

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität

München

Lehrstuhl: Stoffwechselbiochemie

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Christian Haass

# **ZELLULÄRE MODULATOREN DER EKTODOMÄNENSPALTUNG VON APP**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von

Anna Münch

aus

Altötting

2012

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer: Priv.-Doz. Dr. Stefan Lichtenthaler

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. Christian Ries

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2012

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation „Zelluläre Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP“ von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Ich habe mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Hilfen und Quellen bedient.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat auch noch keinen anderen Prüfungszwecken gedient.

Anna Münch

## ZELLULÄRE MODULATOREN DER EKTODOMÄNENSPALTUNG VON APP

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Alzheimer-Krankheit</b> .....	<b>8</b>
1.1.1	Beschreibung der Alzheimer-Krankheit .....	8
1.1.2	Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese .....	10
1.1.3	Therapeutische Ansätze zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit .....	12
<b>1.2</b>	<b>Molekulare Grundlagen der Alzheimer-Krankheit</b> .....	<b>13</b>
1.2.1	Das Amyloid-Vorläuferprotein („Amyloid Precursor Protein“, APP) .....	13
1.2.1.1	Allgemeine Beschreibung von APP .....	13
1.2.1.2	Funktion von APP .....	14
1.2.1.3	Proteolytische Prozessierung von APP .....	15
1.2.2	Die Sekretasen .....	17
1.2.2.1	Die $\alpha$ -Sekretase .....	17
1.2.2.2	Die $\beta$ -Sekretase .....	18
1.2.2.3	Die $\gamma$ -Sekretase .....	18
1.2.3	Regulation der Prozessierung von APP .....	19
1.2.3.1	Regulation der Aktivität der APP-Sekretasen .....	19
1.2.3.2	Der intrazelluläre Transport von APP .....	21
<b>1.3</b>	<b>Das RNA-Interferenz Prinzip</b> .....	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>TMEM59 ist ein neuartiger Modulator der Ektodomänenspaltung von APP</b> .....	<b>32</b>
3.1.1	Identifizierung von TMEM59 .....	32
3.1.2	TMEM59 und TMEM59L modulieren die Ektodomänenspaltung und die Maturierung von APP .....	32
3.1.3	TMEM59 moduliert die Maturierung und die Ektodomänenspaltung von endogenem APP .....	34
3.1.4	TMEM59 moduliert die Maturierung von endogenem Nicastrin .....	36
3.1.5	TMEM59 ist in allen Golgi-Subkompartimenten vorhanden .....	36
3.1.6	TMEM59 hat keinen Einfluss auf die Aktivität der Sekretasen .....	39
3.1.7	TMEM59 verändert den APP-Transport .....	41
3.1.8	Auch der Doppel-„Knockdown“ von TMEM59 und TMEM59L verändert die Ektodomänenspaltung von APP .....	42
<b>3.2</b>	<b>Genomweites RNAi-„Screening“ zur Identifizierung neuer zellulärer Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP</b> .....	<b>46</b>
3.2.1	Etablierung eines Drosophila-„Screenings“ .....	46
3.2.1.1	Etablierung einer Drosophila-Reporterzelllinie .....	46
3.2.1.2	Etablierung eines „Screening“-Verfahrens in Drosophila-S2-Zellen .....	48
3.2.2	Auswertung und Resultate des genomweiten Drosophila RNAi-„Screenings“ .....	50
3.2.3	Identifizierung orthologer humaner Gene zu den Kandidatengenen aus dem Drosophila RNAi-„Screening“ .....	54
3.2.4	Etablierung eines „Screening“-Verfahrens in humanen SH-SY5Y-Zellen .....	55
3.2.5	Untersuchung der humanen orthologen Gene mit Dharmacon siRNA-Pools .....	58
3.2.6	Untersuchung der humanen orthologen Gene mit Qiagen siRNA-Pools .....	60

3.2.7	Untersuchung der humanen orthologen Gene mit einzelnen siRNA-Sequenzen .....	62
3.2.8	Untersuchung der ESCRT-Maschinerie in RNAi-Studien zur Validierung von VPS24 als Modulator der APP-Ektodomänenspaltung.....	65
3.2.9	Weitere Validierung von VPS24 als Modulator der APP-Ektodomänenspaltung durch stabilen „Knockdown“ mittels shRNAs.....	68
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>TMEM59 ist ein neuartiger Modulator der Ektodomänenspaltung von APP.....</b>	<b>71</b>
4.1.1	TMEM59 inhibiert die Ektodomänenspaltung von APP .....	71
4.1.2	Mechanismen von TMEM59 in der Ektodomänenspaltung von APP .....	73
4.1.2.1	TMEM59 hat keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der APP-Sekretasen .....	73
4.1.2.2	TMEM59 inhibiert den intrazellulären Transport von APP .....	74
<b>4.2</b>	<b>Erfolg und Limitationen des genomweiten RNAi-„Screenings“ zur Identifizierung neuartiger Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP .....</b>	<b>76</b>
4.2.1	Identifizierung neuer zellulärer Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP .....	76
4.2.2	Genomweite RNAi-„Screenings“ in Drosophila-Zellen zur Untersuchung humaner Genfunktionen.....	77
4.2.3	Strategie zur Validierung von potentiellen Kandidatengen in humanen Zellen.....	80
<b>4.3</b>	<b>Die ESCRT-Maschinerie moduliert die Ektodomänenspaltung von APP .....</b>	<b>85</b>
4.3.1	Aufbau und zelluläre Funktionen der ESCRT-Maschinerie .....	85
4.3.2	Potentielle Mechanismen der ESCRT-Maschinerie in der Ektodomänenspaltung von APP .....	89
4.3.2.1	Die ESCRT-Maschinerie könnte die Endozytose von BACE1 modulieren .....	89
4.3.2.2	Die ESCRT-Maschinerie könnte die Sekretion von APPs $\beta$ und A $\beta$ regulieren .....	91
4.3.2.3	Die ESCRT-Maschinerie könnte indirekt die $\beta$ -Sekretase-Spaltung von APP modulieren.....	93
<b>5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>103</b>
<b>8.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>103</b>
8.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	103
8.1.1.1	Allgemein .....	103
8.1.1.2	Molekularbiologische Methoden .....	103
8.1.1.3	Zellkultur .....	104
8.1.1.4	Zelluläre Untersuchungen (Assays).....	104
8.1.1.5	Proteinbiochemische Methoden.....	104
8.1.2	Enzyme, Versuchssysteme (Kits) und Chemikalien .....	105
8.1.2.1	Allgemein .....	105
8.1.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	105
8.1.2.3	Zellkultur .....	106
8.1.2.4	Zelluläre Untersuchungen (Assays).....	106
8.1.2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	106
8.1.3	Puffer und Medien .....	107
8.1.4	Antikörper .....	111
8.1.5	Plasmide.....	112
8.1.6	siRNAs.....	113

---

8.1.7	shRNAs.....	118
8.1.8	Oligonukleotide für die qRT-PCR.....	119
<b>8.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>120</b>
8.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	120
8.2.1.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	120
8.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	120
8.2.1.3	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	120
8.2.1.4	Klonierung von „short hairpin RNAs“ (shRNAs).....	120
8.2.1.5	Ligation von DNA.....	121
8.2.1.6	Herstellen des kompetenten E. coli-Stammes DH5 $\alpha$ .....	121
8.2.1.7	Transformation von DNA-Konstrukten in kompetente E. coli DH5 $\alpha$ .....	122
8.2.1.8	Präparation von Plasmid-DNA (Mini- und Midi-Präp).....	122
8.2.1.9	Sequenzierung von DNA-Konstrukten.....	122
8.2.1.10	Isolierung zellulärer RNA.....	123
8.2.1.11	Reverse Transkription von RNA.....	123
8.2.1.12	„Quantitative real time PCR“ nach dem „TaqMan“-Verfahren.....	123
8.2.1.13	„Quantitative real time PCR“ nach der „SYBR Green“-Methode.....	124
8.2.2	Zellkultur.....	125
8.2.2.1	Verwendete Zelllinien.....	125
8.2.2.2	Kultivierung von Zellen.....	125
8.2.2.3	Beschichtung von Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin.....	126
8.2.2.4	Aussäen von Zellen.....	126
8.2.2.5	Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung).....	126
8.2.3	Zelluläre Untersuchungen (Assays).....	126
8.2.3.1	Immunofluoreszenzmikroskopie.....	126
8.2.3.2	Lebend-Zell-Aufnahmen.....	127
8.2.3.3	Transiente Überexpression von rekombinanter DNA.....	127
8.2.3.4	Transienter Doppel-„Knockdown“ von TMEM59 und TMEM59L.....	128
8.2.4	RNAi-basierte „Screenings“ in unterschiedlichen zellulären Systemen.....	129
8.2.4.1	RNAi „Screening“ in Drosophila-Schneider 2 (S2)-Zellen.....	129
8.2.4.2	RNAi-Studien von potentiellen Kandidatengenen in SH-SY5Y-Zellen.....	130
8.2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	132
8.2.5.1	Herstellung von Zelllysaten.....	132
8.2.5.2	Präparation von zellulären Membranen.....	133
8.2.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA-Verfahrens.....	133
8.2.5.4	Immunopräzipitation von Proteinen.....	133
8.2.5.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	134
8.2.5.6	Tris-Tricin-Gelelektrophorese.....	135
8.2.5.7	Western Blot.....	135
8.2.5.8	Western Blot-Protokoll zum Nachweis von A $\beta$ .....	136
8.2.5.9	Nachweis der sekretierten APP-Spezies APP $\alpha$ , APP $\beta$ und A $\beta$ .....	137
8.2.5.10	Messung von HRP-APP-Signalen in konditioniertem Medium.....	138
8.2.5.11	Messung der „Gaussia luciferase“-Aktivität in konditioniertem Medium.....	139
8.2.5.12	Messung der „Firefly luciferase“-Aktivität in Drosophila S2-Zellen.....	139
8.2.5.13	Nachweismethoden der Sekretase-Aktivitäten.....	139
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>142</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>157</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>158</b>
<b>12</b>	<b>Publikation.....</b>	<b>160</b>

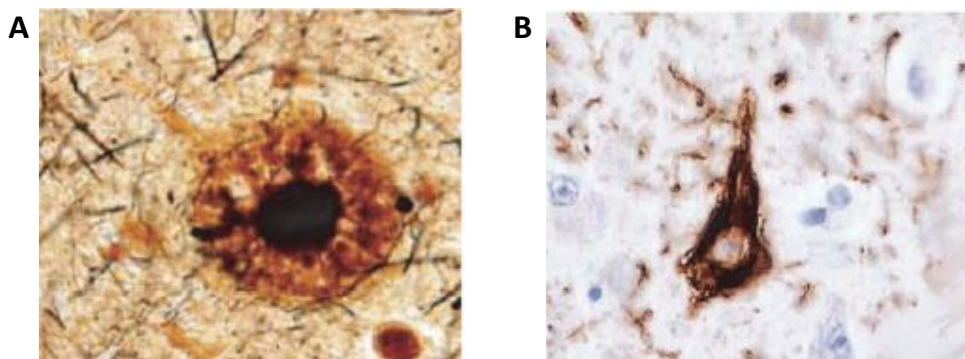
# 1 Einleitung

## 1.1 Die Alzheimer-Krankheit

### 1.1.1 Beschreibung der Alzheimer-Krankheit

Vor gut hundert Jahren beschrieb Alois Alzheimer die nach ihm benannte Alzheimer-Demenz. In seinem Artikel „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ berichtete Alzheimer von dem Fall seiner 51-jährigen Patientin Auguste D., die unter zeitlicher und räumlicher Desorientierung, Wahrnehmungsstörungen, emotionaler Instabilität und einem rasch voranschreitenden Gedächtnisverlust litt. Bei Untersuchung des Gehirns der verstorbenen Patientin konnte Alzheimer die titelgebende Atrophie und weitere histopathologische Veränderungen feststellen (Alzheimer, 1907). Diese damals neuartige Erkrankung gilt heute als die häufigste Form der Demenz (Selkoe, 2001). Allein in Deutschland gibt es derzeit ca. 1,3 Millionen Patienten (<http://www.wegweiser-demenz.de/informationen.html>) und weltweit geht man von schätzungsweise 35 Millionen Betroffenen aus (<http://www.alzheimer-forschung.de/presse/index.htm?showid=3493>). Als größter Risikofaktor für die Alzheimer-Krankheit gilt das Altern. Unter Einbeziehung der steigenden Lebenserwartung und der demographischen Entwicklung wird prognostiziert davon ausgegangen, dass bereits 2050 weltweit 115,4 Millionen Alzheimer-Patienten zu erwarten sind (<http://www.alzheimer-forschung.de/alzheimer-krankheit/index.htm>).

Das wichtigste makroskopische Merkmal ist die bereits von Alois Alzheimer beschriebene Atrophie des Gehirns. Diese lässt sich in Form eines deutlichen Gewichtsverlustes des durchschnittlichen adulten Gehirns von ca. 1300 bis 1700 g auf ca. 800 bis 1000 g erkennen (Sánchez et al., 2011). Die wichtigsten mikroskopischen, histopathologischen Veränderungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten sind das Auftreten von amyloiden Ablagerungen („Plaques“) und neurofibrillären Bündeln („neurofibrillary tangles“) (Ballard et al., 2011). Diese sind meist in den Gehirnregionen des Neokortex und des Hippokampus sowie im limbischen System zu finden (Braak et al., 1996). Diese histopathologischen Veränderungen, die bereits von Alois Alzheimer beschrieben werden konnten, dienen bis heute der eindeutigen Diagnose der Alzheimer-Krankheit, die nur post mortem möglich ist (Thorsett & Latimer, 2000). Mikroskopische Aufnahmen der beiden Hauptmerkmale sind in Abbildung 1 zu finden.



**Abbildung 1: Typische histopathologische Veränderungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten.** Mikroskopische Aufnahmen von Silberfärbungen von A) einer typischen amyloiden Ablagerung, die in diesem Stadium als neuritisches „Plaques“ bezeichnet wird, und B) intrazellulären neurofibrillären Bündeln („neurofibrillary tangles“) (Sánchez et al., 2011).

Die extrazellulären amyloiden Ablagerungen weisen einen Durchmesser von 20 bis 100  $\mu\text{m}$  auf und bestehen hauptsächlich aus Amyloid- $\beta$  ( $\text{A}\beta$ ). Dabei bildet  $\text{A}\beta$  Fibrillen, die eine schwer lösliche  $\beta$ -Faltblatt-Struktur besitzen, aus. Interessanterweise lassen sich in den Plaques unterschiedlich lange Formen dieses Amyloid- $\beta$  finden: Zumeist besitzt  $\text{A}\beta$  eine Länge von 42 Aminosäuren (Jarrett et al., 1993; Lansbury, 1997); es konnten aber auch  $\text{A}\beta$  40 und darüber hinaus weitere N- und C-terminal verkürzte oder verlängerte Formen des  $\text{A}\beta$ -Peptids nachgewiesen werden (Glennner et al., 1984; Masters et al., 1985). Je nach dem mikroskopischen Erscheinungsbild werden die „Plaques“ als diffus bis neuritisch bezeichnet, um die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der amyloiden Ablagerungen umschreiben zu können. Diffuse Ablagerungen zeichnen sich durch eine relativ „lockere“ Akkumulation von  $\text{A}\beta$  aus, ohne dass dabei feste Grenzen beobachtet werden können (Sánchez et al., 2011). Diese diffusen Ablagerungen wurden auch in Gehirnen von älteren Menschen ohne Alzheimer-Krankheit nachgewiesen (Hardy & Selkoe, 2002). Bilden sich die diffusen Ablagerungen weiter aus und beginnen sie feste Grenzen und einen festen Kern auszubilden, so spricht man von neuritischen „Plaques“ (vergleiche Abbildung 1A). Dieser feste Kern wird im Besonderen durch seine Umgebung, in der degenerierte Axone und Dendriten (Braak et al., 1996) sowie aktivierte Mikrogliazellen und Astrozyten (Pike et al., 1994) zu finden sind, charakterisiert.

