

Analyse des neuen Proteins TMEM59 und seiner Funktion in dem Transport und der Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins

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

vorgelegt von
Sylvia Fischer aus München
15. Januar 2008

Erklärung und ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit, 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 _____

Sylvia Fischer

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

Promotionsgesuch eingereicht: 15.01.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2008

Erster Gutachter: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Manfred Schliwa

Sondergutachter: Prof. Dr. Christian Haass

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	- 5 -
1.1	Epidemiologie und Charakteristika der Alzheimer-Krankheit	- 5 -
1.2	Die Proteolyse des Amyloid-Vorläufer-Proteins als zentraler Prozess in der Alzheimer-Krankheit	- 7 -
1.2.1	Die anti-amyloidogene Prozessierung generiert neuroprotektives APPs α	- 8 -
1.2.2	Die amyloidogene Prozessierung generiert neurotoxisches Amyloid- β	- 9 -
1.3	Die Amyloid-Kaskade führt zum Tod von Neuronen.....	- 11 -
1.4	Formen der Alzheimer-Erkrankung.....	- 12 -
1.4.1	Die sporadische Form der Alzheimer-Krankheit	- 13 -
1.4.2	Die familiäre Form der Alzheimer-Krankheit	- 13 -
1.4.2.1	Mutationen im APP-Gen.....	- 14 -
1.4.2.2	Mutationen im Presenilin-Gen.....	- 14 -
1.5	Allgemeine Charakterisierung des Amyloid-Vorläuferproteins	- 15 -
1.5.1	Isoformen und Struktur von APP	- 15 -
1.5.2	Funktion von APP	- 16 -
1.5.3	APP-Transport und -Glykosylierung	- 17 -
1.6	Transport und Glykosylierung von Proteinen.....	- 19 -
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	- 22 -
2.	Ergebnisse	- 23 -
2.1	Allgemeine Charakterisierung von TMEM59	- 23 -
2.1.1	Sequenz- und Domänenanalyse von TMEM59	- 23 -
2.1.2	TMEM59 besitzt ein humanes Homolog und Orthologe.....	- 24 -
2.1.3	TMEM59 ist ubiquitär exprimiert.....	- 26 -
2.1.4	Membranprotein-Klassifizierung und Signalpeptid-Vorhersage	- 28 -
2.1.4.1	TMEM59 trägt ein Signalpeptid	- 28 -
2.1.4.2	TMEM59 ist ein Typ-I-Membranprotein.....	- 29 -
2.1.5	TMEM59 ist glykosyliert.....	- 32 -
2.1.6	Subzelluläre Lokalisierung von TMEM59 in ER und Golgi-Apparat.....	- 33 -
2.1.6.1	Endogenes TMEM59 ist Golgi-lokalisiert.....	- 33 -
2.1.6.2	Das TMEM59-GFP-Fusionsprotein zeigt Golgi- und ER-Lokalisierung... -	37 -
2.2	TMEM59-Einfluss auf die Maturierung und Sekretion von APP.....	- 38 -
2.2.1	TMEM59 inhibiert die Maturierung von endogenem APP	- 38 -
2.2.2	Transient überexprimiertes APP wird in seiner Maturierung inhibiert.....	- 39 -
2.2.3	TMEM59-Expression hemmt die Maturierung von APP	- 43 -
2.2.4	Kontrollproteine inhibieren nicht die Maturierung und Sekretion von APP- 45 -	
2.2.5	Die generelle Sekretion von Proteinen wird von TMEM59 nicht beeinflusst- 47 -	
	-	
2.2.5.1	Die TNF α -Sekretion wird von TMEM59 nicht gehemmt	- 47 -
2.2.5.2	Die Sekretion der alkalischen Phosphatase (SEAP) bleibt durch TMEM59 unbeeinflusst	- 48 -
2.2.5.3	Lösliche Formen von APP werden trotz TMEM59-Expression sekretiert. -	50 -
2.2.6	TMEM59 beeinflusst die Glykosylierung von APP	- 51 -
2.2.7	TMEM59 beeinflusst die Glykosylierung verschiedener Proteine.....	- 56 -
2.2.7.1	BACE1 wird durch TMEM59-Expression in seiner Glykosylierung gehemmt.....	- 56 -

2.2.7.2	Das Prion-Protein zeigt unter TMEM59-Expression eine veränderte Glykosylierung	- 58 -
2.3	Molekulare mechanistische Untersuchung des Effekts von TMEM59	- 59 -
2.3.1	TMEM59 muss Golgi-lokalisiert sein	- 59 -
2.3.2	TMEM59 beeinträchtigt den Transport von Proteinen.....	- 60 -
2.3.3	Knock-Down von TMEM59/BSMAP zeigt keinen Einfluß auf die APP-Maturierung.....	- 65 -
2.3.4	Domänen-Deletionsanalyse von TMEM59.....	- 68 -
3.	Diskussion	- 72 -
3.1	Erstcharakterisierung von TMEM59	- 72 -
3.2	Die Bedeutung der Glykosylierung bei dem Transport von APP	- 73 -
3.3	TMEM59 könnte eine Rolle in der Glykosylierung innehaben	- 75 -
3.4	Die Rolle der Glykosylierung bei der Aktivität der Sekretasen	- 78 -
3.5	TMEM59 beeinflusst verschiedene Proteingruppen	- 79 -
3.6	Darstellung eines TMEM59-Funktionsmechanismus	- 80 -
4.	Zusammenfassung	- 88 -
5.	Abkürzungsverzeichnis	- 90 -
6.	Material und Methoden	- 94 -
6.1	Material.....	- 94 -
6.1.1	Chemikalien, Enzyme und Reagenzien.....	- 94 -
6.1.2	Kits	- 96 -
6.1.3	Puffer	- 96 -
6.1.4	Antikörper.....	- 99 -
6.1.5	Säuger-Zelllinien	- 101 -
6.1.6	<i>E.coli</i> -Zelllinie.....	- 102 -
6.1.7	Plasmide	- 102 -
6.1.8	Verwendete Oligonukleotide.....	- 105 -
6.1.9	Verbrauchsmaterial.....	- 108 -
6.1.10	Geräte	- 108 -
6.2	Methoden.....	- 109 -
6.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	- 109 -
6.2.1.1	Polymeraseketten Reaktion (PCR).....	- 109 -
6.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	- 110 -
6.2.1.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	- 110 -
6.2.1.4	Sequenzierung der DNA-Konstrukte.....	- 110 -
6.2.1.5	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	- 110 -
6.2.1.6	Dephosphorylierung von DNA.....	- 111 -
6.2.1.7	Ligation der DNA.....	- 111 -
6.2.1.8	Herstellung des kompetenten Bakterienstamms DH5 α	- 112 -
6.2.1.9	Transformation des Ligationsproduktes in <i>E. coli</i>	- 112 -
6.2.1.10	Glyzerinkulturen von Bakterienklonen	- 113 -
6.2.1.11	Präparation von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi-Präp).....	- 113 -
6.2.1.12	Transienter Knock-Down von Proteinen mittels siRNA.....	- 113 -
6.2.1.13	Isolierung von zellulärer RNA	- 114 -
6.2.1.14	Reverse Transkription (RT) von RNA	- 115 -
6.2.1.15	quantitative Real-Time-PCR	- 115 -
6.2.1.16	Northern-Blot-Analyse	- 116 -
6.2.2	Zellkultur	- 118 -
6.2.2.1	Beschichtung von Kulturschalen mit Poly-L-Lysin	- 118 -
6.2.2.2	Kultivierung von Zellen	- 118 -
6.2.2.3	Transiente Transfektion mit rekombinanter DNA.....	- 118 -

6.2.2.4	Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)	- 119 -
6.2.2.5	Nachweis der exogenen Proteinexpression in transfizierten Zellen ..	- 119 -
6.2.3	Proteinbiochemische Methoden	- 120 -
6.2.3.1	Gewinnung von Gesamtproteinextrakten	- 120 -
6.2.3.2	Ermittlung der Proteinkonzentration	- 120 -
6.2.3.2.1	Proteinkonzentration nach Bradford	- 120 -
6.2.3.2.2	Proteinkonzentration nach dem Bicinchonic Acid Assay (BCA-Assay).	- 121 -
6.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	- 121 -
6.2.3.4	Western-Blot	- 122 -
6.2.3.5	Immunpräzipitation (IP) von Proteinen	- 123 -
6.2.3.6	In-vitro-Transkription und -Translation	- 125 -
6.2.3.6.1	In-vitro-Transkription	- 125 -
6.2.3.6.2	In-vitro-Translation	- 126 -
6.2.3.7	TMEM59-Antikörper-Generierung	- 127 -
6.2.4	Zelluläre Assays	- 127 -
6.2.4.1	PIPLC-Verdau	- 127 -
6.2.4.2	Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins und Generierung eines TMEM59-Antikörpers	- 128 -
6.2.4.3	Radioaktive Markierung von Proteinen mit [³⁵ S]	- 129 -
6.2.4.4	IF Techniken	- 129 -
6.2.4.4.1	Herstellung und Auswertung eines Immunfluoreszenz-Präparates	- 129 -
6.2.4.4.2	TMEM59-ER-Kolokalisierung	- 130 -
6.2.4.4.3	TMEM59-Golgi-Kolokalisierung	- 130 -
6.2.4.4.4	Lebend-Zell-Aufnahme	- 130 -
6.2.4.5	Deglykosylierungs-Experimente	- 131 -
6.2.4.5.1	N-Glykosidase F-Verdau	- 131 -
6.2.4.5.2	Endoglykosidase H-Verdau	- 131 -
6.2.4.6	Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität	- 131 -
7.	Literaturverzeichnis	- 133 -
	Danksagung	- 148 -
	Lebenslauf	- 149 -

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie und Charakteristika der Alzheimer-Krankheit

Der Neurologe Alois Alzheimer berichtete im Jahre 1906 erstmals über eine Erkrankung des Gehirns, welche er „präsenile Demenz“ nannte (Alzheimer, 1907). Diese nachfolgend nach ihm benannte Krankheit trifft hauptsächlich Menschen höheren Alters und ist mit einem fortschreitenden Verlust der mentalen Fähigkeiten verbunden. Die betroffenen Patienten leiden an progressivem Gedächtnisverlust, kognitiven Beeinträchtigungen und Persönlichkeitswandel. Das Risiko an der Alzheimer-Demenz zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter drastisch an. Die mittlere Prävalenzrate aller Demenz-Formen in Deutschland beträgt 1,2% bei über 65-Jährigen, während sie bei über 90-Jährigen bei 34,6% liegt (Quelle: www.deutsche-alzheimer.de). Der Anteil der Alzheimer-Krankheit an den Demenzen wird auf etwa zwei Drittel aller Demenzen geschätzt, eine eindeutige Diagnose dieser weltweit häufigsten Form der Demenz ist jedoch lediglich mittels einer histologischen Hirnuntersuchung *post mortem* möglich (Jellinger, 2005; Selkoe, 2001a). In Deutschland leiden schätzungsweise 1,2 Millionen Patienten am Morbus Alzheimer (Quelle: <http://www.neuro24.de/alzhei.htm>, Stand 2006).

Die Alzheimer-Krankheit stellt eine ätiologisch heterogene Gruppe von neuropathologisch, sowie klinisch sehr ähnlichen Krankheitsbildern dar und zählt zu den neurodegenerativen Krankheiten. Diese Krankheiten sind charakterisiert durch Ablagerungen der Proteine Amyloid- β ($A\beta$) und Tau im Gehirn (Braak et al., 1996). Neuropathologisch führt die Alzheimer-Krankheit zu einem massiven Neuronen-Verlust im limbischen System und im zerebralen Kortex. Bedingt durch die damit verbundene Atrophie kann das Gehirn einen Gewichtsverlust von bis zu 60% erleiden (siehe Abb. 1).

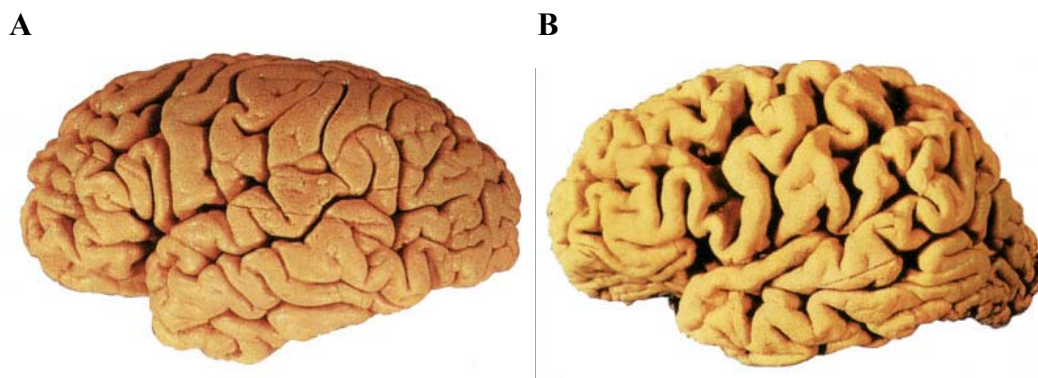


Abbildung 1 A) Darstellung des Gehirns eines gesunden Menschen und B) eines Alzheimer-Patienten (Kriesten, 2003)

Die Alzheimer-Krankheit ist charakterisiert durch intra- und extrazelluläre unlösliche, proteinhaltige Ablagerungen in Hippokampus, Großhirnrinde und Hirnstamm, (Alzheimer, 1907; Katzman, 1986; Reisberg et al., 1983b). Als ein pathologisches Merkmal treten neurofibrilläre Bündel („neurofibrillary tangles“) auf, die aus dem krankhaft veränderten hyperphosphorylierten Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau bestehen, welches in Neuronen akkumuliert (Goedert et al., 1991; Grundke-Iqbal et al., 1986; Trojanowski and Lee, 1994) (siehe Abb. 2B). Das Hauptaugenmerk der Forschung liegt jedoch auf dem Vorkommen von extrazellulären Ablagerungen, welche rundliche Läsionen mit einem Durchmesser von 20-120 μm bilden, wobei deren Anzahl nicht mit dem Grad der Demenz korreliert (Dickson, 1997; Masters et al., 1985b) (siehe Abb. 2A). Diese Läsionen bestehen hauptsächlich aus Ablagerungen des Amyloid- β -Proteins ($\text{A}\beta$) und werden demzufolge als Amyloid-Plaques bezeichnet (Glenner et al., 1984; Masters et al., 1985a). Der Hauptbestandteil der Plaques ist eine leicht aggregierende 42-Aminosäure-lange Form des Amyloid- β ($\text{A}\beta_{42}$) (Jarrett et al., 1993; Lansbury, 1997), während ein kleinerer Anteil aus einer 40-Aminosäure-langen Form ($\text{A}\beta_{40}$) besteht. Zusätzlich sind weitere N- und C-terminal verkürzte oder verlängerte Formen des $\text{A}\beta$ -Peptids nachweisbar (Glenner et al., 1984; Masters et al., 1985b; Wang et al., 1996). Die Ablagerungen sind aus unlöslichen $\text{A}\beta$ -Fibrillen zusammengesetzt, die eine β -Faltblatt-Struktur ausbilden und daher mit Kongo-Rot anfärbbar sind. In Abhängigkeit von der Aggregationsform und Fibrillenbildung des Amyloid- β s werden diffuse und senile Plaques unterschieden, wobei die diffusen Plaques zeitlich früher auftreten und auch bei älteren Menschen *post mortem* beobachtet werden können, bei denen keine Demenz-Anzeichen festzustellen waren (Hardy and Selkoe, 2002; Von Braunnmuhl, 1952). Deren limbische Hirnrinden wiesen zwar einen erhöhten Anteil an $\text{A}\beta$ -Ablagerungen des diffusen Typs auf, welche allerdings nicht aus Amyloid-Fibrillen bestehen und keinerlei neuritische und gliale Zytopathologie erzeugen, wie dies bei senilen Plaques der Fall ist, worauf jedoch präziser unter Kapitel 1.3 eingegangen wird (Dickson, 1997). Bei einem Teil der Alzheimer-Patienten findet sich darüber hinaus auch eine Ablagerung des Amyloid-Proteins in den zerebralen und meningealen Blutgefäßen in Form eines vaskulären Amyloids, welche als kongophile Angiopathie bezeichnet wird und zu Hirnblutungen führen kann (Muller-Hill and Beyreuther, 1989).

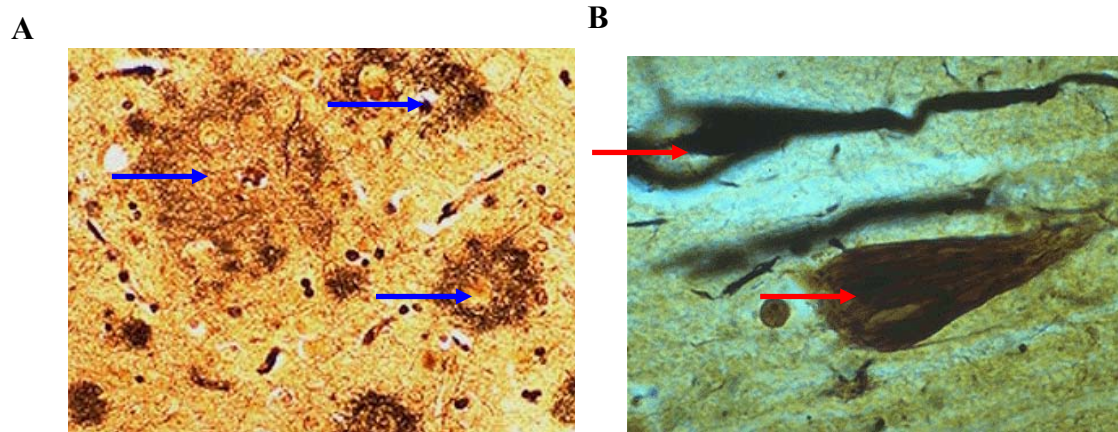


Abbildung 2: Histopathologische Charakteristika der Alzheimer-Krankheit

A) hochauflösende mikroskopische Aufnahme einer Silberfärbung seniler Plaques unterschiedlicher Größe (blaue Pfeile) B) Silberfärbung von neurofibrillären Bündeln (rote Pfeile) [Quelle: <http://library.med.utah.edu/WebPath/CNSHTML/CNS097.html>]

1.2 Die Proteolyse des Amyloid-Vorläufer-Proteins als zentraler Prozess in der Alzheimer-Krankheit

Ein für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit wesentlicher Schritt ist die proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins APP („amyloid precursor protein“). Das Amyloid-Vorläufer-Protein ist ein großes Typ-I-transmembranes Glykoprotein, welches eine A β -Domäne enthält, die mittels Proteolyse freigesetzt werden kann. Auf die Struktur und Funktion von APP wird unter Kapitel 1.5 eingegangen. APP kann alternativ auf zwei unterschiedlichen Wegen prozessiert werden, dem amyloidogenen Weg, bei dem A β entsteht und dem anti-amyloidogenem Weg, bei dem die Freisetzung des A β -Peptids durch einen proteolytischen Schnitt in der A β -Region verhindert wird (Kang et al., 1987). Die beiden Prozessierungswege unterscheiden sich demzufolge sehr in der Funktion ihrer Spaltprodukte, welche im anti-amyloidogenen Weg zu Neuroprotektion und im amyloidogenen Weg zu Neurotoxizität führt. Im gesunden Organismus finden beide Wege statt, jedoch sind bisher die Mechanismen noch nicht eindeutig aufgeklärt, die der Entscheidung zugrunde liegen, welcher Weg eingeschlagen wird (Haass et al., 1992b; Seubert et al., 1993; Shoji et al., 1992).

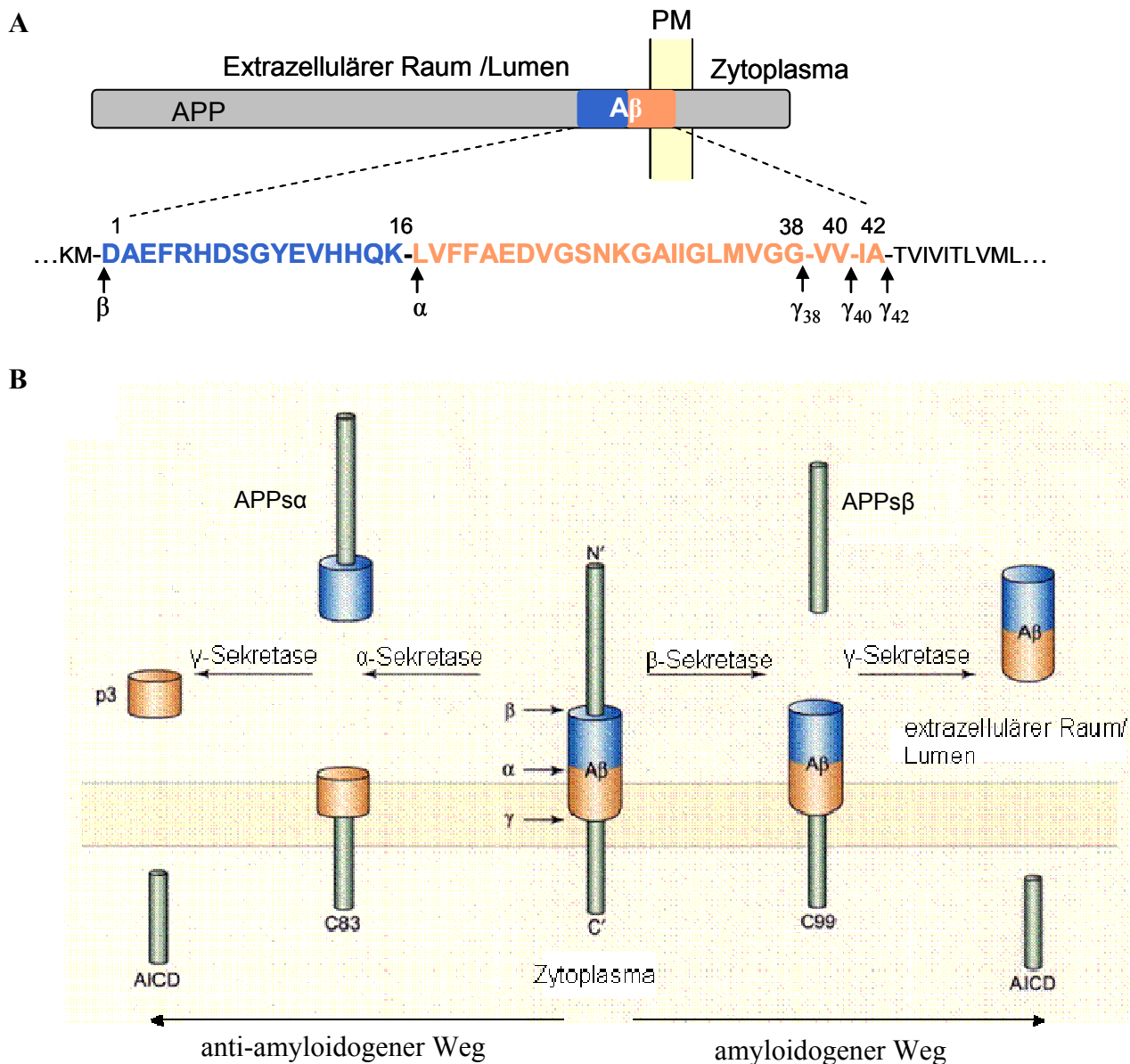


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Prozessierung von APP

A) Schematische Darstellung der α-Sekretase (α)-, β-Sekretase (β)- und γ-Sekretase-Schnittstellen (γ) in der Aβ-Sequenz (fett gedruckt). Die Zahlen über der Sequenz geben die Aminosäure-Position der Schnittstellen an. PM: Plasmamembran

B) Schematische Darstellung des amyloidogenen und anti-amyloidogenen Prozessierungsweges von APP (modifiziert nach (Haass and Steiner, 2002))

1.2.1 Die anti-amyloidogene Prozessierung generiert neuroprotektives APPsα

Die Proteolyse von APP durch Mitglieder der ADAM-Genfamilie („A Disintegrin And Metalloprotease“) initiiert den anti-amyloidogenen oder auch nicht-pathogenen Weg. Die ADAM-Proteasen ADAM-9, -10, -17, die auch als α-Sekretasen bezeichnet werden, spalten APP vorrangig an der Plasmamembran, sind jedoch zum Teil bereits im Golgi aktiv (Allinson et al., 2003; Buxbaum et al., 1998; Lammich et al., 1999; Skovronsky et al., 2000). APP wird

dabei extrazellulär an der Position Lys16/Leu17 innerhalb der A β -Region von der α -Sekretase geschnitten, wodurch ein extrazellulär sezerniertes, lösliches N-terminales Spaltprodukt (APPs α) und ein membranständiges C-terminales Fragment einer Länge von 83 Aminosäuren (CTF α , C83) entsteht (Esch et al., 1990; Oltersdorf et al., 1990; Selkoe, 1989; Sisodia et al., 1990; Weidemann et al., 1989) (siehe Abb. 3A/B). Sodann kann das C-terminale Fragment durch Aktivität der γ -Sekretase an der Plasmamembran, in späten Endosomen, im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), aber auch im ER weiter prozessiert werden (Chyung et al., 2005; De Strooper, 2003; Kaether et al., 2006; Pasternak et al., 2003; Vetrivel and Thinakaran, 2006). Die γ -Sekretase ist eine Aspartyl-Protease und stellt einen Komplex bestehend aus vier Proteinen dar, Presenilin, Nicastrin, Pen2 („presenilin enhancer“) und Aph1 („anterior pharynx defective homolog“) (Edbauer et al., 2003). Die Spaltung mittels der γ -Sekretase erfolgt innerhalb der Transmembrandomäne des Substrats, wobei für die Position des Schnittes Länge und Struktur der Transmembrandomäne entscheidend sind (Esler and Wolfe, 2001; Lichtenthaler et al., 2002; Wolfe et al., 1999). Die Prozessierung des CTF α von APP durch die γ -Sekretase resultiert in der Sekretion eines 3 kDa großen Fragments (p3), welches dem C-terminalen Teil der A β -Sequenz (Aminosäuren 17-40/42) entspricht, und der Bildung der APP-intrazellulären C-terminalen Domäne (AICD) (Haass et al., 1993; Haass et al., 1992a; Seubert et al., 1992; Shoji et al., 1992) (siehe Abb. 3A/B). Alternativ kann das gesamte C-terminale Fragment über ein NPXY-Motiv internalisiert und in den Lysosomen abgebaut werden.

Der neuroprotektive Effekt des anti-amyloidogenen Weges beruht auf dem Spaltprodukt APPs α , welches selbst neuroprotektiv wirkt und die Erinnerungsleistung fördert (Furukawa et al., 1996; Mattson et al., 1999; Meziane et al., 1998; Roch et al., 1994; Smith and Anderton, 1994; Stein et al., 2004). Dieser anti-amyloidogene Weg der APP-Prozessierung steuert der Entwicklung der Alzheimer-Krankheit entgegen, da er nicht zur Generierung des Amyloid- β führt, was unter Kapitel 1.2.2 erläutert wird (Esch et al., 1990).

1.2.2 Die amyloidogene Prozessierung generiert neurotoxisches Amyloid- β

Alternativ zur Prozessierung durch die α -Sekretase kann APP von einer Pepsin-ähnlichen Aspartylprotease (β -Sekretase) gespalten werden (Estus et al., 1992; Golde et al., 1992; Haass et al., 1992a) (siehe Abb. 3A/B). BACE1 („ β -site APP Cleaving Enzyme 1“ oder memapsin2) wurde im Jahre 1999 als die APP-prozessierende β -Sekretase identifiziert (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Der

enzymatischen Spaltung durch die β -Sekretase geht die Internalisierung von APP über Clathrin-vermittelte Endozytose von der Plasmamembran in die sauren Kompartimente der Endosomen oder nachfolgendem Transport in das TGN voraus (Capell et al., 2000; Haass et al., 1995a; Huse et al., 2000; Koo and Squazzo, 1994; Vassar et al., 1999). Die β -Sekretase BACE1 ist ein komplex-glykosyliertes Typ-I-Transmembranprotein mit luminaler enzymatischer Aktivität (Charlwood et al., 2001; Haniu et al., 2000; Huse et al., 2000). BACE1 wird ubiquitär exprimiert, wobei die maximale Aktivität dieser Protease in neuronalem Gewebe nachweisbar ist (Haass et al., 1992a; Seubert et al., 1993). Nach der Glykosylierung wird BACE1 schnell zum Golgi-Apparat und den Endosomen transportiert (Creemers et al., 2001), wo im Rahmen des amyloidogenen Prozessierungsweges der β -Sekretase-Schnitt von APP stattfindet (Haass et al., 1992a; Koo and Squazzo, 1994; Koo et al., 1996). Dennoch ist ein Anteil aktiven BACE1 sowohl auf der Zelloberfläche, als auch im TGN zu detektieren (Capell et al., 2000). Durch Aktivität von BACE1, das APP an Position 1 der A β -Sequenz schneidet, entsteht zunächst ein membranständiges C-terminales Fragment einer Länge von 99 Aminosäuren (CTF β , C99), welches die gesamte A β -Sequenz beinhaltet, sowie das lösliche N-terminale Spaltprodukt APPs β (Golde et al., 1992) (siehe Abb. 3A/B). Die enzymatische Aktivität der γ -Sekretase führt anschließend neben der Bildung der AICD zur Freisetzung unterschiedlich langer proteolytischer A β -Spaltprodukte in den extrazellulären Raum (Citron et al., 1996; Haass et al., 1993b; Zhong et al., 1994) (siehe Abb. 3A/B). Die γ -Schnittstellen sind zwar variabel, unter physiologischen Bedingungen variiert die Länge des Amyloid- β zwischen 38 und 42, vorwiegend wird jedoch meist A β ₄₀ generiert (Dyrks et al., 1993; Haass et al., 1992a; Seubert et al., 1992). Der jeweilige γ -Schnitt ist für die nachfolgenden Aggregations-Eigenschaften des A β -Peptids äußerst relevant, worauf unter Kapitel 1.3 eingegangen werden wird.

Da die enzymatische Spaltung von APP alternativ durch die α - oder die β -Sekretase erfolgt, verhindert die Prozessierung von APP durch die α -Sekretase die Bildung von Amyloid- β (Buxbaum et al., 1998; Haass et al., 1995b; Skovronsky et al., 2000; Thinakaran et al., 1996). Die beiden Sekretasen konkurrieren um dasselbe Substrat, wobei ungefähr 90% von APP durch die α -Sekretase prozessiert werden (Skovronsky et al., 2000). Damit beeinflussen die Aktivitäten der Sekretasen, die Affinitäten zum Substrat und die Zugänglichkeit zum Substrat die Menge des gebildeten A β -Peptids. Gegenwärtig ist noch nicht im Detail geklärt, welche Mechanismen kontrollieren, ob der APP-Schnitt durch die α -, bzw. die β -Sekretase erfolgt. Die Aktivierungen bestimmter Kinasen wie der MAP-Kinase oder der Protein-Kinase-C erhöhen den α -Schnitt (Allinson et al., 2003; Esler and Wolfe, 2001; Felsenstein et al., 1994;

Hung et al., 1993; Huovila et al., 2005; Jacobsen et al., 1994). Bislang ist jedoch nicht verstanden, wie diese Kinasen letztendlich zur verstärkten α -Prozessierung führen.

1.3 Die Amyloid-Kaskade führt zum Tod von Neuronen

Amyloid- β bildet mit seinen β -Faltblattfibrillen im Patienten den stark verdichteten Amyloidkern der senilen Plaques (Busciglio et al., 1993; Golde et al., 1992; Haass et al., 1992a; Seubert et al., 1993; Shoji et al., 1992) (siehe unter Kapitel 1.1). Dieser Amyloidkern ist umgeben von veränderten Neuriten, degenerierten Nervenzellkörpern und aktivierten Mikrogliazellen (Braak et al., 1996; Pike et al., 1994). Die diffusen Plaques hingegen gelten als Vorstufe der senilen Plaques und bestehen aus nicht-fibrillären, amorphen $A\beta$ -Ablagerungen, welche lediglich $A\beta_{42}$ enthalten und nicht von veränderten Neuronen oder aktivierten Gliazellen umgeben sind (Giaccone et al., 1989). Obwohl das Auftreten von Amyloid-Plaques im Gehirn einen eindeutigen Hinweis auf das Bestehen der Alzheimer-Krankheit gibt, konnte in jüngster Zeit gezeigt werden, dass weder unlösliche fibrilläre Aggregate, noch monomere Formen des $A\beta$ -Peptids primär neurotoxisch sind. Die toxische Spezies scheinen lösliche $A\beta$ -oligomerische Intermediate zu sein, während die Plaques lediglich einen Speicher für reaktive $A\beta$ -Oligomere bilden (Haass and Selkoe, 2007; Kawasumi et al., 2002; Walsh et al., 2002). Abbildung 4 stellt die sogenannte Amyloid-Kaskade dar, in der anfängliche Veränderungen im $A\beta$ -Stoffwechsel, wie vermehrte $A\beta$ -Bildung, reduzierter $A\beta$ -Abbau, bzw. eine Verschiebung des $A\beta$ -Gleichgewichts zugunsten von $A\beta_{42}$, letztlich zu einer Neuronenschädigung führen (Hardy and Selkoe, 2002). $A\beta_{42}$ ist gegenüber enzymatischem Abbau widerstandsfähiger als die übrigen $A\beta$ -Spezies (Glabbe, 2001). Zudem ist $A\beta_{42}$ aufgrund seiner C-terminalen Alanin- und Isoleuzin-Reste hydrophober und somit in der Lage, sich zu löslichen Oligomeren zusammenzulagern und mikroskopisch sichtbare, diffuse $A\beta_{42}$ -Plaques zu bilden, welche die Reizweiterleitung an Synapsen beeinträchtigen (Hardy, 1992; Kamenetz et al., 2003; Selkoe, 1991; Selkoe, 1999; Walsh et al., 2002). Diese diffusen Plaques können sich mittels $A\beta$ -Fibrillenbildung in senile Plaques umwandeln, woraufhin Mikrogliazellen und Astrozyten eine lokale chronische Neuroinflammation auslösen (McGeer and McGeer, 1995; Rogers et al., 1996). Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass Mikroglia durch Behandlung mit dem $A\beta$ -Peptid und Interferon- γ neurotoxische Faktoren sezernierten, wie beispielsweise $TNF\alpha$, während $A\beta$ -behandelte Astrozyten verstärkt Zytokine und Wachstumsfaktoren sekretierten (Araujo and Cotman, 1992; Gitter et al., 1995; Meda et al., 1995). Die zunehmende Schädigung der

Neurone führt zu einer veränderten Kinase- und Phosphataseaktivität, woraufhin sich neurofibrilläre Bündel durch Tau-Hyperphosphorylierung bilden. Diese beiden Mechanismen führen darauffolgend zum Funktionsverlust und Tod von Neuronen, was als unmittelbare Ursache der Demenz angesehen wird (Hardy and Selkoe, 2002; Selkoe, 2001b; Sisodia and St George-Hyslop, 2002).

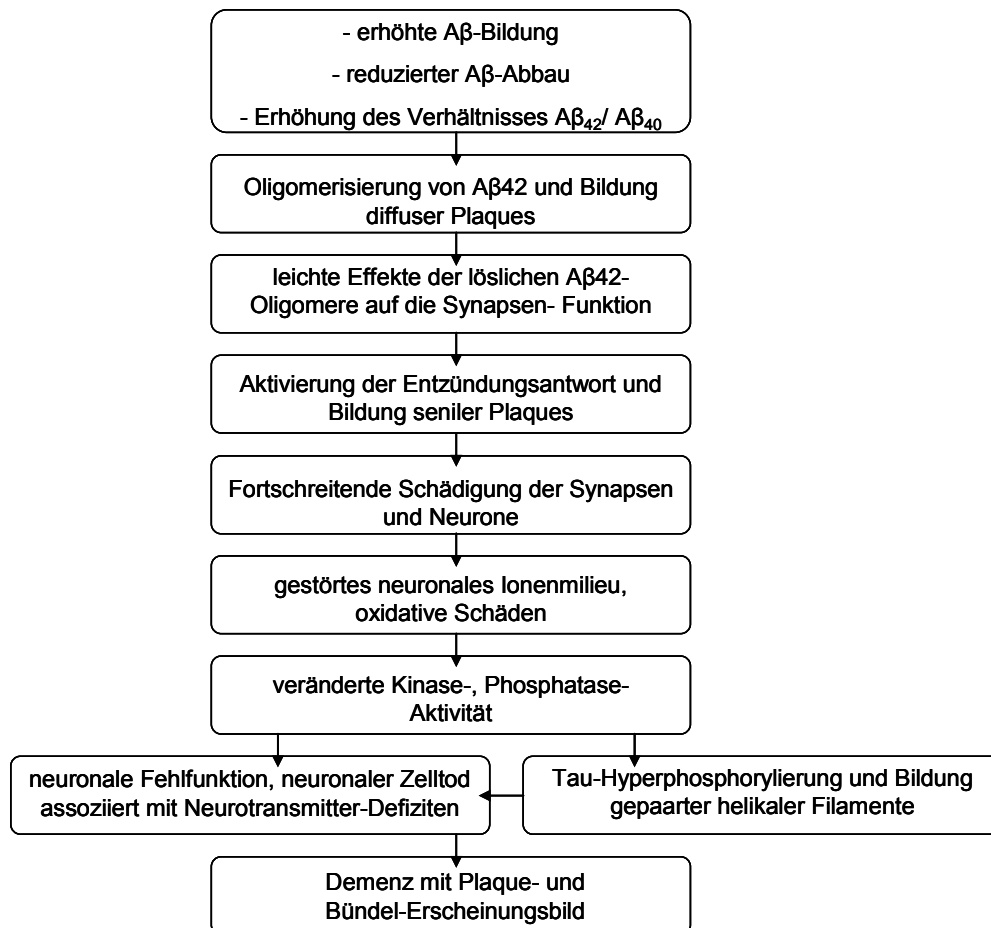


Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung der Amyloidkaskade

Der auslösende Faktor der pathologischen Ereignis-Kaskade, die schließlich zur Entstehung der Alzheimer-Krankheit führt, ist ein verstärktes Vorkommen von Aβ₄₂. [modifiziert nach (Hardy and Selkoe, 2002)]

1.4 Formen der Alzheimer-Erkrankung

Man kann in dem Auftreten der Alzheimer-Krankheit die Form der senilen, sporadischen Alzheimer-Krankheit von der präsenilen, autosomal-dominanten familiären Erkrankung (FAD, „Familiar Alzheimer’s Disease“) unterscheiden. Darüber hinaus kategorisiert man die Alzheimer-Krankheit nach dem Alter des Patienten, in dem sich die Erkrankung manifestiert.

Sind typische Merkmale vor dem Erreichen des 65. Lebensjahres eindeutig nachgewiesen, so spricht man vom „early onset“ (früher Ausbruch), während hingegen der „late onset“ (später Ausbruch) eine Manifestation nach dem 65. Lebensjahr bedeutet (Jellinger, 2005).

1.4.1 Die sporadische Form der Alzheimer-Krankheit

Bei dem weitaus größeren Anteil (95%) der Alzheimer-Patienten tritt die Krankheit sporadisch auf. Die ersten klinischen Symptome manifestieren sich zumeist erst nach Erreichen des 65. Lebensjahres, es handelt sich demzufolge um einen „late onset“ der Alzheimer-Erkrankung (Breitner and Folstein, 1984; Nee et al., 1983; Reisberg et al., 1983a). Die Entstehung der sporadischen Form kann multifaktoriell bedingt sein, beispielsweise durch Umweltfaktoren oder genetische Prädisposition, die im Falle der sporadischen Erkrankung zwar nicht die Ursache der Krankheit sind, jedoch den Ausbruch beschleunigen und den Verlauf beeinflussen können. Der größte Risikofaktor ist das Alter, gefolgt beispielsweise von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Fettleibigkeit, Typ2-Diabetes oder Artherosklerose (Mayeux et al., 2003).

Das Auftreten eines bestimmten Allels des Apolipoprotein-E (ApoE) als genetischer Risikofaktor kann jedoch das Risiko eines „early-onsets“ erhöhen. ApoE, welches im ZNS an der Regeneration und Degeneration neuronaler Zellen beteiligt ist, indem es die Neuverteilung von Lipiden, Lipid-Abbauprodukten und Cholesterin ermöglicht, existiert in drei Isoformen (E2, E3 und E4), welche durch drei verschiedene Allele kodiert werden. Die ApoE4-Isoform ist in der Lage Amyloid- β zu binden (Strittmatter et al., 1993). Liegt das apoE4-Allel homozygot vor, kommt es zu einer verstärkten A β -Aggregation, was das Risiko erhöht früh an Alzheimer zu erkranken (Castano et al., 1995; Holtzman et al., 2000; Hyman et al., 1996). Die molekulare Grundlage hierfür ist noch nicht geklärt.

1.4.2 Die familiäre Form der Alzheimer-Krankheit

Verschiedene Einflüsse können eine verstärkte APP-Prozessierung über den amyloidogenen Weg bewirken und so das Risiko erhöhen, an Alzheimer zu erkranken. Die Ätiologie der familiären Alzheimer-Demenz (FAD) ist zum Teil genetisch bedingt. Häufig tritt diese Form schon vor dem 50. Lebensjahr auf, in seltenen Fällen sogar schon vor dem 30. Lebensjahr (Breitner and Folstein, 1984; Nee et al., 1983; Reisberg et al., 1983a). Bislang konnten neben dem APP-Gen auf Chromosom 21 zwei weitere Gene identifiziert werden, die zur Generierung von mehr A β_{42} und somit zur Ausbildung der Alzheimer-Pathogenese führen.

Dabei handelt es sich um das Gen für Presenilin 1 (PS1) auf Chromosom 14 und Presenilin 2 (PS2) auf Chromosom 1. Insgesamt sind diese drei Gene an ca. 50 % aller FAD-Fälle beteiligt (Tanzi et al., 1996). Die familiäre Form der Alzheimer-Krankheit konnte bislang in 300 Familien weltweit nachgewiesen werden (Blennow et al., 2006). Alle bislang bekannten Genmutationen fördern die Bildung von amyloidogenen Plaques im Gehirn, jedoch nicht die Bildung der neurofibrillären Bündel. Dies bestätigt die Amyloid-Kaskaden-Hypothese, dass nämlich ein Ungleichgewicht zwischen A β -Produktion und –Abbau im Gehirn das initiale Ereignis ist, welches zur neuronalen Degeneration und Demenz führt.

1.4.2.1 Mutationen im APP-Gen

Alle Alzheimer-verursachenden APP-Mutationen, die bislang identifiziert wurden, treten entweder in oder nahe bei der A β -Region von APP auf. Mutationen der APP-Sequenz im Bereich der β -Sekretase-Schnittstelle, die die Affinität zur β -Sekretase erhöhen, können zu einer höheren Gesamtmenge an Amyloid- β führen (Irie et al., 2005). Mutationen im Bereich der γ -Sekretase-Schnittstellen können zu einer Verschiebung des Verhältnisses von A β_{40} zu A β_{42} führen, welches stärker aggregiert und somit leichter zur Plaque-Bildung führt (Ancolio et al., 1999; Makarova et al., 2004). Treten Mutationen innerhalb der A β -Sequenz auf, so können diese zu verstärktem Aggregationsverhalten von A β_{40} führen (Irie et al., 2005).

1.4.2.2 Mutationen im Presenilin-Gen

Neben den Mutationen im APP-Gen konnten zahlreiche Missense-Mutationen in den Genen für Presenilin 1 und 2 identifiziert werden, die einen frühen Ausbruch der Alzheimer-Krankheit in der fünften bis sechsten Lebensdekade oder sogar früher verursachen (Levy-Lahad et al., 1995; Sherrington et al., 1995). In Zellkulturmodellen, sowie in Tiermodellen und Patienten konnte ein Einfluss von Mutationen im Presenilin-Gen auf die Prozessierung von APP und die vermehrte Generierung des A β_{42} -Peptids gezeigt werden (Borchelt et al., 1996; Citron et al., 1997; Haass, 1997; Haass and Steiner, 2002; Scheuner et al., 1996). Die Mutationen in diesen Genen decken 20% der familiären Fälle der Alzheimer-Krankheit ab (Hyman and Tanzi, 1995).

1.5 Allgemeine Charakterisierung des Amyloid-Vorläuferproteins

Die biochemische Analyse des Amyloid-Proteins führte 1984 zur Isolierung eines 42-43 Aminosäure-langen Peptids als Hauptbestandteil der extrazellulären Ablagerungen (Glenner et al., 1984; Masters et al., 1985a). Ausgehend von der A β -Sequenz wurde das Vorläuferprotein APP identifiziert (Goldgaber et al., 1987; Kang et al., 1987; Robakis et al., 1987; Tanzi et al., 1987b). Mittlerweile sind verschiedene APP-mRNAs des mehr als 170 kb umfassenden APP-Gens beschrieben, die durch alternatives Spleißen von vier der insgesamt 19 Exons entstehen (Kang et al., 1987; Kitaguchi et al., 1988; Ponte et al., 1988; Tanzi et al., 1988; Yoshikai et al., 1990).

1.5.1 Isoformen und Struktur von APP

Humanes APP ist lokalisiert auf Chromosom 21 und umspannt mit 19 Exons eine Länge von ca. 3600 Basenpaaren. Es ist ein Typ-I-Transmembran-Protein, welches durch einen extrazellulären Aminoterminus, einen Transmembranbereich und einen intrazellulären Carboxyterminus gekennzeichnet ist (Dyrks et al., 1988; Kang et al., 1987) (siehe Abb. 5). APP zählt zu einer Proteinfamilie, die auch die APP-homologen Proteine APLP-1 und APLP-2 („amyloid precursor like protein“) umfasst, wobei diese keine A β -Domäne enthalten (Sandbrink et al., 1994; Sprecher et al., 1993; Wasco et al., 1992; Wasco et al., 1993). Die verschiedenen Isoformen von APP werden nach der Anzahl der Aminosäuren (AS) benannt und besitzen eine Molmasse von ca. 100 bis 140 kDa. Als häufigste Translationsprodukte im peripheren System wurden die Isoformen APP₇₇₀ und APP₇₅₁ beschrieben, welche eine Domäne enthalten, deren Sequenz etwa 45% Homologie zu den Kunitz-TypII-Serin-Protease-Inhibitoren (KPI) aufweist (Kitaguchi et al., 1988; Ponte et al., 1988; Tanzi et al., 1988) (siehe Abb. 5). APP₇₇₀ enthält zusätzlich eine Domäne, die Ähnlichkeiten mit dem MRC-OX-2-Antigen auf Thymozyten aufweist (Clark et al., 1985). Die Isoformen APP₇₇₀ und APP₇₅₁ werden im Gehirn vorwiegend von glialen Zellen exprimiert, während die dominierende Isoform im Gehirn des Menschen, APP₆₉₅, der die Domänen KPI und OX-2 fehlen, hauptsächlich von Neuronen exprimiert wird (Golde et al., 1990; Gray and Patel, 1993a; Gray and Patel, 1993b; Kang et al., 1987; Kang and Muller-Hill, 1990; Neve et al., 1988; Tanzi et al., 1987a).

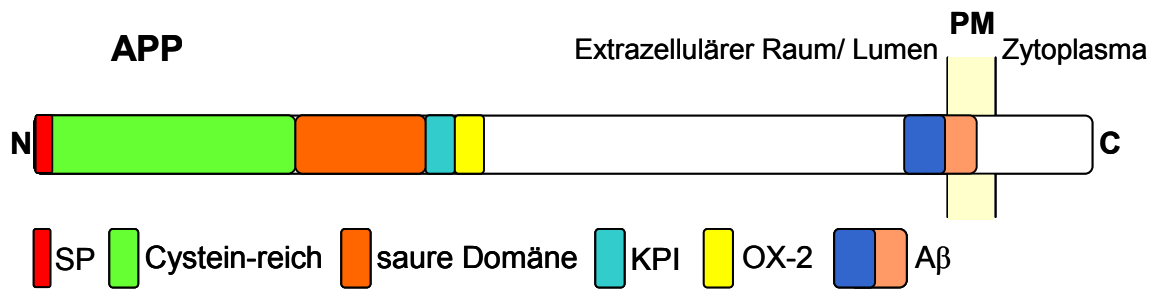


Abbildung 5: Schematische Darstellung der APP-Domänenstruktur

N-terminal ist ein 17 AS großes Signalpeptid (SP) lokalisiert, das die Translokation von APP in das ER vermittelt. Darauf folgt eine Cystein-reiche Domäne, eine saure Domäne, die Kunitz-Protease-Inhibitor-Domäne (KPI), die lediglich in den Isoformen APP₇₇₀ und APP₇₅₁ enthalten ist, die OX-2-Domäne, die nur in APP₇₇₀ vorkommt, und die Amyloid- β -Sequenz (A β). PM: Plasmamembran

Homologe APP-Formen wurden sowohl in Säugern (APLP-1 und APLP-2), als auch in *Drosophila melanogaster* (APPL) und *Caenorhabditis elegans* (APL-1) gefunden (Daigle and Li, 1993; Rosen et al., 1989; Wasco et al., 1992; Wasco et al., 1993).

