wurden Immunpräzipitationen durchgeführt, bei denen das gewünschte Protein an einen entsprechenden Antikörper bindet, der seinerseits an eine immobile Phase anhaftet. Im Falle polyklonaler Antikörper wurde ProteinA-Sepharose (PAS) verwendet, bei monoklonalen Antikörper wurde ProteinG-Sepharose (PGS) eingesetzt. Sowohl PAS als auch PGS wurden vor Gebrauch 3x in PBS-Puffer gewaschen. Vor der eigentlichen IP wurde das Gesamtzelllysate mit 30 µl immobilierter Phase versetzt und 1 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Es folgte Zentrifugation bei 4 °C/8000 upm für 3 min und der Transfer des Zelllysats in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß. Auf diese Weise kann man Proteine, die unspezifisch an die immobile Phase binden, entfernen („Preclearing“). Der so gereinigte Überstand wurde dann mit dem entsprechenden Antikörper versetzt (Tabelle 2 und

3) und es wurden erneut 30 µl der immobilen Phase hinzupipettiert. Die Immunpräzipitation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler.

Die Zellsate wurden am nächsten Morgen bei 4 °C/8000 upm für 3 Minuten zentrifugiert. Es folgte ein Waschen der immobilen Phase mit 1 ml Sten-NaCl-Puffer, 1 ml Sten-SDS-Puffer sowie 1 ml Sten-Puffer. Nach dem letzten Waschschrift wurden Pufferreste mit Hilfe einer Hamilton-Spritze entnommen, die immobile Phase mit 15 µl 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend abzentrifugiert (13000 upm/30 sec). Die Proben wurden dann auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen (C.2.3.4) und auf einen Western Blot transferiert (C.2.3.5).

### 2.3.7 Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität

Zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität wurden HEK293E/AP-APP Zellen in poly-L-Lysin-beschichteten 24-Well-Platten in einer Dichte von  $4,5 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät und nach 24 h mit 0,5 µg der gewünschten cDNAs transfiziert (C.2.2.3). Die AP-APP-Reporterzelllinie (HEK293E/AP-APP) exprimiert APP, welches N-terminal an sekretorische alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Zur Bestimmung der Menge an sekretiertem APP wurde das Medium der Zellen 24 h nach Transfektion durch 500 ml neues Zellkulturmedium ersetzt und nach weiteren 24 h in 1,5 ml Eppendorfgläser überführt und bei RT/13000 upm 1 min zentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden dann in ein frisches Eppendorfgläser überführt und 30 min bei 65 °C inkubiert, um eine Hitze-inaktivierung endogener alkalischer Phosphatase zu erlangen. Die in dem Reportersystem überexprimierte Alkalische Phosphatase ist hingegen hitzestabil und wird bei diesem Vorgang nicht Hitze-inaktiviert. Anschließend wurden die Überstände bei RT/13000 upm für 30 sec zentrifugiert. Je 20 µl einer Probe wurden dann in Doppelwerten in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit 200 µl Substratpuffer versetzt. Die Absorbionsmessung der Farbreaktion erfolgte bei 405 nm zu mehreren unterschiedlichen Zeitpunkten, wobei die 96-Well-Platte dabei bei RT aufbewahrt wurde. Als Nullwert wurde der Hitze-inaktivierte Überstand von nicht-transfizierten HEK293-Zellen verwendet, als Kontrolle wurde der Überstand von AP-APP-Zellen verwendet, die mit einem leeren Kontrollplasmid transfiziert worden sind.

Parallel zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität der Proben wurden Gesamtzellextrakte der zu untersuchenden Zellen hergestellt (C.2.3.1) und die Proteinkonzentration der Proben mittels des BCA-Assay-Kits bestimmt (C.2.3.3). Die

gemessenen alkalischen Phosphatase-Aktivitäten wurden dann auf die zugehörige Proteinkonzentration des Gesamtzellextrakts normiert und graphisch dargestellt.

### 2.3.8 Biotinylierung von Oberflächenproteinen

HEK293-Zellen wurden in Poly-L-Lysin beschichteten 6 cm Schalen (C.2.2.1) bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert, auf Eis gestellt und dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Biotinlösung (0,5 mg/ml EZ-Link<sup>TM</sup> Sulfo-NHS-SS-Biotin in PBS) bedeckt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit je 3 ml Glycin-Lösung, wobei die Glycin-Lösung des letzten Waschschrittes 15 min auf den Zellen gelassen wurde, um ungebundenes Biotin abzusättigen. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 3 ml eiskaltem PBS wurden die Zellen entweder zur Bestimmung der Menge an Oberflächenproteinen direkt lysiert oder ein Internalisierungs-Experiment angeschlossen. Im Falle des Internalisierungs-Experiments wurde das PBS durch 2 ml vorgewärmtes Grundmedium ersetzt und die Zellen für die entsprechenden Zeitpunkte bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann umgehend auf Eis gestellt und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Es folgte eine dreimalige Inkubation der Schalen mit 2 ml („Cleavage buffer“) für je 15 min. Proben, deren Oberflächen-Biotinylierung nicht entfernt werden sollte, wurden in dieser Zeit parallel mit PBS inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut zweimal mit PBS gewaschen, anschließend 15 min in PBS inkubiert und dann lysiert. Die Zelllyse und die Gesamtproteinextraktgewinnung erfolgten wie unter C.2.3.1 beschrieben. Zum Nachweis von biotinylierten Proteinen wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dafür wurde das Zelllysats mit 30 µl Streptavidin Sepharose High Performance (Amersham Biosciences) versetzt und 2 h bei 4 °C bzw. über Nacht auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose-Beads wurden anschließend bei 4 °C/8000 upm für 3 min zentrifugiert und mit jeweils 1 ml Sten-NaCl-Puffer, Sten-SDS-Puffer und Sten-Puffer gewaschen. Der verbleibende Puffer wurde mit einer Hamiltonspritze vollständig entfernt, die Sepharose-Beads mit 15 µl 4x Probenpuffer versetzt und bei 95 °C 5 min aufgekocht. Nach einer Zentrifugation bei RT/13000 upm für 30 sec wurden die Proben auf einem 8% -igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (C.2.3.4) und im Western Blot analysiert (C.2.3.5).

### 2.3.9 $\gamma$ -Sekretase Inhibition

HEK293-Zellen wurden zwei Tage nach dem Aussäen für 45 min in 1 µM DAPT in DMEM Medium präinkubiert und anschließend für 8 Stunden in 1 µM DAPT in DMEM Medium

inkubiert. DAPT war in DMSO gelöst. Kontroll Zellen wurden in DMSO in DMEM Medium inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen (C.2.3.1) und die Analyse der zellulären Proteine mittels Gelelektrophorese (C.2.3.4) und Immunoblotting (C.2.3.5).

### **2.4 Immunfluoreszenz-basierte Methoden**

#### 2.4.1 Herstellung und Auswertung eines Immunfluoreszenz-Präparates

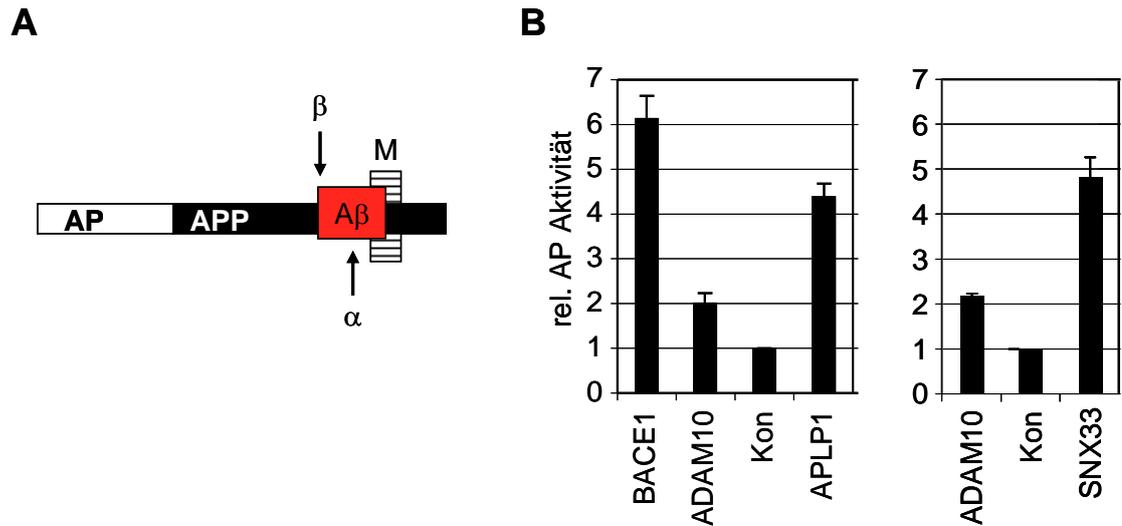
Zur Herstellung von Immunfluoreszenz-Präparaten wurden COS-Zellen auf unbeschichteten Deckgläsern mit einem Durchmesser von  $\varnothing$  10 mm in einer Dichte von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml in 24-Well-Platten ausgesät, am nächsten Tag mit  $0,3 \mu\text{g}$  DNA transfiziert (C.2.2.3) und weitere 16-24 h bis zu einer Konfluenz von 60-80% kultiviert. Dann wurde die 24-Well-Plate auf Eis transferiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle nun folgenden Wasch- und Inkubationsschritte in den Wells der 24-Well-Platte durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit je 1 ml PCM-Puffer auf Eis gewaschen. Dann erfolgte die Fixierung der Zellen auf Eis in  $500 \mu\text{l}$  Fixierlösung für 20 min. Nach dreimaligem Waschen mit je 1 ml PBS-Puffer wurden die Zellen 10 min in Ammoniumchlorid-Lösung inkubiert und erneut zweimal mit je 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden dann 2 min in Triton-Lösung inkubiert und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation der Deckgläser in  $500 \mu\text{l}$  Blockmedium zur Blockierung unspezifischer Bindungstellen. Falls nötig, wurden die Zellen anschließend mit dem Erstantikörper behandelt, der – verdünnt in Blockmedium – 20 min inkubiert wurde. Dazu wurden  $25 \mu\text{l}$  der Erstantikörperverdünnung auf Parafilm pipettiert und die Deckgläser kopfüber, mit den Zellen nach unten, vorsichtig auf diesen Tropfen gelegt. Anschließend wurden die Deckgläser zurück in 24-Well Platten transferiert, dreimal mit PBS gewaschen und für 20 min mit dem in Blockmedium verdünnten Zweitantikörper behandelt. Die Zweitantikörperinkubation erfolgte, wie oben für die Erstantikörperinkubation beschreiben, auf Parafilm. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Deckgläser kurz in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. getaucht, die Rückseite der Gläschen auf einem Papiertuch abgetropft und die Deckgläser in Mowiol-Lösung auf Objektträgern eingebettet. Das Deckglas wurde dabei mit der Zellseite nach unten auf den Objektträger gelegt. Nach ca. 30-minütiger Aushärtung bei  $37^\circ\text{C}$  erfolgte eine Analyse der Präparate unter der Verwendung eines Zeiss Axioskop2 plus Mikroskops, ausgestattet mit einem 63x/1.25-Objektiv sowie Standard FITC- und TRITC-Fluoreszenz-Filtern. Bilder der präparierten Zellen wurden mit Hilfe der Zeiss AxioCam HRm-Kamera sowie der Metaview Imaging Software (Universal Imaging Corp.) aufgenommen und ausgewertet.

### 2.4.2 APP-Antikörper-Endozytose-Assay

Zur Durchführung des APP-Antikörper-Endozytose-Experiments wurden COS-Zellen der Dichte  $1,5 \times 10^5$  auf Glasplättchen ( $\varnothing$  10 mm) ausgesät und mit Wildtyp APP<sub>695</sub> sowie dem gewünschten Konstrukt (DynK44A-GFP, APLP1-GFP, SNX33-GFP bzw. GFP) kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit eiskaltem PCM gewaschen und 20 min auf Eis mit dem AK 5315 (1:200 in PCM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PCM gewaschen. PCM wurde dann durch auf 37 °C vorgewärmtes Grundmedium ersetzt und die Zellen für die angegebenen Zeitpunkte bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach dem Standardprotokoll fixiert und für die Immunfluoreszenz-Analyse vorbereitet (C.2.4.1), dabei wurde ein Alexa555-gekoppelter Sekundärantikörper (Tabelle 3) eingesetzt. Alexa555 emittiert nach Anregung mit 553 nm Fluoreszenz bei 568 nm und erscheint deshalb als rotes Fluoreszenzsignal.

## C. Ergebnisse

In einem von Dr. Stefan Lichtenthaler durchgeführten Expressionsklonierungs-Screen (siehe A.3.) konnten das APP-Homologe APLP1 und das neue Mitglied der SNX-Familie, SNX33, als Stimulatoren der APP-Spaltung identifiziert werden. In dem vorliegenden Ergebnisteil wird der Effekt der APLP1- und der SNX33-Expression auf die APP-Spaltung näher charakterisiert und der molekulare Mechanismus der APP-Spaltungs-Stimulation beschrieben. Die Reporterzelllinie des Screens wurde auch in den hier dargestellten Versuchen verwendet und soll deswegen kurz erläutert werden. Es handelt sich um eine HEK293-Zelllinie, die stabil APP exprimiert, an dessen N-Terminus die Ektodomäne der sekretorischen alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelt ist (Abb. 11A). Wird die N-terminale Ektodomäne von APP durch  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretase abgespalten, gelangt AP-gekoppeltes APP (AP-APP) in das Medium der Reporterzelllinie. Die Menge an geschnittenem AP-APP kann dann mittels AP-Aktivitätsmessung bestimmt werden. Um die Größenordnungen der AP-APP-Sekretion abzuschätzen und um den Reporterassay zu validieren, wurde die AP-APP-Zelllinie mit den zwei bekannten Sekretasen BACE1 und ADAM10 transfiziert. Entsprechend vorangegangener Publikationen (Lichtenthaler et al., 2003; Schobel et al., 2006) resultierte die Expression der  $\beta$ -Sekretase BACE1 in einem 6-fachen Anstieg der AP-APP-Sekretion, wohingegen die  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 eine 2-fache Zunahme verursachte (Abb. 11B). Expression von APLP1 (Abb. 11B, linker Graph) oder SNX33 (Abb. 11B, rechter Graph) aktivierte die AP-APP-Spaltung um den Faktor 4 bis 5. APLP1 und SNX33 zeigten also, verglichen mit der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10, eine starke Zunahme der AP-APP-Spaltung. Mit diesem Versuch konnten die Ergebnisse des Expressionsklonierungsscreens reproduziert werden. In den folgenden Kapiteln werden zuerst unter C.1. die Ergebnisse der APLP1-Analyse dargestellt und anschließend unter C.2. die Analyse der SNX33-Effekte zusammengefasst.



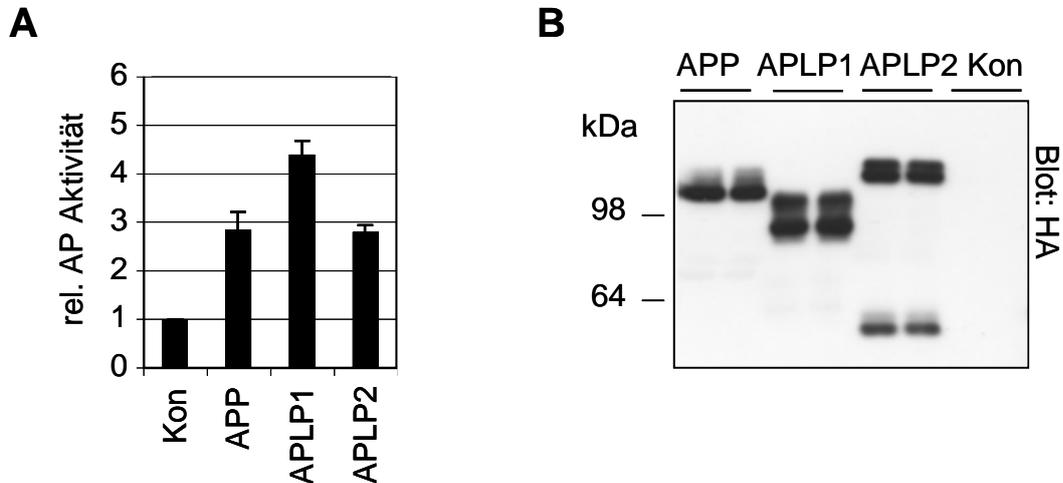
**Abb. 11 Expression von APLP1 und SNX33 stimuliert die Spaltung des AP-APP-Reporterproteins**

A) Schematische Darstellung des AP-APP-Reporterkonstrukts. Pfeile markieren die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase-Schnittstellen innerhalb der rot dargestellten A $\beta$ -Peptidomäne. M: Membran. B) HEK293-Zellen, die stabil AP-APP exprimieren, wurden transient mit BACE1-, ADAM10-, Kontroll-, APLP1- oder SNX33-cDNA transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die AP-Aktivität des Mediums gemessen und die Zellen lysiert. Dargestellt ist die AP-Aktivität relativ zu Kontroll-transfizierten Zellen. Es handelt sich um den Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten ausgeführt wurden.

## 1. APLP1 als Stimulator der APP-Spaltung

### 1.1 Die APP-Homologen stimulieren die Spaltung von AP-APP

Der AP-APP-Reporterassay wurde im Anschluss eingesetzt, um den Effekt von APLP1 auf die APP-Spaltung im Detail zu untersuchen. Da APLP1 zur APP-Genfamilie gehört, wurden zusätzlich auch die APLP1-Homologen APLP2 und APP getestet. Transfiziert man HA-markiertes APLP1 in die AP-APP-Reporterzelllinie, führte dies zu einem 4,3-fachen Anstieg der AP-APP-Sekretion (Abb. 12A). Sowohl die Expression von HA-markiertem APLP2, als auch von HA-markiertem APP stimulierte die Sekretion von AP-APP um den Faktor 2,8 (Abb. 12A). Da die Immunoblotanalyse der zugehörigen Zelllysate mit einem anti-HA-Antikörper zeigte, dass HA-markiertes APP, APLP1 und APLP2 in der Reporterzelllinie ähnlich stark exprimiert waren (Abb. 12B), könnte dies bedeuten, dass APLP2 und APP etwas schwächere Stimulatoren der APP-Spaltung als APLP1 sind. Exogene Expression eines Mitglieds der APP-Genfamilie führt also zu einer Zunahme der Sekretion des AP-APP-Reporterkonstrukts. Das bedeutet, dass exogen exprimiertes APP seine eigene Spaltung stimulieren kann und deutet darüber hinaus die Möglichkeit an, dass die APP-Homologen gegenseitig ihre Sekretion beeinflussen könnten.



**Abb. 12 Expression der APP-Homologen aktiviert die Spaltung des AP-APP-Reporterproteins**

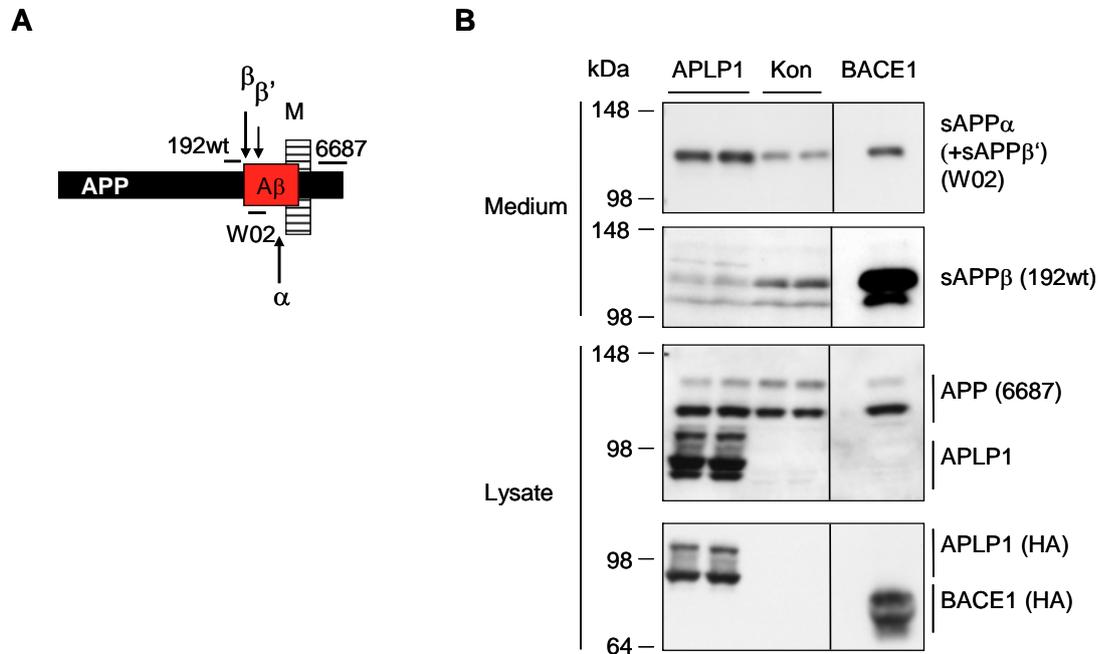
**A)** HEK293-AP-APP-Zellen wurden transient mit Kontroll-, APP-HA-, APLP1-HA- oder APLP2-HA-cDNA transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die AP-Aktivität des Mediums gemessen und die Zellen lysiert. Dargestellt ist die AP-Aktivität relativ zu Kontroll-transfizierten Zellen. Es handelt sich um den Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten ausgeführt wurden. **B)** Proben des Zelllysats wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und exprimierte HA-markierte Proteine durch Western-Blot-Analyse mit einem anti-HA-Antikörper nachgewiesen.

## 1.2 APLP1 stimuliert die $\alpha$ -Sekretase-Spaltung von endogenem APP

Der AP-APP-Reporterassay zeigt eine Stimulation oder Abnahme der APP-Spaltung an. In diesem Assay kann aber nicht zwischen  $\alpha$ -Sekretase- oder  $\beta$ -Sekretase-geschnittenem sAPP unterschieden werden. Um herauszufinden, ob APLP1 die generelle sAPP-Sekretion stimuliert oder spezifisch auf den  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretase Weg wirkt, wurden HEK293-Zellen mit Kontrollplasmid oder HA-markiertem APLP1 transient transfiziert. Um die Spezifität der entstandenen Fragmente zu überprüfen, wurde zusätzlich HA-markiertes BACE1 transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden das Medium der Zellen gesammelt und die Zellen lysiert. Medium und Zelllysate wurden dann mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot auf APP-Fragmente mit Schnitt-spezifischen Antikörpern untersucht, deren Epitope in Abbildung 13A schematisch dargestellt sind. Um das durch die  $\alpha$ -Sekretase geschnittene sAPP nachzuweisen, wurde der W02-Antikörper verwendet, der zwischen der  $\beta$ - und der  $\alpha$ -Schnittstelle bindet und nur das längere sAPP $\alpha$  erkennt. Um sAPP $\beta$  nachzuweisen, wurde der Antikörper 192wt verwendet, der an den durch den  $\beta$ -Sekretase-Schnitt entstandenen, neuen C-Terminus von sAPP $\beta$  bindet. Der 6687-Antikörper erkennt die zytoplasmatische Domäne von APP und dient der Darstellung des Gesamt-APP im Zelllysate. Zusätzlich bindet 6687 an die zytoplasmatische Domäne von APLP1. Die Expression von APLP1-HA und BACE1-HA wurde mit einem anti-HA-Antikörper im Zelllysate nachgewiesen. Da in dieser Western-Blot-Analyse die Spaltfragmente von endogenem APP nachgewiesen werden und nicht wie in dem AP-APP-Reporterassay die Spaltung von exogen exprimiertem, AP-markiertem APP, konnte mit diesem Versuchsansatz zusätzlich geklärt werden, ob APLP1 die Spaltung von endogenem Wildtyp APP beeinflusst.

Expression von APLP1 führte zu einer deutlichen Zunahme der sAPP $\alpha$ -Sekretion, wohingegen eine Abnahme der sAPP $\beta$ -Sekretion beobachtet wurde (Abb. 13B, obere Bilder). Die Menge an Gesamt-APP im Zelllysate wurde durch die Expression von APLP1 nicht verändert (Abb. 13B mittleres Panel). Parallel transfiziertes BACE1 zeigte wie zu erwarten eine sehr starke Zunahme der sAPP $\beta$ -Sekretion und zusätzlich eine leichte Zunahme der sAPP $\alpha$ -Sekretion. Diese leichte Stimulation der sAPP $\alpha$ -Sekretion resultiert von einem alternativen BACE1 Schnitt ( $\beta'$ ). Überexprimiertes BACE1 schneidet APP zu einem geringen Anteil vor der Aminosäure Glutamat an Position 11 innerhalb der A $\beta$ -Domäne (Liu et al., 2002). Das entstandene längere sAPP $\beta'$  wird von dem W02-Antikörper erkannt und verursacht die leichte Zunahme im W02-Blot (Abb. 13B, oberes Bild).

Mit dieser Analyse konnten zwei wichtige Fragen geklärt werden. Erstens verändert die Expression von APLP1 auch die Spaltung von endogenem APP und zweitens stimuliert APLP1 nur den anti-amyloidogenen,  $\alpha$ -Sekretase-vermittelten Prozessierungsweg von APP auf Kosten des amyloidogenen  $\beta$ -Sekretase-Prozessierungsweges.



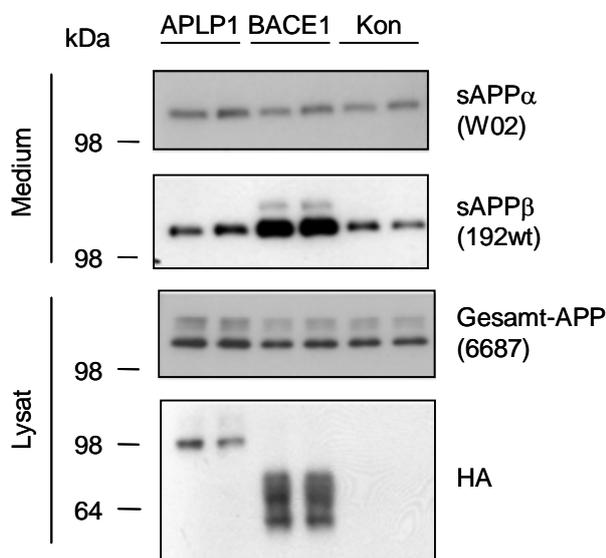
**Abb. 13 Expression von APLP1 stimuliert die  $\alpha$ -Sekretase-Prozessierung von endogenem APP**

HEK293-Zellen wurden transient mit APLP1-HA-, Kontroll- oder BACE1-HA-cDNA transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen lysiert. **A**) Schematische Darstellung von APP. Die A $\beta$ -Domäne ist in rot symbolisiert. In horizontalen Linien sind die Bindestellen der verwendeten Antikörper an APP dargestellt. Pfeile markieren die  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\beta'$ -Sekretase-Schnittstellen. M: Membran **B**) Proteine des Mediums und des Zelllysats wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und APP-Fragmente sowie exprimierte Proteine durch Western-Blot-Analyse mit den angegebenen Antikörper nachgewiesen. Im Zelllysate laufen APP, APLP1 und BACE1 in einer oberen maturen und einer unteren immaturren Bande. Der 6687-Antikörper erkennt sowohl APP als auch das transfizierte APLP1. Die vertikale Linie in den Blots bedeutet, dass Kontroll-, APLP1- und BACE1-transfizierte Proben auf dem gleichen Gel aber nicht unmittelbar nebeneinander gelaufen sind.

### 1.3 APLP1 hat keinen Einfluss auf stark überexprimiertes APP

In HEK293-Zellen, die einen endogenen APP-Expressionslevel aufweisen, verursachte APLP1 eine geringe Abnahme der sAPP $\beta$ -Sekretion (C.1.2). In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob die Abnahme von sAPP $\beta$  auch mit einer veränderten Bildung von A $\beta$  einhergeht. Da der endogene Expressionslevel von APP in HEK293E-Zellen zu niedrig ist, um A $\beta$  nachzuweisen, wurde APLP1 in HEK293E-Zellen transfiziert, die stabil APP überexprimieren (HEK293E/APP695). Als erstes sollte der Effekt von APLP1 auf die Bildung von sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$  in HEK293/APP695 Zellen reproduziert werden.

Überraschenderweise hatte die Expression von APLP1 in diesen Zellen keinen Einfluss auf die sAPP $\alpha$ - und sAPP $\beta$ -Sekretion (Abb. 14, obere Bilder). Die Expression von BACE1 hingegen resultierte in dem schon bekannten Anstieg der sAPP $\beta$ -Bildung (Abb. 14, zweites Bild von oben), der jedoch wesentlich schwächer ausfiel, als in Zellen mit endogenem APP (Abb. 13). APLP1 verursacht also nur in Zellen mit einem niedrigen APP-Expressionslevel, wie dem Level von endogenem APP in HEK293-Zellen oder von AP-APP in der Reporterzelllinie eine Veränderung der APP-Sekretion. APLP1 hat hingegen keinen Einfluss auf die APP-Spaltung bei einem hohen APP-Expressionslevel. Aus diesem Grund wurde auf eine Analyse der A $\beta$ -Bildung bei APLP1 Expression in HEK293/APP695-Zellen verzichtet.



**Abb. 14 APLP1 beeinflusst nicht die Spaltung von APP in HEK293/APP695-Zellen**

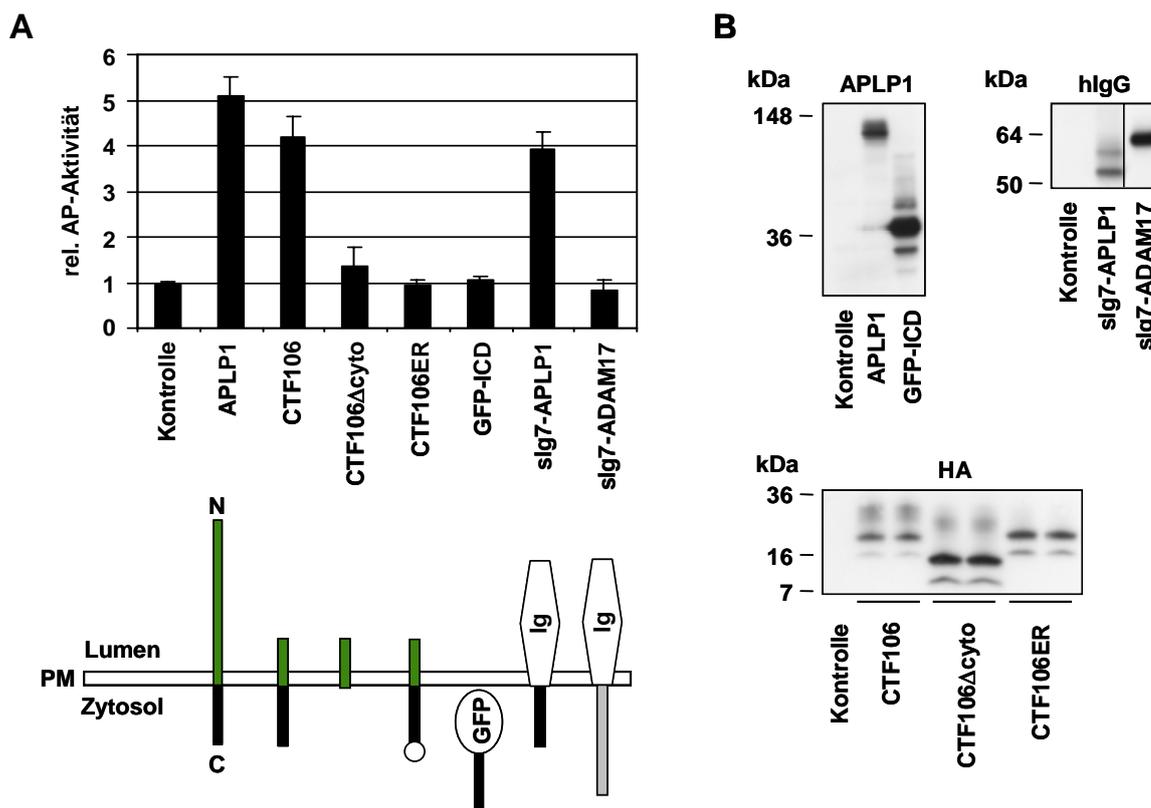
HEK293/APP695-Zellen wurden mit APLP1-HA-, BACE1-HA- oder Kontrollplasmid transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen lysiert. Proteine des Mediums und des Zelllysats wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und APP-Fragmente, sowie exprimierte Proteine durch Western-Blot-Analyse mit den angegebenen Antikörpern nachgewiesen.

#### 1.4 Die zytoplasmatische Domäne von APLP1 induziert die APP-Spaltung

Bisher existierte kein Hinweis, wie ein anderes Mitglied der APP-Familie die Spaltung von APP stimulieren könnte. Um den molekularen Mechanismus der APLP1-induzierten Sekretionszunahme zu verstehen, wurde eine Domänendeletionsanalyse durchgeführt. Es sollte geklärt werden, welche Domäne von APLP1 diesen Effekt vermittelt. Dafür wurden APLP1 und Mutanten von APLP1, denen bestimmte Domänen fehlten, im AP-APP-Reporterassay getestet. Abbildung 15A zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs. Im unteren Teil von Abbildung 15A sind die verwendeten Deletionsmutanten schematisch dargestellt.