Die neurofibrillären Bündel, die in den Neuronen von Alzheimer-Patienten gefunden werden können, bestehen hauptsächlich aus dem Protein Tau, welches in Form von gepaarten helikalen Filamenten aggregiert (Terry et al., 1964). Die physiologische Funktion des Tau-Proteins ist die Stabilisierung der axonalen Mikrotubuli (Friedhoff et al., 2000). Unter

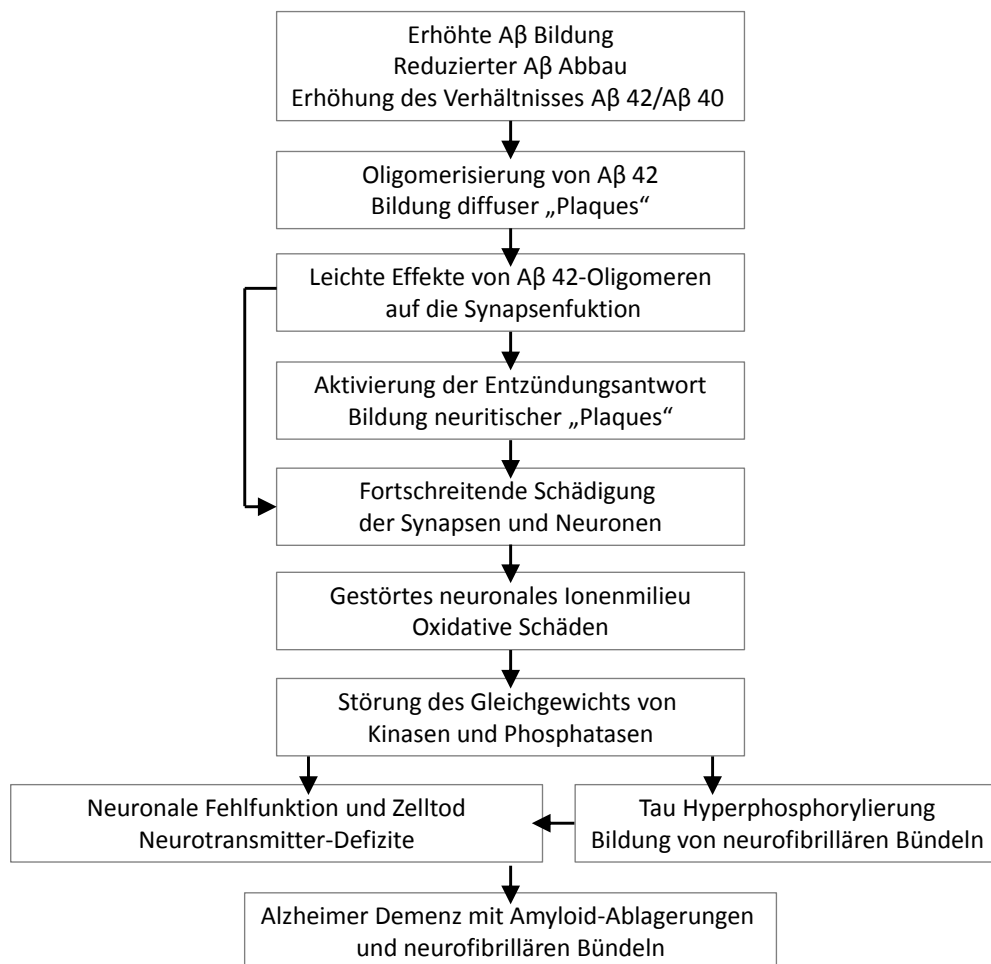


pathologischen Bedingungen wird das Tau-Protein hyperphosphoryliert (Grundke-Iqbal et al., 1986) und aggregiert. Die Hyperphosphorylierung des Proteins ist wiederum durch eine Störung des Gleichgewichts verschiedener Kinasen und Phosphatasen bedingt (Mandelkow & Mandelkow, 1998). Diese neurofibrillären Bündel sind jedoch nicht spezifisch für die Alzheimer-Krankheit, da sie auch im Zusammenhang mit anderen neurodegenerativen Krankheitsbildern bekannt sind. Diese werden oft als Tauopathien, deren einheitliches Merkmal die Ansammlung des Tau-Proteins im Gehirn ist, zusammengefasst. Ein Beispiel hierfür ist eine weitere Demenz, die sogenannte Frontotemporale Demenz (Morris et al., 2001).

### 1.1.2 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Einige Jahrzehnte nach der initialen Beschreibung durch Alois Alzheimer wurden erstaunlicherweise auch in jungen, erwachsenen Down-Syndrom-Patienten (Trisomie 21) die Merkmale der Alzheimer-Krankheit festgestellt: amyloide Ablagerungen und neurofibrilläre Bündel (Schochet et al., 1973). Dies führte zu weiteren wichtigen Fortschritten: Zum einen konnte so erstmals das A $\beta$ -Peptid als Hauptbestandteil der amyloiden Ablagerungen identifiziert werden (Glennier & Wong, 1984). Zum anderen konnte aus der A $\beta$ -Peptid-Sequenz folgend die Klonierung des „Amyloid  $\beta$  Vorläuferprotein“-Gens („Amyloid  $\beta$  precursor protein“, APP), codiert auf Chromosom 21, bewerkstelligt werden (Korenberg et al., 1989). Diese Fortschritte führten zur Identifizierung von zahlreichen Alzheimer-auslösenden Mutationen im APP-Gen (Kowalska, 2003) und weiteren assoziierten Genen (Bertram & Tanzi, 2008). Dieses neue, stetig zunehmende Wissen führte zur Formulierung der sogenannten Amyloid-Kaskaden-Hypothese mit folgenden Annahmen (Hardy & Higgins, 1992): durch proteolytische Spaltung von APP wird das A $\beta$ -Peptid gebildet, welches durch Akkumulation eine komplexe Kaskade von Reaktionen hervorruft, die letztendlich in den Alzheimer-typischen Symptomen sichtbar werden. Im Speziellen wird hierbei davon ausgegangen, dass auf Grund von Mutationen oder anderer Risikofaktoren die Produktion von A $\beta$  erhöht und zeitgleich der Abbau vermindert wird. Dabei wird auch hypothetisiert, dass sich das Verhältnis von A $\beta$  42/A $\beta$  40 zu Gunsten der längeren Spezies verschiebt. Das um zwei Aminosäuren längere A $\beta$  42 neigt auf Grund seiner erhöhten Hydrophobizität stärker zur Aggregation und bildet rasch Oligomere (Selkoe, 1999). Diese können direkt toxische Reaktionen vermitteln und die Synapsen-Funktion beeinträchtigen oder indirekt als

Aggregationskeim für weitere A $\beta$ -Spezies dienen und somit weitere synaptische oder neuronale Schäden verursachen oder auch zur Ausbildung neuritischer Plaques beitragen. Die Summe diese Ereignisse führt zur Aktivierung von Astrozyten, Mirkogliazellen und der Entzündungsantwort. Daraus resultierende Veränderungen des intrazellulären Milieus führen zu einer Störung des Gleichgewichts von unterschiedlichen Kinasen und Phosphatasen, was zur Entstehung von neurofibrillären Bündeln führt. Am Ende der Kaskade stehen der vielfache Funktionsverlust und das Absterben von Neuronen, was letztlich zu den Demenz-typischen kognitiven Defiziten und den assoziierten Symptomen führt (Hardy & Selkoe, 2002). Diese Annahmen sind schematisch in untenstehender Abbildung 2 zusammengefasst.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese.**

Gezeigt sind die Schritte von der vermehrten A $\beta$ -Produktion bis hin zum neuronalen Absterben und der Entwicklung der Alzheimer-Demenz. (Abbildung modifiziert nach Hardy & Selkoe, 2002).

### 1.1.3 Therapeutische Ansätze zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese schlägt daher vor, dass eine Verringerung der A $\beta$ -Menge die Verlangsamung des Krankheitsverlaufs bewirkt. Auf Grund dieser Annahme wurden zahlreiche Therapiestrategien zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit entwickelt, die den A $\beta$ -Metabolismus modulieren wollen. Die Hauptansätze sind dabei die Verminderung der A $\beta$ -Produktion, die Förderung des Abbaus oder die Verhinderung der Aggregation dieser Peptide (Karran et al., 2011).

Zur Verminderung der A $\beta$ -Produktion wird derzeit versucht Inhibitoren der Enzyme, die das A $\beta$ -Peptid aus seinem Vorläuferprotein APP freisetzen, zu entwickeln. Für Inhibitoren der  $\beta$ -Sekretase gestaltet sich die Suche schwierig, da diese ein sehr großes aktives Zentrum besitzt und so nur schwer niedermolekulare Stoffe gefunden werden können, die aktiv, aber auch in der Lage sind, die Blut-Hirnschranke zu überwinden (Hong et al., 2000; Vassar, 2002). Für die Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase konnten bereits einige effiziente Substanzen gefunden werden, die allerdings auf Grund des breiten Substratspektrums der  $\gamma$ -Sekretase mit vielen Nebenwirkungen verbunden sind (Behr & Graham, 2005). Somit wird die  $\beta$ -Sekretase als besseres therapeutisches Ziel gesehen, da BACE1 „Knockout“-Mäuse lebensfähig sind und keinen offensichtlichen Phänotyp zeigen (Cai et al., 2001; Y. Luo et al., 2001).

Um den Abbau des produzierten A $\beta$ -Peptids zu verstärken oder dessen Oligomerisierung und weitere Aggregation zu verhindern, wurden aktive und passive Immunisierungen gegen A $\beta$  entwickelt, um den Abbau von A $\beta$ -Strukturen durch Mikrogliazellen zu fördern (Bard et al., 2000; Schenk et al., 1999). Dieser Ansatz führte zu vielversprechenden Ergebnissen im Mausmodell, musste jedoch in Patientenstudien beendet werden, da zu viele Probanden eine transiente Entzündungsreaktion im zentralen Nervensystem zeigten (Hardy & Selkoe, 2002).

Derzeit angewandte Therapieansätze konzentrieren sich daher auf die Milderung der Symptome der Alzheimer-Demenz. So werden Alzheimer-Patienten heute meist Acetylcholinesterase-Hemmer (Donepezil oder Galantamine) oder NMDA-Rezeptor-Antagonisten (Memanatine) verabreicht. Beide Medikamente versuchen auf unterschiedlichen Wegen, dem Ungleichgewicht von Neurotransmittern im Gehirn, bedingt durch die Dysfunktion oder auch das Absterben von Neuronen, entgegenzuwirken (Herrmann et al., 2011).

## **1.2 Molekulare Grundlagen der Alzheimer-Krankheit**

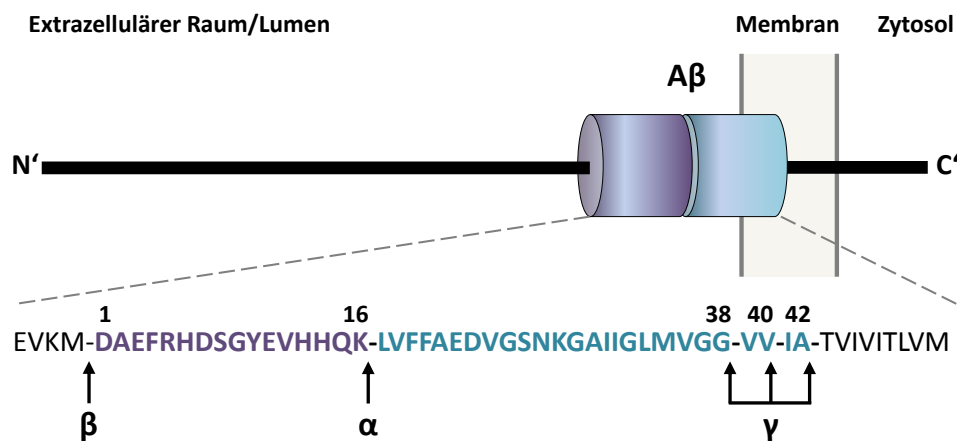
Nach Erläuterung der wichtigsten pathologischen Merkmale und der weitverbreiteten Amyloid-Kaskaden-Hypothese sollen nun die molekularen Grundlagen der Alzheimer-Krankheit dargestellt werden.

### **1.2.1 Das Amyloid-Vorläuferprotein („Amyloid Precursor Protein“, APP)**

Wie bereits erwähnt, führten die Entdeckung des A $\beta$ -Peptids als Hauptbestandteil der Amyloid-Ablagerungen und dessen Sequenzierung zur Identifizierung des „Amyloid  $\beta$ -Vorläuferprotein“-Gens („Amyloid  $\beta$  precursor protein“, APP) (Korenberg et al., 1989). Dieses Gen codiert für APP, aus dem das A $\beta$ -Peptid durch proteolytische Spaltung freigesetzt wird.

#### **1.2.1.1 Allgemeine Beschreibung von APP**

Das APP-Gen besteht aus 19 Exons (ca. 3600 Basenpaare) und wird ubiquitär in allen Geweben exprimiert (Tanzi et al., 1987). Aus dem APP-Gen werden durch alternatives Spleißen drei unterschiedliche mRNAs gebildet, die für die drei charakteristischen APP-Isoformen codieren: APP695, APP751 und APP770. Die Proteine unterscheiden sich in ihrer Länge, was durch die Anzahl der Aminosäuren angegeben wird (Sandbrink et al., 1994; Selkoe, 1994). Die Isoformen unterscheiden sich im Weiteren durch ihre spezifische Expression, so wird das APP695 vor allem in neuronalen Geweben exprimiert, wohingegen das APP751 die häufigste Isoform in nicht-neuronalem Gewebe ist (Wertkin et al., 1993). Das APP ist ein typischer Vertreter der Typ-I-Transmembranproteine und besitzt demzufolge eine große N-terminale Ektodomäne, einen Transmembranbereich und eine kurze zytoplasmatische Domäne (Dyrks et al., 1988; Kang et al., 1987). Die A $\beta$ -Peptidsequenz befindet sich an der Grenze zwischen der Ekto- und der Transmembrandomäne. Eine schematische Darstellung von APP findet sich in Abbildung 3.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung von APP.**

Gezeigt sind die Orientierung von APP in der Membran sowie Aβ-Peptidsequenz mit den wichtigsten Sekretase-Schnittstellen. Diese Sequenz ist vergrößert im Einbuchstaben-Code der Aminosäuren gezeigt.

APP ist Bestandteil einer Proteinfamilie, der neben APP auch die APP-ähnlichen Proteine APLP1 und APLP2 („APP-like protein“) angehören (Sprecher et al., 1993; Wasco et al., 1992; Wasco et al., 1993).

### 1.2.1.2 Funktion von APP

Obwohl bis heute schon ein beträchtliches Wissen über APP, dessen Proteolyse und Rolle in der Alzheimer-Krankheit besteht, ist die exakte physiologische Funktion von APP noch immer ungeklärt (De Strooper & Annaert, 2000).