1.5.2 Funktion von APP

Bis heute liegen zwar bereits Erkenntnisse über die mögliche physiologische Funktion von APP vor, es gibt jedoch lediglich Hinweise auf einige zum Teil sehr grundlegende potentiell APP-abhängige Mechanismen, so soll APP beispielsweise in die Entwicklung des Nervensystems involviert sein. Ein interessanter Hinweis auf die physiologische Rolle von APP im Gehirn stammt aus der Analyse von Mausmodellen. *app*-, *aplp1*- oder *aplp2*-defiziente Mäuse zeigten nur geringe neurologische Abnormalitäten gegenüber Kontrolltieren, dies galt ebenso in *app*^{-/-}*aplp1*^{-/-}-Mäusen (Heber et al., 2000). Jedoch starben jene Tiere kurz nach der Geburt, die eine kombinierte Gendefizienz mit *aplp2* aufwiesen, nämlich *app*^{-/-}*aplp2*^{-/-} oder *aplp1*^{-/-}*aplp2*^{-/-}. Mäuse defizient für alle drei Mitglieder der Genfamilie wiesen eine sehr frühe Letalität auf, bedingt durch kortikale Fehlbildungen, darunter Lissenzephalie und neuronale Migrationsdefizite (Herms et al., 2004). Dies lässt auf eine essentielle Funktion von APP und seinen Homologen in der frühen Entwicklung schließen (Dawson et al., 1999; Heber et al., 2000; Zheng et al., 1995). Darüber hinaus unterstützen APP und das homologe Protein APPL aus *D. melanogaster* die Verzweigung der Axone nach traumatischem Streß im Gehirn (Jellinger, 2004; Li et al., 2004). Im Gehirn von Trauma-Patienten wurden verstärkt A β /ApoE-Ablagerungen und eine sehr hohe APP-Expression nachgewiesen. Während der neuronalen Maturierung und Differenzierung wird die Expression von APP ebenfalls hochreguliert (Bibel et al., 2004; Hung et al., 1992). Weiterhin scheint APP eine Rolle in der

Entwicklung neuromuskulärer Synapsen zu spielen (Wang et al., 2005). APP hat zusätzlich über das Aktin-Zytoskelett einen Einfluss auf die Zellmigration und spielt durch Interaktion mit bestimmten Proteinen, unter anderem Fe65, X11/Mint1 und Dab1, eine Rolle in der Signaltransduktion (Homayouni et al., 1999; McLoughlin and Miller, 1996; Nishimoto et al., 1993; Sabo et al., 2001). Offensichtlich ist APP auch durch Interaktion mit Adhäsionsproteinen, wie Integrinen oder Lamininen, an der zellulären Adhäsion beteiligt (Fossgreen et al., 1998; Milward et al., 1992; Saitoh and Imoto, 1989; Storey et al., 1996). APP₇₇₀ und APP₇₅₁ können zudem als Inhibitoren von Serin-Proteasen, wie Trypsin und Chymotrypsin, fungieren und somit die Inhibierung der Serum-Protease XIa in der Blut-Koagulationskaskade verursachen (Smith et al., 1990).

1.5.3 APP-Transport und -Glykosylierung

Das Typ-I-Transmembranprotein APP wird kotranslational in das endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert und von dort entlang des sekretorischen Weges in den Golgi-Apparat transportiert, von wo aus es weiter an die Plasmamembran und in die Endosomen gelangt (siehe Abb. 6). Nach der Reifung in ER und Golgi-Apparat werden lediglich 30% des gebildeten APP an die Zellmembran transportiert, wo ein Großteil der α -Proteolyse stattfindet (Knops et al., 1992; Weidemann et al., 1989) (siehe unter Kapitel 1.2.1). Alternativ kann APP in saure Kompartimente, wie Endosomen, internalisiert werden und nachfolgend ins TGN transportiert werden, wo die enzymatische Spaltung durch die β -Sekretase erfolgt (siehe unter Kapitel 1.2.2). Die Prozessierung durch die γ -Sekretase geschieht an der Plasmamembran, in späten Endosomen oder im TGN (Vetrivel and Thinakaran, 2006). APP kann zusätzliche Wege beschreiten, nämlich ein „Recycling“ von der Plasmamembran, den retrograden Transport von der Membran zum TGN, sowie den Transport in die degradierenden Lysosomen (Vetrivel and Thinakaran, 2006) (siehe Abb. 6). Änderungen im subzellulären APP-Transport, die die Dauer der Interaktion von APP und seinen Sekretasen beeinflussen, bedingen demzufolge auch eine Änderung der APP-Prozessierung. In Neuronen wird APP anterograd durch Kinesin in tubulären Vesikeln transportiert (Ferreira et al., 1992; Kaether et al., 2000; Kamal et al., 2000; Koo et al., 1990; Simons et al., 1995; Sisodia et al., 1993). Während des Durchwanderns von ER und Golgi-Apparat wird APP modifiziert. Den APP-Isoformen ist eine Vielzahl von kovalenten posttranslationalen Modifizierungen gemein, zu denen neben der N-Glykosylierung auch die O-Glykosylierung, sowie die Phosphorylierung, die Tyrosin-Sulphatierung und proteolytische Spaltungen zählen (Oltersdorf et al., 1989; Weidemann et al., 1989). Alle Translationsprodukte des APP besitzen zwei N-

Glykosylierungs-Stellen (Asn₄₆₇ und Asn₄₉₆ der APP₆₉₅-Isoform), von denen jeweils eine oder beide glykosyliert werden, abhängig von den exprimierenden Zelltypen (Pahlsson et al., 1992; Yazaki et al., 1996).

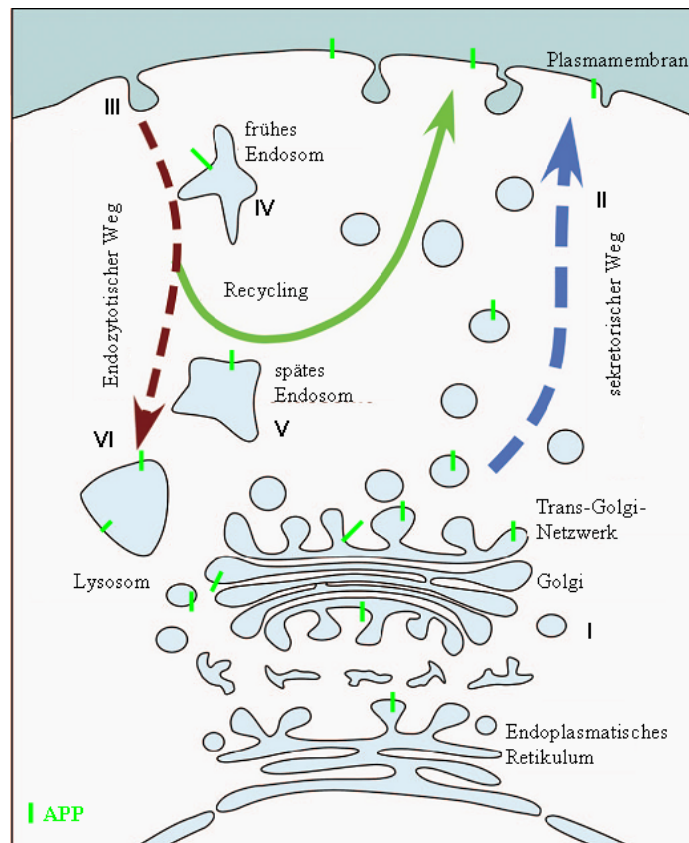


Abbildung 6: Darstellung des intrazellulären Transports von APP

Nach der posttranslationalen Modifikation in ER und Golgi (I) wird APP mittels sekretorischer Vesikel an die Plasmamembran transportiert (II), wo es entweder prozessiert oder endozytiert wird. Nach der Endozytose (III) wird APP entweder in Lysosomen degradiert (VI), wieder mit frühen Endosomen an die Zelloberfläche transportiert (IV) oder mittels später Endosomen retrograd in den Golgi gebracht (V). [modifiziert nach (Vetrivel and Thinakaran, 2006)]

Es konnten bereits einige Risikofaktoren beschrieben werden, welche die Gefahr der Alzheimer-Erkrankung durch Veränderung des APP-Transports oder des BACE1-Schnitts erhöhen. So führt der Knock-down des mutmaßlichen Transport-Faktors Ubiquilin1 zur Stimulation des APP-Transports zur Plasmamembran und nachfolgender Sekretion von APP α , APP β und dem A β -Peptid (Hiltunen et al., 2006). Die Überexpression des Vps10p-Rezeptors SorLa beispielsweise führt zu einer Blockade des APP-Transports und zu verminderter APP-Prozessierung, was eine Senkung der A β -Generierung bedeutet (Haass et al., 1993; Schmidt et al., 2007; Yamazaki et al., 1995). Im Gegenzug resultiert ein SorLa-Knock-down in einer verstärkten β -Sekretase-Prozessierung von APP (Rogaeva et al., 2007).

Die Hemmung der Endozytose von APP hingegen führt zu einer verringerten A β -Bildung (Koo and Squazzo, 1994; Soriano et al., 1999). Der Transport von APP spielt demzufolge für dessen nachfolgende Prozessierung eine große Rolle, eine Beeinflussung des Transports kann ein mögliches Risiko für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit darstellen.

1.6 Transport und Glykosylierung von Proteinen

Da in vorliegender Arbeit neben APP der Transport und die Glykosylierung von weiteren Proteinen eine Rolle spielt, soll in diesem Kapitel genauer auf Transport und Glykosylierung eingegangen werden.

Zusammen mit der Plasmamembran bilden das ER, der Golgi-Apparat, sowie Endosomen und Lysosomen ein funktionelles Netzwerk aus, welches für die Modifizierung und Lokalisierung von Proteinen und Lipiden, für die Sekretion, sowie für die Endozytose verschiedenster Proteine und Verbindungen verantwortlich ist. Der Transport von Proteinen geschieht zu einem erheblichen Teil mit Hilfe von Transportvesikeln, wobei ein Vesikel entweder lösliche Proteine im Inneren oder in seiner Lipiddoppelschicht inkorporierte Transmembran-Proteine trägt (Palade, 1975). Der sekretorische Weg beginnt mit der Signalpeptid-vermittelten kotranslationalen Translokation der ungefalteten Form eines Proteins aus dem Zytoplasma in das ER (Mothes et al., 1997; Rapoport, 1992). Im ER werden die Proteine glykosyliert, gefaltet und zusammgebaut, um als biologisch aktive Moleküle an die Zelloberfläche oder in bestimmte Kompartimente transportiert oder sekretiert werden zu können (Sitia and Braakman, 2003). Auf dem Weg zum Zielort müssen anschließend das ER-Golgi-Intermediärkompartiment („ERGIC“) und Bereiche des Golgi-Apparates durchquert werden. Einige Proteine werden anschließend retrograd vom Golgi zum ER transportiert. Eine Funktion des retrograden Transports ist das Zurückführen von Proteinen, die normalerweise im ER lokalisiert sind, jedoch im Vesikelfluss des anterograden Transports in den Golgi gelangt sind. Der Rücktransport ist Rezeptor-vermittelt und geschieht mittels eines Rücktransport-Signals, wie beispielsweise der KDEL-Sequenz in Säugern, die sich am C-Terminus von überwiegend löslichen Proteinen befindet (Munro and Pelham, 1987; Scheel and Pelham, 1996). Für Typ-I-Transmembranproteine konnte gezeigt werden, dass ein C-terminales Di-Lysin-Motiv (K(X)KXX-Motiv, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt) als Rückführungssignal dient, was unter Kapitel 2.3.2 aufgegriffen werden wird (Jackson et al., 1990; Nilsson et al., 1989).

Die Glykosylierung der Proteine geschieht während des Transportes innerhalb des sekretorischen Weges. Für die N-Glykosylierung existieren zwei verschiedene Erkennungs-Sequenzen, N-X-S (Asparagin - beliebige AS außer Prolin – Serin) und N-X-T (Asparagin – X – Threonin) (Bause, 1983). Auf die Asparaginseitenkette in diesen Erkennungs-Sequenzen kann kotranslational von dem an der ER-Membran lokalisierten Träger-Lipid Dolicholphosphat ein aktiviertes „Core“-Oligosaccharid auf eine wachsende Polypeptidkette übertragen werden (Burda and Aebi, 1999; Gahmberg and Tolvanen, 1996; Kornfeld and Kornfeld, 1985), welche nun vom „Mannose-reichen“-Typ ist (Silberstein and Gilmore, 1996). Darauf folgend werden im ER enzymatisch Zuckerreste abgespalten (Kornfeld and Kornfeld, 1985; Moremen et al., 1994) (siehe Abb. 7). Anschliessend beginnt der Export des Proteins in den Golgi-Komplex. In den Kompartimenten des Golgi-Apparates werden enzymatisch weitere Zuckerreste entfernt, sowie andere angehängt, das Protein wird komplex glykosyliert (Lyckman et al., 1998). Während im ER die Grund-Glykosylierung aller Proteine eine einheitliche Struktur und Zusammensetzung der Oligosaccharide aufweist und unter anderem eine Rolle in der Proteinfaltung und Qualitätskontrolle einnimmt, nehmen die Proteine im Golgi-Apparat diverse komplexe Strukturen mit heterogener Oligosaccharid-Zusammensetzung an, die Zelltyp- und Spezies-spezifisch sind und unterschiedliche Funktionen der reifen Proteine vermitteln, wie Zellerkennung oder Signalwirkung (Kornfeld and Kornfeld, 1985; Paulson and Colley, 1989; Varki, 1993).

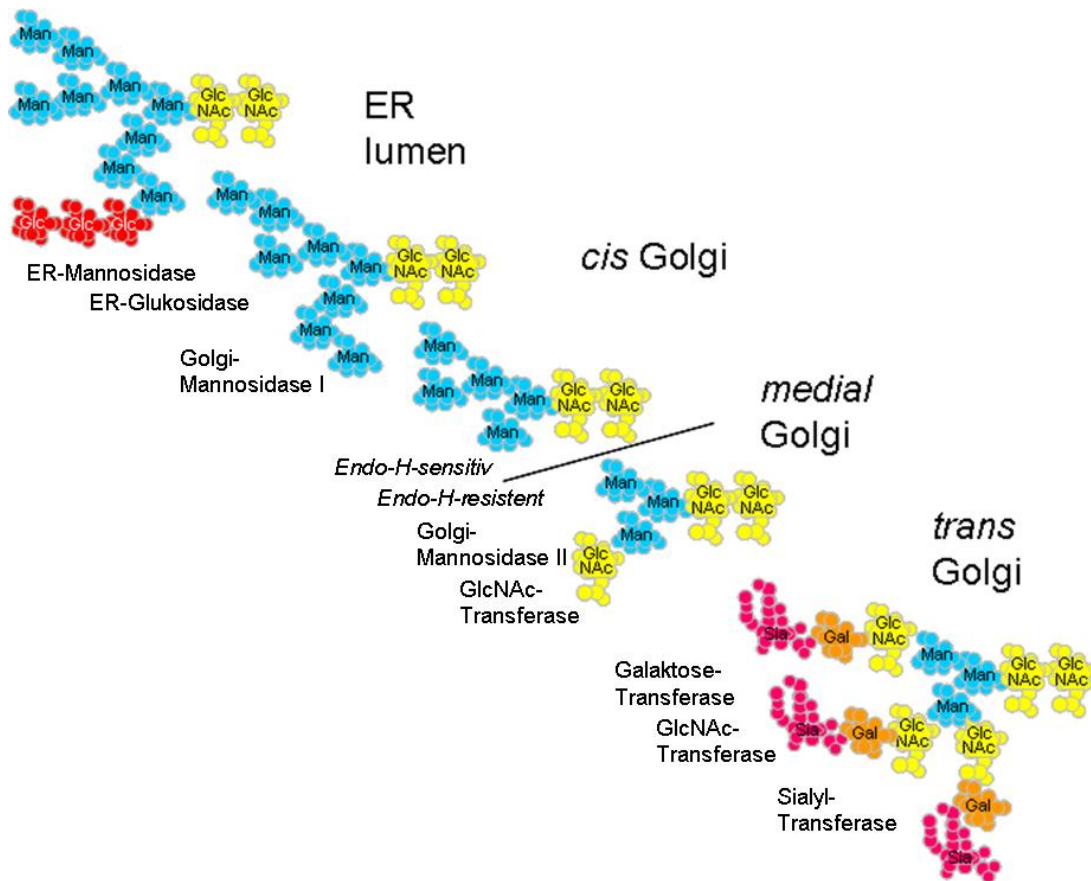


Abbildung 7: Prozessierung der N-gebundenen Oligosaccharide im ER und den Golgi-Kompartimenten

Folgende Enzyme sind an der Prozessierung beteiligt: ER-Mannosidase, ER-Glukosidase, Golgi-Mannosidase I, Golgi-Mannosidase II, GlcNAc-Transferase, Galaktose-Transferase und Sialyltransferase. Endo-H bezieht sich auf das Enzym Endoglykosidase H, welches in der Lage ist, „Mannose-reiche“-Oligosaccharidketten zu spalten, jedoch keine komplexer glykosylierten Ketten mehr, worauf nachfolgend unter Kapitel 2.1.4 eingegangen wird.

[Quelle: http://www.steve.gb.com/images/science/glycosylation_flowchart.png]

Neben der N-Glykosylierung an Asparagin können Oligosaccharide auch kovalent an das Sauerstoffatom des Serin oder Threonin gebunden werden. Diese häufig vorkommende Bindung wird als O-Glykosylierung bezeichnet und erfolgt ausschließlich im Golgi-Apparat. Ein komplex-glykosyliertes Protein durchläuft also unterschiedliche Glykosylierungsstadien: die unglykosylierte Form, die Mannose-reiche Glykosylierungsform und schließlich die komplexe Glykosylierung, die durch das Auftreten von N-Azetyl-Glukosamin, Galaktose, Sialinsäure und L-Fukose gekennzeichnet ist.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Beeinflussung des Transports von APP und der nachfolgenden APP-Prozessierung stellen möglicherweise einen Risikofaktor der Alzheimer-Krankheit dar. Da bislang nur sehr wenig über die Regulation des APP-Transports und der APP-Prozessierung durch α - und β -Sekretase bekannt ist, sollen neue Regulatoren der APP-Ektodomänenspaltung identifiziert werden. Mittels eines Expressions-Klonierungs-Screens einer cDNA-Bibliothek aus dem Gehirn wurde nach Modulatoren der APP-Spaltung gesucht, die den Zugang von APP zu seinen Sekretasen kontrollieren und somit auch den α - und β -Sekretase-Schnitt beeinflussen. Ein dabei identifizierter cDNA-Klon eines Transmembran-Proteins ist bis dato noch unbeschrieben, lediglich die Sequenz des auf Chromosom 1 kodierten Gens ist in der NCBI-Datenbank als TMEM59 („transmembrane protein 59“) vermerkt. Aufgabe vorliegender Doktorarbeit ist die generelle Charakterisierung des Proteins TMEM59, sowie die nähere Beschreibung und funktionelle Analyse dessen Einflusses auf die Prozessierung und Sekretion von APP.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll die generelle Charakterisierung von TMEM59 erfolgen, sowie sein Vorkommen in unterschiedlichen Organismen und Geweben analysiert werden. Parallel werden Modifikationen, wie beispielsweise Glykosylierungen, und subzelluläre Lokalisierung untersucht. Dies soll *in-vitro* mittels molekularbiologischer und proteinbiochemischer Methoden erfolgen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von TMEM59 auf die APP-Prozessierung und –Sekretion. Es stellt sich die Frage, ob TMEM59 den Transport, die Modifizierung oder die Prozessierung von APP beeinflusst. Zur Beantwortung dieser Fragen werden ebenfalls molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden verwendet. Des Weiteren wird ein möglicher Effekt von TMEM59 auf weitere Proteingruppen analysiert und mittels einer Domänen-Deletions-Analyse die für den Effekt verantwortliche Domäne gesucht.

2. Ergebnisse

2.1 Allgemeine Charakterisierung von TMEM59

Um Modulatoren der APP-Prozessierung zu identifizieren, wurde von Dr. Stefan Lichtenthaler ein Expressions-Screen in speziellen HEK293-Zellen durchgeführt. Diese Zellen exprimieren stabil ein APP-Fusionsprotein, an dessen N-Terminus die Ektodomäne der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) gekoppelt ist (Lichtenthaler et al., 2003). cDNAs einer humanen Gehirn-cDNA-Bibliothek wurden in diese Zelllinie transfiziert und mittels SEAP-Aktivitätsbestimmung im Zellkultur-Überstand die Menge an α - oder β -Sekretase-prozessiertem SEAP-APP im Vergleich zu Kontroll-transfizierten SEAP-APP-Zellen analysiert.

Mittels diesen Ansatzes konnte Dr. Lichtenthaler die cDNA des bis dahin unbeschriebenen Proteins TMEM59 identifizieren, dessen Expression die Prozessierung von APP zu inhibieren scheint.

2.1.1 Sequenz- und Domänenanalyse von TMEM59

Zunächst wurde eine Sequenzanalyse von TMEM59 durchgeführt. Die Aminosäuresequenz ist 323 Aminosäuren lang und weist vier auffällige Abschnitte auf, ein mutmaßliches Signalpeptid, eine vermeintliche N-Glykosylierungs-Stelle, eine mögliche Transmembran-Domäne und ein PDZ-Bindemotiv (siehe Abb. 8).

```

1      MAAPKGSSLWVRTQLGLPPLLLLLTMALAGGSGTASAEAFDSVLGDTASCHR
51     ACQLTYPLHTYPKEEELYACQRGCRLFSICQFVDDGIDLNRTKLECESAC
101    TEAYSQSDEQYACHLGCQNQLPFAELRQEQLMSLMPKMHLLFPLTLVRSF
151    WSDMMSAQSFITSSWTFYLQADDGKIVIFQSKPEIQYAPHLEQEPTNLR
201    ESSLSKMSYLQMRNSQAHRNFLEDGESDGFLRCLSLNSGWILTTTTLVLSV
251    MVLLWICCATVATAVEQYVPSEKLSIYGDLEFMNEQKLNRYPASSLVVVR
301    SKTEDHEEAGPLPTKVNLAHSEI

```

Abbildung 8: Sequenz und Domänen von TMEM59

Das Signalpeptid ist blau dargestellt, die N-Glykosylierungsstelle grün, die Transmembrandomäne rot und das PDZ-Bindemotiv rosa.

Die Aminosäuresequenz des Proteins wurde in das Transmembrandomänen-Vorhersage-Programm TMHMM-Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) eingespeist,

woraufhin die rot markierte Sequenz als mögliche Transmembran-Domäne angegeben wurde (siehe Abb. 9).

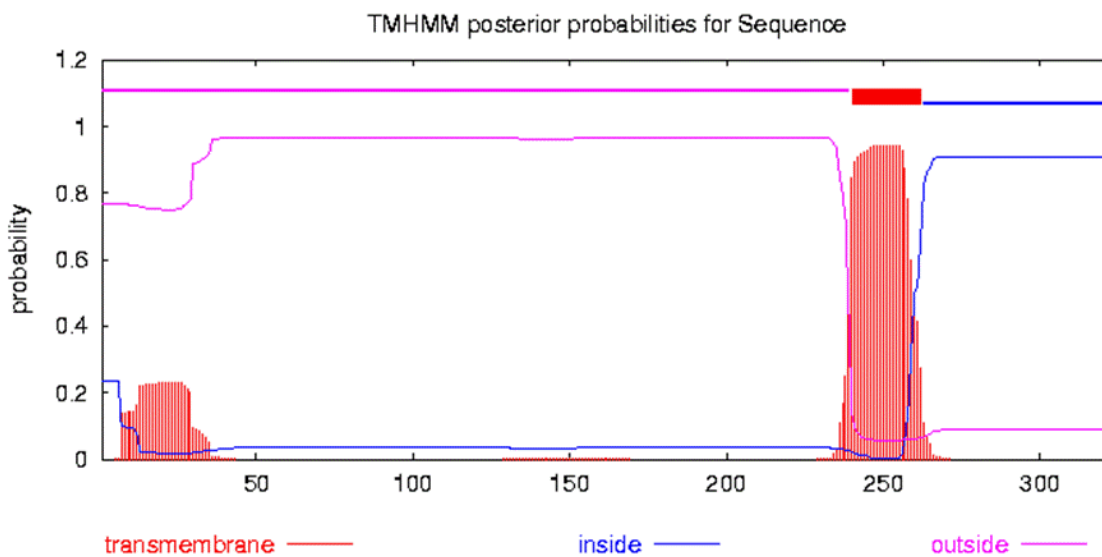


Abbildung 9: Transmembran-Domänen-Vorhersage für TMEM59

Die Vorhersage wurde mittels des Programms TMHMM-Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) ermittelt.

Die rot-hervorgehobenen Bereiche kennzeichnen eine hydrophobe Sequenz, die eine Signalpeptid- oder Transmembrandomäne darstellen können. Der kleinere rote Bereich in der Vorhersage weist auf eine kurze hydrophobe Sequenz hin, die als Signalpeptid fungieren könnte. Auf das Vorhandensein dieses möglichen Signalpeptids wird unter Kapitel 2.1.5 eingegangen.

Die Aminosäuresequenz -SEI könnte ein mögliches PDZ-Bindemotiv für PDZ-Domänenenthaltende Proteine sein (Ponting et al., 1997; Zimmermann, 2006), welches die Sequenzkriterien eines Klasse-I-PDZ-Bindemotivs erfüllt: -X-S/T-X-Φ-COOH, wobei X für eine beliebige und Φ für eine hydrophobe Aminosäure steht, im Falle von TMEM59 Isoleuzin (Brone and Eggermont, 2005). Die mutmaßliche N-Glykosylierungsstelle wird unter Kapitel 2.1.4 behandelt, weitere Domänen konnten in diesem Protein nicht entdeckt werden.

2.1.2 TMEM59 besitzt ein humanes Homolog und Orthologe

Das humane Protein TMEM59 weist mit den Sequenzen aus Maus (*mus musculus*), Ratte (*rattus norvegicus*) und Zebrafisch (*danio rerio*) eine hohe Übereinstimmung auf. In

Abbildung 10 ist der Sequenzabgleich dargestellt, der den hohen Konservierungsgrad von TMEM59 verdeutlicht. Die Ähnlichkeit zu der Maus-Sequenz beträgt 97,2%, zu dem Zebrafisch schließlich noch 57,9%.

```

mus      MAAPKGKLVWQAQLGLPPLLLLTMALAGGSGTAAAEAFDSVLGDTASCHRACQLTYPLHT 60
rattus   MAAPKGKLVWQAQVGLPPLLLLTMALAGGSGTAAAEAFDSVLGDTASCHRACQLTYPLHT 60
homo     MAAPKGSLWVRTQLGLPPLLLLTMALAGGSGTASAEAFDSVLGDTASCHRACQLTYPLHT 60
danio    MLQFGG--RVRGVPALVSLILVALAAAS-----SDLFDNQLGDIN YCKKQCQMSIKNKS 52
          *  *      *:  .*  .*::::*  * .      : :  ** .  ***  *::  ***:  : :

mus      YPKEEELYACQRGCR LFSICQFVDDGLDLNR TKLECESACTEAYSQPDEQYACHLGCQDQ 120
rattus   YPKEEELYACQRGCR LFSICQFVDDGIDLNR TKLECESACTEAYSQPDEQYACHLGCQDQ 120
homo     YPKEEELYACQRGCR LFSICQFVDDGIDLNR TKLECESACTEAYSQSDEQYACHLGCQDQ 120
danio    PAKDSIMNACHRGCR LYSICQFVNGNTGINTSKEECQGACQEAYSKLLEQEACSTGCASQ 112
          .*: . :  ***:*****:*****:.. . : * : *  ***:.*  *****:  **  **  *  . *

mus      LPFAELRQEQLMSLMPRMHLLFPLTLVRSFWS DMMSAQSFITSSWTFYQLQADDGKIVIF 180
rattus   LPFAELRQEQLMSLMPRMHLLFPLTLVRSFWS DMMSAQSFITSSWTFYQLQADDGKIVIF 180
homo     LPFAELRQEQLMSLMPKMHLFPLTLVRSFWS DMMSAQSFITSSWTFYQLQADDGKIVIF 180
danio    PAEPEIKRRK LKALTRPKPISVMEAVSSWCNDIVSSAQSFISSTWTFYQLQADDGKVVVF 172
          . . *::::.* : * : : : : * * : .*: . *****:*****:*****:*. *

mus      QSKPEIQY-APQLEQEPTNLRESSLSKMSYLQMR---NSQAHRN-----Y 221
rattus   QSKPEIQY-APQLEQEPADLRQSSLSKMSYLQMR---NSQAHRN-----Y 221
homo     QSKPEIQY-APHLEQEPTNLRESSLSKMSYLQMR---NSQAHRN-----F 221
danio    QSQPEIEYSLPELQAPRSNVVDPKWPQVNSHTQRPHTGGRLHRERNAAKPGVKGNVSH 232
          **:***:*  *:*  : : : : . . . : . * . . : ** : .

mus      LEEEEESD-GFLRCLSLNSG---WILTTTLVFSVMVLLWICCAAVATAVEQYVPPEKLSIY 277
rattus   LEDEESD-GFLRCLSLNSG---WILTTTLVLSVMVLLWICCAAVATAVEQYVPPEKLSIY 277
homo     LEDGESD-GFLRCLSLNSG---WILTTTLVLSVMVLLWICCATVATAVEQYVPSEKLSIY 277
danio    AEDPAAEHDFLGCMSRRSGLPRWILAACLFLSIMVMLWLSCASLVTAPEQHIKT-QLSIN 291
          * :  : : .** *:*  .*  *****: * .*:***:***:***:.*  ***: . :***

mus      GDLEFMNE-QKLSRYP-APSLVIVRSQTEEHEEAGPLPTKVNLAHSEI 323
rattus   GDLEFMNE-QKLSRYP-APSLVVVRSQTEEHEEAGPLPTKVNLAHSEI 323
homo     GDLEFMNE-QKLNRY P-ASSLVVVRSKTEDHEEAGPLPTKVNLAHSEI 323
danio    GDKEFMDDAQKVNPHYHLPVIAMTIAQSEESKEAGPLPVKVDLSKTSL 339
          **  ***:  ***:  *  . : . . : : : : : *****.***: : : . :

```

Abbildung 10: Vergleich der Proteinsequenzen aus Mensch, Maus, Ratte und Zebrafisch

Der Vergleich der Protein-Sequenzen wurde mittels des „ClustalW“-Programmes von EMBL-EBI durchgeführt. "*" zeigt identische Reste an, ":" ähnliche Reste, die konserviert scheinen, sowie "." ähnliche Reste, die semi-konserviert zu sein scheinen.

TMEM59 tritt in fast allen Vertebraten auf, ist jedoch nicht in Invertebraten, wie *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster* vertreten. Interessanterweise gibt es jedoch Vertreter der Insekten, die Orthologe zu TMEM59 aufweisen, zum Beispiel *Ixodes scapularis* mit einer Sequenz-Ähnlichkeit von 44%.

Im Menschen existiert ein homologes Protein zu TMEM59 mit einer Übereinstimmung von 32% (siehe Abb. 11). Dieses Protein wurde bereits als mutmaßliches Typ-I-Transmembran-Protein BSMAP („Brain-Specific Membrane-Anchored Protein“/TMEM59L) beschrieben,

das in hohem Grad im Gehirn exprimiert wird, wobei eine Expression auch in Zellen anderer Gewebe nachweisbar ist, beispielsweise in den humanen Nierenzellen HEK293 (Elson et al., 1999). Über BSMAP ist nichts Weiteres bekannt, als dass es ebenfalls eine mögliche N-Glykosylierungsstelle aufweist und nicht an der Zelloberfläche nachweisbar ist.

TMEM59	MAAPKGSLVRTQLGLPPLLLLTMALAG--GSGTASAEAFDSVLGDTASHRACQLT---	55
BSMAP	-----MAAVALMPPPLLLLLLLLLLASPPAASAPSARDEFAPQLGDTQNQLECRDRDLG	52
TMEM59	-----YPLHTYPKEEELYACQRGCRLFSICQFVDDGIILNRTKLCESACTEAVS	135
BSMAP	POPSQAGLEGASESPYTRAVLISACERGCRLFSICRFVAPSSKFNATQTCEBAACVEAV	112
TMEM59	QSDEQYACHLGCGQLPFAELRQELMSLPKMHLLFPLTLVRSFVSDMDSACSFITSS	155
BSMAP	KEAEQQACSHGCVSQPAEPEPEQKRKVLEAPSG--ALSLDLFSTLCNDLVNSACQGEVSST	171
TMEM59	UTFYLQADDGXIVFQSKPEIQ-----YAPELEQEPTNLRESSLSSK	216
BSMAP	UTYYLQTDNGXVVFQTPQIVESLGFQGGRLQRVEVTVRGSHPEALEVH7DPVGPLDKVR	231
TMEM59	MSYLQMRNSQARMFLEDGESDGFLRCLSINSG-----WILTTIVLSVMVLLWCCATVAT	253
BSMAP	KAKIRVKTSSKAKVESEEPQDNDFLSCMSRRSGLPRWILACCIFLSVLVMLWLSCSTLVI	231
TMEM59	AVECVVPSEKLSIYGDLEFMNEQKLNRYPASSIVVVRSSKTEDEEEAGPLTRKVNLAHSEI	323
BSMAP	APGCHLKFQPLTLEQHKGFMEPQWPLYVPPFSHACKCS-----LPFYKLKLDLTKL	342

Abbildung 11: Sequenz-Vergleich zwischen TMEM59 und BSMAP

Vergleich der Protein-Sequenz von TMEM59 und BSMAP, identische Reste sind in dunkelgrau, ähnliche Reste in hellgrau unterlegt. Ermittelt wurde der Vergleich mittels des „AlignX“-Programmes von Vector-NTI (Invitrogen). Die Transmembran-Domäne ist durch Unterstreichung hervorgehoben, die mögliche N-Glykosylierungs-Stelle mit einem Sternchen gekennzeichnet.

2.1.3 TMEM59 ist ubiquitär exprimiert

Um zu überprüfen, in welchen humanen Geweben TMEM59 exprimiert wird, wurde eine TMEM59-spezifische cDNA-Sonde, welche den Bereich 67-898 bp der kodierenden Sequenz von TMEM59 repräsentiert, auf einen „human multiple tissue Northern-Blot“ hybridisiert. Auf dem Northern-Blot ist in acht Spuren Gesamt-RNA aus den folgenden humanen Geweben aufgetragen: Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Muskel, Niere und Pankreas. Die Menge an RNA pro Spur auf diesem Northern-Blot ist so abgeglichen, dass ein konsistentes Signal für ein „housekeeping“-Gen erlangt wird, in diesem Falle β -Aktin. Daher kann der tatsächliche Gehalt an RNA pro Spur unter den verschiedenen Proben variieren, das Signal für β -Aktin sollte jedoch gleichbleibend sein.

Nach Hybridisierung des Blots mit der TMEM59-cDNA-Sonde sind bei 1,35 kb und ca. 2 kb zwei unterschiedliche Transkriptvarianten zu detektieren (siehe Abb. 12). Diese beiden Varianten unterscheiden sich in ihrer 3'-UTR („untranslated region“), was anhand der NCBI-

EST („expressed sequence tag“-)Datenbank ermittelt werden konnte. Bei langer Exposition scheint ersichtlich, dass diese zwei Transkripte in allen Geweben exprimiert werden, in Gehirn und Lunge jedoch deutlich schwächer, als in den anderen Gewebetypen. Nach der Entfernung der radioaktiven TMEM59-Sonde wurde der Northern-Blot mit einer von BD Bioscience zur Verfügung gestellten β -Aktin-Sonde hybridisiert. Durch das deutlich schwächere β -Aktin-Signal in der Spur, in der die RNA aus dem Gehirn geladen waren, zeigte sich, dass dort im Vergleich zu den anderen Spuren deutlich weniger RNA geladen war. Dieser Befund relativiert das deutlich schwächere Signal von TMEM59 in dieser Spur, TMEM59 wird also auch im Gehirn und somit ubiquitär exprimiert. Eine Aussage über die Quantität der Expression ist nicht zu treffen. In den Herz- und Muskel-Spuren treten bei Hybridisierung der β -Aktin-Sonde bei 1,8 kb und 2,4 kb zwei zu erwartende Isoformen auf, in den restlichen Geweben ist hingegen nur die 2,4 kb-Isoform vertreten.

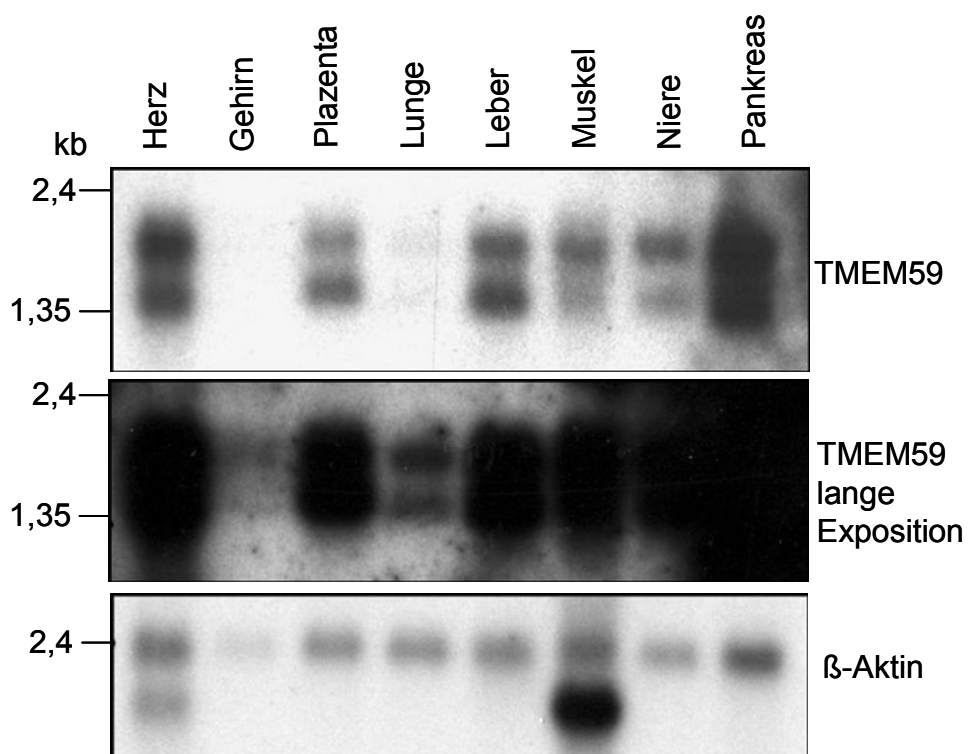


Abbildung 12: TMEM59 wird ubiquitär exprimiert

Hybridisierung der TMEM59-cDNA-Sonde, welche den Bereich 67-898 bp der kodierenden Sequenz von TMEM59 repräsentiert, und nachfolgend einer β -Aktin-Sonde (BD Bioscience) auf einen „human multiple tissue Northern-Blot“, auf dem Gesamt-RNA unterschiedlicher Gewebetypen aufgetragen ist.

TMEM59 wurde von Dr. Lichtenthaler als Klon aus einer humanen Gehirn-cDNA-Bibliothek isoliert, was ebenfalls die Expression von TMEM59 im Gehirn zeigt (siehe unter Kapitel 2.1). Zusätzlich finden sich in der NCBI-EST-Datenbank weitere Einträge die belegen, dass TMEM59 in Gehirngewebe vorkommt, nämlich in humanen Neuroblastom-Zellen, sowie in humanem adultem und fetalem Gehirn.

2.1.4 Membranprotein-Klassifizierung und Signalpeptid-Vorhersage

2.1.4.1 *TMEM59 trägt ein Signalpeptid*

Proteine, die für den Transport in das ER bestimmt sind, weisen in ihrer Aminosäuresequenz ein Signal auf, welches sie spezifisch zur ER-Membran zielleitet (Blobel and Dobberstein, 1975). Bei sekretorischen oder Membran-Proteinen besteht das Signal im Allgemeinen aus einem 15-40 Aminosäure-langen N-terminal-lokalisiereten Signalpeptid. Die Primärstruktur des Signalpeptids ist nicht konserviert, dennoch können drei verschiedene Bereiche unterschieden werden: ein zentraler hydrophober Kern wird N-terminal von positiv geladenen Aminosäuren und C-terminal von polaren Aminosäuren flankiert. In den meisten Fällen wird die Signalsequenz nach dem Membrandurchtritt durch die membranständige Signalpeptidase proteolytisch vom eigentlichen Protein abgespalten. Die Schnittstelle wird dabei durch kleine Aminosäurereste in den Positionen -3 und -1 der C-terminalen polaren Reste der Signalsequenz definiert (Steger, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Signalpeptid-Sequenz mittels des Vorhersage-Programms SignalP bestimmt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Nielsen et al., 1997). Als Ergebnis werden verschiedene „scores“ für jede Position in der zu analysierenden Aminosäuresequenz geliefert, wobei der **S-score** die Wahrscheinlichkeit liefert, mit der das entsprechende Peptid ein Signalpeptid ist, wohingegen der **C-score** die Position der Spaltstelle angibt. Das Produkt von C-score und S-score ist der sogenannte **Y-score**, welcher die genauere Schnittstellen-Vorhersage darstellt. Das Programm definierte das Signalpeptid von TMEM59 von Aminosäure 1-35 (siehe Abb. 13).

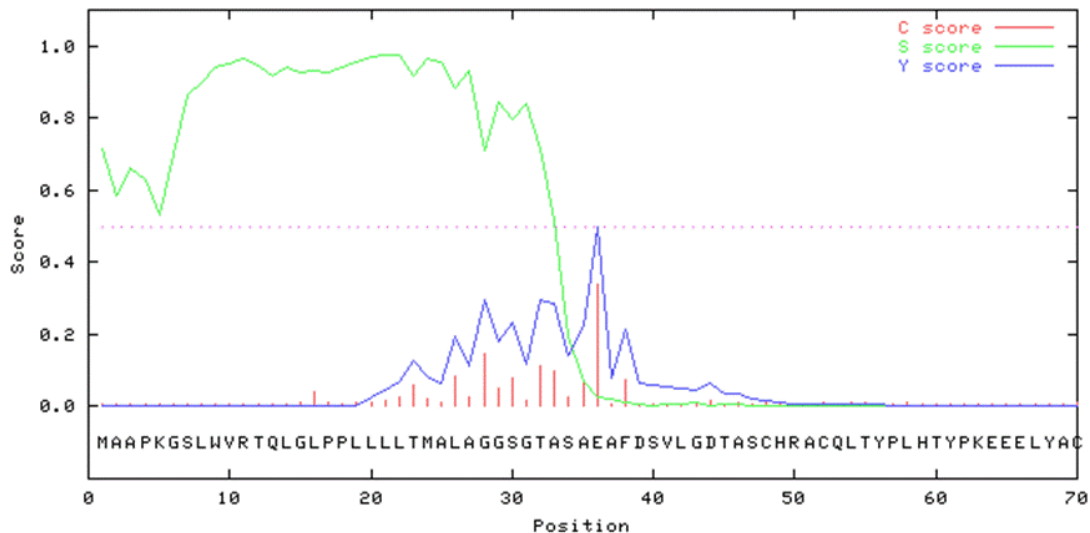


Abbildung 13: Vorhersage des TMEM59-Signalpeptids

Dargestellt ist eine Teilsequenz von Aminosäure 1-70. Die Vorhersage erfolgte unter Verwendung des Programmes „SignalP“ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

Auf dieses vorhergesagte Signalpeptid trifft zwar die -3/-1-Regel zu, jedoch ist das Vorkommen von zwei Prolinen an den Positionen 17/18 etwas außergewöhnlich. Aus diesem Grunde wurde experimentell überprüft, ob TMEM59 tatsächlich ein Signalpeptid enthält.

2.1.4.2 *TMEM59 ist ein Typ-I-Membranprotein*

Handelt es sich bei der im SignalP-Vorhersage-Programm angegebenen Sequenz tatsächlich um ein Signalpeptid, so muss das Protein nach Abspaltung des Signalpeptids in das ER transloziert werden können. Um dies zu überprüfen, wurde die Fähigkeit zur Lokalisierung und Insertion von TMEM59 in die Membran von mikrosomalen Mikrosomen analysiert, die biochemisch ein Äquivalent zu dem ER darstellen und die gleiche enzymatische Zusammensetzung aufweisen (Dallman et al., 1969). Wird ein Protein in die mikrosomale Membran eingebaut, bedeutet das gleichzeitig auch den Verlust des Signalpeptids (siehe Abb. 14). In einem *in-vitro*-Retikulozyten-Lysat-Translationssystem, dem posttranslational ribosomenbesetzte mikrosomale Membranen (RM) zugesetzt werden, führt die Membran-Insertion des Proteins anschließend zur N-Glykosylierung des Proteins, die im Falle von TMEM59 eine Unterscheidung von Typ-I- und Typ-II-Transmembran-Proteinen erlaubt. Wird die einzig mögliche N-Glykosylierungsstelle glykosyliert, dann befindet sich diese Domäne des Proteins im Lumen der Mikrosomen (siehe Abb. 14). Demzufolge läge die N-Glykosylierungsstelle am N-Terminus und TMEM59 wäre ein Typ-I-Transmembran-Protein.

Wird die N-Glykosylierungsstelle nicht glykosyliert, so ragt sie in das Zytosol, das Protein wäre ein Typ-II-Transmembran-Protein (siehe Abb.14).

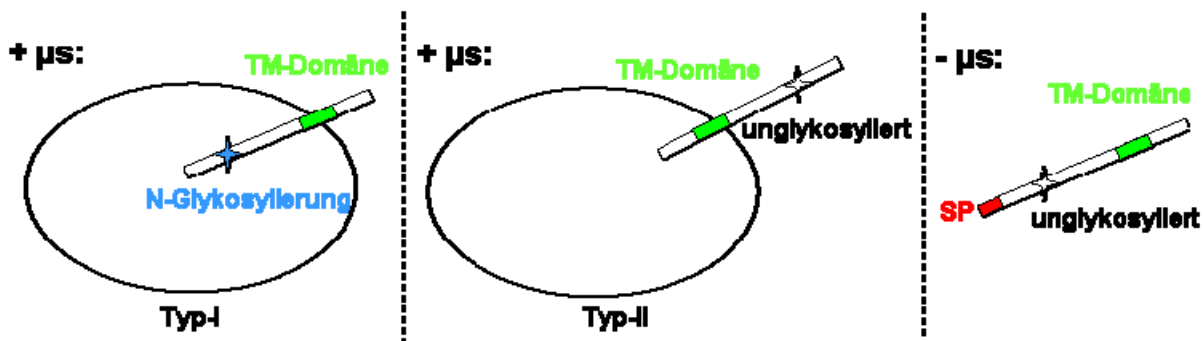


Abbildung 14: Membranprotein-Klassifizierung mittels mikrosomaler Membranen
 Insertion von TMEM59 in die Mikrosomen (+µs) führt zur Abspaltung des Signalpeptides (SP) und N-Glykosylierung, falls es sich um ein Typ-I-Membranprotein handelt. Ein Typ-II-Membranprotein bleibt unglykosyliert, verliert jedoch ebenfalls sein Signalpeptid. Ohne Mikrosomen (-µs) bleibt das Signalpeptid erhalten und das Protein unglykosyliert. Der blaue Stern kennzeichnet die Glykosylierung des Proteins an der möglichen Glykosylierungsstelle, farblos bleibt das Protein unglykosyliert. Die Transmembrandomäne (TM-Domäne) ist in grün dargestellt.

TMEM59-DNA wurde *in-vitro* transkribiert und die RNA mittels des *in-vitro*-Retikulozyten-Lysat-Translationssystems translatiert, dem ribosomenbesetzte mikrosomale Membranen (der Zusatz von Mikrosomen wird künftig mit „+µs“ markiert) zugesetzt waren. Dem Kontroll-Ansatz wurden keine Mikrosomen (-µs) zugesetzt, hier sollte demzufolge TMEM59 das Signalpeptid noch enthalten und unglykosyliert vorliegen. Beide Ansätze wurden daraufhin jeweils mit N-Glykosidase-F (PNGase-F) deglykosyliert oder zur Kontrolle nur mit dem Deglykosylierungs-Puffer ohne Zusatz des Enzyms behandelt, per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die PNGase-F ist enzymatisch in der Lage, alle Typen Asparagin-gebundener N-Glykanketten abzuspalten und somit alle Mannose-reichen, hybriden und komplexen Kohlehydrat-Seiten-Ketten anzugreifen (Tarentino et al., 1985). Die Verwendung dieses Enzyms ermöglicht daher die Unterscheidung eines komplex-glykosylierten Proteins von einem unglykosylierten Protein. Im Translations-Kontroll-Blot (siehe Abb. 15A) wird deutlich, dass in den Fraktionen, in denen keine RNA eingesetzt wurde, unabhängig von der Anwesenheit von mikrosomalen Membranen keine Translation stattfand. Die TMEM59-RNA wurde in den Fraktionen mit Mikrosomen deutlich effektiver translatiert, als in den Fraktionen ohne Mikrosomen. Dies wird auch im Western-Blot ersichtlich, wo in den Fraktionen ohne Mikrosomen geringere Proteinmengen nachweisbar sind (siehe Abb. 15C). Möglicherweise ist das TMEM59-Protein in den mikrosomalen

Fraktionen stabiler und wird weniger schnell abgebaut. Alternativ könnte der TMEM59-Antikörper aufgrund von beispielsweise einer veränderten Sekundärstruktur das Protein in den Fraktionen ohne Mikrosomen nicht so effizient erkennen. Tabelle 15B veranschaulicht nochmals, in welcher Form das Protein in dem jeweiligen Ansatz vorliegen muss. In der Western-Blot-Analyse wird deutlich, dass das in Anwesenheit von Mikrosomen translatierte und nachfolgend mit PNGase-F behandelte TMEM59 (+F), welches kein Signalpeptid mehr trägt und unglykosyliert ist (+F/+ μ s), eine höhere elektrophoretische Mobilität im Gel aufweist, als TMEM59 ohne Signalpeptid, welches hingegen noch glykosyliert ist (-F/+ μ s) (siehe Abb. 15C). TMEM59 aus den Translations-Ansätzen ohne Mikrosomen (- μ s) liegt unglykosyliert vor, die PNGase-F zeigt daher keinerlei Effekt. Das noch vorhandene Signalpeptid in diesen Ansätzen (+F/-F, - μ s) erklärt die verringerte elektrophoretische Mobilität im Vergleich zu TMEM59, welches ebenfalls unglykosyliert ist, jedoch auch kein Signalpeptid mehr trägt (+F, + μ s).