Als erstes wurde getestet, ob die Ektodomäne von APLP1 notwendig für die Stimulation der APP-Spaltung war. Deswegen wurde neben APLP1 ein APLP1-Konstrukt, dem ein Großteil der Ektodomäne fehlte (CTF106), in die AP-APP-Reporterzelllinie transfiziert. CTF106 besteht aus den C-terminalen 106 Aminosäuren von APLP1 und entspricht ungefähr dem C-terminalen-Fragment von APP (C99) nach  $\beta$ -Sekretase-Spaltung. Da CTF106 die APP-Spaltung vergleichbar zu wildtyp APLP1 stimulierte, konnte gefolgert werden, dass die Ektodomäne von APLP1 nicht verantwortlich für die Spaltungszunahme von APP war. Um zu klären, ob die zytoplasmatische Domäne von APLP1 und CTF106 notwendig für den Spaltungseffekt war, wurde eine APLP1-Mutante (CTF106 $\Delta$ cyto) kloniert, der neben der Ektodomäne auch die zytoplasmatische Domäne fehlte. Im Gegensatz zu APLP1 und CTF106 hatte die Expression dieser Mutante keinen Einfluss auf die Spaltung von APP (CTF106 $\Delta$ cyto in Abb. 15A). Damit war die zytoplasmatische Domäne von APLP1 als essentielle Domäne für die Stimulation der APP-Spaltung identifiziert worden. Als nächstes sollte untersucht werden, ob die APLP1-zytoplasmatische Domäne diesen Effekt in den frühen oder den späten Kompartimenten des sekretorischen Weges vermittelt. Zu diesem Zweck wurde das Endoplasmatisches-Retikulum-Retentionssignal KKXX an den C-Terminus von CTF106 gehängt (CTF106ER). CTF106ER hatte keinen Einfluss auf die APP-Spaltung und demonstriert damit, dass APLP1 nicht im frühen sekretorischen Transportweg die APP-Spaltung induziert. Um zusätzlich herauszufinden, ob die APLP1-zytoplasmatische Domäne auch in einer löslichen Form die APP-Spaltung stimulieren konnte, wurde ein Fusionsprotein aus GFP und der zytoplasmatischen Domäne von APLP1 (GFP-ICD) in dem AP-APP-Reporterassay getestet. GFP-ICD hatte keinen Einfluss auf die APP-Spaltung und demonstriert damit, dass die zytoplasmatische Domäne von APLP1 membranverankert sein muss, um die APP-Spaltung zu aktivieren. Mit einer weiteren APLP1-Mutante sollte dann geklärt werden, ob der Membrananker spezifisch die APLP1-Transmembrandomäne sein muss, wie in dem CTF106-Konstrukt, oder ob eine beliebige Transmembrandomäne fusioniert an die APLP1-zytoplasmatische Domäne ausreicht die APP-Spaltung zu stimulieren. Zu diesem Zweck wurde die APLP1-zytoplasmatische Domäne an ein Fusionsprotein aus der CD7-Transmembrandomäne und der Ektodomäne von humanem IgG1 gehängt. Dieses sIg7-APLP1 Konstrukt stimulierte die APP-Spaltung vergleichbar zu CTF106. Um sicher zu gehen, dass nicht die IgG- und CD7-Domänen allein die APP-Spaltung veränderten, wurde die APLP1-zytoplasmatische Domäne durch die zytoplasmatische Domäne von ADAM17 in dem IgG-CD7-Konstrukt ersetzt. Dieses sIg7-ADAM17-Konstrukt beeinflusste die APP-Spaltung nicht und zeigt, dass die intrazelluläre

Domäne von APLP1 spezifisch die Spaltung von AP-APP stimuliert. Die Expression der APLP1-Deletionsmutanten wurde in einer Western-Blot-Analyse überprüft (Abb. 15B). Zusammenfassend ergab die APLP1-Deletionsanalyse folgendes Ergebnis. Die APLP1-zytoplasmatische Domäne verursacht in einer membranverankerten Form eine Zunahme der APP-Spaltung. Dieser Effekt findet in den späten Kompartimenten des sekretorischen Weges oder in den endosomalen Kompartimenten statt.



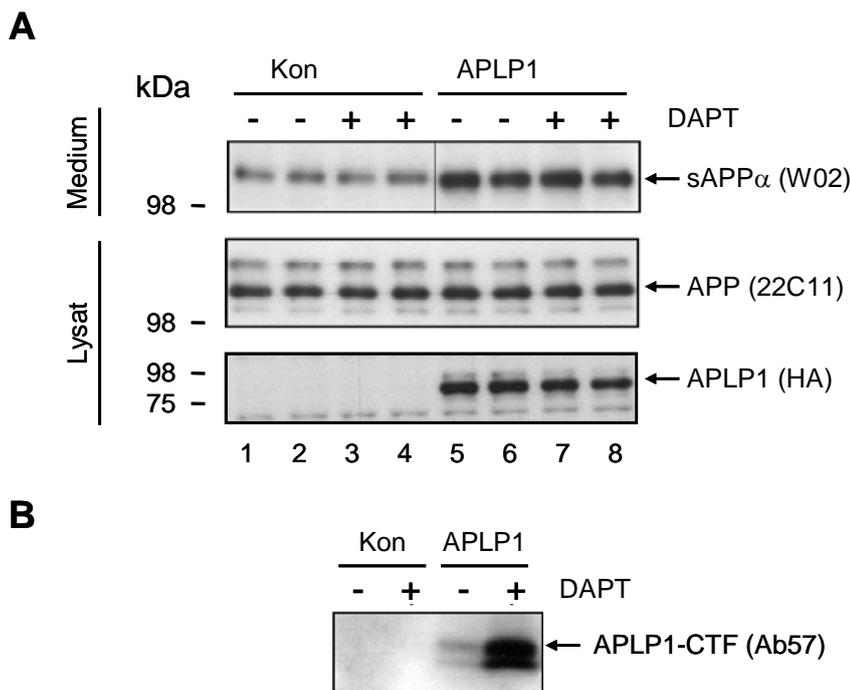
**Abb. 15 Domänendeletionsanalyse von APLP1**

HEK293-Zellen wurden mit APLP1 oder den angegebenen Deletionsmutanten von APLP1 transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen lysiert. **A)** Die AP-Aktivität des Mediums wurde gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert der AP-Aktivität relativ zu Kontroll-transfizierten Zellen von zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten ausgeführt wurden. Unterhalb des AP-Diagramms sind die Deletionskonstrukte schematisch dargestellt. Der N- und der C-Terminus von APLP1 sind mit einem N bzw. C, die Membran ist mit einem M markiert. **B)** Proteine des Zelllysats wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western-Blot nachgewiesen. APLP1 und dessen Deletionsmutanten wurden mit Antikörper Ab57, mit einem anti-HA- oder anti-humanen IgG-Antikörper detektiert. Die vertikale Linie im IgG-Blot symbolisiert, dass die beiden Banden auf demselben Gel, aber nicht direkt nebeneinander gelaufen sind. CTF106 wird im Blot als zwei Banden erkannt. Die untere Bande repräsentiert wahrscheinlich eine N-terminal verkürzte Form von CTF106.

CTF106: APLP1-C-terminales-Fragment aus den C-terminalen 106 Aminosäuren; CTF106 $\Delta$ cyto: CTF106 ohne zytoplasmatische Domäne; CTF106ER: CTF106 mit einem ER-Rückhaltmotiv; GFP-ICD: die zytoplasmatische Domäne von APLP1 mit einer N-terminalen GFP-Markierung; slg7-APLP1/TACE: chimeres Typ-I-Transmembranprotein aus der Ektodomäne von humanem IgG1, der CD7-Transmembrandomäne und der APLP1/ADAM17-zytoplasmatischen Domäne.

### 1.5 Die $\gamma$ -Sekretase-Aktivität ist nicht erforderlich für die APLP1-induzierte Zunahme der APP-Spaltung

APLP1 wird genau wie APP prozessiert, indem zuerst die Ektodomäne von APLP1 abgespalten und dann APLP1 durch  $\gamma$ -Sekretase innerhalb der Membran geschnitten wird (Eggert et al., 2004; Scheinfeld et al., 2002; Walsh et al., 2003). Der  $\gamma$ -Sekretase-Schnitt entlässt die APLP1-zytoplasmatische Domäne (APLP1-ICD) ins Zytosol. Bisher gibt es keine Anhaltspunkte für eine Funktion der APLP1-ICD. Eine Möglichkeit, wie die APLP1-zytoplasmatische Domäne die Spaltung von APP beeinflussen könnte, wäre, wenn die APLP1-ICD ähnlich wie die Notch-ICD in den Kern transportiert würde (Fortini, 2002) und dort die Transkription von Genen steuert, die die APP-Spaltung regulieren. In diesem Fall sollte eine Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase den APLP1-induzierten Effekt auf die APP-Spaltung verhindern. Es würde kein APLP1-ICD produziert, das in den Kern lokalisieren könnte.



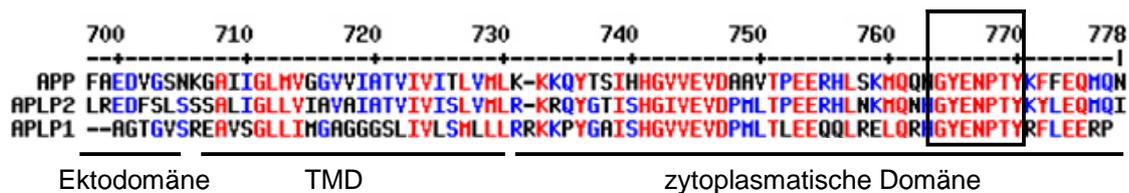
**Abb. 16 Die  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität ist nicht für die APLP1-induzierte APP-Spaltung notwendig**

HEK293-Zellen wurden mit Kontrollvektor oder APLP1 transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen für 8 h mit Dimethylsulfoxid oder dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT behandelt. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen lysiert. **A)** Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Western-Blotting wurde sAPP $\alpha$  im Medium und Gesamt-APP im Lysat mit dem Antikörpern W02 nachgewiesen. Die vertikale Linie im oberen Blot bedeutet, dass Kontroll- und APLP1-transfizierte Proben auf dem gleichen Gel aber nicht unmittelbar nebeneinander gelaufen sind. Die Zahlen unter den Blots geben die Nummer der jeweiligen Bahn an. **B)** Die C-terminalen Fragmente von APLP1 wurden mit dem Antikörper Ab57 detektiert.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Vektor- und APLP1-transfizierte Zellen mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT (Dovey et al., 2001) oder als Kontrolle mit DMSO behandelt. Die Expression von APLP1 führte sowohl in DAPT-, als auch in DMSO-behandelten Zellen zu einer Zunahme der sAPP $\alpha$ -Sekretion (Abb. 16A oberer Blot, Bahn 5-8) im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen (Abb. 16A oberer Blot, Bahn 1-4). Um nachzuprüfen, ob DAPT in dem Experiment aktiv war, wurde das APLP1-CTF des Zelllysats immunopräzipitiert. In DAPT-behandelten Zellen reichert sich APLP1-CTF stark an (Abb. 16B) und belegt damit eine Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase.  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität und die daraus resultierende Bildung der APLP1-ICD sind demnach nicht notwendig, um den APLP1-induzierten Phänotyp zu vermitteln. Damit kann die Hypothese, dass die APLP1-ICD die Transkription von Spaltungsstimulierenden Genen steuert, als mechanistische Ursache für die APLP1-induzierte Zunahme der APP-Spaltung ausgeschlossen werden.

### **1.6 Das zytoplasmatische GYENPXY-Motiv von APLP1 spielt eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung der APP-Spaltung**

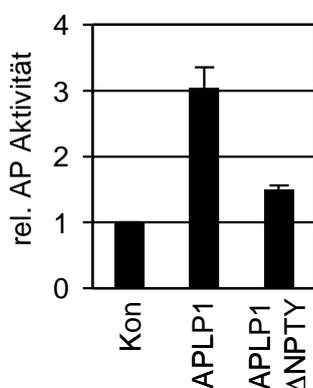
Eine weitere Möglichkeit, wie die APLP1-zytoplasmatische Domäne die Spaltung von APP beeinflussen könnte, wäre wenn APLP1 die gleichen zytosolischen Proteine wie APP bindet und mit APP um deren Interaktion in Konkurrenz steht. Exogen exprimiertes APLP1 würde dann, da es im Überschuss vorliegt, bevorzugt mit diesen Proteinen interagieren, wohingegen APP ohne Interaktionspartner anders transportiert oder prozessiert werden könnte. Innerhalb der zytoplasmatischen Domäne der APP-Homologen befindet sich ein konserviertes Aminosäuremotiv, das GYENPTY-Motiv (Abb. 17), das die Bindung von zytosolischen Adapterproteinen an APP vermittelt (siehe auch A) 2.4). Ob APLP1 ebenfalls an diese Adapterproteine bindet und inwieweit das GYENPTY-Motiv bei einer solchen Interaktion beteiligt ist, wurde bisher nicht untersucht. Um Aufschluss über den molekularen Mechanismus der APLP1-induzierten APP-Spaltungsstimulation zu erhalten, sollte deswegen in einem weiteren Versuch geklärt werden, ob das GYENPTY-Motiv der zytoplasmatischen Domäne von APLP1 notwendig ist, um die APP-Spaltung zu stimulieren.



**Abb. 17 Das zytosolische GYENPTY-Motiv ist unter den APP-Homologen konserviert**

Die Aminosäuresequenzen der APP-, APLP2- und APLP1-zytoplasmatischen Domäne wurden verglichen. Stimmen alle drei Homologen an einer Aminosäureposition mit ähnlichen Aminosäuren überein, so sind diese Reste in rot dargestellt. Besitzen nur zwei Homologe an einer Position identische Aminosäuren, so sind diese in blau dargestellt. Der schwarze Kasten markiert das konservierte GYENPTY-Motiv. Horizontale Linien markieren die Ektodomäne, die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische Domäne der APP-Homologen.

Es wurde eine Mutante von APLP1 kloniert, der das GYENPTY-Signal der zytoplasmatischen Domäne fehlt (APLP1 $\Delta$ NPTY). Transfektion von APLP1 $\Delta$ NPTY in die AP-APP-Reporterzelllinie führte nur noch zu einem 1,4-fachen Anstieg der APP-Sekretion, verglichen mit einem 3-fachen Anstieg nach APLP1-Expression (Abb. 18). Das GYENPTY-Signal ist damit essentiell für die Zunahme der APP-Spaltung nach APLP1-Expression. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Modell der Konkurrenz von APLP1 und APP um die gleichen zytosolischen Interaktionspartner.

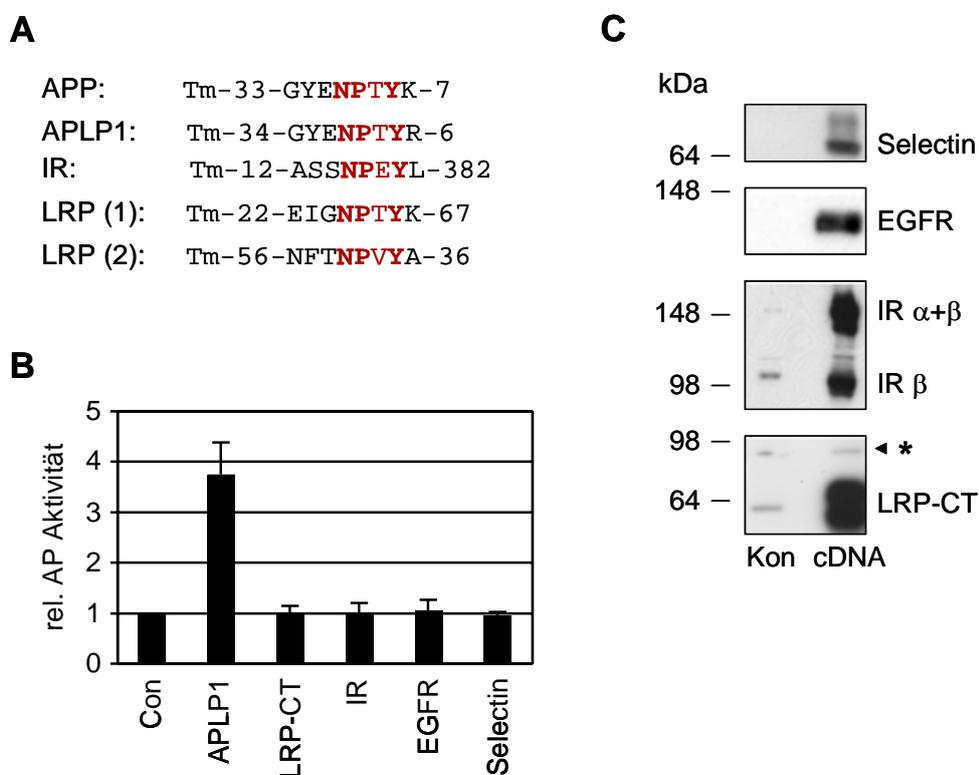


**Abb. 18 Das GYENPTY-Motiv von APLP1 ist essentiell für den APLP1-vermittelten Anstieg der APP-Sekretion**

AP-APP-HEK293-Zellen wurden mit Kontrollvektor, APLP1 oder einer Mutante von APLP1, der das GYENPTY-Signal fehlte (APLP1 $\Delta$ NPTY), transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die AP-Aktivität des Mediums gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert der AP-Aktivität relativ zu Kontrolltransfizierten Zellen von zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten ausgeführt wurden.

Das GYENPTY-Signal gehört zur Familie der Tyrosin-abhängigen NPXY-Signale. Neben der APP-Familie kommen diese NPXY-Motive auch in der zytoplasmatischen Domäne weniger weiterer Membranproteinen, wie z.B. des LRPs, des IRs und des EGFRs vor (siehe Einleitung A) 2.3 und Abb. 19A). Um zu untersuchen, ob das NPXY-Signal dieser

Transmembranproteine ebenfalls die APP-Spaltung stimuliert, oder ob dieser Effekt spezifisch nur durch die zytoplasmatische Domäne von APLP1 ausgelöst wird, wurden die C-terminale Domäne von LRP (LRP-CT), der IR, der EGFR und zur Kontrolle ein Typ-I-Transmembranprotein ohne NPXY-Motiv (L-Selektin) in die AP-APP-Reporterzelllinie transfiziert (Abb. 19A und B). Die Expression dieser Proteine wurde mittels Western-Blott überprüft (Abb. 19C). Wie in Abb. 18B zu erkennen ist, führte keines der getesteten Transmembranproteine zu einer Zunahme der APP-Sekretion (Abb. 19B). Dieser Versuch zeigt, dass innerhalb der NPXY-Proteinklasse spezifisch nur die APP-Familie die Spaltung von APP induzieren kann.

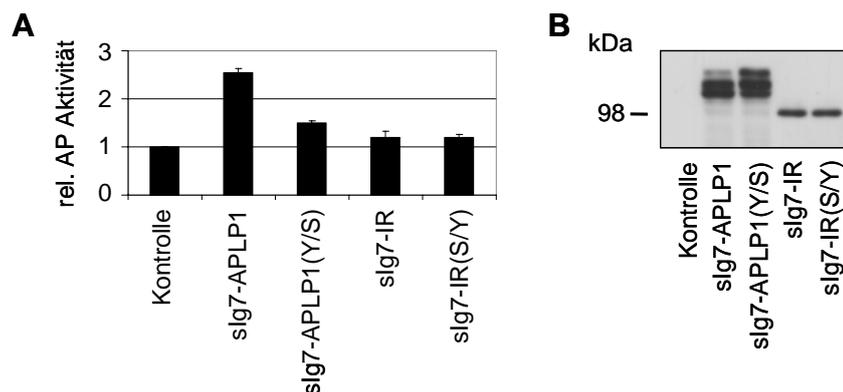


**Abb. 19 Das NPXY-Motiv anderer Typ-I-Transmembranproteine stimuliert nicht die APP-Spaltung**

**A)** Vergleich der NPXY-Signale verschiedener Typ-I-Transmembranproteine. Das NPXY-Motiv ist rot markiert, gleiche Reste sind fett abgebildet. Die Zahlen vor dem Aminosäuremotiv geben die Anzahl an weiteren Aminosäuren bis zur Transmembrandomäne (Tm) an, die Zahlen nach dem Motiv die Anzahl der restlichen C-terminalen Aminosäuren. LRP besitzt zwei NPXY-Motive in seiner zytosolischen Domäne die mit den Nummern (1) und (2) unterschieden werden. **B)** AP-APP-HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die AP-Aktivität des Mediums gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert der AP-Aktivität relativ zu Kontrolltransfizierten Zellen von zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten ausgeführt wurden. **C)** Proteine des Zelllysats der in B) beschriebenen Proben wurde mit Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western-Blot detektiert. Der IR läuft auf dem Gel einmal als Gesamt-IR (IR  $\alpha$ + $\beta$ ) und einmal als IR- $\beta$ -Kette. Der Stern markiert endogenes LRP.

Da das NPXY-Motiv alleine nicht den APLP1-induzierten APP-Spaltungs-Phänotyp vermittelt, wurden erweiterte NPXY-Signale verschiedener Transmembranproteine verglichen. Im Gegensatz zu anderen NPXY-Sequenzen befindet sich bei der APP-Familie ein Tyrosinrest (Tyr638) in einer Distanz von zwei Aminosäuren vor dem NPXY-Motiv (Abb. 19A). Dieser Tyrosinrest spielt eine wichtige Rolle bei der Endozytose von APP (Perez et al., 1996) und bei der Bindung von APP an zytosolische Adapterproteine (Borg et al., 1996). Um zu untersuchen, ob Tyr638 essentiell für den Anstieg der APP-Spaltung ist, wurde Tyrosin 638 in dem sIg7-APLP1-Konstrukt zu Serin mutiert (sIg7-APLP1(Y/S)). Serin befindet sich zwei Aminosäuren vor dem NPXY-Motiv des IR. Gleichzeitig wurde auch ein Fusionsprotein aus der Insulinrezeptor-zytoplasmatischen Domäne und dem IgG-CD7-Konstrukt kloniert (sIg7-IR), sowie der Serinrest zu Tyrosin in sIg7-IR mutiert (sIg7-IR(S/Y)). Alle vier Konstrukte wurden im AP-APP-Reporterassay auf ihre Spaltungs-induzierende Wirkung überprüft. Die Expression der sIg7-Konstrukte wurde parallel mittels Western-Blot-Analyse überprüft (Abb. 20B).

Mutation des Tyrosins zu Serin in sIg7-APLP1(Y/S) resultierte in einem für die APP-Spaltung inaktiven Konstrukt (Abb. 20A). Tyr638 scheint also essentiell für die APLP1-induzierte APP-Spaltung zu sein. Da sowohl sIg7-IR als auch sIg7-IR (S/Y) zu keinem Anstieg der APP-Spaltung führten, reicht der Tyrosinrest zwei Positionen vor dem NPXY-Motiv alleine nicht aus, um die APP-Spaltung zu erhöhen. Damit konnte gezeigt werden, dass das erweiterte GYENPTY -Motiv den Anstieg der APP-Spaltung vermittelt.

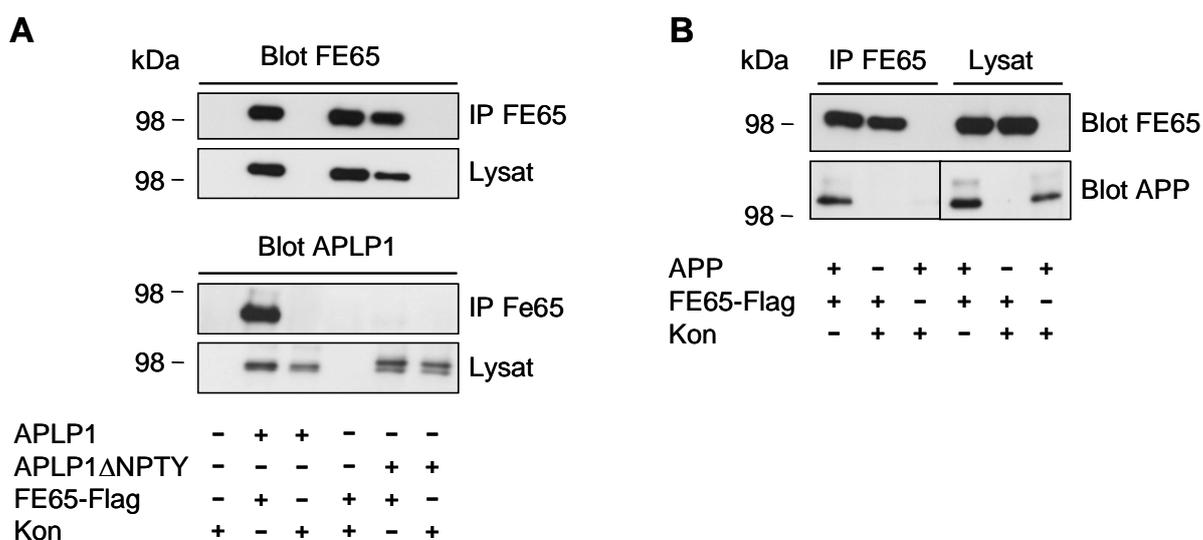


**Abb. 20 Das erste Tyrosin (Tyrosin 638) des GYENPTY-Motivs ist notwendig für den APP-Stimulationseffekt**

**A)** AP-APP/HEK293-Zellen wurden mit den sIg7-APLP1, sIg7-APLP1(Y/S), bei dem Tyrosin 638 zu Serin mutiert war, sIg-IR oder sIg7-IR(S/Y) bei dem das Serin zwei Aminosäuren vor dem Tyrosin des NPXY-Motivs zu Tyrosin mutiert war, transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die AP-Aktivität des Mediums gemessen. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der AP-Aktivität relativ zu Kontroll-transfizierten Zellen von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten ausgeführt wurden. **B)** Proteine des Zelllysats der in A) beschriebenen Proben wurden mit Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western-Blot mit anti-hIgG1 detektiert.

### 1.7 Das GYENPTY-Motiv der APLP1-zytoplasmatischen Domäne bindet FE65

In einem weiteren Versuch sollten nun zytosolische Adapterproteine gefunden werden, die sowohl APP als auch APLP1 binden. Da bekannt war, dass Tyr638 des GYENPTY-Motivs essentiell für die Bindung von APP an FE65 ist (Borg et al., 1996), wurde untersucht, ob erstens APLP1 FE65 bindet und ob zweitens für diese Bindung das GYENPTY-Signal notwendig ist. Dazu wurde FE65 zusammen mit APLP1 oder APLP1 $\Delta$ NPTY in HEK293 exprimiert. Dann wurde FE65 aus dem Zelllysate immunpräzipitiert und präzipitiertes FE65 (Abb. 21A erster Blot) sowie kopräzipitiertes APLP1 (Abb. 21A dritter Blot) mit Gelelektrophorese und Immunoblot analysiert. Die Expression von FE65 und APLP1 wurde durch Gelelektrophorese und Immunoblot im Zelllysate nachgewiesen (Abb. 21A zweite und vierter Blot). Zur Kontrolle wurde parallel FE65 zusammen mit APP transfiziert und präzipitiert (Abb. 21B). In diesem Versuch konnte eine Bindung von APLP1, nicht aber von APLP1 $\Delta$ NPTY an FE65 nachgewiesen werden (Abb. 21A dritter Blot).

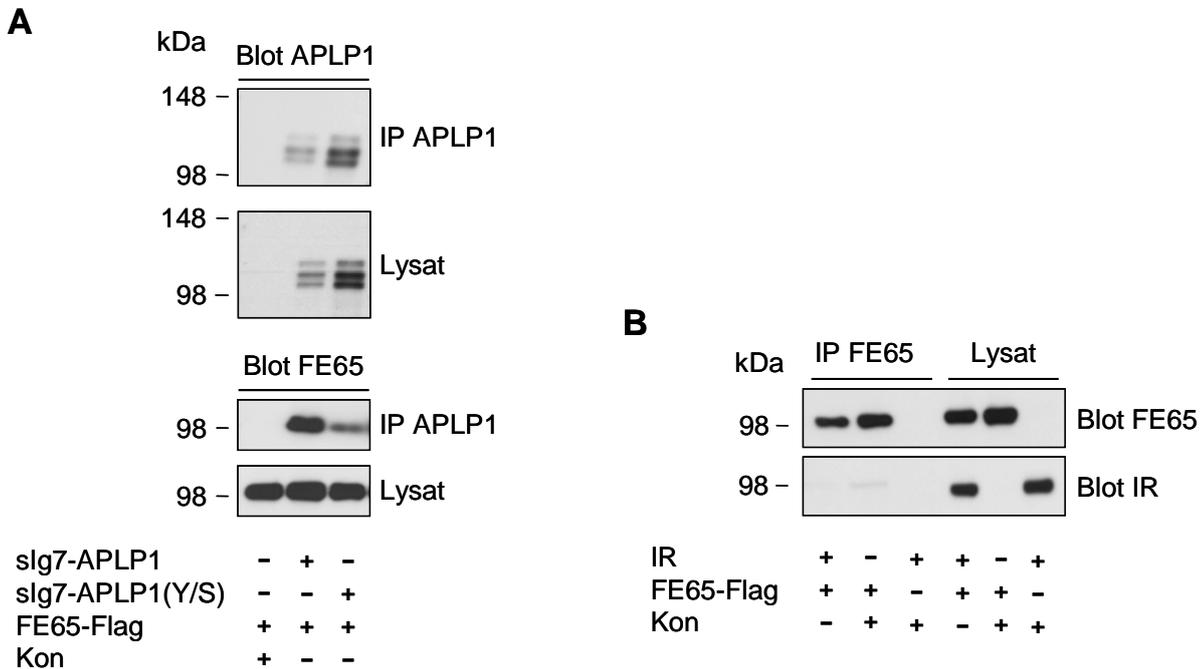


**Abb. 21 APLP1 bindet FE65**

HEK293-Zellen wurden transient mit Flag-markiertem FE65 und APLP1, oder APLP1 $\Delta$ NPTY (A) oder FE65-Flag und APP (B) oder FE65-Flag und Kontrollvektor (A und B) kotransfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurde das Zelllysate mit einem anti-Flag-Antikörper präzipitiert und präzipitiertes FE65 sowie kopräzipitiertes APLP1 oder APP mittels Gelelektrophorese und Immunoblotanalyse nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Expression von FE65, APLP1 und APP im Lysate überprüft IP: Immunpräzipitation.

In einem weiteren Experiment konnte FE65 mit sIG7-APLP1, kaum aber mit sIg7-APLP1(Y/S) kopräzipitiert werden (Abb. 22A, dritter Blot). Auch zwischen dem IR und FE65 konnte keine Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 22B, unterer Blot). Diese Daten belegen erstens, dass APLP1 FE65 bindet und dass zweitens der erste Tyrosinrest des

GYENPTY-Motivs der APLP1-zytoplasmatischen Domäne kritisch für die Bindung von APLP1 an FE65 ist.



**Abb. 22 Tyr638 ist notwendig für die Bindung von APLP1 an FE65**

**A)** HEK293-Zellen wurden transient mit FE65-Flag und sIg7-APLP1, sIg7-APLP1(Y/S) oder Kontrollvektor transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurde das Zelllysate mit anti-humanem IgG präzipitiert und präzipitiertes sIg7-APLP1 (oberer Blot) sowie kopräzipitiertes FE65 (dritter Blot) mittels Gelelektrophorese und Immunoblotanalyse nachgewiesen. Die Expression von FE65, sIg7-APLP1 und sIg7-APLP1(Y/S) wurde im Lysat überprüft (zweiter und vierter Blot). sIg7-APLP1(Y/S): Tyr638 wurde zu Serin mutiert. **B)** Flag markiertes FE65 und IR oder Kontrollvektor wurden zusammen in HEK293-Zellen exprimiert. Immunopräzipitation mit anti-Flag-Antikörper und Analyse der präzipitierten Proteine und exprimierten Proteine im Lysat mittels Gelelektrophorese und Immunoblot mit anti-Flag- und anti-IR-Antikörper. IP: Immunopräzipitation.

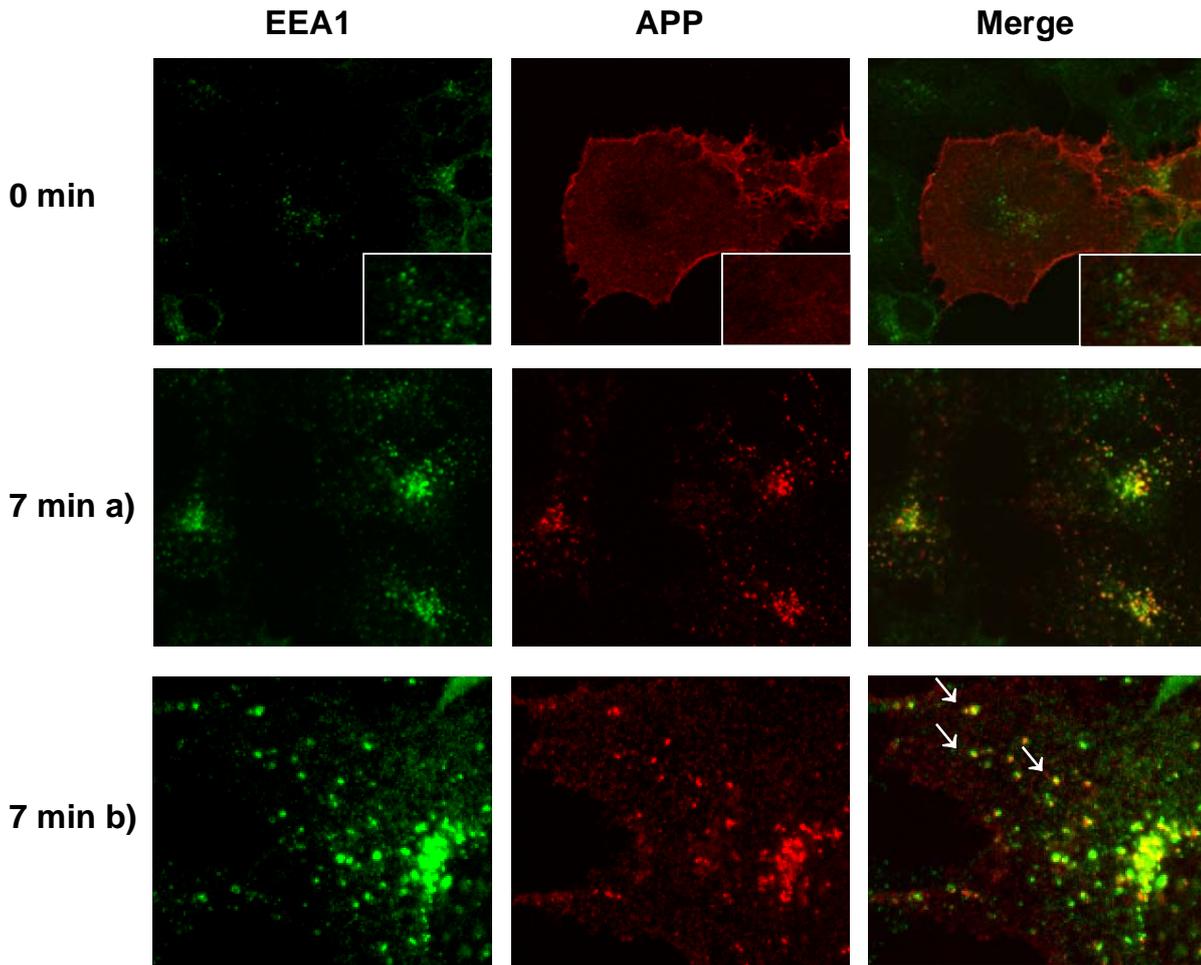
### 1.8 APLP1 inhibiert die Endozytose von APP

In den weiteren Versuchen sollte nun der molekulare Mechanismus der APLP1-vermittelten APP-Spaltungsstimulation identifiziert werden. Die vorangegangenen Experimente zeigten, welche Domäne von APLP1 den Anstieg der APP-Sekretion vermittelt. Dabei war klar geworden, dass die von APLP1 verursachte Zunahme der APP-Spaltung mit der Fähigkeit von APLP1 korrelierte FE65 zu binden. Für beide Effekte war das zytoplasmatische GYENPTY-Signal notwendig. Da das GYENPTY-Signal der APP-zytoplasmatischen Domäne essentiell für die Endozytose von APP ist, wurde als nächstes getestet, ob APLP1 die Endozytose von APP beeinflusst. Dazu wurde ein APP-Endozytoseassay etabliert, der im Folgenden kurz beschrieben wird. Es handelt sich dabei um einen Fluoreszenz-basierten

Assay. Da HEK293-Zellen besonders klein sind, wurde der Versuch in den größeren und für eine Fluoreszenzanalyse besser geeigneten COS-Zellen durchgeführt.