APP ähnelt in seiner Domänenstruktur und seiner Proteolyse durch verschiedene Sekretasen sehr dem Notch-Rezeptor, weshalb für APP analog eine Rezeptorfunktion postuliert wurde (Annaert & De Strooper, 1999; Kang et al., 1987; Selkoe & Kopan, 2003). Es wäre denkbar, dass die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) ähnlich wie die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NICD) für die Transkriptionsregulation bestimmter Gene verwendet wird (Cao & Sudhof, 2001). Diese Hypothese wird jedoch kontrovers diskutiert (Hebert et al., 2006). Des Weiteren wurden Funktionen der Homo- oder Hetero-Dimerisierung von Mitgliedern der APP-Familie in der synaptischen Plastizität, in der Zelladhäsion und Migration vorgeschlagen (Perez et al., 1997; Qiu et al., 1995; Soba et al., 2005; Weyer et al., 2011).

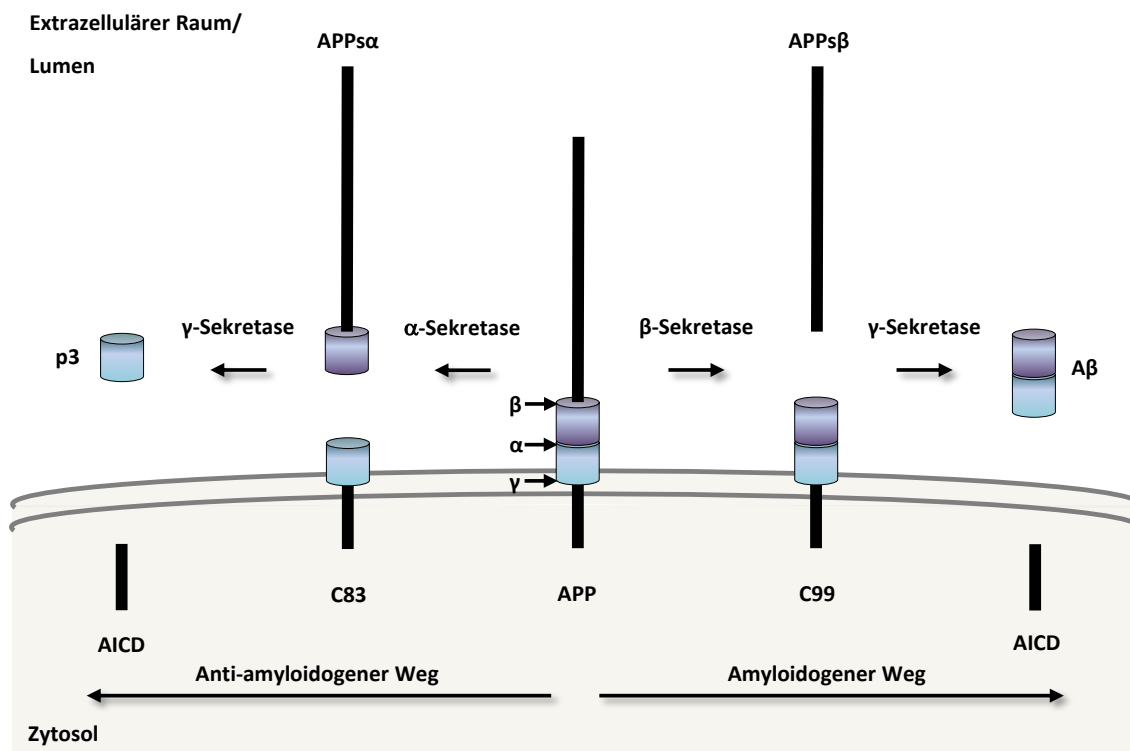
Weitere wichtige Hinweise auf potentielle Funktionen von APP stammen aus sogenannten „Knockout“-Modellen, in denen das APP-Gen durch genetische Methoden inaktiviert wurde.

So konnte mit Untersuchungen des APP-Homologen APL-1 in *C. elegans* eine Funktion von APP in der Entwicklung postuliert werden (Hornsten et al., 2007). In *Drosophila* resultierte die Deletion des APP-homologen Gens APPL in einer verminderten Lebensfähigkeit von Neuronen (Gunawardena & Goldstein, 2001). Auch in Mäusen wurden „Knockout“-Studien der Mitglieder der APP-Familie durchgeführt: Wurden entweder APP oder APLP1 oder APLP2 deletiert, so waren die Mäuse lebensfähig und zeigten nur geringfügige neurologische Veränderungen gegenüber Kontrolltieren. Diese Beobachtungen wurden auch für  $app^{-/-}aplp1^{-/-}$ -Doppel-„Knockout“-Mäuse gemacht (Heber et al., 2000). Dahingegen waren  $app^{-/-}aplp2^{-/-}$ - und  $aplp1^{-/-}aplp2^{-/-}$ -Doppel-„Knockout“ und  $app^{-/-}aplp1^{-/-}aplp2^{-/-}$ -Trippel-„Knockout“-Mäuse nicht lebensfähig und starben kurz nach der Geburt. Die  $app^{-/-}aplp2^{-/-}$ - Doppel-„Knockout“-Mäuse zeigten Defekte in den neuromuskulären Verbindungen auf (P. Wang et al., 2005).  $app^{-/-}aplp1^{-/-}aplp2^{-/-}$ -Trippel-„Knockout“-Mäuse bildeten kortikale Fehlbildungen aus, darunter Lissenzephalie und neuronale Migrationsdefizite (Herms et al., 2004). Diese Befunde lassen auf eine essentielle Funktion von APP und seinen Homologen in der neuronalen und neuromuskulären Integrität und damit in der frühen Entwicklung schließen.

### 1.2.1.3 Proteolytische Prozessierung von APP

Die Generierung des A $\beta$ -Peptids aus APP ist ein zentraler Schritt in der Entstehung der Alzheimer-Krankheit. Dabei wird das A $\beta$ -Peptid durch sequentielle Proteolyse von APP durch zwei unterschiedliche Sekretasen freigesetzt. Eine weitere Sekretase, die ebenfalls an der APP-Proteolyse beteiligt ist, verhindert durch Schnitt in der A $\beta$ -Peptidsequenz die Produktion der aggregierenden Peptide. Da die molekulare Identität dieser Proteasen lange Zeit nicht bekannt war, wurden sie als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase benannt – diese Nomenklatur wurde beibehalten.

Bei der Proteolyse von APP werden zwei Schritte unterschieden: Die initiale Ektodomänenspaltung, die durch die  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretase vermittelt wird, und die nachfolgende Intramembranproteolyse, die von der  $\gamma$ -Sekretase durchgeführt wird. Diese Schritte sind schematisch in Abbildung 4 zusammengefasst.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der proteolytischen Prozessierung von APP.**

Dargestellt sind der anti-amyloidogene Weg und der amyloidogene Weg der Prozessierung von APP durch die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase.

Bei der Ektodomänenspaltung dominiert in nicht-neuronalen Zellen die  $\alpha$ -Sekretase, die APP in die lösliche, große sekretierte Ektodomäne APP $\alpha$  und das membrangebundene, 83 Aminosäuren lange C-terminale Fragment C83 oder CTF $\alpha$  spaltet (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1990). Im Anschluss daran wird das membranständige C83-Fragment weiter durch die  $\gamma$ -Sekretase geschnitten, so dass das lösliche p3-Peptid (Haass et al., 1993b) sowie eine intrazelluläre Domäne (AICD) (Sastre et al., 2001) entstehen. Das p3-Peptid aggregiert im Gegensatz zu A $\beta$  nicht und wird schnell abgebaut. Dieser Weg der Prozessierung von APP wird anti-amyloiden genannt, da die  $\alpha$ -Sekretase in der A $\beta$ -Peptidsequenz schneidet und somit die Produktion der aggregierenden Peptide verhindern kann. Darüber hinaus wurden APP $\alpha$  neuroprotektive und synaptotrophe Funktionen zugeschrieben (Furukawa et al., 1996; Gralle et al., 2009; Meziane et al., 1998; Stein et al., 2004; Thornton et al., 2006). Es konnte zusätzlich sogar gezeigt werden, dass die Phänotypen von APP-„Knockout“-Mäusen durch Expression von APP $\alpha$  deutlich verbessert werden konnten (Ring et al., 2007; Weyer et al., 2011).

Die zweite Protease mit einer Rolle in der Ektodomänenspaltung von APP ist die  $\beta$ -Sekretase, deren Spaltung von APP zur Produktion einer etwas kürzeren, sekretierten Ektodomäne

APPs $\beta$  und eines membrangebundenen, 99 Aminosäuren langen C-terminalen Fragments C99 oder CTF $\beta$  führt (Seubert et al., 1993). Die weitere Spaltung des C99-Fragments übernimmt wiederum die  $\gamma$ -Sekretase, so dass hierbei neben der intrazellulären Domäne (AICD) (Sastre et al., 2001) auch das A $\beta$ -Peptid freigesetzt wird. Durch Unterschiede in der genauen Schnittstelle der  $\gamma$ -Sekretase werden unterschiedlich lange A $\beta$ -Spezies generiert, wobei hier die Peptide A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 dominieren (Haass & Steiner, 2002). Dieser Weg der Prozessierung von APP wird amyloidogen genannt, da die sequentielle Aktivität der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase zur Produktion der pathogenen A $\beta$ -Peptide führt. Interessanterweise scheinen sich die Funktionen von APPs $\alpha$  und APPs $\beta$  recht gegensätzlich zu verhalten, da kürzlich für APPs $\beta$  pro-apoptotische Eigenschaften gefunden werden konnten (Nikolaev et al., 2009).

## 1.2.2 Die Sekretasen

### 1.2.2.1 Die $\alpha$ -Sekretase

Der erste Schritt im anti-amyloidogenen Weg wird von der  $\alpha$ -Sekretase bewerkstelligt, die APP in der A $\beta$ -Sequenz zwischen den Aminosäuren Lysin 16 und Leucin 17 spaltet (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1990) (siehe Abbildung 3 und 4). Die Aktivierung der  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität ist somit eine attraktive, alternative Therapiestrategie (Fahrenholz, 2007), so dass deren Identifizierung zum Gegenstand vieler Studien wurde. Untersuchungen von verschiedenen Protease-Inhibitoren konnten die Suche zunächst auf Zink-Metalloproteasen aus der Familie der ADAMs („A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein“) eingrenzen (Allinson et al., 2003). Nachfolgend wurden auf Grund von Überexpressionsversuchen verschiedener Vertreter dieser Familie als konstitutive  $\alpha$ -Sekretase vorgeschlagen: ADAM10 (Lammich et al., 1999), ADAM17 (Slack et al., 2001) und ADAM9 (Koike et al., 1999). Unser Labor konnte nun erstmals zeigen, dass alleine ADAM10 für die spezifische Spaltung von APP zwischen den Aminosäuren Lysin 16 und Leucin 17 verantwortlich ist. Durch Verwendung Spaltprodukt-spezifischer Antikörper in Kombination mit Depletierung der in Frage kommenden Kandidaten der ADAM-Familie konnte ADAM10 als physiologisch relevante, konstitutive  $\alpha$ -Sekretase von APP in humanen Zelllinien, aber auch in primären Maus-Neuronen identifiziert werden (Kuhn et al., 2010). ADAM10 ist ein glykosyliertes Typ-I-Transmembranprotein (Escrivente et al., 2008a), welches als inaktives Proprotein in der Zelle gebildet wird. Erst nach seiner eigenen proteolytischen Prozessierung



durch Furin oder PC7 (Anders et al., 2001; Lopez-Perez et al., 2001) liegt ADAM10 in seiner enzymatisch aktiven Form vor und vermittelt die  $\alpha$ -Sekretase-spezifische Spaltung von APP in den späten Kompartimenten des sekretorischen Wegs oder an der Plasmamembran (Knops et al., 1992; Sisodia, 1992; Weidemann et al., 1989).

### 1.2.2.2 Die $\beta$ -Sekretase

Im Gegensatz zur  $\alpha$ -Sekretase schneidet die  $\beta$ -Sekretase nicht in der A $\beta$ -Sequenz, sondern exakt am N-Terminus der A $\beta$ -Domäne von APP und beginnt somit den amyloidogenen Weg der Prozessierung von APP (siehe Abbildung 3 und 4). Nach wegweisenden Studien, die die ersten Hinweise auf die Zellbiologie der  $\beta$ -Sekretase gaben (Haass et al., 1995; Koo & Squazzo, 1994), gelang die Klonierung und Charakterisierung der  $\beta$ -Sekretase BACE1 („beta-site APP-cleaving enzyme“) (Vassar et al., 1999). So wurde beschrieben, dass die Überexpression von BACE1 in einer starken Zunahme bzw. die Depletierung von BACE1 in einer deutlichen Abnahme der Produkte, die exakt an der  $\beta$ -Sekretase-spezifischen Stelle am Beginn der A $\beta$ -Sequenz geschnitten wurden, resultierte. Die Identifizierung von BACE1 als  $\beta$ -Sekretase von APP konnte durch mehrere Arbeitsgruppen unter Verwendung unterschiedlicher experimenteller Ansätze bestätigt werden (Hussain et al., 1999; Lin et al., 2000; Sinha et al., 1999; Yan et al., 1999). BACE1 ist ein glykosyliertes Typ-I-Transmembranprotein und Mitglied der Pepsin-Familie der Aspartylproteasen (Hussain et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). BACE1 hat ein pH-Optimum im leicht sauren Bereich bei pH 4,5 (Gruninger-Leitch et al., 2002; Shimizu et al., 2008; Vassar et al., 1999) und schneidet daher sein Substrat APP in zellulären Kompartimenten mit leicht saurem pH wie den frühen endosomalen und den trans-Golgi-Kompartimenten, wo ebenfalls die Produktion der A $\beta$ -Peptide stattfindet (Capell et al., 2000; Gruninger-Leitch et al., 2002; Haass et al., 1993a; Koo & Squazzo, 1994; Vassar et al., 1999).

### 1.2.2.3 Die $\gamma$ -Sekretase

Im Gegensatz zur  $\alpha$ - und zur  $\beta$ -Sekretase schneidet die  $\gamma$ -Sekretase nicht das APP-Holoprotein, sondern nur die C-terminalen Fragmente C83 und C99, die durch die Aktivität der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase entstanden sind. Der Schnitt dieser Fragmente resultiert in der Produktion des p3- bzw. A $\beta$ -Peptids. Die  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität trägt somit sowohl zum anti-amyloidogenen als auch zum amyloidogenen Weg der Prozessierung von APP bei (siehe

Abbildung 3 und 4). Neben den APP-Fragmenten werden diverse andere Substrate durch die  $\gamma$ -Sekretase prozessiert, wobei nur Typ-I-Transmembranproteine, die bereits eine Ektodomänenspaltung erfahren haben, als Substrat zugelassen werden (Haapasalo & Kovacs, 2011). Dieser Prozess wird als regulierte Intramembranproteolyse (RIP) bezeichnet, da die Intramembranproteolyse ausschließlich nach erfolgreicher Ektodomänenspaltung erfolgen kann (Lichtenthaler et al., 2011).

Die  $\gamma$ -Sekretase ist, im Gegensatz zu den beiden anderen APP-Sekretasen, ein hochmolekularer Proteinkomplex, der aus vier Untereinheiten besteht: Presenilin 1 oder Presenilin 2 (PS1 or PS2), Nicastrin, „anterior pharynx-defective-1“ (APH-1) und „presenilin enhancer-2“ (PEN2) (Kimberly & Wolfe, 2003; Steiner & Haass, 2000). Alle vier Komplexkomponenten werden für die katalytische Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase benötigt (Francis et al., 2002) und sind zugleich ausreichend (Edbauer et al., 2003). Die Preseniline PS1 und PS2 sind homologe Proteine. Diese polytopen Transmembranproteine gehören zur Gruppe der GXGD-Aspartylproteasen (Levy-Lahad et al., 1995; Sherrington et al., 1995; Steiner & Haass, 2000). Nicastrin ist ein glykosyliertes Typ-I-Transmembranprotein, das vermutlich als Gerüst des  $\gamma$ -Sekretasekomplexes dient (Vassar & Citron, 2000). Den anderen beiden polytopen Transmembranproteinen APH-1 und PEN2 wird eine Funktion in der frühen Assemblierung des Komplexes bzw. in der Endoproteolyse der Preseniline zugeschrieben (Pardossi-Piquard et al., 2009; Prokop et al., 2005; Prokop et al., 2004). Die subzelluläre Lokalisierung des  $\gamma$ -Sekretasekomplexes erstreckt sich auf das endoplasmatische Retikulum, das trans-Golgi-Netzwerk sowie die Endosomen und die entsprechenden intermediären Kompartimente (Cupers et al., 2001).