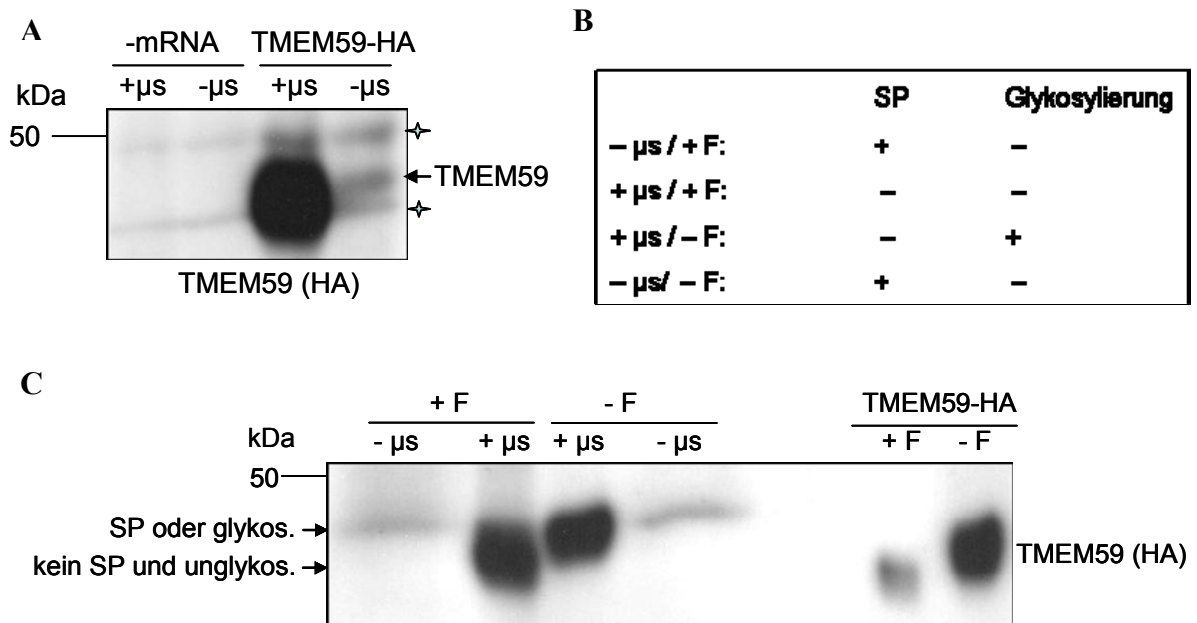


Abbildung 15: TMEM59 besitzt ein Signalpeptid und ist glykosyliert

A) Western-Analyse der Translation von TMEM59-HA-RNA in Anwesenheit (+ μ s) und Abwesenheit (- μ s) von mikrosomalen Membranen; als Kontrolle wurde der Translationsansatz ohne RNA gestartet. Der Pfeil markiert TMEM59, während die Sterne Hintergrundbanden anzeigen. Der Nachweis des Proteins erfolgte mittels der HA-Markierung per HA-Antikörper **B)** Übersicht über den Zustand von TMEM59 unter den gegebenen Bedingungen, Anwesenheit oder Abwesenheit von Mikrosomen (+/- μ s) und Behandlung mit oder ohne PNGase F (+/-F). **C)** Western-Analyse der zwei Reaktionsansätze in Anwesenheit/Abwesenheit von mikrosomalen Membranen (+/- μ s) und darauffolgendem PNGase-F-Verdau samt Kontrolle (+/-F). Zur PNGase-F-Funktionalitäts-Kontrolle und zum Vergleich der Mobilität im Gel wurde Zelllysat

transient p12-TMEM59-HA-transfizierter HEK293-Zellen mit PNGase-F behandelt und analysiert. Die höhere Bande repräsentiert TMEM59, dem entweder das Signalpeptid fehlt oder das glykosyliert ist, die untere Bande repräsentiert unglykosyliertes TMEM59 ohne SP. Der Nachweis erfolgte mittels eines HA-Antikörpers.

Die Ergebnisse vorangegangener Experimente stimmen überein mit der Annahme, dass es sich bei TMEM59 um ein Typ-I-Transmembran-Protein handelt, da das Protein in Anwesenheit von mikrosomalen Membranen glykosyliert wird und sein Signalpeptid abgespalten wird. Die N-Glykosylierungs-Stelle befindet sich demzufolge am N-Terminus des Proteins. Die vermeintliche Signalpeptid-Sequenz von TMEM59-HA wird somit in Anwesenheit der mikrosomalen Membranen abgespalten und fungiert tatsächlich als Signalpeptid.

2.1.5 TMEM59 ist glykosyliert

In der Sequenzanalyse von TMEM59 wurde eine mutmaßliche N-Glykosylierungs-Stelle detektiert: Asn-Arg-Thr (NRT, Darstellung im Einbuchstaben-Code). Diese Sequenz erfüllt die Voraussetzung für eine N-Glykosylierung, da sie der Konsensus-Sequenz Asn-X-Ser/Thr entspricht (siehe unter Kapitel 1.6). Zur Untersuchung einer möglichen N-Glykosylierung des TMEM59-Proteins, wurden HEK293-Zellen mit TMEM59 transfiziert und die daraus gewonnenen Lysate zum Einen mit PNGase-F und zum Anderen mit Endoglykosidase-H (Endo-H) behandelt. Die Endo-H weist eine engere Substratspezifität auf als die PNGase-F und spaltet spezifisch zwischen zwei N-Azetyl-Glukosamin-Resten, an denen mindestens fünf Mannose-Einheiten gekoppelt sind. Sie prozessiert demzufolge lediglich unreife, im rER angefügte N-glykosidische Oligosaccharide des Mannose-reichen, nicht jedoch des komplexen Typs (Maley et al., 1989; Robbins et al., 1984). Durch Einsatz dieser die Zuckerreste modifizierenden Enzyme wird die Unterscheidung einer reifen von einer unvollständig prozessierten Form eines Proteins möglich. Im Anschluss an die Behandlung des Lysats mit PNGase-F und Endo-H wurde TMEM59 mittels Western-Blot-Analyse auf Veränderungen des Laufverhaltens untersucht.

Um festzustellen, ob eine zu beobachtende veränderte elektrophoretische Mobilität des Proteins im Gel durch den enzymatischen Verdau bedingt war, wurde zum Vergleich ein weiteres Aliquot des Lysats nur mit dem jeweiligen Deglykosylierungspuffer ohne Zusatz von Enzymen inkubiert und analysiert. Als Kontrolle für eine prinzipiell erfolgreiche Deglykosylierung wurde BACE1 ebenso mit PNGase-F und Endo-H behandelt. BACE1 ist bekanntermaßen glykosyliert (Capell et al., 2000), so dass eine definierte Abweichung des apparenten Molekulargewichts von BACE1 erwartet wurde. Bei der Detektion von

TMEM59 konnte, wie auch bei BACE1, nach der PNGase-F-Behandlung eine erhöhte elektrophoretische Mobilität im Gel festgestellt werden (siehe Abb. 16). Dieses Ergebnis beweist, dass TMEM59 durch N-Glykosylierung modifiziert ist. Nach Behandlung mit Endo-H konnte ebenfalls ein verändertes Laufverhalten im Gel detektiert werden, das exakt dem Laufverhalten nach Behandlung mit PNGase-F entsprach. Eine Endo-H-Stabilität der Zucker würde auf eine Lokalisierung von TMEM59 in späteren Zellkompartimenten hinweisen (Tarentino et al., 1974). Die Sensitivität von TMEM59 gegenüber Endo-H weist jedoch auf ein alleiniges Vorkommen von Oligosacchariden des Mannose-reichen Typs hin, was darauf hindeuten könnte, dass TMEM59 in den frühen Kompartimenten des sekretorischen Weges lokalisiert ist. BACE1 zeigt, wie vormals schon beschrieben, nach Behandlung mit PNGase-F das Fehlen der Oligosaccharid-Reste der muren und immatunen Form des Proteins durch ein verändertes Laufverhalten beider Formen (Capell et al., 2000). Der Endo-H-Verdau zeigt die Stabilität der muren Form und die Sensitivität der immatunen Form, die durch abgespaltene Zuckerketten eine erhöhte Mobilität im Gel aufweist (Capell et al., 2000).

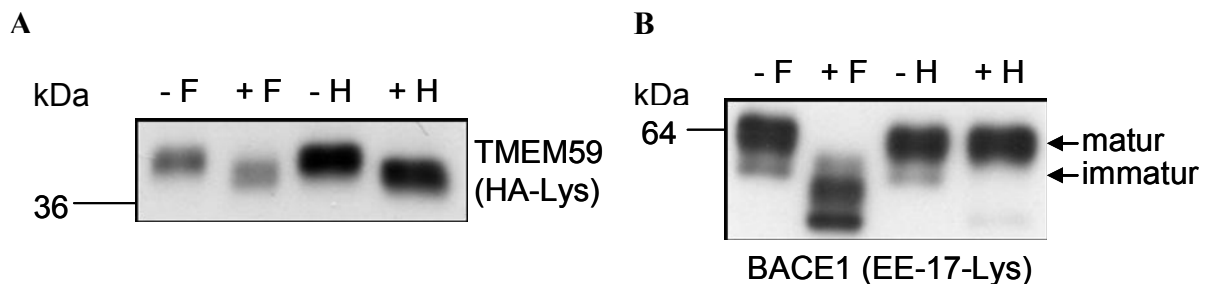


Abbildung 16: TMEM59 ist PNGase-F- und Endo-H-sensitiv

A) HEK293-Zellen wurden transient im 24-well-Format mit 200 ng p12-TMEM59-HA oder B) mit p12-BACE1 transfiziert. Nach 48 Stunden wurden in einem Volumen von 300µl Zelllysate hergestellt, die entweder mit PNGase-F (+F) oder Endo-H (+H), sowie zur Kontrolle nur mit den jeweiligen Puffern (-F/-H) inkubiert wurden. Mittels SDS-PAGE und Western-Analyse wurde die Mobilität von TMEM59 (HA) und BACE1 (EE-17) untersucht. Die Proteinkonzentration der Proben wurde aufeinander abgeglichen und von der niedrigst konzentrierten Probe das maximale Volumen auf die Gele geladen, was 25µl entspricht.

2.1.6 Subzelluläre Lokalisierung von TMEM59 in ER und Golgi-Apparat

2.1.6.1 Endogenes TMEM59 ist Golgi-lokalisiert

Das Vorhandensein eines Signalpeptides und das Auftreten von Oligosacchariden des Mannose-reichen Typs könnten einen Hinweis geben auf eine subzelluläre Lokalisierung von TMEM59 im sekretorischen Transportweg im ER oder ER-cis-Golgi intermediären

Kompartiment („ERGIC“) oder Golgi-Apparat (Tarentino and Plummer, 1994). Per Immunfluoreszenz-Analyse sollte mittels eines Golgi-Markers die Lokalisierung von endogen exprimiertem TMEM59 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden TMEM59-spezifische Antikörper benötigt, die das endogene Protein detektieren können. Der polyklonale Antikörper 93 wurde bei der Firma Eurogentech in Auftrag gegeben, welche diesen TMEM59-spezifischen Antikörper aus immunisierten Kaninchen isolierte. Zusätzlich zu dem Antikörper wurde ein Präimmunserum mitgeliefert, welches vor der Immunisierung der Kaninchen gewonnen wurde und somit TMEM59 nicht detektieren dürfte. HEK293-Zellen wurden transient mit p12-TMEM59 oder p12-TMEM59-HA oder einem Kontrollplasmid transfiziert. Als Kontrollplasmid diente im Rahmen dieser Doktorarbeit p12-Luziferase. Die Transfektion dieses Kontroll-Plasmides führt zur Expression der sekretierten Luziferase, welche keines der zu beobachtenden Effekte beeinflussen dürfte. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Tatsächlich detektiert der 93-Antikörper sowohl TMEM59, als auch abgeschwächt das HA-markierte TMEM59, welches aufgrund der Markierung eine verminderte elektrophoretische Mobilität aufweist (siehe Abb. 17A). Anscheinend wurde das HA-markierte TMEM59 schwächer exprimiert, als das unmarkierte TMEM59. Das korrekte Laufverhalten von TMEM59 kann anhand des HA-Blots nachgewiesen werden. Der 93-Antikörper ist nicht in der Lage, endogenes TMEM59 zu detektieren, welches in der Kontroll-Spur sichtbar werden müsste, da die Sensitivität dieses Antikörpers zu gering zu sein scheint. Er weist keinerlei unspezifisches Signal in der Kontroll-Spur auf, ebenso detektiert das Präimmunserum keinerlei unspezifischen Proteine, der Antikörper 93 weist demzufolge spezifisch TMEM59 nach. Zusätzlich wurde ein monoklonaler C-Terminus-gerichteter Antikörper durch Immunisierung von Ratten generiert. Dieser 4E5-Antikörper wies im Western-Blot ebenso eine spezifische Detektion von TMEM59 auf, im Kontrolllysat wurde jedoch ebenfalls kein endogenes TMEM59 und keinerlei unspezifisches Signal detektiert (siehe Abb. 17B). Das Laufverhalten des 4E5-detektierten Proteins entsprach der Laufhöhe des 93-detektierten TMEM59.

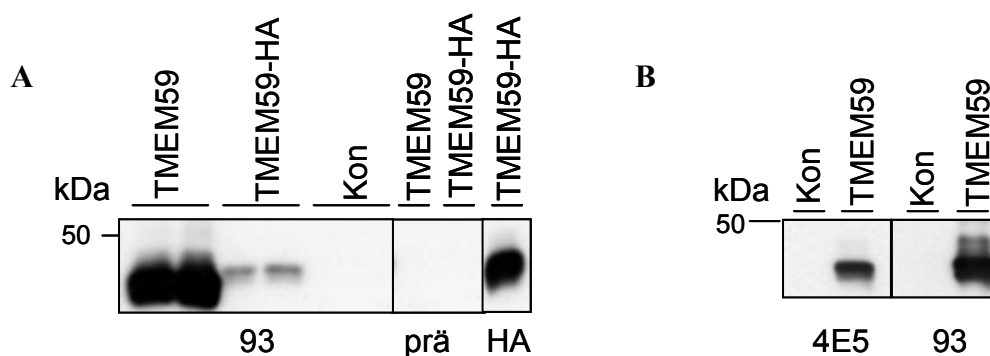


Abbildung 17: Spezifität der Antikörper 93 und 4E5 gegen TMEM59

A) HEK293-Zellen wurden im 24-well-Format transient mit 200ng p12-TMEM59, bzw. 200 ng p12-TMEM59-HA oder dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon), welches auch in den künftigen Experimenten das Kontroll-Plasmid darstellt, transfiziert. Nach 48 Stunden wurden in 300µl Volumen Zellysate hergestellt und mittels SDS-PAGE und Western-Analyse die TMEM59-Expression mittels des polyklonalen Antikörpers 93 aus dem Hasen, des dazugehörigen Präimmunserums (prä) und des HA-Antikörpers untersucht. Hierfür wurde die Proteinkonzentrationen der Proben aufeinander abgeglichen und von der niedrigst konzentrierten Probe 25 µl auf das Gel geladen. Alle weiteren Transfektions-Experimente im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mit genannter DNA-Konzentration, sowie genanntem Lyse-Volumen und Lade-Volumen durchgeführt.

B) HEK293-Zellen wurden transient mit p12-TMEM59 oder dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon) transfiziert, nach 48 Stunden wurden Zellysate hergestellt. Per SDS-PAGE und Western-Analyse wurden mittels des monoklonalen Antikörpers 4E5 aus der Ratte und des Antikörpers 93 die Expression von TMEM59 untersucht.

Endogenes TMEM59 wurde daraufhin mit dem polyklonalen Antikörper 93 in COS-Zellen nachgewiesen, als Golgi-Marker wurde ihm Rahmen dieser Arbeit ein monoklonaler Antikörper gegen das endogene Golgi-ständige Protein Giantin (Linstedt and Hauri, 1993) verwendet. Als Kontrolle wurde der 93-Antikörper mit dem Peptid geblockt, gegen welches der Antikörper generiert wurde, so dass keine spezifische Bindung an ein Epitop mehr möglich war. Die Signal-Detektion erfolgte über Fluorophor-gekoppelte Sekundär-Antikörper, die Auswertung mittels des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. Durch Überlagerung der grünen (TMEM59) und roten (Giantin) Signale wird eine mögliche Kolokalisierung mittels eines gelben Signals sichtbar gemacht (siehe Abb. 18). Die beiden Signale von TMEM59 und Giantin kolokalisieren in demselben Kompartiment. TMEM59 befindet sich demzufolge tatsächlich im Golgi-Apparat, wenn auch die Verteilung innerhalb des Golgis nicht exakt mit der Verteilung Giantins übereinstimmt. Dies zeigt sich daran, dass die beiden fluoreszierenden Signale für Giantin und TMEM59 nur teilweise überlagern und zusätzlich jeweils unterschiedliche Bereiche im Golgi-Apparat markieren. Giantin ist im *cis*- und *medialen*-Kompartiment des Golgi-Apparates lokalisiert, beispielsweise könnte TMEM59 auf das *mediale*- und *trans*-Golgi-Kompartiment verteilt sein. Das Signal des 93-Antikörpers ist spezifisch für endogenes TMEM59, da der geblockte Antikörper kein Signal erzeugt.

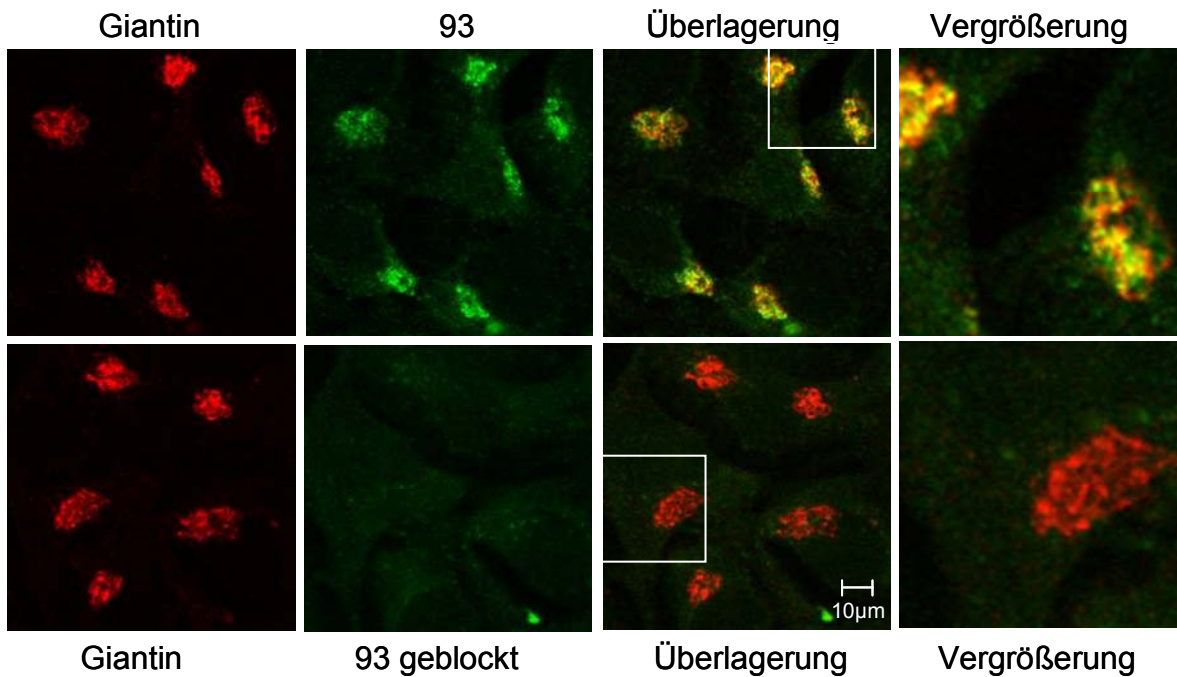


Abbildung 18: Endogenes TMEM59 kolokalisiert mit endogenem Golgi-Marker Giantin

Fluoreszenzaufnahme der Kolokalisierung (gelbes Signal) von endogenem Giantin (anti-Giantin, rotes Signal) und endogenem TMEM59 (93, grünes Signal, obere Reihe) in COS-Zellen. Als Antikörper-Spezifitätskontrolle für den Antikörper 93 diente ein Peptid-gebloccker 93-Antikörper (grünes Signal, untere Reihe).

Um sicherzustellen, dass TMEM59 tatsächlich mit Giantin kolokalisiert, wurde ein weiterer Antikörper spezifisch für TMEM59 getestet. Dieser monoklonale C-Terminus-gerichtete Antikörper 4E5 generiert in der Immunfluoreszenz ein Signal, das durch seinen Isotyp-Kontroll-Antikörper IgG2b nicht entsteht, auch hier ist die Detektion von endogenem TMEM59 spezifisch. Wiederum ist in diesem Ansatz erkennbar, dass das Giantin-Signal (grün) mit dem 4E5-Signal (rot) kolokalisiert (siehe Abb. 19). Diese Analysen zeigen eine subzelluläre Lokalisierung von TMEM59 im Golgi.

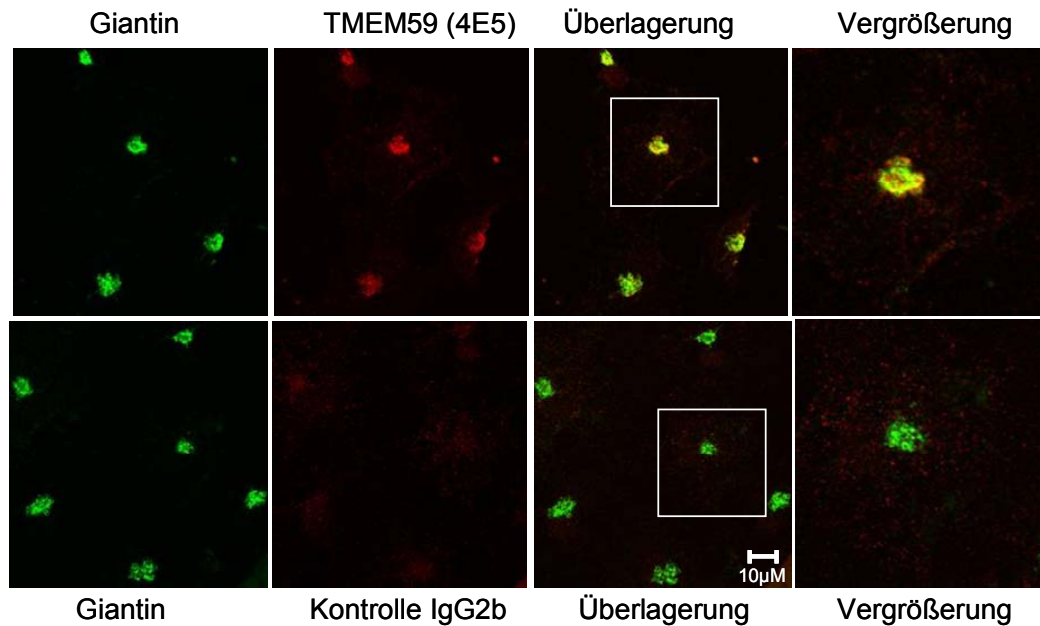


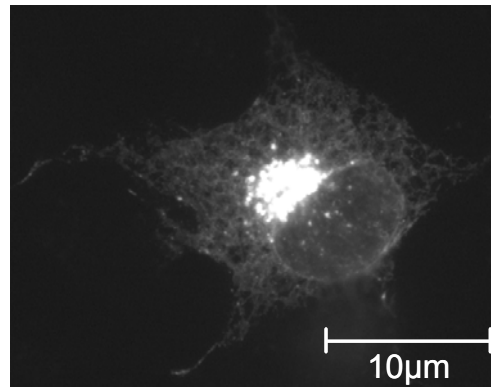
Abbildung 19: Endogenes TMEM59 kolokalisiert mit endogenem Golgi-Marker Giantin

Fluoreszenzaufnahme der Kolokalisierung (gelbes Signal) von endogenem Giantin (anti-Giantin, grünes Signal) und endogenem TMEM59 (4E5, rotes Signal, untere Reihe) in COS-Zellen. Als Kontrolle für die Spezifität des 4E5-Antikörpers für TMEM59 diente ein Antikörper desselben Isotyps (IgG2b, rotes Signal, obere Reihe).

2.1.6.2 Das TMEM59-GFP-Fusionsprotein zeigt Golgi- und ER-Lokalisierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich die subzelluläre Lokalisierung von TMEM59 mittels GFP („green fluorescence protein“-Fusion untersucht. GFP wurde aus einer Quallenart, *Aequorea victoria*, isoliert und in heterologen Organismen exprimiert (Chalfie et al., 1994; Prasher et al., 1992; Shimomura et al., 1962). GFP dient nun standardmäßig zur Charakterisierung rekombinanter Proteine in vielen biologischen Systemen (Brandizzi et al., 2003). Nach Anregung mit UV-Licht einer Wellenlänge von $\lambda=488$ nm kann die Fluoreszenz des GFP-Proteins bei $\lambda=509$ nm detektiert werden. Zur Untersuchung der Lokalisierung wurde ein TMEM59-GFP-Fusionskonstrukt hergestellt. Dabei wurde der Vollängenklon von TMEM59 ohne Stopkodon C-terminal mit GFP im offenen Leseraster fusioniert. Dieses Konstrukt wurde in COS-Zellen transfiziert und die Fluoreszenz durch Verwendung des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops ausgewertet. In Abbildung 20 erkennt man ein sehr starkes Signal, bei dem es sich um den Golgi-Apparat handeln könnte, von dem aus kleinere Vesikel auszugehen scheinen. Zusätzlich ist etwas abgeschwächt eine netzförmige Struktur zu erkennen, bei der es sich typischerweise um das endoplasmatische Retikulum (ER) handelt. Das Vorhandensein eines Signalpeptides erklärt eine Lokalisierung im ER, während die Sensitivität von TMEM59 gegenüber Endo-H für eine Lokalisierung im

sekretorischen Weg und für eine fehlende Plasma-Membran-Färbung spricht. Demzufolge stimmt die Lokalisierung von TMEM59 in ER und Golgi-Apparat und das Fehlen eines Signals an der Zelloberfläche mit den bisherig erbrachten molekularen Daten überein.



TMEM59-GFP

Abbildung 20: Überexprimiertes TMEM59-GFP ist Golgi-lokalisiert

COS-Zellen wurden transient mit p12-TMEM59-GFP transfiziert, nach 24 h fixiert und per konfokaler Mikroskopie ausgewertet.

2.2 TMEM59-Einfluss auf die Maturierung und Sekretion von APP

2.2.1 TMEM59 inhibiert die Maturierung von endogenem APP

Das Protein TMEM59 wurde auf der Suche nach APP-Modulatoren identifiziert. Um den Effekt von TMEM59 auf die Proteolyse des endogenen wildtyp-APP zu charakterisieren, wurde p12-TMEM59 im 24-Well-Format in HEK293-Zellen transfiziert. Zugleich wurden parallel Zellen mit dem Kontrollplasmid p12-Luziferase transfiziert, welches für ein Protein kodiert, das keinen Effekt auf APP zeigen sollte. Die Zellen dürfen zum Zeitpunkt der Transfektion nicht konfluent sein, damit eine hohe Transfektionseffizienz erzielt wird. 48 Stunden nach der Transfektion wurde der Zellkultur-Überstand gesammelt und die Zellen lysiert. Zelllysate und Medium wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels schnittspezifischer Antikörper im Western-Blot auf zelluläres und sekretiertes APP überprüft. Die Bindestellen der jeweiligen APP-spezifischen Antikörper werden im folgenden Kapitel erläutert, sowie in Abbildung 22A dargestellt. Im Zelllysate lässt sich endogenes APP als drei-Banden-Muster identifizieren, die untere Bande stellt das immature APP₆₉₅ dar, die mittlere Bande ist eine Mischform aus maturem APP₆₉₅ und immaturem APP₇₅₁, während die oberste Bande das mature APP₇₅₁ zeigt (siehe Abb. 21A). Unter TMEM59-Expression ist eine Abnahme der maturaen APP₇₅₁-Bande und eine leichte Zunahme des immaturnen APP₆₉₅ zu

beobachten. Das lösliche APP α nimmt unter TMEM59-Expression ab (siehe Abb. 21A). Aktin gilt als Ladekontrolle, zum Nachweis des Ladens vergleichbarer Mengen an Lysat (siehe Abb. 21A). Anhand des Aktin-Blots scheint die Proteinkonzentration in den TMEM59-transfizierten Lysaten schwächer zu sein. Um nicht aufgrund unterschiedlicher Proteinkonzentrationen verfälschte Ergebnisse zu erhalten, wurden die Signale des 22C11-Blots und des W02-Blots quantifiziert. Darauffolgend wurde das Verhältnis von löslichem APP zu zellulärem APP bestimmt und mittels einer Graphik dargestellt (siehe Abb. 21B). Die Quantifizierung erfolgte anhand von vier unabhängigen Experimenten. Die Graphik verdeutlicht, dass die TMEM59-Expression zu einer ca. 65%igen Abnahme des sekretierten APP α führt.

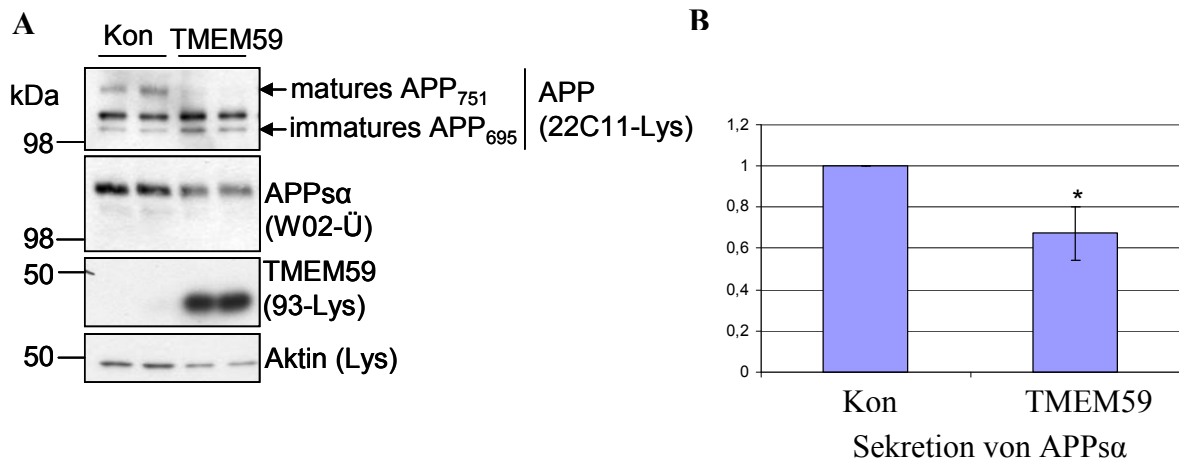


Abbildung 21: TMEM59 inhibiert die Maturierung und Sekretion von endogenem APP

A) HEK293-Zellen wurden im 24-Well-Format mit p12-TMEM59 oder Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon) transfiziert, die Zellen wurden nach 48 h lysiert und mittels Western-Analyse auf endogenes zelluläres (22C11) und lösliches (W02) APP und TMEM59-Expression (93) untersucht. Die Transfektion der Plasmide erfolgte jeweils in 2 wells als Doppelkontrolle. Als Ladekontrolle dient Aktin (β -Aktin). B) Graphische Darstellung der Abnahme des Verhältnisses löslichen APP α (W02) zu zellulärem APP (22C11) unter Einberechnung von Mittelwerten und Standardabweichung in den transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen anhand von vier unabhängigen Experimenten; p-Wert: 0,015.

2.2.2 Transient überexprimiertes APP wird in seiner Maturierung inhibiert

Um den Effekt von TMEM59 und seines Homologen BSMAP auf die Proteolyse von APP genauer charakterisieren zu können, beispielsweise die Generierung des β -prozessierten APP, sowie des A β -Peptids, wurde APP₆₉₅ unter Kotransfektions-Bedingungen untersucht. Ein möglicher Effekt auf die APP-Maturierung und die APP-Sekretion ist auf transient überexprimiertes APP einfacher nachzuweisen als auf endogenes APP, dies wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt (Pahlsson and Spitalnik, 1996). In HEK293-Zellen

wurde eine transiente Kotransfektion von p12-APP₆₉₅ und p12-TMEM59-HA, bzw. einem Kontroll-Plasmid durchgeführt. die Transfektion des p12-GFP-Plasmides diene als Transfektions-Kontrolle. Bei einer gleichmäßigen Transfektionsrate sollten im Western-Blot homogene Mengen an GFP detektierbar sein. 48 Stunden nach Transfektion wurde das Medium (Zellkultur-Überstand) der Zellen gesammelt und die Zellen lysiert. Zelllysate und Medium wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Schnitt-spezifischer Antikörper im Western-Blot auf APP-Fragmente überprüft. Die Epitope der Antikörper sind in Abbildung 22A schematisch dargestellt. Um β -Sekretase prozessiertes APPs β nachzuweisen, wurde der schnittspezifische Antikörper 192wt verwendet, der das durch die Proteolyse entstandene C-terminale Neo-Epitop erkennt. Der W02-Antikörper ist in der Lage, durch Bindung zwischen α - und β -Schnittstelle, α -Sekretase-geschnittenes APPs α nachzuweisen. Allerdings existiert neben der hauptsächlich verwendeten β -Sekretase-Schnittstelle eine weitere Position, an der APP zu einem geringeren Teil durch die β -Sekretase prozessiert werden kann. Diese Stelle wird als β' bezeichnet und gleichfalls vom W02-Antikörper detektiert (siehe Abb. 22A). Die zytoplasmatische Domäne von zellulärem APP wird von dem Antikörper 6687 erkannt, zusätzlich enthält der N-Terminus von APP ein Epitop für den 22C11-Antikörper, der somit in der Lage ist, sowohl zelluläres APP im Lysat, sowie prozessiertes APP im Überstand nachzuweisen. In dem Kontroll-transfizierten Lysat detektiert man unter Verwendung des Antikörpers 22C11 zwei Formen des zellulären APP, eine immature und eine höher laufende mature Form (siehe Abb. 22B). Unter Kotransfektions-Bedingungen mit p12-TMEM59-HA wird die mature Bande von APP stark reduziert, stattdessen ist eine Akkumulation der immaturen Form erkennbar. Im Überstand ist unter TMEM59-Expression eine starke Reduktion sowohl des sekretierten APPs α , als auch des APPs β und des A β -Peptids zu sehen. Um zu untersuchen, ob das Homolog BSMAP einen ähnlichen Effekt auf die APP-maturierung und -Sekretion zeigt, wurden HEK293-Zellen transient mit p12-APP₆₉₅ und p12-TMEM59-HA, bzw. p12-BSMAP-HA oder dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase kotransfiziert. Sodann wurden 48 Stunden nach der Transfektion die Lysate und Zellkulturüberstände mittels SDS-PAGE und Western-Analyse untersucht. BSMAP weist wie TMEM59 eine Maturierungs-Hemmung von APP auf, zudem wird die Sekretion von APPs α und APPs β reduziert (siehe Abb. 22C). Es scheint, als hätten TMEM59 und BSMAP denselben Effekt auf APP.

Um zu testen, ob der Antikörper 22C11 tatsächlich überexprimiertes APP₆₉₅ nachweisen kann, wurden HEK293-Zellen transient mit p12-APP₆₉₅ und einem Kontroll-Plasmid, bzw. p12-TMEM59-HA kotransfiziert. Diese Zellen, sowie untransfizierte HEK293-Zellen wurden

48 h nach der Transfektion lysiert und die Zelllysate, sowie die Zellkulturüberstände per SDS-PAGE und Western-Analyse untersucht. Abbildung 22D zeigt, dass der 22C11-Antikörper die mature und immature Form des überexprimierten APP₆₉₅ nachweisen kann, die dasselbe Laufverhalten aufweisen, wie die Formen des endogenen APP₆₉₅, was in der langen Exposition sichtbar wird. Die oberste der drei Banden repräsentiert die mature Form des APP₇₅₁. Im Zellkulturüberstand hingegen kann man nur die lösliche Form des APP₇₅₁ sehen, welches in HEK293-Zellen stärker exprimiert wird. Daher zeigt die lösliche Form des endogenen APP in dem W02-Blot in der langen Exposition ein verlangsamtes Laufverhalten im Vergleich zu den transfizierten Proben.

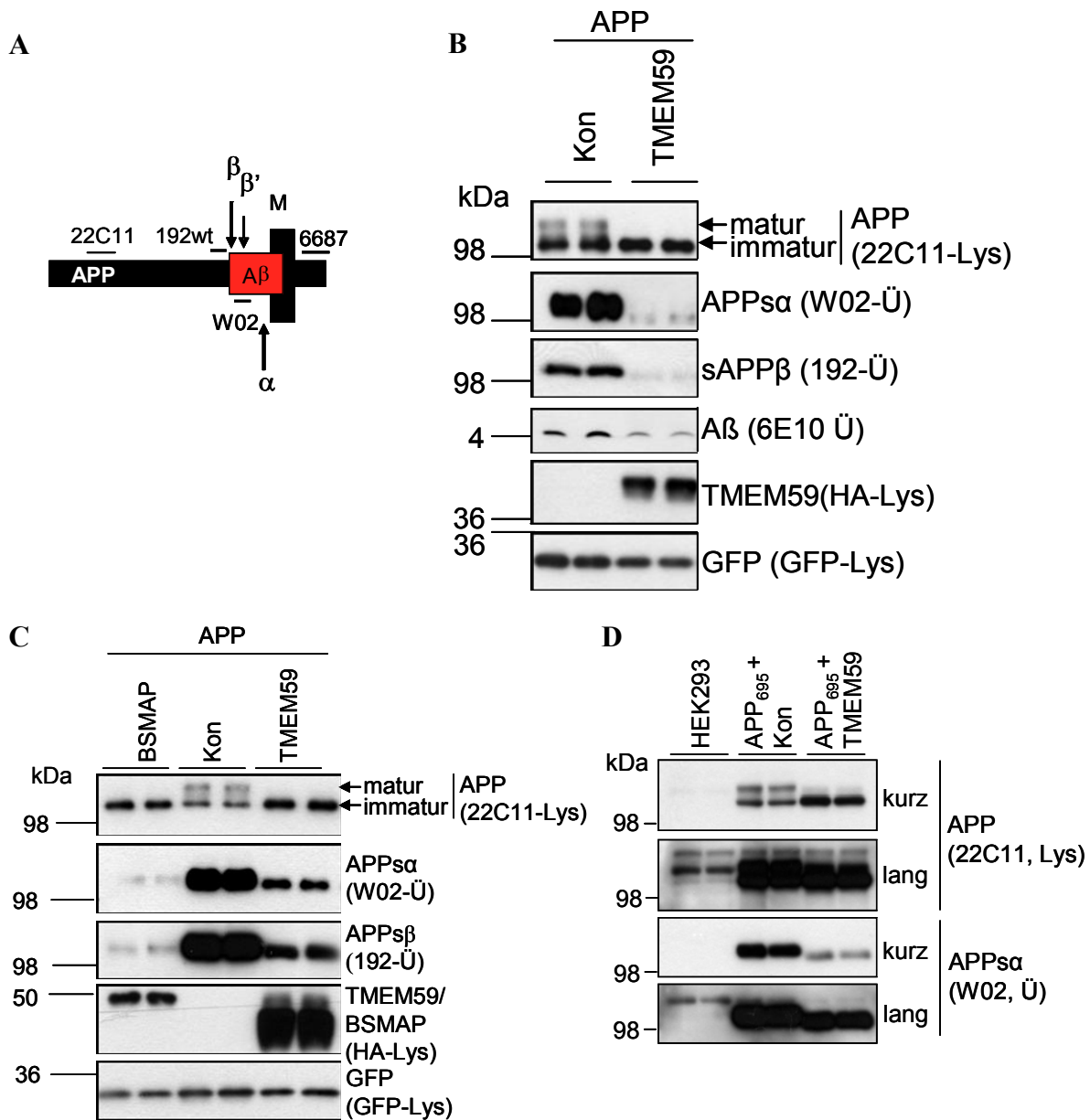


Abbildung 22: TMEM59 und BSMAP inhibieren APP-Maturierung und Sekretion

A) Darstellung der Epitope der APP-spezifischen Antikörper und der spezifischen Schnittstellen der Sekretasen (Pfeile). **B)** HEK293-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ und p12-TMEM59-HA, bzw. Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon) kotransfiziert, p12-GFP diente als Transfektions-Kontrolle. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate und das Medium mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf zelluläres APP (22C11), lösliches APPs α (W02), APPs β (192wt), A β (6E10, erkennt A β 1-17), TMEM59 (HA) und GFP (GFP-mono) untersucht. **C)** HEK293-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ und p12-TMEM59-HA, p12-BSMAP-HA, bzw. Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon) kotransfiziert, p12-GFP diente als Transfektions-Kontrolle. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate und das Medium mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf zelluläres APP (22C11), lösliches APPs α (W02), APPs β (192wt), TMEM59 und BSMAP (HA) und GFP (GFP-mono) untersucht. **D)** HEK293-Zellen wurden mit p12-APP₆₉₅ und Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon), bzw. mit p12-TMEM59 kontransfiziert. Die transfizierten Zellen und zugleich untransfizierte Zellen wurden nach 48 h lysiert und mittels SDS-PAGE und Western-Analyse auf zelluläres APP (22C11) und lösliches APP (W02) untersucht.

Um einen Zelltyp-abhängigen Effekt auszuschließen, wurde dieser außer in humanen HEK293-Zellen auch in COS7-Zellen aus dem Affen und in CHO-Zellen aus dem Hamster analysiert. Auch in diesen Zellen ist unter transientscher Kotransfektion ein Einfluss auf die Maturierung und Sekretion von APP₆₉₅ erkennbar, wiederum ist eine Abnahme der murenen Bande und eine Akkumulation der immaturren Form von APP im Zelllysate sichtbar, ebenso kann nochmals eine Abnahme des APP α gezeigt werden (siehe Abb. 23A/B).

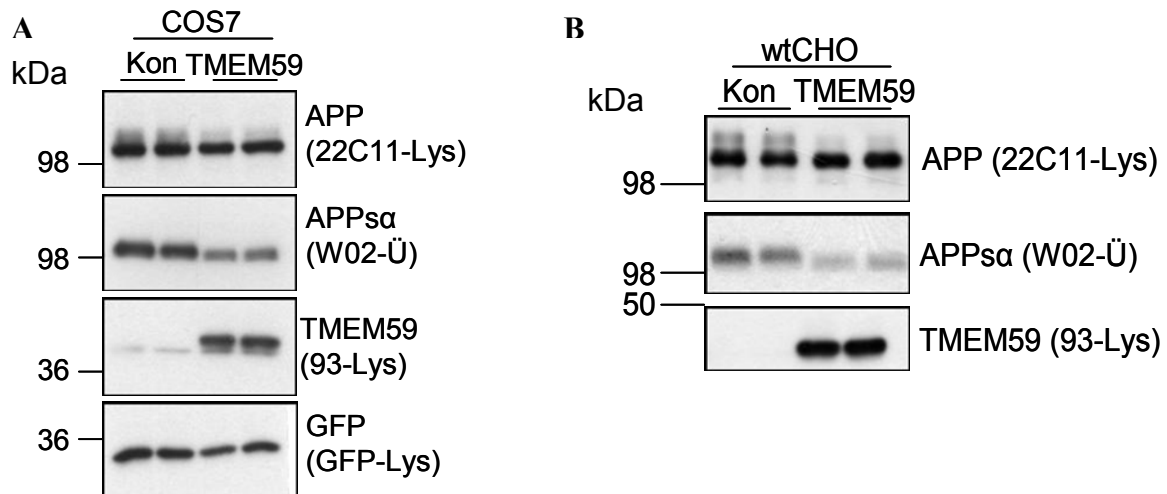


Abbildung 23: TMEM59 inhibiert APP-Maturierung und Sekretion in COS7- und wtCHO-Zellen

A) COS7-Zellen und B) wtCHO-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ und p12-TMEM59, bzw. Kontroll-Plasmid p12-Luziferase kotransfiziert, p12-GFP diente als Transfektions-Kontrolle. Die Zellen wurden nach 48 h lysiert und in Lysaten und Medium mittels SDS-PAGE und Western-Analyse zelluläres APP (22C11), sekretiertes APP α (W02), TMEM59 (93) und GFP (GFP-mono) analysiert.

Wie gezeigt werden konnte, sorgen TMEM59 und BSMAP für eine Inhibition der Maturierung von APP und eine Reduktion der Sekretion der löslichen APP-Formen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Hemmung der Maturierung einen gestörten APP-Transport zur Folge haben könnte. Durch den gestörten Transport könnte APP nicht mehr zu den Sekretasen gelangen, was die Reduktion der Sekretion von APP erklären würde.

2.2.3 TMEM59-Expression hemmt die Maturierung von APP

Um die Frage zu beantworten, ob das mature APP unter TMEM59-Expression erst gar nicht entsteht oder schneller abgebaut wird, wurde die Maturierung von APP in einem „pulse/chase“-Experiment analysiert. HEK293-Zellen wurden mit p12-APP₆₉₅ und entweder dem Kontrollplasmid p12-Luziferase oder p12-TMEM59 kotransfiziert. Nach 48 Stunden

wurden die Zellen und damit das neu synthetisierte APP radioaktiv mit ^{35}S markiert („pulse“) und zeitlich in seiner Maturierung verfolgt („chase“). Zu den angegebenen „chase“-Zeitpunkten (0, 30, 60, 90 und 120 min) wurden Zelllysate hergestellt und ein Teil mittels SDS-PAGE und Western-Analyse auf TMEM59-Expression analysiert. Das restliche Lysat wurde gegen APP₆₉₅ immunopräzipitiert und sodann ebenfalls per Western-Analyse untersucht. Das zum „chase“-Zeitpunkt „0 min“ hergestellte Zelllysate der Ausgangspopulation zeigt für Kontroll-transfiziertes APP eine starke immature Bande und eine schwächere mature Bande (siehe Abb. 24). Die Intensität der maturen Bande nimmt zuerst zu, bis sie ab dem Zeitpunkt „60“ min erneut abnimmt, bedingt durch den Abbau des maturen APP. Das Signal der immatures Bande hingegen wird kontinuierlich schwächer, da diese Form von APP glykosyliert wird und sich zu einer maturen Form umwandelt. Dagegen nimmt in TMEM59-kotransfizierten Zellen das mature APP kontinuierlich ab, bedingt zum Einen durch den Abbau des bereits vorhandenen maturen Proteins, zum Anderen durch die gehemmte Maturierung der immatures Bande. Diese lässt daher auch keine Abnahme erkennen, sondern zeigt kontinuierlich dieselbe Intensität. Dieses Experiment spricht für eine Inhibition der APP-Maturierung und nicht für einen beschleunigten Abbau unter TMEM59-Expression, da ansonsten in den TMEM59-kotransfizierten Zellen die mature Bande des APP bei frühen Zeitpunkten zuerst zunehmen würde, bevor es abgebaut würde.

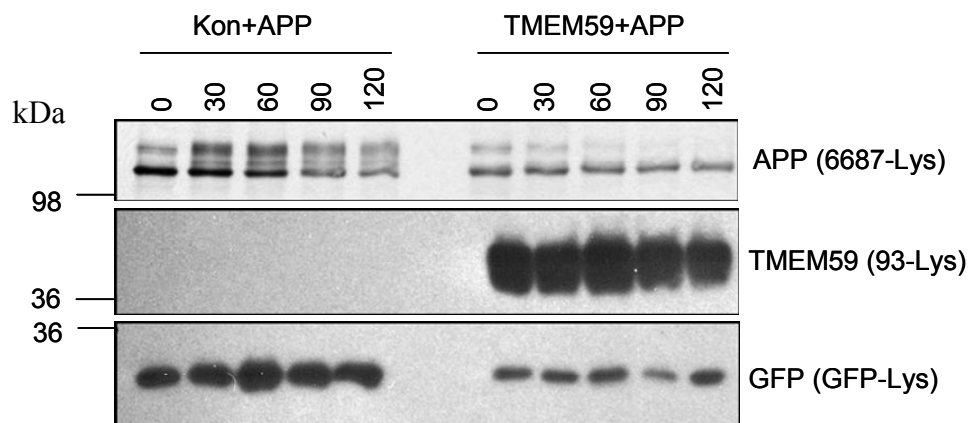


Abbildung 24: TMEM59 inhibiert die Maturierung von APP

HEK293-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ und p12-GFP und entweder dem Kontrollplasmid p12-Luziferase (Kon) oder p12-TMEM59 kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit ^{35}S radioaktiv markiert und zu bestimmten Zeitpunkten Lysate der Zellen hergestellt, die partiell gegen APP₆₉₅ immunopräzipitiert wurden (6687) und per SDS-PAGE und Western-Analyse auf APP (6687), TMEM59 (93) und GFP (GFP-mono) untersucht wurden.