COS-Zellen wurden transient mit APP transfiziert. Dann wurden die Zellen auf Eis gestellt, um alle Transportvorgänge in der Zelle zu inhibieren. Das Oberflächen-APP wurde mit einem Antikörper, der an die Ektodomäne von APP bindet, markiert. Ungebundener Antikörper wurde gewaschen. Um die Endozytose von markiertem Oberflächen-APP zu erlauben, wurden die Zellen für unterschiedlich lange Zeitintervalle bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem weiteren Antikörper gegen EEA1 behandelt. EEA1 ist ein Transmembranprotein, das nur in frühen Endosomen vorkommt und deswegen als Marker des frühen Endozytoseweges benutzt wird (Walter et al., 2001). Der polyklonale APP-Antikörper und der monoklonale EEA1-Antikörper wurden dann mit Fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern unterschiedlicher Farbe sichtbar gemacht.

Untersucht man diese Zellen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, kann die Endozytose des markierten Oberflächen-APP gut beobachtet werden (Abb. 23). APP, das sich im sekretorischen Weg befindet, ist in diesem Assay nicht sichtbar, da nur das APP an der Zelloberfläche markiert wurde. Zum Zeitpunkt 0 min, wenn die Zellen nicht bei 37°C inkubiert, sondern nur Oberflächen-APP markiert wurde, ist das APP-Signal gleichmäßig über die Oberfläche der Zelle verteilt und ist an den Zellrändern besonders gut sichtbar (Abb. 23, oberste Spalte, mittleres Bild, rot). Nach 7 min Inkubation bei 37°C, befindet sich das markierte APP in kleinen vesikulären Strukturen innerhalb der Zelle, die in der Nähe des Zellkerns gehäuft auftreten (Abb. 23 zweite Spalte, mittleres Bild, rot). Um festzustellen, ob diese Strukturen physiologisch-relevante Vesikel des endosomalen Kompartiments sind, wurde das APP-Signal mit dem EEA1-Signal verglichen. EEA1 befindet sich sowohl zum Zeitpunkt 0 min als auch zum Zeitpunkt 7 min in kleinen Vesikeln in der Zelle, die ebenfalls in der Nähe des Kerns konzentriert vorliegen (Abb. 23, erste Reihe, grün). In allen hier abgebildeten Versuchen ist das APP-Signal rot und das Signal für EEA1 grün dargestellt. Legt man das rote APP-Signal in einem Bild mit dem grünen EEA1-Signal zusammen, erscheinen Bereiche der APP- und EEA1-Kolokalisierung in gelb (Abb. 23, rechte Reihe). Zum Zeitpunkt 7 min kolokalisiert ein Großteil der APP-positiven Vesikel mit den EEA1-markierten Vesikeln (Abb. 23, rechte Reihe, zweite und dritte Spalte). Dies beweist, dass in diesem Assay markiertes Oberflächen-APP innerhalb weniger Minuten in frühe Endosomen aufgenommen wurde und sich der Assay damit zur Untersuchung der APP-Endozytose eignet.

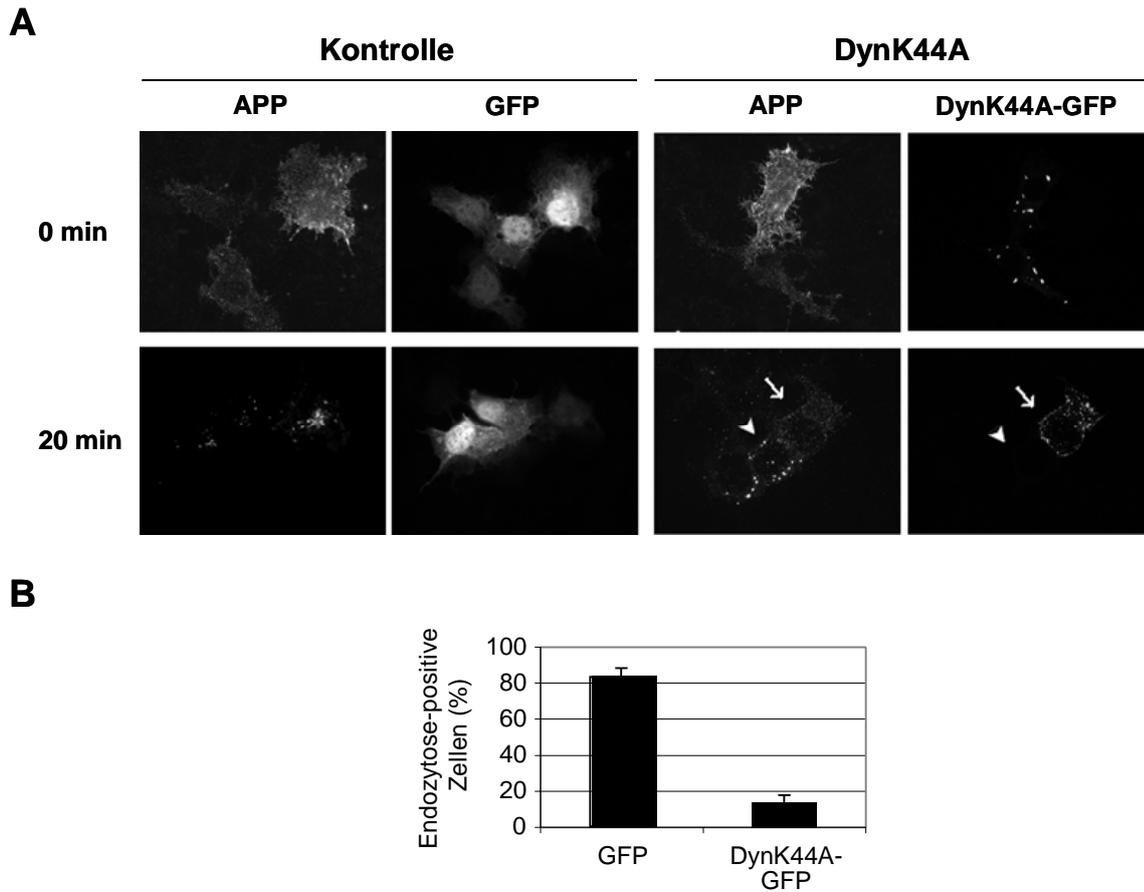


**Abb. 23 Endozytoseassay für APP**

COS-Zellen, die transient mit APP transfiziert wurden, wurden auf Eis mit anti-APP-Ektodomänen-Antikörper behandelt. Ungebundener Antikörper wurde gewaschen und die Zellen für 0 oder 7 min bei 37°C inkubiert um Endozytose von Antikörper-markiertem APP zu erlauben. Danach wurden die Zellen auf Eis fixiert und permeabilisiert. Frühe Endosomen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen EEA1 und einem anti-Maus Zweitantikörper angefarbt, das Antikörper-markierte APP mit einem anti-Kanarienvogel Zweitantikörper. Die Zweitantikörper waren mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die linke Spalte zeigt das Signal für frühe Endosomen in grün, die mittlere Spalte das APP-Signal in rot und die rechte Spalte frühe Endosomen und APP-Signal übereinandergelegt (Merge). Eine Kolokalisierung von frühen Endosomen und APP in der rechten Spalte ist in gelben Bereichen erkennbar. Zusätzlich wurden einige EEA1- und APP-positive Vesikel mit Pfeilen markiert. Die oberste Reihe zeigt das EEA1- und APP-Signal zum Zeitpunkt 0 min, die mittlere und untere Reihe nach 7 min Inkubation bei 37°C. In der oberen Reihe ist in der unteren rechten Ecke ein Ausschnitt vergrößert abgebildet. In der unteren Reihe (7 min b) sind vergrößerte Ausschnitte aus der mittleren Reihe (7 min a) gezeigt.

Als nächstes musste sichergestellt werden, dass sich der APP-Endozytoseassay auch dazu eignet, eine verlangsamte oder inhibierte Endozytose von APP aufzuzeigen. Dazu wurden COS-Zellen parallel mit APP und DynaminK44A-GFP (DynK44A) oder APP und GFP

als Kontrolle transfiziert. DynK44A ist eine dominant-negative Mutante von Dynamin, die die Endozytose von APP hemmt (Chyung and Selkoe, 2003). Oberflächen-APP wurde, wie oben beschrieben, auf Eis mit einem anti-APP-Ektodomänen-Antikörper markiert, ungebundener Antikörper gewaschen und die Zellen für 0 min oder 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und Erstantikörper-gebundenes APP mit einem fluoreszenz-markierten Zweitantikörper lokalisiert. Die APP Lokalisierung wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert und repräsentative Bilder in Abb. 24 dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 min befand sich sowohl in Kontroll-GFP als auch in DynK44A-GFP transfizierten Zellen das gesamte markierte APP an der Zelloberfläche (Abb. 24, obere Reihe, erstes und drittes Bild). Nach 20 min Inkubation bei 37°C war in GFP-transfizierten Zellen kein Zellmembran-APP mehr erkennbar, sondern das markierte APP befand sich in endozytotischen Vesikeln nahe des Kerns (Abb. 24, untere Reihe, erstes Bild). In DynK44A-GFP exprimierenden Zellen (Abb.24, untere Reihe viertes Bild mit einem Pfeil markiert) waren dagegen eine schwache Zellmembranlokalisierung von APP und keine intrazellulären Vesikel erkennbar (Abb.24, untere Reihe drittes Bild mit einem Pfeil markiert). Eine benachbarte, nicht DynK44A-transfizierte Zelle im gleichen Bild (Pfeilspitze in Abb. 24, untere Reihe viertes Bild) zeigte deutlich APP in Kern-nahen Vesikeln vergleichbar der GFP-exprimierenden Zellen. In DynK44A-transfizierten Zellen ist die Endozytose von APP inhibiert. Als Folge akkumuliert Antikörper-markiertes APP an der Zellmembran, wird dort von Sekretasen geschnitten und die Antikörper-markierte Ektodomäne von APP wird ins Medium sezerniert (Chyung and Selkoe, 2003). Nach 20 min Inkubation bei 37°C war daher die Antikörperfärbung der Zellmembran sehr viel schwächer, als nach 0 min Inkubation bei 37°C. Um eine statistische Auswertung der Endozytoseinhibition bei DynK44A-Expression zu erhalten, wurde die Anzahl der Zellen, in denen APP-Endozytose stattfand, ermittelt. Als Endozytose-positiv wurden dabei Zellen gewertet, bei denen intrazelluläre APP-Vesikel vorhanden waren. Endozytose-negativ waren solche Zellen, die nur Oberflächenfärbung und keine APP-Vesikel zeigten. Die Analyse von jeweils 100 GFP- oder DynK44A-GFP-exprimierenden Zellen ergab, dass nach 20 min Inkubation bei 37°C bei 82 % der Kontroll-transfizierten Zellen die Endozytose von APP sichtbar war, während bei DynK44A-exprimierenden Zellen nur zu 16 % Endozytose von APP auftrat. Diese Zahlen belegen, dass der APP-Endozytoseassay in der Lage ist, eine Hemmung der APP-Endozytose darzustellen.

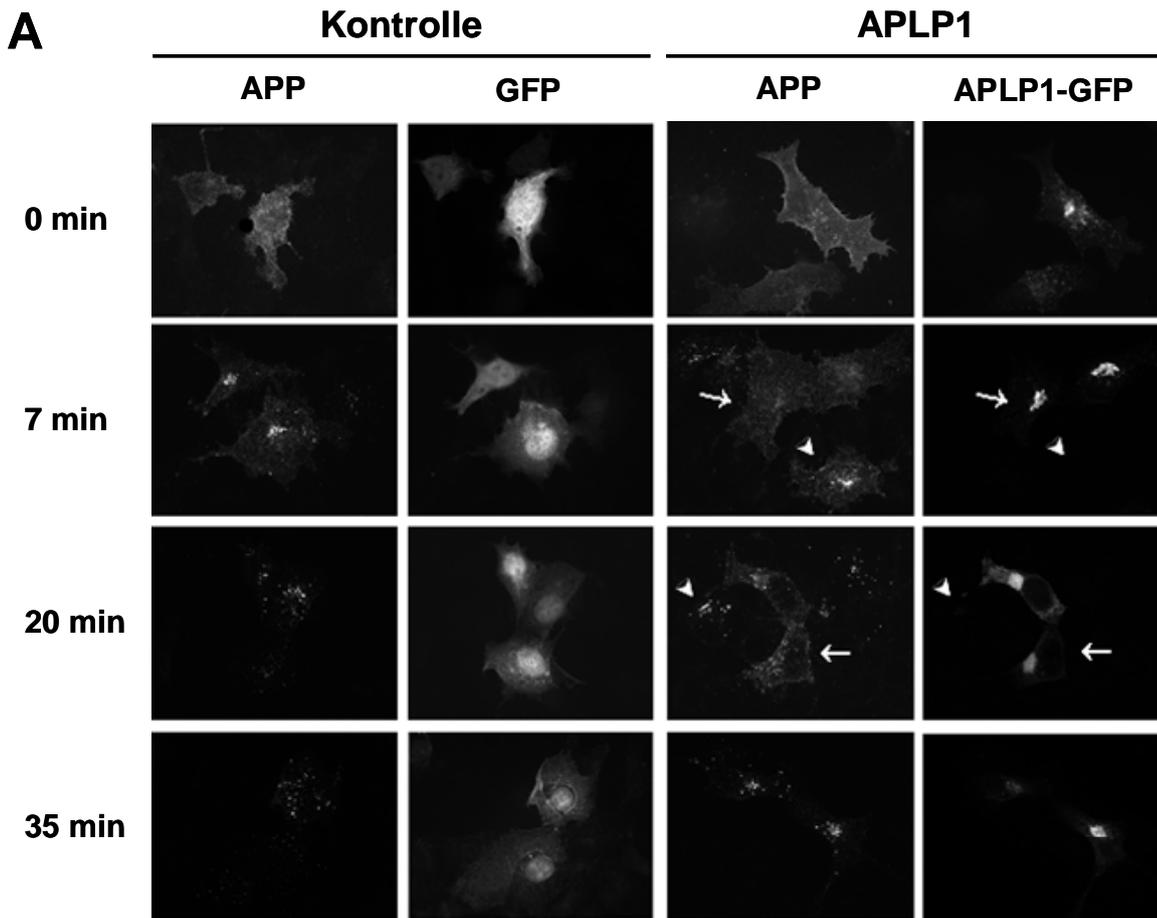
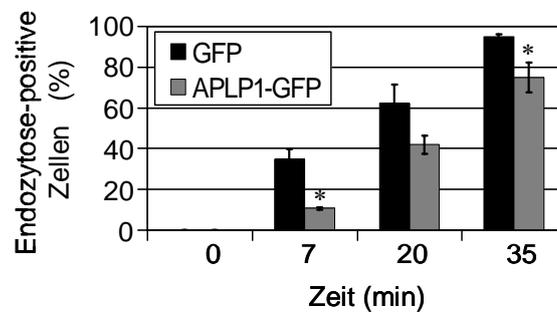


**Abb. 24 DynK44A hemmt die Endozytose von APP**

COS-Zellen wurden transient mit APP und GFP oder APP und DynK44A-GFP transfiziert. Oberflächen-APP wurde auf Eis mit Antikörper markiert, ungebundener gewegewaschen und die Zellen für 0 min oder 20 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und Antikörper-markiertes APP mit einem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper detektiert. **A)** Das APP-Signal ist in der ersten und der dritten Spalten, das GFP-Signal in der zweiten und vierten Spalte dargestellt. Der Pfeil markiert eine DynK44A-GFP exprimierende Zelle die keine APP-Endozytosevesikel zeigt, die Pfeilspitze eine nicht transfizierte Zelle mit APP-Endozytosevesikeln. **B)** Die Anzahl der Zellen, die zu dem angegebenen Zeitpunkt endosomalen APP-Vesikel zeigten, wurde ermittelt. Es wurden 100 GFP und 100 APLP1-GFP exprimierende Zellen unter doppelt-blinden Bedingungen analysiert. Gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Mit diesem APP-Endozytoseassay konnte im Anschluss die Frage geklärt werden, ob APLP1 die Endozytose von APP beeinflusst. Dazu wurden COS-Zellen transient mit APP und APLP1-GFP oder als Kontrolle mit APP und GFP transfiziert. Oberflächen-APP wurde, wie oben beschrieben, markiert und die Zellen für 0 min, 7 min, 20 min oder 35 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und das Voranschreiten der APP-Endozytose wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet. Bilder repräsentativer Zellen sind in Abbildung 25 zusammengefasst. Zum Zeitpunkt 0 min zeigten sowohl Kontroll- als auch APLP1-GFP-exprimierende Zellen eine Zelloberflächenverteilung des markierten APP. Zum

Zeitpunkt 7 min waren in GFP-transfizierten Zellen, neben einer Zelloberflächenfärbung deutliche APP-Vesikel in der Nähe des Zellkerns sichtbar (Abb. 25, zweite Reihe erstes Bild). In APLP1-GFP-exprimierenden Zellen war zum selben Zeitpunkt nur Oberflächen-APP und noch keine APP-Vesikel erkennbar (Abb. 25, zweite Reihe, drittes Bild mit einem Pfeilmarkierte Zelle). Eine benachbarte, nicht APLP1-exprimierende Zelle im selben Bild (mit einer Pfeilspitze markiert) verhielt sich wie die Kontroll-transfizierten Zellen mit deutlichen intrazellulären APP-Vesikeln. Zum Zeitpunkt 7 min fand damit in Kontroll-transfizierten Zellen APP-Endozytose statt, während in APLP1-exprimierenden Zellen APP noch nicht sichtbar endozytiert wurde. Nach 20 und 35 min war in GFP-exprimierenden Zellen kein Plasmamembran-APP mehr erkennbar und die APP-Vesikel waren weniger stark in der Nähe des Kerns konzentriert, sondern lagen im Zytosol verteilt vor (Abb. 25, dritte und vierte Reihe erstes Bild). In APLP1-exprimierenden Zellen hingegen war nach 20 min APP noch an der Zelloberfläche sichtbar und erst zu diesem Zeitpunkt waren die ersten APP-Vesikel erkennbar (Abb. 25, dritte Reihe, drittes Bild mit einem Pfeil markiert). Wieder verhielt sich eine nicht-transfizierte Zelle im gleichen Bild, wie die Kontroll-transfizierten Zellen zum selben Zeitpunkt (mit einer Pfeilspitze markiert). Nach 35 min waren in APLP1 exprimierenden Zellen APP-Vesikel deutlich in der Nähe des Kerns zu sehen (Abb. 25, vierte Reihe, drittes Bild). Die Verteilung des ursprünglich an der Oberfläche markierten APPs in APLP1-exprimierenden Zellen (Abb. 25, untere Reihe, drittes Bild) glich damit zum Zeitpunkt 35 min eher der Verteilung zum Zeitpunkt 7 min in Kontroll-transfizierten Zellen (Abb. 25, zweite Reihe erstes Bild). Die statistische Auswertung der APP-Endozytose ergab, dass zu jedem untersuchten Zeitpunkt APLP1-exprimierende Zellen seltener Endozytose-positiv waren als Kontroll-transfizierte Zellen (Abb. 25B). Die Expression von APLP1 verlängert also die Verweildauer von APP an der Plasmamembran und führt zu einer verlangsamten APP-Endozytose.

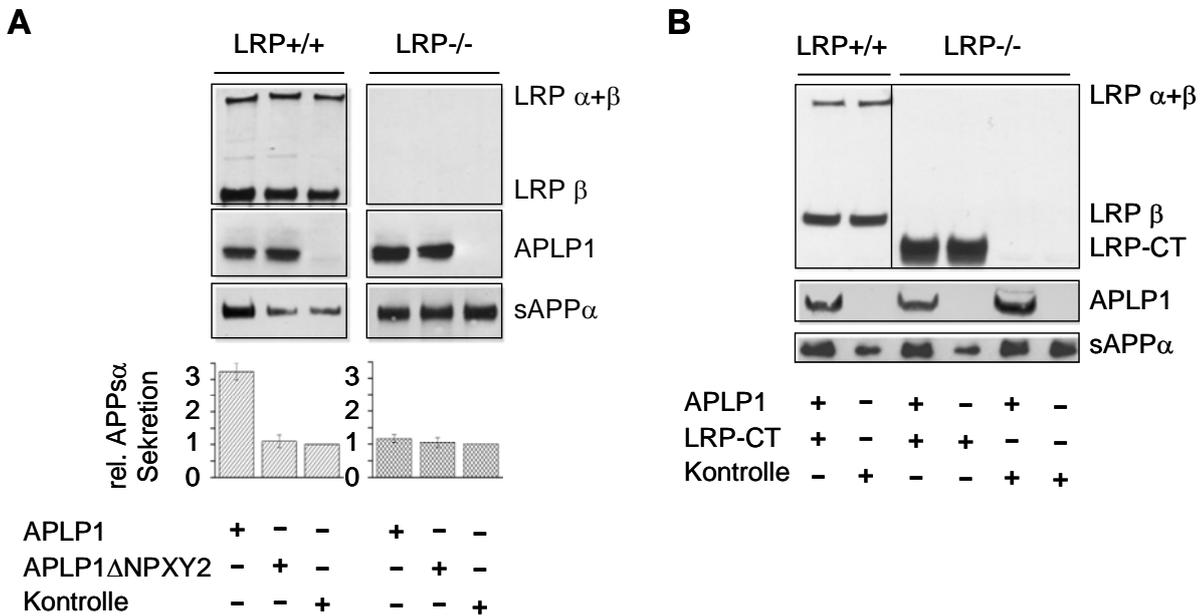
**B**

**Abb. 25 APLP1-exprimierende Zellen weisen eine verlangsamte Endozytose von APP auf**  
 COS-Zellen wurden transient mit APP und GFP oder APP und APLP1-GFP transfiziert. Oberflächen-APP wurde auf Eis mit einem anti-APP-Ektodomänen-Antikörper markiert, ungebundener Antikörper weggewaschen und die Zellen für 0, 7, 20 oder 35 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden permeabilisiert und mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper behandelt. Die Zellen wurden fixiert und mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. **A)** Bilder repräsentativer Zellen von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Die Lokalisierung von markiertem APP zu den angegebenen Zeitpunkten ist in der ersten (Kontroll-transfizierten) und dritten (APLP1-transfizierten) Spalte gezeigt. Die Expression von GFP ist in der zweiten und die Expression von APLP1-GFP in der vierten Spalte sichtbar. Pfeile markieren APLP1-exprimierende Zellen mit verlangsamter APP-Endozytose, Pfeilspitzen verweisen auf nicht-transfizierte Zellen, die APP wie Kontroll-transfizierte Zellen endozytieren. **B)** Unter 100 GFP oder APLP1-GFP exprimierenden Zellen wurde die Anzahl der Zellen ermittelt, die endozytische APP-Vesikel enthielten. Gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Auswertung erfolgte unter doppelt-blinden Bedingungen. Der Stern verweist auf einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$  Students t-Test) zwischen GFP und APLP1-GFP exprimierenden Zellen.

### 1.9 Die APLP1-vermittelte Stimulation der APP-Spaltung findet in Abhängigkeit von LRP statt

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass die Expression von APLP1 zu einer verlangsamten Endozytose von APP und einer gesteigerten sAPP $\alpha$ -Sekretion führt. Ein ähnlicher Phänotyp ist kürzlich in *low density lipoprotein related protein* (LRP) defizienten Zellen beschrieben worden. LRP bindet APP über das Adapterprotein FE65 und beeinflusst die Endozytose und die Prozessierung von APP (Pietrzik et al., 2002; Pietrzik et al., 2004; Ulery et al., 2000). APLP1 könnte also mit APP um die Bindung an FE65 und damit die Interaktion mit LRP konkurrieren und auf diesem Wege die Endozytose von APP beeinflussen. In diesem Falle sollte die Expression von APLP1 die Endozytose und Spaltung von APP nur in Gegenwart von LRP beeinflussen. Um zu testen, ob die APLP1-induzierte Zunahme der APP-Spaltung in Abhängigkeit von LRP stattfindet, wurde der Effekt von APLP1 in LRP-defizienten Zellen in Zusammenarbeit mit C. Pietrzik (Universität Mainz) getestet. Dazu wurden CHO-Zellen, die endogenes LRP exprimieren (LRP+/+) und LRP-defiziente CHO-Zellen (LRP-/-) mit APLP1, APLP1 $\Delta$ NPTY oder Kontrollvektor transfiziert und deren Effekt auf die sAPP $\alpha$ -Sekretion untersucht (Abb. 26A). In LRP+/+-Zellen führte die Expression von APLP1 im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen zu einem 3,5-fachen Anstieg der sAPP $\alpha$ -Bildung (Abb. 26A, erste Bahn). APLP1 $\Delta$ NPTY hatte wie erwartet in LRP(+/-) keinen Einfluss auf sAPP $\alpha$  (Abb. 26A, zweite Bahn). Die Expression von APLP1 und APLP1 $\Delta$ NPTY verhält sich also in CHO-Zellen gleich, wie in HEK293-Zellen (vgl. Abb. 13). Vorangegangene Publikationen haben gezeigt, dass in LRP(-/-)-Zellen eine vermehrte sAPP $\alpha$ -Bildung stattfindet (Ulery et al., 2000; Pietrzik et al., 2002 und Abb. 26A, sechste Bahn), wobei die sAPP $\alpha$ -Sekretion noch nicht im gesättigten Bereich liegt, da sie durch PMA noch gesteigert werden kann (Pietrzik et al., 2004). Expression von APLP1 oder APLP1 $\Delta$ NPTY in LRP(-/-)-Zellen führte zu keinem weiteren Anstieg der sAPP $\alpha$ -Sekretion im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen (Abb. 26A, vierte und fünfte Bahn). In Abwesenheit von LRP kann APLP1 die APP-Spaltung also nicht stimulieren. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer über LRP- und FE65-vermittelten Stimulation der APP-Spaltung durch APLP1. Wurden LRP(-/-)-Zellen mit einer C-terminalen Mutante von LRP (LRP-CT) transfiziert (Abb. 26B, vierte Bahn), so reduzierte sich die, in LRP(-/-)-Zellen erhöhte, sAPP $\alpha$ -Sekretion auf ein zu LRP(+/-)-Zellen vergleichbares Niveau (Abb. 26B, zweite Bahn). Kofunktion von APLP1 und LRP-CT in LRP(-/-)-Zellen hingegen stimulierte die sAPP $\alpha$ -Sekretion im Vergleich zu nur LRP-CT exprimierenden LRP(-/-)-

Zellen (Abb. 26B, dritte im Vergleich zu vierter Bahn). Damit konnte gezeigt werden, dass APLP1 die APP-Spaltung nur in Gegenwart von LRP induziert.



**Abb. 26 APLP1 stimuliert die APP-Spaltung nur in Gegenwart von LRP**

CHO-Zellen, die endogenes LRP exprimieren (LRP+/+) und LRP-defiziente CHO-Zellen (LRP-/-) wurden transient mit Kontrollvektor, APLP1, APLP1, dem das GYENPTY-Motiv fehlt (APLP1 $\Delta$ NPXY) (A), oder APLP1 und der C-terminalen Domäne von LRP (LRP-CT) (B) transfiziert. Proben des Mediums und des Zelllysats wurden mittels Gelelektrophorese und Immunoblotting analysiert. Im Medium wurde sAPP $\alpha$  mit den Antikörpern 1G7 und 5A3 nachgewiesen und im Zelllysat die Expression von APLP1 mit dem Antikörper Ab57 oder LRP mit dem Antikörper LRP1704. Nicht-prozessiertes LRP läuft im Blot in einer höheren Bande (LRP  $\alpha$ + $\beta$ ) und einer niedrigeren Bande, die nur der  $\beta$ -Einheit entspricht. Im unteren Teil von A) wurde die sAPP $\alpha$ -Sekretion quantifiziert. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten ausgeführt wurden.

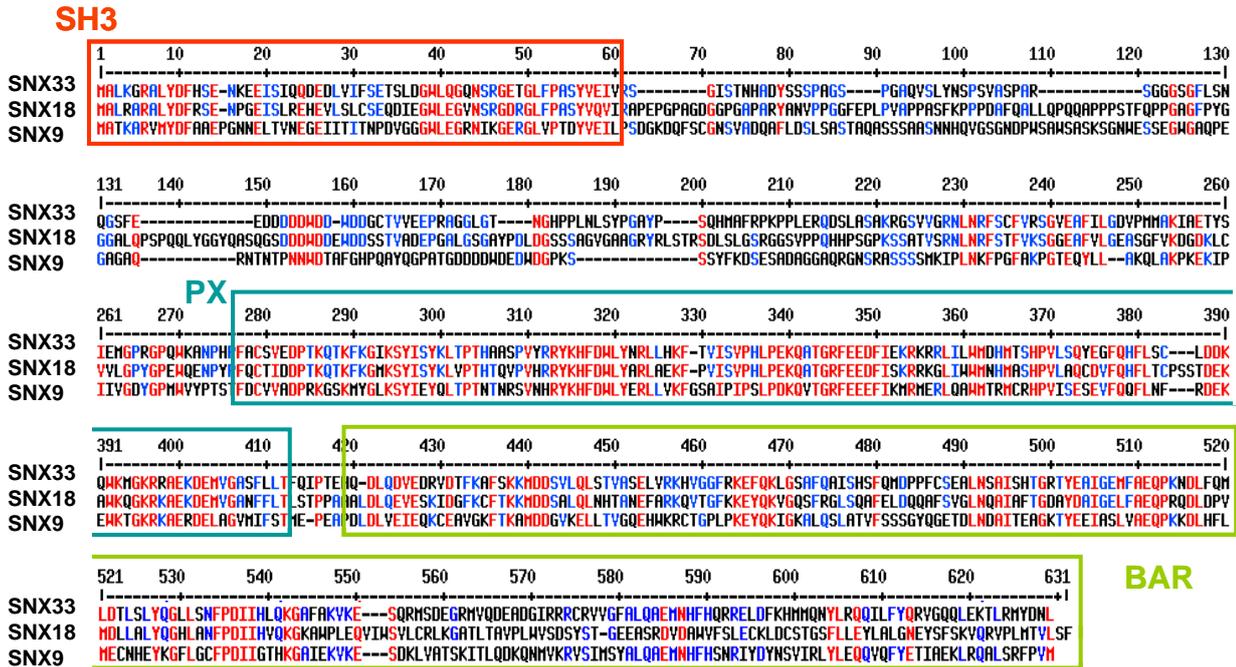
## **2. Die Sorting-Nexin-Untergruppe SNX9/18/33 beeinflusst die APP-Spaltung**

Neben APLP1 konnte für SNX33 eine APP-Spaltungs-stimulierende Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 11B). SNX33 ist ein neues Mitglied der Sorting-Nexin-Familie. Die SNX-Familie umfasst verschiedene zytosolische Proteine, deren gemeinsames Kennzeichen eine Phox-Homologe (PX)-Domäne ist und die für den zellulären Transport mehrerer Oberflächenproteine notwendig sind (siehe auch A.4.). SNX33 bildet zusammen mit seinen zwei Homologen, SNX9 und SNX18, eine SNX-Untergruppe. In dem folgenden Ergebnisabschnitt wird der Effekt der SNX9/18/33-Untergruppe auf die APP-Spaltung analysiert. Da SNX33 und SNX18 bisher noch nicht charakterisiert worden waren und insbesondere kein Zusammenhang zwischen der SNX-Familie und der Prozessierung von APP beschrieben worden war, war es von besonderem Interesse, ob SNX9 und SNX18 vergleichbar mit SNX33 die APP-Spaltung stimulierten und wie sich weniger homologe SNXe im Bezug auf die APP-Spaltung verhielten.

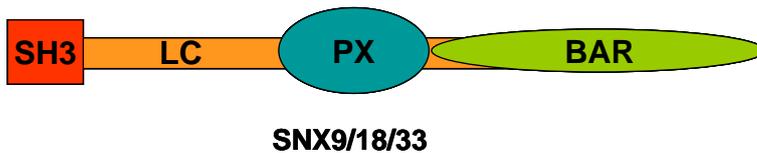
### **2.1 SNX33 bildet zusammen mit SNX9 und SNX18 eine SNX-Untergruppe**

Innerhalb der SNX-Familie weist die Aminosäuresequenz von SNX33 die höchste Homologie zu den Sequenzen von SNX9 und SNX18 auf (Abb. 27A). SNX9, SNX18 und SNX33 fasst man deswegen auch zu einer SNX-Untergruppe zusammen. Die SNX9/18/33-Untergruppe besitzt eine N-terminale SH3-Domäne, gefolgt von einer Region mit geringer Komplexität (LC (*low complexity*)-Domäne), einer PX-Domäne und einer C-terminalen Bin-Amphiphysin-Rvs (BAR)-Domäne (Abb. 27B). Innerhalb der SH3- und der PX-Domäne ähneln sich die Aminosäuresequenzen von SNX33 und SNX18 zu über 60 % und die Sequenz von SNX33 und SNX9 zu über 40 %.

**A**



**B**



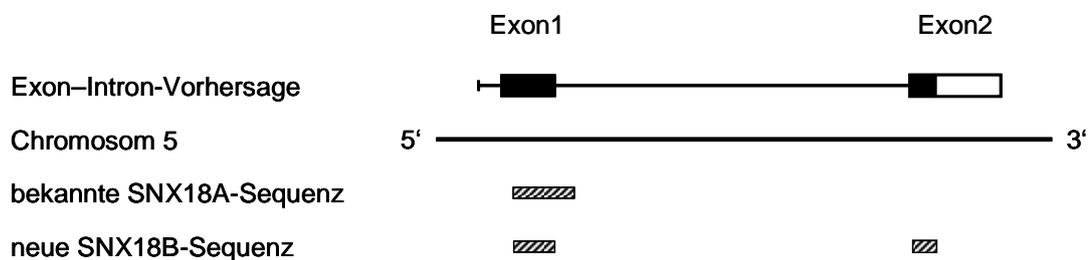
**Abb. 27 Vergleich der Aminosäuresequenz von SNX33, SNX9 und SNX18**

A) Die Aminosäuresequenzen von SNX33, SNX9 und SNX18 wurden verglichen. Handelt es sich bei den Aminosäuren aller drei SNXen um identische oder ähnliche Reste sind diese in rot dargestellt, identische Aminosäuren in nur zwei der drei SNXen sind in blau und verschiedenen Reste in schwarz dargestellt. Die Zahlen über der Sequenz geben die Position der Aminosäuren innerhalb des Proteins an. Mit einem roten Kasten ist die SH3-Domäne, mit einem blauen Kasten die PX-Domäne und mit einem grünen Kasten die BAR-Domäne markiert. B) Die Domänenstruktur von SNX9, SNX18 und SNX33 ist schematisch dargestellt. SH3: Scr homologe Domäne; LC: *low complexity*; PX: Phox; BAR: Bin Amphiphysin Rvs.