### **1.2.3 Regulation der Prozessierung von APP**

Enzymatische Reaktionen, wie die regulierte Intramembranproteolyse von APP, können durch zwei grundlegende Prinzipien kontrolliert werden: Auf der einen Seite durch die Regulation der Enzymaktivitäten und auf der anderen Seite durch die Verfügbarkeit von Substraten.

#### **1.2.3.1 Regulation der Aktivität der APP-Sekretasen**

Die Aktivitäten der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 und der  $\beta$ -Sekretase BACE1 werden auf Ebene der Transkription, der Translation sowie auf post-translationeller Ebene kontrolliert (Dislich &

Lichtenthaler, 2012; Lichtenthaler, 2011a, 2011b; Rossner et al., 2006). So wird die Transkription von ADAM10 durch Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren in seiner Promotor-Region reguliert (Prinzen et al., 2005; Tippmann et al., 2009). Die Translation der gebildeten ADAM10-mRNA wird unter anderem durch eine Region in 5'-untranslatierten Region der mRNA kontrolliert (Lammich et al., 2010). Die post-translationelle Regulation der ADAM10-Aktivität lässt sich in drei Gruppen darstellen: Erstens kann die Stimulation von Rezeptoren mit Wachstumsfaktoren oder Neurotransmittern über die nachfolgenden zellulären Signaltransduktionskaskaden zu einer Aktivierung der Aktivität von ADAM10 führen (Bandyopadhyay et al., 2007). Zweitens haben Mechanismen, die das Aufeinandertreffen von Substrat und Sekretase regulieren, einen großen Einfluss auf die  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität in der Prozessierung von APP. Der intrazelluläre Transport von APP ist Gegenstand des nächsten Kapitels. Als drittes ist eine heterogene Gruppe von Modulatoren zu nennen, die in unterschiedlichen Wegen Einfluss auf die ADAM10-Aktivität nehmen. Hier sind als Beispiele zelluläre Inhibitoren wie TIMP3 („tissue inhibitor of metalloproteases 3“) (Hoe et al., 2007) oder Veränderungen in der Lipidzusammensetzung von Membranen (Kojro et al., 2010) zu nennen. Ähnlich wie bei ADAM10 wird auch die Transkription von BACE1 durch die Bindung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren in seiner Promotorregion reguliert (Rossner et al., 2006). Die Translation der BACE1-mRNA wird wiederum durch einen Abschnitt in seiner 5'-untranslatierten Region überwacht (De Pietri Tonelli et al., 2004; Lammich et al., 2004; Rogers et al., 2004). Des Weiteren wird die Translation von BACE1 durch eine natürlich auftretende Antisense-RNA (Faghihi et al., 2008) und eine microRNA (Hebert et al., 2008; W. X. Wang et al., 2008) kontrolliert. Ähnlich wie bei ADAM10 sind auch für die Aktivität von BACE1 post-translationelle Regulationsmechanismen bekannt: Die Prozessierung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase ist auf ein leicht saures Kompartiment angewiesen (Vassar, 2001), so dass erneut die Kontrolle des Aufeinandertreffens von APP und BACE1 ein wichtiger Bestandteil der post-translationellen Regulation der BACE1-Aktivität ist. Der intrazelluläre Transport von APP wird im nächsten Kapitel erläutert. Weitere wichtige Faktoren in der Kontrolle der BACE1-Aktivität sind der Cholesterolgehalt und die Lipidzusammensetzung der Membran (Crameri et al., 2006; Hattori et al., 2006). Die  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität wird hauptsächlich durch die vorangegangene Ektodomänenspaltung des Substrats kontrolliert (Lichtenthaler et al., 2011). Aus diesem Grund ist es von entscheidender Bedeutung, mehr über die zelluläre Regulation der APP-

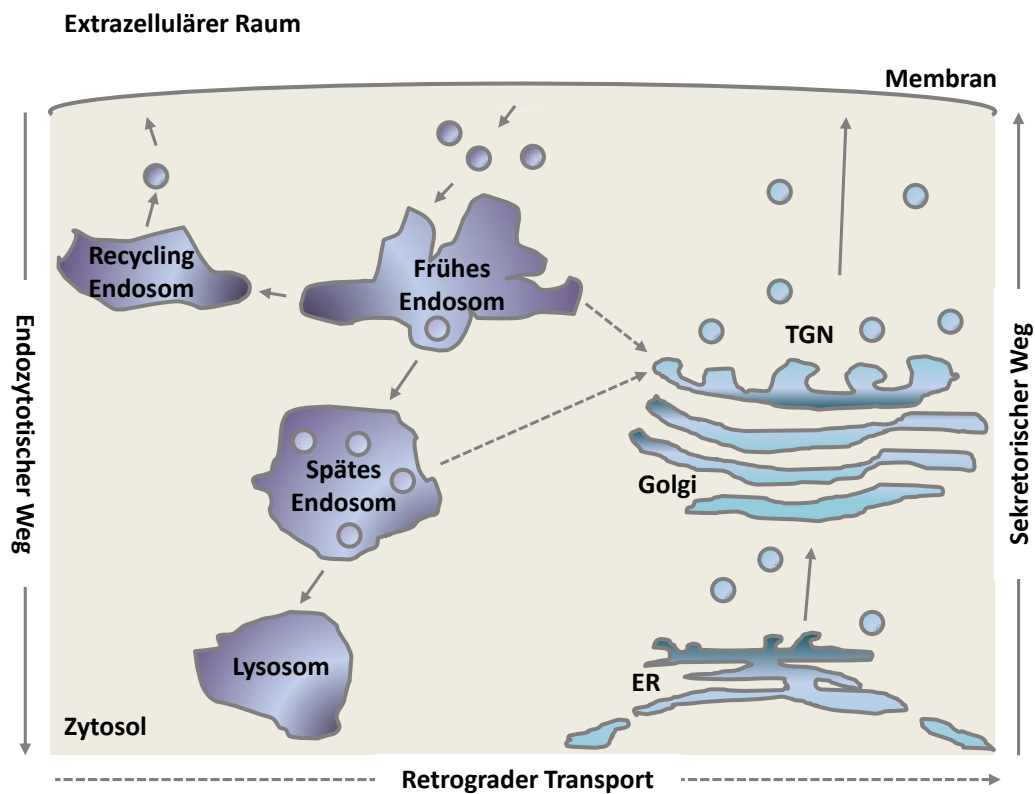
Ektodomänenspaltung zu lernen, um auf diesem Weg therapeutische Ansätze zur Inhibition der A $\beta$ -Bildung zu identifizieren.

### 1.2.3.2 Der intrazelluläre Transport von APP

Ein zentraler Mechanismus in der Regulation der Substratverfügbarkeit ist die Kontrolle über das Zusammentreffen der APP-Substrate mit den entsprechenden Sekretasen. Derzeit ist wenig darüber bekannt, welche zellulären Modulatoren dieses Zusammentreffen regulieren (Allinson et al., 2003; Lichtenthaler, 2006). In den letzten Jahren konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass dabei Proteinen aus dem intrazellulären Transport Schlüsselfunktionen in der Regulation der APP-Prozessierung zukommen (Sannerud & Annaert, 2009; Thinakaran & Koo, 2008; Vetrivel & Thinakaran, 2006).

Der intrazelluläre Transport von APP lässt sich in zwei Hauptwege gliedern: den sekretorischen und den endozytotischen Transportweg (siehe Abbildung 5). Der sekretorische Weg beginnt mit Synthese von APP, die auf Grund der 17 Aminosäuren langen N-terminalen Signalsequenz ko-translational am endoplasmatischen Retikulum (ER) stattfinden kann, so dass APP als Typ-I-Transmembranprotein in die Membran des ERs inseriert wird (Kang et al., 1987). Darauf folgend wird APP entlang des konstitutiven sekretorischen Wegs in den Golgi-Apparat transportiert und von dort durch das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) an die Zelloberfläche weitergeleitet. Während des Transports durch das ER und den Golgi-Apparat wird APP in verschiedenster Weise post-translational modifiziert. So erhält APP neben Phosphorylierung und Tyrosin-Sulphatierung auch seine typischen N- und O-Glycosylierungen (Oltersdorf et al., 1990; Weidemann et al., 1989). Der sekretorische Weg dient also neben dem Transport von APP an die Plasmamembran auch der Maturierung des Proteins. Ist APP an der Zelloberfläche angelangt, kann es dort durch die  $\alpha$ -Sekretase prozessiert werden (Sisodia, 1992). Alternativ hierzu kann APP durch Clathrin-vermittelte Endozytose von der Zelloberfläche wieder in die Zelle aufgenommen werden (Koo & Squazzo, 1994; Perez et al., 1999). Dabei wird das internalisierte APP durch vesikulären Transport zunächst in das frühe Endosom gebracht. In dieser „Sortier-Station“ wird die weitere Destination von APP bestimmt: Zum einen kann APP in das Recycling-Endosom oder das trans-Golgi-Netzwerk gesendet und jeweils von dort aus zurück an die Plasmamembran gebracht werden (Koo & Squazzo, 1994; Koo et al., 1996; Sannerud & Annaert, 2009). Zum anderen kann APP in das späte Endosom, das auf Grund seiner

Morphologie auch Multivesikulärer Körper („multivesicular body“ MVB) genannt wird, weitergeleitet werden. Von hier aus sind wiederum zwei Transportrouten möglich: Einer der Wege führt APP in das Lysosom, in dem der Abbau von APP erfolgt (Golde et al., 1992; Haass et al., 1992). Im anderen, retrograden Weg wird APP vom späten Endosom „zurück“ ins trans-Golgi-Netzwerk des sekretorischen Wegs transportiert und somit zurück an die Plasmamembran gesendet (Thinakaran & Koo, 2008; Vetrivel & Thinakaran, 2006). Die  $\beta$ -Sekretase BACE1 ist hauptsächlich im späten Golgi-Apparat, dem trans-Golgi-Netzwerk und den endosomalen Kompartimenten lokalisiert, so dass die Prozessierung von APP durch BACE1 in den Schritten des endozytotischen Wegs und des Recyclings stattfindet (Koo & Squazzo, 1994). Im Gegensatz dazu ist die  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität in den subzellulären Kompartimenten vom ER bis hin zum trans-Golgi-Netzwerk, an der Plasmamembran und in Endosomen lokalisiert. Wie bereits geschildert, kann die  $\gamma$ -Sekretase APP nur nach erfolgter Ektodomänenspaltung durch die  $\alpha$ - oder die  $\beta$ -Sekretase schneiden. Die Substrate für die  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität sind also die C-terminalen Fragmente von APP CTF $\alpha$  und CTF $\beta$  (Lichtenthaler et al., 2011). Die Prozessierung des CTF $\beta$  zum A $\beta$ -Peptid findet vorwiegend in den Kompartimenten, in denen auch BACE1 aktiv ist, statt. So wird A $\beta$  hauptsächlich in Endosomen des endozytotischen Wegs und im Zusammenhang mit Recyclingschritten im trans-Golgi-Netzwerk gebildet (Cupers et al., 2001; Small & Gandy, 2006).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des intrazellulären Transports von APP.**

Dargestellt sind der sekretorische (rechts) und der endozytische (links) Weg sowie der retrograde Weg (Mitte, gestrichelte Pfeile) von endosomalen Kompartimenten zurück zum trans-Golgi-Netzwerk (TGN), auf denen APP transportiert werden kann. Nach ko-translationaler Translokation in das endoplasmatische Retikulum (ER) wird APP durch den Golgi-Apparat und das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) an die Zelloberfläche transportiert. Nach Endozytose kann APP entweder recycelt und an die Plasmamembran zurückgebracht oder dem lysosomalen Abbau zugeführt werden.

Einer der bekanntesten Modulatoren des intrazellulären Transports von APP ist das Protein SorL1 („sortilin-related receptor“ SORL1, sorLA oder LR11), das den endosomalen Transport von APP kontrolliert (Andersen et al., 2005; Rogaeva et al., 2007). SorL1 gehört zur LRP-Familie und ko-lokalisiert mit APP in endosomalen Kompartimenten (Offe et al., 2006). Die erhöhte Expression von SorL1 resultiert in einer Zunahme von APP im Golgi-Apparat, welche mit einer Abnahme von APP an der Zelloberfläche und in endosomalen Kompartimenten korreliert. Daraus resultiert eine Abnahme der Produktion von APP $\alpha$ , APP $\beta$  und A $\beta$  (Andersen et al., 2005; Offe et al., 2006; Rogaeva et al., 2007; Spoelgen et al., 2006). Die Depletierung des SorL1-Proteins führt zu einer Akkumulation von APP in endosomalen Kompartimenten, dadurch zur verstärkten Ektodomänenspaltung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase und somit zu einem Anstieg von APP $\beta$  und folglich auch A $\beta$ . Diese Ergebnisse führten zur Hypothese, dass SorL1 durch Bindung von sowohl APP als auch dem

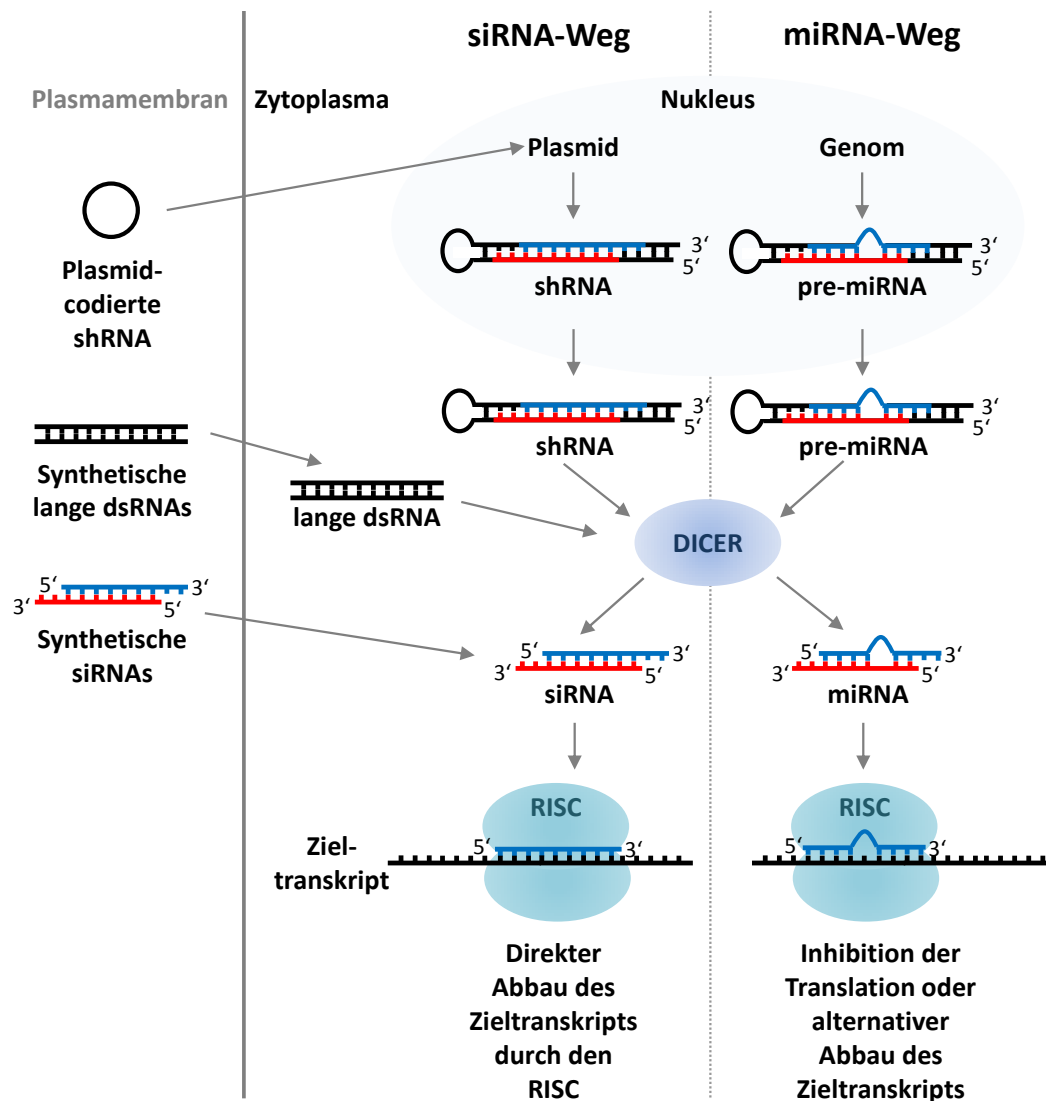
Retromer-Komplex den Transport von APP aus den endosomalen Kompartimenten in das trans-Golgi-Netzwerk erleichtert und somit das Zusammentreffen von APP und BACE1 und die nachfolgende Produktion von A $\beta$  kontrollieren kann (Rogaeva et al., 2007). Anhand dieses Beispiels wird deutlich, welche entscheidende Rolle der Transport von APP bei dessen Prozessierung und der A $\beta$ -Produktion einnimmt. Aus diesem Grund ist es von entscheidender Bedeutung, mehr über die zellulären Modulatoren des Transports von APP und damit auch der Ektodomänenspaltung von APP zu lernen, um auf diesem Weg Einblicke in neue Therapiestrategien zu erhalten.