2.2.4 Kontrollproteine inhibieren nicht die Maturierung und Sekretion von APP

Der inhibitorische Effekt, den die TMEM59-Expression auf die APP-Maturierung und –Sekretion zeigt, könnte ebenso durch die artifizielle Überexpression von TMEM59 bedingt sein. Um dies auszuschließen, wurde ein Plasmid, welches ein zweites Typ-I-Membranprotein, CD4, kodiert, zusätzlich zu p12-APP₆₉₅ kotransfiziert, um dessen vermeintlichen Effekt auf die APP-Maturierung zu überprüfen. HEK293-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ und entweder dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase oder p12-HA-TMEM59, bzw. p12-HA-CD4 kotransfiziert. Die Zellkultur-Überstände wurden nach 48 Stunden gesammelt und die Zellen lysiert. Per SDS-PAGE und Western-Analyse wurden zelluläres und sekretiertes APP, sowie die Expression von TMEM59 und CD4 analysiert. CD4 verhält sich in allen Blots exakt wie die Kontrolle (siehe Abb. 25). Weder ist ein Einfluss auf die Maturierung (APP), noch auf die Sekretion detektierbar (APPs α , APPs β). Die CD4-Überexpression beeinflusst APP demzufolge nicht in seiner Maturierung und weiteren Prozessierung. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass der inhibitorische Maturierungs-Effekt, den TMEM59 verursacht, nicht durch einen Überexpressions-Artefakt verursacht wird.

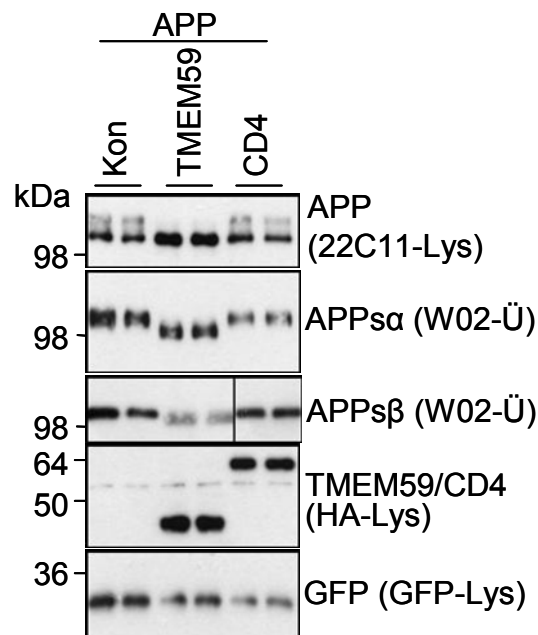


Abbildung 25: CD4 hat keinen Einfluss auf die Maturierung oder Sekretion von APP

HEK293-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ und dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon), bzw. p12-HA-TMEM59 oder p12-HA-CD4 kotransfiziert. p12-GFP diente als Transfektionskontrolle. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert. Mittels SDS-PAGE und Western-Analyse wurde in den Lysaten und den Zellkulturüberständen zelluläres (22C11) und lösliches APP (W02, wt192), sowie TMEM59 und CD4 (HA) und GFP (GFP-mono) untersucht. In dem APPs β -Blot wurden Spuren mit irrelevanten Proben entfernt, was mittels einer vertikalen Linie markiert ist, die dargestellten Proben waren dennoch auf demselben Blot geladen.

Das Typ-I-Transmembranprotein CD4 beeinflusst die Maturierung und Sekretion von APP nicht. CD4 ist jedoch hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert, nur ein geringer Teil des Proteins befindet sich im Golgi-Apparat. Um zu überprüfen, ob nicht die reine Überexpression von TMEM59 unspezifisch zu dem inhibitorischen Effekt auf APP führt, wurde als zusätzliches Kontrollprotein ein Golgi-ständiges Fusions-Protein verwendet. Dieses Protein, Golgi-Venus, wurde durch Fusion des N-Terminus der humanen β -1,4-Galaktosyltransferase an den N-Terminus des fluoreszierenden Proteins Venus generiert (Llopis et al., 1998). Somit ist das grün-fluoreszierende Protein durch den Galaktosyltransferasen-Anteil Golgi-ständig. Zum Nachweis der Golgi-Lokalisierung von Golgi-Venus wurden HEK293-Zellen in Kammern ausgesät, die eine Lebendzell-Aufnahme ermöglichen. Das Material dieser Platten besitzt ähnliche Eigenschaften wie Glas und entspricht in der Dicke und den optischen Eigenschaften einem Objektträger. Daher können Zellen in diesen Kammern kultiviert und nachfolgend mit konfokaler *in-vivo*-Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht werden. Die ausgesäten HEK293-Zellen wurden transient mit pCAG-IRES2-Golgi-Venus transfiziert und nach 24 Stunden *in-vivo* unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Das Signal von Golgi-Venus scheint tatsächlich Golgi lokalisiert zu sein (siehe Abb. 26A, weiße Pfeile), es ist weder eine Färbung der Plasmamembran, noch des Zytoplasmas oder des Kerns zu erkennen. HEK293-Zellen wurden nun transient mit p12-APP₆₉₅ und entweder p12-TMEM59, pCAG-IRES2-Golgi-Venus oder dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon) kotransfiziert. Die Zellkultur-Überstände wurden nach 48 Stunden gesammelt und die Zellen lysiert. Mittels SDS-PAGE und Western-Analyse wurden zelluläres und sekretiertes APP, sowie die Expression von TMEM59 und Golgi-Venus identifiziert. In diesem Experiment diente p12-GFP nicht als Transfektionskontrolle, da der Nachweis von Golgi-Venus über einen GFP-Antikörper erfolgte und das GFP-Signal des transfizierten GFP das Signal von Golgi-Venus überlagert hätte. Interessanterweise verhält sich das Golgi-ständige Protein unter Überexpressionsbedingungen in Bezug auf APP wie die Kontrolle (siehe Abb. 26B). Golgi-Venus zeigt, im Gegensatz zu TMEM59, keinen Einfluß auf die Sekretion und Maturierung von APP. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass der Effekt, den TMEM59 auf die Maturierung und Sekretion von APP zeigt, spezifisch ist und kein Artefakt darstellt.

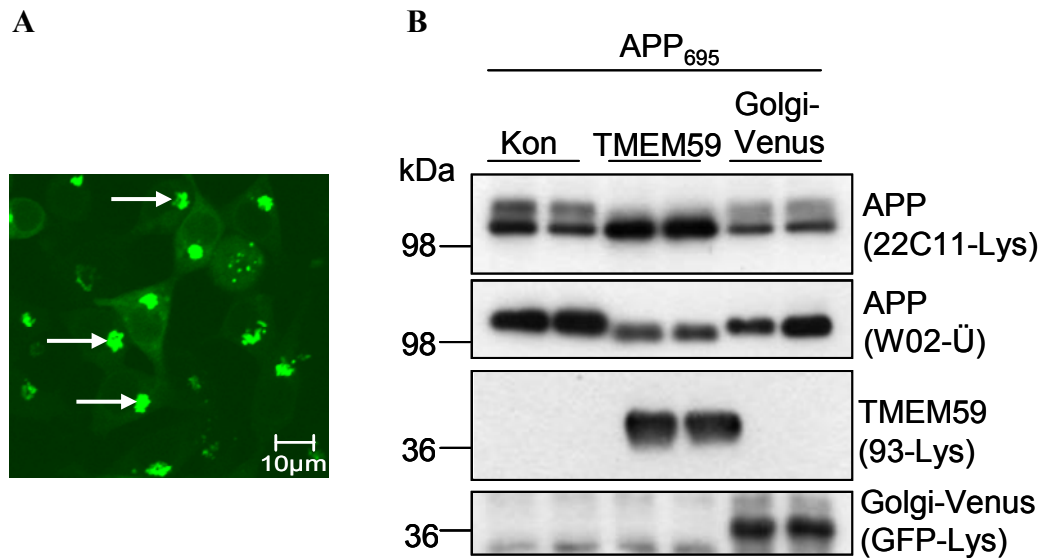


Abbildung 26: Golgi-Venus hat keinen Einfluß auf die Maturierung oder Sekretion von APP

A) HEK293-Zellen wurden in Kammern ausgesät und nach 24 h transient mit pCAG-IRES2-Golgi-Venus transfiziert. Die Auswertung erfolgte nach 24 h am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Weiße Pfeile markieren den Golgi-Apparat. **B)** HEK293-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ und dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon), bzw. p12-TMEM59 oder pCAG-IRES2-Golgi-Venus kotransfiziert. Mittels SDS-PAGE und Western-Analyse wurde zelluläres (22C11) und lösliches APP (W02), sowie TMEM59 (93) und Golgi-Venus (GFP-mono) untersucht.

2.2.5 Die generelle Sekretion von Proteinen wird von TMEM59 nicht beeinflusst

2.2.5.1 Die TNF α -Sekretion wird von TMEM59 nicht gehemmt

Um zu überprüfen, ob die TMEM59-Expression ebenfalls auf die Prozessierung und Sekretion anderer Proteine einen Einfluss zeigt, wurde ein möglicher Effekt von TMEM59 auf den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) untersucht. Es handelt sich dabei um ein potentes Zytokin, das von mehreren Zelltypen, unter ihnen Makrophagen, Monozyten und Fibroblasten, produziert wird. TNF α ist ein Typ-II-Transmembran-Protein, welches als Vorläufer-Protein synthetisiert und sodann, vergleichbar mit APP, in einer α -Sekretase-ähnlichen Art prozessiert wird (Hooper et al., 1997). Es liegt in der biologisch aktiven Form als nicht-glykosyliertes Trimer oder Dimer vor. Wird TNF α prozessiert, so entsteht ein lösliches Fragment, sowie ein N-terminales Fragment von TNF α , TNF α -NTF. Als weitere Form lässt sich im Lysat transfizierter Zellen das unprozessierte Vollängen-Protein nachweisen (TNF α -fl). Um zu überprüfen, ob TMEM59 auch auf dieses sekretierte unglykosylierte Protein einen Einfluss hat, wurden HEK293-Zellen transient mit p12-Flag-

TNF α -HA und Kontroll-Plasmid p12-Luziferase, bzw. p12-TMEM59 kotransfiziert. Als transfektionskontrolle wurde jeweils zusätzlich p12-GFP kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und Zellkultur-Überstand und Lysat wurden per Western-Analyse untersucht. Weder auf die lösliche Form im Überstand, noch auf TNF α -NTF oder die Volllängen-Form ist ein Einfluss der TMEM59-Koexpression zu detektieren (siehe Abb. 27). TMEM59 scheint demzufolge keinen Effekt auf die Maturierung oder Prozessierung von TNF α zu haben. Offensichtlich zeigt die TMEM59-Expression keinen generellen Effekt auf die Prozessierung und Sekretion von Proteinen.

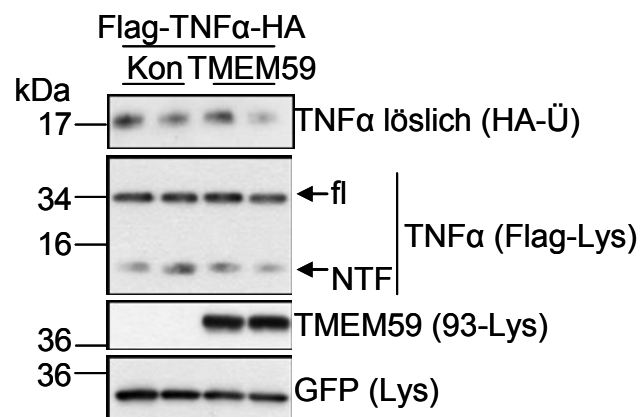


Abbildung 27: TMEM59 beeinflusst nicht die TNF α -Prozessierung

HEK293-Zellen wurden transient mit einem p12-Flag-TNF α -HA und dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon), bzw. p12-TMEM59 kotransfiziert, als Transfektionskontrolle diente p12-GFP. Nach 48 Stunden wurde der Zellkultur-Überstand gesammelt und die Zellen lysiert. Überstand und Lysat wurden mittels Western-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper auf lösliches TNF α (HA), TNF α -fl und TNF α -NTF (Flag), TMEM59 (93) und GFP (GFP-mono) untersucht.

2.2.5.2 Die Sekretion der alkalischen Phosphatase (SEAP) bleibt durch TMEM59 unbeeinflusst

Zusätzlich zu TNF α sollte der mögliche Effekt von TMEM59 auf ein weiteres Protein untersucht werden, um eine genauere Aussage treffen zu können, ob die generelle Sekretion von Proteinen unter der Expression von TMEM59 gestört ist.

Die sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) ist die verkürzte Form der GPI-verankerten humanen plazentaren alkalischen Phosphatase (AP), die eine veränderte kodierende Region für die Membran-Lokalisierung im Vergleich zur AP aufweist. Die SEAP ist ein lösliches, glykosyliertes Enzym, welches enzymatisch aktiv ist und ein großes Spektrum an Substraten bei alkalischem pH hydrolysiert (Cullen and Malim, 1992). Somit ist die SEAP-Aktivität im Zellkultur-Überstand transfizierter Zellen durch Zugabe von para-Nitrophenolphosphat

(pNPP) und photometrischer Messung des Umsatzes zu para-Nitrophenol (pNP) möglich. Die Aktivität der endogenen alkalischen Phosphatase kann durch Erhitzen eliminiert werden und ist somit nicht in der Lage, die Messung der Phosphatase-Aktivität der transfizierten SEAP zu verfälschen (Cullen and Malim, 1992).

Um zu testen, ob die Kotransfektion mit p12-TMEM59 die Maturierung und Sekretion eines weiteren sekretierten Proteins beeinflusst, wurden HEK293-Zellen mit p12-HA-SEAP und p12-TMEM59, bzw. dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase kotransfiziert. Per Western-Analyse wurden das Zelllysate und der Zellkultur-Überstand auf HA-SEAP und TMEM59-Expression getestet. Die TMEM59-Koexpression führt in diesem Falle zu einer Inhibierung der Maturierung, die mature Bande der SEAP im Lysat ist im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Proben nicht mehr zu detektieren (siehe Abb. 28). Die SEAP wird zwar unter dem Einfluss von TMEM59 weiterhin sekretiert, weist jedoch eine höhere Mobilität im Gel auf, als Kontroll-transfizierte SEAP, was auf eine veränderte Glykosylierung hindeuten könnte. TMEM59 inhibiert demzufolge nicht generell die Funktion des Golgi-Apparates, da Sekretion weiterhin stattfindet. Anscheinend beeinflusst TMEM59 allerdings dennoch die Maturierung und Glykosylierung von sekretorischen Proteinen. Parallel wurde im Zellkultur-Überstand die Phosphatase-Aktivität der SEAP in TMEM59-kotransfizierten Zellen im Vergleich zu Kontroll-kotransfizierten Zellen gemessen (siehe Abb. 28B). Die Messwerte stammen aus zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten und beziehen die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung mit ein. Die SEAP-Aktivität ist unter dem Einfluß der TMEM59-Expression stark reduziert, was auf eine unzureichende Glykosylierung hindeutet, durch die SEAP nicht mehr enzymatisch aktiv ist. Bereits in früherer Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass stabil-SEAP-exprimierende Zellen nach Tunikamycin-Induktion eine reduzierte dosisabhängige Phosphatase-Aktivität aufweisen, was zeigt, dass eine normale Glykosylierung für die volle Aktivität der SEAP Voraussetzung ist (Hiramatsu et al., 2006b).

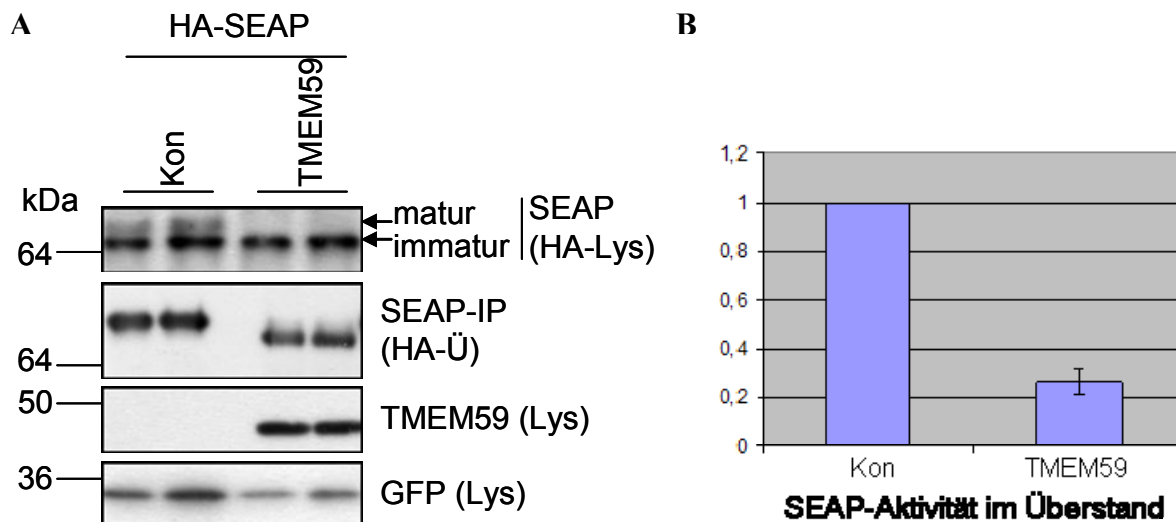


Abbildung 28: TMEM59 inhibiert nicht die Sekretion der SEAP, beeinflusst jedoch die komplexe Glykosylierung

HEK293-Zellen wurden transient mit p12-HA-SEAP und p12-TMEM59, bzw. Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon) kotransfiziert, p12-GFP diente als Transfektions-Kontrolle. **A)** Die Zellen wurden nach 48 h lysiert und das Medium gegen SEAP immunpräzipitiert (HA). Mittels SDS-PAGE und Western-Blot wurde SEAP (HA), TMEM59 (93) und GFP (GFP-mono) nachgewiesen. **B)** Phosphatase-Aktivitäts-Bestimmung im Zellkultur-Überstand der kotransfizierten HEK293-Zellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung anhand zweier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

2.2.5.3 Lösliche Formen von APP werden trotz TMEM59-Expression sekretiert

Um den Effekt auf ein drittes sekretiertes Protein zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen transient mit p12-APP α , p12-APP β und p12-APP β' , die jeweils die sekretierten Formen von APP kodieren, sowie entweder p12-TMEM59 oder dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase kotransfiziert. Die Zellen wurden nach 48 Stunden lysiert und der Zellkultur-Überstand und das Lysat mittels Western-Analyse untersucht. Wie schon bei der sekretorischen AP zeigt auch hier die Expression von TMEM59 keine Inhibition der Sekretion (siehe Abb. 29). Erneut ist eine erhöhte Mobilität der sekretierten Proteine im Gel zu beobachten, die mit TMEM59 kotransfiziert wurden. Augenscheinlich wurde auch bei diesen sekretierten Proteinen die Glykosylierung beeinflusst, was die Sekretion jedoch nicht stört. Dies deutet abermals daraufhin, dass TMEM59 die Golgi-Funktion nicht grundsätzlich hemmt, da die Sekretion stattfindet.

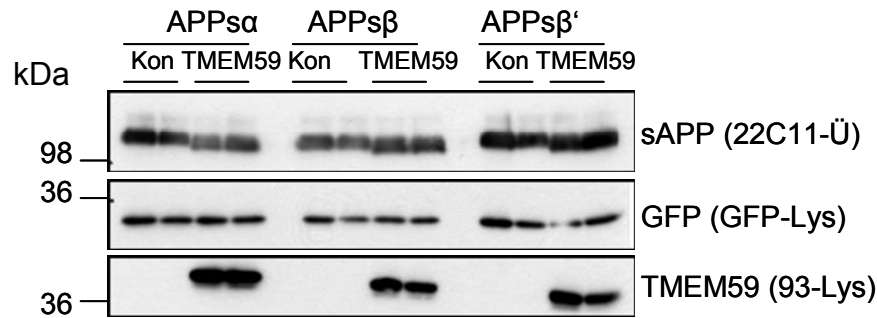


Abbildung 29: Lösliches APP wird unter TMEM59-Einfluß sekretiert, jedoch nicht mehr komplex-glykosyliert.

HEK293-Zellen wurden transient mit p12-APPs α , p12-APPs β und p12-APPs β' und p12-TMEM59, bzw. dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon) kotransfiziert, p12-GFP diente als Transfektions-Kontrolle. Die Zellen wurden nach 48 h lysiert und die Lysate und das Medium mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf sekretiertes APPs α , APPs β und APPs β' (22C11), TMEM59 (93) und GFP (GFP-mono) überprüft.

2.2.6 TMEM59 beeinflusst die Glykosylierung von APP

Für die SEAP (unter Kapitel 2.2.5.2) und die löslichen APP-Formen (unter Kapitel 2.2.5.3) konnte gezeigt werden, dass die Expression von TMEM59 die Glykosylierung zu beeinflussen scheint. Bei genauerer Betrachtung der vorangegangenen Experimente scheint die TMEM59-Expression ebenfalls nicht nur die Maturierung und Sekretion von APP zu inhibieren. Betrachtet man das sekretierte APPs α im Zellkultur-Überstand genauer, so scheint es eine leicht erhöhte Mobilität im Gel aufzuweisen, im Gegensatz zu Kontroll-transfiziertem APPs α (siehe Kapitel 2.2.3, Abb. 24). Dasselbe gilt für APPs β , wobei dort der leichte Laufverhaltensunterschied geringer ausfällt (siehe Kapitel 2.2.3, Abb. 24). Dies wirft die Vermutung auf, dass durch die TMEM59-Koexpression die Glykosylierung von APP gehemmt sein könnte. Dadurch könnte der Transport von APP beeinflusst werden, was sowohl die fehlende komplex-glykosylierte Bande des zellulären APP, als auch die stark verminderte Sekretion, sowie die erhöhte Mobilität von APPs α und APPs β erklären würde. Um die Frage nach einer Beeinflussung der Glykosylierung zu beantworten, wurde der Zellkultur-Überstand von HEK293-Zellen gesammelt, die transient mit p12-APP₆₉₅ und entweder einem Kontroll-Plasmid oder p12-TMEM59 kotransfiziert wurden, und mit PNGase-F behandelt. Darauffolgend wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Western-Analyse auf APPs α untersucht. Würde die erhöhte Mobilität im Gel bei Kontroll-kotransfizierten Proben nach PNGase-F-Behandlung dasselbe Laufverhalten demonstrieren, wie die Proben nach TMEM59-Kotransfektion, so würde die TMEM59-Expression die N-Glykosylierung von APP hemmen. Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, führt der PNGase-F-

Verdau nicht nur in den Kontroll-transfizierten Zellen zu einer erhöhten Mobilität im Gel, also zu einer Abspaltung der komplexen N-Glykosylierung, sondern auch in den TMEM59-transfizierten Zellen, wo ebenfalls eine minimale Änderung im Laufverhalten detektiert werden kann. Die N-Glykosylierung ist unter TMEM59-Expression demzufolge nicht komplett inhibiert, andernfalls wäre kein Unterschied zwischen PNGase-F-behandelten und –unbehandelten Zellen erkennbar. Zugleich wird deutlich, dass die mit p12-TMEM59-transfizierten Proben im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Proben, die PNGase-F behandelt wurden, eine erhöhte Mobilität im Gel aufweisen. Der Laufverhaltens-Unterschied der löslichen Form von APP, welches entweder mit einem Kontroll-Plasmid oder p12-TMEM59 kotransfiziert wurde, ist also nicht nur durch eine Änderung der N-Glykosylierung bedingt. Vermutlich verursacht eine Änderung der O-Glykosylierung, einen Großteil des Laufverhaltens-Unterschiedes. Dies scheint auch insofern plausibel, als APP stark O-glykosyliert ist und ein Defekt in der O-Glykosylierung einen deutlich sichtbaren Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität im Gel verursacht (Pahlsson and Spitalnik, 1996). Ein alleiniger Effekt auf die N-Glykosylierung würde nicht einen so deutlichen Laufverhaltensunterschied verursachen können (siehe unter Kapitel 2.2.3, Abb. 24).

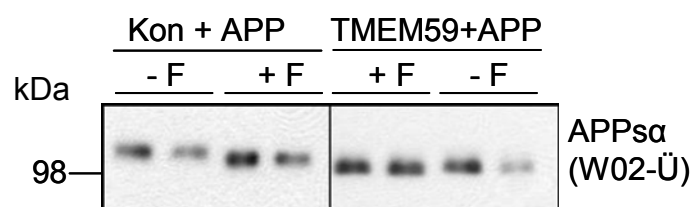


Abbildung 30: Die TMEM59-Expression scheint nicht nur die N-Glykosylierung zu inhibieren

HEK293-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ und entweder dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon) oder p12-TMEM59 kotransfiziert. Der Überstand der Zellen wurde nach 24 h gesammelt und mit PNGase-F verdaut (+F). Per Western-Analyse wurde der Überstand sodann auf lösliches APPsα (W02) überprüft. Die Proben waren auf demselben Gel geladen, zwischenliegende Spuren wurden entfernt, dies ist mittels eines vertikalen Strichs dargestellt.

Es stellte sich die Frage, ob TMEM59 überhaupt einen Effekt auf die N-Glykosylierung oder tatsächlich nur auf die O-Glykosylierung ausübt. Zur weiteren Klärung wurde ein APP-Konstrukt generiert, bei dem beide möglichen N-Glykosylierungsstellen mutiert wurden, indem jeweils das Serin an Position drei des Motivs –N-X-S- durch ein Alanin ersetzt wurde. Zeigt TMEM59-Koexpression mit diesem APPΔNGS-Konstrukt keinen Effekt auf dessen Maturierung und Sekretion, so wäre die N-Glykosylierung, die wtAPP aufweist, mitverantwortlich für den inhibitorischen Effekt von TMEM59 auf dessen Maturierung. Es

konnte bereits gezeigt werden, dass APP Δ NGS in der Sekretion jedoch unbeeinträchtigt bleibt, die Sekretion von APP hängt demzufolge nicht von der N-Glykosylierung ab (Pahlsson and Spitalnik, 1996). HEK293-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ oder p12-APP₆₉₅ Δ NGS und jeweils einem Kontroll-Plasmid oder p12-TMEM59 kotransfiziert. Mittels Western-Analyse wurden Zelllysate und Zellkultur-Überstand auf APP und TMEM59-Expression hin untersucht. Die Mutation der N-Glykosylierungsstellen war erfolgreich, da die APP Δ NGS-Banden durch die fehlenden Zuckerketten im Vergleich zu den APP-Banden eine leicht erhöhte Mobilität im Gel aufwiesen, als die wtAPP-Banden, was im Zelllysate ersichtlich ist (siehe Abb. 31). Es wird jedoch deutlich, dass APP Δ NGS unter TMEM59-Koexpressions-Bedingungen genauso in der Maturierung und Sekretion beeinträchtigt ist, wie wtAPP.

Dies deutet erneut darauf hin, dass TMEM59 einen Einfluss auf die O-Glykosylierung von APP hat. In einem späteren Kapitel (unter Kapitel 2.2.7.1) wird nachgewiesen, dass TMEM59 jedoch nicht nur die O-Glykosylierung, wie im Falle von APP, sondern auch die N-Glykosylierung von Proteinen beeinträchtigen kann. In früherer Arbeit wurde gezeigt, dass eine defekte N-Glykosylierung anderer zellulärer Proteine die Maturierung von APP beeinflusst (Pahlsson and Spitalnik, 1996). Möglicherweise hemmt auch TMEM59 nicht direkt die Glykosylierung von APP, sondern ebenfalls die Glykosylierung anderer zellulärer Proteine, welche wiederum für die Maturierung von APP notwendig sind.

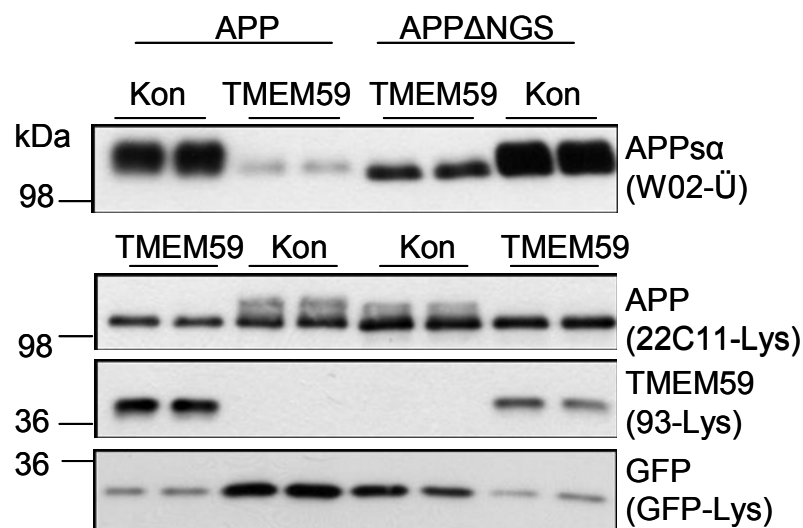


Abbildung 31: TMEM59 inhibiert Maturierung und Sekretion von APP Δ NGS

HEK293-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ oder p12-APP₆₉₅ Δ NGS und jeweils dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon) oder p12-TMEM59 kotransfiziert, als Transfektionskontrolle diente p12-GFP. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert. Mittels Western-Analyse wurde Zelllysate und Zellkultur-Überstand auf zelluläres APP (22C11), sowie lösliches APP α (W02) und TMEM59-Expression (93) hin untersucht.

Es stellte sich die Frage, ob es weitere Proteine gibt, welche die Golgi-Glykosylierung beeinflussen und somit einen Einfluss auf die Maturierung von zellulären Proteinen haben können. Eine Überprüfung der Literatur zeigte, dass der Defekt in der N- und O-Glykosylierung, den die TMEM59-Überexpression verursacht, auch unter Knock-out-Bedingungen verschiedener Proteine beschrieben wurde. Unter ihnen befinden sich die Komponenten des COG („conserved oligomeric Golgi“-Komplexes. Dieser oktamere Komplex (COG1-8) wird für die korrekte Lokalisierung und Aktivität der Golgi-residenten Proteine benötigt, insbesondere von Enzymen, die in den Glykosylierungs-Prozess involviert sind (Oka and Krieger, 2005; Ungar et al., 2006). Es existieren zwei COG-Knock-out-CHO-Zelllinien, die COG1-defizient (ldIB) oder COG2-defizient (ldIC) sind. In diesen Zelllinien wurden Defekte in der Glykosylierung des LDL-Rezeptors und anderer Proteine nachgewiesen (Kingsley et al., 1986). Ausgehend von diesen Befunden stellte sich die Frage, ob die APP-Glykosylierung und -Prozessierung auch in diesen COG-defizienten-Zellen gestört ist und ein ähnliches Bild ergibt, wie unter Koexpression mit TMEM59 in HEK293-Zellen. Zu diesem Zweck wurden wtCHO-, ldIB-CHO- und ldIC-CHO-Zellen transient mit p12-APP₆₉₅ und entweder Kontroll-Plasmid oder p12-TMEM59 kotransfiziert. Die Überstände wurden gesammelt und die Zellen lysiert, beides wurde mittels SDS-PAGE und Western-Analyse auf APP und TMEM59-Expression hin untersucht. In Abbildung 32 ist zu erkennen, dass in den wtCHO-Zellen die APP-Maturierung und -Sekretion durch die TMEM59-Koexpression inhibiert wird. Ein Ausschnitt dieser Abbildung wurde bereits unter Kapitel 2.2.2 in Abbildung 23B gezeigt. Die Banden im Western-Blot wurden quantifiziert, sekretiertes APP zu zellulärem APP ins Verhältnis gesetzt und eine Graphik generiert, die die Sekretion der unterschiedlichen Zelltypen verdeutlicht. Dies ist nötig, da zum Einen durch das Aussäen der drei unterschiedlichen Zelltypen und zum Anderen durch die unterschiedliche Transfizierbarkeit der Zellen kein äquivalent-starkes Signal für zelluläres APP erhalten werden konnte, so dass das Verhältnis sekretiertes zu zellulärem APP mehr Aussagekraft besitzt. Die Sekretion von APP_α wird in wtCHO-Zellen durch die Expression von TMEM59 um 70% reduziert (siehe Abb. 32/ Graphik). Sowohl in den ldIB-, als auch in den ldIC-Zellen findet eine Maturierung von APP selbst in den Kontroll-transfizierten Zellen nicht mehr statt, was den bereits publizierten Glykosylierungs-Defekten in diesen Zellen entspricht (Kingsley et al., 1986). Die Sekretion von APP in diesen Zellen wird im Vergleich zur wtCHO-Zelllinie, in der APP normal maturiert und sekretiert wird, interessanterweise um 40%, bzw. 70% reduziert. APP-Maturierung und -Prozessierung scheinen demzufolge abhängig von der Expression von COG1/COG2 zu sein. Die Sekretion von APP in den COG-Knock-out-Zellen

zeigt durch die Koexpression von TMEM59 lediglich in den IdIB-Zellen eine sehr geringe zusätzliche Abnahme. Das sekretierte APP α in IdIB- und IdIC-Zellen weist im Vergleich zu wtCHO-Kontroll-transfizierten Zellen, gleich den wtCHO-TMEM59-transfizierten Zellen, ebenfalls eine erhöhte Mobilität im Gel auf. Anscheinend sorgt TMEM59 für einen Glykosylierungs-Defekt, der ähnliche Auswirkungen zeigt, wie der COG-Knock-out. Dies ist eine unabhängige Bestätigung die zeigt, dass Änderungen in der Golgi-Glykosylierungs-Regulation tatsächlich die APP-Sekretion beeinflussen. Auch Pahlsson konnte zeigen, dass in Glykosylierungs-defizienten Zellen, in denen die initiale N-Glykan-Prozessierung gestört ist, zugleich die APP-Sekretion reduziert ist (Pahlsson and Spitalnik, 1996).

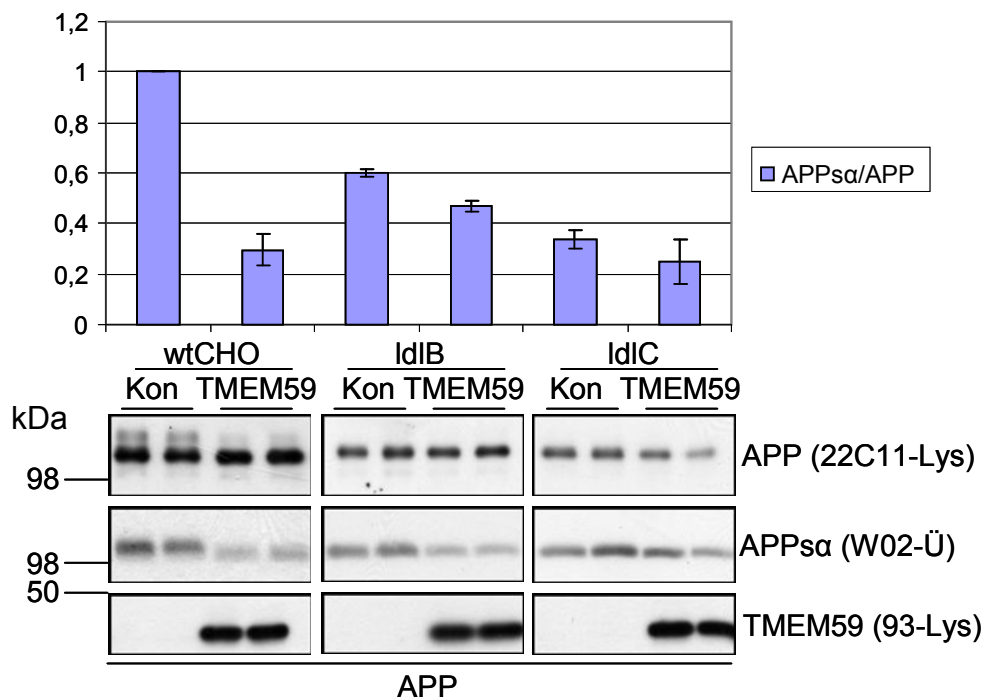


Abbildung 32: Expression von TMEM59 ähnelt dem COG-Knock-out

wtCHO-, IdIB-CHO- und IdIC-CHO-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ und entweder dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon) oder p12-TMEM59 kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Zellkulturüberstände gesammelt. Mittels Western-Analyse wurde zelluläres (22C11), sowie sekretiertes APP (W02) und die TMEM59-Expression (93) analysiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

Um zu überprüfen, ob der COG-Defizit auch einen Einfluß auf endogenes APP zeigt, wurden wtCHO-, IdIB- und IdIC-Zellen auf zelluläres und sekretiertes endogenes APP hin untersucht. Die ausgesäten Zellen wurden nach 48 Stunden lysiert und die Zellkultur-Überstände gesammelt. Im Gegensatz zu den wtCHO-Zellen findet sowohl in den IdIB-, als auch in den IdIC-Zellen keine Maturierung des endogenen APP statt, lediglich die immature Form von

APP ist zu detektieren (siehe Abb. 33). Das sekretierte endogene APP α zeigt ebenfalls wie im Falle des überexprimierten APP in den IdIB- und IdIC-Zellen eine erhöhte elektrophoretische Mobilität im Gel, was erneut auf eine veränderte Glykosylierung hindeutet. Ein inhibitorischer Effekt auf die Sekretion konnte in diesen COG-defizienten Zellen nicht festgestellt werden, da trotz Messung der Proteinkonzentration und Abgleich beim Laden des Gels das Erlangen äquivalenter Proteinmengen schwierig zu bewerkstelligen ist. Daher kann zwar eine Aussage über das unterschiedliche Laufverhalten von APP α im Gel getroffen werden, jedoch nicht über die Quantität des Signals.

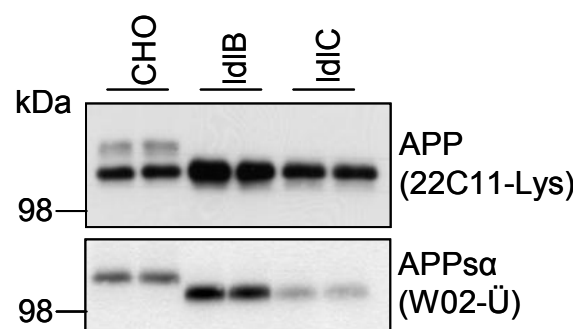


Abbildung 33: Der COG-Knock-out inhibiert die Maturierung des endogenen APPs
wtCHO-, IdIB- und IdIC-Zellen wurden ausgesät und nach 48 h lysiert. Mittels Western-Analyse wurden Lysate und Zellkulturüberstände auf endogenes zelluläres (22C11) und sekretiertes APP (W02) hin untersucht.

2.2.7 TMEM59 beeinflusst die Glykosylierung verschiedener Proteine

2.2.7.1 *BACE1 wird durch TMEM59-Expression in seiner Glykosylierung gehemmt*

Es stellte sich die Frage, ob ein möglicher Effekt von TMEM59 auf die Glykosylierung weiterer Proteine nachgewiesen werden kann, zu diesem Zweck wurde der Effekt von TMEM59 auf BACE1 untersucht. BACE1 ist wie APP ein Typ-I-Transmembranprotein, das kotranslational N-glykosyliert und darauffolgend komplex-glykosyliert wird, jedoch im Unterschied zu APP nicht O-glykosyliert ist (Huse et al., 2000). Unter Kapitel 1.2.2 wurde auf BACE1 näher eingegangen. Um den Einfluß von TMEM59 auf die Glykosylierung von BACE1 zu überprüfen, wurden HEK293-Zellen transient mit p12-BACE1 und entweder p12-TMEM59 oder einem Kontroll-Plasmid kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Analyse auf BACE1- und TMEM59-Expression überprüft. In

Abbildung 34A wird deutlich, dass die TMEM59-Expression die Maturierung von BACE1 deutlich hemmt. Die mature, komplex-glykosylierte Bande, die in den Kontroll-transfizierten Proben zu sehen ist, ist verschwunden, stattdessen ist nur noch die immature, nicht-komplex glykosylierte Form zu erkennen. In einem zweiten Experiment wurden wiederum HEK293-Zellen nach demselben Schema transfiziert, jedoch wurden die Lysate jeweils mit PNGase-F und Endo-H behandelt. Kontroll-Lysate wurden lediglich mit den jeweiligen Puffern behandelt. In den Kontrollzellen war die deutliche mature, komplex-glykosylierte Form und eine schwächere immature, nicht komplex-glykosylierte Form von BACE1 zu detektieren (siehe Abb. 34A). Die mature Bande erwies sich, wie bereits publiziert, als PNGase-F-sensitiv und Endo-H stabil, die immature hingegen war sensitiv gegenüber beiden Enzymen (Capell et al., 2000; Huse et al., 2000). Die Expression von TMEM59 verursachte eine deutliche Inhibition der Maturierung von BACE1, die komplex-glykosylierte Form war nicht mehr zu detektieren. Die verbleibende immature Form zeigte sich wie bei den Kontroll-transfizierten Zellen sensitiv gegenüber PNGase-F und Endo-H (siehe Abb. 34B). TMEM59 selber ist, wie bereits unter Kapitel 2.1.5 beschrieben, sowohl PNGase-F-, als auch Endo-H-sensitiv, was anhand des unterschiedlichen Laufverhaltens beobachtet werden kann (siehe Abb. 34B).

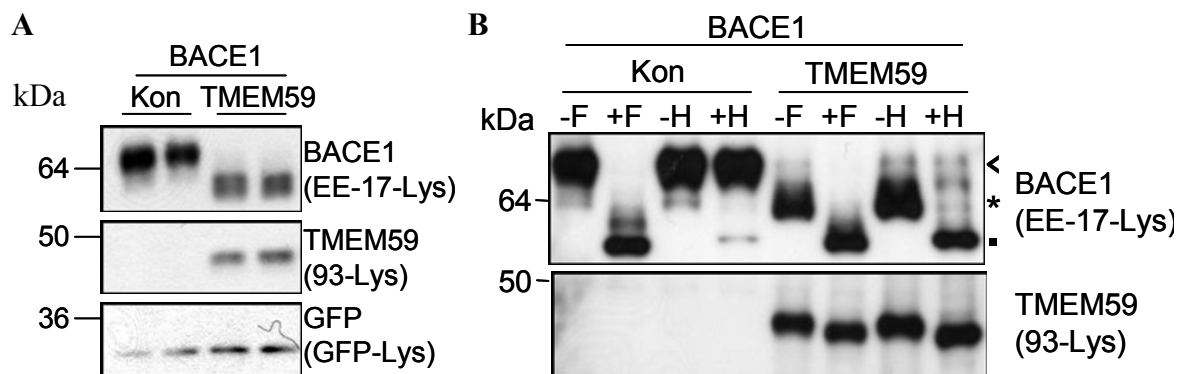


Abbildung 34: Die TMEM59-Expression inhibiert die komplexe Glykosylierung von BACE1

A) HEK293-Zellen wurden transient mit p12-BACE1 und p12-TMEM59, bzw. dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon) kotransfiziert. p12-GFP diente als Transfektionskontrolle. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert. Mittels Western-Analyse wurden die Zelllysate auf BACE1 (EE-17), sowie TMEM59-Expression (93) untersucht. **B)** HEK293-Zellen wurden transient mit p12-BACE1 und p12-TMEM59, bzw. dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon) kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden Zelllysate hergestellt, die jeweils mit PNGase-F und Endo-H behandelt wurden, zur Kontrolle lediglich mit Deglykosylierungs-Puffer. Mittels SDS-PAGE und Western-Blot wurden BACE1 (EE-17) und TMEM59 (93) detektiert. Die mature komplex-glykosylierte Form von BACE1 ist mit einem Pfeil, die immature Form mit einem Sternchen und die deglykosylierte Form mit einem Punkt gekennzeichnet.

Unter Einfluß von TMEM59 scheint BACE1 demnach keine N-Glykosylierung mehr zu erhalten, die BACE1 jedoch für seine volle Aktivität benötigt (Chang et al., 2005; Charlwood et al., 2001). Somit könnte der Effekt, den TMEM59 auf die Prozessierung von APP zeigt, nicht nur durch einen Effekt auf APP selbst, sondern zusätzlich auch auf einen Einfluß auf die Aktivität einer seiner Sekretasen zurückzuführen sein.

2.2.7.2 Das Prion-Protein zeigt unter TMEM59-Expression eine veränderte Glykosylierung

Der Glykosylierungseffekt von TMEM59 sollte noch auf ein weiteres Protein getestet werden, hierfür wurde das GPI-verankerte Prion-Protein (PrP) gewählt. Die Akkumulation einer anormal gefalteten Form des Prion-Proteins im zentralen Nervensystem führt bei erkrankten Organismen zu der Prion-Krankheit. Korrekt gefaltetes PrP durchquert das Golgi-Kompartiment und den sekretorischen Weg und wird mittels eines GPI-Ankers an der Aussenseite der Plasmamembran befestigt (Borchelt et al., 1990; Caughey and Raymond, 1991; Taraboulos et al., 1990). Das Maus-Prion-Protein wird durch zwei N-Glykosylierungen an den Asparaginen 180 und 196 posttranslational modifiziert, es erhält jedoch keinerlei O-Glykosylierung (Endo et al., 1989; Haraguchi et al., 1989; Rudd et al., 1999; Stimson et al., 1999). Das Protein kann demnach in drei unterschiedlichen Glykosylierungszuständen vorkommen, wobei anhand des Molekulargewichts unglykosylierte Moleküle, Mannose-reiche Molekül-Formen und komplex-glykosylierte Moleküle unterschieden werden können, die im Western-Blot ein charakteristisches vier-Banden-Muster aufweisen (Winklhofer et al., 2003). Alle Formen werden auf der Zelloberfläche exprimiert, jedoch zu unterschiedlichen Anteilen am Gesamt-PrP (Stahl et al., 1990). Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der N-Glykosylierung von PrP nicht mit dem zellulären Transport von PrP interferiert (Winklhofer et al., 2003). Selbst in Anwesenheit von Tunikamyzin fand Transport von PrP zu der Plasma-Membran statt (Lehmann and Harris, 1997). Mit Hilfe von Tunikamyzin kann die Bildung des „Core“-Oligosaccharids schon in der ersten Stufe gehemmt werden und die N-Glykosylierung vollständig unterbunden werden.

Das Prion-Protein PrP war im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus drei Gründen von Interesse: in fehlgefalteter Form kann es ebenfalls zu einer amyloidogenen Erkrankung führen. Zusätzlich eignet es sich durch seine Zucker-Modifikationen und dem daraus resultierenden charakteristischen Vier-Banden-Muster (unglykosyliert, monoglykosyliert, diglykosyliert, komplex glykosyliert) für eine Analyse des möglichen Effekts von TMEM59

auf die Maturierung eines Proteins. Schließlich handelt es sich bei PrP nicht um ein Typ-I-Transmembranprotein, wie APP, sondern um ein GPI-verankertes Protein.

Um den Glykosylierungsstatus des wtPrP zu bestimmen, wurde, wie zuvor bei APP, in HEK293-Zellen eine transiente Kotransfektion von pcDNA3.1-wtPrP und p12-TMEM59, bzw. einem Kontroll-Plasmid durchgeführt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und abzentrifugiert und nachfolgend das entstehende Pellet und das Lysat per SDS-PAGE auf PrP untersucht. Kontroll-kotransfiziertes PrP weist das charakteristische Vier-Banden-Muster auf, wobei unter Kotransfektion mit TMEM59 die komplex-glykosylierte Bande nicht mehr zu detektieren ist, während die verbleibenden Formen zu akkumulieren scheinen (siehe Abb. 35). TMEM59 scheint demzufolge auch auf die Maturierung des Prion-Proteins einen Einfluss zu haben.

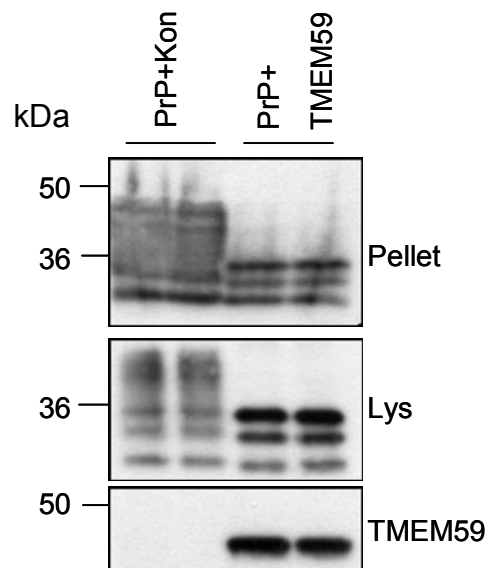


Abbildung 35: TMEM59 inhibiert die komplexe Glykosylierung von wtPrP

HEK293-Zellen wurden transient mit pcDNA3.1-wtPrP und p12-TMEM59, bzw. dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase (Kon) kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert, abzentrifugiert und das entstehende unlösliche Pellet und das Lysat mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf PrP (3F4) und TMEM59 (93) untersucht.

2.3 Molekulare mechanistische Untersuchung des Effekts von TMEM59

2.3.1 TMEM59 muss Golgi-lokalisiert sein

TMEM59 scheint die Glykosylierung von Proteinen beeinflussen zu können, was aufgrund der Lokalisierung von TMEM59 im Golgi plausibel sein könnte. Um zu testen, ob die Golgi-Lokalisierung von TMEM59 ausschlaggebend für den Effekt auf die Glykosylierung anderer

Proteine ist, wurde ein Konstrukt kloniert, bei dem TMEM59 mit einem ER-Rückhaltesignal ausgestattet wurde (TMEM59-KKXX) (Jackson et al., 1990; Nilsson et al., 1989). HEK293-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ und p12-HA-TMEM59-KKXX, bzw. Kontroll-Plasmid oder p12-HA-TMEM59 transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und das gesammelte Medium und das Lysat mittels SDS-PAGE und Western-Blot untersucht. In Abbildung 36 ist erkennbar, dass TMEM59-KKXX gleich der Kontrolle keinen Effekt auf APP hat, während TMEM59 den typischen inhibitorischen Effekt auf Maturierung und Sekretion von APP zeigt. Dies deutet daraufhin, dass TMEM59 im Golgi lokalisiert sein muss, um die Glykosylierung von Proteinen inhibieren zu können.