## 2.2 Nachweis der Expression einer bisher unbekanntenen SNX18-Sequenz

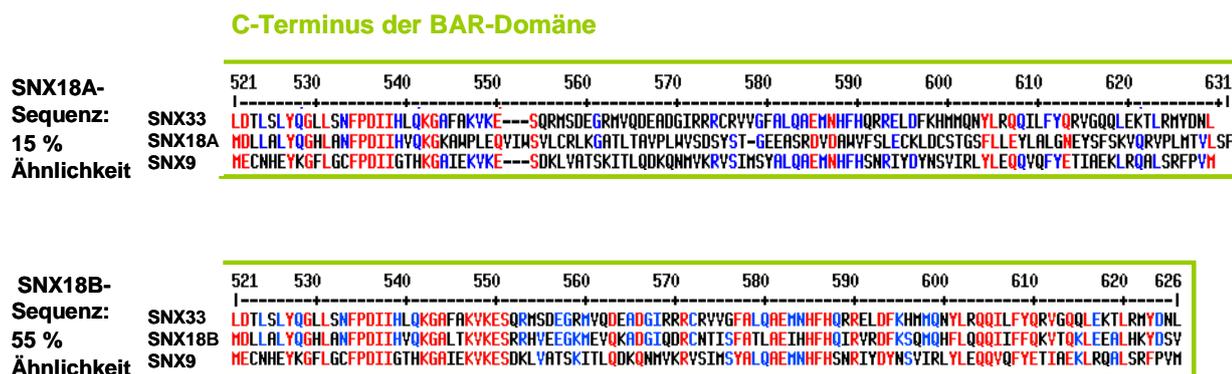
Um den Effekt der SNX9/18/33-Untergruppe auf die Spaltung von APP in einem Zellkulturmodell zu untersuchen, musste als erstes die cDNA der drei SNXen kloniert und sequenziert werden. Die cDNA von SNX33 wurde dem identifizierten Klon der humanen Gehirn-cDNA-Bibliothek entnommen, woraufhin die Sequenzanalyse dieser cDNA eine 100 %-Übereinstimmung mit SNX33 (*accession number*: NP\_695003) ergab. Die cDNA-Sequenzen von SNX9 und SNX18 sind bereits beschrieben und wurden in Fall von SNX9

einer humanen Genom-Kollektionen (ATCC; GenBank ID: BC005022) und im Fall von SNX18 der *Mammalian Gene Collection* (MGC) entnommen. Die Sequenzanalyse der SNX18-cDNA zeigte nur 92 % Übereinstimmung mit der für SNX18 publizierten Sequenz (<http://align.genome.jp/sit-bin/clustalw>). Während die ersten 1622 Basen identisch mit der publizierten SNX18-Sequenz waren, hatte der neu identifizierte Klon ein vollkommen anderes 3'-Ende. Im Folgenden wird die schon publizierte SNX18-Sequenz mit SNX18A und die neu identifizierte SNX18-Sequenz mit SNX18B bezeichnet. Die Expression von SNX18A ist bisher nicht untersucht worden. Um herauszufinden, ob es sich bei SNX18B um eine alternative Spleißvariante von SNX18A handeln könnte und ob beide SNX18-Sequenzen exprimiert werden könnten, wurde die Exon-Intron-Verteilung der SNX18-cDNA im menschlichen Genom mit Hilfe eines Exon-Intron-Vorhersageprogramms analysiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Demnach liegen die ersten 1650 Basen der SNX18-Sequenz auf einem Exon und Basen 1651 bis 1850 auf einem zweiten Exon. Die SNX18A-Sequenz läuft von dem ersten Exon in das vorhergesagte Intron weiter, das 3'-Ende der SNX18B-Sequenz liegt hingegen wie von dem Exon-Intron-Vorhersageprogramm angegeben in einem zweiten Exon und stimmt damit mit der Exon-Vorhersage überein (Abb. 28).



**Abb. 28 Exon-Intron-Verteilung der bekannten SNX18- und der neuen SNX18-Sequenz**  
Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur der SNX18-Sequenz auf Chromosom 5. Die obere Zeile gibt die Exon-Intron-Verteilung laut eines Vorhersageprogramms (*BLAST Human Sequence*) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) an. In der zweiten Zeile ist die DNA-Sequenz auf Chromosom 5 in 5'-3'-Richtung symbolisiert. In der dritten Zeile sind die *open reading frames* (ORFs) der SNX18A-Sequenz und in der vierten Zeile die ORFs der SNX18B-Sequenz dargestellt.

Als nächstes wurde die Aminosäuresequenz von SNX18A und SNX18B mit den Sequenzen von SNX9 und SNX33 verglichen. Der Aminosäurevergleich verwies auf eine wesentlich höhere Homologie der SNX18B-Sequenz zur SNX9/33-Untergruppe. So zeigte der C-Terminus von SNX18A nur 15 % Ähnlichkeit mit SNX33, während die SNX18B-Sequenz zu 55% der SNX33-Sequenz ähnelte (Abb. 29).

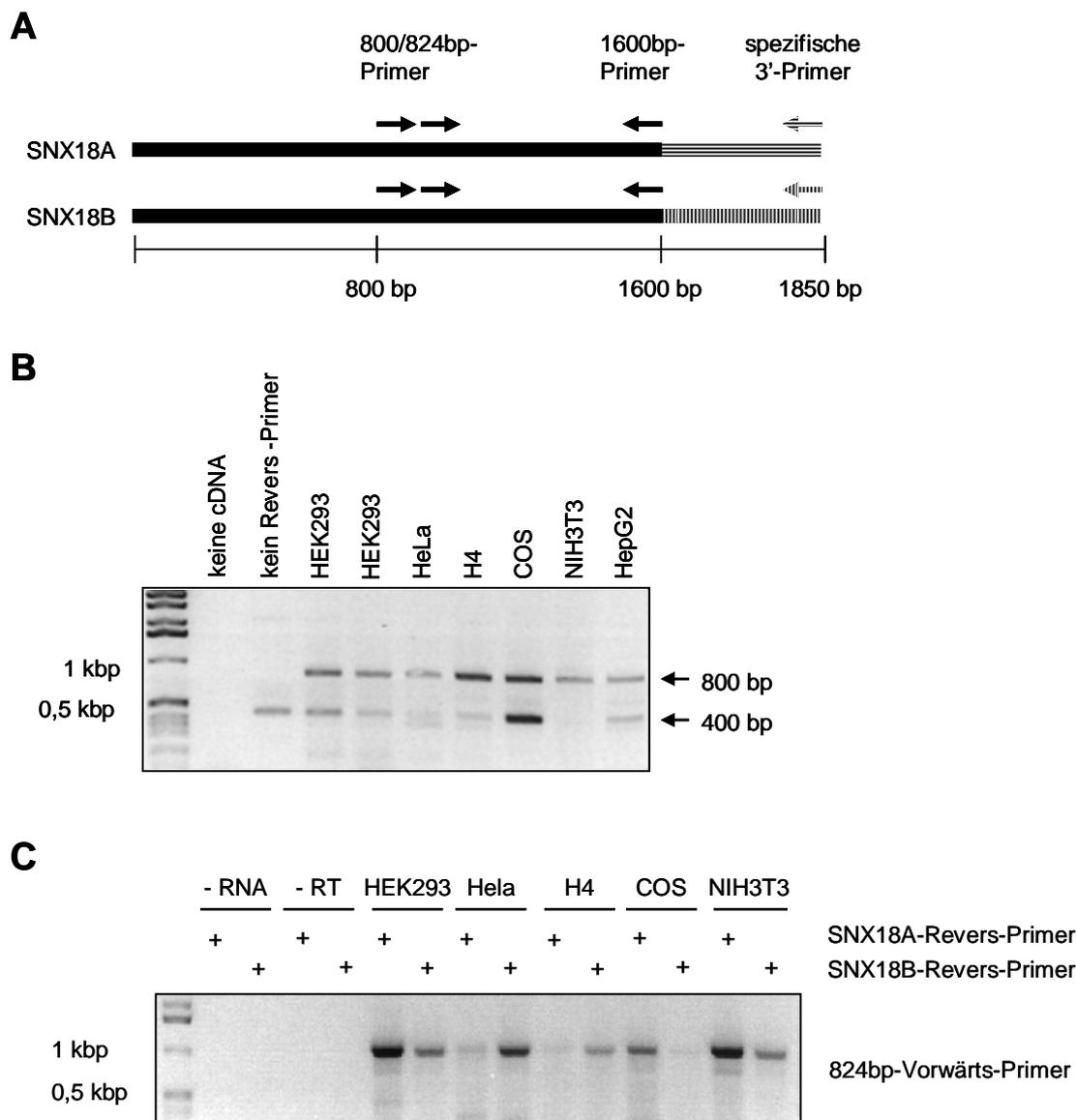


**Abb. 29 Vergleich der SNX18A und SNX18B C-terminalen Aminosäuresequenzen mit SNX33 und SNX9**

Die Aminosäuresequenzen des C-Terminus von SNX33, SNX9 wurde mit der SNX18A-Sequenz (obere Zeile) oder der neu identifizierten SNX18B-Sequenz (untere Zeile) verglichen. Handelt es sich bei den Aminosäuren aller drei SNXen um identische oder ähnliche Reste sind diese in rot dargestellt, identische Aminosäuren von zwei der drei SNXen sind in blau und verschiedenen Reste in schwarz dargestellt. Die Zahlen über der Sequenz geben die Position der Aminosäuren innerhalb des Proteins an. Mit einem grünen Kasten ist die BAR-Domäne markiert. BAR: Bin/Amphiphysin/Rvs.

Die Exonverteilung und Aminosäurehomologie unterstreichen also die Existenz der neu identifizierten SNX18B-Sequenz. Um zu überprüfen, welche SNX18-Sequenz tatsächlich exprimiert wird, wurde die RNA verschiedener Zellkulturlinien in cDNA-Bibliotheken mit Hilfe von Reverser-Transkriptase (RT) umgeschrieben und dann mit Sequenz-spezifischen Primern die Expression von SNX18A und SNX18B überprüft. Die ersten 800bp der SNX18-Sequenz sind besonders GC-reich und lassen sich aus diesem Grund schwer in einer PCR-Reaktion amplifizieren. Daher wurde für die Analyse der SNX18-Expression ein Vorwärts-Primer gewählt, der die SNX18-Sequenz bei den Basen 800-822 (800bp-Primer) oder den Basen 824-844 (824bp-Primer) bindet. In einem ersten Versuch wurde ein Revers-Primer gewählt, der sowohl die SNX18A-Sequenz, als auch die neue SNX18B-Sequenz bei den Basen 1600-1620 (1600bp-Primer) erkennt (Abb. 30A). In diesem Bereich sind die Sequenzen von SNX18A und SNX18B noch identisch. Wie in Abbildung 30B zu erkennen, entsteht bei einer PCR-Reaktion mit dem 800bp-Vorwärts-Primer und dem 1600bp-Revers-Primer in allen getesteten cDNA-Bibliotheken, neben einem 400bp-Fragment das erwartete spezifische PCR-Produkt mit einer Größe von 800bp. Die untersuchten cDNA-Bibliotheken waren wie oben beschrieben durch RT-PCR der RNA verschiedener Zellkulturlinien gewonnen worden. Das 800bp-PCR-Produkt wurde isoliert und die Sequenz in einer Sequenzierreaktion überprüft. Es handelte sich um die Basen 800 bis 1600 der SNX18-Sequenz. Als Kontrolle für mögliche DNA-Verunreinigungen des PCR-Ansatzes wurde in der

PCR der ersten Bahn in Abbildung 30B keine cDNA-Bibliothek eingesetzt. Wie zu erwarten wurde in diesem Ansatz kein PCR-Produkt gebildet. In der PCR der zweiten Bahn in Abbildung 31B wurde kein Revers-Primer verwendet. Hier wurde nur das 400bp-Fragment gebildet. Bei dem 400bp-Fragment handelt es sich folglich um ein unspezifisches PCR-Produkt, das durch unspezifische Anlagerung des Vorwärts-Primers an einer zweiten Stelle der SNX18-Sequenz entsteht. In einem weiteren Versuch sollte nun zwischen der SNX18A- und der SNX18B-Sequenz unterschieden werden. Dazu wurden Revers-Primer verwendet, die spezifisch das 3'-Ende der SNX18A- oder SNX18B-Sequenz erkennen (siehe Abb. 30A). Mit diesen spezifischen Revers-Primern konnten in cDNA-Bibliotheken verschiedener Zelllinien sowohl die SNX18A-, als auch die SNX18B-Sequenz detektiert werden (Abb. 30C). So wurde in Nierenepithel-HEK293-, in Nierenepithel-COS- und in neuronalen NIH3T3-Zellen die bekannte SNX18A-Sequenz und in den Zervixkarzinom-Hela- und den Neurogliom-H4-Zellen die neue SNX18B-Sequenz stärker vervielfältigt. Die Sequenz der PCR-Produkte wurde wieder mit Hilfe von Sequenzierreaktionen überprüft. Als Kontrolle für DNA-Verunreinigungen des PCR-Ansatzes und für RNA-Verunreinigungen des RT-PCR-Ansatzes wurde in der ersten und zweiten Bahn in Abbildung 30C keine RNA für die RT-PCR eingesetzt. In der dritten und vierten Bahn von Abbildung 30C wurde keine Reverse-Transkriptase verwendet. Da in diesen Spuren kein PCR-Produkt gebildet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die für die RT-PCR verwendeten RNA-Präparationen frei von DNA-Verunreinigung waren. Diese Analyse belegt die Existenz beider SNX18-Varianten, die unterschiedlich stark in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Somit konnte zum ersten Mal die Expression einer bisher unbekanntes Spleißvariante von SNX18 experimentell nachgewiesen werden. Darüber hinaus deutet dieses Ergebnis auf eine stark Gewebespezifische Regulation des SNX18-Spleißens hin.

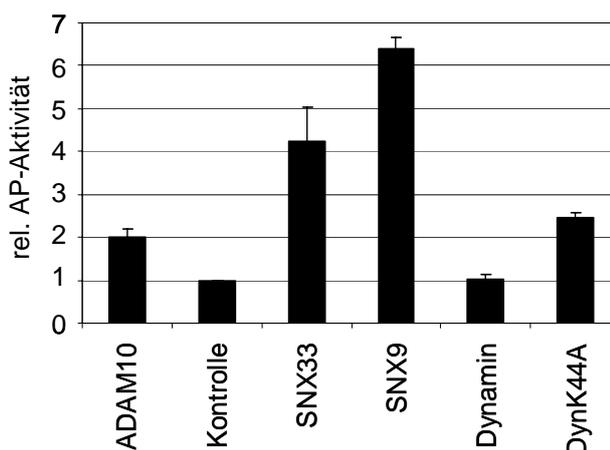


**Abb. 30 Die SNX18-cDNA kann in verschiedenen Zellkulturlinien nachgewiesen werden**

Die RNA der angegebenen Zelllinien wurde isoliert und durch Reverse-Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA-Bibliotheken wurden als Vorlage für PCR-Reaktionen mit den angegebenen Primern verwendet. **A)** Schematische Darstellung der verwendeten Primer und deren Bindestellen an der SNX18A- und SNX18B-Sequenz. Der schwarze Balken symbolisiert den identischen Teil der SNX18A- und B-Sequenz. Der horizontal gestreifte Balken das 3'-Ende der SNX18A-Sequenz und der vertikal gestreifte Balken das 3'-Ende der SNX18B-Sequenz. Die Linie unter den Balken markiert die Größe der SNX18-Sequenzen in Basenpaaren (bp). **B)** Die cDNA der angegebenen Zelllinien wurde mit einem Vorwärts-Primer, der an die Base 800-820 in der SNX18-Sequenz bindet, und einem Revers-Primer, der an die Basen 1600-1620 bindet, vervielfältigt. Als Kontrollen für unspezifische PCR-Produkte wurde in der ersten Spur keine cDNA und in der zweiten Spur kein Revers-Primer eingesetzt. Das spezifische PCR-Produkt (800bp) läuft zwischen dem 0,5- und dem 1 kbp-Marker. Ein unspezifisches PCR-Produkt (400bp), das auch ohne Revers-Primer (zweite Spur) entsteht, läuft unterhalb der 0,5 kbp-Markierung. **C)** Die cDNA der angegebenen Zelllinien wurde mit einem Vorwärts Primer der an Base 824 der SNX18-Sequenz bindet und einem für die publizierte SNX18A-Sequenz spezifischen oder einem für die neue SNX18B-Sequenz spezifischen Revers-Primer vervielfältigt. Das spezifische PCR-Produkt ist 1000 bp groß. Als Kontrollen für unspezifische PCR-Produkte wurde für die Reverse-Transkription der RNA in cDNA in den ersten beiden Spuren keine RNA (-RNA) und in der dritten und vierten Spur keine Reverse-Transkriptase (-RT) eingesetzt.

### 2.3 SNX33 und SNX9 stimulieren die Ektodomänenspaltung von APP

Als nächstes folgte die mechanistische Untersuchung der APP-Spaltung unter SNX9/18/33-Expression. Dazu wurden SNX33 und SNX9 in die in Kapitel C.1.1 beschriebene AP-APP-Reporterzelllinie transfiziert. Als Positivkontrollen wurden parallel die zwei bekannten Stimulatoren der APP-Sekretion, ADAM10 und die dominant-negative Mutante von Dynamin, DynK44A, sowie Wildtyp-Dynamin als Negativkontrolle untersucht (Abb. 31). Expression von SNX33 stimulierte die Sekretion von AP-APP um den Faktor 4 und SNX9 um den Faktor 6,3 im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen. ADAM10 und DynK44A führten zu einer 2-2,5-fachen Zunahme der APP-Spaltung, während Wildtyp-Dynamin keinen Effekt auf die Spaltung von APP hatte. In diesem Experiment konnte damit, wie schon im Expressionsklonierungs-Screen beobachtet, der stimulierende Effekt auf die Sekretion von AP-APP von SNX33 reproduziert und für SNX9 neu beschrieben werden.



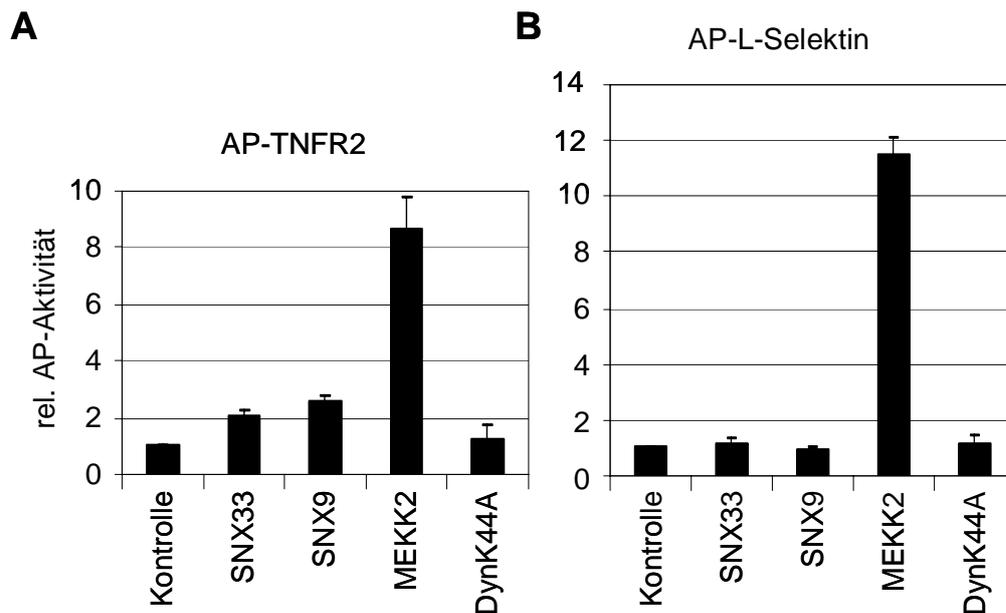
**Abb. 31 SNX33 stimuliert die Spaltung von AP-APP**

HEK293-Zellen, die stabil AP-APP exprimieren, wurden transient mit ADAM10, Kontrollplasmid, SNX33, SNX9, Dynamin, oder den Dynaminmutanten DynK44A und Dyn $\Delta$ NT transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurde die AP-Aktivität des Mediums relativ zur Proteinkonzentration bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der AP-Aktivität relativ zu Kontroll-transfizierten Zellen von zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten ausgeführt wurden. AP: Alkalische-Phosphatase.

### 2.4 SNX33 stimuliert nicht die Ektodomänenspaltung aller Typ-I-Transmembranproteine

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob die SNX9/18/33-Untergruppe nur die Sekretion von APP stimuliert oder auch die Ektodomänenspaltung anderer Transmembranproteine beeinflusst. Dazu wurden Fusionsproteine aus AP und dem Tumornekrose-Faktor-Rezeptor 2 (TNFR2) (AP-TNFR2) oder AP und L-Selektin (AP-L-Selektin)

hergestellt. TNFR2 und L-Selektin sind beide Typ-I-Transmembranproteine, deren Ektodomänen von  $\alpha$ -Sekretasen abgespalten und sezerniert werden (Rosen and Bertozzi, 1994; Werb and Yan, 1998). HEK293E-Zellen, die stabil AP-TNFR2 oder AP-L-Selektin exprimieren, wurden transient mit SNX33, SNX9 oder DynK44A transfiziert. Zusätzlich wurde die konstitutiv aktive Form der Mitogen-aktivierende-Protein-Kinase-Kinase 2 (MEKK2) als bekannter Stimulator der Ektodomänenspaltung von TNFR2 und L-Selektin transfiziert (Fan and Derynck, 1999). Die Expression von MEKK2 verursachte eine starke Aktivierung der TNFR2- und L-Selektin-Spaltung (Abb. 32) und zeigt damit, dass die AP-TNFR2- und die AP-L-Selektin-Reporterzelllinien sensitiv Zunahmen der Ektodomänenspaltung detektieren können. Die Expression von SNX33, SNX9 und DynK44A resultierte hingegen nur in einer schwachen Stimulation der AP-TNFR2-Spaltung und hatte keinen Effekt auf AP-L-Selektin (Abb. 32). SNX33, SNX9 und SNX18 sind also keine generellen Aktivatoren der Ektodomänenspaltung von Membranproteinen. Diese SNX-Untergruppe wirkt hingegen besonders stark auf die Spaltung der APP-Ektodomäne.

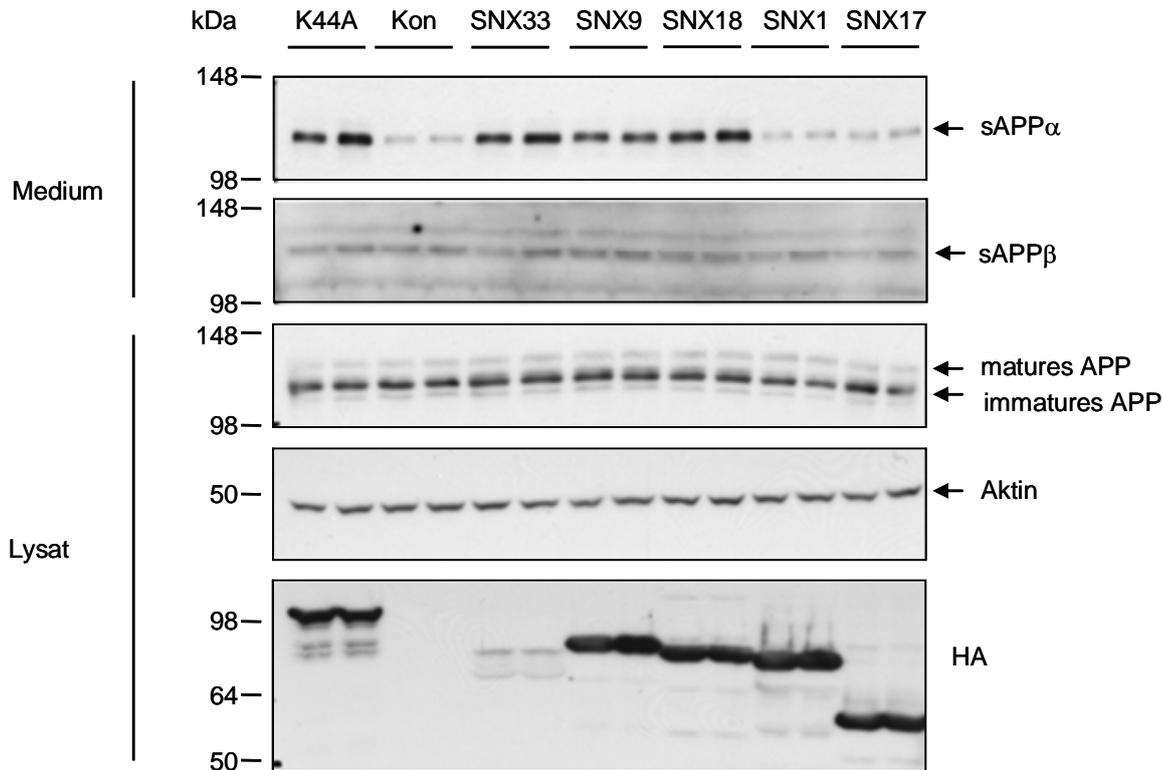


**Abb. 32 SNX33 und SNX9 stimulieren leicht die Spaltung von TNFR2 und haben keinen Einfluss auf L-Selektin**

HEK293E-Zellen, die stabil AP-TNFR2 (AP-TNFR2) (A) oder AP-L-Selektin (B) exprimieren wurden transient mit Kontrollplasmid, SNX33, SNX9, der konstitutiv aktiven Form der Mitogen-aktivierenden-Protein-Kinase-Kinase 2 (MEKK2) oder DynK44A transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurde die AP-Aktivität des Mediums relativ zur Proteinkonzentration bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der AP-Aktivität relativ zu Kontroll-transfizierten Zellen von zwei unabhängigen Experimenten die jeweils in Duplikaten ausgeführt wurden. AP: Alkalische Phosphatase.

## 2.5 Die SNX9/18/33-Untergruppe stimuliert die $\alpha$ -Spaltung von endogenem APP

Als nächstes wurde die Frage untersucht, ob nur die SNX9/18/33-Untergruppe die APP-Spaltung beeinflusst, oder ob andere Mitglieder der SNX-Familie einen ähnlichen Effekt haben. Dazu wurden SNX33, SNX9 und SNX18, sowie SNX1 und SNX17 in HEK293-Zellen transfiziert. SNX1 besitzt wie die SNX9/18/33-Untergruppe neben der PX-Domäne eine C-terminale BAR-Domäne, während SNX17 eine PX-Domäne und eine B41-Domäne enthält. Zwei Tage nach Transfektion wurde das Medium der Zellen auf sAPP-Fragmente in einer Western-Blot-Analyse untersucht. Da Antikörper verwendet wurden, die spezifisch nur das  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretase-prozessierte sAPP erkennen (siehe auch C) 1.2), konnte in diesem Versuch zusätzlich geklärt werden, ob die getesteten SNXe generelle Aktivatoren der APP-Spaltung sind oder spezifisch auf die  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Spaltung von APP wirken. Zwei Tage nach Transfektion ließ sich im Überstand von SNX33-, SNX9- und SNX18-exprimierenden Zellen eine deutliche Zunahme der sAPP $\alpha$ -Sekretion gegenüber Kontroll-transfizierten Zellen nachweisen, während SNX1 und SNX17 keinen Einfluss auf die sAPP $\alpha$ -Spaltung hatten (Abb. 33, oberster Blot). Kontroll-transfiziertes DynK44A stimulierte unter denselben Bedingungen ebenfalls die sAPP $\alpha$ -Sekretion. Im Gegensatz zur sAPP $\alpha$ -Sekretion hatten sowohl DynK44A, sowie keines der untersuchten SNXe einen Einfluss auf die sAPP $\beta$ -Spaltung von endogenem APP (Abb. 33, zweiter Blot von oben). Um sicherzustellen, dass die transfizierten Proteine nicht die Gesamt-Proteinmengen des Zelllysats beeinflussten, wurden als Kontrolle die Gesamt-APP- und  $\beta$ -Aktin-Level des Zelllysats ebenfalls untersucht. Keines der transfizierten Proteine veränderte die Gesamt-APP- oder  $\beta$ -Aktin-Level (Abb. , dritter und vierter Blot). Da alle transfizierten Proteine C-terminal eine HA-Markierung trugen, konnte ihre Expression in einem anti-HA-Blot verglichen werden. Wie in Abbildung 33 im untersten Blot zu erkennen, wurden für SNX33 zwei Molekulargewichtsbanden nachgewiesen. In hier nicht dargestellten Versuchen konnte gezeigt werden, dass es sich um zwei Doppelbanden handelt, wobei die obere Doppelbande phosphorylierte Formen von SNX33 darstellt. Alle anderen getesteten SNXe liefen in nur einer Bande. Während DynK44A, SNX9, SNX18, SNX1 und SNX17 ähnlich stark exprimiert waren, wurde SNX33 wesentlich schwächer exprimiert (Abb. 33, unterer Blot). Es lässt sich festhalten, dass alle Mitglieder der SNX9/18/33-Untergruppe die  $\alpha$ -Sekretase-Spaltung von endogenem APP stimulieren, während SNX1 und SNX17, die anderen SNX-Untergruppen angehören, keinen Einfluss auf die APP-Spaltung haben. Keines der untersuchten SNXe beeinflusste hingegen die  $\beta$ -Sekretase-Spaltung von endogenem APP.



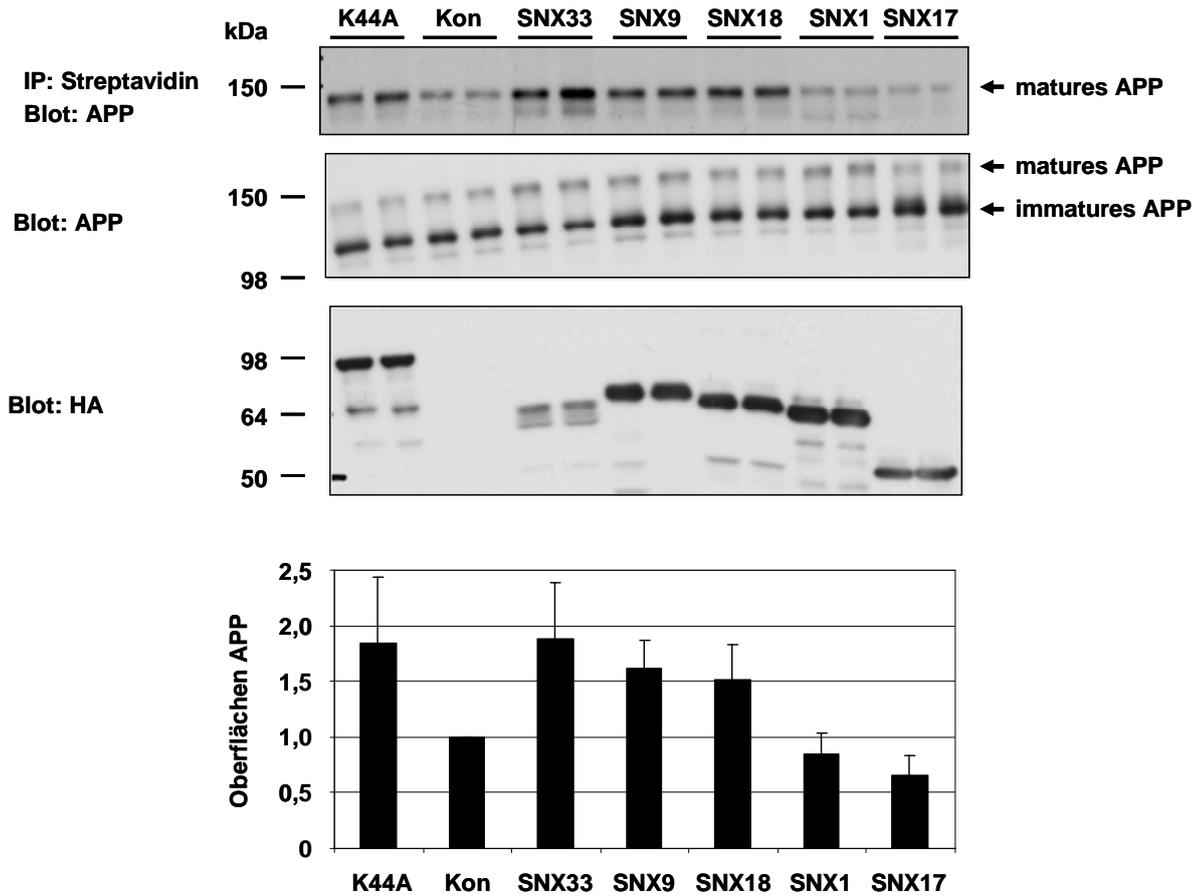
**Abb. 33 Expression der SNX9/18/33-Untergruppe stimuliert die  $\alpha$ -Sekretase-Spaltung von endogenem APP**

HEK293E-Zellen wurden transient mit Kontrollplasmid (Kon), SNX33-HA, SNX9-HA, SNX18-HA, SNX1-HA, SNX17-HA oder DynK44A-HA(K44A) transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden das Medium der Zellen und das Zelllysate mittels Gelelektrophorese und Immunoblotting auf APP-Fragmente untersucht. Im Medium wurde sAPP $\alpha$  mit dem Antikörper W02 und sAPP $\beta$  mit dem Antikörper 192wt detektiert. Im Lysat wurde Gesamt-APP mit dem Antikörper 22C11 nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde im Lysat zusätzlich  $\beta$ -Aktin analysiert. Die Expression der HA-markierten Proteine wurde im Lysat mit einem anti-HA-Antikörper überprüft. Dargestellt sind Bilder eines repräsentativen Versuches von mindestens drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Duplikaten ausgeführt wurden. Gesamt-APP läuft im Lysat in drei Banden, wobei die obere Bande matures APP<sub>751</sub>, die mittlere Bande immatures APP<sub>751</sub> und matures APP<sub>695</sub> und die untere Bande immatures APP<sub>695</sub> darstellt. Im HA-Blot ist SNX33 schwächer als die übrigen Proteine exprimiert und läuft in zwei Banden, wobei die obere Bande phosphoryliertes SNX33 darstellt. Bei den schwachen Banden unter den K44A-, SNX18- und SNX1-Hauptbanden handelt es sich um Abbauprodukte der exprimierten Proteine.