### 1.3 Das RNA-Interferenz Prinzip

Vorliegende Arbeit nutzt in verschiedener Weise das Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi), weshalb hier die grundlegenden zellulären Mechanismen dargestellt werden sollen. Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlicher Mechanismus zur Regulation der Genexpression in eukaryoten Zellen. Dabei werden Transkripte von Zielgenen (mRNAs) mit Hilfe kurzer, doppelsträngiger RNAs erkannt und für den Abbau markiert. Da dieser Prozess in der „Stilllegung“ spezifischer Gene resultiert, wird das RNAi-Prinzip häufig zur Untersuchung von Genfunktionen verwendet (Fire et al., 1998; Hannon, 2002; Meister & Tuschl, 2004; Sigoillot & King, 2011). Die RNAi-basierte Regulation der Genexpression wird in zwei Hauptwege unterteilt: den siRNA-Weg (siRNA = „small interfering“ RNA) und den miRNA-Weg (miRNA = „micro“ RNA). Der siRNA-Weg blockiert die Expression von Transkripten mit homologer Sequenz und bietet deshalb ein großes experimentelles Potential. Dieser Weg wird beispielsweise in der zellulären Abwehr von Viren verwendet, in dem dsRNA-Moleküle, die bei der viralen Replikation entstehen, abgebaut werden. Der miRNA-Weg hingegen ist für die Regulation der Expression von endogen vorhandenen Zieltranskripten zuständig. Dabei wird die Translation von Transkripten mit heterologer Sequenz verhindert. Der miRNA-Weg reguliert somit die Expression von Genen, die different von miRNA-codierenden Locus sind. Beide Wege nutzen dieselbe zelluläre RNAi-Maschinerie, unterscheiden sich aber zum einen in den RNA-Vorläufermolekülen und zum anderen in den Mechanismen, die in der „Stilllegung“ der Expression des Zielgens resultieren (Carthew & Sontheimer, 2009; Tomari & Zamore, 2005). Die beiden Wege, deren Gemeinsamkeiten und Unterschiede sind in Abbildung 6 dargestellt. Im siRNA-Weg werden doppelsträngige RNA-Vorläufermoleküle durch die Endoribonuklease-Aktivität des Enzyms „Dicer“ in kurze, doppelsträngige

Fragmente geschnitten, die dann als siRNAs („small interfering“ RNAs) bezeichnet werden (Bernstein et al., 2001). Diese sind typischerweise 21 - 23 Nukleotide lang und weisen an ihren Enden sogenannte 3'-Überhänge von 2 Nukleotiden auf (Martin & Caplen, 2007). Die RNA-Vorläufermoleküle des siRNA-Wegs können dsRNA-Moleküle der viralen Replikation sein, aber auch synthetische lange dsRNA oder Plasmid-codierte shRNAs („small hairpin“ RNAs) können experimentell verwendet werden. Neben den RNA-Vorläufermolekülen können auch direkt synthetische siRNAs für die „Stilllegung“ von Transkripten in Zielzellen eingebracht werden. Im miRNA-Weg werden zellulär codierte und exprimierte prä-miRNAs durch den „Dicer“ zu miRNAs („micro“ RNA) prozessiert (Mendell, 2005). Nachdem die siRNAs bzw. miRNAs aus den unterschiedlichen Vorläufermolekülen gewonnen wurden, vereinigen sich der siRNA- und der miRNA-Weg: Sowohl die siRNAs als auch die miRNAs werden in den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) geladen, woraufhin der Doppelstrang der kurzen RNAs aufgelöst wird und nur ein Strang (Leitstrang oder „guide strand“) im RISC behalten wird, während der andere Strang (Folgestrang oder „passenger strand“) freigesetzt und abgebaut wird. Die Auswahl des Leitstrangs erfolgt dabei auf Grund seiner thermodynamischen Eigenschaften (Khvorova et al., 2003). Der fertige beladene RISC kann nun mit Hilfe des Leitstrangs seine Zieltranskripte finden und deren Expression regulieren: Im siRNA-Weg findet auf Grund der Homologie der Sequenzen von siRNA-Leitstrang und Zieltranskript eine perfekte Basenpaarung statt, die dazu führt, dass der RISC aktiviert wird und das Zieltranskript zerschneidet, so dass weitere Schritte der Translation verhindert werden. Im miRNA-Weg findet typischerweise keine perfekte Basenpaarung statt, da die Sequenzen nicht komplett homolog sind. Konsequenzen daraus sind die Inhibierung der Translation der betroffenen mRNA oder die Weitervermittlung der mRNA in andere zelluläre mRNA-Abbauwege (Fabian et al., 2010; Hannon, 2002; Meister & Tuschl, 2004; Sigoillot & King, 2011).





**Abbildung 6: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz: der siRNA und der miRNA-Weg.**

Eine Vielzahl doppelsträngiger RNA-Vorläufermoleküle können die zelluläre RNAi-Maschinerie aktivieren: Experimentell genutzte siRNAs oder lange dsRNAs finden ebenso Anwendung wie Plasmid-codierte shRNAs. Endogene Expression initiiert die Bildung von prä-miRNAs. Nach dem Export der shRNAs bzw. der prä-miRNAs aus dem Nukleus in das Zytoplasma wird der Dicer aktiv und prozessiert die RNA-Vorläufer in siRNAs bzw. miRNAs. Auch synthetische lange dsRNAs werden im Zytoplasma von diesem Enzym in siRNA-Fragmente zerlegt. Die resultierenden siRNAs bzw. miRNAs ebenso wie synthetische siRNAs werden in den RISC eingebaut und dienen der Erkennung von Zieltranskripten, die direkt durch den RISC abgebaut werden können (siRNA-Weg). Alternativ wird im miRNA-Weg die Translation gestoppt oder die mRNAs an andere Abbauewege weitergeleitet.

Das RNAi-Prinzip besitzt ein großes experimentelles Potential, da im siRNA-Weg synthetische siRNAs spezifisch die Expression von Transkripten mit homologer Sequenz blockieren können. Wird eine vollständige Basenpaarung zwischen siRNA und Zieltranskript erreicht, so wird die mRNA abgebaut und somit die Expression eines bestimmten Gens

vermindert. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass auch siRNAs unter Umständen wie miRNAs wirken können und selbst bei nicht-vollständiger Basenpaarung die Expression von unspezifischen Transkripten blockieren können. Die resultierenden Effekte werden als „off target“-Effekte bezeichnet (Jackson et al., 2003; Scacheri et al., 2004).

Die Verminderung der Genexpression durch die RNAi wird in Anlehnung an den „Knockout“, bei dem die Expression eines Gens durch genetische Methoden gänzlich aufgehoben wird, auch als „Knockdown“ bezeichnet (Voorhoeve & Agami, 2003). Dieser wesentlich einfacher und schneller durchzuführende „Knockdown“ von Genen hat die Möglichkeiten der Untersuchung von Genfunktionen in eukaryoten Zellen revolutioniert. Anfangs wurde die RNAi-Technologie oft für den „Knockdown“ von individuellen Genen von Interesse genutzt, doch schnell wurde auch das Potential dieser Technologie für die Untersuchung ganzer Genome in Modellorganismen erkannt: Durch Herstellung und Verwendung von RNAi-Bibliotheken konnten erstmals genomweite „Knockdown“-Studien zur Identifizierung neuer Genfunktionen („loss-of-function screenings“) durchgeführt werden (Boutros & Ahringer, 2008). Heute werden solche genomweiten RNAi-„Screenings“ in Zelllinien verschiedener Organismen, wie beispielsweise des Menschen, der Maus oder der Drosophila-Fliege, zur Untersuchung diverser biologischer Prozesse, wie der Signaltransduktion, der Zellzyklusregulation oder der Entstehung von Krebs, verwendet (Mohr et al., 2010). Die häufige Verwendung von Drosophila-Zellen in diesen genomweiten „Screenings“ zur Identifizierung von humanen Genfunktionen ist auf entscheidende Vorteile der Drosophila-Zellen gegenüber humanen Zellen zurückzuführen (Kuttenkeuler & Boutros, 2004): Erstens ist die RNAi in Drosophila sehr effizient, da die Invertebraten-Zellen lange dsRNAs (ca. 500 bp) ohne Zusatz von Transfektionsreagenzien aufnehmen. In Zellen höherer Organismen ist dies nicht möglich, da die langen dsRNAs die Interferon-Antwort auslösen, die letztendlich zur Apoptose führt (Sledz et al., 2003). Durch die Prozessierung der dsRNAs in sehr viele verschiedene siRNAs kann eine fast hundertprozentige Depletierung des Zieltranskripts erzielt werden (Clemens et al., 2000). Zweitens besitzt Drosophila ein relativ kleines, sehr gut annotiertes Genom (ca. 15.000 Gene) und damit eine geringere genetische Redundanz als das humane Genom, so dass die Depletierung einzelner Gene eher zur Identifizierung neuer Genfunktionen führen kann (Boutros & Ahringer, 2008). Drittens sind zahlreiche Stoffwechselwege zwischen dem Menschen und Drosophila hoch konserviert (Bier, 2005) und 60 % der krankheitsrelevanten Gene des Menschen sind auch im Drosophila-

Genom vorhanden (Rubin et al., 2000). Positiv zu vermerken ist, dass bereits erfolgreich das Wissen aus genomweiten RNAi-,Screenings“ in Drosophila-Zellen in humane Zellen transferiert und so neue humane Genfunktionen identifiziert werden konnten (Gwack et al., 2006; Hao et al., 2008; Kwon et al., 2008; Sessions et al., 2009).

## 2 Ziele der Arbeit

Der Prozess der sequentiellen Prozessierung von APP durch die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase und dessen Bedeutung für die Alzheimer-Krankheit sind mittlerweile sehr gut untersucht. Im Gegensatz dazu ist nur wenig über zelluläre Modulatoren und deren Mechanismen, die die Aktivität und die Expression der APP-relevanten Sekretasen sowie das Zusammentreffen von APP und seinen Sekretasen in den intrazellulären Transportwegen kontrollieren, bekannt. Da die Ektodomänenspaltung von APP die nachfolgende  $\gamma$ -Sekretase-Prozessierung von APP reguliert und somit eine zentrale Rolle in der Kontrolle der A $\beta$ -Peptid-Produktion einnimmt, sollte in vorliegender Arbeit gezielt nach neuen zellulären Modulatoren und neuartigen Kontroll-Mechanismen der Ektodomänenspaltung von APP gesucht werden.

Zur Identifizierung neuartiger Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP wurde bereits vor Beginn der vorliegenden Arbeit in der Gruppe von Dr. Stefan Lichtenthaler ein cDNA-Expressions-„Screening“ durchgeführt (Neumann et al., 2006; Schobel et al., 2008; Schobel et al., 2006). Hierzu wurden die Effekte der Expression von cDNAs einer humanen GehirndNA-Bibliothek auf die Ektodomänenspaltung von APP einer Reporterzelllinie untersucht. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte das bis dato unbekannte Protein TMEM59 identifiziert werden. Dieses neuartige Protein konnte bereits, wie folgt, in einer vorangegangenen Doktorarbeit charakterisiert werden (Fischer, 2008): TMEM59 ist ein Golgi-lokalisiertes Typ-I-Transmembranprotein, das ubiquitär exprimiert und evolutionär konserviert ist. TMEM59 besitzt ein homologes Protein, das TMEM59-ähnliche Protein (TMEM59L). Des Weiteren war bekannt, dass die verstärkte Expression von TMEM59 in einer starken Hemmung der APP-Spaltung und der APP-Maturierung resultiert. Neben APP wurde auch die Maturierung anderer Proteine wie BACE1 und PrP untersucht, so dass festgestellt werden konnte, dass TMEM59-Expression die erforderlichen Golgi-Glykosylierungsreaktionen inhibierte. Um den Wirkmechanismus von TMEM59 auf die Ektodomänenspaltung von APP weiter zu untersuchen, wurden in vorliegender Arbeit offene Fragestellungen aufgegriffen und diskutierte Modelle mit gezielten Experimenten überprüft: Hierzu wurden zunächst die Effekte der TMEM59-Expression auf die Ektodomänenspaltung von APP verifiziert. Zudem sollte in detaillierten Ko-Lokalisierungsstudien überprüft werden, ob TMEM59 eine spezifische Lokalisierung in einem der Golgi-Apparat-Subkompartimente aufweist und somit eventuell nähere Einblicke in die Modulation von Golgi-Glykosylierungsreaktionen durch TMEM59 erhalten werden können. Eine zentrale Hypothese, die bis dato nur spekulativ

diskutiert werden konnte, war die Annahme, dass die Expression von TMEM59 die enzymatischen Aktivitäten der relevanten APP-Sekretasen modulieren und auf diesem Wege zu einer Abnahme der APP-Ektodomänenspaltung führen könnte. Hierzu wurden spezifische, fluoreszenzbasierte Experimente zur Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten etabliert und durchgeführt. Des Weiteren sollten erhaltene Hinweise auf eine Veränderung des intrazellulären Transports von APP zu einem eindeutigen Ergebnis gebracht werden. Zu diesem Zweck sollten Lokalisierungsstudien mit einer fluorophorgekoppelten Variante von APP in lebenden Zellen durchgeführt werden. Da alle bisherigen Erkenntnisse über TMEM59 und sein Homologes TMEM59L auf Expressionsstudien basieren, sollte in vorliegender Arbeit untersucht werden, in welchen Effekten auf APP die Depletierung beider Proteine resultiert. Es sollten transiente Doppel-„Knockdown“-Studien durchgeführt werden, um die Ergebnisse aus den Expressions-Studien zu verifizieren.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte zur Identifizierung neuer zellulärer Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP ein genomweites RNAi-„Screening“ in *Drosophila*-Zellen etabliert und durchgeführt werden. Auf Grund wichtiger Vorteile der *Drosophila*-Zellen gegenüber humanen Zellen sollten diese Zellen für das genomweite „Screening“ verwendet werden. Einer der Hauptvorteile von *Drosophila*-Zellen ist die Effizienz der RNAi in den Invertebraten-Zellen, da hier mit langen dsRNAs (ca. 500 bp) gearbeitet werden kann. Die Prozessierung der dsRNAs in sehr viele verschiedene siRNAs führt zu einer hocheffizienten Depletierung des Zieltranskripts (Clemens et al., 2000). Ein weiterer wichtiger Vorteil ist das relativ kleine, sehr gut annotierte *Drosophila*-Genom (ca. 15.000 Gene), das eine geringe genetische Redundanz aufweist. Dadurch kann die Depletierung einzelner Gene häufig zur Identifizierung neuer Genfunktionen beitragen (Boutros & Ahringer, 2008). Durch die gute Konservierung zahlreicher Proteine und Stoffwechselwege zwischen dem Menschen und *Drosophila* (Rubin et al., 2000) können *Drosophila*-Zellen als Modell für die genomweiten RNAi-Studien verwendet werden und die erhaltenen Resultate oftmals in humanen Zellen verifiziert werden (Kwon et al., 2008; Sessions et al., 2009). In vorliegender Arbeit sollte demzufolge ein genomweites RNAi-„Screening“ zur Identifizierung neuer Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP in *Drosophila*-Zellen etabliert und durchgeführt werden. Diese Aufgabe konnte in Zusammenarbeit mit Dr. Richard Page und in Kollaboration mit dem Labor von Prof. Dr. Boutros am DKFZ in Heidelberg erfolgen. Da in *Drosophila*-Zellen APP nur durch eine  $\alpha$ -