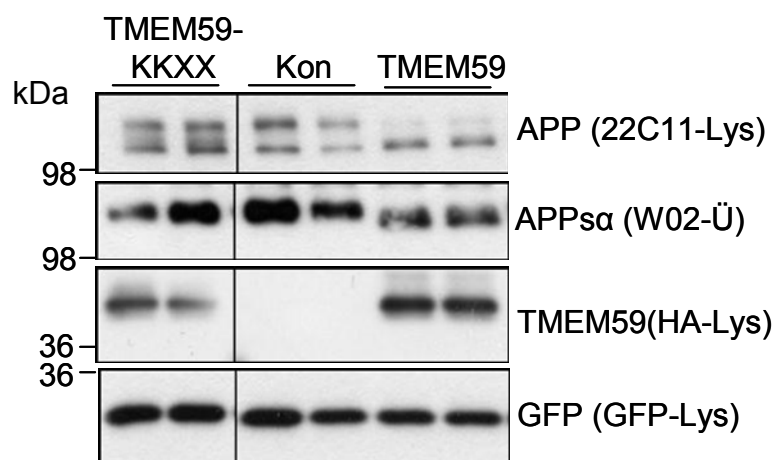


Abbildung 36: TMEM59 mit ER-Retentionssignal zeigt keinen Einfluß auf die Glykosylierung und Sekretion von APP

HEK293-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ und p12-HA-TMEM59, bzw. p12-HA-TMEM59-KKXX oder dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase(Kon) kotransfiziert, p12-GFP diente als Transfektions-Kontrolle. Die Zellen wurden nach 48 h lysiert und die Lysate und das Medium mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf zelluläres APP (22C11), sekretiertes APP α (W02), zelluläres TMEM59 (HA) und GFP (GFP-mono) untersucht.

2.3.2 TMEM59 beeinträchtigt den Transport von Proteinen

Unter Expression von TMEM59 ist die Maturierung von APP geblockt, gleichzeitig wird die APP-Sekretion inhibiert. Die Tatsache, dass TMEM59 Golgi-lokalisiert ist legt die Vermutung nahe, dass die Expression von TMEM59 den Transport von APP beeinträchtigen könnte. Dies könnte durch ein Zurückhalten des immaturren, unterglykosylierten APP im sekretorischen Weg geschehen, so dass APP weder die Plasmamembran der Zelle, wo der α -Sekretase-Schnitt stattfindet (Checler, 1995; Sisodia, 1992), noch die Endosomen erreicht, in denen der β -Sekretase-Schnitt erfolgt (Haass et al., 1992a; Perez et al., 1999) und demzufolge

dort auch nicht prozessiert werden kann. Um dies zu testen, wurden HEK293-Zellen in Kammern ausgesät, die eine Lebendzell-Aufnahme ermöglichen. Die ausgesäten Zellen wurden transient mit pShuttle-CMV-YFP-APP transfiziert, einem APP-Konstrukt, welches N-terminal anstelle der KPI-Domäne ein fluoreszierendes Protein, YFP („yellow fluorescent protein“), trägt (Goldsbury et al., 2006). Zusätzlich wurden die Zellen entweder mit einem Kontrollplasmid, p12-TMEM59 oder mit p12-HA-TMEM59-KKXX mit dem ER-Rückhaltesignal transfiziert. Nach 24 Stunden wurden diese Zellen *in-vivo* unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. In den Kontroll-transfizierten Zellen ist anhand der Zell-Zell-Kontakte eine deutliche Zelloberflächen-Färbung durch YFP-APP zu erkennen, APP wird demzufolge zur Plasmamembran transportiert (siehe Abb. 37, roter Pfeil). Zugleich deutet ein Signal im Inneren der Zelle auf eine Golgi-Färbung (siehe Abb. 37, weißer Pfeil). Dies ist nicht verwunderlich, da das Protein bei dem Transport zur Zelloberfläche den Golgi-Apparat durchwandern muss. Sind die Zellen hingegen mit TMEM59 kotransfiziert, so ist das YFP-Signal nicht mehr an der Zelloberfläche detektierbar, sondern verstärkt im Golgi und im perinukleären Raum (siehe Abb. 37, blauer Pfeil), YFP-APP wird also nicht mehr an die Zelloberfläche transportiert, sondern scheint in Golgi und ER arretiert. Das TMEM59-Konstrukt mit dem ER-Rückhaltesignal hingegen verhält sich auch in der Lebendzell-Beobachtung wie in der Western-Blot-Analyse, es zeigt vergleichbar zur Kontrolle keinen Effekt, YFP-APP ist ebenfalls Plasmamembran-lokalisiert und zeigt eine Golgi-Färbung. Somit scheint die Expression von TMEM59, die zu einer unterglykosylierten Form von APP führt, zu einer Rückhaltung von APP im Golgi zu führen und den Transport zur Zelloberfläche zu blocken. Dies könnte die starke Abnahme der prozessierten löslichen APP-Formen der TMEM59-transfizierten Zellen erklären, APP gelangt, zurückgehalten im Golgi, nicht mehr in die Kompartimente, in denen es von den Sekretasen prozessiert würde.

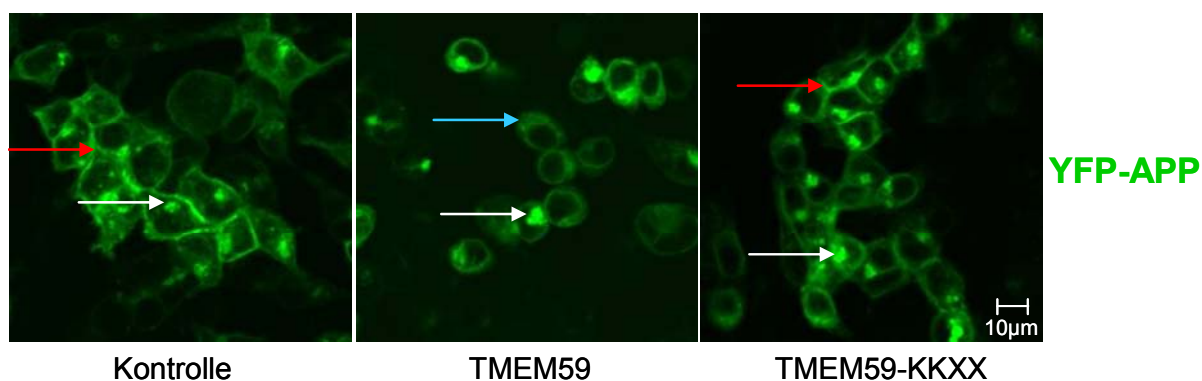


Abbildung 37: Konfokale *In-vivo*-Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskopie von YFP-APP

HEK293-Zellen wurden in Kammern ausgesät, nach 24 h mit pShuttle-CMV-YFP-APP und entweder dem Kontrollplasmid p12-Luziferase, p12-TMEM59 oder p12-HA-TMEM59-KKXX kotransfiziert. Die Auswertung erfolgte nach 24 h am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Rote Pfeile markieren Zell-Zell-Kontakte, weiße Pfeile den Golgi-Apparat und der blaue Pfeil ein perinukleäres Signal.

Zur Kontrolle, ob TMEM59-Expression auch zur Rückhaltung von anderen Proteinen im Golgi führt, wurde derselbe Ansatz mit einem anderen fluoreszierenden Fusions-Protein durchgeführt, RFP („red fluorescent protein“) mit einem GPI-Anker des CD59-Proteins (siehe Abb. 38A). HEK293-Zellen wurden in Kammern ausgesät, welche eine Lebendzell-Aufnahme ermöglichen, und nach 24 Stunden mit p12-HA-RFP-CD59 und entweder Kontrollplasmid oder p12-TMEM59-GFP, p12-HA-TMEM59-KKXX oder dem Homolog p12-BSMAP kotransfiziert. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Auswertung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop, anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit von TMEM59-GFP untersucht. In Abbildung 38B ist ersichtlich, dass die Kontroll-transfizierten Zellen eine Oberflächen-Färbung (grüner Pfeil) und eine leichte Golgi-Färbung (weißer Pfeil) des GPI-verankerten RFP-Fusionsproteins zulassen, während die TMEM59-GFP-Expression hingegen erneut zu einem Verlust des Signals an der Plasmamembran und zu einer Verstärkung des Golgi-Signals (weißer Pfeil) führt. Wiederum ist zusätzlich eine perinukleäre Färbung erkennbar (blauer Pfeil). Die Expression von TMEM59-GFP ist in einer Lebendzell-Aufnahme (siehe Abb. 38B) und im Western-Blot (siehe Abb. 38C) gezeigt. BSMAP verhält sich wie TMEM59-GFP, während sich TMEM59-KKXX wie im Falle des YFP-APP wie die Kontroll-transfizierten Zellen verhält. Die TMEM59- oder BSMAP-Expression scheint demzufolge zur Retention von unterglykosylierten Proteinen in Golgi und ER zu führen und den Transport entlang des sekretorischen Weges zu stören.

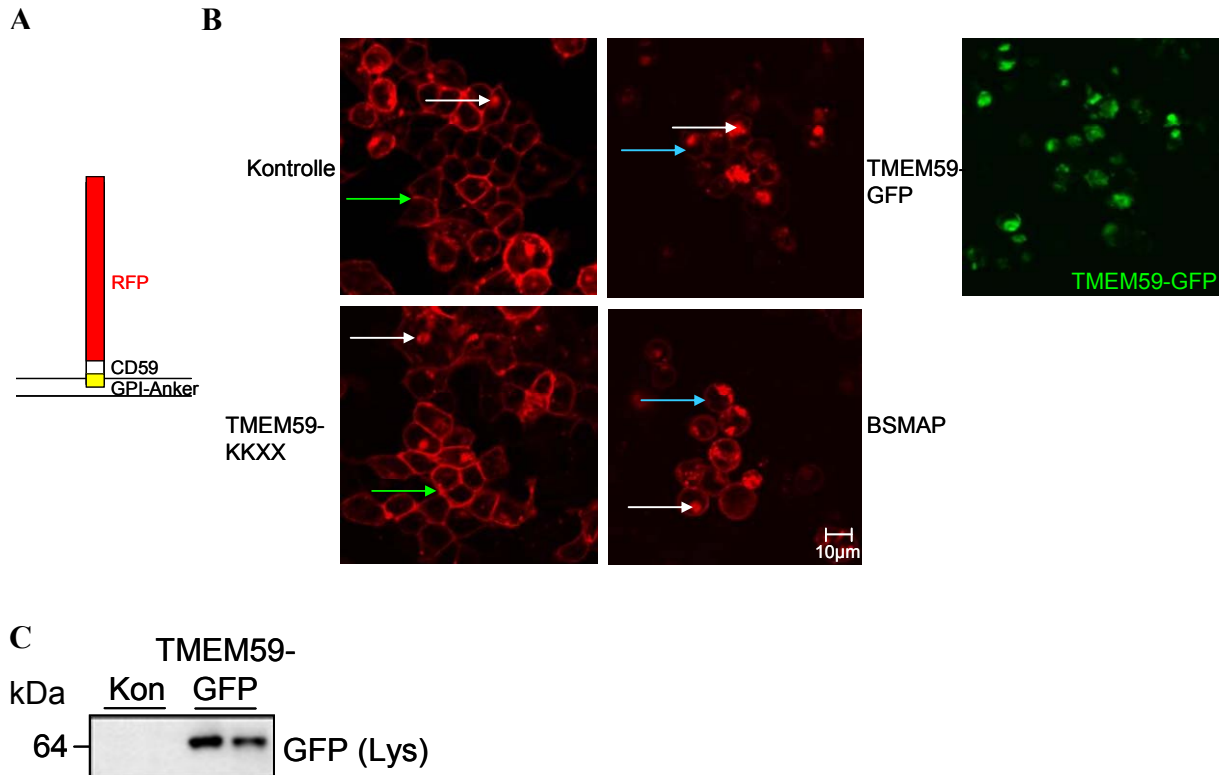


Abbildung 38: Konfokale *In-vivo*-Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskopie von RFP-CD59

HEK293-Zellen wurden in Kammern ausgesät und 24 h später mit p12-HA-RFP-CD59 und jeweils dem Kontrollplasmid p12-Luziferase, p12-TMEM59-GFP, p12-HA-TMEM59-KKXX und p12-BSMAP kotransfiziert. Nach 24 h wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie Aufnahmen gemacht.

Anhand der Lebendzell-Aufnahmen konnte nachgewiesen werden, dass TMEM59 den Transport des GPI-verankerten Fusionsproteins RFP-CD59 an die Plasmamembran stört. Nun sollte dies zusätzlich auf biochemischem Wege gezeigt werden. Hierfür wurde der Einfluss der TMEM59-Expression auf die Lokalisierung des GPI-verankerten Prion-Proteins (PrP) untersucht. Dazu wurden intakte pcDNA3.1-wtPrP-, Kontroll-Plasmid- und p12-TMEM59-kotransfizierte HEK293-Zellen mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PIPLC) inkubiert. PIPLC schneidet spezifisch den GPI-Anker von Proteinen, in diesem Falle von PrP, welches sich daher nach einem Verdau mit PIPLC im Zellkultur-Überstand befindet und mittels Western-Blot detektierbar sein sollte. Um eine Lokalisierung der Proteine im Zellkulturmedium durch eine möglicherweise stattfindende Sekretion zu vermeiden, wurde der Verdau bei 4°C vollzogen und zur Kontrolle Zellen ohne PIPLC bei 37°C inkubiert. Das PIPLC-verdaute Wildtyp-PrP findet sich in den Kontroll-transfizierten Zellen im Zellkulturmedium (siehe Abb. 39, +PIPLC), während unter TMEM59-Expression eine starke Abnahme des verdauten PrP im Überstand zu detektieren ist, PrP scheint demzufolge nicht mehr korrekt an die Zelloberfläche transportiert zu werden. Unverdauter Überstand (siehe

Abb. 39, -PIPLC) weist kein PrP-Signal auf. Dies gilt ebenso für den Überstand bei 37°C, der lediglich sekretierte Proteine enthält (siehe Abb. 39, 37°C, -PIPLC). Die relativen Proteinmengen im Zelllysate sind, anhand der GFP-Transfektionskontrolle und zellulärem PrP zu sehen, äquivalent. Im Zelllysate ist nochmals der inhibitorische Glykosylierungseffekt der TMEM59-Expression auf PrP zu sehen, unter TMEM59-Expression ist die komplexglykosylierte Form von PrP nicht zu detektieren. Daraus könnte man schlussfolgern, dass auch hier die TMEM59-Expression zu einem Rückhalt unterglykosylierter Proteine im sekretorischen Weg führt, sodass PrP nicht mehr die Plasmamembran erreicht. Da eine Beeinträchtigung der N-Glykosylierung jedoch keinen Einfluss auf die Membranständigkeit des PrP hat (Lehmann and Harris, 1997), könnten diese Ergebnisse auf einen Einfluss des TMEM59 auf andere Proteine hindeuten, die für den Transport von PrP zur Zelloberfläche notwendig sind.

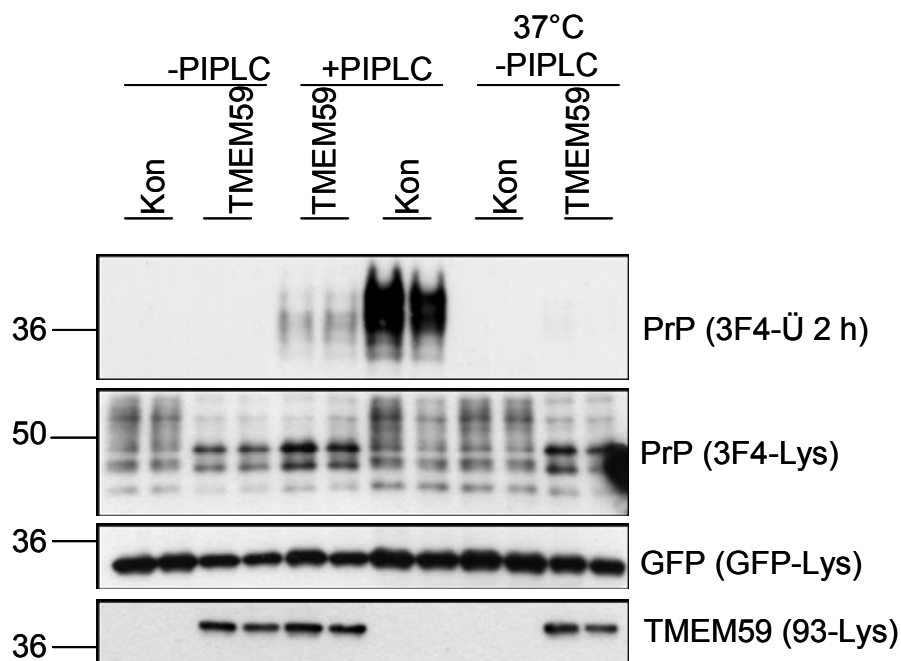


Abbildung 39: TMEM59-Expression inhibiert den Transport von PrP zur Plasmamembran

Transient pcDNA3.1-wtwtPrP- und p12-GFP-, und jeweils p12-Luziferase- (Kon) oder p12-TMEM59- kotransfizierte HEK293-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit PIPLC bei 4°C inkubiert oder zur Kontrolle unbehandelt belassen (4°C und 37°C). Nach 2 h wurde der Überstand gesammelt und präzipitiert, sowie die Zellen lysiert. Zellkultur-Überstand und Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf PrP (3F4), TMEM59 (93) und GFP (GFP-mono) untersucht.

2.3.3 Knock-Down von TMEM59/BSMAP zeigt keinen Einfluß auf die APP-Maturierung

Die Überexpression von TMEM59 und BSMAP hat einen stark inhibitorischen Effekt auf die APP₆₉₅-Glykosylierung zur Folge. Daher stellt sich die Frage, ob der transiente Knock-down von TMEM59 oder ein transienter Doppel-Knock-down von TMEM59 und seinem Homolog BSMAP einen Einfluss auf die Glykosylierung von APP haben könnte. Da die vorhandenen Antikörper für die Detektion endogener Proteine (TMEM59 und BSMAP) in der Western-Blot-Analyse nicht sensitiv genug waren, erfolgte der Nachweis des Knock-downs über die Quantifizierung der Expressionshöhe der jeweiligen mRNA. Eine sehr elegante Methode der Quantifizierung ist über den TaqMan-Assay (Applied Biosystems) möglich und besteht in der Verwendung von sequenzspezifischen Primern in Verbindung mit einer doppelt fluoreszenzmarkierten Sonde, die ebenfalls nur an diese eine definierte Sequenz bindet. Die fluorogene Sonde trägt einen Reporterfarbstoff und einen „Quencher“, der die abgestrahlte Fluoreszenz des Reporters unterdrückt. Im Laufe einer PCR hybridisieren Primer und die Sonde an ihre Zielsequenz, woraufhin die Sonde von der Taq-Polymerase von der Matrize verdrängt wird, was zur Hydrolyse der Sonde führt. Reporter und „Quencher“ werden demzufolge getrennt, das Fluoreszenzsignal des Reporters kann detektiert werden und die Zunahme eines PCR-Produkts während der gesamten Reaktion gemessen werden.

HEK293-Zellen wurden transient mit einer TMEM59-siRNA („small interfering RNA“) und Kontroll-siRNA transfiziert, alternativ wurde p12-APP₆₉₅ kotransfiziert. Zusätzlich wurde unter p12-APP₆₉₅-Transfektion TMEM59-/BSMAP-siRNA und Kontroll-siRNA kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurde aus einem Teil der Zellen die RNA isoliert, diese revers transkribiert und mittels quantitativer „Realtime“-PCR analysiert. Die restlichen Zellen wurden lysiert und mittels SDS-PAGE und Western-Analyse auf zelluläres APP untersucht. In Abbildung 40A ist erkennbar, dass der Knock-down von TMEM59 (auf 15% der endogenen Expression) keinen Einfluss auf die Glykosylierung oder Sekretion von endogenem APP hat. Unter APP₆₉₅-Überexpression zeigt der Knock-down von TMEM59 (auf 6% der endogenen Expression) ebenfalls keinen Effekt auf Maturierung oder Sekretion (siehe Abb. 40B). Um zu überprüfen, ob im Falle des TMEM59-Knock-downs das Homolog BSMAP dessen Funktion übernehmen kann, wurde ein Doppel-Knock-down von TMEM59 und BSMAP in HEK293-Zellen durchgeführt, die transient mit APP₆₉₅ transfiziert wurden. In diesem Fall wurden zwei unterschiedliche Kontrollen verwendet, die vom Hersteller (Dharmacon) mitgeliefert wurden. Die TMEM59-Expression wurde auf 10% runterreguliert, die von BSMAP auf 37%. Auch unter Doppel-Knock-down-Bedingungen ist kein Effekt auf

die APP-Glykosylierung oder -Sekretion zu detektieren (siehe Abb. 40C). Als weiterer Beweis für den gelungenen Knock-down, neben der TaqMan-Analyse, wurden die TMEM59/BSMAP-siRNA-transfizierten Zellen auf Glasplättchen ausgesät und per Immunfluoreszenz-Analyse mittels des TMEM59-Antikörpers auf endogenes TMEM59 überprüft. Wie in Abbildung 40D ersichtlich, ist in den Kontroll-transfizierten Zellen eine leichte Golgi-Färbung (weiße Pfeile) durch das endogene TMEM59 erkennbar, während hingegen in den Knock-down-Zellen kein Signal zu detektieren ist. Die TMEM59-Expression wurde demzufolge tatsächlich herabreguliert.

Da jedoch unter Doppel-Knock-down-Bedingungen die BSMAP-Expression nur auf 37% und von TMEM59 auf 10% der endogenen Expression reprimiert werden konnte, könnte die verbleibende Expression der beiden Proteine für ihre Funktion ausreichend sein und somit kein Effekt auf APP sichtbar werden. Alternativ könnte ein dritter Faktor die Funktion dieser beiden Proteine übernehmen oder die Funktion von TMEM59 und BSMAP nur unter bestimmten Bedingungen zum Tragen kommen, die hier nicht gewählt wurden. Ein weiterer Aspekt könnte eine lange Halbwertszeit für die TMEM59- und BSMAP-Proteine sein. In diesem Falle blieben die beiden homologen Proteine für die Länge des Experimentes stabil genug, um ihre Funktion zu erfüllen, womit keine Änderung der APP-Maturierung erkennbar wäre.

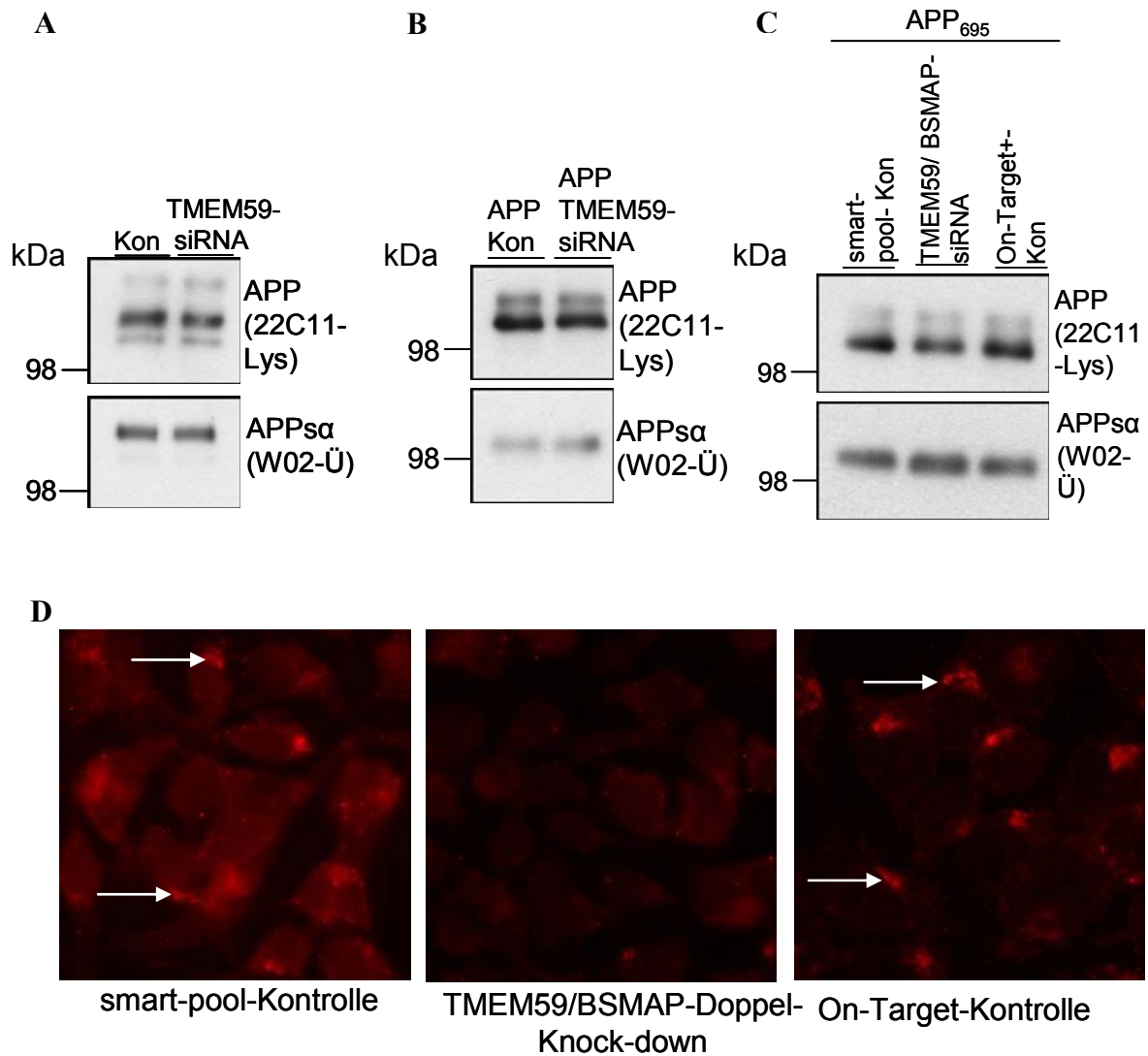


Abbildung 40: Knock-down von TMEM59 hat keinen Effekt auf die Glykosylierung von Proteinen

A-D) HEK293-Zellen wurden transient mit der jeweiligen siRNA transfiziert, in manchen Fällen mit zusätzlicher DNA kotransfiziert. Nach 48 h wurde ein Teil der Zellen für die TaqMan-Analyse verwendet, der restliche Teil wurde lysiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. **A)** Die Transfektion erfolgte mit TMEM59-siRNA, bzw. Kontroll-siRNA, die Detektion im Western-Blot gegen endogenes zelluläres APP (22C11) und sekretiertes APP α (W02). **B)** Die Transfektion erfolgte mit TMEM59-siRNA, bzw. Kontroll-siRNA und p12-APP₆₉₅, die Detektion im Western-Blot erfolgte gegen zelluläres überexprimiertes APP (22C11) und sekretiertes überexprimiertes APP α (W02). **C)** Die Transfektion erfolgte mit TMEM59-siRNA und BSMAP-siRNA, bzw. Kontroll-siRNA und APP₆₉₅-DNA, die Detektion im Western-Blot erfolgte gegen überexprimiertes zelluläres APP (22C11) und sekretiertes APP α (W02). **D)** Die Transfektion erfolgte mit TMEM59-siRNA und BSMAP-siRNA, bzw. zwei Kontroll-siRNAs, die Detektion mittels Immunfluoreszenz erfolgte gegen endogenes TMEM59 (93). Die weißen Pfeile markieren den Golgi-Apparat.

2.3.4 Domänen-Deletionsanalyse von TMEM59

Um zu überprüfen, welche Domäne von TMEM59 für den Effekt auf die Maturierung von Proteinen verantwortlich ist, wurden Domänen-Deletions-Mutanten generiert. Unter Kapitel 2.1.1 wurden bereits die bestehenden Domänen von TMEM59 aufgezeigt, eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne, eine zytosolische Domäne und ein mögliches PDZ-Bindemotiv. Ansonsten weist TMEM59 keinerlei zuzuordnende Domänen auf. Es wurden vier unterschiedliche Mutanten generiert, die zum Nachweis alle HA-markiert wurden (siehe Abb. 41). Damit diese Mutanten den sekretorischen Weg beschreiten können, wurde jeweils vor die HA-Markierung ein Signalpeptid gesetzt. Dem Konstrukt p12-HA-TMEM59- Δ SEI fehlt das mögliche PDZ-Bindemotiv (Aminosäure (AS) 1-329 des Volllängen-Proteins), im Konstrukt p12-HA-TMEM59- Δ CT (AS1-266) ist ein Großteil des C-Terminus deletiert, während bei dem löslichen p12-HA-TMEM59-löslich-Konstrukt (AS1-234) die Transmembran-Domäne samt der zytoplasmatischen Domäne nicht mehr vorhanden ist. Die Transmembrandomäne von TMEM59 wurde im Konstrukt p12-HA-TMEM59- Δ TM-TMCD4 hingegen gegen die Transmembrandomäne von CD4 ausgetauscht, welche dieselbe Länge von 23 Aminosäuren hat. Unter Kapitel 2.2.3 wurde gezeigt, dass CD4 keinerlei Effekt auf die Maturierung und Sekretion von APP aufweist. Daher sollte, falls die Transmembrandomäne von TMEM59 ausschlaggebend für den Maturierungs-Effekt ist, der Austausch dieser Domäne von TMEM59 und CD4 genügen, um die Funktion von TMEM59 zu blocken.

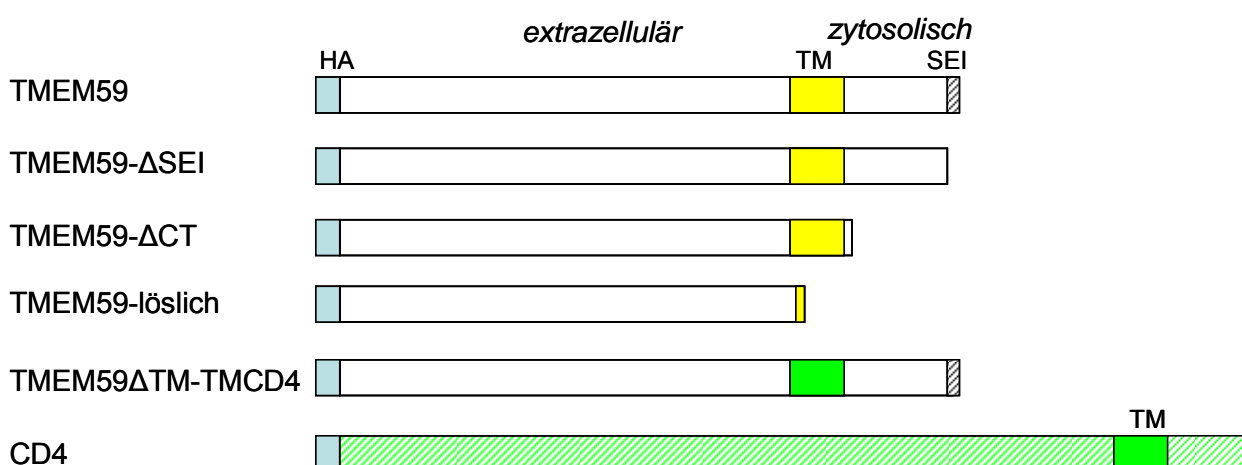


Abbildung 41: Domänen-Deletionsanalyse von TMEM59

Mittels PCR wurden obenstehende mutierte Deletions-Konstrukte kloniert, die jeweils ein Signalpeptid und eine HA-Markierung am N-Terminus tragen. HA: HA-Markierung, TM: Transmembrandomäne, SEI: PDZ-Bindemotiv

Zur Untersuchung der Deletionsmutanten wurden HEK293-Zellen transient mit p12-APP₆₉₅ und entweder einem Kontrollplasmid, p12-TMEM59, p12-HA-TMEM59 oder mit einem Plasmid einer der Mutanten kotransfiziert. Der Überstand und das Lysat der Zellen wurde mittels SDS-PAGE und Western-Analyse auf einen möglichen Effekt auf APP und die Expression der Mutanten untersucht. Ein Unterschied im Verhalten von TMEM59 und HA-markiertem TMEM59 ist nicht festzustellen (siehe Abb. 42). Das lösliche TMEM59-Konstrukt wird sekretiert und beeinflusst die APP-Glykosylierung und –Sekretion unter Koexpressions-Bedingungen nicht. Dies erstaunt nicht, da anhand des TMEM59-Konstruktes mit einem ER-Rückhaltemotiv gezeigt werden konnte, dass TMEM59 Golgi-lokalisiert sein muss, um einen inhibitorischen Effekt auf die APP-Maturierung ausüben zu können (siehe unter Kapitel 2.3.1). In der Analyse verhielten sich TMEM59- Δ CT und TMEM59- Δ SEI ebenso wie TMEM59, die Koexpression zeigte einen inhibitorischen Effekt auf die Glykosylierung und Sekretion von APP (siehe Abb. 42). Der Verlust des PDZ-Motivs oder gar der zytosolischen Domäne hat demzufolge keinen Einfluss auf den Maturierungs-Effekt von TMEM59.

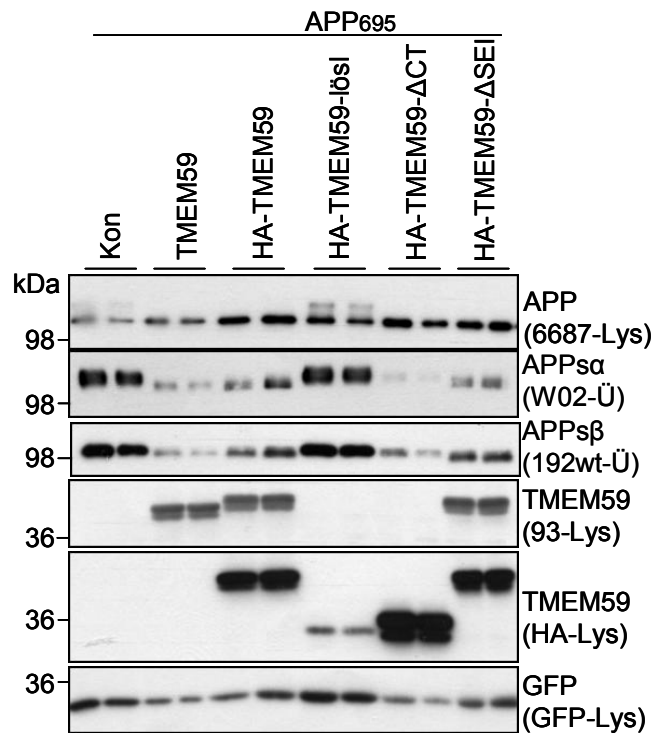


Abbildung 42: Die Deletionsmutanten TMEM59-ΔCT und TMEM59-ΔSEI inhibieren die APP-Maturierung und –Sekretion

HEK293-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ und entweder dem Kontrollplasmid p12-Luziferase oder den Plasmiden mit oben angeführten Deletionsmutanten kotransfiziert, der Überstand nach 48 Stunden gesammelt und die Zellen lysiert. Als Transfektionskontrolle diente p12-GFP. Mittels SDS-PAGE und Western-Analyse wurde zelluläres APP (6687), sekretiertes APP (W02, 192), sowie die Expression der Deletionsmutanten (93, HA) und GFP (GFP-mono) analysiert.

Es stellte sich die Frage, ob der Verlust der TMEM59-Transmembrandomäne einen Effekt auf die Maturierung von APP hat. Das TMEM59-Konstrukt mit der Transmembrandomäne von CD4 verursacht interessanterweise ebenfalls eine Hemmung der Maturierung des zellulären APP, sowie der Glykosylierung des sekretierten APP α , wobei aufgrund des sehr starken Signals im W02-Blot keine Aussage über die Signalstärke getroffen werden kann (siehe Abb. 42). Somit scheint nicht die Sequenz der Transmembrandomäne entscheidend zu sein, lediglich die Verankerung von TMEM59 im Golgi-Apparat.

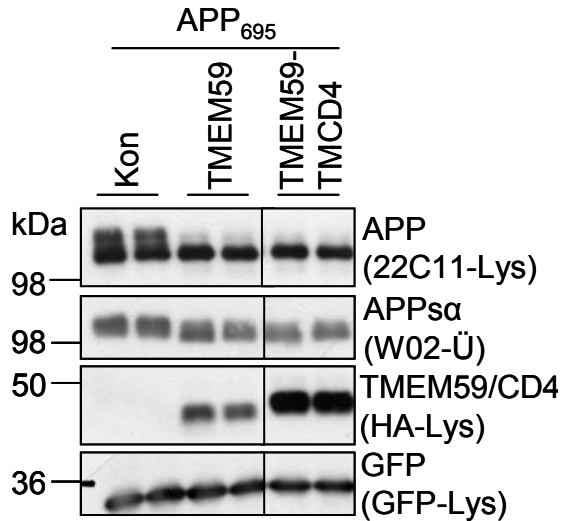


Abbildung 42: Die Mutante TMEM59 Δ TM-TMCD4 inhibiert APP-Maturierung und -Sekretion.

HEK293-Zellen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ und entweder dem Kontrollplasmid p12-Luziferase oder p12-HA-TMEM59 Δ TM-TMCD4 kotransfiziert, der Überstand nach 48 Stunden gesammelt und die Zellen lysiert. p12-GFP diente als Transfektionskontrolle. Mittels SDS-PAGE und Western-Analyse wurde zelluläres APP (22C11), sekretiertes APP (W02, 192), sowie die Expression der Mutante und TMEM59 (HA) und GFP (GFP-mono) analysiert.

Die Domänendeletions-Analyse zeigt, dass die Expression aller in Abbildung 41 und 42 aufgezeigten Konstrukte einen inhibitorischen Einfluss auf die Maturierung und Sekretion von APP aufweisen. Diese Konstrukte exprimieren die luminaire Domäne, also die Ektodomäne von TMEM59, die eventuell für den Transport von APP verantwortlich sein könnte.

3. Diskussion

Die Prozessierung der Ektodomäne des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) sowohl durch die α -, als auch durch die β -Sekretase, ist ein wichtiger Schritt in der Entstehung des neuroprotektiven APP α , bzw. des neurotoxischen APP β in der Alzheimer-Krankheit (Selkoe and Schenk, 2003). Über den zellulären Mechanismus, der den Zugang von APP zu seinen Sekretasen und somit die Menge und die Spezies an geschnittenem APP kontrolliert, ist zu diesem Zeitpunkt noch wenig bekannt. Allerdings werden im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit immer mehr mögliche Risikofaktoren identifiziert, die den Transport und die Prozessierung von APP beeinflussen. Zu diesen Risikofaktoren zählen beispielsweise SorLa und Ubiquilin, auf die im Rahmen der weiteren Diskussion eingegangen wird (Ficklin et al., 2005; Hiltunen et al., 2006; Schmidt et al., 2007; Spoelgen et al., 2006). Die Suche nach Modulatoren des APP-Transports und der APP-Prozessierung bietet einen guten Ansatzpunkt in der Identifizierung weiterer möglicher Risikofaktoren. In einem Expressionsklonierungs-Screen wurde das bisher unbeschriebene Protein TMEM59 als ein Modulator der APP-Spaltung identifiziert. Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war eine genaue Charakterisierung des Proteins TMEM59, seines Einflusses auf die Prozessierung von APP und seiner möglichen Rolle als Risikofaktor in der Alzheimer-Erkrankung. Unter Einbeziehung von Ergebnissen vorangegangener Publikationen sollen in vorliegender Diskussion die Ergebnisse dieser Doktorarbeit kritisch analysiert werden.

3.1 Erstcharakterisierung von TMEM59

TMEM59 wird unter diesem Namen bereits als Transmembran-Protein in der NCBI-Datenbank geführt, wurde aber weiterhin nicht näher beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TMEM59 ein Typ-I-Transmembranprotein ist, welches ein Signalpeptid besitzt, mit dessen Hilfe das Protein in das endoplasmatische Retikulum transloziert wird. TMEM59 erhält darauffolgend eine N-Glykosylierung, deren Sensitivität gegenüber der Endoglykosidase-H jedoch auf alleiniges Vorkommen von Oligosacchariden des Mannose-reichen Typs hinweist. Die daraus resultierende Annahme, dass TMEM59 in den frühen Kompartimenten des sekretorischen Weges lokalisiert ist, konnte durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestätigt werden, endogenes TMEM59 findet sich im Golgi-Apparat wieder. Die genaue Lokalisierung von TMEM59 innerhalb der *cis*-, *medial*- oder *trans*-Kompartimente des Golgi-Apparates ist allerdings noch unklar. Zusätzlich konnte

nachgewiesen werden, dass zwei mRNA-Isoformen des Proteins ubiquitär in allen Geweben einschließlich des Gehirns exprimiert werden. Die Expression von TMEM59 im Gehirn wird durch weitere NCBI-Datenbank-Einträge bestätigt, welche das Vorkommen von TMEM59 in Neuroblastom-Zellen, sowie fetalem und adultem Gehirn aufzeigen. Die verschiedenen mRNA-Isoformen kommen durch eine unterschiedlich lange UTR zustande. Interessanterweise ist die 5'-UTR von TMEM59 relativ lang und sehr GC-reich, was einen Hinweis darauf geben könnte, dass die UTR eine Funktion in der Translationskontrolle von TMEM59 spielen könnte, was bereits für die UTR von BACE1 gezeigt werden konnte (Lammich et al., 2004).

3.2 Die Bedeutung der Glykosylierung bei dem Transport von APP

Die Verteilung eines Proteins an den richtigen Bestimmungsort erfordert vielfältige Sortierungssignale und zahlreiche Sortierungsschritte. Eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen auf ihrem Weg zu ihrem endgültigen Bestimmungsort ist die Glykosylierung, welche als Vermittler verschiedener Erkennungsprozesse fungiert oder durch Änderung biochemischer Parameter die Löslichkeit eines Proteins, seine Zugänglichkeit für Proteasen, sowie die Gewährleistung der korrekten Faltung und Zielsteuerung eines Proteins beeinflusst (Helenius and Aebi, 2001; Varki, 1993).

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass TMEM59 und sein Homolog BSMAP in verschiedenen Zelllinien die komplexe N- und O-Glykosylierung von APP hemmen, sowie zu einer Akkumulation von APP im Golgi-Apparat und einer deutlich reduzierten Prozessierung durch die α - und β -Sekretase führen. Teilweise kann ein kleiner Anteil an maturiertem und prozessiertem APP auch unter TMEM59-, bzw. BSMAP-Expression nachgewiesen werden, dabei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um APP aus Zellen, welche nicht oder nur in sehr geringem Maße mit TMEM59 oder BSMAP transfiziert wurden.

Die N-Glykosylierung von APP startet im ER, wo eine Grund-Glykosylierung mit Mannose-reichen Oligosacchariden kotranslational an APP geheftet und nachfolgend getrimmt wird. Abhängig von der exprimierenden Zelllinie erfolgt die Glykosylierung von APP an einer oder beiden seiner N-Glykosylierungsstellen Asn₄₆₇ und Asn₄₉₆, bezogen auf APP₆₉₅ (Pahlsson et al., 1992; Yazaki et al., 1996). Während APP den Golgi-Apparat durchwandert, werden die N-Glykane zu komplexen Glykanen modifiziert, die Galaktose und Sialinsäure enthalten, zusätzlich wird APP phosphoryliert und sulfatiert (Oltersdorf et al., 1989; Weidemann et al., 1989). Zudem erhält APP im Golgi eine O-Glykosylierung, die zu einem deutlich erhöhten

Molekulargewicht führt (Pahlsson and Spitalnik, 1996). Interessanterweise konnte sowohl in vorliegender Arbeit anhand des Konstruktes APP Δ NGS, als auch in bereits veröffentlichten Arbeiten gezeigt werden, dass nicht allein die N-Glykosylierung von APP dessen Transport beeinflusst. Nicht-N-glykosyliertes APP mit mutierten N-Glykosylierungsstellen wird weiterhin sekretiert (siehe unter Kapitel 2.2.6) (Pahlsson and Spitalnik, 1996; Yazaki et al., 1996). Da auch die O-Glykosylierung für den Transport von APP keine Rolle spielt, da eine Hemmung der O-Glykosylierung in der Zelle weiterhin den Transport und die Prozessierung von APP erlaubt, scheinen durch die Expression von TMEM59 oder BSMAP andere Proteine in der Zelle beeinflusst zu werden, die für den Transport oder die Glykosylierung von APP notwendig sind (Pahlsson and Spitalnik, 1996).

Die Expression von APP in Glykosylierungs-defizienten „lec-8“-CHO-Zellen, welche eine defekte Galaktosylierung und daher auch Sialylierung von Glykoproteinen aufweisen, führt auch zu einer Beeinflussung der APP-Maturierung und zu einer starken Abnahme der Sekretion von löslichem APP (Pahlsson and Spitalnik, 1996). Nach Behandlung von APP mit Swainsonine, einem Inhibitor der Golgi-Mannosidase II, der die komplexe N-Glykosylierung von Glykoproteinen in der Zelle hemmt, wird interessanterweise ebenfalls eine Akkumulation von APP im Golgi beobachtet und die APP-Prozessierung durch vermutlich α - und β -Sekretase stark reduziert (McFarlane et al., 1999). Die Glykosylierungs-Inhibierung unter Swainsonine zeigt, dass ähnlich dem Zustand unter TMEM59-, bzw. BSMAP-Expression eine Hemmung der Glykosylierung den Transport von APP stört, woraufhin die Prozessierung von APP verhindert wird. Da die O-Glykosylierung von Proteinen in Anwesenheit von Swainsonine nicht beeinflusst wird, jedoch die N-Glykosylierung anderer Proteine in der Zelle, scheint tatsächlich die korrekte Glykosylierung von zusätzlichen Faktoren für die Glykosylierung und den Transport von APP notwendig zu sein. Die erhöhte α - und β -Prozessierung von APP und die resultierende verstärkte A β -Sekretion durch eine Überexpression der Sialyltransferasen ST6GalII oder α 2,6(N)-Sialyltransferase scheint, im Gegensatz zu den Bedingungen unter Swainsonine, spezifisch durch die erhöhte N-verknüpfte Sialylierung des APP und nicht die anderer zellulärer Proteine verursacht (McFarlane et al., 1999; Nakagawa et al., 2006).

Während des Krankheitsverlaufs bei Alzheimer-Patienten könnten Glykosylierungsenzyme demzufolge einen Einfluss auf die Prozessierung von APP haben. In Gehirnen von Alzheimer-Patienten konnten im Vergleich zu Kontroll-Gehirnen Änderungen in der Aktivität Glykan-prozessierender Enzyme festgestellt werden (Maguire and Breen, 1995). Unter bestimmten Bedingungen, beispielsweise durch Aktivierung der Proteinkinase C, die

bekanntermaßen die proteolytische Prozessierung einiger Membranproteine reguliert (Beguinet et al., 1985; Ehlers and Riordan, 1991; Lin et al., 1986; Pandiella and Massague, 1991), tritt außerdem verstärkt der α -Schnitt von APP auf, während der β -Schnitt abnimmt (Esler and Wolfe, 2001; Felsenstein et al., 1994; Hung et al., 1993; Jacobsen et al., 1994). Jene und die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Änderung in der Glykosylierung von Proteinen den Umfang des Sekretasen-Schnitts von APP bedingen kann. Bis heute bleibt allerdings unklar, inwiefern eine Änderung der komplexen N- und O-Glykosylierung von APP oder auch die veränderte Glykosylierung anderer, bei dem Transport und der Prozessierung beteiligter Proteine, die APP-Prozessierung beeinflussen und einen Beitrag zur Entwicklung der Alzheimer-Krankheit leisten.

3.3 TMEM59 könnte eine Rolle in der Glykosylierung innehaben

Der inhibitorische Effekt, den die TMEM59-/BSMAP-Expression auf die komplexe Glykosylierung und Prozessierung von APP zeigt, ähnelt dem unter COG1-, bzw. COG2-defizienten Bedingungen. Unter diesen Bedingungen ist eine Inhibierung der Glykosylierung und Reduktion der Sekretion sowohl von überexprimiertem, als auch von endogenem APP nachweisbar.

COG1 und COG2 sind Komponenten des oktameren COG-Komplex („conserved oligomeric Golgi“), der an die zytoplasmatische Seite des Golgi-Apparates angelagert ist. Dieser COG-Komplex scheint durch seine Wirkung im retrograden Transport zwischen ER und Golgi und innerhalb der Golgi-Zisternen die korrekte zelluläre Lokalisierung und die Aktivität bestimmter Glykosylierungsenzyme zu beeinflussen (Oka and Krieger, 2005; Ungar et al., 2006). Die Aktivität dieser Enzyme ist abhängig von ihrer korrekten intra-Golgi-Lokalisierung und einem geeigneten intra-luminalen Milieu, wie beispielsweise dem pH-Wert (Axelsson et al., 2001; Harris and Waters, 1996; Martinez-Menarguez et al., 2001; Mironov et al., 2001; Skrinicosky et al., 1997). Die Mutation und Deletion einzelner Komponenten des COG-Komplexes (COG1-8), führt vermutlich zu einer Fehl-Lokalisierung oder Degradierung bestimmter Glykosylierungsenzyme, welche darauffolgend in einer erheblichen Störung der Protein-Glykosylierung resultiert (Oka et al., 2004; Ungar et al., 2006). Zusätzlich verursacht die Mutation von COG-Komponenten mannigfaltige Defekte des intrazellulären Proteintransports, sowie der Sekretion von Proteinen und steht sogar in direktem Zusammenhang mit einer erblich bedingten Störung der Glykosylierung beim Menschen

(Ungar et al., 2006). Die von den Autoren „GEAR“ („Golgi resident integral membrane proteins“) genannten Glykosylierungsenzyme, wie zum Beispiel CASP und Golgin-84, spielen eine zentrale Rolle bei der komplexen N- und O-Glykosylierung, die im Golgi-Apparat vonstatten geht (Oka et al., 2004). In COG1- und COG2-defizienten CHO-Zellen ist eine Reduktion von sieben GEARS festzustellen, die nicht mehr ihre typische Golgi-Lokalisierung aufweisen und vermehrt degradiert werden, während andere Golgi-ständige Proteine, beispielsweise p115 oder GRASP-65, weder in ihrem Expressions-Level, noch in ihrer Lokalisierung beeinträchtigt sind (Oka et al., 2004). Aufgrund der fehlenden GEARS werden andere Glykosylierungsenzyme, wie die Mannosidase II oder die GlcNAc-Transferase-I, im Golgi-Apparat fehl-lokalisiert (Shestakova et al., 2006; Zolov and Lupashin, 2005).