## 2.6 Expression der SNX9/18/33-Untergruppe erhöht die Menge an Plasmamembran-APP

Wie oben dargestellt, erhöht die Expression der SNX9/18/33-Untergruppe die Menge an  $\alpha$ -geschnittenem APP. Für eine Zunahme der sAPP $\alpha$ -Sekretion gibt es zwei Hauptursachen. Entweder kann direkt die Aktivität der  $\alpha$ -Sekretasen gesteigert sein oder den  $\alpha$ -Sekretasen kann mehr APP als Substrat zur Verfügung stehen. Da der  $\alpha$ -Sekretase-Schnitt an oder nahe der Plasmamembran stattfindet (Sisodia, 1992), kommt nur Plasmamembran lokalisiertes

APP als Substrat der  $\alpha$ -Sekretasen in Frage. In einem weiteren Versuch wurde deswegen die Menge an Plasmamembran-lokalisiertem APP nach SNX-Expression verglichen. HEK293E-Zellen wurden mit verschiedenen SNXen, DynK44A oder Kontrollplasmid transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden alle Proteine der Plasmamembran mit Biotin markiert. Die Zellen wurden lysiert, Biotin-markierte Proteine mittels Streptavidin-Präzipitation isoliert und durch Gelelektrophorese aufgetrennt. In einem Immunblot wurde dann Zellmembran-lokalisiertes APP nachgewiesen (Abb. 34, oberer Blot) und quantifiziert (Abb. 34, Graphik). Gesamt-APP (Abb. 34, mittlerer Blot) und die Expression der verschiedenen SNXe (Abb. 34, unterer Blot) wurde im Zelllysate durch Gelelektrophorese und Immunblot analysiert. Die Expression von DynK44A und SNX9, SNX18 oder SNX33 führte zu einer 1,5- bis 1,8-fachen Zunahme des Zellmembran-lokalisierten APPs im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen (Abb. 34, Graphik). Expression von SNX1 oder SNX17 hingegen resultierte in keiner Zunahme des Oberflächen-APPs. Mit diesem Ergebnis ist der Mechanismus der SNX9/18/33-induzierten Zunahme der sAPP $\alpha$ -Sekretion näher charakterisiert. Die SNX9/18/33-Expression steigert die Menge an Oberflächen-APP und bietet damit den ADAM-Sekretasen mehr APP als Substrat. Dies wiederum ist in Übereinstimmung mit einer Zunahme der sAPP $\alpha$ -Sekretion.



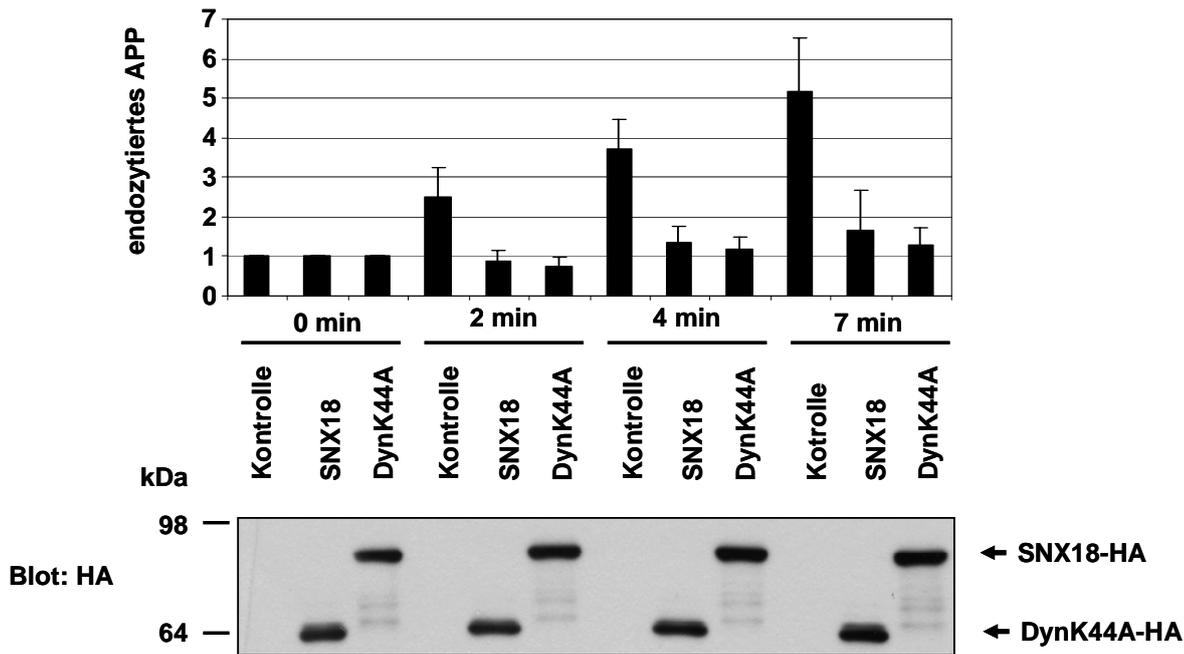
**Abb. 34 Expression der SNX9/18/33-Untergruppe erhöht die Menge an Zelloberflächen-APP**  
 HEK293E-Zellen wurden transient mit Kontrollplasmid (Kon), SNX33-HA, SNX9-HA, SNX18-HA, SNX1-HA, SNX17-HA oder DynK44A-HA(K44A) transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden Zelloberflächenproteine auf Eis mit reaktivem Biotin markiert. Biotin wurde gewaschen und die Zellen lysiert. Biotin-markierte Proteine wurden mit Streptavidinkügelchen aus dem Zelllysate präzipitiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und Biotin-markiertes APP im Immunoblot nachgewiesen (oberer Bot). Zusätzlich wurde Gesamt-APP (mittlerer Bot) und die Expression der transfizierten Proteine (unterer Bot) im Zelllysate mittels Gelelektrophorese und Immunoblotting analysiert. Die Menge an Oberflächen-APP relativ zur Gesamt-APP-Menge in jeder Zellschale wurde quantifiziert und ist in der Graphik unter den Blots relativ zu Kontroll-transfizierten Zellen dargestellt. Es handelt sich um den Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Duplikaten ausgeführt wurden.

## 2.7 Die SNX9/18/33-Untergruppe verlangsamt die Endozytose von APP

In einem weiteren Versuch sollte nun der Mechanismus der APP-Oberflächenzunahme geklärt werden. Da bekannt war, dass SNXe den endosomalen Transport von Oberflächenrezeptoren beeinflussen (siehe A. 2.3) und eine Inhibition der Endozytose einen ähnlichen APP-Spaltungs-Phänotyp zeigte (siehe A.2.3 und DynK44A in den vorangegangenen Versuchen) wie die Expression von SNX9/18/33, lag es nahe die Endozytose von APP bei SNX-Expression zu untersuchen. Die Rolle von SNX18 auf die APP-Endozytose wurde mit einem Oberflächenbiotinylierungs-Versuch analysiert. Dieser

Versuchsansatz erlaubt die Quantifizierung des in einem bestimmten Zeitraum endozytierten Oberflächen APPs als Mittelwert aller untersuchter Zellen. Als alternativer Internalisierungsassay wurde der Effekt von SNX33 mit dem in C. 1.8 beschriebenen APP-Endozytose-Assay bestimmt. Im Gegensatz zum Biotinylierungsassay kann mit diesem Assay der Einfluss eines transfizierten Proteins auf die Endozytose des Oberflächen-APPs in einzelnen Zellen verfolgt werden.

In dem Oberflächenbiotinylierungs-Experiment wurden, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, HEK293E-Zellen mit Kontrollplasmid, SNX18 oder DynK44A transfiziert und Proteine der Zellmembran auf Eis mit Biotin markiert. Dann wurden die Zellen für 0 min, 2 min, 4 min oder 7 min bei 37°C inkubiert, um die Endozytose von markierten Oberflächenproteinen zu erlauben. Um Transportvorgänge in der Zelle zu blockieren, wurden die Zellen wieder auf Eis gestellt und der Biotinrest von markierten Plasmamembranproteinen abgespalten. Eine Biotinmarkierung trugen nun nur solche Proteine, die während der Markierungsphase an der Plasmamembran lokalisiert waren und innerhalb der 37°C-Inkubation in der Zelle aufgenommen wurden. Die Zellen wurden lysiert, Biotin-markierte Proteine durch Streptavidinpräzipitation isoliert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Biotin-markiertes APP wurde in einem Immunoblot nachgewiesen und quantifiziert. Dabei entsprach das Biotin-markierte APP der Menge an endozytiertem APP. Die Menge an endozytiertem APP zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde relativ zur Menge an Oberflächen-APP zum Zeitpunkt 0 min unter Kontroll-, SNX18- oder DynK44A-Expression in der Graphik der Abbildung 35 dargestellt. Kontroll-transfizierte Zellen zeigten eine kontinuierliche Aufnahme des markierten Oberflächen-APPs innerhalb des untersuchten Zeitraums. Nach 2 min war die 2,5-fache Menge an APP, nach 4 min die 3,5-fache Menge und nach 7 min die 5,2-fache Menge an APP in die Zelle aufgenommen worden. Im Gegensatz dazu konnte in SNX18- und DynK44A-exprimierenden Zellen keine oder nur eine geringe Internalisierung von Oberflächen-APP innerhalb des 7 min-Zeitraums beobachtet werden. Damit lässt sich festhalten, dass die Expression von SNX18 die Endozytose von APP inhibierte.



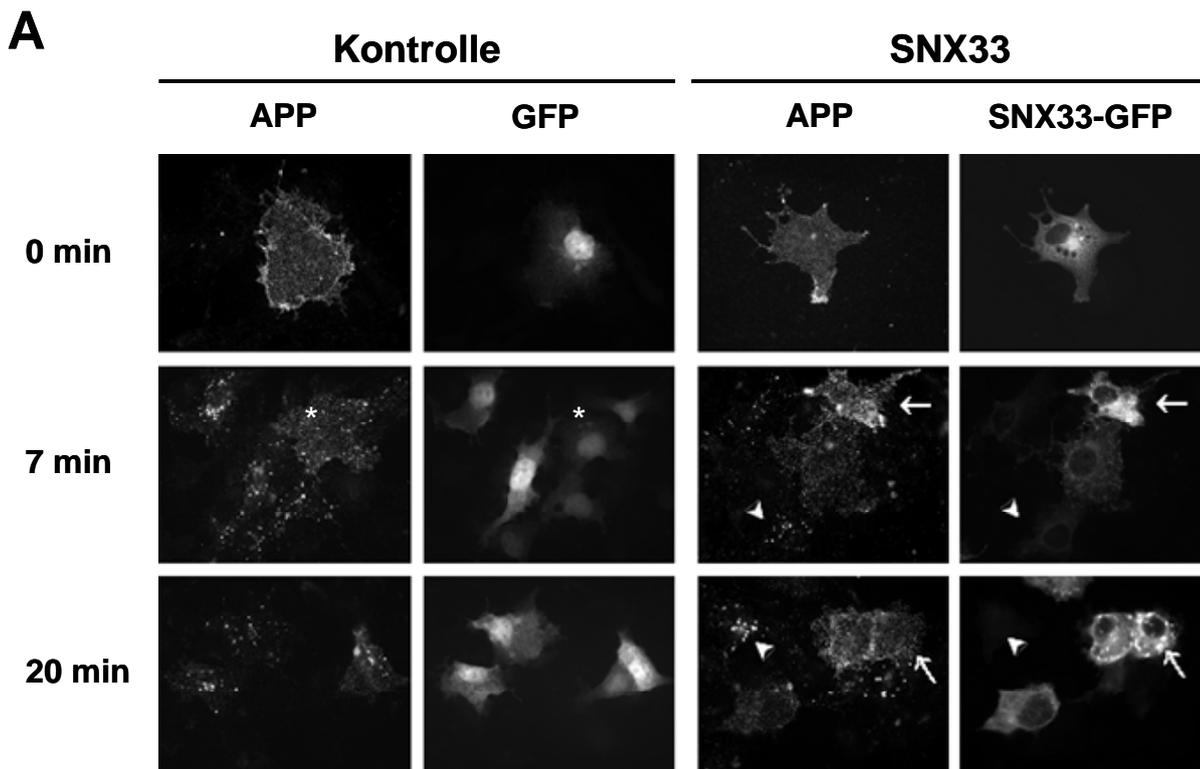
**Abb. 35 Expression von SNX18 verringert die Endozytose von Oberflächen-APP**

HEK293E-Zellen wurden transient mit Kontrollplasmid, SNX18-HA oder DynK44A-HA(K44A) transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden Zelloberflächenproteine auf Eis mit reaktivem Biotin markiert. Biotin wurde gewaschen und die Zellen für 0 min, 2 min, 4 min oder 7 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Biotinmarkierung der Zelloberflächenproteine abgespalten und die Zellen wurden lysiert. Biotin-markierte Proteine des Zelllysats wurden mit Streptavidinkügelchen präzipitiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und Biotin-markiertes APP im Immunoblot nachgewiesen und quantifiziert (Graphik). Die Expression von SNX18-HA und DynK44A-HA wurde mittels Gelelektrophorese und Immunoblotting im Zelllysate nachgewiesen. In der Graphik ist die Menge an endozytiertem APP relativ zum Oberflächen-APP (Zeitpunkt 0 min) jeweils unter Kontrollplasmid-, SNX18- oder DynK44A-Expression dargestellt. Es handelt sich um den Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten ausgeführt wurden.

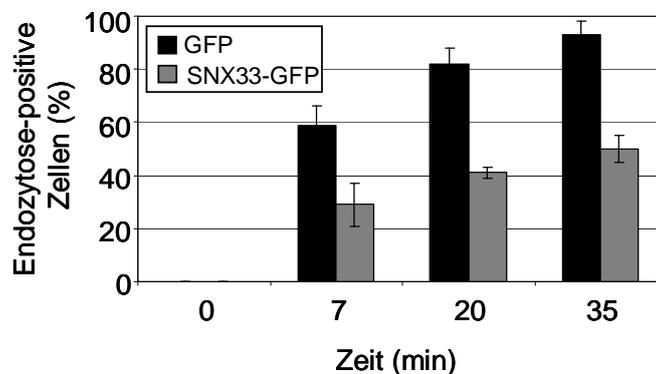
Der Einfluss der SNX33-Expression auf die Endozytose von APP wurde mit Hilfe eines alternativen Assays, dem Antikörper-Internalisierungs-Assay (siehe auch C. 1.8) bestimmt. Der Antikörper-Internalisierungs-Assay (siehe auch C. 1.8) bietet im Gegensatz zu dem Oberflächenbiotinylierungs-Assay den Vorteil, dass das Voranschreiten der Endozytose von APP in einzelnen Zellen untersucht wird. Es kann zwischen beginnender Endozytose, in der neben APP-Plasmamembranfärbung die ersten endozytotischen Vesikel erkennbar sind (Abb. 36A mit einem Stern markierte Zelle), und vorangeschrittener Endozytose ohne APP-Oberflächenfärbung und mit deutlichen APP-Vesikeln (Abb. 36A mit einer Pfeilspitze markierte Zellen) unterschieden werden. Außerdem gibt die GFP-Färbung Aufschluss über den Expressionslevel von SNX33 in der untersuchten Zelle. In diesem Versuch wurden COS-Zellen transient mit APP und SNX33-GFP oder APP und GFP transfiziert. Oberflächen-APP wurde mit einem Antikörper markiert und die Aufnahme dieses markierten APP für

verschiedene Zeitintervalle erlaubt. Dann wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und markiertes APP mit einem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper detektiert. Die Auswertung des Versuches erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops.

Wurden die Zellen sofort nach der Markierung des Oberflächen-APPs fixiert (Abb. 36A, obere Reihe), so war die APP-Färbung in GFP- und SNX33-GFP-exprimierenden Zellen gleichmäßig über die Plasmamembran verteilt. Nach 7 min Inkubation bei 37°C waren in 60 % der GFP-exprimierenden Zellen endozytotische APP-Vesikel erkennbar, während SNX33-GFP-exprimierende Zellen nur zu 28 % Endozytose-positiv waren (Abb. 36B). Nach 20 und 35 min Inkubation bei 37°C zeigte ein Großteil der GFP-exprimierenden Zellen Endozytose, wohingegen zum selben Zeitpunkt die Hälfte der SNX33-GFP-exprimierenden Zellen noch Endozytose-negativ waren (Abb. 36B). In Abbildung 36A sind SNX33-GFP-exprimierende Zellen, die Endozytose negativ sind und nur Oberflächen-APP zeigen, mit einem Pfeil markiert. Benachbarte, nicht-transfizierte Zellen im selben Bild verhalten sich wie GFP-exprimierende Zellen und weisen deutliche intrazelluläre APP-Vesikel auf (mit einer Pfeilspitze markiert). Die Expression von SNX33-GFP hemmt also die Aufnahme von APP von der Plasmamembran in endozytotische Vesikel. Des Weiteren konnte in diesem Versuch eine Abhängigkeit der APP-Endozytosehemmung von dem SNX33-Expressionslevel beobachtet werden. So zeigen Zellen mit einem starken SNX33-GFP-Expressionslevel häufiger eine Endozytosehemmung (Abb. 36A, zweite Reihe mit einem Pfeil markierte Zelle) als schwach SNX33-GFP-exprimierende Zellen (Abb. 36A, zweite Reihe mit einem Pfeilspitze markierte Zelle). Bei GFP-exprimierenden Zellen hingegen zeigten zu einem bestimmten Zeitpunkt genauso viele stark wie schwach exprimierende Zellen noch keine APP-Endozytose. Vergleicht man die Endozytoserate des in Abbildung 25 dargestellten Internalisierungsassays mit der Endozytoserate aus Abbildung 36, so zeigen zum selben Zeitpunkt in Abbildung 25 weniger der GFP-exprimierenden Zellen Endozytose, als in Abbildung 36. Diesem Unterschied liegt eine Modifikation der Versuchsdurchführung zugrunde. So wurden die Zellen aus Abbildung 36 nach der Antikörperinkubation auf Eis in eine neue, vorgewärmte Zellkulturschale überführt und beginnen früher mit der Endozytose, als die Zellen aus Abbildung 25, bei denen warmes Medium in die abgekühlte Zellkulturschale gegeben wurde.



**B**



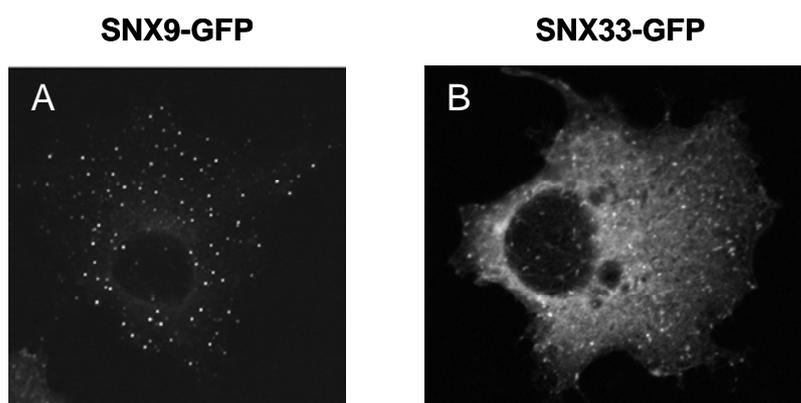
**Abb. 36 Expression von SNX33-GFP hemmt die Endozytose von APP**

COS-Zellen wurden transient mit APP und GFP oder APP und SNX33-GFP transfiziert. Ein Tag nach Transfektion wurden die Zellen auf Eis mit einem anti-APP-Ektodomänenantikörper inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und für die angegebenen Zeitintervalle bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper behandelt. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop. **A)** Repräsentative Bilder von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Der Stern markiert eine Zelle, die neben einer APP-Plasmamembranfärbung auch APP-positive Vesikel enthält. Der Pfeil markiert SNX33-GFP-exprimierende Zellen, die nur Oberflächen-APP zeigen. Die Pfeilspitze markiert nicht-transfizierte Zellen, die APP-endozytotische Vesikel aufweisen. **B)** Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden unter jeweils 100 GFP- oder SNX33-GFP-exprimierenden Zellen die Anzahl der APP-Endozytose positiven Zellen ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten, die unter doppelt-blinden Bedingungen ausgewertet wurden.

## 2.8 Zelluläre Lokalisierung der SNX9/18/33-Untergruppe

Mit Hilfe des Oberflächenbiotinylierungs-Versuchs und des Antikörper-Internalisierungs-Assays konnte eine Inhibition der APP-Endozytose unter SNX18- oder SNX33-Expression gezeigt werden. Da bekannt war, dass die Expression von SNX33-GFP und SNX9-GFP auch die Aufnahme von fluoreszenz-markiertem Transferrin verzögert (Daten von meiner Kollegin Susanne Schöbel), inhibierte die Expression der SNX9/18/33-Untergruppe die Endozytose von mehreren Oberflächenproteinen, wie APP und dem Transferrin-Rezeptor, und ist möglicherweise ein genereller Inhibitor der Dynamin-abhängigen Endozytose. In diesem Fall ist es wahrscheinlich, dass SNX9/18/33 mit Komponenten der Clathrin-abhängigen Endozytose interagiert und den generellen Endozytosemechanismus dieser Oberflächenproteine behindert. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde die Lokalisierung von Komponenten der Clathrin-abhängigen Endozytose unter SNX9/18/33-Expression in Immunfluoreszenzexperimenten untersucht. Es war von besonderem Interesse, ob SNX9/18/33 mit diesen Komponenten kolokalisierte.

GFP-markiertes SNX9 zeigte in COS-Zellen neben einer zytosolischen Lokalisierung eine gleichmäßige, punktförmige Verteilung in der Zelle (Abb. 37A). Expression von SNX33-GFP resultierte in einer stärker zytosolischen Lokalisierung von SNX33. Zusätzlich ließen sich SNX33-punktförmige Bereiche nahe der Plasmamembran nachweisen (Abb. 37B).

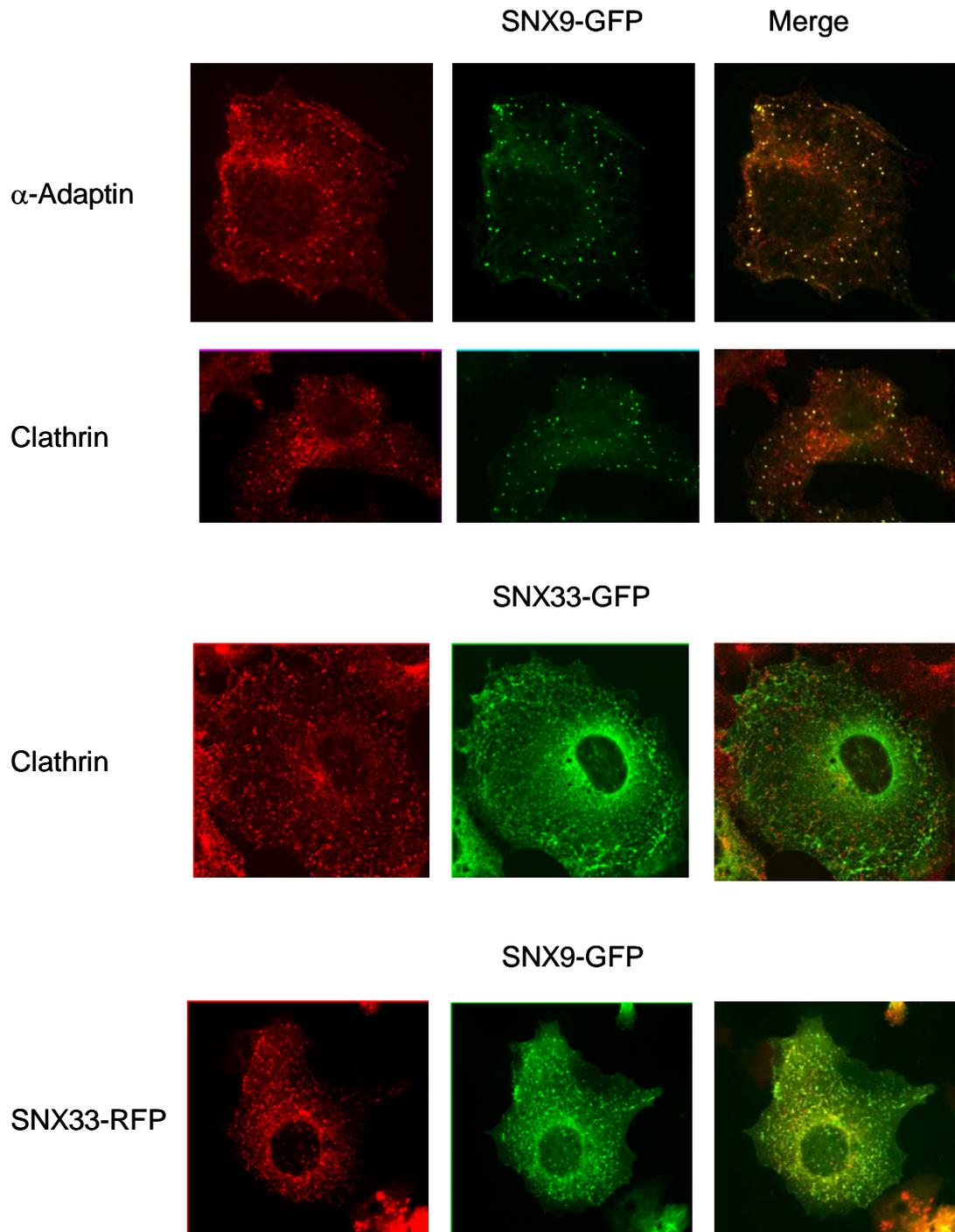


**Abb. 37 Lokalisierung von exogenem SNX9 und SNX33 in COS-Zellen**

COS-Zellen wurden transient mit SNX9-GFP oder SNX33-GFP transfiziert. Ein Tag nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die Markierung von Komponenten des *Clathrin Coats* in SNX9-GFP exprimierenden COS-Zellen zeigte eine übereinstimmende Lokalisierung der SNX9-positiven Vesikel mit  $\alpha$ -Adaptin oder Clathrin (Abb. 38, erste und zweite Reihe). Bereiche der Kolokalisierung von rotem Clathrin-, bzw.  $\alpha$ -Adaptin-Signal mit dem grünen SNX-GFP-Signal erscheinen in

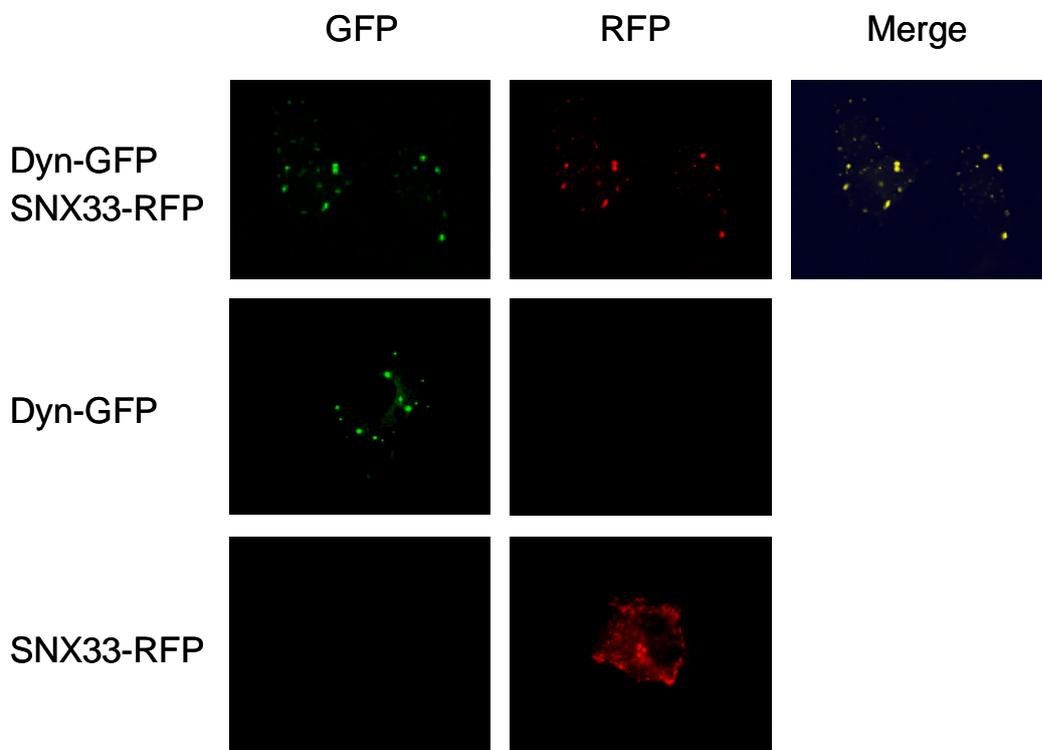
übereinander gelegten Bildern (Merge) in Abbildung 38 gelb. Im Gegensatz zu SNX9, konnte für SNX33-GFP-positive Strukturen keine Kolo­kalisierung mit Clathrin festgestellt werden (Abb. 38B). Exprimierte man SNX9-GFP zusammen mit SNX33-RFP, so kolo­kalisier­ten beide Proteine nur teilweise in denselben Strukturen (Abb. 38C). Die hier dargestellten Versuche belegen, dass es sich bei SNX9-positiven Strukturen um *Clathrin Coated Vesicles* handelte. Eine Kolo­kalisierung von endogenem SNX9 mit Komponenten des *Clathrin Coats* ist auch in vorangegangenen Publikationen gezeigt worden (Lundmark and Carlsson, 2003). Die Identität von SNX33-positiven Strukturen konnte hingegen nicht geklärt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die SNX33-positiven Strukturen nur bei exogener Expression von SNX33 entstehen und somit keine physiologisch relevanten Strukturen in der Zelle darstellen. In einer erst kürzlich erschienenen Studie konnten bei der Expression der SNX9-PX-BAR-Domäne vergleichbare vesikuläre Strukturen beobachtet werden, die wahrscheinlich durch eine vermehrte Plasmamembrantubulierung und Abschnürung durch die SNX9-PX-BAR-Domäne hervorgerufen werden (Pylypenko et al., 2007).



**Abb. 38 SNX9 kolokalisiert im Gegensatz zu SNX33 mit  $\alpha$ -Adaptin und Clathrin**

**A)** COS-Zellen wurden transient mit den angegebenen GFP-SNXen transfiziert. Ein Tag nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit anti- $\alpha$ -Adaptin- oder anti-Clathrin-Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Die Analyse der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Das Clathrin-, bzw.  $\alpha$ -Adaptin-Signal ist in der ersten Spalte rot und das GFP-Signal in der zweiten Spalte grün dargestellt. In der dritten Spalte sind beide Signale übereinander gelegt (Merge), Bereiche der Kolokalisierung erscheinen gelb. **B)** COS-Zellen wurden transient mit SNX9-GFP und SNX33-RFP kotransfiziert. Ein Tag nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. Das SNX33-RFP-Signal ist in der ersten Spalte rot und das SNX9-GFP-Signal in der zweiten Spalte grün dargestellt. In der dritten Spalte sind beide Signale übereinander gelegt (Merge), Bereiche der Kolokalisierung erscheinen gelb.

In einem weiteren Versuch wurde die Lokalisierung von SNX9/18/33 und Dynamin verglichen. Da kein ausreichend sensitiver Antikörper vorlag, um endogenes Dynamin zu detektieren, wurde GFP-markiertes Dynamin (Dyn-GFP) zusammen mit RFP-markiertem SNX33 in COS-Zellen exprimiert. Expression von Dyn-GFP resultierte in Dynamin-positiven Vesikeln verschiedener Größe in der Zelle (Abb. 39, zweite Zeile). Koexpression von SNX33-RFP führte zu einer Umverteilung der sonst punktförmigen SNX33-Lokalisierung (Abb. 39, untere Reihe) in die größeren Dyn-GFP-positiven Vesikel (Abb. 39, erste Zeile). SNX33 veränderte also seine zelluläre Lokalisierung bei Koexpression mit Dynamin. Diese Ergebnisse deuten eine Interaktion von SNX9/18/33 mit Dynamin an.



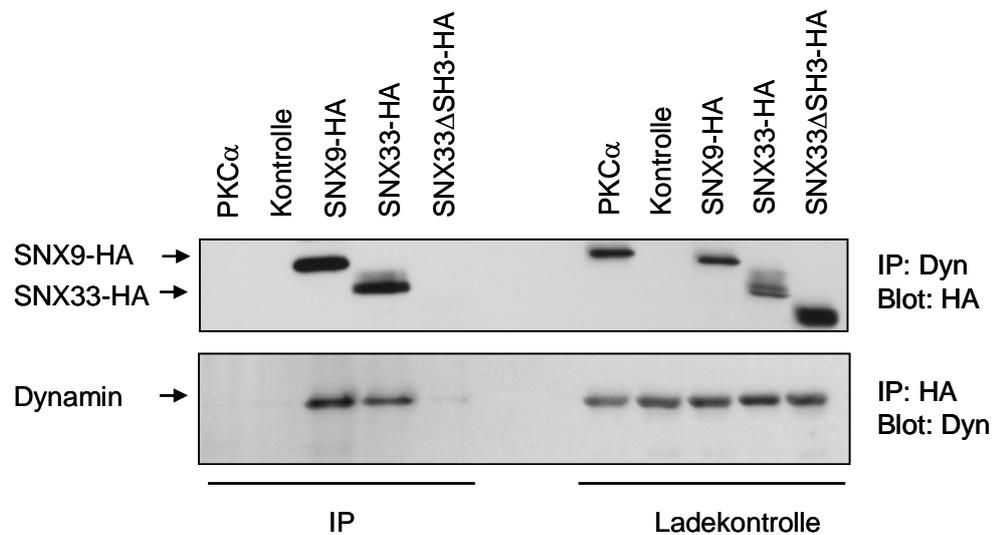
**Abb. 39 SNX33 kolokalisiert mit Dynamin**

COS-Zellen wurden transient mit Dynamin-GFP und SNX33-RFP kotransfiziert. Ein Tag nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Das GFP-Signal ist in der ersten Spalte, das RFP-Signal in der zweiten Spalte dargestellt. In der dritten Spalte sind beide Signale übereinander gelegt (Merge).

## 2.9 SNX9 und SNX33 binden Dynamin

Die Bindung von SNX9 und SNX33 mit Dynamin konnte in Immunopräzipitationsexperimenten bestätigt werden. Dazu wurden HEK293E-Zellen mit Dynamin und HA-markierten SNXen oder HA-markierter PKC $\alpha$  als Kontrollprotein kotransfiziert. Proteine des Zelllysats wurden dann mit einem anti-Dynamin- oder anti-HA-Antikörper präzipitiert und in einer Western-Blot-Analyse einmal präzipitierte Proteine sowie in einem zweiten Blot

kopräzipitierte Proteine untersucht (Abb. 40, linke Seite, IP). Wie in Abbildung 40 im oberen Blot auf der rechten Seite zu erkennen kopräzipitierten SNX9 und SNX33 in diesem Versuch mit Dynamin, nicht aber eine SNX33-Mutante, der die N-terminale SH3-Domäne fehlte (SNX33 $\Delta$ SH3) oder das zytosolische Kontrollprotein PKC $\alpha$ . Wurde das Zelllysate mit einem anti-HA-Antikörper behandelt, so konnte Dynamin im Gegenzug nur mit SNX9-HA und SNX33-HA kopräzipitiert werden, nicht aber mit SNX33 $\Delta$ SH3-HA oder PKC $\alpha$ -HA. (Abb 40, unterer Blot). Die Expression aller transfizierten Proteine wurde im Zelllysate überprüft (Abb. 40, rechte Seite, Ladekontrolle).