---

aber keine  $\beta$ -Sekretase-Aktivität prozessiert wird (Fossgreen et al., 1998; L. Q. Luo et al., 1990; Sapir et al., 2005; Takasugi et al., 2003), konnte im Speziellen nach Modulatoren der  $\alpha$ -Sekretasespaltung von APP gesucht werden. Hierzu wurden zunächst eine geeignete Drosophila-Reporterzelllinie und eine Strategie für das „Screening“ etabliert. Nach der erfolgreichen Durchführung des genomweiten „Screenings“ und der Identifizierung von potentiellen Modulatoren der  $\alpha$ -Sekretasespaltung von APP in Drosophila-Zellen sollten die erhaltenen Ergebnisse in humane Zellen transferiert werden. Nach Identifizierung von orthologen humanen Genen, sollten deren Effekte auf die Ektodomänenspaltung von APP untersucht werden. Da in humanen Zellen die Ektodomänenspaltung von APP sowohl durch die  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 als auch durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 erfolgt, sollten hierbei Effekte auf die Spaltprodukte beider Sekretasen (APPs $\alpha$  und APPs $\beta$ ) untersucht werden. Dazu sollten die potentiellen humanen Kandidatengene in RNAi-basierten Experimenten depletiert werden und die Effekte auf die Sekretion von APPs $\alpha$  und APPs $\beta$  gemessen werden. Zur Validierung potentieller Kandidatengene sollte eine Strategie entwickelt werden, mit der belegbar ist, dass erhaltene Effekte spezifisch für die Depletierung eines Kandidatengens und nicht durch unspezifische „off target“-Effekte der RNAi bedingt sind.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 TMEM59 ist ein neuartiger Modulator der Ektodomänenspaltung von APP

##### 3.1.1 Identifizierung von TMEM59

Auf der Suche nach neuartigen Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP wurde im Labor ein cDNA-Expressions-„Screening“ durchgeführt (Neumann et al., 2006; Schobel et al., 2008; Schobel et al., 2006). Hierzu wurden Expressionskonstrukte einer humanen Gehirn cDNA-Bibliothek in eine Reporterzelllinie transfiziert und deren Effekte auf die Ektodomänenspaltung von APP analysiert. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte das bis dato unbekannte Protein TMEM59 als Modulator der APP-Ektodomänenspaltung identifiziert werden. TMEM59 ist ein Typ-I-Transmembranprotein und besitzt eine Sequenz von 323 Aminosäuren, die vier bekannte Motive aufweist: Ein N-terminales Signalpeptid, eine N-Glykosylierungsstelle, eine Transmembrandomäne und ein potentielles C-terminales PDZ-Bindemotiv (Abbildung 7) (Fischer, 2008).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung von TMEM59.**

Gezeigt sind die Orientierung von TMEM59 in der Membran sowie die vier bekannten Motive des Proteins. In blau ist das Signalpeptid am N-Terminus des Proteins dargestellt. In grün bzw. orange sind die N-Glykosylierungsstelle bzw. die Transmembrandomäne von TMEM59 abgebildet. Am C-Terminus des Proteins findet sich ein potentielles PDZ-Bindemotiv (gelb).

##### 3.1.2 TMEM59 und TMEM59L modulieren die Ektodomänenspaltung und die Maturierung von APP

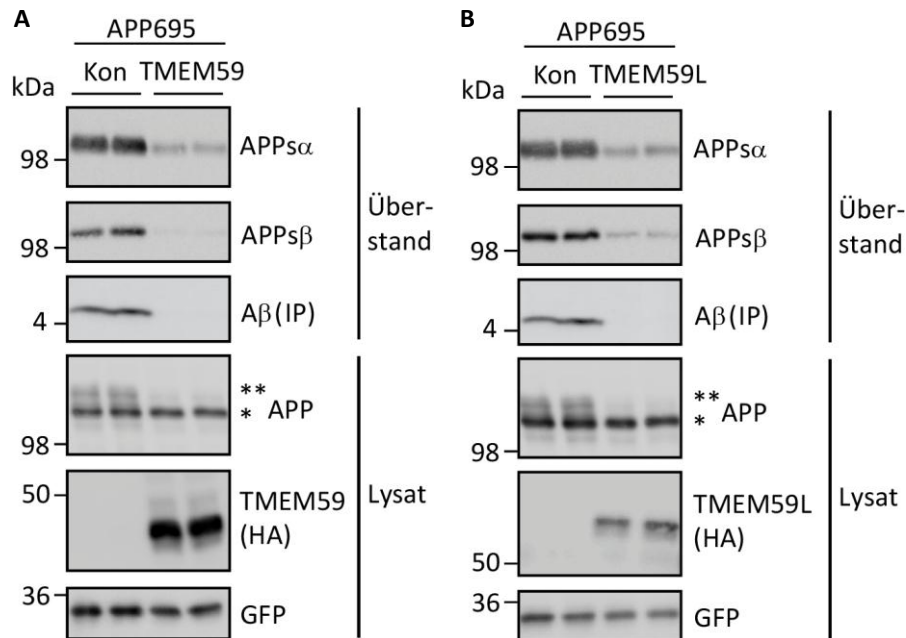
Zunächst wurde ein wesentlicher Befund der vorangegangenen Doktorarbeit im Labor (Fischer, 2008) überprüft. Es sollte verifiziert werden, dass die verstärkte Expression von TMEM59 und TMEM59L eine starke Inhibierung der APP-Ektodomänenspaltung und der APP-Maturierung zur Folge haben. Dies konnte in meinen eigenen, nachfolgenden Untersuchungen bestätigt werden (Abbildung 8). Hierzu wurden HEK293E-Zellen transient mit APP695 und

TMEM59-HA oder TMEM59L-HA bzw. der Kontrolle Luziferase (Kon) ko-transfiziert. Die gleichzeitige Transfektion mit GFP diente als Kontrolle für homogene Transfektionsraten. 48 h nach Transfektion wurden die Überstände gesammelt und die Zellen zu Lysaten verarbeitet, so dass eine Analyse der unterschiedlichen APP-Spezies sowie die Überprüfung der Expression der transfizierten Proteine im Western Blot möglich war. Wie aus Abbildung 8A hervorgeht, reduzierte die Expression von TMEM59 im Vergleich zur Kontrolle das  $\alpha$ -Sekretase-geschnittene APPs $\alpha$  und das  $\beta$ -Sekretase-geschnittene APPs $\beta$  in einem ähnlichen Ausmaß. Konsistent mit diesen Ergebnissen konnte auch eine Reduktion der Produktion von A $\beta$  unter TMEM59-Expression im Vergleich zu Kontrollbedingungen gezeigt werden. Die Betrachtung des Gesamt-APP im Zelllysats zeigte, dass nicht nur die Ektodomänenspaltung von APP, sondern auch die Maturierung von APP bei Expression von TMEM59 inhibiert ist. Unter Kontrollbedingungen tritt das APP695 in zwei typischen Banden, die das mature APP (\*\*\*) und das immature APP (\*) darstellen, auf. Diese beiden Banden unterscheiden sich in ihrem Laufverhalten, da die molekulare Masse im Laufe der Maturierung von APP verändert wird. So hat das immature APP nur eine N-Kern-Glykosylierung, wohingegen das mature APP eine Komplex-Glykosylierung aufweist: Diese besteht aus einer N-Komplex-Glykosylierung und einer zusätzlichen O-Glykosylierung (Weidemann et al., 1989). Können unter Kontrollbedingungen beide Maturierungsgrade distinkt detektiert werden, so ist bei TMEM59-Expression nur das immature APP zu erkennen, was auf eine reduzierte Komplex-Glykosylierung des APP schließen lässt. Da die immature APP-Bande nicht in ihrem Laufverhalten verändert wurde, kann gefolgert werden, dass nur die N-Komplex-Glykosylierung und die O-Glykosylierung, nicht aber die N-Kern-Glykosylierung von APP durch TMEM59-Expression beeinträchtigt wurde. Die Feststellung, dass TMEM59 komplexe Glykosylierungsreaktionen inhibiert, konnte bereits im Labor auch für andere transient exprimierte Proteine, wie BACE1 oder PrP, gezeigt werden (Fischer, 2008).

Das TMEM59 homologe Protein TMEM59L zeigte ähnliche Effekte auf die Ektodomänenspaltung und Maturierung von APP (Abbildung 8B). So ist auch hier eine Reduktion der sekretierten APP Fragmente APPs $\alpha$ , APPs $\beta$  und A $\beta$  unter TMEM59L Expression im Vergleich zu Kontrollbedingungen zu erkennen. Im Western Blot des Zelllysats kann wiederum die Inhibierung der Maturierung von APP durch TMEM59L Expression beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass TMEM59 und sein Homologes TMEM59L ähnliche Funktionen in Hinsicht auf APP haben. Somit konnten TMEM59 und



sein Homologes TMEM59L in bisherigen Studien als neuartige Modulatoren der APP-Ektodomänenspaltung und der APP-Maturierung charakterisiert werden.



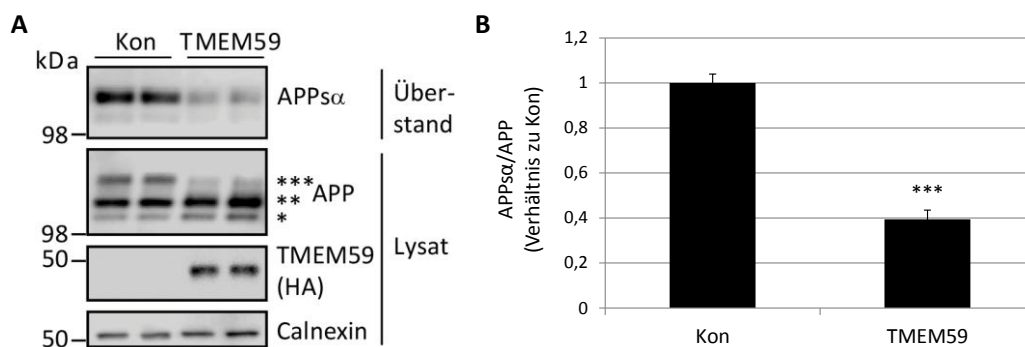
**Abbildung 8: TMEM59- und TMEM59L-Effekte auf die Ektodomänenspaltung und die Maturierung von APP.**

A) HEK293E-Zellen wurden transient mit peak12-APP695 und peak12-TMEM59-HA bzw. Kontroll-Plasmid peak12-Luziferase (Kon) ko-transfiziert, peak12-GFP diente als Transfektionskontrolle. In den Zelllysaten wurden im Western Blot zelluläres APP (22C11), TMEM-HA (HA.11) und GFP (GFP mono) detektiert. \*\* matures APP695 und \* immatures APP695. Die Überstände wurden gegen sekretiertes APPs $\alpha$  (W02), APPs $\beta$  (192wt) und A $\beta$  (6E10, nach 3552 Immunopräzipitation) geblottet. B) HEK293E-Zellen wurden transient mit peak12-APP695 und peak12-TMEM59L-HA bzw. Kontroll-Plasmid peak12-Luziferase (Kon) ko-transfiziert, peak12-GFP diente als Transfektionskontrolle. Die Auswertung wurde wie in A) beschrieben durchgeführt.

### 3.1.3 TMEM59 moduliert die Maturierung und die Ektodomänenspaltung von endogenem APP

Wie in vorangegangenem Kapitel dargestellt wurde, hat TMEM59 starke Effekte auf transient exprimiertes APP695. Für endogenes APP konnten bisher im Labor jedoch nur vergleichsweise schwache Effekte erzielt werden. Dieser Befund ist vermutlich durch eine unzureichende Transfektionseffizienz der Zellen mit TMEM59 zu erklären. Zur Verbesserung der Transfektionseffizienz wurde das Standardprotokoll zur transienten Überexpression von rekombinanter DNA dahingehend modifiziert, dass bis zu 5-fach weniger Zellen als üblich verwendet wurden, da bekannt ist, dass die Transfektionseffizienz mit der Zelldichte zum Zeitpunkt der Transfektion korreliert (QIAGEN, 1999-2002). Somit wurden HEK293E-Zellen

transient mit TMEM59-HA bzw. mit Luziferase (Kon) transfiziert. Nach entsprechender Präparation der Proben konnte eine Analyse der APP-Sekretion und der APP-Maturierung vorgenommen werden. Wie in Abbildung 9A zu erkennen ist, nimmt APP $\alpha$  unter TMEM59-Expression im Vergleich zu Kontrollbedingungen deutlich ab. Diese Abnahme ist in Abbildung 9B quantifiziert und zeigt eine eindeutige, signifikante Reduktion auf 40 % des APP $\alpha$ . Auch die Veränderung der Maturierung von endogenem APP bei TMEM59-Expression im Vergleich zu Kontrollbedingungen ist zu erkennen. Allerdings tritt das endogene APP hier im Gegensatz zu transient transfiziertem APP695 nicht als Doppelsondern als Dreifachbande auf. Dies ist dadurch bedingt, dass in HEK293E-Zellen zwei alternative Isoformen des APP Gens exprimiert werden: zum einen das bereits beschriebene APP695 und zum anderen das APP751. Die Banden sind wie folgt zuzuordnen: die unterste Bande (\*) entspricht dem immaturem APP695, die mittlere Bande (\*\*) ist eine Mischung aus immaturem APP751 und maturem APP695 und die oberste Bande (\*\*\*) stellt das mature APP751 dar (Weidemann et al., 1989). Unter TMEM59-Expression lässt sich eine Abnahme der maturen APP751-Bande, womit eine leichte Zunahme des immaturen APP751 in der Mischbande verbunden ist, feststellen. Die Abnahme der Maturierung von APP695 lässt sich aus einer leichten Zunahme der immaturen APP695-Bande ableiten. Somit konnten die Effekte von TMEM59-Expression, die für transientes APP gezeigt werden konnten, auch für endogenes APP reproduziert werden.