In vorliegender Arbeit wurden zwei COG-defiziente CHO-Zelllinien verwendet, IdIB (COG1^{-/-}) und IdIC (COG2^{-/-}). Für diese Zelllinien wurde bereits beschrieben, dass die Glykosylierung des LDL-Rezeptors und weiterer Proteine Defekte aufweist (Kingsley et al., 1986), während die generelle Sekretion oder Endozytose normal verläuft (Oka and Krieger, 2005). In IdIB- und IdIC-Zellen können an Glykoproteine zwar Mannose-reiche Oligosaccharide angeheftet werden, allerdings bleiben bei einigen Proteinen diese Zuckerketten stets Endoglykosidase-H-sensitiv, komplexen Zuckerstrukturen werden nicht ausgebildet (Kingsley et al., 1986). Die O-Glykosylierung erfolgt mittels Addition von Glukose und Galaktose, wobei keine Sialinsäure angehängt wird, was eine Lokalisierung an der Plasmamembran jedoch nicht beeinträchtigt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ähnlich des Effekts der TMEM59-Expression in wtCHO-Zellen, die Glykosylierung und Sekretion von endogenem und überexprimiertem APP in IdIB- und IdIC-Zellen inhibiert ist. Auch in der Glykosylierungs-defizienten lec-8-Zelllinie führt eine Hemmung der Glykosylierung zu einem inhibitorischen Effekt auf die Maturierung und Sekretion von APP (Pahlsson and Spitalnik, 1996). Dies deutet darauf hin, dass eine Blockade der korrekten Glykosylierung in der Zelle die Prozessierung von APP stört. Im Rahmen dieser Arbeit wurde allerdings nicht geklärt, ob ein COG-Knock-out auch zu einer Arretierung und Akkumulation von APP im Golgi-Apparat führt, also den Transport zu den Kompartimenten blockiert, in denen die Prozessierung von APP eigentlich stattfindet, wie dies unter TMEM59-Expression der Fall ist.

Im Gegensatz zu den COG-Komponenten, die lediglich Golgi-assoziiert sind, ragt von TMEM59 oder BSMAP jeweils eine große Domäne ins Lumen des Golgi-Apparates, die Möglichkeit zur Interaktion bietet. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Domäne direkt oder

indirekt bestimmte Transport- oder Glykosylierungsenzyme des Golgi-Apparates hemmen könnte. Die Domänendeletions-Analyse von TMEM59 zeigt, dass unter Expression des Konstrukts TMEM59- Δ CT, dem ein Großteil der zytoplasmatischen Domäne entfernt wurde, noch immer ein inhibitorischer Einfluss auf die Sekretion von APP nachgewiesen werden kann. Die untersuchten Konstrukte, die alle einen hemmenden Effekt auf die Maturierung und Sekretion von APP aufweisen, exprimieren die luminalen Domäne, die demzufolge tatsächlich eine Rolle bei dem Transport von APP spielen könnte. Vergleicht man die Ektodomäne von TMEM59 mit der von BSMAP oder den Orthologen, so fällt auf, dass es vor allem zwei Abschnitte gibt, die eine hohe Übereinstimmung aufweisen, ein 15 Aminosäure-langer Abschnitt von AS 69-83, sowie eine 35 Aminosäure-lange Sequenz von AS 153-187. Allerdings ist nicht geklärt, ob diese Domänen tatsächlich eine Rolle in der Maturierungs-Inhibierung innehaben. Als sicher gilt, dass TMEM59 eine Transmembran-Domäne exprimieren muss, um Golgi-lokalisiert zu sein und somit einen inhibitorischen Effekt auf die APP-Maturierung ausüben zu können, da das Konstrukt TMEM59-löslich keinerlei Effekt auf die APP-Maturierung und Sekretion aufweist. Die Transmembrandomäne selbst ist jedoch austauschbar, wie anhand des Konstruktes TMEM59 Δ TM-TMCD4 veranschaulicht werden konnte. Ebenso zeigt TMEM59 mit einem ER-Rückhaltmotiv keinen Effekt, womit nochmals bestätigt wird, dass die Golgi-Lokalisierung von TMEM59 für die Hemmung der Maturierung von APP vonnöten ist. Ob die Lokalisierung von APP in der Zelle unter Expression der Deletions-Konstrukte verändert ist, wurde im Rahmen vorliegender Arbeit nicht festgestellt.

Interessanterweise sind Orthologe von TMEM59 und BSMAP zwar in einigen Insekten vertreten, nicht jedoch in *D. melanogaster*. Die Fliege ist ein Organismus, dem verschiedenste Golgi-Glykosylierungsenzyme fehlen, die in Säugern exprimiert werden. Dieser Mangel an diversen Glykosylierungsenzymen führt beispielsweise bei der Expression des humanen BACE1 in *D. melanogaster* zur Expression eines nicht komplex-glykosylierten Proteins (Chang et al., 2005). Das Fehlen von TMEM59 und BSMAP in der Fliege könnte daher eventuell auf eine Rolle im Golgi-Glykosylierungs-Prozess hinweisen, den diese beiden Proteine in *D. melanogaster* nicht übernehmen können.

3.4 Die Rolle der Glykosylierung bei der Aktivität der Sekretasen

Neben der Reduktion des Schnittes der α - und β -Sekretase führte in vorliegender Arbeit die Expression von TMEM59 in Zellkultur-Experimenten zu einer Blockade der komplexen Glykosylierung sowohl von APP, als auch von dessen Sekretase BACE1. Anhand dieser beiden Proteine konnte gezeigt werden, dass die Expression von TMEM59 sowohl die O-Glykosylierung inhibieren kann, wie für APP veranschaulicht wurde, als auch die N-Glykosylierung, was anhand von BACE1 aufgezeigt wurde. Es stellt sich die Frage, ob eine Hemmung der Glykosylierung von BACE1 zu einer Inhibierung der APP-Proteolyse führt.

Um die Prozessierung von APP durch die α -, bzw. β -Sekretase unbeeinträchtigt zu gewährleisten, muss APP komplex glykosyliert an der Plasmamembran vorliegen oder in den Endosomen lokalisiert sein, den Kompartimenten, in denen die Sekretasen jeweils hauptsächlich aktiv sind. Beide Sekretasen prozessieren APP in dessen Ektodomäne und nahe der Transmembrandomäne, wobei die β -Sekretase BACE1 APP am N-Terminus der A β -Domäne schneidet und somit bei der Generierung des neurotoxischen A β -Peptids eine entscheidende Rolle spielt (Citron, 2004). Nach der Prozessierung von APP durch BACE1 wird das verbleibende C-terminale Fragment mittels der γ -Sekretase innerhalb der Transmembran-Domäne geschnitten, was darauffolgend zur Sekretion des A β -Peptids führt (Haass, 2004). Die α -Sekretase, deren APP-Schnitt die neuroprotektive lösliche APP α -Form generiert, ist ein Mitglied der ADAM-Familie, wobei es sich sowohl um ADAM10, als auch um ADAM17 (TACE) oder ADAM9 handeln könnte (Allinson et al., 2003; Furukawa et al., 1996; Meziane et al., 1998; Stein et al., 2004). Bislang ist immer noch unklar, welche Mechanismen in der Zelle kontrollieren, ob die Prozessierung von APP durch die α - oder β -Sekretase stattfindet. Durch Aktivierung bestimmter Kinasen (MAP-Kinase, Protein-Kinase-C) kann zwar der α -Schnitt stimuliert werden, jedoch ist auch diese Regulation noch nicht verstanden (Esler and Wolfe, 2001; Felsenstein et al., 1994; Hung et al., 1993; Jacobsen et al., 1994).

APP wird, wie auch das Fusionsprotein RFP-CD59 und das GPI-verankerte PrP, unter Einfluss von TMEM59 im sekretorischen Weg zurückgehalten. Somit gelangt APP nicht mehr in die endosomalen Kompartimente, wo der β -Schnitt hauptsächlich stattfindet (Haass et al., 1992a; Koo and Squazzo, 1994; Koo et al., 1996). Würde sich die BACE1-Lokalisierung unter TMEM59-Expression gleich der von APP ändern, so wäre eine Prozessierung von APP eventuell dennoch möglich, wenn sich APP und BACE1 in demselben Kompartiment treffen würden und der dort vorherrschende pH-Wert eine Aktivität der Sekretase zuließe. Da die

generelle Sekretion löslicher Proteine unter TMEM59-Einfluss nicht gestört ist, sollte in dem Falle eines β -Schnitts, beispielsweise im Golgi-Apparat, die Sekretion von APPs β nicht gehemmt sein. Die β -Sekretase benötigt allerdings eine komplexe Glykosylierung zur vollständigen Aktivität (Chang et al., 2005; Charlwood et al., 2001), die sie unter TMEM59-Expression nicht mehr erhält. Selbst wenn sich APP und BACE1 unterglykosyliert in einem sekretorischen Kompartiment trafen, so wäre die β -Sekretase vermutlich nicht in der Lage, APP zu prozessieren. Der Einfluss von TMEM59 auf die α -Sekretase, welche ebenfalls ein glykosyliertes Enzym ist, wurde in vorliegender Arbeit nicht untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass die α -Sekretase auch im Golgi-Apparat Aktivität zeigt und demzufolge APP dort ebenfalls prozessieren könnte (Skovronsky et al., 2000). Interessanterweise wurde in einer *C. elegans*-Studie nachgewiesen, dass eine Reduktion der Glykosylierung ebenfalls die Funktion von ADAM-Proteasen inhibieren kann. Ein COG1-Knock-out, der zu einem Glykosylierungs-Defekt in der Zelle führt, reduziert die Glykosylierung von MIG-17, einer sezernierten ADAM-Protease in *C. elegans*, die eine Funktion in der Entwicklung der Gonaden vollführt. Das unterglykosylierte MIG-17 wird zwar weiterhin sekretiert, ist jedoch nicht mehr vollständig aktiv (Kubota and Nishiwaki, 2006). Auch eine unterglykosylierte SEAP, die noch sekretiert wird, besitzt enzymatisch nicht mehr ihre volle Aktivität (Hiramatsu et al., 2006a). Es kann also angenommen werden, dass sowohl die β -, als auch die α -Sekretase-Aktivität durch Hemmung der Glykosylierung unter TMEM59-Expression gemindert ist. Somit besteht die Möglichkeit, dass nicht alleinig das Rückhalten von APP im Golgi-Apparat, und somit der erschwerte Zugriff der Sekretasen auf ihr Substrat, zu einer reduzierten Sekretion führt, sondern eventuell gleichzeitig die verringerte Aktivität der APP-Proteasen unter TMEM59-Expression.

3.5 TMEM59 beeinflusst verschiedene Proteingruppen

Ähnlich wie bei der COG-Defizienz divergiert der inhibitorische Maturierungs-Effekt von TMEM59 bei unterschiedlichen Proteinen. Das glykosylierte sekretorische SEAP-Protein wird zwar durch TMEM59-Expression wie APP in seiner Glykosylierung gehemmt, wodurch die Phosphatase-Aktivität des Enzyms reduziert wird (Hiramatsu et al., 2006a), die Sekretion bleibt jedoch im Wesentlichen unbeeinträchtigt. Ähnliches gilt für die sekretierten Formen von APP, APPs α , APPs β und APPs β' , welche unter TMEM59-Expression ebenfalls in der Glykosylierung beeinträchtigt sind, jedoch nicht in der Sekretion. Die generelle Funktion des Golgi-Apparates scheint also durch die Expression von TMEM59 nicht gestört zu sein.

Interessanterweise wird TNF α , ein unglykosyliertes Typ-II-Transmembranprotein, durch TMEM59 weder in seinem Transport, noch in seiner Prozessierung gestört, die ähnlich der α -Sekretasen-Prozessierung von APP vonstatten geht (Hooper et al., 1997). Somit scheint TMEM59 nicht die Prozessierung aller Proteine zu beeinflussen, sondern eventuell nur die Glykosylierung, was lediglich bei einem Teil der Glykoproteine zu gehemmter Prozessierung führen könnte.

Es stellt sich die Frage, wieso TMEM59 den Transport und die Prozessierung einer Vielzahl von Proteinen inhibiert, jedoch nicht von TNF α . Möglicherweise wird TNF α über eine alternative Route im sekretorischen Weg transportiert und kommt daher nicht oder nur sehr kurz mit TMEM59 in Kontakt. Dies könnte auch für die SEAP gelten, deren Glykosylierung zwar durch TMEM59 beeinträchtigt ist, der nachfolgende Transport und die Sekretion jedoch kaum. Auch in den COG-defizienten Zellen ist lediglich der Transport von einigen Proteinen beeinträchtigt, während andere Proteine zu ihren Ziel-Kompartimenten gelangen (Kingsley et al., 1986). Über mögliche Routen und Transportwege von Proteinen in dem sekretorischen Weg ist noch relativ wenig bekannt. Es existieren gegensätzliche Modelle, ob der Golgi-Stapel eine eher statische Struktur innehat, innerhalb der sich sekretierte Moleküle mittels anterograd-gerichteten Transport-Vesikel bewegen und die Glykosylierungsenzyme in der jeweiligen Zisterne verbleiben, oder ob die Zisternen selbst in einer Fortwärtsbewegung innerhalb des Stapels maturieren, während die Golgi-Enzyme rücktransportiert werden (Rabouille and Klumperman, 2005). Mittlerweile geht die Tendenz zu letzterem Modell (Malhotra and Mayor, 2006). Auf welchen Wegen sich allerdings die zu transportierenden Proteine bewegen ist noch unklar. Obwohl in den letzten Jahren über den Transport in der Zelle viel in Erfahrung gebracht werden konnte, bleiben fundamentale Fragen weiterhin unbeantwortet, die meisten mechanistischen Informationen fehlen bis heute (Pfeffer, 2007).

3.6 Darstellung eines TMEM59-Funktionsmechanismus

Im Rahmen vorliegender Doktorarbeit stellt sich die Frage, mittels welchen Mechanismus TMEM59 und sein Homolog BSMAP die Inhibierung der Glykosylierung und nachfolgender Prozessierung von APP bewerkstelligen. Aus den ermittelten Daten ergeben sich zwei Möglichkeiten, erstere resultiert aus dem inhibierten Transport von APP zur Plasmamembran oder zu den Endosomen und zweitere durch die Verminderung der Sekretasen-Aktivität. In dem ersten Modell führen TMEM59 und BSMAP, eventuell indirekt über einen

Transportfaktor, zu einem Rückhalten von APP im frühen sekretorischen Weg, wodurch eine komplexe Glykosylierung von APP, die in einem späteren Kompartiment erfolgen würde, nicht mehr stattfinden kann, sowie der weitere Transport an die Plasmamembran gestört wird. Alternativ könnten allerdings auch die Hemmung eines Glykosylierungsenzyms das initiale Ereignis sein, wodurch ein unterglykosyliertes Transportprotein den Weitertransport von APP nicht mehr gewährleisten könnte. Es ist unwahrscheinlich, dass TMEM59 durch Beeinflussung der Glykosylierung von APP dessen Transport verhindert. Die fehlende N-Glykosylierung von APP alleine kann nicht für das Rückhalten im Golgi und die reduzierte Prozessierung verantwortlich sein, wie sowohl in dieser, als auch in bereits veröffentlichten Arbeiten mit dem Konstrukt APP Δ NGS gezeigt werden konnte (Pahlsson and Spitalnik, 1996; Yazaki et al., 1996). Auch die fehlende O-Glykosylierung rechtfertigt nicht das Arretieren im Golgi, da Swainsonine, welches zu einer Transport-Hemmung von APP führt, die O-Glykosylierung nicht beeinträchtigt (Samih et al., 2003). Zudem kann unter Hemmung der O-Glykosylierung in der Zelle APP weiterhin transportiert werden (Pahlsson and Spitalnik, 1996). Daher erscheint eine Beteiligung eines weiteren Faktors plausibel, beispielsweise eines Glykoproteins, welches eine Rolle im Protein-Transport spielt, oder eines Glykosylierungsenzyms, welches für die Aktivität eines Transportfaktors verantwortlich ist. Allerdings sollte dieser Faktor, der in Abbildung 43B mit einem Fragezeichen dargestellt wird, keine Rolle in der generellen Sekretion von Proteinen spielen, da die Sekretionsrate löslicher Proteine unter TMEM59-Expression nicht beeinflusst ist.

Im Gegensatz zu den normalen Maturierungs-Bedingungen in der Zelle (siehe Abb. 43A), verbleibt unter TMEM59-, bzw. BSMAP-Expression das immature APP, welches lediglich die Grund-Glykosylierung aufweist, im Golgi-Apparat (siehe Abb. 43B). Da der α -Sekretase-Schnitt hauptsächlich an der Zelloberfläche stattfindet, wird dieser demzufolge reduziert. Dasselbe gilt für den Schnitt durch die β -Sekretase, der zum Großteil nach der Endozytose von membranständigem APP in den Endosomen geschieht. Eine ähnliche Situation, Rückhalten von APP im Golgi-Apparat und gehemmte APP-Glykosylierung, wurde unter Einsatz des Glykosylierungs-Inhibitors Swainsonine beobachtet (McFarlane et al., 1999) (siehe Abb. 43B).

Dieses Modell der verminderten APP-Proteolyse durch Retention im Golgi-Apparat lässt sich ebenfalls nachahmen durch die Behandlung von Zellen mit Brefeldin-A, einem Stoffwechselprodukt des Pilzes *Eupenicillium brefeldianum*. Brefeldin-A löst, durch Fusion des Golgi mit dem endoplasmatischen Retikulum und der Fusion des Trans-Golgi-Netzwerks mit dem endosomalen System, scheinbar den Golgi-Apparat auf (Pelham, 1991). Dies führt

sowohl zu gehemmter Maturierung und Glykosylierung von APP, als auch zu verminderter Produktion und Sekretion von APP-Fragmenten (APPs, Amyloid- β und p3) (Caporaso et al., 1992; Haass et al., 1993). Da jedoch sowohl die generelle Sekretion von löslichen Proteinen, als auch die Prozessierung des Typ-II-Transmembranproteins TNF α unter TMEM59-Expression nicht gestört ist, scheint TMEM59 nicht zu einer generellen Blockade der Golgi-Funktionen zu führen.

Eine Defizienz der COG-Komponenten COG1 und COG2 führt ebenfalls zu einer Inhibierung der Glykosylierung und der Prozessierung von APP, es ist jedoch nicht geklärt, ob auch der Transport von APP in diesem Falle gehemmt ist (siehe Abb. 43B). Dies wäre zu erwarten, da Veränderungen des Golgi-Glykosylierungs-Prozesses den intrazellulären Transport von APP zu beeinträchtigen scheinen. COG1 und COG2 könnten demzufolge als Aktivatoren der APP-Prozessierung wirken, während TMEM59 und BSMAP als Inhibitoren der Prozessierung fungieren könnten.

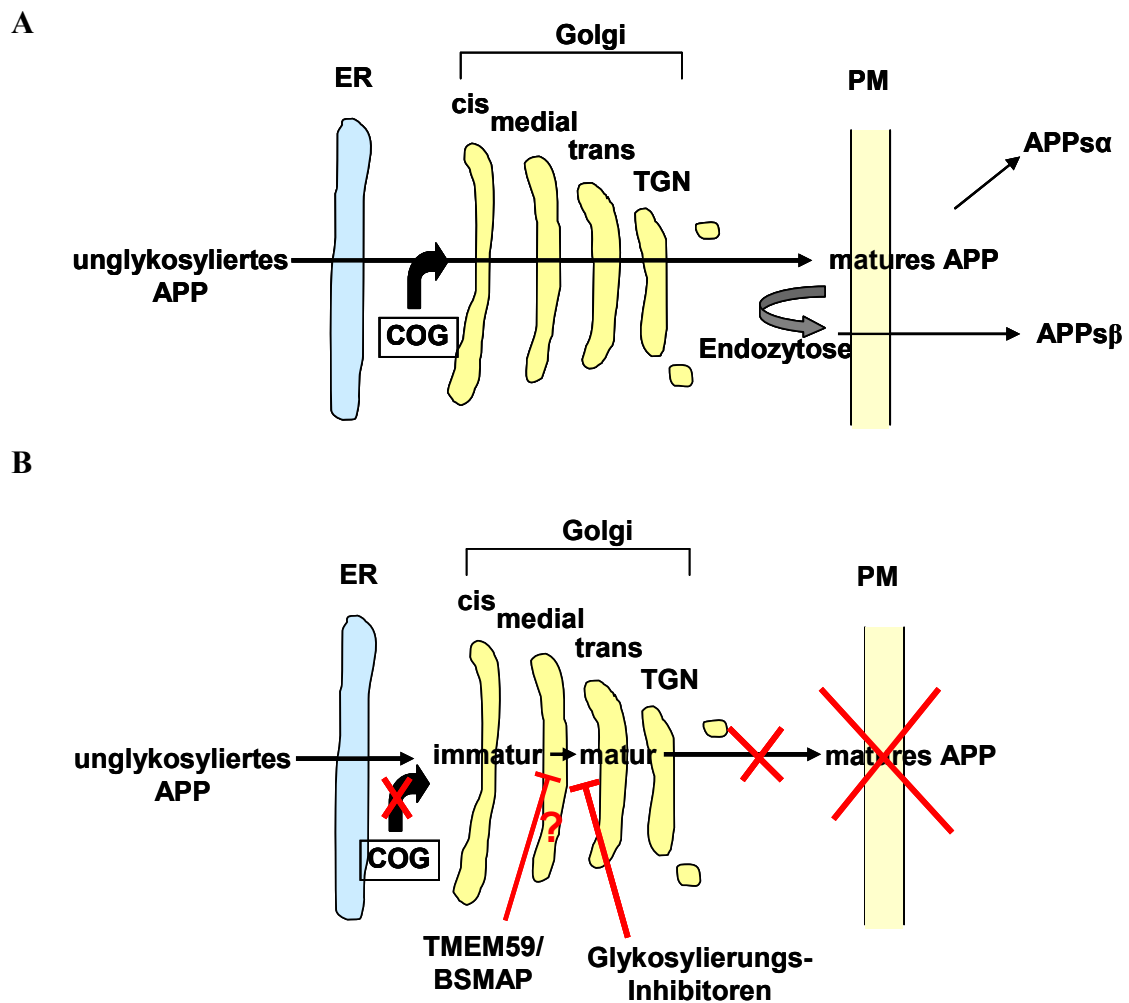


Abbildung 43: Schematische Darstellung eines möglichen Wirkmechanismus des TMEM59

A) Maturierung und nachfolgende Prozessierung von APP unter natürlichen Bedingungen, der graue Pfeil markiert eine mögliche Endozytose von APP. B) Inhibierung der Maturierung und Prozessierung von APP unter COG-Knock-out-Bedingungen, bzw. Einsatz von Glykosylierungs-Inhibitoren oder Expression von TMEM59 oder BSMAP.

Der zweite Mechanismus, der bei der Hemmung der APP-Prozessierung zum Tragen kommen könnte, ist bedingt durch eine reduzierte Aktivität der Sekretasen. Für BACE1 konnte gezeigt werden, dass unter TMEM59-Expression die Glykosylierung gehemmt ist. Allerdings wurde nicht analysiert, ob sich die Lokalisierung von BACE1 in der Zelle geändert hat. Würden sich sowohl APP, als auch BACE1 oder die α -Sekretase in einem frühen sekretorischen Kompartiment treffen, so könnte die Prozessierung von APP eventuell trotz des veränderten pH-Wertes stattfinden, es sei denn, die Sekretasen könnten nicht mehr ihre volle Aktivität entfalten, was in unterglykosyliertem Zustand tatsächlich der Fall ist (Chang et al., 2005; Charlwood et al., 2001; Kubota and Nishiwaki, 2006) (siehe Abb. 44).

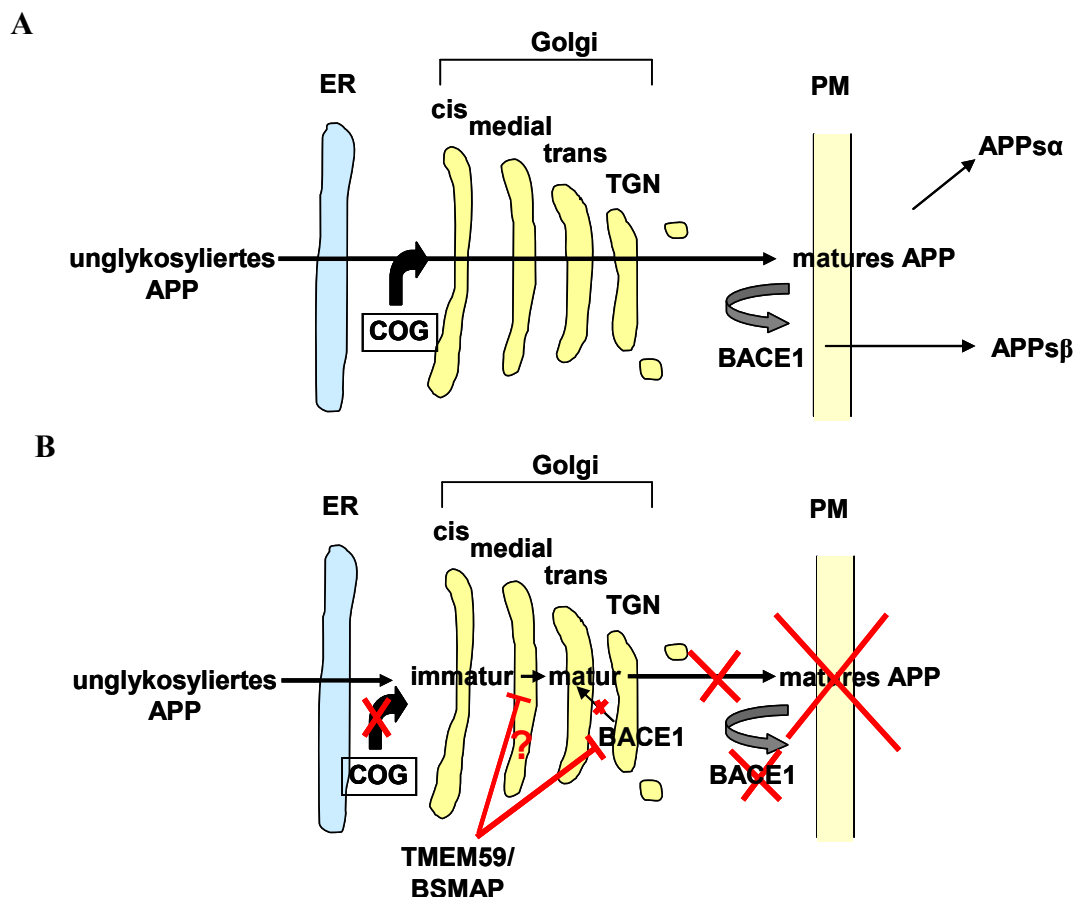


Abbildung 44: Schematische Darstellung des möglichen Wirkmechanismus von TMEM59 auf BACE1

A) Maturierung und nachfolgende Prozessierung von APP unter natürlichen Bedingungen, der graue Pfeil markiert eine mögliche Endozytose von APP und die anschließende Prozessierung durch BACE1. **B)** Inhibierung der Glykosylierung von APP und BACE1 und Hemmung der Proteolyse von APP durch BACE1 unter Expression von TMEM59 oder BSMAP.

Der inhibitorische Effekt auf den Transport von TMEM59 kommt jedoch nicht bei allen Proteinen zum Tragen, beispielsweise bei $\text{TNF}\alpha$ oder SEAP. Eventuell werden diese Proteine über eine andere Route transportiert und kommen daher nicht oder lediglich kurz mit TMEM59 in Kontakt (siehe Abb. 45).

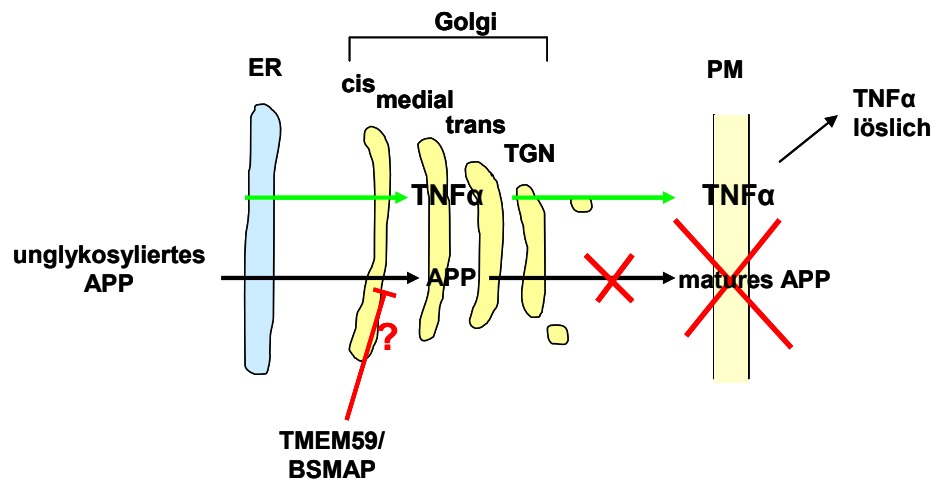


Abbildung 45: Schematische Darstellung des möglichen alternativen TNF α -Transports

Sämtliche hier beschriebenen Effekte von TMEM59 oder BSMAP wurden unter Überexpressions-Bedingungen durchgeführt, welche oftmals das Risiko eines artifiziellen, unspezifischen Effekts bergen. Um dies auszuschließen, wurde zur Kontrolle der Effekt des überexprimierten Typ-I-Transmembranproteins CD4, sowie des Golgi-ständigen Proteins Golgi-Venus auf die Maturierung und Prozessierung von APP analysiert. Die beiden Proteine CD4 und Golgi-Venus, welche dieselbe Proteinklasse, bzw. dieselbe Lokalisierung wie TMEM59 repräsentieren und sich daher als Kontrollproteine eignen, zeigen keinerlei Effekt auf APP. Damit ist ein unspezifischer Einfluss des überexprimierten TMEM59 auf die APP-Maturierung unwahrscheinlich.

Der Doppel-Knock-down von TMEM59 und BSMAP führte zu keiner Änderung der APP-Maturierung oder -Prozessierung. Eine Erklärung könnte sein, dass der Knock-down beider Proteine nicht ausreichend war und verbleibendes endogenes TMEM59 oder BSMAP dessen Funktion in der Zelle weiterhin erfüllen konnte. Des Weiteren könnte eine lange Halbwertszeit von TMEM59 und BSMAP dafür sorgen, dass die Proteine für die hier gewählten Experiment-Bedingungen zu stabil bleiben. Die relativ lange und GC-reiche 5'-UTR von TMEM59 könnte darauf hindeuten, dass TMEM59 von der UTR translationell reguliert wird, wie dies bereits für die 5'-UTR von BACE1 gezeigt werden konnte (Lammich et al., 2004). Für eine weitergehende Analyse scheint es sinnvoll, stabile Doppel-Knock-down Einzel-Zellklone zu generieren. Unter diesen können dann jene Klone selektioniert und auf einen möglichen APP-Effekt hin analysiert werden, in denen ein effizienter Doppel-Knock-down erzielt werden konnte. Alternativ zum unzulänglichen Knock-down könnte als

Erklärung für den nicht darstellbaren Effekt auf die Maturierung und Sekretion von APP gelten, dass ein noch unbekannter dritter Faktor eine ähnliche Rolle in der Zelle übernehmen und den Knock-down ausgleichen könnte.

TMEM59 könnte als neu identifiziertes Mitglied einer Gruppe von Proteinen betrachtet werden, die den Transport, die Lokalisierung und die Prozessierung von APP beeinflussen. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise die COG-Komponenten, sowie Ubiquilin1, welches vermutlich ein Transport-Faktor ist, der in Zusammenarbeit mit anderen Proteinen den APP-Transport kontrolliert. Unter Ubiquilin1-Knock-down-Bedingungen wird die APP-Maturierung, der Transport zur Plasmamembran, sowie die Sekretion von APP α , APP β , und dem A β -Peptid stimuliert (Hiltunen et al., 2006). Umgekehrt führt eine Überexpression von Ubiquilin1 mit Kofaktoren zu einer dramatischen Reduktion von bestimmten Rezeptoren an der Zelloberfläche, also zu einer Blockade des Transports entlang des sekretorischen Weges (Ficklin et al., 2005). TMEM59 und Ubiquilin1 könnten als Risikofaktoren für die Alzheimer-Krankheit fungieren, da beide den Transport von APP beeinflussen. Aufgrund seiner zytoplasmatischen Lokalisierung beeinflusst Ubiquilin jedoch vermutlich den Transport vom Trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran und agiert somit in einem späteren Kompartiment als TMEM59. Somit sollte eine Überexpression von Ubiquilin1 nicht die Glykosylierung von APP hemmen, da APP zu diesem Zeitpunkt bereits komplex glykosyliert vorliegt. Dies wurde jedoch noch nicht untersucht. Ähnlich wie TMEM59 kontrolliert Ubiquilin1 nicht die Verteilung aller Proteine, da unter Knock-down-Bedingungen der Transport des Transferrin-Rezeptors keinerlei Änderung erfuhr. Der generelle Protein-Transport wird demzufolge weder unter Ubiquilin1-Knock-down-, noch unter TMEM59-Überexpressions-Bedingungen geblockt. Als weitere Mitglieder der Gruppe der Transport-Faktoren konnten Fe65 und sein Homolog Fe65L identifiziert werden, deren Überexpression zu einem ähnlichen Effekt auf die APP-Maturierung und -Sekretion führt, wie der Knock-down von Ubiquilin1 (Guenette et al., 1999; Sabo et al., 1999). Der Vps10p-Rezeptor SorLa könnte ebenfalls einen Risikofaktor für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit darstellen. Er wurde ebenfalls als neuer Transportregulator identifiziert, der im TGN lokalisiert ist und dort die Freisetzung von maturem APP zur Plasmamembran kontrolliert (Schmidt et al., 2007). Unter SorLa-Überexpression akkumuliert APP im Golgi, ähnlich wie unter TMEM59-Überexpression, was zu einer Reduktion des α - und β -Schnitts und somit zu einer Senkung der A β -Generierung führt (Haass et al., 1993; Schmidt et al., 2007; Yamazaki et al., 1995). Der Einfluss von SorLa richtet sich ebenfalls nicht gegen alle Proteine in der Zelle, die den sekretorischen Weg durchlaufen. So sind beispielsweise LRP1 und der Insulin2-Rezeptor in ihrem Transport nicht

gestört (Andersen et al., 2005). Interessanterweise interagiert SorLa jedoch mit BACE und reduziert durch seine Affinität zu BACE die Interaktion zwischen APP und BACE im Golgi-Apparat (Spoelgen et al., 2006). Somit könnte TMEM59 durch Hemmung der Aktivität von BACE1 die Interaktion von APP und BACE1 im Golgi-Apparat verringern, während SorLa dies durch ein Verhindern der Bindung von APP und BACE1 verursacht.

Die APP-Maturierung und der Transport spielen für die nachfolgende Prozessierung und somit für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit eine große Rolle. Eine fundiertere Kenntnis dieser Prozesse und die Suche nach beteiligten Interaktionspartnern gewinnen immer mehr an Bedeutung. In vorliegender Arbeit wurde ein möglicher Transport-Regulator von APP identifiziert. Wie anhand verschiedener Proteine, beispielsweise Ubiquilin und SorLa, gezeigt werden konnte, können Veränderungen des Transports von APP im sekretorischen Weg dessen Prozessierung beeinflussen. Ebenso konnte anhand von TMEM59, der COG-defizienten Zellen und der Glykosylierungs-defizienten lec-8-Zellen gezeigt werden, dass eine Hemmung der Golgi-Glykosylierung in der Zelle die Prozessierung von APP beeinflusst (Pahlsson and Spitalnik, 1996; Ungar et al., 2006). Ob TMEM59 durch Inhibierung eines Glykosylierungsenzyms die Aktivität eines unterglykosylierten Transportfaktors und somit den Transport von unterglykosyliertem APP hemmt, oder ob TMEM59 einen Transportfaktor inhibiert und daher den Transport und die Glykosylierung von APP stört, bleibt allerdings unklar.

Geplante nachfolgende Studien beinhalten die Ausweitung der Domänendeletions-Analyse von TMEM59, sowie die Analyse der Auswirkung eines stabilen TMEM59/BSMAP-Knock-down auf die APP-Maturierung und –Prozessierung. Zudem soll Aufschluss darüber gewonnen werden, ob der TMEM59-Mechanismus die Beteiligung eines Glykosylierungsenzyms einschließt, beispielsweise durch eine veränderte Lokalisierung und somit eine Reduzierung der Aktivität des Enzyms.

4. Zusammenfassung

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit zeigen, dass das Golgi-lokalisierte Protein TMEM59 zusammen mit seinem Homolog BSMAP eine neue Proteingruppe von Modulatoren darstellt, welche die Golgi-Glykosylierungs-Prozesse beeinflussen können. Die Expression von TMEM59 oder BSMAP scheint die komplexe Glykosylierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins APP, sowohl die N-Glykosylierung, wie anhand der β -Sekretase BACE1 gezeigt wurde, als auch die O-Glykosylierung, was anhand von APP dargestellt wurde, und zugleich den APP-Transport zu hemmen. Die Grund-Glykosylierung, die kotranslational bereits im ER erfolgt, wird von TMEM59 hingegen nicht beeinträchtigt. Zusätzlich wird durch TMEM59 oder BSMAP die Sekretion sowohl des α -, als auch des β -Sekretase-prozessierten APP inhibiert. Vermutlich akkumuliert APP im Golgi-Apparat in einem frühen sekretorischen Kompartiment. Infolgedessen steht APP der nachfolgenden Prozessierungskaskade nicht mehr zur Verfügung, die in späteren Kompartimenten stattfindet. Folglich kann weder der α -Sekretase-Schnitt, der hauptsächlich an der Plasmamembran stattfindet, noch der β -Sekretase-Schnitt in den Endosomen erfolgen, was die starke Reduktion des prozessierten APP erklärt. Vorliegende Arbeit identifiziert demzufolge das Protein TMEM59 als einen starken Inhibitor der APP-Glykosylierung und der APP-Prozessierung. Zusätzlich zu dem Effekt auf APP inhibiert TMEM59 die komplexe Glykosylierung der β -Sekretase, die diese Modifikation für ihre volle Aktivität benötigt. Dennoch hemmt TMEM59 nicht die generelle Golgi-Funktion, da die Sekretion löslicher Proteine unter TMEM59-Expression ungestört vonstatten geht, sowie die Prozessierung von TNF α . Der inhibitorische Effekt auf die Glykosylierung und die Prozessierung von APP ähnelt dem Effekt unter Inhibierung der Mannosidase II mittels Swainsonine oder dem in COG1- oder COG2-defizienten Zelllinien. Beide Proteine sind notwendig für den Transport und die Aktivität von Golgi-ständigen Glykosylierungsenzymen. Um seine Funktionen zu erfüllen, muss TMEM59 Golgi-lokalisiert sein, da sowohl eine lösliche Form des Proteins, als auch eine Mutante, die mit einem ER-Rückhalte-Signal ausgestattet war, keinerlei inhibitorischen Effekt auf die APP-Glykosylierung oder -Prozessierung aufwies.

Zusammengefasst zeigt vorliegende Arbeit, dass TMEM59 ein Inhibitor der komplexen N- und O-Glykosylierung von APP ist, sowie gleichzeitig durch Blockade des APP-Transports den Zugang von APP zu seinen Sekretasen hemmt. Vermutlich wird die APP-Prozessierung zusätzlich durch Beeinträchtigung der β -Sekretase-Aktivität gehemmt und somit die

Entstehung des pathogenen A β -Peptids reduziert. Der Effekt auf die α -Sekretase wurde im Rahmen vorliegender Arbeit nicht aufgeklärt.

Die Erforschung des Mechanismus der Inhibierung von TMEM59 auf den Transport und die Maturierung einiger Proteine erlaubt uns einen Einblick in die Regulation des APP-Transports und der APP-Prozessierung. Gleichzeitig lässt sie noch einige spannende Fragen offen, deren Klärung aufgrund des starken Effekts auf die APP-Maturierung, sowie –Prozessierung und somit Reduzierung der Generierung des neurotoxischen A β -Peptids von großer Bedeutung ist.

5. Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer-Demenz (<i>Alzheimer's Disease</i>)
APP _x	<i>Amyloid β Vorläufer Protein; x bezeichnet die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Isoform (Amyloid β Precursor Protein)</i>
APP _{sα}	<i>lösliches APP entstanden durch die α-Sekretasen-Spaltung</i>
APP _{sβ}	lösliches APP entstanden durch die β-Sekretasen-Spaltung
APP _{sβ'}	lösliches APP entstanden durch β'(Glu11)-Spaltung
ADAM	Disintegrinmetalloprotease (<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>)
AICD	Intrazelluläre Domäne des APP (<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
Aβ _x	Amyloid-β-Peptid <i>x bezeichnet die Anzahl der Aminosäuren des Amyloid-β-Peptids</i>
ATTC	Amerikanische Zellkulturkollektion (<i>American Tissue Culture Collection</i>)
BACE	<i>Beta-site APP Cleaving Enzyme</i>
BCA	Bicinchonic Acid Assay
BSA	Bovine Serum Albumin
C89	C-terminales βAPP-Fragment (89 Aminosäuren) entstanden durch α-Sekretase-Spaltung
C99	C-terminales βAPP-Fragment (99 Aminosäuren) entstanden durch β-Sekretase-Spaltung
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins

CTF	APP C-terminales Fragment
DAPT	<i>N</i> -[<i>N</i> -(3,5-difluorphenacetyl)- <i>L</i> -alanyl]- <i>S</i> -phenylglycine <i>t</i> -butyl ester
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothieitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Endo H	Endoglykosidase H
ECL	Enhanced Chemoluminescence Chemolumineszenz zur Detektion HRP-konjugierter Sekundärantikörper
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi-Intermediärkompartiment
FAD	erbliche Form der Alzheimer Krankheit (<i>Familial Alzheimer's Disease</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>)
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- β -D-Thiogalaktosid
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
NCT	Nicastrin
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
ORF	<i>open reading frame</i>
p3	Spaltprodukt des β APP nach α - und γ -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
PIPLC	Phosphatidylinositol-Phospholipase C
PM	Plasmamembran
pNPP	para-Nitrophenyl-Phosphat
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase-F
PtdInsP	Phosphatidyl-Inositolphosphat
pI	Proteaseinhibitor
PI	Phosphatidyl-Inositol
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PS	Presenilin
PSGL1	P-Selektin-Glykoprotein Ligand-I
PVDF	Polyvinylidenedifluorid
RT	Raumtemperatur
SAP	Alkalische Phosphatase aus Krabben (<i>shrimp alkaline Phosphatase</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodiumdodecylsulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEAP	sekretorische Alkalische Phosphatase
s	Sekunde
TACE	<i>Tumor Necrosis Factor-α Convertase</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF α	<i>Transforming Growth Factor α</i>
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TM	Transmembrandomäne
TMEM59	<i>Transmembrane Protein 59</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
Tris	Tris-(Hydroxy-Methyl)-Aminomethan
U	Einheiten (<i>units</i>)
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	nicht-translatierte Region (<i>untranslated region</i>)

UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume / volume</i>)
WB	Western Blot
Wt	Wildtyp-Form eines Proteins
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight / volume</i>)
Ø	Durchmesser

6. Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Chemikalien, Enzyme und Reagenzien

Material	Hersteller
Acrylamid Lösung (30% in dH ₂ O)	O-BioGen
Agarose NA	Amersham Biosciences
Alexa-gekoppelte anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes
Alexa-gekoppelte anti-Maus IgG	Molecular Probes
Alexa-gekoppelte anti-Ratten IgG	Molecular Probes
Ampizillin	Roth
APS	Roche
ATP (10 mM)	Roche
<i>Bam</i> H I	MBI Fermentas
<i>Bgl</i> II	New England Biolabs
Biotin (EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin)	Pierce
BSA	Uptima, Interchim
CaCl ₂	J.T. Baker
DABCO	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
αDMEM	Invitrogen
DNaseI	Ambion
DNA T4 Ligase (5U/μl)	Roche
DNA T4 Ligase Puffer	Roche
dNTP (10 mM)	Roche
<i>Eco</i> R I	MBI Fermentas
FCS	Gibco
Glutathion Sepharose 4B (GSH-Sepharose)	Amersham Biosciences
Glycin	Biomol
HEPES	Biomol
<i>Hind</i> III	MBI Fermetas
Hygromyzin	Invitrogen
KCl	Merck
IPTG, dioxanfrei	Roth
Isopropanol	Merck

Lipofectamin 2000	Invitrogen
1 kB-DNA-Leiter	Gibco Invitrogen Corporation
KH ₂ PO ₄	J.T. Baker
Magermilchpulver (instant)	Frema
β-Mercaptoethanol	Merck
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄	Merck
MnCl ₂	Sigma
Molekulargewichtsstandard Marker (See Blue Plus 2)	Invitrogen
Mowiol	Hoechst
NaCl	Roth
NaHPO ₄	Sigma
<i>Nco</i> I	New England Biolabs
NH ₄ Cl	Merck
<i>Not</i> I	MBI Fermentas
NP-40	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	J.T. Baker
PAS	Sigma-Aldrich
Pen/Strep	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
Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PIPLC) (11 mg/ml)	Sigma
PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Azetat)	Sigma
pNPP	Sigma
pI	Roche
Proteinmarker	Invitrogen
Puromyzin (50 µg/ml)	Invitrogen
Pwo-Polymerase (1U/µl)	PeqLab
10x Pwo Polymerase Reaktionspuffer	PeqLab
Random Primer DNA Labeling System	Invitrogen
RNase H	Invitrogen
Saccharose	Merck
SAP (1U/µl)	Roche
SAP (1U/µl)-Puffer	Roche
SDS	Calbiochem

STEN	Biorad
Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare Bio-Sciences AB
TEMED	Merck
Tricin	Biomol
Tris	Biomol
Triton X-100	Merck
Trypsin-EDTA (0,05%)	Gibco
Tween-20	Merck
<i>Xba</i> I	MBI Fermentas

6.1.2 Kits

Kits	Hersteller
BCA Kit	Uptima, Interchim
Canine Pancreatic Microsomal Membranes	Promega
ECL Detektionsreagenz	Amersham Biosciences
ECL plus Detektionsreagenz	Amersham Biosciences
DNase Kit	Invitrogen
Dual Glo Luciferase Assay System	Promega
mMessage mMachine T7 Ultra Kit	Ambion
NucleoBond AX500 Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega
Random Primers DNA Labeling System	GibcoBRL
RNAeasy Kit	Quiagen
Superscript first strand synthesis kit	Invitrogen

6.1.3 Puffer

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Puffer

Angegeben sind Name und Zusammensetzung der Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
4x DNA Probenpuffer	30% (v/v) Glyzerin, 10 mM EDTA, 0,05% Orange G in dH ₂ O
4x SDS-Probenpuffer	<i>Für 10 ml:</i> 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 μ l 10% Bromphenolblau
Acrylamid-Lösung	30% (w/v) Acrylamid-BIS-Acrylamid in dH ₂ O
Ammoniumchlorid-Lösung	50 mM NH ₄ Cl in PBS
Ampizillin-Lösung (Stammlösung 1000x)	100 mg/ml Ampizillin gelöst in 70% Ethanol
APS (Ammonium-Persulfat)	10% Stammlösung in H ₂ O
Alkalische Phosphatase-Substrat	1 Tablette in 1 ml H ₂ O lösen, 1:500 einsetzen
Biotinlösung (EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin)	0,5 mg/ml in PBS-Puffer
Blockpuffer für Western Blot (Blockierlösung)	5% Magermilchpulver in PBST
Blockreagenz für Immunfluoreszenz	2% BSA 2% FCS 0,2% Gelatin gelöst in PBS
Einfriermedium	FCS mit 5% DMSO
Elektrophorese-Laufpuffer	25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 0,1% SDS in dH ₂ O
Glutathion-Puffer	1,54 g Glutathion, 0,53 g NaCl, 100 μ l 1,25 M CaCl ₂ , 100 μ l 1,25 M MgCl ₂ 0,2 g BSA mit NaOH auf pH 8,6 in dH ₂ O
Glycinlösung	20 mM Glycin in PBS-Puffer
Glyzerinlösung	50% (w/v) Glyzerin in dH ₂ O
Grundmedium	DMEM 10% FCS 50 U/ml Penizillin 50 μ g/ml Streptomycin
LB-Medium (Lysogeny Broth Medium)	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl pH 7,0
LB-Medium mit Ampizillin	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl pH 7,0, 100 μ g/ml Ampizillin
Lysispuffer	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 ₂ O
NP-40 (Nonident P-40)	10% (w/v) Stammlösung in dH ₂ O

PBS	140 mM NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,75 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 mit HCl eingestellt in dH ₂ O (autoklaviert)
PBS-EDTA	PBS (steril), 25 mM EDTA
Penizillin/Streptomycin (Pen/Strep)	5000 U/ml Penizillin 5 mg/ml Streptomycin
PBST	PBS –Puffer 0,05% Tween-20
PCM	PBS-Puffer 1 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂
PAS (Protein A Sepharose)	2 mg PAS in 1 ml 20% EtOH resuspendiert; vor Gebrauch 3x mit PBS waschen
PGS (Protein G Sepharose)	2 mg PGS in 1 ml 20% EtOH gelöst; vor Gebrauch 3x mit PBS waschen
Primärantikörper	0,25% (w/v) BSA 0,05% (w/v) Natriumazid Antikörper (vgl. Tab. 4/5) in PBST
Poly-L-Lysin-Lösung	100 µg/ml Poly-L-Lysin gelöst in PBS (steril)
SOB-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 2,5 mM KCl ad 1 l H ₂ O, (autoklavieren)
TAE Puffer (50x)	2 M Tris 1 M CH ₃ COOH 50 mM EDTA
TB Puffer	10 mM Hepes, 15 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O, 250 mM KCl, pH-Wert 6,7 mit KOH einstellen, 55 mM MnCl ₂ x 2H ₂ O steril filtrieren
TBE Puffer	9 mM Tris-Borat 2 mM EDTA in dH ₂ O
Transformationsmedium	DMEM ohne Zusätze
Trypsin-Lösung	0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA * 4Na in Hanks' B.S.S.
Sammelgel-Puffer („High Tris Buffer“)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS in dH ₂ O
Sekundärantikörper	0,25% (w/v) BSA Antikörper (vgl. Tab. 6) in PBST

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 ₂ O
Substratpuffer SEAP-Analyse	0,1 M Glycin (87,51 g) 1 mM MgCl ₂ (203 mg) 1 mM ZnCl ₂ (136 mg) pH mit NaOH auf 10,4 einstellen
Transferpuffer	25 mM Tris, 0,2 M Glycin
Trenngel-Puffer („Low Tris Buffer“)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS in dH ₂ O
Triton-Lösung (Immunfluoreszenz)	0,2% Triton X-100 in PBS

6.1.4 Antikörper

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.