**Abb. 40 SNX9 und SNX33 binden an Dynamin**

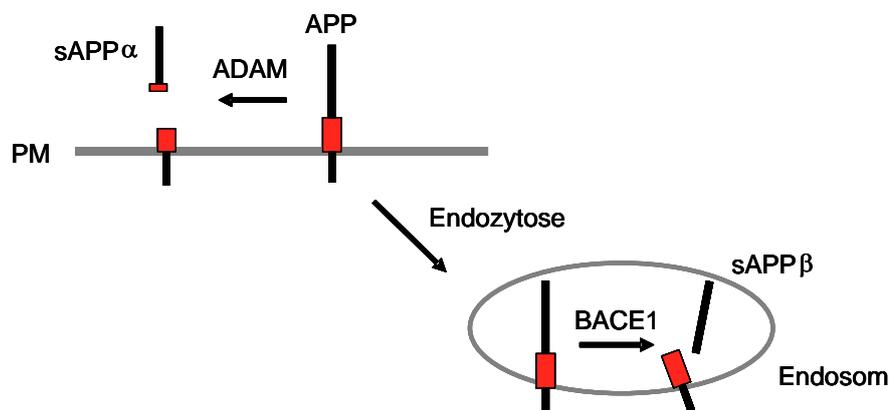
HEK293E-Zellen wurden transient mit Dynamin und SNX9-HA, SNX33-HA, SNX33 $\Delta$ SH3-HA, PKC $\alpha$ -HA oder Kontrollvektor kotransfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und für jeden Transfektionsansatz sowohl Dynamin (oberer Blot, IP) als auch HA-markierte Proteine (unterer Blot, IP) präzipitiert. Kopräzipitierte Proteine wurden mit Hilfe von Gelelektrophorese und Immunoblotting mit einem anti-HA- (oberer Blot) oder anti-Dynamin-Antikörper (unterer Blot) detektiert. Zusätzlich wurde die Expression von HA-markierten Proteinen (oberer Blot, Ladekontrolle) und Dynamin (unterer Blot, Ladekontrolle) im Zelllysate überprüft. PKC $\alpha$ : Protein Kinase  $\alpha$ ; IP: Immunopräzipitation.

## E. Diskussion

Die Ektodomänenspaltung von APP ist das initiale Ereignis der Bildung des schädlichen A $\beta$ -Peptids. Bisher ist nur sehr wenig über die Regulation der APP-Ektodomänenspaltung bekannt. In einem Expressionsklonierungs-Screen wurden das APP-Homologe APLP1 und ein neues Mitglied der SNX-Familie als Aktivatoren der APP-Spaltung identifiziert. Ziel dieser Doktorarbeit war eine genaue Charakterisierung der APP-Spaltung unter APLP1- und SNX9/18/33-Expression und die Identifizierung des molekularen Mechanismus der APLP1- und SNX9/18/33-induzierten APP-Sekretionszunahme. In dieser Diskussion sollen die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit in Zusammenhang mit den Ergebnissen vorangegangener Publikationen gebracht und kritisch analysiert werden.

### 1. Effekte der Endozytosehemmung auf die $\alpha$ - und $\beta$ -Sekretase-Spaltung von APP

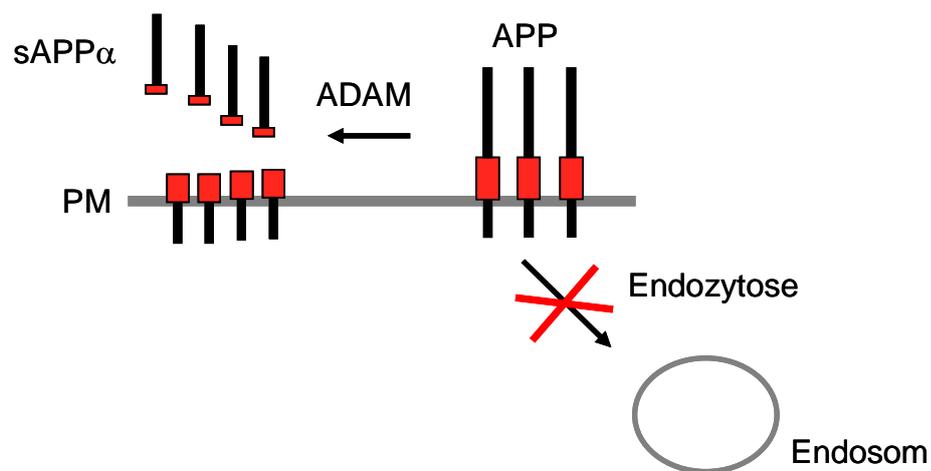
Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass APLP1 und die SNX9/18/33-Untergruppe sowohl die Endozytose, als auch die Ektodomänenprozessierung von APP verändern. Unter endogenen Bedingungen wird APP an der Plasmamembran von ADAM-Proteasen gespalten. Nicht gespaltenes APP gelangt über Endozytose von der Plasmamembran in endosomale Kompartimente und wird in den Endosomen von BACE1 geschnitten. Nicht gespaltenes APP gelangt entweder über den Transport zum TGN zurück in den sekretorischen Weg oder wird in den Lysosomen abgebaut. Abbildung 41 fasst die Rolle der APP-Endozytose für die Ektodomänenspaltung von APP zusammen.



**Abb. 41 Zelluläre Lokalisation des  $\alpha$ -Sekretase- und  $\beta$ -Sekretase-Schnitts von APP**

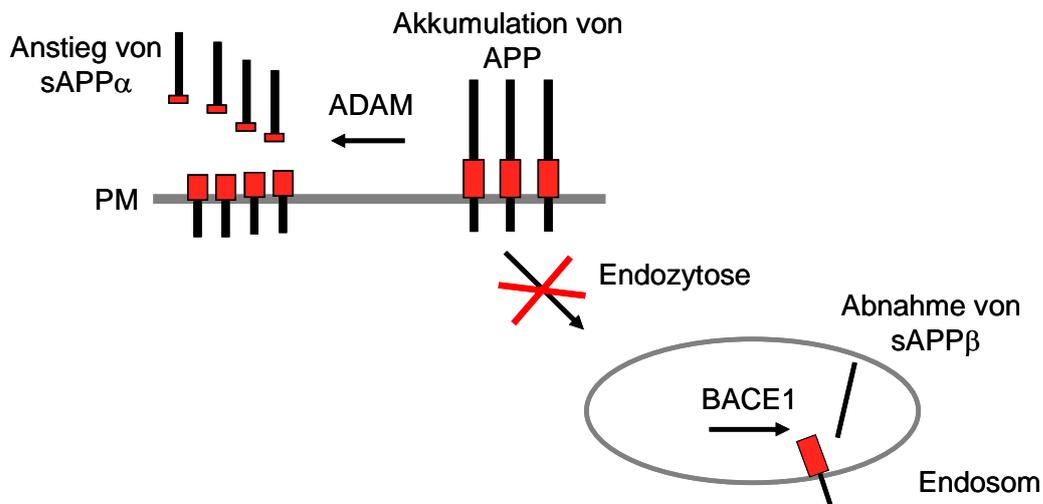
Schematische Darstellung der zellulären Lokalisation der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase-Spaltung von APP. An der Plasmamembran kann die Ektodomäne von APP von ADAM-Proteasen gespalten werden. Es kommt zur Sekretion des neuroprotektiven sAPP $\alpha$ -Fragments. Nicht gespaltenes APP gelangt über Endozytose von der Plasmamembran in endosomale Kompartimente. In den Endosomen wird APP von BACE1 geschnitten. sAPP $\beta$  wird über Recycling Endosomen sezerniert (nicht dargestellt).

Im Vergleich zu der in Abbildung 41 dargestellten Prozessierung von APP unter endogenen Bedingungen, verzögerte die Expression von APLP1 oder der SNX9/18/33-Untergruppe die Endozytose von APP (Abb. 35 und Abb. 36). Des Weiteren konnte bei APLP1- und SNX9/18/33-Expression ein Anstieg des Plasmamembran-lokalisierter APP (Abb.34) und eine vermehrte sAPP $\alpha$ -Sekretion (Abb. 13 und Abb. 33) beobachtet werden. Diese Befunde decken sich sehr gut mit bereits beschriebenen Phänotypen bei einer APP-Endozytoseinhibition. In allen bisher untersuchten Systemen resultierte eine Inhibition der APP-Endozytose in einer vermehrten  $\alpha$ -Sekretase-Prozessierung von APP (Carey et al., 2005; Chyung and Selkoe, 2003; Koo and Squazzo, 1994; Perez et al., 1996). Ebenfalls ist bekannt, dass die Inhibition der APP-Internalisierung zu einer Zunahme an Plasmamembran-lokalisierendem APP (Haass et al., 1993; Koo and Squazzo, 1994) und infolge dessen zu einer verstärkten sAPP $\alpha$ -Sekretion führt (Sisodia, 1992). Damit lässt sich der Wirkmechanismus der APLP1- und SNX9/18/33-induzierten Stimulation der APP-Spaltung in einem Modell zusammenfassen (Abb. 42). In diesem Modell führt die Expression von APLP1 und SNX9/18/33 zu einer verzögerten Aufnahme von APP von der Plasmamembran in endosomale Kompartimente der Zelle. Als Folge akkumuliert APP an der Plasmamembran und die APP-Ektodomäne wird vermehrt von  $\alpha$ -Sekretasen gespalten. Die Endozytoserate von APP entscheidet also darüber, wie viel APP den  $\alpha$ -Sekretasen als Substrat zur Verfügung steht. Dieses Ergebnis verdeutlicht die Bedeutung der APP-Endozytose für die Bildung des neuroprotektiven sAPP $\alpha$ .



**Abb. 42 Die Expression von APLP1 oder SNX9/18/33 inhibiert die Endozytose von APP**  
 Schematische Darstellung der APP-Spaltung bei Endozytoseinhibition. Expression von APLP1 oder SNX9/18/33 verzögert die APP-Endozytose. Als Folge akkumuliert APP an der Plasmamembran und wird vermehrt von ADAM-Proteasen gespalten. Es kommt zu einem Anstieg der sAPP $\alpha$ -Sekretion.

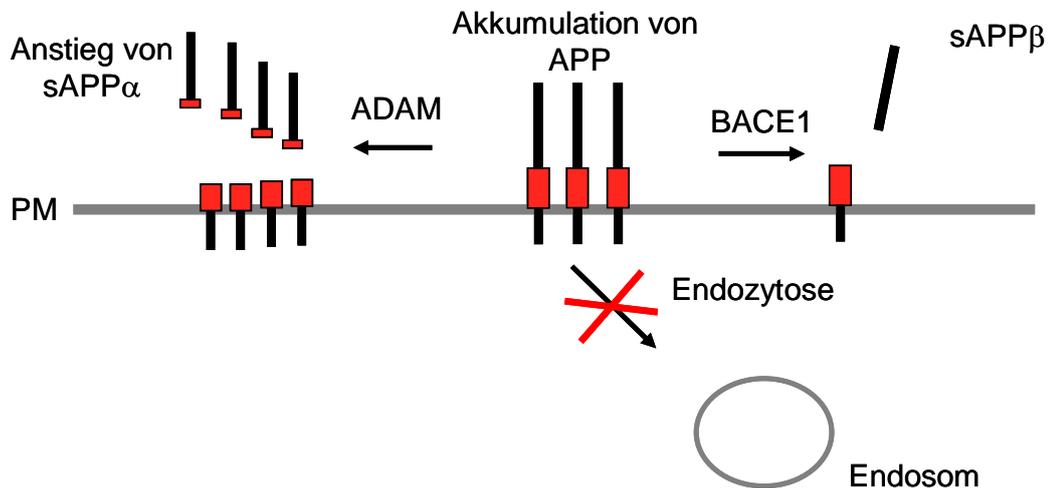
Während APLP1 und SNX9/18/33 in gleicher Weise die Sekretion von sAPP $\alpha$  beeinflussten, ließen sich unterschiedliche Effekte auf die Bildung von sAPP $\beta$  nachweisen. Die Expression von APLP1 führte zu einer Abnahme von sAPP $\beta$  (Abb. 13), wohingegen die Expression von SNX9/18/33 die Menge an sAPP $\beta$  nicht wesentlich veränderte (Abb. 33). Diese Ergebnisse deuten Unterschiede in der Art der Endozytosehemmung an. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von APLP1 in einer spezifischen APP-Endozytoseinhibition resultiert (Abb. 25). In diesem Fall gelangt weniger APP in die Endosomen und als Folge nimmt die sAPP $\beta$ -Sekretion ab (Abb. 43). Da bekannt ist, dass die Hemmung der APP Endozytose durch Mutation des APP-Internalisierungsmotivs zu einer Reduktion der A $\beta$ -Bildung führt (Koo and Squazzo, 1994; Perez et al., 1996), deckt sich der APP-Spaltungsphänotyp unter APLP1-Expression mit bereits beschriebenen Phänotypen einer spezifischen APP-Endozytosehemmung. Auf den Mechanismus der spezifischen APP-Endozytoseinhibition durch APLP1 wird in dem folgenden Kapitel eingegangen.



**Abb. 43 Die Expression von APLP1 verhindert die  $\beta$ -Sekretase-Prozessierung von APP**  
 Schematische Darstellung der APP-Spaltung bei Inhibition der APP-Internalisierung. Expression von APLP1 verzögert die APP-Endozytose. Als Folge akkumuliert APP an der Plasmamembran und wird vermehrt von ADAM-Proteasen gespalten. Da weniger APP in endosomale Kompartimente gelangt, kommt es zu einer Abnahme der sAPP $\beta$ -Bildung.

Im Gegensatz zur Expression von APLP1 verändert die Expression der SNX9/18/33-Untergruppe die sAPP $\beta$ -Sekretion nicht (Abb. 33). Des Weiteren beeinflusst SNX9/18/33 neben der APP-Internalisierung auch die Aufnahme von Transferrin in die Zelle und führt damit zu einer eher generellen Endozytosehemmung (C.2.7). In einer vorangegangenen Untersuchung resultiert die Inhibition aller Dynamamin-abhängigen Endozytosevorgänge in der

Zelle in einer leichten Zunahme von sAPP $\beta$  und A $\beta$  (Chyung and Selkoe, 2003). Die Autoren argumentieren, dass in diesem Fall sowohl die Aufnahme von APP, als auch von BACE1 in die Endosomen verhindert ist. BACE1 akkumuliert ebenfalls an der Plasmamembran und kann dort APP schneiden (Chyung and Selkoe, 2003; dargestellt in Abb. 42). Da das pH-Optimum von BACE1 nicht dem Milieu der Plasmamembran entspricht (Vassar, 2001), wird APP an der Plasmamembran effizienter von ADAM-Proteasen geschnitten, als von BACE1. Es kommt zu einem starken Anstieg der sAPP $\alpha$ -Bildung und zu einer leichten Zunahme der sAPP $\beta$ -Sekretion. Aufgrund dieses ähnlichen Phänotyps könnte die veränderte APP-Spaltung unter SNX9/18/33-Expression durch einen analogen Mechanismus wie die Inhibition der Dynamin-abhängigen Endozytose hervorgerufen werden.



**Abb. 44 Die Expression von SNX9/18/33 inhibiert generelle Endozytosemechanismen in der Zelle**

Schematische Darstellung der APP-Spaltung bei genereller Endozytoseinhibition. Expression von SNX9/18/33 behindert Dynamin-abhängige Endozytosevorgänge der Zelle. Als Folge akkumulieren APP und BACE1 an der Plasmamembran. APP wird an der Plasmamembran von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretasen umgesetzt. Da das pH-Optimum der  $\alpha$ -Sekretasen dem Milieu der Plasmamembran entspricht, kommt es zu einer starken Zunahme der sAPP $\alpha$ -Sekretion.

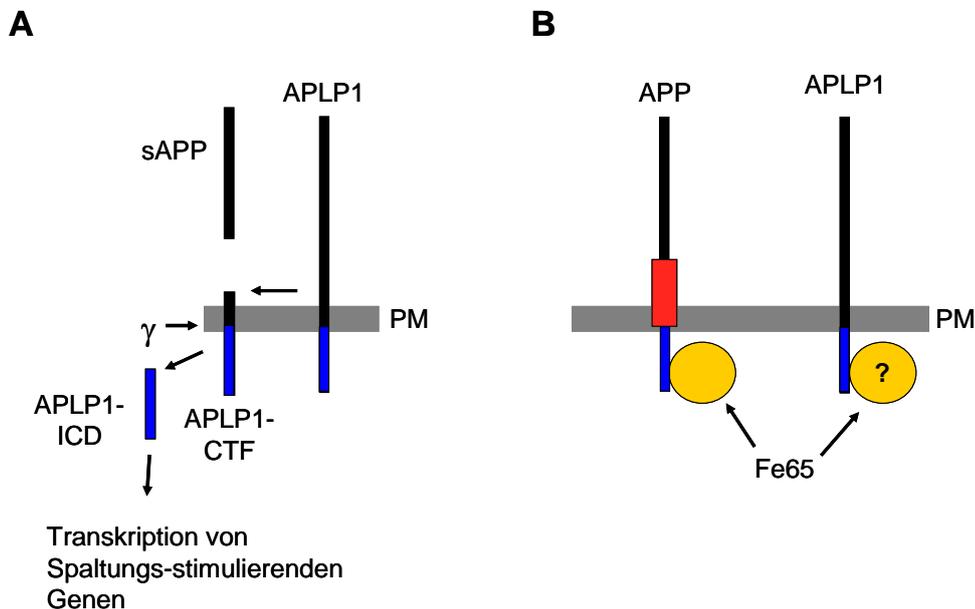
Das in Abbildung 44 vorgestellte Modell der sAPP $\beta$ -Bildung bei APP-Endozytoseinhibition konnte bisher nur bei endogener Expression von APP nachgewiesen werden (Chyung and Selkoe, 2003; Abb. 33 DynK44A). Bei starker Überexpression von APP resultiert eine generelle Endozytoseinhibition hingegen in einer Abnahme der sAPP $\beta$ -Bildung (Carey et al., 2005; Koo and Squazzo, 1994). Vermutlich gelangt unter APP-Überexpressionsbedingungen deutlich mehr APP in die Endosomen, so dass die sAPP $\beta$ -Bildung von vornherein stark gesteigert ist. Akkumulation von APP und BACE1 an der Plasmamembran resultiert in

diesem Fall nicht in einer ebenso effizienten Prozessierung von APP durch BACE1 an der Plasmamembran und damit in einer Abnahme der sAPP $\beta$ -Bildung.

Zusammenfassend lässt sich der APLP1- und SNX9/18/33-induzierte Effekt auf die APP-Spaltung folgenderweise erklären. Die Expression von APLP1 und SNX9/18/33 verursachen die Inhibition der APP-Endozytose und führen zu einer Akkumulation von APP an der Plasmamembran und einer gesteigerten sAPP $\alpha$ -Sekretion. APLP1 inhibiert spezifisch nur die Endozytose von APP, es gelangt weniger APP in die Endosomen und sAPP $\beta$  nimmt ab (Abb. 43). Die SNX9/18/33-Untergruppe inhibiert die generelle Endozytose. APP und BACE1 akkumulieren an der Plasmamembran und sAPP $\beta$  wird an der Plasmamembran durch BACE1 gebildet (Abb. 44). Der genaue Mechanismus der APLP1- und SNX9/18/33-vermittelten Endozytosehemmung wird in den folgenden Absätzen diskutiert.

## 2. APLP1 konkurriert mit APP um Endozytose-relevante Proteine

In der Domänendeletionsanalyse von APLP1 konnte gezeigt werden, dass die APLP1-zytoplasmatische Domäne allein den APP-Spaltungsphänotyp und damit die Endozytoseinhibition von APP vermittelt (Abb. 15). Für diesen Effekt sind zwei potentielle Mechanismen vorstellbar. Im ersten Fall könnte die APLP1-ICD, ähnlich der NOTCH-ICD in den Kern lokalisieren und dort die Transkription von Endozytose-relevanten Proteinen steuern (Abb. 45A). In einem alternativen Mechanismus könnte die APLP1-zytoplasmatische Domäne in einer membranverankerten Form Proteine binden, die für die Endozytose von APP notwendig sind (Abb. 45B).



**Abb. 45 Die zytoplasmatische Domäne von APLP1 könnte auf verschiedenen Weise die Endozytose und Spaltung von APP beeinflussen**

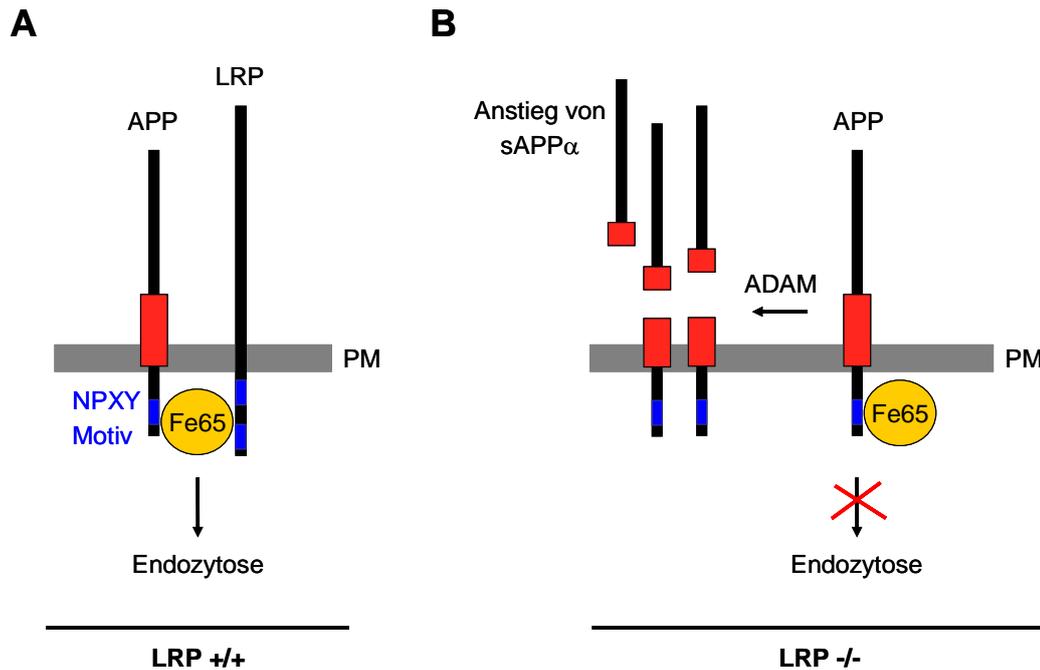
Schematische Darstellung möglicher Mechanismen, wie die APLP1-zytoplasmatische Domäne die APP-Endozytose beeinflussen könnte. **A)** Die APLP1-ICD reguliert im Kern die Transkription von APP-Endozytose relevanten Proteinen. **B)** Die APLP1-zytoplasmatische Domäne konkurriert mit APP um Endozytose-relevante Proteine. ICD: intrazelluläre Domäne; CTF: C-terminales Fragment.

Da weder ein GFP-APLP1-ICD-Fusionsprotein (Abb. 15), noch  $\gamma$ -Sekretase-vermittelte Freisetzung von APLP1-ICD (Abb. 16) notwendig waren, um den APLP1-vermittelten Phänotyp zu induzieren, kann das Modell der APLP1-ICD-stimulierten Transkription verworfen werden. Stattdessen ist es wahrscheinlich, dass die APLP1-zytoplasmatische Domäne mit der APP-zytoplasmatischen Domäne um Endozytose-relevante Adapterproteine konkurriert. Für dieses Modell spricht auch, dass APLP1 die APP-Spaltung nur in Gegenwart eines intakten GYENPTY-Internalisierungsmotivs der APLP1-zytoplasmatischen Domäne

stimulierte (Abb. 18). APP interagiert über dieses Motiv mit Proteinen, die die Endozytose von APP regulieren (Koo and Squazzo, 1994; Perez et al., 1996). Falls Endozytose-relevante Adapterproteine in der Zelle limitiert sind, reduziert die Expression von APLP1 die Bindung von APP an diese Adapterproteine und APP kann nicht mehr effizient internalisiert werden. Die Expression von APLP1 sollte in einem solchen Fall den gleichen Effekt auf die Spaltung von APP haben, wie ein *knock down* des betroffenen Adapterproteins.

Unter den potentiellen APP-Adapterproteinen (A) 2.4) wurde bisher nur für FE65, X11 und SORL1 eine Rolle im Transport von APP beschrieben (Offe et al., 2006; Pietrzik et al., 2004; Rogaeva et al., 2007). SORL1 scheint dabei die endosomale Sortierung von APP zum TGN zu betreffen. Der *knock out* von SORL1 resultiert in einer vermehrten  $\beta$ -Sekretase-Prozessierung von APP (Rogaeva et al., 2007) und widerspricht damit dem APLP1-induzierten Phänotyp. FE65 hingegen beeinflusst direkt die Endozytose von APP. Der *knock out* von FE65 führt entsprechend der APLP1-Expression zu einer vermehrten sAPP $\alpha$ -Sekretion (Pietrzik et al., 2004). X11 wiederum kolokalisiert mit APP im Golgi und moduliert den Transport von APP im sekretorischen Weg (Hill et al., 2003; King et al., 2003).

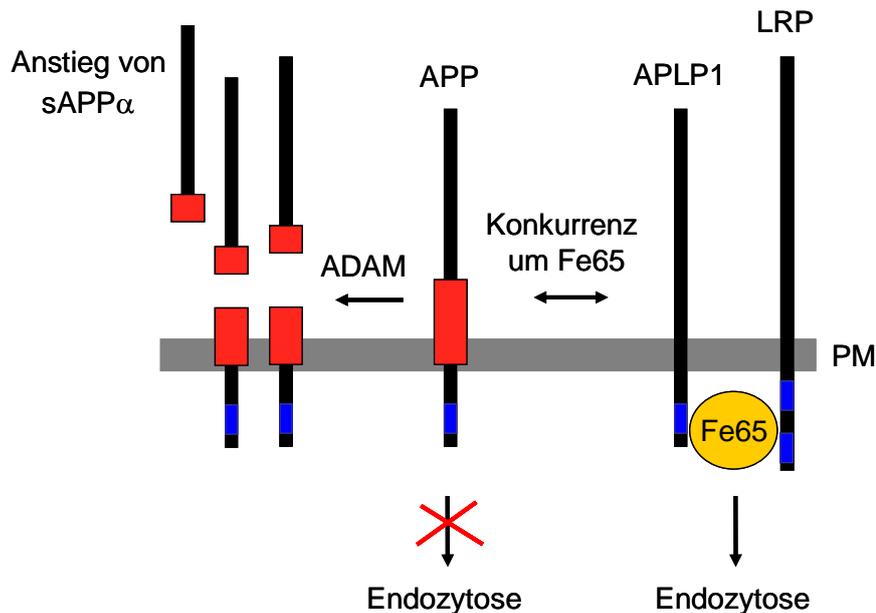
Aus diesen Vorarbeiten geht FE65 als bester Kandidat für die APLP1-vermittelte APP-Endozytosehemmung hervor. Eine postulierte Rolle von FE65 bei der Endozytose von APP ist in Abbildung 46 zusammengefasst (Pietrzik et al., 2004). FE65 besitzt zwei Phosphotyrosin-bindende (PTB) Domänen. Die C-terminale PTB-Domäne von FE65 bindet an das GYENPTY-Motiv von APP (Borg et al., 1996). Die zweite PTB-Domäne bindet das zweite NPXY-Motiv in LRP (Trommsdorff et al., 1998). Damit kann FE65 APP an den Endozytoserezeptor LRP koppeln (siehe auch A. 2.4). Da LRP an der Plasmamembran eine Halbwertszeit von unter einer halben Minute besitzt, ist LRP für die schnelle Endozytose von APP verantwortlich (Cam et al., 2004). Entsprechend ist in LRP-defizienten Zellen die Endozytose von APP um 50 % reduziert, die Halbwertszeit von APP verlängert, die sAPP $\alpha$ -Sekretion erhöht und die A $\beta$ -Bildung reduziert (Pietrzik et al., 2002). Der *knock out* von LRP hat demnach den gleichen Effekt auf die APP-Spaltung wie der *knock out* von FE65 (siehe oben; Pietrzik et al., 2004) und die Expression von APLP1. Damit ist es wahrscheinlich, dass APLP1 seinen Effekt über die Bindung an FE65 und LRP ausübt. Kürzlich wurde auch die Interaktion von einem LRP-Homologen (LRP1B) mit APP nachgewiesen. Da LRP1B sehr langsam endozytiert wird, verzögert die Expression von LRP1B die Endozytose von APP (Cam et al., 2004). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass LRP und LRP1B die Endozytoserate von APP bestimmen.



**Abb. 46 APP wird im Komplex mit FE65 und LRP endozytiert**

Schematische Darstellung der APP-Endozytose in Gegenwart und Abwesenheit von FE65 **A)** APP bindet über FE65 an LRP und wird in diesem Komplex endozytiert. **B)** In Abwesenheit von FE65 akkumuliert APP an der Plasmamembran und wird vermehrt von ADAM-Proteasen geschnitten.

Die oben aufgezählten Erkenntnisse aus vorangegangenen Arbeiten deuten auf eine von FE65- und LRP-vermittelte Stimulation der APP-Spaltung durch APLP1 hin. Dieses Modell wird auch durch Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit bestätigt. So konnte die Bindung von FE65 an APLP1 nachgewiesen werden (Abb.21). Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Mutation des GYENPTY-Motivs der APLP1-zytoplasmatischen Domäne die Interaktion von APLP1 und FE65 verhinderte (Abb. 21). Das GYENPTY-Motiv von APLP1 vermittelt also sowohl die Stimulation der APP-Spaltung, als auch die Bindung von APLP1 an FE65. Außerdem ergab sich, dass APLP1 die APP-Spaltung nur in Gegenwart von LRP stimuliert. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ein Modell der durch APLP1 verursachten APP-Endozytosehemmung ableiten. APP und APLP1 konkurrieren um die Bindung an FE65. Daher reduziert die Expression von APLP1 die Menge an verfügbarem FE65 und in Folge dessen wird APP nicht an den Endozytoserezeptor LRP gekoppelt, sondern akkumuliert an der Plasmamembran. Dies führt zu einer verstärkten sAPP $\alpha$ -Sekretion (Abb. 47). Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit bieten damit eine wichtige Validierung des vor kurzem postulierten Modells, indem FE65 und LRP die Endozytose von APP vermitteln. Darüber hinaus konnte in dieser Doktorarbeit erstmals gezeigt werden, dass APP mit APLP1 um die Bindung an FE65 und LRP konkurriert und dass FE65 für die Endozytose von APP limitierend ist.



**Abb. 47 APLP1 konkurriert mit APP um die Bindung an FE65 und LRP**

Schematische Darstellung der APP-Endozytosehemmung bei APLP1-Expression. APP konkurriert mit APLP1 um die Bindung an FE65. Exogen exprimiertes APLP1 liegt im Überschuss vor und bindet einen Großteil von FE65. APP akkumuliert an der Plasmamembran und wird vermehrt von ADAM-Proteasen geschnitten.

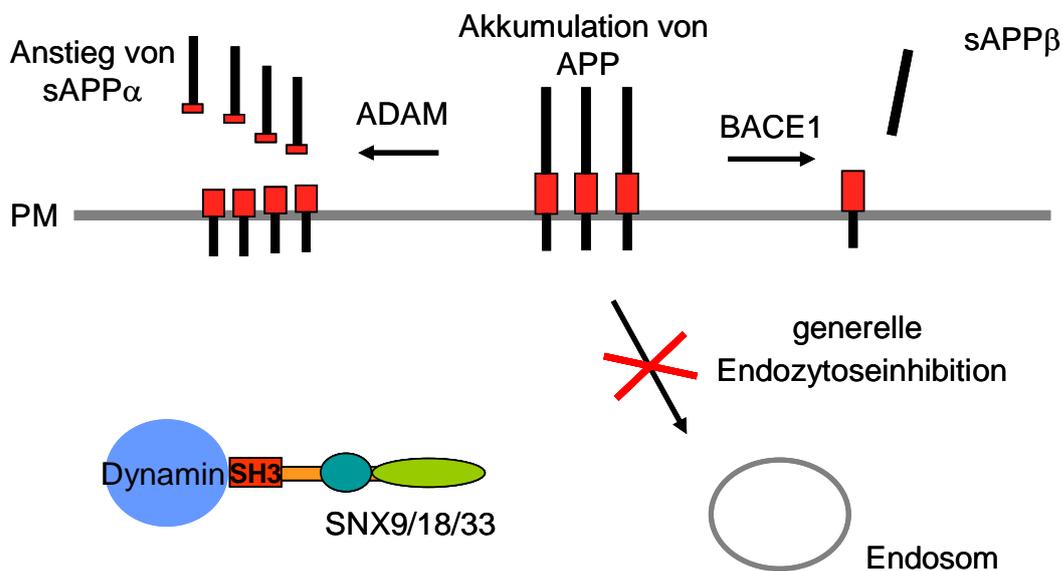
Neben APLP1 führte die Expression von APLP2, APP und C99 zu einer verstärkten Ektodomänenspaltung von APP (Abb.12 und Abb.15), nicht aber die Expression von LRP, IR, EGFR oder L-Selektin (Abb.19B). LRP, IR und EGFR haben wie die APP-Homologen ein NPXY-Motiv in ihren zytoplasmatischen Domänen (Abb.19A) und könnten damit theoretische APP Endozytose-relevante Proteine binden. Im Gegensatz zu den APP-Homologen fehlt ihnen aber ein Tyrosinrest, zwei Aminosäuren vor dem NPXY-Motiv (Abb. 19A). Es ist bekannt, dass dieser Tyrosinrest (Tyr638) für die Endozytose von APP essentiell ist (Perez et al., 1996) und auch die Bindung von APP an Adapterproteine eine Rolle spielt (Borg et al., 1996). In dieser Arbeit ergab sich, dass Tyr638 von APLP1 kritisch sowohl für die Stimulation der APP-Spaltung (Abb.20), als auch für die Bindung von APLP1 an FE65 ist (Abb.22A). Dies erklärt warum LRP, IR und EGFR APP nicht in dem Komplex mit LRP ersetzen können und keinen Einfluss auf die Spaltung von APP haben. Des Weiteren lässt sich nun auch der Effekt von APLP1 in APP-überexprimierenden Zellen erklären. Die Expression von APLP1 hat in stark APP-exprimierenden Zellen keinen Einfluss auf die Spaltung von APP (Abb.14), da die Endozytose von APP in diesen Zellen durch den hohen APP-Expressionslevel schon verlangsamt ist. FE65 ist gesättigt und zusätzlich exprimiertes APLP1 kann die Konkurrenz nicht weiter verschärfen.