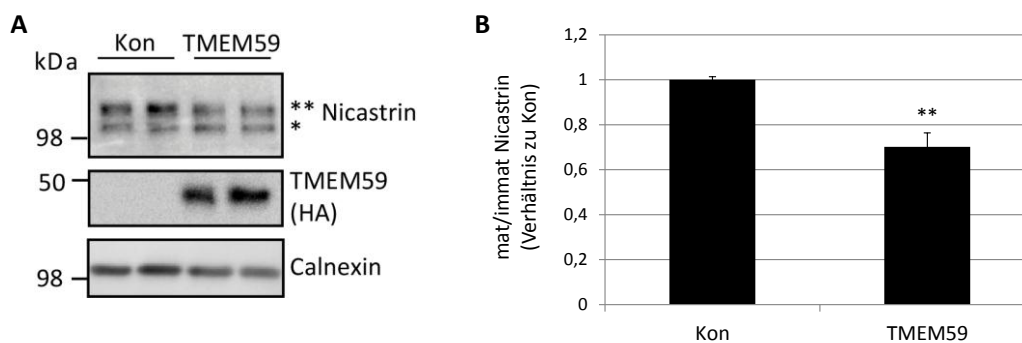


**Abbildung 9: TMEM59-Effekte auf die Ektodomänenspaltung und die Maturierung von endogenem APP.**

A) HEK293E-Zellen wurden transient mit peak12-TMEM59-HA bzw. Kontroll-Plasmid peak12-Luziferase (Kon) transfiziert. In den Zelllysaten wurden im Western Blot zelluläres APP (22C11), TMEM-HA (HA.11) und Calnexin detektiert. \*\*\* matures APP751, \*\* Mischbande aus immaturem APP751 und maturem APP695 und \* immatures APP695. Die Überstände wurden gegen sekretiertes APP $\alpha$  (W02) geblottet. B) Quantifizierung der APP $\alpha$  Produktion aus A). Dargestellt ist die Produktion von APP $\alpha$  (W02) in Abhängigkeit von der Menge an APP im Lysat (22C11). Gezeigt sind die Mittelwerte und zugehörige Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten. \*\*\*  $p < 0,001$  nach t Test.

### 3.1.4 TMEM59 moduliert die Maturierung von endogenem Nicastrin

Um zu überprüfen, ob die beobachteten TMEM59-Effekte spezifisch für APP sind, wurde untersucht, ob auch andere, glykosylierte Proteine von einer verstärkten TMEM59-Expression beeinflusst werden können. Hierzu wurden die TMEM59-Effekte auf endogen vorhandenes, nicht transient transfiziertes Nicastrin untersucht. Nicastrin ist eine der vier  $\gamma$ -Sekretase-Komponenten und wie APP ein Typ-I-Transmembranprotein, das während seiner Maturierung komplex-glykosyliert wird (Edbauer et al., 2003; Kaether et al., 2002). Ähnlich wie für APP konnte auch hier eine signifikante, wenn auch nicht so starke Minderung der Maturierung von Nicastrin unter TMEM59-Expression im Vergleich zu Kontrollbedingungen beobachtet werden (Abbildung 10). Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass TMEM59 in der Lage ist, die komplexe Glykosylierung verschiedener, endogen exprimierter Proteine zu modulieren.



#### Abbildung 10: TMEM59-Effekte auf die Maturierung von endogenem Nicastrin.

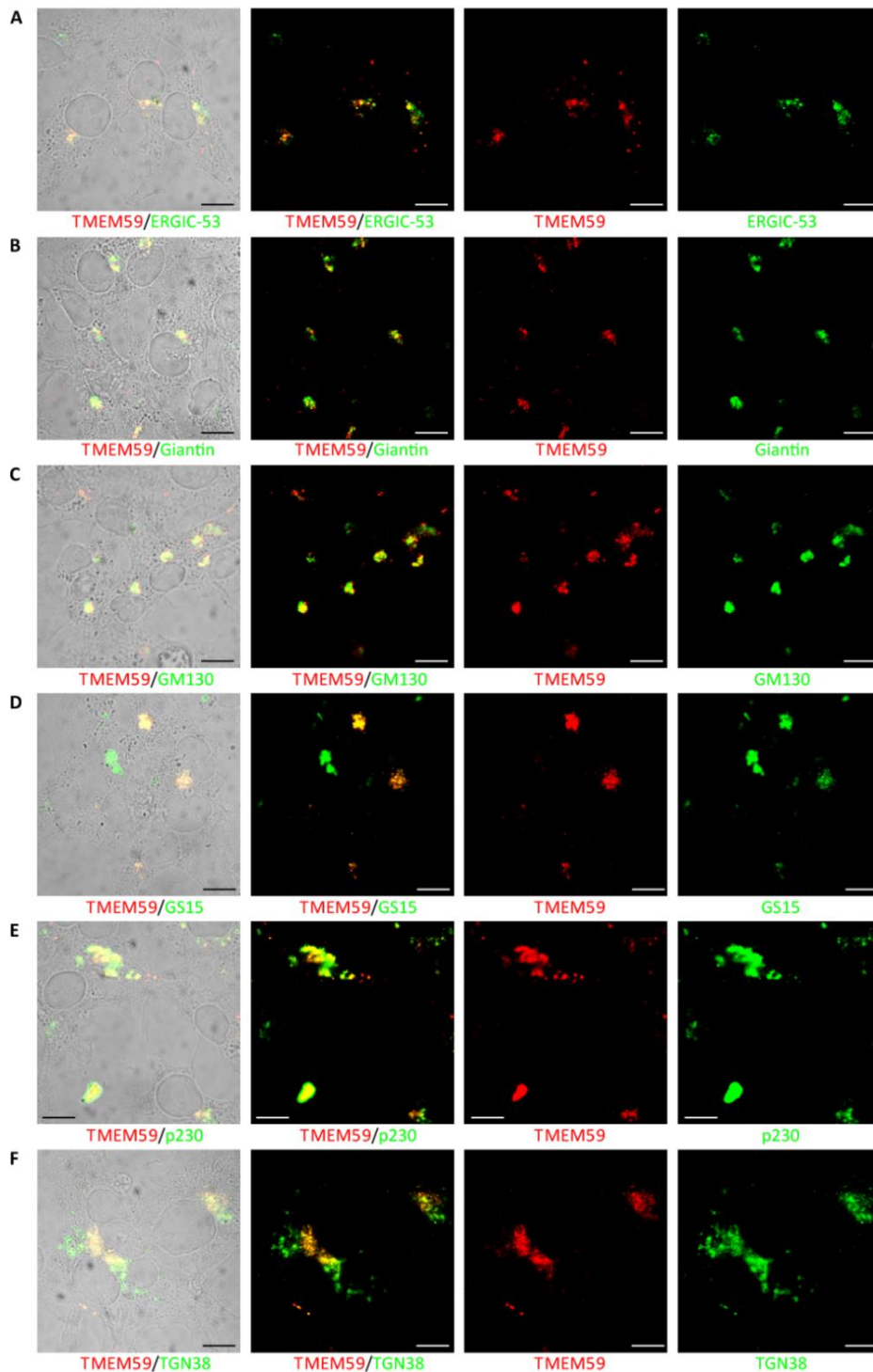
A) HEK293E-Zellen wurden transient mit peak12-TMEM59-HA bzw. Kontroll-Plasmid peak12-Luziferase (Kon) transfiziert. In den Zelllysaten wurden im Western Blot Nicastrin (N1660), TMEM-HA (HA.11) und Calnexin detektiert. \*\* matures und \* immatures Nicastrin. B) Quantifizierung der Nicastrin Maturierung aus A), diese wird dargestellt als Verhältnis von maturem (\*\*) zu immaturem (\*) Nicastrin. Gezeigt sind die Mittelwerte und zugehörige Standardfehler aus acht unabhängigen Experimenten. \*\*  $p < 0,01$  nach t Test. Die Gesamtmenge an Nicastrin war nicht in Abhängigkeit von TMEM59-Expression verändert.

### 3.1.5 TMEM59 ist in allen Golgi-Subkompartimenten vorhanden

Wie in vorangegangener und vorliegender Dissertation anhand verschiedener Proteine, wie APP, Nicastrin, BACE1 und PrP, gezeigt werden konnte, kann TMEM59 als genereller Modulator von komplexen Glykosylierungsreaktionen gesehen werden. Diese komplexen Glykosylierungsreaktionen werden von einer größeren Anzahl verschiedener Enzyme im Golgi-Apparat durchgeführt (Kornfeld & Kornfeld, 1985; Roth, 1991). Daher lag die

Überlegung nahe, dass TMEM59 als Modulator dieser Enzyme auftreten könnte. Diese Hypothese wurde dadurch unterstützt, dass die TMEM59-Expression dem „Knockout“ von COG-Proteinen ähnelt, wie bisher im Labor beschrieben werden konnte. Diese „Conserved Oligomeric Golgi“-Proteine bilden einen hetero-oktameren Komplex, der für die korrekte Lokalisierung und die Aktivität von Golgi-residenten Proteinen, insbesondere von Enzymen der Glykosylierungsreaktionen, notwendig ist (Ungar et al., 2006; Zeevaert et al., 2008). Des Weiteren ist bekannt, dass diese Golgi-residenten Enzyme in spezifische Subgruppen, die jeweils einzelnen Golgi-Subkompartimenten zugeordnet werden können, auftreten (Pfeffer, 2001; Tu & Banfield, 2010; Wilson & Ragnini-Wilson, 2010). Um herauszufinden, ob TMEM59 selbst auch einem bestimmten Subkompartiment zugeordnet werden kann und somit seine Effekte eventuell eine bestimmte Enzymgruppe betreffen, wurden detaillierte Ko-Lokalisierungsstudien von TMEM59 mit etablierten Markern der einzelnen Golgi-Subkompartimente durchgeführt. Hierzu wurden COS-Zellen permeabilisiert, mit dem Antikörper 93 gegen TMEM59 und mit diversen Antikörpern gegen endogene Proteine, die als Marker der verschiedenen Golgi-Subkompartimente etabliert sind, gefärbt. Durch Verwendung unterschiedlicher, fluorophor-gekoppelter Zweitantikörper können unterschiedliche oder ähnliche Lokalisierungen festgestellt werden. So konnte eine partielle Ko-Lokalisierung von TMEM59 und dem ERGIC-53 Protein beobachtet werden (Abbildung 11A). Dieses Protein wird häufig als Marker des ER und des intermediären Kompartiments zwischen ER und Golgi-Apparat (ERGIC = „ER-Golgi Intermediate Compartment“) verwendet, da es den Transport bestimmter Proteine zwischen den beiden genannten Kompartimenten vermittelt und somit selbst in beiden zu finden ist (Sastre et al., 2001; Schweizer et al., 1988). Interessanterweise zeigte sich hier, vor allem unter Berücksichtigung des Durchlichtbildes, dass TMEM59, anders als das ERGIC-53 Protein, nicht nur in den Kern-nahen ER und ERGIC-Bereichen, sondern auch in Kern-ferneren Bereichen, die die anderen Golgi-Subkompartimente darstellen, repräsentiert ist. Auch mit dem gut etablierten cis-medialen Marker Giantin (Linstedt et al., 1995; Linstedt & Hauri, 1993) zeigte TMEM59 eine partielle Ko-Lokalisierung (Abbildung 11B). Diese Feststellung konnte mit dem cis-Golgi-Marker GM130 (Nakamura et al., 1995) (Abbildung 11C) und dem medialen Golgi-Marker GS15 (Xu et al., 2002; Xu et al., 1997) (Abbildung 11D) bestätigt werden. Ebenfalls mit den Markerproteinen p230 und TGN38 des trans-Golgi-Netzwerkes (Gleeson et al., 1996; Luzio et al., 1990) konnte eine partielle Ko-Lokalisierung mit TMEM59 festgestellt werden

(Abbildung 11E und 11F).



**Abbildung 11: TMEM59-Ko-Lokalisierung mit Markern der Golgi-Subkompartimente.**

Endogenes TMEM59 (rot) und diverse endogene Marker der Golgi-Subkompartimente (grün) wurden in permeabilisierten COS-Zellen detektiert. Eine Ko-Lokalisierung kann durch Überlagerung der Signale festgestellt werden (gelb). Um die Zellmorphologie darzustellen, wurden zusätzlich Überlagerungsbilder mit dem Durchlichtkanal erzeugt. TMEM59 zeigt eine partielle Ko-Lokalisierung mit A) ERGIC-53, B) Giantin, C) GM130, D) GS15, E) p230 und F) TGN38. Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu\text{m}$ .

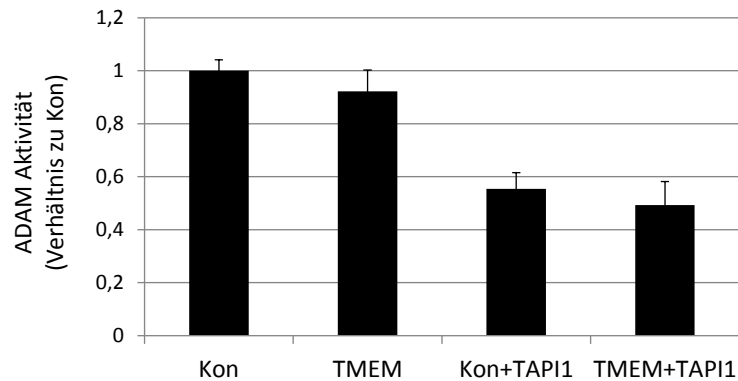
Die Auswertungen der einzelnen Ko-Lokalisierungsstudien führten zu dem Ergebnis, dass TMEM59 in allen Golgi-Subkompartimenten, von cis- über medial- bis hin zum trans-Golgi und im trans-Golgi-Netzwerk, zu finden ist. Somit bieten diese Lokalisierungsstudien einen weiteren Hinweis darauf, dass TMEM59 eine mehr generelle Modulation von Golgi-Glykosylierungsreaktionen bewerkstelligt. Daher sollen in den folgenden Untersuchungen andere Glykosylierungs-abhängige und somit potentiell TMEM59-modulierte Prozesse untersucht werden.

### **3.1.6 TMEM59 hat keinen Einfluss auf die Aktivität der Sekretasen**

Als mögliche Erklärung für die reduzierte APP-Ektodomänenspaltung wurde bisher die Möglichkeit diskutiert, dass eine Verminderung der Aktivitäten der  $\alpha$ -Sekretase und der  $\beta$ -Sekretase zugrunde liegen könnte, da bekannt ist, dass beide Sekretasen komplex-glykosyliert sind und dies Voraussetzung für eine vollständige enzymatische Aktivität ist (Chang et al., 2005; Charlwood et al., 2001; Escrevente et al., 2008a; Kubota & Nishiwaki, 2006). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden fluoreszenzbasierte Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der APP-Sekretasen angewendet. Diese Verfahren beruhen auf synthetischen Protease-spezifischen Substratpeptiden, die mit zwei Fluorophoren, deren Emissions- und Absorptionsspektren komplementär zueinander sind, modifiziert sind. Im Grundzustand kann der „Quencher“ die emittierte Fluoreszenz des Reporters absorbieren, da die beiden Gruppen in räumlicher Nähe sind. Erfolgt jedoch ein proteolytischer Schnitt des Substratpeptids, werden die beiden Gruppen voneinander getrennt, so dass die frei emittierte Fluoreszenz des Reporters detektiert werden kann. In diesem Verfahren kann die Aktivität einer speziellen Protease mit spezifischen Fluoreszenzsignalen korreliert werden.