¹Angegeben ist die zur Immunpräzipitation von Proteinen (Kapitel 6.2.3.5) verwendete Verdünnung.

²Angegeben ist die zum immunochemischen Nachweis von Proteinen nach Western Blotting (Kapitel 6.2.3.4) verwendete Verdünnung.

³Angegeben ist die zum immunozytochemischen Nachweis von Proteinen (Kapitel 6.2.4.5) verwendete Verdünnung.

⁴Angegeben ist die Vertreiberfirma oder die Bezugsquelle des Antikörpers.

Alle verwendeten Maus- und Ratten-Antikörper sind monoklonal, alle verwendeten Hasen-Antikörper polyklonal.

Bezeichnung	Zielprotein	IP ¹	WB ²	IF ³	IgG	Hersteller ⁴
3F4	mPrPwt	---	1:3000	---	Maus, monoklonal	Kascsak, 1977
4E5	TMEM59	1:10	unverdünnt	1:100	Ratte, monoklonal	Dr. E. Kremmer
6E10	A β 1-17	---	1:2000	---	Maus, monoklonal	Senetek Inc.
93	TMEM59	1:200	1:2000	1:200	Hase, polyklonal	Eurogentech
192 wt	sAPP β	---	1:100	---	Hase, polyklonal	Dr. D. Schenk (Seubert, 1993)
22C11	APP	---	1:5000	---	Maus, monoklonal	Dr. K. Beyreuther

3552	A β 1-40	1:400	---	---	Hase, polyklonal	Eurogentech
5313	APP Ektodomäne	---	---	1:300	Hase, polyklonal	Eurogentec (Walter, 2000)
6687	APP C-Terminus	1:400	1:1000	---	Hase, polyklonal	Eurogentec (Walter, 2000)
β -Aktin	Humanes β -Aktin	---	1:1000	---	Maus, monoklonal	Sigma
Flag	Flag-Markierung	1:100	1:2000	---	Maus, monoklonal	Sigma
mono-GFP	GFP	---	1:2000	---	Maus, monoklonal	Clontech
anti-Giantin	humanes Giantin	---	---	1:200	Maus, monoklonal	H.-P. Hauri
HA.11	HA-Markierung	1:300	1:1000	1:100	Maus, monoklonal	Covance
IgG2b	Isotyp-Kontrollantikörper	---	unverdünnt	unverdünnt	Ratte, monoklonal	Dr. E. Kremmer
W02	sAPP α	---	1 μ g/ml	---	Maus, monoklonal	Dr. K. Beyreuther

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper

Angegeben sind 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	Hase IgG	Ziege	IF	1:1000	Molecular Probes
Anti-rabbit-Alexa555	Hase IgG	Ziege	IF	1:1000	Molecular Probes
Anti-mouse-Alexa488	Maus IgG	Ziege	IF	1:1000	Molecular Probes
Anti-mouse-Alexa555	Maus IgG	Ziege	IF	1:1000	Molecular Probes
Anti-rat-Alexa488	Ratte IgG	Ziege	IF	1:1000	Molecular Probes
Anti-rat-Alexa555	Ratte IgG	Ziege	IF	1:1000	Molecular Probes

Anti-rabbit-HRP	Hase IgG	Ziege	WB	1:10000	Promega
Anti-rat-HRP	Ratten IgG	Ziege	WB	1:5000	Jackson Immuno Research
Anti-IgG Fc	Mensch IgG Fc	Ziege	IF	1:1000	Cappel

6.1.5 Säuger-Zelllinien

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Zelllinien

Angegeben sind Name und Herkunft, sowie Medium und Bezugsquelle der Zelllinie.

Zelllinie	Herkunft	Medium	Hersteller
HEK293E (stabil transfiziert mit EBNA1-Protein aus dem EB-Virus; die Zellen zeichnen sich aus durch hohe Transfizierbarkeit, sowie einem schnellen Expressionssystem)	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM, 10% FCS, P/S (50 U/ml / 50 µg/ml)	ATCC Amerikanische Zellkulturkollektion
COS7	Affen-Nierenzellen	DMEM, 10% FCS, P/S (50 U/ml / 50 µg/ml)	ATCC
CHO K1	Hamster Ovarzellen	DMEM, 10% FCS	Dr. S. Leppla
wtCHO/ldIB-CHO/ ldIC-CHO	Hamster Ovarzellen defizient in COG-Komplex-Komponenten	DMEM F-12, 10% FCS, P/S (50 U/ml / 50 µg/ml)	Dr. Monty Krieger

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten genetisch veränderten Zelllinien

Angegeben sind Name der stabilen Zelllinie, Name der jeweiligen Mutterzelllinie, das exogen exprimierte Protein, das verwendete Selektionsmedium und die Bezugsquelle der Zelllinie.

Name	Mutterzelllinie	Exogen exprimiertes Protein	Medium	Bezugsquelle
ldIB-CHO	CHO	COG1 ^{-/-}	DMEM F12, 10%FCS,	Dr. M. Krieger

			P/S (50 U/ml / 50 µg/ml)	
IdIC-CHO	CHO	COG2 ^{-/-}	DMEM F12, 10%FCS, P/S (50 U/ml / 50 µg/ml)	Dr. M. Krieger

6.1.6 *E.coli*-Zelllinie

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten *E.coli*-Zelllinie

Angegeben sind Name und Herkunft, sowie Medium und Bezugsquelle der Zelllinie.

Zelllinie	Medium	Firma
DH5α	SOB	Invitrogen

6.1.7 Plasmide

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Plasmide

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

Plasmid	Vektor	cDNA	Restriktionsenzyme	Bezugsquelle
p8-TMEM59	peak8	TMEM59	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	cDNA-Bibliothek (Edgebio)
p12-TMEM59-GFP	peak12	TMEM59 C-terminal GFP-markiert	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
p12-TMEM59-HA	peak12	TMEM59 C-terminal HA-markiert	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
p12-HA-TMEM59	peak12	TMEM59 N-terminal HA-markiert	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
p12-TMEM59-	peak12	TMEM59 delta	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	im Rahmen dieser

deltaSEI		SEI-domäne		Arbeit hergestellt
p12-BSMAP-HA	peak12	BSMAP, C-terminal HA-markiert	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
p12-APP ₆₉₅	peak12	APP ₆₉₅	<i>Kpn</i> I; <i>EcoR</i> I	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
p12-APP ₆₉₅ -deltaNGS	peak12	APP ₆₉₅ deltaNGS	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
p12-APPs α	peak12	Lösliches APP ₆₉₅ (AS1-612)	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
p12-APPs β	peak12	Lösliches APP ₆₉₅ (AS1-596)	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
p12-APPs β'	peak12	Lösliches APP ₆₉₅ (AS1-607)	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
p12-Flag-TNF α -HA	peak12	TNF α , N-terminal Flag, C-terminal HA-markiert	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	erhalten von Dr. R. Fluhrer
p12-GFP	peak12	GFP	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
p12-HA-CD4	peak12	CD4, N-terminal HA markiert	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
p12-HA-SEAP	peak12	SEAP, N-terminal HA markiert	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
p12-HA-RFP-CD59	peak12	RFP, N-terminal HA markiert, C-terminal CD59-GPI-Anker	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler
p12-Luziferase	peak12	Luziferase	<i>Hind</i> III; <i>Not</i> I	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler

pcDNA3.1-wtPrP	pcDNA3.1	wtPrP		erhalten von Prof. J. Tatzelt
pGex5X.1-GST-TMEM59cyto	pGex5X.1	TMEM59 (261-323), N-terminal GST fusioniert	<i>BamHI</i> ; <i>Not I</i>	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
pGex5X.1-GST-BSMAPcyto	pGex5X.1	BSMAP (291-342), N-terminal GST fusioniert	<i>BamHI</i> ; <i>Not I</i>	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
pShuttle-CMV-YFP-APP	pShuttle	APP mit YFP statt der KPI-Domäne		erhalten von Dr. C. Kaether
pCAG-IRES2-GolgiVENUS	pCAG	Fusionsprotein zwischen β -1,4-Galaktosyltransferase und Venus		erhalten von Dr. C. Okita
p12-HA-TMEM59-löslich	peak12	TMEM59 AS(1-234), N-terminal HA-markiert	<i>Hind III</i> ; <i>Not I</i>	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
p12-HA-TMEM59-KKXX	peak12	TMEM59, N-terminal HA-markiert, C-terminal KKXX-Motiv	<i>Hind III</i> ; <i>Not I</i>	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
p12-HA-TMEM59- Δ CT	peak12	TMEM59 (AS1-266), N-terminal HA-markiert	<i>Hind III</i> ; <i>Not I</i>	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
p12-HA-TMEM59 Δ TM-TMCD4	peak12	TMEM59 mit TM von CD4	<i>Hind III</i> ; <i>Not I</i>	im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
p12-BACE1	pcDNA3.1	BACE1	<i>Hind III</i> ; <i>Not I</i>	erhalten von Dr. S. Lichtenthaler

6.1.8 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 8: Beschreibung der verwendeten Oligonukleotide

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

Plasmidname	Oligonukleotid-Sequenzen	cDNA
P12-TMEM59-HA	PCR 1 fw: p12-Hind 5'- CAT TCT CAA GCC TCA CAG AGT-3' rev: 7C6CT-XbaI-R 5'-GAT CTC TAG AAT TTC AGA ATG AGC AAG ATT C-3'	P8-TMEM59
P12-HA-TMEM59löslich	fw : p12-Hind 5'- CAT TCT CAA GCC TCA CAG AGT -3' rev: p12-7C6-deltaTMCTF-Not-R 5'-TAA AGC GGC CGC TTA GAG GCA TCT TAA AAA GCC -3'	p12-HA-TMEM59
p12-HA-TMEM59ΔSEI	fw: p12-Hind 5'- CAT TCT CAA GCC TCA CAG AGT -3' rev: p12-SP-HA-7C6deltaSEI-R 5'-TAA AGC GGC CGC TTA ATG AGC AAG ATT CAC TTT TG -3'	p12- HA-TMEM59
p12-HA-TMEM59ΔCT	fw: p12-Hind 5'- CAT TCT CAA GCC TCA CAG AGT -3' rev: p12-SP-HA-7C6-deltaCT-Not-R 5'- TAA AGC GGC CGC TTA CTC CAC AGC TCT AGC AAC AG-3'	p12- HA-TMEM59
P12-HA-TMEM59-KKXX	fw: p12-Hind 5'- CAT TCT CAA GCC TCA CAG AGT -3' rev: p12-7C6-KKXX-Not-R 5'-GCT ATG CGG CCG CTC AGT TCG TCT TCT TAA TTT CAG AAT GAG CAA G -3'	p12-HA-TMEM59

P12-BSMAP-HA	fw: BSMAP-Hind-F 5'-GAT CAA GCT TCC ACC ATG GCT GCG GTG GCG CTG -3' rev: BSMAP-Xba-R 5'- GAT CTC TAG ACC CAG CTT GGT CAG GTC CAG-3'	pCMV-Sport6- BSMAP
P12-APPΔNGS	PCR1: fw: APP1000fw 5'- AGC ACC GAG AGA GAA TGT CCC-3' rev: APPS469Arev 5'-GAG CAG Gct tAa gGc CTG ATT CAT GCG CTC ATA AAT CAC AC-3' PCR2: fw: APPS469Afw 5'- GAG CGC ATG AAT CAG gCc tTa agC CTG CTC TAC AAC G-3' rev: APPS498Arev 5'- CAA GAC GTC ATC TGc ATA GTT TTG CTC TTT CTG AAG CAG -3' PCR3: fw: APPS498Afw 5'- GAG CAA AAC TAT gCA GAT GAC GTC TTG GCC AAC-3' rev: APPEcoR1rev 5'- GTC GGA ATT CTG CAT CCA TC-3' PCR4: fw: APP1000fw 5'- AGC ACC GAG AGA GAA TGT CCC-3' rev: APPEcoR1rev 5'- GTC GGA ATT CTG CAT CCA TC-3'	1,2,3: P12- APP695-HA 4: PCR- Produkte 1,2,3
P12-HA-TMEM59	PCR 1: fw: p12-Hind 5'- CAT TCT CAA GCC TCA CAG AGT -3'	1: p12- TMEM59-HA 2: p8-

	<p>rev: p12-7C6-SP-HA-R</p> <p>5'- GTA GTC GGG CAC GTC GTA GGG GTA TGC TTC AGC CGA AGC GGT CCC-3'</p> <p>PCR 2:</p> <p>fw: p12-HA-7C6-deltaSP-F</p> <p>5'- TAC GAC GTG CCC GAC TAC GCC TTT GAC TCG GTC TTG GGT G-3'</p> <p>rev: p12-7C6-Not-R</p> <p>5'- TAA AGC GGC CGC TTA AAT TTC AGA ATG AGC AAG-3'</p> <p>PCR 3:</p> <p>fw: p12-Hind</p> <p>5'- CAT TCT CAA GCC TCA CAG AGT -3'</p> <p>rev: p12-7C6-Not-R</p> <p>5'- TAA AGC GGC CGC TTA AAT TTC AGA ATG AGC AAG -3'</p>	<p>TMEM59</p> <p>3: PCR- Produkte 1 und 2</p>
pGEX5X.1-BSMAP- cyto	<p>fw: p12-BSMAP-BamHI-deltaNTTM</p> <p>5'- CGC GGA TCC GCC GGA TGA CCG CGC CTG GCC AGC AC-3'</p> <p>rev: p12-BSMAP-Not-R</p> <p>5'- TAA AGC GGC CGC TTA CAG CTT GGT CAG GTC CAG -3'</p>	p12-BSMAP- HA
pGEX5X.1-TMEM59 cyto	<p>fw: p12-7C6-BamHI-deltaNTTM-F</p> <p>5'-CGC GGA TCC GCC GGA TGG TTG CTA CAG CTG TGG AG -3'</p> <p>rev: p12-7C6-Not-R</p> <p>5'- TAA AGC GGC CGC TTA AAT TTC AGA ATG AGC AAG -3'</p>	p8-TMEM59
p12-TMEM59deltaTM- TMCD4	<p>PCR1:</p> <p>fw: p12-Hind</p> <p>5'- CAT TCT CAA GCC TCA CAG AGT -3'</p> <p>rev: CD4-TM-R</p> <p>5'- ccc aat gaa aag cag gag gcc ggc gac ggc ccc cca gta cta tca ggg ccc cag agt taa gag aga g-3'</p>	p12-SP-HA- TMEM59

<p>PCR2:</p> <p>fw: CD4-TM-7C6cyto-F</p> <p>5'- ctc ctg ctt ttc att ggg cta ggc atc ttc ttc tgt gtc aca gct gtg gag cag tat g -3'</p> <p>rev: p12-NotI</p> <p>5'- TGG ATG CAG GCT ACT CTA GGG -3'</p>	
---	--

6.1.9 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 („Whatmanpapier“)	Schleicher & Schuell
Glasplättchen (Ø 10 mm)	Marienfeld
Lebendzell-Kammern (15µm, 8well)	ibidi
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

6.1.10 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
Fluorchem 8900	Biozym
Gefrierschrank (Arktis)	AEG
Gelkammer	Biorad
-80 °C-Gefrierschrank	Heraeus
Heizblöcke	Stuart Scientific, NeoLab
37 °C-Inkubator	Heraeus, Kendro Laboratories Products

Kamera (CCD Video Camera Module)	MS Laborgeräte
Konfokales Mikroskop	Zeiss
Kühlschrank (Santo)	AEG
Kühlzentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus
MicroLumatPlus LB96V	Berthold Technologies
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
Zell-Inkubator	Heraeus, Kendro Laboratories Products
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Instruments

6.2. Methoden

6.2.1 Molekularbiologische Methoden

6.2.1.1 *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 (6.2.1.2) und die entstandenen DNA-Fragmente direkt analysiert oder aus dem Gel isoliert (6.2.1.3).

Reaktionsansatz:

1 µl cDNA (ca. 100-500 ng/µl)
 1 µl 5'-Oligonukleotid (fw; 100 µM)
 1 µl 3'-Oligonukleotid (rw; 100 µM)

PCR Programm:

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

1 µl dNTP (10 mM) 72 °C, 2 min
1 µl Pwo-Polymerase (1U/µl) 1 Zyklus: 72 °C, 10 min
5 µl Reaktionspuffer, komplett (10x)
mit dH₂O auf 50 µl Endvolumen auffüllen

6.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung und Analyse von linearen DNA-Fragmenten, superhelikaler Plasmid-DNA und zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurden 1-2%-ige Agarosegele in TAE-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 Agarose-Gelkammern.

6.2.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

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

6.2.1.4 Sequenzierung der DNA-Konstrukte

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

6.2.1.5 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für analytische Ansätze nach Plasmidpräparationen wurde Plasmid-DNA für ca. 1-2 h bei 37°C 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 (6.2.1.3).

Restriktionsverdau:

0,5-1 µg Plasmid DNA oder 5-10 µg PCR Produkt
10 U Restriktionsenzym von MBI Fermentas
3 µl Restriktions-Puffer von MBI Fermentas
mit dH₂O auf 30 µl Endvolumen auffüllen

6.2.1.6 Dephosphorylierung von DNA

Die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten DNA-Moleküle (6.2.1.5) wurden vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase (SAP, Roche) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte Plasmid-DNA aufgereinigt (6.2.1.3).

Dephosphorylierungsansatz:

1 µg linearisierte Plasmid DNA
1 µl SAP (1 U/ µl)
2 µl SAP Puffer
mit dH₂O auf 20 µl Endvolumen auffüllen

6.2.1.7 Ligation der DNA

Die Insertion des mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragments (6.2.1.5) in das linearisierte, dephosphorylierte Plasmid (6.2.1.6) 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 (6.2.1.9) verwendet.

Ligationsansatz:

100 ng Plasmid-DNA
500 ng DNA-Fragment
1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/ µl)
2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer
mit dH₂O auf 50 µl Endvolumen auffüllen

6.2.1.8 *Herstellung des kompetenten Bakterienstamms DH5 α*

100 ml SOB-Medium wurden mit einer *Escherichia-coli* DH5 α -Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C/200 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. Inoue et al., konnten zeigen, dass die Kompetenz der Zellen sich erhöht, wenn das Wachstum bei 18°C stattfindet (Inoue et al., 1990) Erreichte die Bakterienkultur eine OD von 0,6-0,8, wurde die Kultur auf fünf 50 ml-Falkon-Gefäße aufgeteilt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C/3500 upm für 20 min. Das Bakteriensediment 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 Sediment 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 μ l-Aliquots bei 4°C. Die Bakterienaliquots wurden umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

SOB-Medium:

20 g Trypton,
5 g Hefeextrakt,
0,5 g NaCl,
10 mM MgCl₂,
10 mM MgSO₄,
2,5 mM KCl
ad 1 l H₂O, (autoklavieren)

TB-Puffer:

10 mM Hepes,
15 mM CaCl₂ x 2H₂O,
250 mM KCl, pH-Wert 6,7 mit KOH einstellen,
55 mM MnCl₂ x 2H₂O
steril filtrieren

6.2.1.9 *Transformation des Ligationsproduktes in E. coli*

20 μ l des Ligationsansatzes, sowie ein Ligations-Kontrollansatz ohne Insertion wurden mit je 100 μ l DH5 α 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 μ l 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 Bakteriensediment in 100 μ l LB-Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/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 (6.2.1.11).

6.2.1.10 Glyzerinkulturen 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 Glyzerinlösung gemischt und bei -20°C eingefroren. Alternativ wurden 600 µl Bakteriensuspension vor einer DNA-Maxipräparation aus dem Kolben entnommen und mit einer 50%-igen Glyzerinlösung gemischt.

6.2.1.11 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 (2.2.6.2) angeimpft und über Nacht bei 37°C/200 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 (Macherey-Nagel).

Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen auf positive Insertionen untersucht (6.2.1.5) und gegebenenfalls zur Sequenzierung geschickt (6.2.1.4).

6.2.1.12 Transienter Knock-Down von Proteinen mittels siRNA

Für einen transienten Knock-Down von Proteinen wurde ein Ansatz gewählt, der auf der Transfektion von siRNA (small interfering RNA) beruht. Die siRNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Dharmacon bezogen. Alle bestellten Oligonukleotide wurden in RNase-freiem Wasser + RNAi-stabilisierendem Puffer (Dharmacon) gelöst, so dass eine 20 µM Stammlösung erhalten wurde. Tabelle 9 zeigt die Sequenzen der verwendeten RNAi-Oligonukleotide.

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten siRNA-Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Dharmacon bezogen. Gezeigt ist der Name des RNAi-Oligos, die Zielsequenz (in 5'-3'-Orientierung) sowie die Position innerhalb der kodierenden Sequenz, an die das Oligonukleotid bindet.

Name	Sequenz (sense)	Zielregion (Bindungsstelle)
Kontrolle	UAGCGACUAAACACAUCAA	Non-targeting siRNA
TMEM59	Gemisch aus 4 Oligonukleotiden	Sequenz von Dharmacon nicht zur Verfügung gestellt

BSMAP	Gemisch aus 4 Oligonukleotiden	Sequenz von Dharmacon nicht zur Verfügung gestellt
-------	--------------------------------	--

Die TMEM59-Oligonukleotide bestehen in einem TMEM59-pool Mix aus 4 Oligonukleotiden, deren Sequenzen von Dharmacon jedoch nicht zur Verfügung gestellt wurden, somit bleiben die Zielregion(en) der Oligonukleotide unbekannt. Für die Transfektion mit Lipofectamin wurden 5 ml HEK293E-Zellen ($3,5 \times 10^5$ Zellen/ml, entspricht $17,5 \times 10^5$ Zellen pro 6 cm-Schale) in sterile Poly-L-Lysin-beschichtete 6 cm-Zellkulturschalen in Grundmedium ausgesät. 24 h nach dem Aussäen wurden die Zellen unter der Verwendung von Lipofectamin transfiziert. Pro 6 cm-Schale wurden 20 µl Lipofectamin mit 250 µl Transformationsmedium gemischt und 5 Minuten inkubiert. Parallel wurde in einem zweiten Reaktionsansatz 25 µl einer 20 µM RNAi-Oligonukleotid-Stammlösung (Endkonzentration: 100 nM) mit 250 µl Transformationsmedium gemischt. In einigen Experimenten wurde parallel 3 µg p12-APP₆₉₅-DNA zusätzlich kotransfiziert. Beide Ansätze wurden nach der 5-minütigen Inkubation gemischt und für weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Dieser Transfektionsansatz wurde anschließend auf die ausgesäten Zellen pipettiert. An Tag 3 wurde das Medium abgesaugt und durch 5 ml Grundmedium ersetzt. Die Zellen wurden an Tag 4 mit 1 ml PBS abgeschabt. 500µl-Zellsuspension wurden lysiert, um eine Western-Analyse des endogenen, bzw. überexprimierten APP durchzuführen. Aus den restlichen 500µl wurde sodann die RNA isoliert (6.2.1.13), revers transkribiert (6.2.1.14) und mittels quantitativer RT-PCR (6.1.2.15) analysiert.

6.2.1.13 Isolierung von zellulärer RNA

Die RNA verschiedener Zellkulturlinien wurde mit Hilfe des RNAeasy-Kits (Qiagen) isoliert. Dazu wurden die Zellen einer konfluenten 10cm-Zellkulturschale 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 (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verdaut. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde durch Absorptionsmessung überprüft. Dazu wurde die isolierte RNA 1/20 in dH₂O verdünnt und die Absorption der RNA bei 260 und 280 nm mit Hilfe eines Photometers gemessen. Zusätzlich wurde die Qualität der isolierten RNA durch Agarose-

Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurden 0,5 ng RNA bei 120 V in einem 2 % Agarosegel analysiert.

6.2.1.14 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 (6.2.1.15) die Expression einer bestimmten cDNA nachgewiesen werden.

6.2.1.15 quantitative Real-Time-PCR

Unter Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotide in Verbindung mit einer doppelt fluoreszenzmarkierten Sonde, wurde die cDNA mittels des TaqMan-Assays (Applied Biosystems) quantifiziert. Dies ist eine sehr elegante Methode der Quantifizierung, die in der Verwendung von sequenzspezifischen Primern in Verbindung mit einer doppelt fluoreszenzmarkierten Sonde besteht, die ebenfalls nur an diese eine definierte Sequenz bindet. Der TaqMan Assay (Applied Biosystems) macht sich die 5'-Nukleaseaktivität der *Taq* Polymerase zunutze (Lee *et al.*, 1993). Die fluorogene Sonde trägt am 5'-Ende einen sog. Reporterfarbstoff (zumeist ein Fluoreszeinderivat) und am 3'-Ende einen Quencher (ein Rhodaminderivat). Wird nun die Sonde durch Licht einer bestimmten Wellenlänge λ angeregt (488 nm), so emittiert der Reporterfarbstoff Licht bei einer längeren Wellenlänge λ' . Die abgestrahlte Fluoreszenz des Reporters wird in der intakten Sonde durch die räumliche Nähe zum Quencher-Farbstoff durch einen Fluoreszenzenergietransfer (FET) unterdrückt. Im Laufe der PCR hybridisieren die Primer und die Sonde an ihre Zielsequenz. Während der Extensionsphase verdrängt die *Taq* Polymerase die Sonde von der Matrize. Dieses Ereignis aktiviert die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase und die Sonde wird hydrolysiert. Hierdurch werden Reporter und Quencher getrennt, der FET wird unterbrochen und das Fluoreszenzsignal des Reporters kann detektiert werden. Aufgrund der Spezifität der Sonde (maximal ein Basenaustausch wird von dem System toleriert), kann so die Zunahme eines PCR-Produktes während der gesamten Reaktion gemessen werden. Um Volumina-Schwankungen aufgrund von Pipettierfehlern auszugleichen, enthält der für die TaqMan-PCR verwendete Reaktionspuffer einen passiven Referenzfarbstoff (ROX), der in die Analyse der Fluoreszenzwerte einbezogen wird.

Für die Auswahl der TaqMan Sets wurde die Primer Express Software von ABI benutzt, die die erforderlichen Parameter unterstützte. Die cDNA wurde mit einem Reaktionspuffer versetzt und nachfolgend jeweils einem humanem TMEM59-spezifischen Oligonukleotid oder zur Kontrolle mit einem humanen GAPDH-spezifischen Oligonukleotid zugesetzt. Sodann wurde eine PCR-Reaktion gestartet, in der die Taq-Polymerase die Sonde von der cDNA verdrängte, woraufhin der Abbau der Sonde erfolgte, wodurch ein Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte. Somit konnte die Zunahme eines PCR-Produktes während der gesamten Reaktion gemessen werden. Die Auswertung erfolgte mittels des 7500 Fast Systems (Applied Biosystems). Um Volumina-Schwankungen aufgrund von Pipettierfehlern auszugleichen, enthält der für die TaqMan-PCR verwendete Reaktionspuffer einen passiven Referenzfarbstoff (ROX), der in die Analyse der Fluoreszenzwerte einbezogen wird. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Alle Transfektionen wurden in Duplikaten durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der T-Test angewendet. Die P-Werte sind wie folgend definiert: * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ und *** $P < 0.0001$.

6.2.1.16 Northern-Blot-Analyse

Für die Überprüfung des Expressionsmusters von TMEM59 wurde ein Northern Blot-Experiment unter der Verwendung einer multiplen-Gewebe-Northern-Blot-Membran (MTNBlot: „multiple tissue Northern Blot“) durchgeführt. Die dabei verwendete Membran ist kommerziell erhältlich (BD Biosciences). Zur Durchführung des Experiments wurde zunächst eine TMEM59-spezifische cDNA-Sonde hergestellt. Dafür wurden 10 μg p8-TMEM59-Plasmid mit den Restriktionsenzymen *Nco* I und *Bgl* II 60 min bei 37 °C verdaut. Die verdaute DNA wurde dann auf einem 1% -igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das TMEM59-spezifische 830 bp-Fragment aus dem Gel eluiert (siehe 6.2.1.3). Für den Verdau wurde die Menge der DNA so gewählt, dass letztlich eine Konzentration von ca. 25 ng/ μl DNA im Eluat vorlag. Die so berechnete Konzentration der cDNA wurde dann mittels einer DNA bekannter Konzentration auf einem 1% Agarosegel überprüft. Das generierte TMEM59-cDNA-Fragment repräsentiert den Bereich 67-898 der kodierenden Sequenz von TMEM59 und wurde dann für die Herstellung einer TMEM59-spezifischen Sonde für das MTN-Blot-Experiment eingesetzt. Zu Beginn des Versuchs wurde die Hybridisierungslösung (BD Biosciences) in einem 60 °C-Wasserbad warm gestellt. Die Northern Blot-Membran wurde in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben, dabei zeigt die Oberfläche der Membran, welche die aufgetragene mRNA trägt, zur Innenseite des Hybridisierungsröhrchens. Der

Hybridisierungssofen wurde auf 65 °C vorgeheizt, ein Heizblock wurde auf 95 °C vorgeheizt und die Radioaktivität α -[³²P]-dCTP (Amersham Biosciences) wurde bei RT aufgetaut. Es wurde ein Oligonukleotid-Mix und ein DNA-Gemisch vorbereitet, das Gesamtvolumen beider Ansätze betrug 50 μ l:

Oligonukleotid-Gemisch (Invitrogen):

-.15 μ l Random Primer (18 OD260 units/ml)

-.2 μ l dGTP (0,5 mM)

-.2 μ l dATP (0,5 mM)

-.2 μ l dTTP (0,5 mM)

DNA-Gemisch:

1 μ l cDNA (25 ng/ μ l)

22 μ l dH₂O

Zum Start der Reaktion wurde das DNA-Gemisch 5 min bei 95 °C gekocht, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Oligonukleotid-Gemisch zum DNA-Gemisch pipettiert und 5 μ l radioaktiv-markiertes μ -[³²P]-dCTP zugegeben, dessen Aktivität 50 μ Ci betrug. Nach Zugabe von 1 μ l Klenow-Polymerase (Random Primer DNA Labeling System, 3 U/ μ l) wurde das Reaktionsgemisch gevortext und abzentrifugiert. Es folgte eine Inkubation der Reaktion bei 25 °C für 2 h. In der Zwischenzeit wurden 10 ml Hybridisierungslösung auf die MTN-Blot-Membran gegeben, die anschließend bei 65 °C im Hybridisierungssofen für 1-2 h inkubiert wurde. Nach Ablauf der zweistündigen Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 5 μ l Stopp-Puffer (Random Primer DNA Labeling System) versetzt, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Die gesamte so generierte radioaktiv-markierte Sonde wurde anschließend mit Hilfe von „Quick Spin Säulen“ (Roche) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die aufbereitete Sonde wurde dann 2 min bei 95 °C gekocht, kurz zentrifugiert und anschließend zur MTN-Blot-Membran in die Hybridisierungslösung pipettiert. Die Membran wurde über Nacht bei 65 °C im Hybridisierungssofen mit der radioaktiv markierten Sonde inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran mit Hilfe einer Pinzette aus dem Hybridisierungsgefäß entfernt und in eine ca. 10 x 20 cm große Wanne gelegt. Die radioaktive Hybridisierungslösung des Hybridisierungsröhrchens wurde verworfen. Es folgte das Waschen der Membran mit 2x SSC + 0,1% SDS für 3 x 10 min bei RT, auch das Hybridisierungsgefäß wurde parallel mit 3 x 10 ml 2x SSC + 0,1% SDS bei 65 °C gewaschen. Die Membran wurde dann zurück in das Hybridisierungsröhrchen gegeben und erneut 2 x mit

1x SSC + 0,1% SDS für je 20 min bei 65 °C gewaschen. Die Membran wurde in eine Folie gelegt und eingeschweißt, da ein Austrocknen des Blots unbedingt zu vermeiden ist, wenn man diesen häufiger verwenden möchte. Der Blot wurde in eine Filmkassette gegeben, woraufhin sensitive Röntgenfilme aufgelegt wurden und nach 24 h, bzw. 5 Tagen Inkubation bei –80 °C entwickelt wurden. Die Durchführung des β -Aktin-MTN-Blot-Experiments wurde analog durchgeführt, jedoch wurde eine geeignete β -Aktin-DNA-Sonde als Positivkontrolle mit dem kommerziellen MTN-Blot geliefert, welche ebenso radioaktiv markiert wurde und auf den Northern-Blot hybridisiert wurde. Ein β -Aktin-positives Signal konnte bereits 5 h nach dem Auflegen des Röntgenfilms detektiert werden.

6.2.2 Zellkultur

6.2.2.1 *Beschichtung von Kulturschalen mit Poly-L-Lysin*

6 cm-Kulturschalen wurden vollständig mit steriler Poly-L-Lysin-Lösung bedeckt (3 ml einer 1:1000-Lösung in PBS) und mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abnahme der Poly-L-Lysin-Lösung wurden die Schalen zweifach mit je 5 ml dH₂O (steril) gewaschen und getrocknet.

6.2.2.2 *Kultivierung von Zellen*

Die verschiedenen Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Dazu wurden die Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen in den in Tabelle 4 angegebenen Medien in unterschiedlichen Verdünnungen ausgesät und im Inkubator gezüchtet. Wurden 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 Vereinzelung der Zellen von der Kulturschale mittels 1,5 ml einer 0,05%igen Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco). Die so gelösten Zellen wurden dann in 5 ml Grundmedium aufgenommen und in unterschiedlichen Verdünnungen auf frische Zellkulturschalen für weitere Kultivierungen ausgesät.

6.2.2.3 *Transiente Transfektion mit rekombinanter DNA*

Die entsprechenden Zellen wurden in sterilen Poly-L-Lysin-beschichteten 24-Well-Platten, bis zu einer Konfluenz von ca. 60% kultiviert und je ein Well mittels 2 μ l Lipofectamin 2000 unter der Verwendung von 50 μ l Transformationsmedium gemäß den Anweisungen des Herstellers transfiziert. Pro Transfektion im 24-Well-Format wurden 0,2 μ g DNA eingesetzt,

welche wiederum mit 50 µl Transfektionsmedium versetzt wurde. Das Transfektionsmedium wurde ca. 24 h nach Transfektion durch 500 µl Grundmedium ersetzt und die Zellen 48 h nach Transfektion analysiert. Eine Auswertung der Zellen für Immunfluoreszenz wurde 24 h nach Transfektion durchgeführt.

6.2.2.4 *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 Medium versetzt. Die Zellsuspension wurde in der Zentrifuge bei RT 5 min und 200xg sedimentiert. Das Zellsediment wurde anschließend in 1 ml frischem Einfriermedium (FCS mit 5% DMSO) 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.

6.2.2.5 *Nachweis der exogenen Proteinexpression in transfizierten Zellen*

Transfizierte Zellen im 24-Well-Format wurden einmal mit PBS gewaschen, nachdem der Zellkulturüberstand abgenommen wurde. Sodann wurden die Zellen in 300 µl Lysispuffer für 5 min auf Eis inkubiert. Darauf folgend wurden durch Auf- und Abpipettieren die Zellen abgelöst und homogenisiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 13000 upm wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und eine Proteinkonzentrationsbestimmung (6.2.3.2.2) durchgeführt. 60 µl des Zelllysats wurden mit 20 µl 4x-SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Maximal 25 µl der Proben wurde auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (6.2.3.3) und die Proteine im Western Blot nachgewiesen (6.2.3.4).

Lysispuffer:

50 mM Tris pH 7,5

150 mM NaCl

1% NP-40

2 mM EDTA

6.2.3 Proteinbiochemische Methoden

6.2.3.1 Gewinnung von Gesamtproteinextrakten

Sämtliche Arbeitsschritte zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten erfolgten auf Eis.

Für die Gewinnung von Proteinextrakten aus 24-Well-Platten wurden die Zellen mit 500µl PBS gewaschen und anschließend mit 300µl Lysispuffer abgelöst, die 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 Zellsediment wurde verworfen.

Nach der Herstellung der Gesamtproteinextrakte erfolgte eine Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Proben mittels des BCA-Assays (6.2.3.2.2). Hergestellte Proteinextrakte wurden entweder umgehend weiter verarbeitet oder bei -20°C gelagert.

Lysispuffer:

50 mM Tris pH 7,5

150 mM NaCl

1% NP-40

2 mM EDTA

6.2.3.2 Ermittlung der Proteinkonzentration

6.2.3.2.1 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 µl dieser Verdünnung wurden dann mit 200 µl einer 1:4-Mischung aus Protein-Assay-Kit und dH₂O 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.

6.2.3.2 *Proteinkonzentration nach dem Bicinchonic Acid Assay (BCA-Assay)*

Je 10 µl eines Proteinlysats wurden in Doppelwerten in eine 96-Well-Platte pipettiert. Je 200 µl 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 0µg/ml und 2µg/ml in einer Einfachbestimmung angesetzt und ebenfalls mit dem BCA-Reagenz-Mix versetzt. Die 96-Well-Platte wurde anschließend 25 min bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte photometrisch bei 562 nm. Nach Extrapolation der Eichkurve konnte eine Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben erfolgen.

6.2.3.3 *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 (SeeBlue Plus2 Prestained Standard, Invitrogen) wurden 7µl 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 10 angegeben. Ansteigende Bisacrylamidkonzentrationen führen zu einer höheren Vernetzung des Gels und erlauben somit eine verbesserte Auftrennung von kleinen Proteinen.

Elektrophorese-Laufpuffer: 25mM Tris, 0,2 M Glacine, 0,1% SDS in dH₂O

Tabelle 10: Zusammensetzung von 8%- und 12% -igen SDS-Polyacrylamid-Gelen

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

Trenngel	8% Gel	12% Gel
H₂O	7,8 ml	6 ml
30% Bisacrylamid	4,2 ml	6 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% (w/v) SDS in dH ₂ O)	4,0 ml	4 ml
10% APS	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl
Sammelgel		
H₂O	6,5 ml	6,5 ml
30% Acrylamid	1,2 ml	1,2 ml
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% (w/v) SDS in dH ₂ O)	2,5 ml	2,5 ml
10% APS	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl

6.2.3.4 *Western-Blot*

Nach der Auftrennung mittels Gelelektrophorese (6.2.3.3) wurden die Proteine in einer Transferkammer auf eine PVDF-Membran übertragen. Vor dem Transfer ist eine Aktivierung der Membran durch 10 s Inkubation 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 (Whatman; Schleicher & Schuell) in Transfer-Puffer äquilibriert
- PVDF-Membran mit Isopropanol aktiviert und in Transfer-Puffer äquilibriert
- SDS-Polyacrylamid-Gel
- zwei Lagen Gel Blotting-Papier (Whatman; Schleicher & Schuell) 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 2x mit PBST gewaschen und 2x 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 3x 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 der ECL (enhanced chemoluminescence)-Technik (ECLTM Western Blotting Detection Reagent; Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers unter der Verwendung von Röntgenfilmen (Super RX, Fuji). Zum Nachweis schwacher Signale wurde das ECLplus-Western-Blotting-Detection-System (Amersham Biosciences) verwendet. Die Signale wurden mit dem Flurochem 8900 quantifiziert und mittels des Fluorchem-Analysis-Programm ausgewertet.

Transferpuffer: 25 mM Tris, 0,2 M Glycin

6.2.3.5 Immunpräzipitation (IP) von Proteinen

Zur Anreicherung eines gewünschten Proteins aus einem Gesamtproteinextrakt (6.2.3.1) 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 Protein-A-Sepharose (PAS, 2 mg PAS in 1 ml 20% EtOH resuspendiert) verwendet, bei monoklonalen Antikörpern wurde Protein-G-Sepharose (PGS, 2 mg PGS in 1 ml 20% EtOH resuspendiert) eingesetzt. Sowohl PAS als auch PGS wurden vor Gebrauch 3x in PBS-Puffer gewaschen. Vor der eigentlichen IP wurde das Gesamtzelllysat mit 30 µl immobiliser 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 Eppendorf-Reaktionsgefäß. 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 es wurden erneut 30 µl der

immobilen Phase hinzupipettiert. Die Immunpräzipitation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler.

Die Zelllysate 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 4x-SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend abzentrifugiert (13000 upm/30 s). Die Proben wurden dann auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen (6.2.3.3) und auf einen Western-Blot transferiert (6.2.3.4).

Zur Immunpräzipitation von A β wurden APP-überexprimierende Zellen (6 cm-Zellkulturschalen) verwendet, deren Überstand in der Regel 48 h nach Transfektion für eine A β -IP abgenommen wurde. 1 ml des Überstands wurde bei RT/13000 upm für 1 min zentrifugiert und in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Eine Reinigung des Überstandes („Preclearing“) zur Vermeidung unspezifischer Bindung von Proteinen an PAS wurde durchgeführt, indem 30 µl PAS zugegeben wurden. Es folgte eine Inkubation auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C für 60 min. Anschließend wurde die immobile Phase abzentrifugiert (8000 upm, 3 min) und der geklärte Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Pro Probe wurden ca. 800 µl Überstand für die A β -Immunpräzipitation eingesetzt, wobei die eingesetzten Mengen anhand der Proteinkonzentrationsbestimmung des Gesamtzelllysats (6.2.3.2.2) berechnet wurden. Die A β -Immunpräzipitation erfolgte über Nacht bei 4 °C unter der Verwendung des 3552-Antikörper (1:400) sowie mit 30 µl PAS pro Ansatz. Am nächsten Morgen wurden die PAS bei 4 °C/8000 upm für 3 min zentrifugiert und mit je 1 ml Sten-NaCl-Puffer, Sten-SDS-Puffer und Sten-Puffer gewaschen. Der verbleibende Pufferrest wurde vollständig mit einer Hamiltonspritze entfernt und die Proben mit 15 µl 4x Probenpuffer versetzt. Nach dem Aufköchen der Proben bei 95 °C für 5 min erfolgte eine kurze Zentrifugation (13000 upm/30 sec, RT) und das Laden auf ein Tris-Tricin-Gel. Für den immunchemischen Nachweis von A β -Peptiden wurde anstelle der PVDF-Membran eine Nitrocellulose-Membran verwendet (Protran Nitrocellulose Transfer Membran, Schleicher & Schuell). Eine Aktivierung der Nitrocellulose-Membran mittels Isopropanol ist in diesem Fall nicht notwendig, ansonsten erfolgte der Transferaufbau und der Transfer wie unter Kapitel 6.2.3.4 beschrieben. Unmittelbar nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran 5 min in PBS-Puffer gekocht und anschließend 60 min bei RT in I-Block-Reagenz zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen auf dem Schüttler inkubiert. Die so vorbehandelte Membran wurde anschließend über Nacht mit dem Primärantikörper (6E10, SENETEC, 1:2000) bei 4

°C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend 3 x 5 min mit PBST gewaschen. Der entsprechende Anti-Maus-Alkalische-Phosphatase-konjugierte Zweitantikörper wurde ebenfalls in I-Block verdünnt (1:5000) und für 60 min bei RT auf die schüttelnde Membran gegeben. Es folgte erneut 3-maliges Waschen der Membran für je 10 min mit PBST, sowie 2 5-minütige Waschschrte mit 1 x Assay-Puffer (TROPIX-Western Star Kit; Nalgene). Die Detektion der mit den Antikörpern gekoppelten Proteine erfolgte unter der Verwendung des TROPIX-Western Star Kits (Nalgene) nach Angaben des Herstellers sowie unter der Verwendung von Röntgenfilmen (Super RX, Fuji).

Sten:

0,05M Tris HCl pH 7,6

0,15 M NaCl

2 mM EDTA

0,2% NP-40

Sten-NaCl: 3,5% NaCl in Sten

Sten-SDS: 0,1% SDS in Sten

6.2.3.6 *In-vitro-Transkription und -Translation*

6.2.3.6.1 *In-vitro-Transkription*

TMEM59 wurde mittels des mMessage mMachine T7 Ultra Kit (Ambion) nach Protokoll des Herstellers transkribiert. p12-TMEM59-HA wurde downstream mit *BamH* I linearisiert, sodann erfolgte eine NH₄Ac-Fällung. Dabei wurde 10% vom Volumen NH₄Ac (10M) und 2,5faches Endvolumen EtOH (100%) zugesetzt, und für 1 h bei -80°C inkubiert. Sodann erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C bei 13 000 rpm, der Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe von 500 µl 70% EtOH wurde erneut 15 min bei 4°C bei 13 000 rpm abzentrifugiert, sowie der Überstand verworfen. Das entstehende Sediment wurde für ca. 10 min luftgetrocknet und sodann in RNase freiem Wasser resuspendiert. Die resultierende DNA wurde in den Transkriptionsansatz eingesetzt:

-20 µl RNase freies Wasser

-10 µl 2x NTP/CAP

-2 µl 10x Reaktionspuffer

-1 µg linearisierte DNA

-2 µl Enzym-Gemisch

Dieser Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert, in denen die Transkriptionsreaktion vonstatten ging. Der Ansatz mit der nun enthaltenden RNA wurde mit 1 µl DNase I (Qiagen, 2,7 U/µl) verdaut, 15 min bei 37°C, um die restliche DNA zu entfernen. Die RNA wurde mittels einer Phenol-Chloroform-Fällung gefällt. Hierfür wurde zu der erhaltenen RNA 115 µl Nukleas-freies Wasser und 15 µl Ammonium-Azetat-Stop-Lösung (5 M Ammonium-Azetat, 100 mM EDTA, Ambion) zugesetzt und gut durchmischt. Darauffolgend wurde ein Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1) im gleichen Volumen (jeweils 75 µl) zugesetzt und das Gefäß geschüttelt. Nun folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C bei 13 000 rpm, der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und für die Präzipitation mit 1x Volumen Isopropanol (100%) versetzt und für mindestens 15 min bei -20°C inkubiert. Als Nächstes folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 13 000 rpm, der Überstand wurde daraufhin verworfen. Das resultierende RNA-Sediment wurde in 32 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert, 2 µl davon wurden für die photometrische Bestimmung verwendet, von der restlichen RNA wurden 1 µl in die *in-vitro*-Translation eingesetzt.

6.2.3.6.2 *In-vitro*-Translation

Unter Verwendung des Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega) wurde nach dem Protokoll des Herstellers TMEM59-RNA translatiert. Translation unter Verwendung von Canine Microsomal Membranes (Promega) führt zu einer Integration des Proteins in die mikrosomale Membran, die der Membran des endoplasmatischen Retikulums entspricht.

Das Rabbit Reticulocyte Lysate enthält zelluläre Komponenten, die für die Protein-Synthese notwendig sind: tRNA, Ribosomen, Aminosäuren, Initiations-, Elongations- und Terminations-Faktoren.

Die transkribierte mRNA (1 µl) wurde für 3 min bei 65°C denaturiert und auf Eis gestellt und sodann in folgenden Ansatz gegeben:

- 17,5 µl Rabbit Retikulozyten-Lysat
- 0,6 µl Aminosäuren-Gemisch
- 1 µl RNA-Substrat in Wasser (entspricht 100ng)
- 6,9 µl Wasser

Dieser Translations-Ansatz wurde 1 h bei 30°C inkubiert. Wurde die Translation in Anwesenheit von mikrosomalen Membranen durchgeführt, so wurden demselben Ansatz 2 µl canine microsomal membranes (Promega) zugesetzt.

Die resultierenden Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer aufgekocht und mittels SDS-PAGE (6.2.3.3) und Western-Blot-Analyse (6.2.3.4) untersucht.

6.2.3.7 *TMEM59-Antikörper-Generierung*

Die Generierung des polyklonalen TMEM59-Antikörper (93) wurde bei der Firma Eurogentec (Seraing; Belgien) in Auftrag gegeben. Sämtliche Schritte in der Herstellung des Antikörpers wurden von der Firma Eurogentec durchgeführt. Für die Herstellung dieses Antikörpers wurden zwei Kaninchen mit folgendem Peptid immunisiert: H2N-AGP LPT KVN LAH SEI-CONH2 (15 AS; AS 309-323 von TMEM59). Die immunogene Potenz dieses Peptids wurde mit dem Programm DNASTar ermittelt und durch die Experten von Eurogentec bestätigt. Das Peptid bindet in der C-terminalen Region von TMEM59. Zur Gewinnung des Antikörpers wurde das synthetische Peptid an KLH (keyhole limpet hemocyanin) gebunden und das Produkt zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Die finale Blutung beider Hasen wurde vereinigt und über Affinitätschromatographie mit dem Antigen aufgereinigt. Die Kopplung des Peptids, die Immunisierung sowie die Gewinnung des Antiserums wurden von der Firma Eurogentec durchgeführt.