Damit lässt sich das Modell aus Abbildung 47 erweitern. Wir postulieren, dass nicht nur APLP1 und APP um die Bindung an FE65 und LRP konkurrieren, sondern dass alle APP-Homologen miteinander in Konkurrenz stehen. Dieser Ansatz bietet einen vollkommen neuen, potentiellen Regulationsmechanismus der APP-Spaltung. Durch die differentielle Expression eines Mitglieds der APP-Familie, könnte die Endozytose und Spaltung der jeweils anderen Familienmitglieder wirksam reguliert werden. Die differentielle Expression der APP-Homologen wurde in den Studien dieser Arbeit durch exogen exprimierte Proteine hervorgerufen und entspricht demnach nicht den physiologisch-relevanten Expressionsniveaus der APP-Homologen. Somit veranschaulichen die Ergebnisse dieser Arbeit die Effekte einer differentiellen Expression der APP-Homologen in einer Modellsituation. Inwieweit die APP-Homologen in vivo verschieden stark exprimiert werden und durch diese Situation die APP-Spaltung verändert wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Es sind aber Beispiele verschieden starker Expression der unterschiedlichen APP-Homologen bekannt. So ist in Keratinozyten der Epidermis während der Wundheilung die Expression von APP erhöht und die Expression von APLP2 reduziert (Kummer et al., 2002). Auch konnte eine verschieden starke Expressionszunahme der APP-Homologen während der neuronalen Differenzierung von Neuroblastomazellen beschrieben werden (Adlerz et al., 2003). In Zukunft wird es sehr interessant sein zu erfahren, ob in den oben genannten Beispielen die APP-Spaltung verändert stattfindet und besonders, ob bei der Alzheimer-Krankheit die Expression der APP-Homologen verschieden stark reguliert ist und dadurch die Spaltung von APP und die Bildung des neuroprotektiven sAPP $\alpha$ -Fragments und des neurotoxischen A $\beta$ -Peptids beeinflusst wird.

### **3. Exogenes SNX9/18/33 inhibiert die Dynamin-abhängige Endozytose**

Im Gegensatz zu APLP1 inhibierte die Expression der SNX9/18/33-Untergruppe sowohl die Endozytose von APP, als auch die Aufnahme von Transferrin. Es handelt sich also um eine eher generelle Endozytosehemmung. Diese Endozytosehemmung wurde durch die Interaktion von exogenem SNX9/18/33 mit Komponenten der Dynamin-abhängigen-Endozytose hervorgerufen. So konnte in Immunfluoreszenzexperimenten eine Umverteilung der sonst vesikulären SNX9/18/33-Lokalisierung in Dynamin-positive Strukturen beobachtet werden (Abb. 39). Auch Immunpräzipitationsuntersuchungen bestätigten die Interaktion von exogenem SNX9 und SNX33 mit exogenem Dynamin in Abhängigkeit der SNX9/18/33-SH3-Domäne (Abb. 40). Ein SNX33-Konstrukt, dem die N-terminale SH3-Domäne fehlte, kopräzipitierte nicht mit Dynamin (Abb. 40) und stimulierte auch nicht die APP-Spaltung

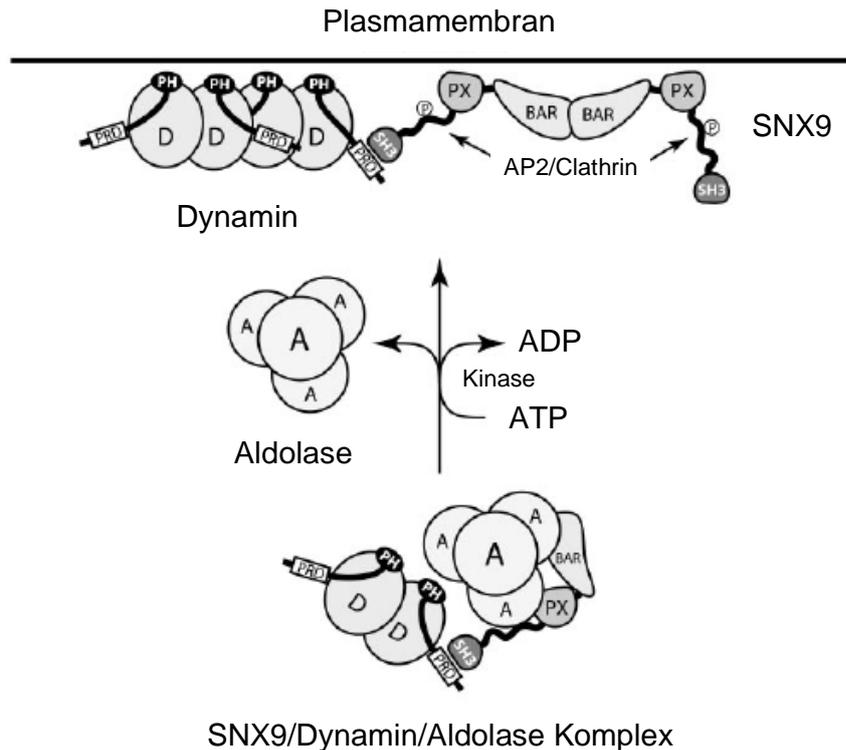
(Daten nicht gezeigt). So lässt sich der Mechanismus der durch die Expression von SNX9/18/33 verursachten generellen Endozytosehemmung in folgendem Modell zusammenfassen. SNX9/18/33 binden über die SH3-Domäne an Dynamin und inhibieren damit Dynamin-abhängige Endozytosevorgänge in der Zelle (Abb.48). APP akkumuliert an der Plasmamembran und wird vermehrt durch ADAM-Proteasen gespalten. Es kommt zu einer gesteigerten sAPP $\alpha$ -Sekretion. Da auch die Dynamin-abhängige Endozytose von BACE1 verzögert stattfindet (siehe D.1), akkumuliert BACE1 an der Zelloberfläche und kann dort APP schneiden. Es kommt zur Freisetzung von sAPP $\beta$ .



**Abb. 48 SNX9/18/33 bindet Dynamin und verhindert die Dynamin-abhängige Endozytose**  
 Schematische Darstellung der APP-Endozytoseinhibition bei SNX9/18/33-Expression. Die SNX9/18/33-SH3-Domäne bindet an die Prolin-reiche Domäne (PRD) von Dynamin. Dynamin-abhängige Endozytosevorgänge in der Zelle werden durch diese Interaktion inhibiert. APP akkumuliert an der Plasmamembran und wird vermehrt von ADAM-Proteasen gespalten. Auch BACE1 wird nicht mehr effizient endozytiert und schneidet APP an der Plasmamembran.

Dieses Modell wird durch bereits publizierte Studien zur Funktion von SNX9 bestätigt und darüber hinaus noch ergänzt. So verringert die Expression einer dominant-negativen SNX9-Mutante die Transferrin-Rezeptor-Internalisierung (Lundmark and Carlsson, 2003; Shin et al., 2007). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die SH3-Domäne von SNX9 an die Prolin-reiche Domäne von neuronalem Dynamin-1 und ubiquitär-exprimierten Dynamin-2 bindet (Lundmark et al., 2003; Soulet et al., 2005). Es wird angenommen, dass ein Teil des zytosolischen Dynamins in einem Komplex mit SNX9 und dem glykolytischen Enzym Aldolase vorliegt (Lundmark and Carlsson, 2003). Die Aldolase bindet eine saure Sequenz

nahe der SNX9-PX-Domäne und verhindert dadurch die Membranassoziiierung von SNX9 und Dynamin. Dynamin wird durch diese Interaktion in einer inaktiven Form im Zytosol zurückgehalten. Phosphorylierung von SNX9 verhindert die Bindung von Dynamin und SNX9 an die Aldolase und führen zur Membranassoziiierung und Aktivierung von SNX9 und Dynamin (Lundmark and Carlsson, 2004, dargestellt in Abb. 49).



**Abb. 49 SNX9 vermittelt die Membranassoziiierung von Dynamin**

Schematische Darstellung der Membranassoziiierung von Dynamin. Dynamin liegt in nicht stimulierten Zellen in einem Komplex mit SNX9 und Aldolase vor. Die SNX9-SH3-Domäne interagiert mit der Dynamin-Prolin-reichen Domäne (PRD). Aldolase bindet SNX9 nahe der PX-Domäne und verhindert so die Membranassoziiierung von SNX9/Dynamin. Die Phosphorylierung der SNX9-LC-Domäne entlässt Aldolase. Der Komplex aus SNX9 und Dynamin lokalisiert an die Plasmamembran. Dabei binden die SNX9-PX- und BAR-Domänen direkt die Membran, während die SNX9-LC-Domäne mit Komponenten des *Clathrin Coat* interagiert (aus: Lundmark and Carlsson, 2004).

Es ist gut vorstellbar, dass unter endogenen Bedingungen ein Teil des Dynamins an SNX9/18/33 gebunden ist und SNX9/18/33 die Membranassoziiierung und Funktion von diesem Anteil des Gesamt-Dynamins reguliert. Die Expression von SNX9/18/33 könnte dieses Gleichgewicht verschieben. Überexprimiertes SNX9/18/33 bindet und inaktiviert einen Großteil des zellulären Dynamins und inaktiviert die Dynamin-abhängige Endozytose in der Zelle. Als Folge ist die Aufnahme von APP und Transferrin verzögert (Abb.36, C.2.8).

Die Expression von SNX9/18/33 hemmt die generelle Dynamin-vermittelte Endozytose und beeinflusst dadurch die Spaltung von APP. Warum verändert die Expression von SNX9 und SNX33 dann nicht auch die Spaltung von TNFR2 und L-Selektin (Abb. 32)? Wahrscheinlich ist die APP-Spaltung besonders sensitiv für eine veränderte Endozytoserate, da sie unter endogenen Bedingungen noch nicht gesättigt ist. Die Hemmung der APP-Endozytose resultieren deswegen in einer starken Zunahme der APP-Ektodomänensekretion. Die Ektodomänenspaltung von TNFR2 und L-Selektin scheint hingegen weniger stark durch eine Inhibition der Dynamin-abhängigen Endozytose beeinflusst zu werden. So hatte zum Beispiel die Expression einer dominant-negativen Dynamin-Mutante keinen Einfluss auf die Ektodomänenspaltung von TNFR2 und L-Selektin (Abb. 32). Inwieweit die Internalisierung von TNFR2 und L-Selektin unter SNX9/18/33-Expression tatsächlich verzögert ist, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Eine weitere Bestätigung der generellen Endozytoseinhibition durch SNX9/18/33-Expression kommt von in vivo Studien mit dem Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). In Kooperation mit Dr. Maren Hertwig von der Universität Freiburg wurde der Effekt der SNX9/18/33-Expression in *C.elegans* untersucht. *C.elegans* besitzt im Gegensatz zum Menschen nur ein Mitglied der SNX9/18/33-Untergruppe, das *Lst-4* genannt wird (Yoo et al., 2004). Die Aminosäuresequenz von *Lst-4* ähnelt zu 48% der SNX33-Sequenz. Expression von *Lst-4* in *C.elegans* resultierte, vergleichbar mit der SNX9/18/33-Expression in humanen Zellen, in einem Dynamin-*loss of function*-Phänotyp (Schobel et al., Manuskript eingereicht). Damit konnte eine Störung der Dynamin-Funktion durch Expression der SNX9/18/33/*Lst-4*-Untergruppe auch in dem Modellorganismus *C.elegans* bestätigt werden.

In dieser Arbeit konnte also eine Inhibition der APP-Endozytose durch exogen exprimiertes SNX9, SNX18 oder SNX33 nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eine Interaktion und Kollokalisierung von exogen exprimiertem SNX9 und SNX33 mit exogen exprimiertem Dynamin gezeigt. Damit konnte der molekulare Mechanismus der APP-Spaltungstimulation bei SNX9/18/33 Expression erklärt werden. Aus diesen Experimenten lässt sich aber nicht die Funktion von endogenem SNX33, SNX18 oder SNX9 ableiten. Um herauszufinden, ob auch endogenes SNX9/18/33 die Funktion von Dynamin reguliert, muss in Zukunft die APP-Spaltung und Endozytose unter SNX9/18/33-triple *knock down*-Bedingungen untersucht werden. Bereits beschriebene Studien an SNX9 sprechen für eine physiologisch relevante Funktion der SNX9/18/33-Untergruppe bei der Dynamin-abhängigen Endozytose. So inhibierte der siRNA-vermittelte-*knock down* von SNX9 die Membranassoziiierung von Dynamin (Lundmark and Carlsson, 2004) und verzögerte die Transferrinaufnahme (Soulet et

al., 2005). Außerdem konnte in Fluoreszenzexperimenten eine gleichzeitige Rekrutierung von SNX9 und Dynamin an *Clathrin Coated Vesicles* kurz vor der Abschnürung des Vesikels beobachtet werden (Soulet et al., 2005; Yarar et al., 2007). Auch die übereinstimmende Lokalisierung von SNX9 mit Komponenten des *Clathrin Coat* (Abb. 38; Lundmark and Carlsson, 2003) weist auf eine Rolle des endogenen SNX9 bei der Clathrin-abhängigen Endozytose hin. Da SNX9 über die SH3-Domäne mit Dynamin interagiert und über die LC-Domäne Komponenten des *Clathrin Coat* bindet, wird postuliert, dass SNX9 Dynamin an den *Clathrin Coated Vesicle* dirigiert (Lundmark and Carlsson, 2004). Die Membranassoziiierung von SNX9 soll in diesem Modell durch die PX- und BAR-Domänen vermittelt werden. Da SNX9 auch über die BAR-Domäne dimerisieren kann, ist eine Interaktion der SNX9-Dimere mit verschiedenen SH3-Domänen-enthaltenden Proteinen möglich. So soll SNX9 einerseits Dynamin an den *Clathrin Coated Vesicle* dirigieren und andererseits mit Aktin-bindenden Proteinen interagieren (Worby et al., 2001). SNX9 könnte in dieser Rolle die Dynamin-vermittelte Abschnürung des *Clathrin Coated Vesicle* mit der Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts synchronisieren (Lundmark and Carlsson, 2004; Abb.49).

Die Kolokalisierung von membranassoziiertem SNX33 mit den Proteinen des *Clathrin Coats* konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden (Abb.38). Da bekannt ist, dass SNX9 über das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP) an Aktin bindet (Shin et al., 2007; Worby et al., 2001; Yarar et al., 2007), könnte es sich bei den SNX33-positiven Strukturen um Komponenten des Zytoskeletts handeln, die hier nicht näher untersucht wurden. Wahrscheinlich ist außerdem, dass überexprimiertes SNX33 Strukturen in der Zelle ausbildet, die unter physiologischen Bedingungen nicht in diesem Umfang vorkommen und deswegen keiner typischen Zellorganellfärbung entsprechen. Vergleichbare Strukturen wurden auch bei der Expression der SNX9-PX-BAR-Domäne beschrieben und sind höchstwahrscheinlich auf die membran-tubulierende Eigenschaft der PX-BAR-Domäne dieser SNX-Untergruppe zurückzuführen (Pylypenko et al., 2007). Die Beschreibung der physiologisch relevanten SNX33-Lokalisierung müsste deswegen mit Hilfe von noch zu entwickelnden Antikörpern erfolgen, die endogenes SNX33 detektieren.

Während bisher nur die Funktion von SNX9 untersucht wurde, deuten die Ergebnisse dieser Doktorarbeit erstmals auch auf eine Funktion von SNX18 und SNX33 bei der Dynamin-abhängigen Endozytose. In Expressionsstudien konnte gezeigt werden, dass sich SNX9, SNX18 und SNX33 gleich bezüglich der Bindung von Dynamin und der Endozytose und Spaltung von APP verhalten. Des Weiteren wurde die Expression einer neuen SNX18-Sequenz nachgewiesen, die laut Aminosäurevergleich eine größere Homologie zu der

SNX9/18/33-Untergruppe als die bereits publizierte SNX18-Sequenz aufweist. Die zelluläre Lokalisierung und die Funktionsabklärung von endogenem SNX18 und SNX33 sind Gegenstand zukünftiger Forschung in unserer Arbeitsgruppe.

#### **4. Die Rolle der Endozytose für die Alzheimer-Krankheit**

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit validieren die Endozytose von APP als den zentralen regulatorischen Schritt für die Ektodomänenspaltung von APP. Da die Ektodomänenspaltung von APP darüber entscheidet, wie viel des Gesamt-APPs in dem anti-amyloidogenen, ADAM-Proteasen-vermittelten Prozessierungsweg, und wie viel APP dem amyloidogenen, A $\beta$ -bildenden Prozessierungsweg umgesetzt wird, bestimmt die Endozytoserate von APP auch wieviel A $\beta$  gebildet wird. (siehe Abb. 41 und Abb. 43). Bisher ist nur sehr wenig über die Regulation der APP-Ektodomänenspaltung bekannt. Das Ziel dieser Doktorarbeit und des, in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten, APP-Spaltungsscreens war es, die Regulation der APP-Ektodomänenspaltung genauer zu verstehen. Dabei schien es zuerst erstaunlich, warum in dem APP-Spaltungsscreen keine direkten Modulatoren der Sekretasen gefunden wurden, sondern vor allem Endozytose-relevante Proteine die APP-Spaltung stimulierten. Eine Erklärung für diesen Befund ist sicherlich, dass sowohl die ADAM-Proteasen als auch die  $\gamma$ -Sekretase eine breite Substratspezifität aufweisen (Haass and Steiner, 2002; Seals and Courtneidge, 2003) und aus diesem Grund die Aktivität dieser Proteasen nicht gleichzeitig reguliert werden kann. So würde eine direkte Regulation der ADAM- oder  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität die Prozessierung vieler Transmembranproteine betreffen und ganz unterschiedliche Funktionen in der Zelle beeinflussen. Daher erscheint es sinnvoll, dass die Regulation der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung auf der Ebene der einzelnen Substrate erfolgt. Dies könnte in erster Linie, wie zum Beispiel bei TNF $\alpha$ , durch die geregelte Expression der Substrate gewährleistet werden. Wie die Daten dieser Arbeit belegen bietet sich im Falle von APP mit dem Vorgang der APP-Endozytose ein zweiter Regulationsmechanismus an. Da die  $\alpha$ -Sekretase-Prozessierung von APP an der Plasmamembran stattfindet und der  $\beta$ - Sekretase-Schnitt in den endosomalen Kompartimenten, trennt die Endozytose von APP den  $\alpha$ -Sekretase-Weg von dem  $\beta$ -Sekretase-Weg ab. Aus diesem Grund reagiert die Ektodomänenspaltung von APP sehr sensitiv auf veränderte Endozytoseraten von APP. So führt die Hemmung der APP-Endozytose zu einer Zunahme der  $\alpha$ -Sekretase-Spaltung und eine längere Verweildauer von APP in endosomalen Kompartimenten zu einer Zunahme der A $\beta$ -Bildung (Ehehalt et al., 2003; Grbovic et al., 2003). Die molekularen Vorgänge der Clathrin-abhängigen Endozytose

spielen aber nicht nur eine wichtige Rolle für die Ektodomänenspaltung von APP, sondern sie beeinflussen auch maßgeblich die Bildung und Aggregation von A $\beta$ . Man geht heute davon aus, dass der  $\gamma$ -Sekretase-Schnitt an der Plasmamembran und in den endosomalen und lysosomalen Kompartimenten stattfindet (Kaether et al., 2006a; Pasternak et al., 2004). So akkumulieren in Presinilin-defizienten Zellen die APP-C-terminalen Fragmente C99 und C83 in Lysosomen (Chen et al., 2000). Da A $\beta$ -Peptide in saurem pH schneller aggregieren (Gorman et al., 2003; Su and Chang, 2001), ist endosomal gebildetes A $\beta$  besonders schädlich. Es ist daher gut möglich, dass extrazelluläre A $\beta$ -Ablagerungen intrazellulärer Herkunft sind. Lysosomale A $\beta$ -Aggregate könnten die Membran der Lysosomen beschädigen und zum Austreten von lysosomalen Hydrolasen ins Zytosol, sowie zum Absterben der Zelle führen. Die ursprünglich intrazellulären A $\beta$ -Aggregate blieben bestehen und lagerten sich extrazellulär ab (Nixon et al., 2001; Pasternak et al., 2004). Tatsächlich wurde in einer Vielzahl von Zellkulturmodellen die intrazelluläre Akkumulation von A $\beta$  beobachtet (Lee et al., 1998; Turner et al., 1996; Walsh et al., 2000). Auch in Gehirnschnitten von Alzheimerpatienten (D'Andrea et al., 2001; Gouras et al., 2000) und in APP-transgenen Mäusen (Shie et al., 2003; Wirths et al., 2001) lassen sich intrazelluläre A $\beta$ -Aggregate vor der Bildung von extrazellulären Plaques nachweisen. Die Rolle des endosomalen Systems bei der Alzheimer-Demenz wird darüber hinaus betont durch das sehr frühe Auftreten von endosomalen Veränderungen zu Beginn dieser Krankheit. So lassen sich im Gehirn von Alzheimerpatienten vergrößerte Endosomen nachweisen, die mit lysosomalen Hydrolasen angefüllt sind. In späteren Stadien der Alzheimererkrankung füllen diese Lysosomen die gesamten neuronalen Zellkörper aus (Cataldo et al., 1997; Cataldo et al., 1994; Cataldo et al., 2000).

Diese Beispiele belegen die Bedeutung der Endozytose und des endosomalen Systems für die Alzheimererkrankung. Für das Verständnis dieser Krankheit ist es daher essentiell die molekularen Vorgänge bei der Endozytose von APP aufzuklären. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten diesem Thema zwei neue Aspekte hinzugefügt werden. Erstens wurde gezeigt, dass die APP-Homologen miteinander um Endozytose-relevante Proteine konkurrieren. Die differentielle Expression der unterschiedlichen APP-Homologen bietet damit einen potentiellen, neuartigen Regulationsmechanismus der APP-Spaltung an. Und zweitens wurde die SNX9/18/33-Untergruppe als zellbiologisch wichtiger Regulator der Dynamamin-vermittelten Endozytose von APP identifiziert.

## F. Zusammenfassung

Der endosomale Transport von APP spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Alzheimer-Demenz. So gehören endosomale Veränderungen zu den frühesten neuropathologischen Kennzeichen der Alzheimer-Erkrankung (Nixon et al., 2001) und eine veränderte Expression des endosomalen Sortierrezeptors SORL1 ist mit einem erhöhten Risiko, an sporadischer Alzheimer-Demenz zu erkranken, assoziiert (Rogaeva et al., 2007). Eine genaue Analyse des intrazellulären APP-Transports und dessen Einfluss auf die proteolytische Spaltung von APP ist aus diesem Grund für das Verständnis der Alzheimer-Demenz unerlässlich und dient auch dem Zweck, mögliche Risikofaktoren der Alzheimer-Erkrankung aufzuzeigen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Bedeutung der APP-Endozytose für die proteolytische Spaltung von APP untersucht und mit APLP1 und der SNX9/18/33-Untergruppe zwei neuartige Modulatoren der APP-Endozytose identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass APLP1 spezifisch die APP-Endozytose beeinflusst, wohingegen die SNX9/18/33-Untergruppe einen generellen Effekt auf Dynamin-abhängige Endozytosevorgänge in der Zelle ausübt. Als Folge stimulierten sowohl die Expression von APLP1 als auch die Expression der SNX9/18/33-Untergruppe die Sekretion von sAPP $\alpha$ . Auf die Spaltung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase haben APLP1 und die SNX9/18/33-Untergruppe hingegen unterschiedlichen Einfluss. So führt die Expression von APLP1 zu einer Abnahme von sAPP $\beta$ , während die Expression der SNX9/18/33 Untergruppe die sAPP $\beta$ -Sekretion nicht verändert.

Auch der molekulare Mechanismus des APLP1- und SNX9/18/33-vermittelten Effekts auf die APP-Endozytose wurde identifiziert. So konkurriert APLP1 mit APP um die Bindung an die Endozytose-relevanten Proteine Fe65 und LRP. Die Expression von APLP1 verlangsamt deswegen die Endozytose von APP, als Folge akkumuliert APP an der Plasmamembran und wird vermehrt von  $\alpha$ -Sekretasen und weniger durch die  $\beta$ -Sekretase geschnitten. Es konnte gezeigt werden, dass APLP1 über das erweiterte Internalisierungsmotiv GYENPTY an Fe65 bindet, wobei der erste Tyrosinrest (Tyr638) innerhalb dieses Motivs kritisch sowohl für die Bindung von APLP1 an FE65, als auch für die APLP1-vermittelte Spaltungszunahme von APP ist. Im Gegensatz zu APLP1 haben andere NPXY-Motiv-enthaltende Oberflächenrezeptoren wie der IR und der EGFR, denen der Tyrosinrest des erweiterten GYENPTY-Motivs fehlt, keinen Einfluss auf die Ektodomänenprozessierung von APP. Konsistent mit einem über Fe65- und LRP-vermittelten Effekt, stimuliert APLP1 die Ektodomänen-spaltung von APP nur in Gegenwart von LRP. Damit beschreiben wir einen

vollkommen neuen Mechanismus, wie die Spaltung von APP reguliert werden könnte. Denn durch die differentielle Expression eines APP-Familienmitglieds könnte die Spaltung der jeweils anderen APP-Homologen wirksam beeinflusst werden.

Die Expression der SNX9/18/33-Untergruppe inhibierte hingegen die Endozytose mehrerer Oberflächenrezeptoren wie APP und dem Transferrinrezeptor und führte zu einer Zunahme an Plasmamembran-lokalisiertem APP und als Folge dessen zu einer gesteigerten  $\alpha$ -Sekretase-Prozessierung von APP. Weniger Homologe SNXe wie SNX1 und SNX17 haben hingegen keinen Einfluss auf die Spaltung von APP. Da SNX9/18/33 an Dynamin in Abhängigkeit der SH3-Domäne bindet und mit Dynamin in der Zelle kolokalisiert, postulieren wir in Übereinstimmung mit vorangegangenen Publikationen (Lundmark et al., 2004, Soulet et al., 2005), dass SNX9/18/33 unter physiologischen Bedingungen nur an einen Teil des zellulären Dynamins bindet und diesen Teil inaktiviert. Die Expression von SNX9/18/33 hingegen könnte dieses Gleichgewicht verschieben und zu einem Funktionsverlust des gesamten Dynamins führen.

Die Hemmung der APP-Endozytose resultiert in den hier untersuchten Systemen zu einer veränderten Spaltung von APP durch die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit unterstreichen damit die modulatorische Rolle der Endozytose für die Ektodomänenspaltung von APP. Des Weiteren kann das vor kurzem postulierte Modell, in dem APP in einem Komplex mit Fe65 und LRP endozytiert wird (Piertzik et al., 2004), bestätigt und ein neuer Regulationsmechanismus der APP-Endozytose in diesem Komplex durch die APP-Homologen vorgeschlagen werden. Schließlich wird die SNX9/18/33-Untergruppe als eine wichtige zellbiologische Komponente der Dynamin-abhängigen Endozytose identifiziert.

## G. Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer-Demenz ( <i>Alzheimer's Disease</i> )
APP <sub>x</sub>	Amyloid $\beta$ Vorläuferprotein, x bezeichnet die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Isoform ( <i>Amyloid <math>\beta</math> Precursor Protein</i> )
ADAM	Disintegrinmetalloprotease ( <i>A Disintegrin And Metalloprotease</i> )
AICD	Intrazelluläre Domäne des APPs ( <i>APP Intracellular Domain</i> )
AK	Antikörper
Amp	Ampizillin
AP	Alkalische Phosphatase
AP2	Adapterprotein Komplex 2
APLP	APP-ähnliches Protein ( <i>Amyloid Precursor-Like Protein</i> )
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARf	<i>ADP-ribosylation factor</i>
AS	Aminosäure
A $\beta$ <sub>x</sub>	Amyloid- $\beta$ -Peptid x bezeichnet die Anzahl der Aminosäuren des Amyloid- $\beta$ -Peptids
ATP	Adenosyltriphosphat
ATTC	Amerikanische Zellkulturkollektion ( <i>American Tissue Culture Collection</i> )
BACE	<i>Beta-site APP Cleaving Enzyme</i>
BAR	Bin/Amphiphysin/RVS-Domäne
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchonic Acid Assay
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
C89	C-terminales $\beta$ APP-Fragment (89 Aminosäuren) entstanden durch $\alpha$ -Sekretase-Spaltung
C99	C-terminales $\beta$ APP-Fragment (99 Aminosäuren) entstanden durch $\beta$ -Sekretase-Spaltung
CCV	<i>Calthrin Coated Vesikel</i>
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
<i>C.e.</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
CTF	APP C-terminales Fragment
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DAPT	<i>N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester</i>
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothieitol
Dyn	Dynamin 1
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	<i>Early endosomal Antigen 1</i>
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EGF	Chemolumineszenz zur Detektion HRP-konjugierter Sekundärantikörper <i>epidermal growth factor</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	erbliche Form der Alzheimer Krankheit ( <i>Familial Alzheimer's Disease</i> )
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>Fetal calf serum</i> )
g	Gramm
GED	GTPase-Effektordomäne
GGA1	<i>Golgi-localized <math>\gamma</math>-ear-containing ARF-binding protein</i>
GTP	Guanidyltriphosphat
h	Stunde ( <i>hour</i> )
HEK	Humane embryonale Nierenzelllinie ( <i>Human Embryonic Kidney</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
ICD	Intrazelluläre Domäne ( <i>Intracellular Domain</i> )
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid
IR	Insulinrezeptor
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny Broth Nährlösung zur Anzucht von Bakterien
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LRP	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>
min	Minute
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
mM	Millimolar
mm	Millimeter
ml	Milliliter
MGC	<i>Mammalian Gene Collection</i>
mRNA	<i>messenger-Ribonucleicacid</i>
$\mu$ g	Microgramm
$\mu$ l	Microliter
NCT	Nicastrin
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
ORF	<i>open reading frame</i>
p3	Spaltprodukt des $\beta$ APP nach $\alpha$ - und $\gamma$ -Sekretase Spaltung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	ProteinA Sepharose
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	PBS mit Tween 20 angereichert
PCM	PBS mit $Mg^{2+}$ und $Ca^{+}$ angereichert
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
Pen2	<i>Presenilin Enhancer 2</i>
PGS	ProteinG Sepharose
Phox	phagozytotischer NADPH-Oxidase Komplex
pI	Proteaseinhibitor

PI	Phosphatidyl-Inositol
pH	pondus Hydrogenii
PH	Pleckstrinhomologe
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Azetat
pNPP	para-Nitrophenyl-Phosphat
PRD	Prolinreiche Domäne
PS	Presenilin
PS-CTF	C-terminales Fragment des Presenilins
PS-NTF	N-terminales Fragment des Presenilins
PSGL1	P-Selektin-Glykoprotein Ligand-I
PTB	Phosphotyrosin-bindend
PtdInsP	Phosphatidyl-Inositolphosphat
PVDF	Polyvinylidenedifluorid
PX	Phox-Homologie-Domäne
RA	Ras-assoziierte Domäne
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleicacid</i> )
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SAP	Alkalische Phosphatase aus Krabben ( <i>shrimp alkaline Phosphatase</i> )
sAPP $\alpha$	lösliches APP entstanden durch $\alpha$ -Sekretase-Spaltung
sAPP $\beta$	lösliches APP entstanden durch $\beta$ -Sekretase-Spaltung
sAPP $\beta'$	lösliches APP entstanden durch $\beta'$ (Glu11)-Spaltung
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodiumdodecylsulfate</i> )
SEAP	sekretorische Alkalische Phosphatase
sec	Sekunde
SH3	Src Homologie 3 Domäne
SH2	Src Homologie 2 Domäne
SNX	Sorting Nexin
TACE	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math> Convertase</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tfn	Transferrin
TfnR	Transferrinrezeptor
TGF $\alpha$	<i>Transforming Growth Factor <math>\alpha</math></i>
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TNFR2	<i>Tumor Necrosis factor receptor 2</i>
Tris	Tris-(Hydroxy-Methyl)-Aminomethan
TTP	Thiamintrisphosphate
U	Einheiten ( <i>units</i> )
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	nicht-translatierte Region (untranslated region)
UV	Ultraviolett
V	Volt
vps5p	<i>vacuolar protein-sorting 5 protein</i>
v/v	Volumen pro Volumen ( <i>volume / volume</i> )
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WB	Western Blot

## Abkürzungsverzeichnis

---

Wt                      Wildtyp-Form eines Proteins  
w/v                      Gewicht pro Volumen (*weight / volume*)  
Ø                         Durchmesser

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

## H. Literaturverzeichnis

Adlerz, L., Beckman, M., Holback, S., Tehranian, R., Cortes Toro, V., and Iverfeldt, K. (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, 62-72.

Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74, 342-352.

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatric und Psychisch-Gerichtl Med* 64, 146-148.

Andersen, O. M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., von Arnim, C. A., Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu, X., *et al.* (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13461-13466.

Andersen, O. M., Schmidt, V., Spoelgen, R., Gliemann, J., Behlke, J., Galatis, D., McKinstry, W. J., Parker, M. W., Masters, C. L., Hyman, B. T., *et al.* (2006). Molecular dissection of the interaction between amyloid precursor protein and its neuronal trafficking receptor SorLA/LR11. *Biochemistry* 45, 2618-2628.

Blennow, K., de Leon, M. J., and Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* 368, 387-403.

Boll, W., Rapoport, I., Brunner, C., Modis, Y., Prehn, S., and Kirchhausen, T. (2002). The mu2 subunit of the clathrin adaptor AP-2 binds to FDNPVY and YppO sorting signals at distinct sites. *Traffic* 3, 590-600.

Bonifacino, J. S., and Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72, 395-447.

Borg, J. P., Ooi, J., Levy, E., and Margolis, B. (1996). The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol Cell Biol* 16, 6229-6241.

Borg, J. P., Yang, Y., De Taddeo-Borg, M., Margolis, B., and Turner, R. S. (1998). The X11alpha protein slows cellular amyloid precursor protein processing and reduces Abeta40 and Abeta42 secretion. *J Biol Chem* 273, 14761-14766.

Braak, H., Braak, E., Bohl, J., and Reintjes, R. (1996). Age, neurofibrillary changes, A beta-amyloid and the onset of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 210, 87-90.

Bravo, J., Karathanassis, D., Pacold, C. M., Pacold, M. E., Ellson, C. D., Anderson, K. E., Butler, P. J., Lavenir, I., Perisic, O., Hawkins, P. T., *et al.* (2001). The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Mol Cell* 8, 829-839.

Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C., and Wakeham, D. E. (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 517-568.

- Burden, J. J., Sun, X. M., Garcia, A. B., and Soutar, A. K. (2004). Sorting motifs in the intracellular domain of the low density lipoprotein receptor interact with a novel domain of sorting nexin-17. *J Biol Chem* 279, 16237-16245.
- Busciglio, J., Gabuzda, D. H., Matsudaira, P., and Yankner, B. A. (1993). Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2092-2096.
- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., and Black, R. A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273, 27765-27767.
- Cam, J. A., Zerbinatti, C. V., Knisely, J. M., Hecimovic, S., Li, Y., and Bu, G. (2004). The low density lipoprotein receptor-related protein 1B retains beta-amyloid precursor protein at the cell surface and reduces amyloid-beta peptide production. *J Biol Chem* 279, 29639-29646.
- Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D. J., and Haass, C. (1998). The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. *J Biol Chem* 273, 3205-3211.
- Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2000). Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J Biol Chem* 275, 30849-30854.
- Carey, R. M., Balcz, B. A., Lopez-Coviella, I., and Slack, B. E. (2005). Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC Cell Biol* 6, 30.
- Carlton, J., Bujny, M., Rutherford, A., and Cullen, P. (2005). Sorting nexins--unifying trends and new perspectives. *Traffic* 6, 75-82.
- Cataldo, A. M., Barnett, J. L., Pieroni, C., and Nixon, R. A. (1997). Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *J Neurosci* 17, 6142-6151.
- Cataldo, A. M., Hamilton, D. J., and Nixon, R. A. (1994). Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in Alzheimer disease. *Brain Res* 640, 68-80.
- Cataldo, A. M., Peterhoff, C. M., Troncoso, J. C., Gomez-Isla, T., Hyman, B. T., and Nixon, R. A. (2000). Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am J Pathol* 157, 277-286.
- Chen, F., Yang, D. S., Petanceska, S., Yang, A., Tandon, A., Yu, G., Rozmahel, R., Ghiso, J., Nishimura, M., Zhang, D. M., *et al.* (2000). Carboxyl-terminal fragments of Alzheimer beta-amyloid precursor protein accumulate in restricted and unpredicted intracellular compartments in presenilin 1-deficient cells. *J Biol Chem* 275, 36794-36802.

Chyung, J. H., Raper, D. M., and Selkoe, D. J. (2005). Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J Biol Chem* 280, 4383-4392.

Chyung, J. H., and Selkoe, D. J. (2003). Inhibition of receptor-mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid beta-protein at the cell surface. *J Biol Chem* 278, 51035-51043.

Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D. J. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-674.

Citron, M., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1995). Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* 14, 661-670.

Cozier, G. E., Carlton, J., McGregor, A. H., Gleeson, P. A., Teasdale, R. D., Mellor, H., and Cullen, P. J. (2002). The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J Biol Chem* 277, 48730-48736.

D'Andrea, M. R., Nagele, R. G., Wang, H. Y., Peterson, P. A., and Lee, D. H. (2001). Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Histopathology* 38, 120-134.

Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E., and Schmid, S. L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* 127, 915-934.

De Pietri Tonelli, D., Mihailovich, M., Di Cesare, A., Codazzi, F., Grohovaz, F., and Zacchetti, D. (2004). Translational regulation of BACE-1 expression in neuronal and non-neuronal cells. *Nucleic Acids Res* 32, 1808-1817.

Dovey, H. F., John, V., Anderson, J. P., Chen, L. Z., de Saint Andrieu, P., Fang, L. Y., Freedman, S. B., Folmer, B., Goldbach, E., Holsztynska, E. J., *et al.* (2001). Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem* 76, 173-181.

Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5, 486-488.

Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C. L., Weidemann, A., and Beyreuther, K. (2004). The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J Biol Chem* 279, 18146-18156.

Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., and Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160, 113-123.

- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P. J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.
- Esler, W. P., and Wolfe, M. S. (2001). A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces. *Science* 293, 1449-1454.
- Fan, H., and Derynck, R. (1999). Ectodomain shedding of TGF-alpha and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades. *Embo J* 18, 6962-6972.
- Fassbender, K., Masters, C., and Beyreuther, K. (2001). Alzheimer's disease: molecular concepts and therapeutic targets. *Naturwissenschaften* 88, 261-267.
- Felsenstein, K. M., Ingalls, K. M., Hunihan, L. W., and Roberts, S. B. (1994). Reversal of the Swedish familial Alzheimer's disease mutant phenotype in cultured cells treated with phorbol 12,13-dibutyrate. *Neurosci Lett* 174, 173-176.
- Fortini, M. E. (2002). Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 673-684.
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M. C., *et al.* (2002). *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 3, 85-97.
- Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (2000). Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim Biophys Acta* 1502, 122-132.
- Furukawa, K., Sopher, B. L., Rydel, R. E., Begley, J. G., Pham, D. G., Martin, G. M., Fox, M., and Mattson, M. P. (1996). Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67, 1882-1896.
- Giaccone, G., Tagliavini, F., Linoli, G., Bouras, C., Frigerio, L., Frangione, B., and Bugiani, O. (1989). Down patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neurosci Lett* 97, 232-238.
- Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885-890.
- Golde, T. E., Estus, S., Younkin, L. H., Selkoe, D. J., and Younkin, S. G. (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* 255, 728-730.
- Goldgaber, D., Lerman, M. I., McBride, O. W., Saffiotti, U., and Gajdusek, D. C. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235, 877-880.

Gorman, P. M., Yip, C. M., Fraser, P. E., and Chakrabartty, A. (2003). Alternate aggregation pathways of the Alzheimer beta-amyloid peptide: Abeta association kinetics at endosomal pH. *J Mol Biol* 325, 743-757.

Gouras, G. K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J. P., Haroutunian, V., Buxbaum, J. D., Xu, H., *et al.* (2000). Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* 156, 15-20.

Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V. A., and Priess, J. R. (2002). APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 775-779.

Gray, A., Van Der Kaay, J., and Downes, C. P. (1999). The pleckstrin homology domains of protein kinase B and GRP1 (general receptor for phosphoinositides-1) are sensitive and selective probes for the cellular detection of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and/or phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in vivo. *Biochem J* 344 Pt 3, 929-936.

Grbovic, O. M., Mathews, P. M., Jiang, Y., Schmidt, S. D., Dinakar, R., Summers-Terio, N. B., Ceresa, B. P., Nixon, R. A., and Cataldo, A. M. (2003). Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Abeta production. *J Biol Chem* 278, 31261-31268.

Grilli, M., Ribola, M., Alberici, A., Valerio, A., Memo, M., and Spano, P. (1995). Identification and characterization of a kappa B/Rel binding site in the regulatory region of the amyloid precursor protein gene. *J Biol Chem* 270, 26774-26777.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S., and Wisniewski, H. M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261, 6084-6089.

Guenette, S. Y., Chen, J., Ferland, A., Haass, C., Capell, A., and Tanzi, R. E. (1999). hFE65L influences amyloid precursor protein maturation and secretion. *J Neurochem* 73, 985-993.

Haass, C., Capell, A., Citron, M., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1995a). The vacuolar H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 differentially affects proteolytic processing of mutant and wild-type beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 270, 6186-6192.

Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268, 3021-3024.

Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., and Selkoe, D. J. (1995b). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* 1, 1291-1296.

Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B., and *et al.* (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-325.

Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101-112.

- Haass, C., and Steiner, H. (2002). Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol* 12, 556-562.
- Haft, C. R., de la Luz Sierra, M., Bafford, R., Lesniak, M. A., Barr, V. A., and Taylor, S. I. (2000). Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. *Mol Biol Cell* 11, 4105-4116.
- Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
- Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.
- He, X., Chang, W. P., Koelsch, G., and Tang, J. (2002). Memapsin 2 (beta-secretase) cytosolic domain binds to the VHS domains of GGA1 and GGA2: implications on the endocytosis mechanism of memapsin 2. *FEBS Lett* 524, 183-187.
- He, X., Li, F., Chang, W. P., and Tang, J. (2005). GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE). *J Biol Chem* 280, 11696-11703.
- Henricson, A., Kall, L., and Sonnhammer, E. L. (2005). A novel transmembrane topology of presenilin based on reconciling experimental and computational evidence. *Febs J* 272, 2727-2733.
- Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretschmar, H., Sisodia, S., and Muller, U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *Embo J* 23, 4106-4115.
- Herreman, A., Van Gassen, G., Bentahir, M., Nyabi, O., Craessaerts, K., Mueller, U., Annaert, W., and De Strooper, B. (2003). gamma-Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation. *J Cell Sci* 116, 1127-1136.
- Herz, J., and Strickland, D. K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 108, 779-784.
- Hill, K., Li, Y., Bennett, M., McKay, M., Zhu, X., Shern, J., Torre, E., Lah, J. J., Levey, A. I., and Kahn, R. A. (2003). Munc18 interacting proteins: ADP-ribosylation factor-dependent coat proteins that regulate the traffic of beta-Alzheimer's precursor protein. *J Biol Chem* 278, 36032-36040.
- Hinshaw, J. E., and Schmid, S. L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374, 190-192.
- Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J. R., Tracy, J., Signorell, A., Muller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., *et al.* (2003). Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* 38, 547-554.
- Howard, L., Nelson, K. K., Maciewicz, R. A., and Blobel, C. P. (1999). Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J Biol Chem* 274, 31693-31699.

- Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B., Trapp, B. D., and Yan, R. (2006). Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* 9, 1520-1525.
- Hung, A. Y., Haass, C., Nitsch, R. M., Qiu, W. Q., Citron, M., Wurtman, R. J., Growdon, J. H., and Selkoe, D. J. (1993). Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J Biol Chem* 268, 22959-22962.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., Gloger, I. S., Murphy, K. E., Southan, C. D., Ryan, D. M., *et al.* (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14, 419-427.
- Jacobsen, J. S., Spruyt, M. A., Brown, A. M., Sahasrabudhe, S. R., Blume, A. J., Vitek, M. P., Muenkel, H. A., and Sonnenberg-Reines, J. (1994). The release of Alzheimer's disease beta amyloid peptide is reduced by phorbol treatment. *J Biol Chem* 269, 8376-8382.
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., and Lansbury, P. T., Jr. (1993). The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 695, 144-148.
- Kaether, C., Haass, C., and Steiner, H. (2006a). Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener Dis* 3, 275-283.
- Kaether, C., Schmitt, S., Willem, M., and Haass, C. (2006b). Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated after transport of their precursors to the cell surface. *Traffic* 7, 408-415.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925-937.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Kibbey, R. G., Rizo, J., Gierasch, L. M., and Anderson, R. G. (1998). The LDL receptor clustering motif interacts with the clathrin terminal domain in a reverse turn conformation. *J Cell Biol* 142, 59-67.
- King, G. D., Perez, R. G., Steinhilb, M. L., Gaut, J. R., and Turner, R. S. (2003). X11alpha modulates secretory and endocytic trafficking and metabolism of amyloid precursor protein: mutational analysis of the YENPTY sequence. *Neuroscience* 120, 143-154.
- Kinoshita, A., Whelan, C. M., Smith, C. J., Mikhailenko, I., Rebeck, G. W., Strickland, D. K., and Hyman, B. T. (2001). Demonstration by fluorescence resonance energy transfer of two sites of interaction between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein: role of the intracellular adapter protein Fe65. *J Neurosci* 21, 8354-8361.
- Kirchhausen, T. (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 705-732.
- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T. C., and Hashimoto, Y. (2001). Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is

- responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13554-13559.
- Knops, J., Lieberburg, I., and Sinha, S. (1992). Evidence for a nonsecretory, acidic degradation pathway for amyloid precursor protein in 293 cells. Identification of a novel, 22-kDa, beta-peptide-containing intermediate. *J Biol Chem* 267, 16022-16024.
- Koo, E. H., and Squazzo, S. L. (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 269, 17386-17389.
- Kopan, R., and Ilagan, M. X. (2004). Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 499-504.
- Kuhn, P. H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C., and Lichtenthaler, S. F. (2007). Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *J Biol Chem* 282, 11982-11995.
- Kummer, C., Wehner, S., Quast, T., Werner, S., and Herzog, V. (2002). Expression and potential function of beta-amyloid precursor proteins during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* 280, 222-232.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3922-3927.
- Lammich, S., Schobel, S., Zimmer, A. K., Lichtenthaler, S. F., and Haass, C. (2004). Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region. *EMBO Rep* 5, 620-625.
- Lansbury, P. T., Jr. (1997). Structural neurology: are seeds at the root of neuronal degeneration? *Neuron* 19, 1151-1154.
- Laudon, H., Hansson, E. M., Melen, K., Bergman, A., Farmery, M. R., Winblad, B., Lendahl, U., von Heijne, G., and Naslund, J. (2005). A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem* 280, 35352-35360.
- LaVoie, M. J., Fraering, P. C., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Kimberly, W. T., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J. (2003). Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem* 278, 37213-37222.
- Lee, S. J., Liyanage, U., Bickel, P. E., Xia, W., Lansbury, P. T., Jr., and Kosik, K. S. (1998). A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo. *Nat Med* 4, 730-734.
- Li, Y. M., Lai, M. T., Xu, M., Huang, Q., DiMuzio-Mower, J., Sardana, M. K., Shi, X. P., Yin, K. C., Shafer, J. A., and Gardell, S. J. (2000). Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6138-6143.
- Lichtenthaler, S. F., Dominguez, D. I., Westmeyer, G. G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., and Seed, B. (2003). The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem* 278, 48713-48719.

Lin, Q., Lo, C. G., Cerione, R. A., and Yang, W. (2002). The Cdc42 target ACK2 interacts with sorting nexin 9 (SH3PX1) to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J Biol Chem* 277, 10134-10138.

Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1456-1460.

Liu, K., Doms, R. W., and Lee, V. M. (2002). Glu11 site cleavage and N-terminally truncated A beta production upon BACE overexpression. *Biochemistry* 41, 3128-3136.

Lu, J., Garcia, J., Dulubova, I., Sudhof, T. C., and Rizo, J. (2002). Solution structure of the Vam7p PX domain. *Biochemistry* 41, 5956-5962.

Lundmark, R., and Carlsson, S. R. (2003). Sorting nexin 9 participates in clathrin-mediated endocytosis through interactions with the core components. *J Biol Chem* 278, 46772-46781.

Lundmark, R., and Carlsson, S. R. (2004). Regulated membrane recruitment of dynamin-2 mediated by sorting nexin 9. *J Biol Chem* 279, 42694-42702.

Luo, W. J., Wang, H., Li, H., Kim, B. S., Shah, S., Lee, H. J., Thinakaran, G., Kim, T. W., Yu, G., and Xu, H. (2003). PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem* 278, 7850-7854.

Masters, C. L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R. N., and Beyreuther, K. (1985). Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *Embo J* 4, 2757-2763.

McLaurin, J., Kierstead, M. E., Brown, M. E., Hawkes, C. A., Lambermon, M. H., Phinney, A. L., Darabie, A. A., Cousins, J. E., French, J. E., Lan, M. F., *et al.* (2006). Cyclohexanehexol inhibitors of A beta aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. *Nat Med* 12, 801-808.

Meziane, H., Dodart, J. C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M., and Ungerer, A. (1998). Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12683-12688.

Mishra, S. K., Keyel, P. A., Hawryluk, M. J., Agostinelli, N. R., Watkins, S. C., and Traub, L. M. (2002). Disabled-2 exhibits the properties of a cargo-selective endocytic clathrin adaptor. *Embo J* 21, 4915-4926.

Morris, H. R., Khan, M. N., Janssen, J. C., Brown, J. M., Perez-Tur, J., Baker, M., Ozansoy, M., Hardy, J., Hutton, M., Wood, N. W., *et al.* (2001). The genetic and pathological classification of familial frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 58, 1813-1816.

Müller, U., Steinbach, J., Aguzzi, A., Herms, J. T., Sisodia, S. S., Wolfer, D. P., and Lipp, H.-P. (1998). Single and combined gene deficiencies of APP/APLP1-family members. *Neurobiol Aging* 16, 1174.

- Neumann, S., Schobel, S., Jager, S., Trautwein, A., Haass, C., Pietrzik, C. U., and Lichtenthaler, S. F. (2006). Amyloid precursor-like protein 1 influences endocytosis and proteolytic processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 281, 7583-7594.
- Nicoll, J. A., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H., and Weller, R. O. (2003). Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 9, 448-452.
- Nitsch, R. M., Slack, B. E., Wurtman, R. J., and Growdon, J. H. (1992). Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258, 304-307.
- Nixon, R. A., Mathews, P. M., and Cataldo, A. M. (2001). The neuronal endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 3, 97-107.
- Oatey, P. B., Venkateswarlu, K., Williams, A. G., Fletcher, L. M., Foulstone, E. J., Cullen, P. J., and Tavare, J. M. (1999). Confocal imaging of the subcellular distribution of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in insulin- and PDGF-stimulated 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 344 Pt 2, 511-518.
- Offe, K., Dodson, S. E., Shoemaker, J. T., Fritz, J. J., Gearing, M., Levey, A. I., and Lah, J. J. (2006). The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *J Neurosci* 26, 1596-1603.
- Oh, Y. S., and Turner, R. J. (2005). Topology of the C-terminal fragment of human presenilin 1. *Biochemistry* 44, 11821-11828.
- Pasternak, S. H., Bagshaw, R. D., Guiral, M., Zhang, S., Ackerley, C. A., Pak, B. J., Callahan, J. W., and Mahuran, D. J. (2003). Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. *J Biol Chem* 278, 26687-26694.
- Pasternak, S. H., Callahan, J. W., and Mahuran, D. J. (2004). The role of the endosomal/lysosomal system in amyloid-beta production and the pathophysiology of Alzheimer's disease: reexamining the spatial paradox from a lysosomal perspective. *J Alzheimers Dis* 6, 53-65.
- Perez, R. G., Squazzo, S. L., and Koo, E. H. (1996). Enhanced release of amyloid beta-protein from codon 670/671 "Swedish" mutant beta-amyloid precursor protein occurs in both secretory and endocytic pathways. *J Biol Chem* 271, 9100-9107.
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R., and McMahon, H. T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303, 495-499.
- Pietrzik, C. U., Busse, T., Merriam, D. E., Weggen, S., and Koo, E. H. (2002). The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *Embo J* 21, 5691-5700.
- Pietrzik, C. U., Yoon, I. S., Jaeger, S., Busse, T., Weggen, S., and Koo, E. H. (2004). FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 24, 4259-4265.

Pike, C. J., Cummings, B. J., Monzavi, R., and Cotman, C. W. (1994). Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 63, 517-531.

Ponting, C. P. (1996). Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci* 5, 2353-2357.

Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H. A., and Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 26, 7212-7221.

Prokop, S., Haass, C., and Steiner, H. (2005). Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain determines its function in the stabilization of presenilin fragments. *J Neurochem* 94, 57-62.

Prokop, S., Shirotani, K., Edbauer, D., Haass, C., and Steiner, H. (2004). Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex. *J Biol Chem* 279, 23255-23261.

Pylypenko, O., Lundmark, R., Rasmuson, E., Carlsson, S. R., and Rak, A. (2007). The PX-BAR membrane-remodeling unit of sorting nexin 9. *Embo J* 26, 4788-4800.

Ren, Z., Schenk, D., Basi, G. S., and Shapiro, I. P. (2007). APP Juxtamembrane domain regulates specificity of gamma-secretase-dependent cleavages. *J Biol Chem*.

Ring, S., Weyer, S. W., Kilian, S. B., Waldron, E., Pietrzik, C. U., Filippov, M. A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C. B., Korte, M., *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, 7817-7826.

Robakis, N. K., Wisniewski, H. M., Jenkins, E. C., Devine-Gage, E. A., Houck, G. E., Yao, X. L., Ramakrishna, N., Wolfe, G., Silverman, W. P., and Brown, W. T. (1987). Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet* 1, 384-385.

Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J. H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C. T., Cheng, R., Hasegawa, H., *et al.* (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 39, 168-177.

Rogers, G. W., Jr., Edelman, G. M., and Mauro, V. P. (2004). Differential utilization of upstream AUGs in the beta-secretase mRNA suggests that a shunting mechanism regulates translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2794-2799.

Rosen, S. D., and Bertozzi, C. R. (1994). The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol* 6, 663-673.

Sabo, S. L., Ikin, A. F., Buxbaum, J. D., and Greengard, P. (2003). The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses in vitro and in vivo. *J Neurosci* 23, 5407-5415.

- Sabo, S. L., Lanier, L. M., Ikin, A. F., Khorkova, O., Sahasrabudhe, S., Greengard, P., and Buxbaum, J. D. (1999). Regulation of beta-amyloid secretion by FE65, an amyloid protein precursor-binding protein. *J Biol Chem* *274*, 7952-7957.
- Santolini, E., Puri, C., Salcini, A. E., Gagliani, M. C., Pelicci, P. G., Tacchetti, C., and Di Fiore, P. P. (2000). Numb is an endocytic protein. *J Cell Biol* *151*, 1345-1352.
- Sastre, M., Dewachter, I., Rossner, S., Bogdanovic, N., Rosen, E., Borghgraef, P., Evert, B. O., Dumitrescu-Ozimek, L., Thal, D. R., Landreth, G., *et al.* (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 443-448.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condrón, M. M., Teplow, D. B., and Haass, C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* *2*, 835-841.
- Sastre, M., Turner, R. S., and Levy, E. (1998). X11 interaction with beta-amyloid precursor protein modulates its cellular stabilization and reduces amyloid beta-protein secretion. *J Biol Chem* *273*, 22351-22357.
- Scheinfeld, M. H., Ghersi, E., Laky, K., Fowlkes, B. J., and D'Adamio, L. (2002). Processing of beta-amyloid precursor-like protein-1 and -2 by gamma-secretase regulates transcription. *J Biol Chem* *277*, 44195-44201.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., *et al.* (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* *400*, 173-177.
- Schobel, S., Neumann, S., Seed, B., and Lichtenthaler, S. F. (2006). Expression cloning screen for modifiers of amyloid precursor protein shedding. *Int J Dev Neurosci* *24*, 141-148.
- Seals, D. F., and Courtneidge, S. A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* *17*, 7-30.
- Seet, L. F., and Hong, W. (2006). The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* *1761*, 878-896.
- Selkoe, D. J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* *6*, 487-498.
- Selkoe, D. J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* *399*, A23-31.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* *81*, 741-766.
- Selkoe, D. J., and Schenk, D. (2003). Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *43*, 545-584.
- Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M. G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D. L., Bryant, K., Fritz, L. C., Galasko, D., Thal, L. J., and *et al.* (1993). Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature* *361*, 260-263.

Sever, S., Muhlberg, A. B., and Schmid, S. L. (1999). Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* 398, 481-486.

Shah, S., Lee, S. F., Tabuchi, K., Hao, Y. H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C. E., 3rd, Sudhof, T., and Yu, G. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122, 435-447.

Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J., and Tonegawa, S. (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89, 629-639.

Shiba, T., Kametaka, S., Kawasaki, M., Shibata, M., Waguri, S., Uchiyama, Y., and Wakatsuki, S. (2004). Insights into the phosphoregulation of beta-secretase sorting signal by the VHS domain of GGA1. *Traffic* 5, 437-448.

Shie, F. S., LeBoeuf, R. C., and Jin, L. W. (2003). Early intraneuronal Abeta deposition in the hippocampus of APP transgenic mice. *Neuroreport* 14, 123-129.

Shin, N., Lee, S., Ahn, N., Kim, S. A., Ahn, S. G., Park, Z. Y., and Chang, S. (2007). Sorting nexin 9 interacts with dynamin 1 and N-WASP and coordinates synaptic vesicle endocytosis. *J Biol Chem*.

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

Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., et al. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537-540.

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

Sisodia, S. S., Koo, E. H., Beyreuther, K., Unterbeck, A., and Price, D. L. (1990). Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248, 492-495.

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

Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., et al. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *Embo J* 24, 3624-3634.

Soulet, F., Yarar, D., Leonard, M., and Schmid, S. L. (2005). SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* 16, 2058-2067.

Spoelgen, R., von Arnim, C. A., Thomas, A. V., Peltan, I. D., Koker, M., Deng, A., Irizarry, M. C., Andersen, O. M., Willnow, T. E., and Hyman, B. T. (2006). Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme. *J Neurosci* 26, 418-428.

- Sprecher, C. A., Grant, F. J., Grimm, G., O'Hara, P. J., Norris, F., Norris, K., and Foster, D. C. (1993). Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry* 32, 4481-4486.
- Stein, T. D., Anders, N. J., DeCarli, C., Chan, S. L., Mattson, M. P., and Johnson, J. A. (2004). Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J Neurosci* 24, 7707-7717.
- Steiner, H., and Haass, C. (2000). Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 217-224.
- Stockinger, W., Sailler, B., Strasser, V., Recheis, B., Fasching, D., Kahr, L., Schneider, W. J., and Nimpf, J. (2002). The PX-domain protein SNX17 interacts with members of the LDL receptor family and modulates endocytosis of the LDL receptor. *Embo J* 21, 4259-4267.
- Stowell, M. H., Marks, B., Wigge, P., and McMahon, H. T. (1999). Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol* 1, 27-32.
- Struhl, G., and Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell* 6, 625-636.
- Su, Y., and Chang, P. T. (2001). Acidic pH promotes the formation of toxic fibrils from beta-amyloid peptide. *Brain Res* 893, 287-291.
- Sweitzer, S. M., and Hinshaw, J. E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 93, 1021-1029.
- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., and Iwatsubo, T. (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422, 438-441.
- Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Watkins, P. C., Bruns, G. A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M. L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D. M., and Neve, R. L. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880-884.
- Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., *et al.* (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17, 181-190.
- Toliver-Kinsky, T., Wood, T., and Perez-Polo, J. R. (2000). Nuclear factor kappaB/p49 is a negative regulatory factor in nerve growth factor-induced choline acetyltransferase promoter activity in PC12 cells. *J Neurochem* 75, 2241-2251.
- Trommsdorff, M., Borg, J. P., Margolis, B., and Herz, J. (1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 273, 33556-33560.

Turner, R. S., Suzuki, N., Chyung, A. S., Younkin, S. G., and Lee, V. M. (1996). Amyloids beta40 and beta42 are generated intracellularly in cultured human neurons and their secretion increases with maturation. *J Biol Chem* 271, 8966-8970.

Ulery, P. G., Beers, J., Mikhailenko, I., Tanzi, R. E., Rebeck, G. W., Hyman, B. T., and Strickland, D. K. (2000). Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 275, 7410-7415.

van Kerkhof, P., Lee, J., McCormick, L., Tetrault, E., Lu, W., Schoenfish, M., Oorschot, V., Strous, G. J., Klumperman, J., and Bu, G. (2005). Sorting nexin 17 facilitates LRP recycling in the early endosome. *Embo J* 24, 2851-2861.

Vassar, R. (2001). The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 17, 157-170.

Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., *et al.* (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.

Vetrivel, K. S., and Thinakaran, G. (2006). Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology* 66, S69-73.

von Arnim, C. A., Kinoshita, A., Peltan, I. D., Tangredi, M. M., Herl, L., Lee, B. M., Spoelgen, R., Hshieh, T. T., Ranganathan, S., Battey, F. D., *et al.* (2005). The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J Biol Chem* 280, 17777-17785.

von Arnim, C. A., Spoelgen, R., Peltan, I. D., Deng, M., Courchesne, S., Koker, M., Matsui, T., Kowa, H., Lichtenthaler, S. F., Irizarry, M. C., and Hyman, B. T. (2006). GGA1 acts as a spatial switch altering amyloid precursor protein trafficking and processing. *J Neurosci* 26, 9913-9922.

von Arnim, C. A., Tangredi, M. M., Peltan, I. D., Lee, B. M., Irizarry, M. C., Kinoshita, A., and Hyman, B. T. (2004). Demonstration of BACE (beta-secretase) phosphorylation and its interaction with GGA1 in cells by fluorescence-lifetime imaging microscopy. *J Cell Sci* 117, 5437-5445.

Walsh, D. M., Fadeeva, J. V., LaVoie, M. J., Paliga, K., Eggert, S., Kimberly, W. T., Wasco, W., and Selkoe, D. J. (2003). gamma-Secretase cleavage and binding to FE65 regulate the nuclear translocation of the intracellular C-terminal domain (ICD) of the APP family of proteins. *Biochemistry* 42, 6664-6673.

Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., and Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535-539.

Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B., and Selkoe, D. J. (2000). The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 39, 10831-10839.

- Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2001). Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem* 276, 14634-14641.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E., and Solomon, F. (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10758-10762.
- Weggen, S., Eriksen, J. L., Das, P., Sagi, S. A., Wang, R., Pietrzik, C. U., Findlay, K. A., Smith, T. E., Murphy, M. P., Bulter, T., *et al.* (2001). A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414, 212-216.
- Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57, 115-126.
- Weihofen, A., and Martoglio, B. (2003). Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol* 13, 71-78.
- Werb, Z., and Yan, Y. (1998). A cellular striptease act. *Science* 282, 1279-1280.
- Wertkin, A. M., Turner, R. S., Pleasure, S. J., Golde, T. E., Younkin, S. G., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (1993). Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9513-9517.
- Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., and Haass, C. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314, 664-666.
- Wirhth, O., Multhaup, G., Czech, C., Blanchard, V., Moussaoui, S., Tremp, G., Pradier, L., Beyreuther, K., and Bayer, T. A. (2001). Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* 306, 116-120.
- Wolfe, M. S. (2006). The gamma-secretase complex: membrane-embedded proteolytic ensemble. *Biochemistry* 45, 7931-7939.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513-517.
- Wong, P. C., Zheng, H., Chen, H., Becher, M. W., Sirinathsinghji, D. J., Trumbauer, M. E., Chen, H. Y., Price, D. L., Van der Ploeg, L. H., and Sisodia, S. S. (1997). Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 387, 288-292.
- Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Clemens, J. C., Kruger, R. P., Muda, M., and Dixon, J. E. (2001). The sorting nexin, DSH3PX1, connects the axonal guidance receptor, Dscam, to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 276, 41782-41789.

Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashier, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., *et al.* (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533-537.

Yarar, D., Waterman-Storer, C. M., and Schmid, S. L. (2007). SNX9 couples actin assembly to phosphoinositide signals and is required for membrane remodeling during endocytosis. *Dev Cell* 13, 43-56.

Yoo, A. S., Bais, C., and Greenwald, I. (2004). Crosstalk between the EGFR and LIN-12/Notch pathways in *C. elegans* vulval development. *Science* 303, 663-666.

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

Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., *et al.* (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407, 48-54.

Zhang, Z., Lee, C. H., Mandiyan, V., Borg, J. P., Margolis, B., Schlessinger, J., and Kuriyan, J. (1997). Sequence-specific recognition of the internalization motif of the Alzheimer's amyloid precursor protein by the X11 PTB domain. *Embo J* 16, 6141-6150.

Zhong, Q., Lazar, C. S., Tronchere, H., Sato, T., Meerloo, T., Yeo, M., Songyang, Z., Emr, S. D., and Gill, G. N. (2002). Endosomal localization and function of sorting nexin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6767-6772.

## **Danksagung**

Vor allen danke ich Prof. Dr. Christian Haass für die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen, die enthusiastische Stimmung in seiner Arbeitsgruppe, sowie für den inspirierenden Kontakt mit der internationalen Alzheimerforschung.

Prof. Dr. Thomas Cremer danke ich für die freundliche Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Stefan Lichtenthaler für die intensive Betreuung dieser Doktorarbeit, die vielen lehrreichen Diskussionen und für sein Vertrauen in meine Fähigkeit Forschung und Familie parallel zu meistern.

Mein besonderer Dank gilt auch dem Boehringer Ingelheim Fond für die großzügige finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit, die vielen interessanten Kontakte und die nette persönliche Betreuung während dieser Zeit.

Herzlich möchte ich Susanne Schöbel danken, die mit mir nicht nur das Projekt, den Schreibplatz und meine Sorgen teilte, sondern mich auch kulinarisch liebevoll versorgte. Danke auch für dein wirklich großes Engagement in unser Projekt.

Meinen Kollegen aus dem Lichtenthaler Labor danke ich für die schöne Zeit, ihr seid mir jeder auf seine Art ans Herz gewachsen, und ich danke für eure Hilfe im Laboralltag. Kathrin Moschke für einwandfreie technische Unterstützung, Stefan Mittereiter, Peer-Hendrik Kuhn und Bastian Dislich für inspirierende Diskussionen zu unserer Forschung und den Dingen des Lebens und für eure Unterstützung in der Endphase des SNX-Projekts.

Sylvia Fischer danke ich für die Korrektur der hoffentlich meisten Rechtschreibfehler dieses Manuskripts und für viele Stunden geduldiges Philipp-Schaukeln. Ganz besonders herzlich möchte ich mich aber für die fröhlichen Zeit, die vielen wertvollen Ratschläge und deine Freundschaft bedanken.

Den Kollegen aus dem Haass Labor danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und die nette Arbeitsatmosphäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner kleinen und Groß-Familie, deren unermüdliche Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglichte und deren Geduld und Vertrauen mich darin bestärkt haben.

# LEBENS LAUF

Dipl. Humbiol. Stephanie Neumann

**Geburt:** 29.12.1976, Gräfelfing  
**Geburtsname:** Stephanie Zully  
**Staatsbürgerschaft:** deutsch  
**Familienstand:** verheiratet, zwei Kinder

**Adresse:** Johannishöhe 48b,  
82288 Kottgeisering  
Stephanie.Neumann@med.uni-muenchen.de

## BERUF SERFAHRUNG

seit Okt. 2007 Lecturer des Biochemie-Seminars der med. Fakultät  
Ludwigs-Maximilians-Universität, München  
Labor für Alzheimer Forschung, Prof. Dr. C. Haass

Okt. 2002 - Okt. 2007 Promotion  
Ludwigs-Maximilians-Universität, München  
Labor für Alzheimer Forschung, Prof. Dr. C. Haass  
**Thema:** Regulation der Amyloid Vorläufer Protein Prozessierung

## STUDIUM

Okt. 1997 - Jun. 2002 Studium der Humanbiologie  
Philipps-Universität, Marburg

Sep. 2001 - Jun. 2002 Diplomarbeit in Biochemie (Note: 1,0)  
Stanford University, USA  
Department of Biochemistry, Prof. Dr. S. R. Pfeffer  
**Thema:** Charakterisierung von Rab9B- einer neuen Rab-GTPase

Apr. 2001 - Aug. 2001 Diplomprüfung (Note: 1,0)  
Philipps-Universität, Marburg  
**Prüfungsfächer:** Biochemie, Zellbiologie, Immunologie

Nov. 2000 - Mär. 2001 Forschungsaufenthalt  
Stanford University, USA

Aug. 1999 - Okt. 1999 Vordiplom (Note: 1,1)  
Philipps-Universität, Marburg  
**Prüfungsfächer:** Biologie, Chemie, Physik, Anatomie, Physiologie

Sep. 1998 - Okt. 1998 Forschungsaufenthalt  
Universitätsklinik für Neurologie, Innsbruck

## SCHULBILDUNG

Nov. 1993 - Jun. 1997 Abitur (Note: 1,0)  
Goethe Gymnasium, Regensburg  
**Prüfungsfächer:** Deutsch, Biologie, Sozialkunde, Englisch

Aug. 1993 - Nov. 1993 Bishop Grandin High School, Calgary; Kanada

Sep. 1988 - Aug. 1993 Gymnasium, Starnberg

Sep. 1983 - Aug. 1988 Montessori Schule, Starnberg