Als Spezifitäts-Kontrolle in der Immunfluoreszenz wurde der 93-Antikörper (0,64 mg/ml in PBS) mit dem Peptid (1 mg/ml) im Verhältnis 1:3 für 1 h bei 37°C inkubiert und somit die Antigen-Bindestellen des Antikörpers geblockt. Das Antikörper-Peptid-Gemisch wurde 1:2000 in der Western-Analyse und unverdünnt in der Immunfluoreszenz-Analyse verwendet. Der 93-Antikörper wurde in der Western-Analyse ebenfalls 1:2000, in der Immunfluoreszenz 1:200 eingesetzt.

6.2.4 Zelluläre Assays

6.2.4.1 *PIPLC-Verdau*

Zur Untersuchung der Membranständigkeit von GPI-verankertem Prp nach p12-TMEM59-Kotransfektion wurden intakte HEK293-Zellen, die transient mit pcDNA3.1-wtPrP und p12-TMEM59 oder dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase transfiziert wurden, mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PIPLC) inkubiert. PIPLC verursacht spezifisch die Freisetzung von in der Membran GPI-verankerten Proteinen, welche sich daher nach einem Verdau mit PIPLC im Zellkulturmedium befinden und in dieser Fraktion mittels Western Blot detektiert werden können. Um eine Lokalisierung der Proteine im Zellkulturmedium durch eine möglich stattfindende Sekretion zu vermeiden, wurde der Verdau bei 4°C vollzogen.

HEK293-Zellen wurden mit pcDNA3.1-wtPrP und p12-TMEM59 oder p12-Luziferase transfiziert, am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen auf Eis mit PBS gewaschen und für 2 h mit 500 µl von PIPLC-versetztem Medium (in 500 µl Medium wurden 5 µl PIPLC (11 mg/ml) von Sigma gegeben), inkubiert, die Kontrolle wurde mit PBS behandelt. Sodann wurde der Überstand abgenommen, 5 min bei 13000 upm zentrifugiert und eine TCA-Fällung durchgeführt. Dafür fügt man 1 Volumen einer 100% (w/v) TCA-Lösung zu 4 Volumen der Protein-Lösung und inkubiert für 10 min bei 4°C. Danach erfolgt ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4°C bei 13 000 rpm. Der Überstand wird verworfen, das Sediment wird mit 1 ml gekühltem Azeton gewaschen und sodann für 5 min bei 4°C bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wird nochmals wiederholt. Sodann trocknet man das Sediment mindestens 15 min. Sodann kann das Sediment in 20 µl 4x Probenpuffer aufgeköcht werden, die Zellen wurden lysiert. Der Nachweis von PrP erfolgte mittels des Antikörpers 3F4 aus dem Sediment und dem Lysat, von TMEM59 nur aus dem Lysat. Zur Kontrolle wurden parallel transfizierte Zellen ohne PIPLC-Inkubation für 2 h bei 37°C inkubiert, um auszuschließen, dass ein Signal im Sediment auch durch Sekretion ohne Zutun der PIPLC zustande kommen kann.

6.2.4.2 *Aufreinigung eines GST-Fusionsproteins und Generierung eines TMEM59-Antikörpers*

Ein monoklonaler Antikörper aus der Ratte gegen den C-Terminus (261-323) von TMEM59 (4E5, Isotyp-Klasse IgG2b) wurde durch Immunisierung von Ratten mit einem GST-TMEM59-CT-Fusionspeptid generiert. Die GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21-Zellen generiert und nach Anweisung des Herstellers (Amersham Biosciences) aufgereinigt. Zur Durchführung von in-vitro-Bindestudien wurden HEK293-Lysate mit 30 µl GST-Fusionsprotein, das an Sepharose-Kügelchen gekoppelt war, inkubiert, wobei vergleichbare Mengen des GST-Fusionproteins verwendet wurden, diese Überprüfung erfolgte mittels einer Coomassie-blau-Färbung. Die Proben wurden für 2 h bei 4°C inkubiert und fünfmal mit 1 ml STEN-Puffer gewaschen.

Sodann wurden die Proben zu Dr. E. Kremmer an die GSF in Martinsried geschickt und es erfolgte eine Grundimmunisierung der Ratten und eine zweite Immunisierung. Drei Tage nach der zweiten Immunisierung wurden Zellen aus der Milz mit Hybridomzellen fusioniert und der Überstand des jeweiligen Hybridoms getestet. Nach Abschluss der Primäraustestung werden die Hybridome zur Reklonierung unter Berücksichtigung der Subklasse ausgewählt.

6.2.4.3 *Radioaktive Markierung von Proteinen mit [³⁵S]*

HEK-293-Zellen in 6 cm-Schalen wurden transient mit p12-APP₆₉₅ und entweder p12-Luziferase als Kontrolle oder p12-TMEM59 kotransfiziert. Als Transfektionskontrolle diente p12-GFP. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 Minuten in MEM ohne Methionin inkubiert, um vorhandenes Methionin (Met) aufzubrechen (Hungern). Für die radioaktive Markierung wurde das Medium abgenommen und durch 500 µl frisches MEM ohne Methionin mit [³⁵S]-Met („ProMix“, 150 µCi/ml) ersetzt. Nach 30 Minuten wurden die 6 cm-Schalen, die zur Untersuchung der während der *pulse*-Phase synthetisierten Proteine bestimmt waren, geerntet und die Zellen mit IP-Lysepuffer lysiert (*pulse*-Proben). Die restlichen Schalen wurden für die angegebene Zeit mit Vollmedium bei 37°C inkubiert, sodann wie oben beschrieben lysiert (*chase*-Proben) und immunpräzipitiert mit 6687-Antikörper. Das restliche Lysat und die IP wurden mittels SDS-PAGE und Western-Analyse auf APP (6687), TMEM59 (93) und GFP (GFP-mono) untersucht

6.2.4.4 *IF Techniken*

6.2.4.4.1 *Herstellung und Auswertung eines Immunfluoreszenz-Präparates*

Zur Herstellung von Immunfluoreszenz-Präparaten wurden COS7-Zellen auf Deckgläsern mit einem Durchmesser Ø 10 mm in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät, transfiziert (6.2.2.3) und bis zu einer Konfluenz von 50-60% kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml PCM-Puffer auf Eis gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen auf Eis in 500 µl 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 Tritonlösung inkubiert und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Es folgte 10-minütiges Blockieren unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen, indem die Deckgläschen in 500 µl Blockmedium inkubiert wurden. Falls nötig, wurden die Zellen dann mit dem Erstantikörper behandelt, der, verdünnt in Blockmedium, 20 min inkubiert wurde. Anschließend wurden die Plättchen dreimal in PBS gewaschen und für 20 min mit dem Zweitantikörper behandelt, der ebenfalls in Blockmedium verdünnt wurde. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Deckgläser kurz in H₂O 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°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. Alternativ erfolgten Auswertungen auch an einem Zeiss 510Meta-konfokalem Mikroskop, die Bilder wurden mit der Metaview-Imaging-Software ausgewertet.

6.2.4.4.2 *TMEM59-ER-Kolokalisierung*

Zur Durchführung der TMEM59-Golgi-Kolokalisierung wurden COS-Zellen der Dichte $1,5 \times 10^5$ auf Glasplättchen (\varnothing 10 mm) ausgesät und mit TMEM59-GFP transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und wie unter 6.2.4.5.1 beschrieben fixiert und für die Immunfluoreszenz-Analyse vorbereitet.

6.2.4.4.3 *TMEM59-Golgi-Kolokalisierung*

Zum Nachweis der Golgi-Kolokalisierung wurden COS-Zellen der Dichte $1,5 \times 10^5$ auf Glasplättchen (\varnothing 10 mm) ausgesät und nach 24 h mit eiskaltem PCM gewaschen, nach dem Standardprotokoll (2.5.1) fixiert und 20 min auf Eis mit dem TMEM59-Ak 93 oder 4E5 und dem Giantin-Ak inkubiert. Zur Kontrolle wurde der Peptid-gebundene 93-Antikörper oder der Isotypantikörper IgG2b von 4E5 eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde ein Alexa555- und Alexa 488-gekoppelter Antikörper eingesetzt. Alexa555 emittiert nach Anregung mit 553 nm Fluoreszenz bei 568 nm und erscheint deshalb als rotes Fluoreszenzsignal, wohingegen Alexa 488 nach Anregung mit 493 nm Fluoreszenz bei 520 nm und erscheint daher als grünes Signal.

6.2.4.4.4 *Lebend-Zell-Aufnahme*

Zur Untersuchung, inwieweit die zelluläre Lokalisierung von Fluorophor-markierten Proteinen durch die Ko-Expression von TMEM59 beeinflusst ist, wurden HEK293-Zellen 4×10^5 in Poly-L-Lysin beschichtete ibidi-Platten ausgesät und mit pShuttle-CMS-YFP-APP und jeweils dem Kontroll-Plasmid p12-Luziferase, p12-TMEM59 und p12-HA-TMEM59-KKXX kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mittels des Zeiss 510Meta-konfokalen Mikroskops ausgewertet. Dieselbe Versuchsanordnung wurde durchgeführt mit p12-HA-RFP-CD59 und p12-Luziferase, p12-TMEM59-GFP, p12-BSMAP und p12-HA-TMEM59-KKXX.

6.2.4.5 Deglykosylierungs-Experimente

6.2.4.5.1 N-Glykosidase F-Verdau

Zur Untersuchung einer möglichen N-Glykosylierung von TMEM59 wurde ein Verdau mit Peptid N-Glykosidase F (PNGase F) durchgeführt, die alle N-Glykane des mannosereichen, hybriden und komplexen Typs spalten kann. Dazu wurden HEK293-Zellen in 24-well-Platten ausgesät, an Tag 2 mit p12-TMEM59-HA transfiziert, an Tag 3 das Medium gewechselt und an Tag 4 die Zellen mit 300 µl Lysispuffer lysiert. Um eine vollständige Abspaltung aller Zuckerreste zu erreichen und somit die Effizienz der Deglykosylierung zu erhöhen, wurden die Proteine zunächst denaturiert. 35 µl Lysat wurden mit 10 µl 5x Reaktionspuffer (250 mM Natrium-Phosphat, pH 7,5) und 2,5 µl Denaturierungs-Lösung (2% SDS, 1 M β-Mercaptoethanol) versetzt, für 5 min bei 100°C aufgeköcht und auf Eis kurz abgekühlt. Daraufhin wurde das Lysat mit 2,5 µl Triton X-100 (15%) gemischt und 2 µl PNGase F (5 U/µl) dazugegeben und der Ansatz 3 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der 3 h wurde das Lysat mit 15 µl 4xProbenpuffer versehen und nochmals 5 min bei 95°C aufgeköcht. 5 µl wurden dann mittels SDS-PAGE (6.2.3.3) aufgetrennt und mittels Western-Blot (6.2.3.4) identifiziert.

6.2.4.5.2 Endoglykosidase H-Verdau

Zur Untersuchung, ob die Zuckerketten an TMEM59 vom mannosereichen Typ sind, wurde ein Endoglykosidase H (Endo H)-Verdau durchgeführt. 35 µl p12-TMEM59-transfiziertes Lysat aus HEK293-Zellen wurden mit 10 µl Na-Citrat (1 M, pH 5,8) und 2,5 µl Denaturierungs-Lösung (siehe 6.2.4.6.1) und 1 µl Endo H (1 U/200 µl, Roche) versetzt und über Nacht bei Raum-Temperatur inkubiert. Das Lysat wurde für 5 min bei 95°C aufgeköcht und 5 µl mittels SDS-PAGE (6.2.3.3) aufgetrennt und mittels Western-Blot (6.2.3.4) identifiziert.

6.2.4.6 Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität

Zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität wurden HEK293-Zellen in poly-L-Lysin-beschichteten 24-Well-Platten ausgesät und mit p12-HA-SEAP und Kontrollplasmid p12-Luziferase oder p12-TMEM59 transfiziert (6.2.2.3). Zur Bestimmung der Menge an sekretierter SEAP wurde das Medium der Zellen 48 h nach Transfektion abgenommen und

bei RT/13000 upm 1 min zentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden dann in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 30 min bei 65 °C inkubiert, um eine Hitzeinaktivierung endogener alkalischer Phosphatase zu erlangen. Die exprimierte Alkalische Phosphatase hingegen ist hitzestabil und wird dabei 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 (siehe unten) versetzt. Die Absorbtionsmessung 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.

Parallel zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität der Proben wurden Gesamtzellextrakte hergestellt (6.2.3.1) und die Proteinkonzentration der Proben mittels des BCA-Assay-Kits bestimmt (6.2.3.2.2). Die gemessenen alkalischen Phosphatase-Aktivitäten wurden dann auf die zugehörige Proteinkonzentration des Gesamtzellextrakts normiert und graphisch dargestellt.

Substratpuffer:

0,1 M Glycin (87,51 g), 1 mM MgCl₂ (203 mg), 1 mM ZnCl₂ (136 mg)
pH mit NaOH auf pH 10,4 einstellen (pH-Optimum der AP)

7. Literaturverzeichnis

- Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74, 342-352.
- Alzheimer (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin*, 146-148.
- Ancolio, K., Dumanchin, C., Barelli, H., Warter, J. M., Brice, A., Campion, D., Frebourg, T., and Checler, F. (1999). Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4119-4124.
- 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.
- Araujo, D. M., and Cotman, C. W. (1992). Beta-amyloid stimulates glial cells in vitro to produce growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res* 569, 141-145.
- Axelsson, M. A., Karlsson, N. G., Steel, D. M., Ouwendijk, J., Nilsson, T., and Hansson, G. C. (2001). Neutralization of pH in the Golgi apparatus causes redistribution of glycosyltransferases and changes in the O-glycosylation of mucins. *Glycobiology* 11, 633-644.
- Bause, E. (1983). Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J* 209, 331-336.
- Beguinet, L., Hanover, J. A., Ito, S., Richert, N. D., Willingham, M. C., and Pastan, I. (1985). Phorbol esters induce transient internalization without degradation of unoccupied epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 2774-2778.
- Bibel, M., Richter, J., Schrenk, K., Tucker, K. L., Staiger, V., Korte, M., Goetz, M., and Barde, Y. A. (2004). Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat Neurosci* 7, 1003-1009.
- Blennow, K., de Leon, M. J., and Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* 368, 387-403.
- Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 67, 835-851.
- Borchelt, D. R., Scott, M., Taraboulos, A., Stahl, N., and Prusiner, S. B. (1990). Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* 110, 743-752.
- Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C. M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., *et al.* (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17, 1005-1013.
- 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.
- Brandizzi, F., Hanton, S., DaSilva, L. L., Boevink, P., Evans, D., Oparka, K., Denecke, J., and Hawes, C. (2003). ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants. *Plant J* 34, 269-281.
- Breitner, J. C., and Folstein, M. F. (1984). Familial Alzheimer Dementia: a prevalent disorder with specific clinical features. *Psychol Med* 14, 63-80.

- Brone, B., and Eggermont, J. (2005). PDZ proteins retain and regulate membrane transporters in polarized epithelial cell membranes. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C20-29.
- Burda, P., and Aebi, M. (1999). The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1426, 239-257.
- 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.
- 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.
- Caporaso, G. L., Gandy, S. E., Buxbaum, J. D., and Greengard, P. (1992). Chloroquine inhibits intracellular degradation but not secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2252-2256.
- Castano, E. M., Prelli, F., Pras, M., and Frangione, B. (1995). Apolipoprotein E carboxyl-terminal fragments are complexed to amyloids A and L. Implications for amyloidogenesis and Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 270, 17610-17615.
- Caughey, B., and Raymond, G. J. (1991). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* 266, 18217-18223.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Chang, K. H., Yang, J. M., Chun, H. O., and Chung, I. S. (2005). Enhanced activity of recombinant beta-secretase from *Drosophila melanogaster* S2 cells transformed with cDNAs encoding human beta1,4-galactosyltransferase and Galbeta1,4-GlcNAc alpha2,6-sialyltransferase. *J Biotechnol* 116, 359-367.
- Charlwood, J., Dingwall, C., Matico, R., Hussain, I., Johanson, K., Moore, S., Powell, D. J., Skehel, J. M., Ratcliffe, S., Clarke, B., *et al.* (2001). Characterization of the glycosylation profiles of Alzheimer's beta -secretase protein Asp-2 expressed in a variety of cell lines. *J Biol Chem* 276, 16739-16748.
- Checler, F. (1995). Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 65, 1431-1444.
- 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.
- Citron, M. (2004). Beta-secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease--promise and challenge. *Trends Pharmacol Sci* 25, 92-97.
- Citron, M., Diehl, T. S., Gordon, G., Biere, A. L., Seubert, P., and Selkoe, D. J. (1996). Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13170-13175.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., *et al.* (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 3, 67-72.
- Clark, M. J., Gagnon, J., Williams, A. F., and Barclay, A. N. (1985). MRC OX-2 antigen: a lymphoid/neuronal membrane glycoprotein with a structure like a single immunoglobulin light chain. *Embo J* 4, 113-118.

- Creemers, J. W., Ines Dominguez, D., Plets, E., Serneels, L., Taylor, N. A., Multhaup, G., Craessaerts, K., Annaert, W., and De Strooper, B. (2001). Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *J Biol Chem* 276, 4211-4217.
- Cullen, B. R., and Malim, M. H. (1992). Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Methods Enzymol* 216, 362-368.
- Daigle, I., and Li, C. (1993). *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 12045-12049.
- Dallman, P. R., Dallner, G., Bergstrand, A., and Ernster, L. (1969). Heterogeneous distribution of enzymes in submicrosomal membrane fragments. *J Cell Biol* 41, 357-377.
- Dawson, G. R., Seabrook, G. R., Zheng, H., Smith, D. W., Graham, S., O'Dowd, G., Bowery, B. J., Boyce, S., Trumbauer, M. E., Chen, H. Y., *et al.* (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* 90, 1-13.
- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38, 9-12.
- Dickson, D. W. (1997). The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 321-339.
- Dyrks, T., Dyrks, E., Monning, U., Urmoneit, B., Turner, J., and Beyreuther, K. (1993). Generation of beta A4 from the amyloid protein precursor and fragments thereof. *FEBS Lett* 335, 89-93.
- Dyrks, T., Weidemann, A., Multhaup, G., Salbaum, J. M., Lemaire, H. G., Kang, J., Muller-Hill, B., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1988). Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *Embo J* 7, 949-957.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5, 486-488.
- Ehlers, M. R., and Riordan, J. F. (1991). Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry* 30, 10065-10074.
- Elson, G. C., de Coignac, A. B., Aubry, J. P., Delneste, Y., Magistrelli, G., Holzwarth, J., Bonnefoy, J. Y., and Gauchat, J. F. (1999). BSMAP, a novel protein expressed specifically in the brain whose gene is localized on chromosome 19p12. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 55-62.
- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B., and Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28, 8380-8388.
- 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.
- Estus, S., Golde, T. E., Kunishita, T., Blades, D., Lowery, D., Eisen, M., Usiak, M., Qu, X. M., Tabira, T., Greenberg, B. D., and *et al.* (1992). Potentially amyloidogenic, carboxyl-terminal derivatives of the amyloid protein precursor. *Science* 255, 726-728.
- 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.
- Ferreira, A., Niclas, J., Vale, R. D., Banker, G., and Kosik, K. S. (1992). Suppression of kinesin expression in cultured hippocampal neurons using antisense oligonucleotides. *J Cell Biol* 117, 595-606.
- Ficklin, M. B., Zhao, S., and Feng, G. (2005). Ubiquilin-1 regulates nicotine-induced up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 280, 34088-34095.

- Fossgreen, A., Bruckner, B., Czech, C., Masters, C. L., Beyreuther, K., and Paro, R. (1998). Transgenic *Drosophila* expressing human amyloid precursor protein show gamma-secretase activity and a blistered-wing phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13703-13708.
- 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.
- Gahmberg, C. G., and Tolvanen, M. (1996). Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem Sci* 21, 308-311.
- 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.
- Gitter, B. D., Cox, L. M., Rydel, R. E., and May, P. C. (1995). Amyloid beta peptide potentiates cytokine secretion by interleukin-1 beta-activated human astrocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10738-10741.
- Glabe, C. (2001). Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 17, 137-145.
- Glenner, G. G., Wong, C. W., Quaranta, V., and Eanes, E. D. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol* 2, 357-369.
- Goedert, M., Sisodia, S. S., and Price, D. L. (1991). Neurofibrillary tangles and beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 1, 441-447.
- Golde, T. E., Estus, S., Usiak, M., Younkin, L. H., and Younkin, S. G. (1990). Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron* 4, 253-267.
- 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, W. O., Saffiotti, U., and Gajdusek, D. C. (1987). Isolation, characterization, and chromosomal localization of human brain cDNA clones coding for the precursor of the amyloid of brain in Alzheimer's disease, Down's syndrome and aging. *J Neural Transm Suppl* 24, 23-28.
- Goldsbury, C., Mocanu, M. M., Thies, E., Kaether, C., Haass, C., Keller, P., Biernat, J., Mandelkow, E., and Mandelkow, E. M. (2006). Inhibition of APP trafficking by tau protein does not increase the generation of amyloid-beta peptides. *Traffic* 7, 873-888.
- Gray, C. W., and Patel, A. J. (1993a). Induction of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs by bFGF in astrocytes. *Neuroreport* 4, 811-814.
- Gray, C. W., and Patel, A. J. (1993b). Regulation of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs by transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 beta in astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 19, 251-256.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., and Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4913-4917.
- 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. (1997). Presenilins: genes for life and death. *Neuron* 18, 687-690.
- Haass, C. (2004). Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *Embo J* 23, 483-488.
- 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., Oltersdorf, T., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1993b). Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. *Ann N Y Acad Sci* 695, 109-116.
- 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., Koo, E. H., Mellon, A., Hung, A. Y., and Selkoe, D. J. (1992a). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357, 500-503.
- 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. (1992b). 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.
- Haniu, M., Denis, P., Young, Y., Mendiaz, E. A., Fuller, J., Hui, J. O., Bennett, B. D., Kahn, S., Ross, S., Burgess, T., et al. (2000). Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J Biol Chem* 275, 21099-21106.
- Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., Borchelt, D. R., Teplow, D., Hood, L., Burlingame, A., and et al. (1989). Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* 274, 1-13.
- Hardy, J. (1992). An 'anatomical cascade hypothesis' for Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 15, 200-201.
- 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.
- Harris, S. L., and Waters, M. G. (1996). Localization of a yeast early Golgi mannosyltransferase, Och1p, involves retrograde transport. *J Cell Biol* 132, 985-998.
- Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretzschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., et al. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20, 7951-7963.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-2369.
- Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretzschmar, 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.
- Hiltunen, M., Lu, A., Thomas, A. V., Romano, D. M., Kim, M., Jones, P. B., Xie, Z., Kounnas, M. Z., Wagner, S. L., Berezovska, O., et al. (2006). Ubiquitin 1 modulates amyloid precursor protein trafficking and Abeta secretion. *J Biol Chem* 281, 32240-32253.
- Hiramatsu, N., Kasai, A., Hayakawa, K., Nagai, K., Kubota, T., Yao, J., and Kitamura, M. (2006a). Secreted protein-based reporter systems for monitoring inflammatory events: critical interference by endoplasmic reticulum stress. *J Immunol Methods* 315, 202-207.
- Hiramatsu, N., Kasai, A., Hayakawa, K., Yao, J., and Kitamura, M. (2006b). Real-time detection and continuous monitoring of ER stress in vitro and in vivo by ES-TRAP: evidence for systemic, transient ER stress during endotoxemia. *Nucleic Acids Res* 34, e93.
- Holtzman, D. M., Bales, K. R., Tenkova, T., Fagan, A. M., Parsadanian, M., Sartorius, L. J., Mackey, B., Olney, J., McKeel, D., Wozniak, D., and Paul, S. M. (2000). Apolipoprotein E

- isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2892-2897.
- Homayouni, R., Rice, D. S., Sheldon, M., and Curran, T. (1999). Disabled-1 binds to the cytoplasmic domain of amyloid precursor-like protein 1. *J Neurosci* 19, 7507-7515.
- Hooper, N. M., Karran, E. H., and Turner, A. J. (1997). Membrane protein secretases. *Biochem J* 321 (Pt 2), 265-279.
- 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.
- Hung, A. Y., Koo, E. H., Haass, C., and Selkoe, D. J. (1992). Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9439-9443.
- Huovila, A. P., Turner, A. J., Peltto-Huikko, M., Karkkainen, I., and Ortiz, R. M. (2005). Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci* 30, 413-422.
- Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M., and Doms, R. W. (2000). Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem* 275, 33729-33737.
- 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.
- Hyman, B. T., Gomez-Isla, T., Rebeck, G. W., Briggs, M., Chung, H., West, H. L., Greenberg, S., Mui, S., Nichols, S., Wallace, R., and Growdon, J. H. (1996). Epidemiological, clinical, and neuropathological study of apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 802, 1-5.
- Hyman, B. T., and Tanzi, R. (1995). Molecular epidemiology of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 333, 1283-1284.
- Irie, K., Murakami, K., Masuda, Y., Morimoto, A., Ohigashi, H., Ohashi, R., Takegoshi, K., Nagao, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. (2005). Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biosci Bioeng* 99, 437-447.
- Jackson, M. R., Nilsson, T., and Peterson, P. A. (1990). Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J* 9, 3153-3162.
- 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 carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4693-4697.
- Jellinger, K. A. (2004). Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 511-512.
- Jellinger, K. A. (2005). Understanding the pathology of vascular cognitive impairment. *J Neurol Sci* 229-230, 57-63.
- Kaether, C., Haass, C., and Steiner, H. (2006). Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener Dis* 3, 275-283.
- Kaether, C., Skehel, P., and Dotti, C. G. (2000). Axonal membrane proteins are transported in distinct carriers: a two-color video microscopy study in cultured hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 11, 1213-1224.
- Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H., and Goldstein, L. S. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 28, 449-459.

- 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.
- Kang, J., and Muller-Hill, B. (1990). Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 166, 1192-1200.
- Katzman, R. (1986). Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 314, 964-973.
- Kawasumi, M., Hashimoto, Y., Chiba, T., Kanekura, K., Yamagishi, Y., Ishizaka, M., Tajima, H., Niikura, T., and Nishimoto, I. (2002). Molecular mechanisms for neuronal cell death by Alzheimer's amyloid precursor protein-relevant insults. *Neurosignals* 11, 236-250.
- Kingsley, D. M., Kozarsky, K. F., Segal, M., and Krieger, M. (1986). Three types of low density lipoprotein receptor-deficient mutant have pleiotropic defects in the synthesis of N-linked, O-linked, and lipid-linked carbohydrate chains. *J Cell Biol* 102, 1576-1585.
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., and Ito, H. (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331, 530-532.
- 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., Sisodia, S. S., Archer, D. R., Martin, L. J., Weidemann, A., Beyreuther, K., Fischer, P., Masters, C. L., and Price, D. L. (1990). Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1561-1565.
- 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.
- Koo, E. H., Squazzo, S. L., Selkoe, D. J., and Koo, C. H. (1996). Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *J Cell Sci* 109 (Pt 5), 991-998.
- Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54, 631-664.
- Kriesten, K. (2003). Alzheimer Wege zur Diagnose. *Biologie in unserer Zeit* 33, 219.
- Kubota, Y., and Nishiwaki, K. (2006). *C. elegans* as a model system to study the function of the COG complex in animal development. *Biol Chem* 387, 1031-1035.
- 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). Inhibition of amyloid formation: a strategy to delay the onset of Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol* 1, 260-267.
- Lehmann, S., and Harris, D. A. (1997). Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. *J Biol Chem* 272, 21479-21487.
- Levy-Lahad, E., Wijsman, E. M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K. A., Weber, J. L., Bird, T. D., and Schellenberg, G. D. (1995). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269, 970-973.

- Li, Y., Liu, T., Peng, Y., Yuan, C., and Guo, A. (2004). Specific functions of *Drosophila* amyloid precursor-like protein in the development of nervous system and nonneural tissues. *J Neurobiol* *61*, 343-358.
- Lichtenthaler, S. F., Beher, D., Grimm, H. S., Wang, R., Shearman, M. S., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (2002). The intramembrane cleavage site of the amyloid precursor protein depends on the length of its transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 1365-1370.
- 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, C. R., Chen, W. S., Lazar, C. S., Carpenter, C. D., Gill, G. N., Evans, R. M., and Rosenfeld, M. G. (1986). Protein kinase C phosphorylation at Thr 654 of the unoccupied EGF receptor and EGF binding regulate functional receptor loss by independent mechanisms. *Cell* *44*, 839-848.
- 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.
- Linstedt, A. D., and Hauri, H. P. (1993). Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. *Mol Biol Cell* *4*, 679-693.
- Llopis, J., McCaffery, J. M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G., and Tsien, R. Y. (1998). Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 6803-6808.
- Lyckman, A. W., Confaloni, A. M., Thinakaran, G., Sisodia, S. S., and Moya, K. L. (1998). Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily proteins in the central nervous system. *J Biol Chem* *273*, 11100-11106.
- Maguire, T. M., and Breen, K. C. (1995). A decrease in neural sialyltransferase activity in Alzheimer's disease. *Dementia* *6*, 185-190.
- Makarova, A., Williams, S. E., and Strickland, D. K. (2004). Proteases and lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Cell Biochem Biophys* *41*, 139-178.
- Maley, F., Trimble, R. B., Tarentino, A. L., and Plummer, T. H., Jr. (1989). Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem* *180*, 195-204.
- Malhotra, V., and Mayor, S. (2006). Cell biology: the Golgi grows up. *Nature* *441*, 939-940.
- Martinez-Menarguez, J. A., Prekeris, R., Oorschot, V. M., Scheller, R., Slot, J. W., Geuze, H. J., and Klumperman, J. (2001). Peri-Golgi vesicles contain retrograde but not anterograde proteins consistent with the cisternal progression model of intra-Golgi transport. *J Cell Biol* *155*, 1213-1224.
- Masters, C. L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R. N., and Beyreuther, K. (1985a). 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.
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K. (1985b). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *82*, 4245-4249.
- Mattson, M. P., Pedersen, W. A., Duan, W., Culmsee, C., and Camandola, S. (1999). Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann N Y Acad Sci* *893*, 154-175.
- Mayeux, R., Honig, L. S., Tang, M. X., Manly, J., Stern, Y., Schupf, N., and Mehta, P. D. (2003). Plasma A[β]40 and A[β]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology* *61*, 1185-1190.

- McFarlane, I., Georgopoulou, N., Coughlan, C. M., Gillian, A. M., and Breen, K. C. (1999). The role of the protein glycosylation state in the control of cellular transport of the amyloid beta precursor protein. *Neuroscience* 90, 15-25.
- McGeer, P. L., and McGeer, E. G. (1995). The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 21, 195-218.
- McLoughlin, D. M., and Miller, C. C. (1996). The intracellular cytoplasmic domain of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein interacts with phosphotyrosine-binding domain proteins in the yeast two-hybrid system. *FEBS Lett* 397, 197-200.
- Meda, L., Cassatella, M. A., Szendrei, G. I., Otvos, L., Jr., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D., and Rossi, F. (1995). Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 374, 647-650.
- 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.
- Milward, E. A., Papadopoulos, R., Fuller, S. J., Moir, R. D., Small, D., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1992). The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron* 9, 129-137.
- Mironov, A. A., Beznoussenko, G. V., Nicoziani, P., Martella, O., Trucco, A., Kweon, H. S., Di Giandomenico, D., Polishchuk, R. S., Fusella, A., Lupetti, P., *et al.* (2001). Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae. *J Cell Biol* 155, 1225-1238.
- Moremen, K. W., Trimble, R. B., and Herscovics, A. (1994). Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology* 4, 113-125.
- Mothes, W., Heinrich, S. U., Graf, R., Nilsson, I., von Heijne, G., Brunner, J., and Rapoport, T. A. (1997). Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* 89, 523-533.
- Muller-Hill, B., and Beyreuther, K. (1989). Molecular biology of Alzheimer's disease. *Annu Rev Biochem* 58, 287-307.
- Munro, S., and Pelham, H. R. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907.
- Nakagawa, K., Kitazume, S., Oka, R., Maruyama, K., Saido, T. C., Sato, Y., Endo, T., and Hashimoto, Y. (2006). Sialylation enhances the secretion of neurotoxic amyloid-beta peptides. *J Neurochem* 96, 924-933.
- Nee, L. E., Polinsky, R. J., Eldridge, R., Weingartner, H., Smallberg, S., and Ebert, M. (1983). A family with histologically confirmed Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 40, 203-208.
- Neve, R. L., Finch, E. A., and Dawes, L. R. (1988). Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron* 1, 669-677.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997). A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst* 8, 581-599.
- Nilsson, T., Jackson, M., and Peterson, P. A. (1989). Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 58, 707-718.
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y., and Ogata, E. (1993). Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* 362, 75-79.
- Oka, T., and Krieger, M. (2005). Multi-component protein complexes and Golgi membrane trafficking. *J Biochem (Tokyo)* 137, 109-114.

- Oka, T., Ungar, D., Hughson, F. M., and Krieger, M. (2004). The COG and COPI complexes interact to control the abundance of GEARs, a subset of Golgi integral membrane proteins. *Mol Biol Cell* 15, 2423-2435.
- Oltersdorf, T., Fritz, L. C., Schenk, D. B., Lieberburg, I., Johnson-Wood, K. L., Beattie, E. C., Ward, P. J., Blacher, R. W., Dovey, H. F., and Sinha, S. (1989). The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II. *Nature* 341, 144-147.
- Oltersdorf, T., Ward, P. J., Henriksson, T., Beattie, E. C., Neve, R., Lieberburg, I., and Fritz, L. C. (1990). The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J Biol Chem* 265, 4492-4497.
- Pahlsson, P., Shakin-Eshleman, S. H., and Spitalnik, S. L. (1992). N-linked glycosylation of beta-amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 1667-1673.
- Pahlsson, P., and Spitalnik, S. L. (1996). The role of glycosylation in synthesis and secretion of beta-amyloid precursor protein by Chinese hamster ovary cells. *Arch Biochem Biophys* 331, 177-186.
- Palade, G. (1975). Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science* 189, 867.
- Pandiella, A., and Massague, J. (1991). Cleavage of the membrane precursor for transforming growth factor alpha is a regulated process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1726-1730.
- 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.
- Paulson, J. C., and Colley, K. J. (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* 264, 17615-17618.
- Pelham, H. R. (1991). Recycling of proteins between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Curr Opin Cell Biol* 3, 585-591.
- Perez, R. G., Soriano, S., Hayes, J. D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D. J., Chen, X., Stokin, G. B., and Koo, E. H. (1999). Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J Biol Chem* 274, 18851-18856.
- Pfeffer, S. R. (2007). Unsolved mysteries in membrane traffic. *Annu Rev Biochem* 76, 629-645.
- 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.
- Ponte, P., Gonzalez-DeWhitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I., and Fuller, F. (1988). A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 331, 525-527.
- Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E., and Blake, D. J. (1997). PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays* 19, 469-479.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., and Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233.
- Rabouille, C., and Klumperman, J. (2005). Opinion: The maturing role of COPI vesicles in intra-Golgi transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 812-817.
- Rapoport, T. A. (1992). Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258, 931-936.
- Reisberg, B., Ferris, S. H., Anand, R., Mir, P., Geibel, V., De Leon, M. J., and Roberts, E. (1983a). Effects of naloxone in senile dementia: a double-blind trial. *N Engl J Med* 308, 721-722.

- Reisberg, B., London, E., Ferris, S. H., Anand, R., and de Leon, M. J. (1983b). Novel pharmacologic approaches to the treatment of senile dementia of the Alzheimer's type (SDAT). *Psychopharmacol Bull* 19, 220-225.
- Robakis, N. K., Ramakrishna, N., Wolfe, G., and Wisniewski, H. M. (1987). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4190-4194.
- Robbins, P. W., Trimble, R. B., Wirth, D. F., Hering, C., Maley, F., Maley, G. F., Das, R., Gibson, B. W., Royal, N., and Biemann, K. (1984). Primary structure of the Streptomyces enzyme endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J Biol Chem* 259, 7577-7583.
- Roch, J. M., Masliah, E., Roch-Levecq, A. C., Sundsmo, M. P., Otero, D. A., Veinbergs, I., and Saitoh, T. (1994). Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7450-7454.
- 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, J., Webster, S., Lue, L. F., Brachova, L., Civin, W. H., Emmerling, M., Shivers, B., Walker, D., and McGeer, P. (1996). Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol Aging* 17, 681-686.
- Rosen, D. R., Martin-Morris, L., Luo, L. Q., and White, K. (1989). A Drosophila gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2478-2482.
- Rudd, P. M., Endo, T., Colominas, C., Groth, D., Wheeler, S. F., Harvey, D. J., Wormald, M. R., Serban, H., Prusiner, S. B., Kobata, A., and Dwek, R. A. (1999). Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13044-13049.
- Sabo, S. L., Ikin, A. F., Buxbaum, J. D., and Greengard, P. (2001). The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol* 153, 1403-1414.
- 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.
- Saitoh, T., and Iimoto, D. (1989). Aberrant protein phosphorylation and cytoarchitecture in Alzheimer's disease. *Prog Clin Biol Res* 317, 769-780.
- Samih, N., Hovsepian, S., Notel, F., Prorok, M., Zattara-Cannoni, H., Mathieu, S., Lombardo, D., Fayet, G., and El-Battari, A. (2003). The impact of N- and O-glycosylation on the functions of Glut-1 transporter in human thyroid anaplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1621, 92-101.
- Sandbrink, R., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1994). Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4-amyloid protein precursor-like proteins. *J Biol Chem* 269, 14227-14234.
- Scheel, A. A., and Pelham, H. R. (1996). Purification and characterization of the human KDEL receptor. *Biochemistry* 35, 10203-10209.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., *et al.* (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2, 864-870.
- Schmidt, V., Sporbert, A., Rohe, M., Reimer, T., Rehm, A., Andersen, O. M., and Willnow, T. E. (2007). SorLA/LR11 regulates processing of amyloid precursor protein via interaction with adaptors GGA and PACS-1. *J Biol Chem*.

- Selkoe, D. J. (1989). The deposition of amyloid proteins in the aging mammalian brain: implications for Alzheimer's disease. *Ann Med* 21, 73-76.
- 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. (2001a). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766.
- Selkoe, D. J. (2001b). Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* 32, 177-180.
- 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.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., and et al. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359, 325-327.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., and et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.
- Shestakova, A., Zolov, S., and Lupashin, V. (2006). COG complex-mediated recycling of Golgi glycosyltransferases is essential for normal protein glycosylation. *Traffic* 7, 191-204.
- Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59, 223-239.
- 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.
- Silberstein, S., and Gilmore, R. (1996). Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *Faseb J* 10, 849-858.
- Simons, M., Ikonen, E., Tienari, P. J., Cid-Arregui, A., Monning, U., Beyreuther, K., and Dotti, C. G. (1995). Intracellular routing of human amyloid protein precursor: axonal delivery followed by transport to the dendrites. *J Neurosci Res* 41, 121-128.
- 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.
- Sisodia, S. S., Koo, E. H., Hoffman, P. N., Perry, G., and Price, D. L. (1993). Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci* 13, 3136-3142.
- Sisodia, S. S., and St George-Hyslop, P. H. (2002). gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci* 3, 281-290.
- Sitia, R., and Braakman, I. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426, 891-894.
- 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.

- Skrincosky, D., Kain, R., El-Battari, A., Exner, M., Kerjaschki, D., and Fukuda, M. (1997). Altered Golgi localization of core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase leads to decreased synthesis of branched O-glycans. *J Biol Chem* 272, 22695-22702.
- Smith, C., and Anderton, B. H. (1994). Dorothy Russell Memorial Lecture. The molecular pathology of Alzheimer's disease: are we any closer to understanding the neurodegenerative process? *Neuropathol Appl Neurobiol* 20, 322-338.
- Smith, R. P., Higuchi, D. A., and Broze, G. J., Jr. (1990). Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* 248, 1126-1128.
- Soriano, S., Chyung, A. S., Chen, X., Stokin, G. B., Lee, V. M., and Koo, E. H. (1999). Expression of beta-amyloid precursor protein-CD3gamma chimeras to demonstrate the selective generation of amyloid beta(1-40) and amyloid beta(1-42) peptides within secretory and endocytic compartments. *J Biol Chem* 274, 32295-32300.
- Spiegel, 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.
- Stahl, N., Borchelt, D. R., and Prusiner, S. B. (1990). Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochemistry* 29, 5405-5412.
- Steger, G. (2003). *Bioinformatik Methoden zur Vorhersage von RNA- und Proteinstrukturen*. Birkhäuser Verlag, 222-223
241-245.
- 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.
- Stimson, E., Hope, J., Chong, A., and Burlingame, A. L. (1999). Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry* 38, 4885-4895.
- Storey, E., Beyreuther, K., and Masters, C. L. (1996). Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components. *Brain Res* 735, 217-231.
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., and Roses, A. D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1977-1981.
- Tanzi, R. E., Bird, E. D., Latt, S. A., and Neve, R. L. (1987a). The amyloid beta protein gene is not duplicated in brains from patients with Alzheimer's disease. *Science* 238, 666-669.
- 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. (1987b). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880-884.
- Tanzi, R. E., Kovacs, D. M., Kim, T. W., Moir, R. D., Guenette, S. Y., and Wasco, W. (1996). The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 3, 159-168.

- Tanzi, R. E., McClatchey, A. I., Lamperti, E. D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J. F., and Neve, R. L. (1988). Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* *331*, 528-530.
- Taraboulos, A., Rogers, M., Borchelt, D. R., McKinley, M. P., Scott, M., Serban, D., and Prusiner, S. B. (1990). Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagine-linked glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 8262-8266.
- Tarentino, A. L., Gomez, C. M., and Plummer, T. H., Jr. (1985). Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry* *24*, 4665-4671.
- Tarentino, A. L., and Plummer, T. H., Jr. (1994). Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enzymol* *230*, 44-57.
- Tarentino, A. L., Plummer, T. H., Jr., and Maley, F. (1974). The release of intact oligosaccharides from specific glycoproteins by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J Biol Chem* *249*, 818-824.
- Thinakaran, G., Teplow, D. B., Siman, R., Greenberg, B., and Sisodia, S. S. (1996). Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the "beta-secretase" site occurs in the golgi apparatus. *J Biol Chem* *271*, 9390-9397.
- Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (1994). Phosphorylation of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease and Lewy body dementias. *Ann N Y Acad Sci* *747*, 92-109.
- Ungar, D., Oka, T., Krieger, M., and Hughson, F. M. (2006). Retrograde transport on the COG railway. *Trends Cell Biol* *16*, 113-120.
- Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* *3*, 97-130.
- 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 Braunmuhl, A. (1952). [Focal paralysis with Alzheimer's change of fibrilles and primitive plaques.]. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr* *188*, 209-217.
- 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.
- Wang, P., Yang, G., Mosier, D. R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y. D., Zhao, N. M., Dominguez, B., Lee, K. F., Gan, W. B., and Zheng, H. (2005). Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci* *25*, 1219-1225.
- Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S. E., and Sisodia, S. S. (1996). The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *J Biol Chem* *271*, 31894-31902.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E., and Solomon, F. (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 10758-10762.
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M. D., Romano, D. M., Sisodia, S. S., Hyman, B. T., Neve, R. L., and Tanzi, R. E. (1993). Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* *5*, 95-100.

- Weidemann, A., König, 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.
- Winklhofer, K. F., Heller, U., Reintjes, A., and Tatzelt, J. (2003). Inhibition of complex glycosylation increases the formation of PrP^{Sc}. *Traffic* 4, 313-322.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Moore, C. L., Leatherwood, D. D., Ostaszewski, B., Rahmati, T., Donkor, I. O., and Selkoe, D. J. (1999). Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry* 38, 4720-4727.
- Yamazaki, T., Selkoe, D. J., and Koo, E. H. (1995). Trafficking of cell surface beta-amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons. *J Cell Biol* 129, 431-442.
- 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.
- Yazaki, M., Tagawa, K., Maruyama, K., Sorimachi, H., Tsuchiya, T., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1996). Mutation of potential N-linked glycosylation sites in the Alzheimer's disease amyloid precursor protein (APP). *Neurosci Lett* 221, 57-60.
- Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H., and Sakaki, Y. (1990). Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87, 257-263.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Sirinathsinghji, D. J., Hopkins, R., Smith, D. W., Heavens, R. P., Dawson, G. R., Boyce, S., Conner, M. W., *et al.* (1995). beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525-531.
- Zhong, Z., Higaki, J., Murakami, K., Wang, Y., Catalano, R., Quon, D., and Cordell, B. (1994). Secretion of beta-amyloid precursor protein involves multiple cleavage sites. *J Biol Chem* 269, 627-632.
- Zimmermann, P. (2006). PDZ domain-phosphoinositide interactions in cell-signaling. *Verh K Acad Geneesk Belg* 68, 271-286.
- Zolov, S. N., and Lupashin, V. V. (2005). Cog3p depletion blocks vesicle-mediated Golgi retrograde trafficking in HeLa cells. *J Cell Biol* 168, 747-759.

Danksagung

mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christian Haass, zum Einen für die Möglichkeit, diese Arbeit in einem perfekt ausgestatteten Labor und tollen Umfeld durchzuführen und zum Anderen für seine ansteckende Forschungs-Begeisterung.

Herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Elisabeth Weiß für die freundliche Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

In besonderem Maße danke ich meinem Betreuer Dr. Stefan Lichtenthaler für die wertvolle Hilfestellung in experimentellen Fragen, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und die Zeit, die er stets hatte.

Den Mitgliedern des Lichtenthaler-Labors danke ich für die schöne Zeit und den Spaß, den wir miteinander hatten. Stefanie Neuman für ihre tolle Freundschaft, Stefan Mitterreiter für die lustigen Freitage und seine Hilfsbereitschaft, Katrin Moschke für Ihre Geduld mit meinem Temperament, sowie Bastian Dislich, Susanne Schoebel, Richard Page, Peer-Hendrik Kuhn und Anna Münch für eine nette und witzige Arbeitsatmosphäre.

Den Kollegen aus dem Haass-Labor möchte ich für die Hilfsbereitschaft und die anregenden Diskussionen danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne die weder mein Studium, noch die Promotion möglich gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt Peter.

Lebenslauf

Dipl. biol. Sylvia Fischer
Siegesstr. 18
80802 München

tel: 089/52350011
mobil: 0160/7913124
mail: syfi@gmx.de

Persönliche Daten

geboren am: 18.04.1977 Staatsangehörigkeit: Deutsch
in: München

Ausbildung

- 06/2004 – 01/2008 Promotionsstudium am Adolf-Butenandt-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München, Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie, Abteilung Prof. Dr. Christian Haass
Betreuer: Dr. Stefan Lichtenthaler
(Thema: Charakterisierung eines Proteins und seines Einflusses auf die Alzheimer-Krankheit)
- 11/1997 – 06/2003 Studium der Biologie an der LMU München, Gesamtnote 1,1
Hauptfach: Humangenetik, Nebenfächer: Immunologie, Biochemie, Molekulare Zellbiologie, Zusatzfach: Genetik
(Thema der Diplomarbeit: „Suche nach Signalpeptiden in *Hydra vulgaris*“, unter der Leitung von Prof. Dr. Charles N. David)
- 09/1995 – 06/1997 Besuch des Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gymnasiums Neubiberg und des St.-Anna-Gymnasiums, München
Leistungskurse: Biologie, Physik, Abiturschnitt 2,5

Berufserfahrung

- 02/2004 – 05/2004 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Adolf-Butenandt-Institut, LMU München, Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie, Abteilung Prof. Dr. Christian Haass,
Betreuerin: Dr. Bettina Schmid
(Thema: Lokalisierung des Alzheimer-Schlüsselproteins APP in *danio rerio*)

04/2001 – 12/2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Department für
Ophtalmologie, LMU München
Prof. Dr. Gerhild Wildner
(Thema: Erforschung der Autoimmunerkrankung Uveitis)

Publikationen/Vorträge

bis heute zwei weitere Publikationen als Erstautor, sowie als Co-Autor in
Vorbereitung

09/2006 Böttger A, Strasser O, Alexandrova O, Levin A, **Fischer S**, Lasi
M, Rudd S, David CN (2006), Genetic screen for signal peptides
in Hydra reveals novel secreted proteins and evidence for non-
classical protein secretion, Eur J Cell Biol, 85, 1107-17

07/2006 Neumann S, Schöbel S, **Fischer S**, Lichtenthaler SF (2006),
Expression Cloning Screen Identifies Novel Proteins
Modulating APP Shedding, Alzheimer's Disease: New
Advances, Medimond, 183-189

07/2006 Posterpräsentation auf dem ICAD (International Conference on
Alzheimer's Disease)-Meeting in Madrid

10/2004 Alexopoulos H, Böttger A, **Fischer S**, Levin A, Wolf A,
Fujisawa T, Hayakawa S, Gojobori T, Davies J, David C, Bacon
J (2004), Evolution of gap junctions: the missing link?, Current
Biology, 14, 879-880

06/2002 Wildner G, Diedrichs-Moehring M, **Fischer S**, Mourad A
(2002), A Peptide from Rotavirus is Uveitogenic in Lewis Rats
and Immunogenic in Uveitis Patients, Invest Ophthalmol Vis
Sci, 43