Wie bereits gezeigt werden konnte (Cisse et al., 2006), ist es möglich, die enzymatische Aktivität von ADAM-Sekretasen in lebenden, intakten Zellen zu detektieren. Hierzu wurden HEK293E-Zellen transient mit TMEM59-HA bzw. der Kontrolle Luziferase (Kon) transfiziert und anschließend mit dem fluorogenen Substrat für ADAM-Proteasen inkubiert. Dabei wurden jeweils zur Kontrolle Zellen beider Ansätze zusätzlich auch mit TAPI1, einem Inhibitor von Metalloprotease-Aktivität (Arribas & Massague, 1995), behandelt. Ein Vergleich von Kontroll-transfizierten Zellen und TMEM59-exprimierenden Zellen zeigte, dass keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität von ADAM-Sekretasen vorlagen (Abbildung 12). Die Spezifität der erhaltenen Signale konnte durch die Reduktion auf ca. 50

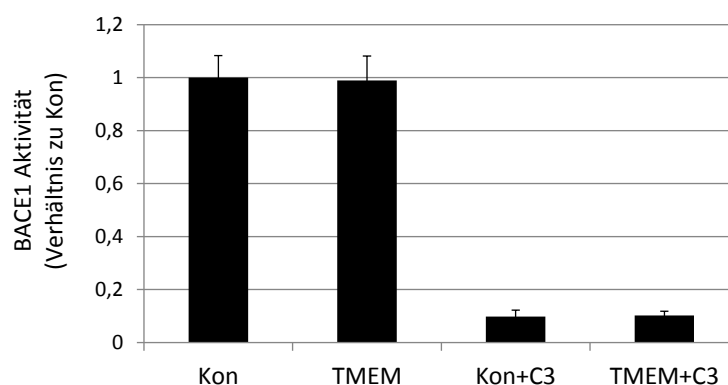
% Restaktivität mit TAPI1, wie bereits in anderen Studien gezeigt (Cisse et al., 2006), gewährleistet werden.



**Abbildung 12: TMEM59-Effekte auf die enzymatische Aktivität von ADAM-Sekretasen.**

HEK293E-Zellen wurden transient mit peak12-TMEM59-HA bzw. Kontroll-Plasmid peak12-Luziferase (Kon) transfiziert. In den lebenden, intakten Zellen wurde die enzymatische Aktivität von ADAM-Sekretasen als Fluoreszenzsignal detektiert und im Verhältnis zu Kontroll-transfizierten Zellen ausgedrückt. Gezeigt sind die Mittelwerte und zugehörige Standardfehler aus fünf (Kon/TMEM59) bzw. drei (Kon+TAPI/TMEM59+TAPI) unabhängigen Experimenten.

Die enzymatische Aktivität von BACE1 kann auf Grund der niedrigen endogenen BACE1-Expressionslevel in HEK293E-Zellen nur mit Hilfe von BACE1-Expression und anschließender Isolation der Membranen detektiert werden (Andrau et al., 2003). Deshalb wurden HEK293E-Zellen transient mit TMEM59-HA bzw. der Kontrolle Luziferase (Kon) und BACE1 ko-transfiziert, die Membranen präpariert und anschließend mit dem fluorogenen Substrat für BACE1 inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen beider Ansätze zusätzlich auch mit C3, einem Inhibitor der BACE1-Aktivität (Stachel et al., 2004), behandelt. Ein Vergleich von Zellen unter Kontrollbedingungen und TMEM59 exprimierenden Zellen zeigte, dass keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität von BACE1 vorlagen (Abbildung 13). Die Spezifität der erhaltenen Signale konnte durch die starke Reduktion auf ca. 10 % Restaktivität mit C3 gewährleistet werden. So kann festgehalten werden, dass TMEM59 zwar in der Lage ist, die Komplex-Glykosylierung von BACE1, nicht aber die Aktivität von BACE1 als  $\beta$ -Sekretase von APP zu modulieren.



**Abbildung 13: TMEM59-Effekte auf die enzymatische Aktivität von BACE1.**

HEK293E-Zellen wurden transient mit peak12-TMEM59-HA bzw. Kontroll-Plasmid peak12-Luziferase (Kon) und peak12-BACE1 ko-transfiziert. In isolierten Membranen wurde die enzymatische Aktivität von BACE1 als Fluoreszenzsignal detektiert und im Verhältnis zu Kontroll-transfizierten Zellen ausgedrückt. Gezeigt sind die Mittelwerte und zugehörige Standardfehler aus sechs (Kon/TMEM59) bzw. drei (Kon+C3/TMEM59+C3) unabhängigen Experimenten.

Mit diesen Untersuchungen konnte folglich ausgeschlossen werden, dass die TMEM59-induzierte Reduktion der APPs $\alpha$ - und der APPs $\beta$ -Produktion auf einer Inhibierung der enzymatischen Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase oder der  $\beta$ -Sekretase beruht.

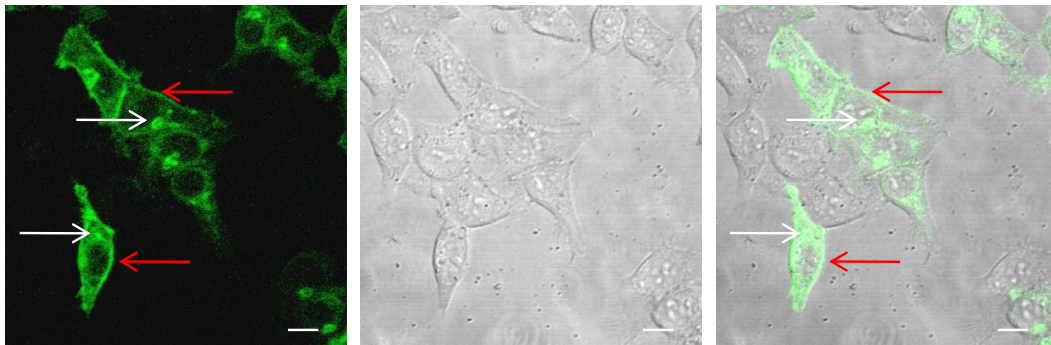
### 3.1.7 TMEM59 verändert den APP-Transport

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die TMEM59-induzierte Reduktion der APP-Ektodomänenspaltung wäre eine grundlegende Veränderung des APP-Transports. Damit würde eine Veränderung der Verfügbarkeit von APP als Substrat für seine Sekretasen einhergehen, da bekannt ist, dass  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität an der Zelloberfläche und  $\beta$ -Sekretase-Aktivität im endozytotischen Weg angesiedelt ist (Buxbaum et al., 1998; Haass et al., 1995; Koo & Squazzo, 1994; Lammich et al., 1999). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden HEK293E-Zellen transient mit YFP-APP (Ehehalt et al., 2003) und TMEM59-HA bzw. der Kontrolle Luziferase (Kon) ko-transfiziert. Nach 24 h Inkubation wurden konfokale Mikroskopie-Bilder der lebenden Zellen angefertigt. Wie aus Abbildung 14A hervorgeht, konnte das YFP-APP in Kontroll-transfizierten Zellen sowohl an der Plasmamembran (rote Pfeile) als auch im Zellinneren im Golgi-Apparat (weiße Pfeile) gefunden werden. In TMEM59 exprimierenden Zellen hingegen konnte das YFP-APP nicht an der Zelloberfläche, sondern nur intrazellulär im Golgi-Apparat (weiße Pfeile) und in der perinukleären ER-Region (blauer Pfeil) detektiert werden (Abbildung 14B). Hieraus geht hervor, dass TMEM59 in der Lage ist, den APP-Transport im ER und im Golgi-Apparat zu arretieren und somit den

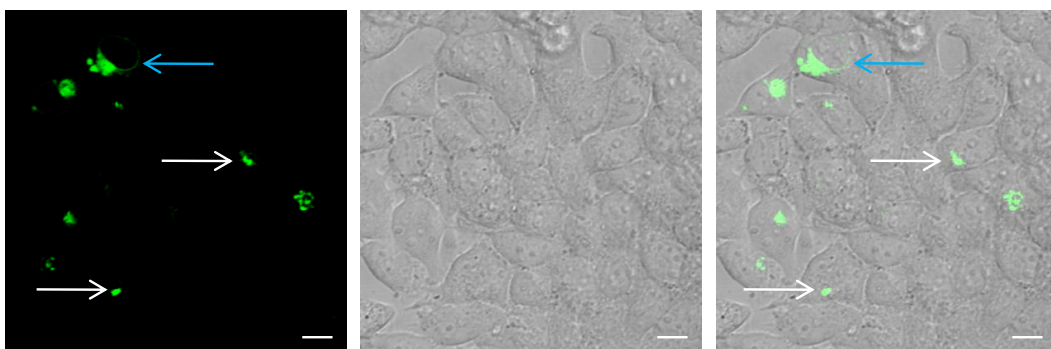


Anteil von APP in späteren zellulären Kompartimenten zu vermindern. Ein dadurch verringertes Aufeinandertreffen von Substrat und Sekretasen in den entsprechenden Kompartimenten könnte also eine Verhinderung der APP-Ektodomänenspaltung durch TMEM59 erklären.

### A Kontrolle



### B TMEM59



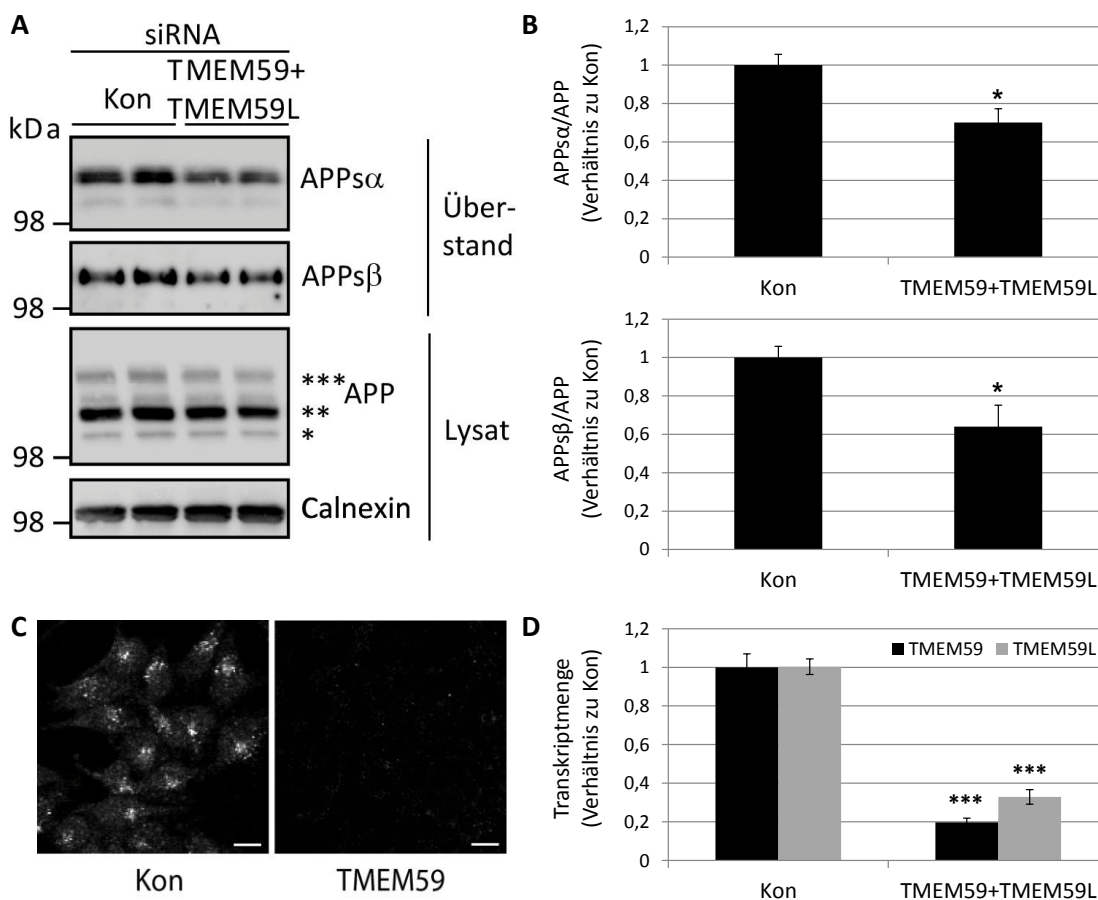
**Abbildung 14: TMEM59-Effekte auf den Transport von YFP-APP.**

HEK293E-Zellen wurden transient mit pShuttle/CMV-YFP-APP (Eehalt et al., 2003) und A) Kontroll-Plasmid peak12-Luziferase (Kon) bzw. B) peak12-TMEM59-HA ko-transfiziert. Nach 24 h Inkubation wurden konfokale Lebendzellaufnahmen angefertigt. Rote Pfeile markieren die Plasmamembran, weiße Pfeile den Golgi-Apparat und der blaue Pfeil die perinukleäre ER-Region. Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu\text{m}$ .

#### 3.1.8 Auch der Doppel-„Knockdown“ von TMEM59 und TMEM59L verändert die Ektodomänenspaltung von APP

Wie eingangs erwähnt, beruhten alle bisherigen Erkenntnisse über TMEM59 und sein Homologes TMEM59L auf verstärkter Expression von TMEM59. Daher sollen nun die Auswirkungen der Depletierung dieser Proteine untersucht werden. Hierzu wurden „Knockdown“-Studien durchgeführt, in denen siRNAs transient in HEK293E-Zellen transfiziert wurden. Dieser Ansatz wurde bereits in einer vorangegangenen Dissertation

durchgeführt, konnte jedoch zu keinem aussagekräftigen Ergebnis gebracht werden. Dies könnte damit begründet werden, dass zum einen die erzielten „Knockdown“-Effizienzen nicht ausreichend stark waren oder zum anderen der transiente „Knockdown“ nicht ausreichend lang durchgeführt wurde. Deshalb wurde in vorliegender Arbeit zunächst das Protokoll für den transienten „Knockdown“ dahingehend optimiert, dass die Transfektion revers, also in Zellsuspensionen, und über einen längeren Zeitraum (72 h statt bisher 48 h), durchgeführt wurde. Des Weiteren wurde vormals mit einer sehr hohen siRNA Konzentration (100 nM) gearbeitet, was eventuell zu einer unspezifischen Toxizitätsreaktion in den Zellen führen könnte, welche wiederum Effekte des „Knockdowns“ auf die APP-Ektodomänenspaltung maskieren könnte. Daher wurde in vorliegender Arbeit die Konzentration auf 5 nM siRNA gesenkt. Somit wurden HEK293E-Zellen revers mit siRNA Pools gegen TMEM59 und/oder TMEM59L bzw. mit Kontroll-siRNAs (Kon, Kontroll-siRNAs 3 und 4) transfiziert. Nach 72 h Inkubation wurde die „Knockdown“-Effizienz bestimmt. Dies wurde sowohl für TMEM59 als auch für TMEM59L mittels spezifischer Oligonukleotid-Paare und einer spezifischen Sonde in der quantitativen „Real Time“-PCR bestimmt, da für beide Proteine keine Antikörper vorhanden waren, die sensitiv genug waren, um endogene Proteine in der Western Blot Analyse detektieren zu können. Lediglich für TMEM59 konnte der Beweis des „Knockdowns“ auch mit Hilfe von Immunofluoreszenzmikroskopie erbracht werden. Nach erfolgter Quantifizierung des „Knockdowns“ wurden, wie bereits beschrieben, die APP-Sekretion sowie die APP-Maturierung analysiert. In ersten Experimenten einer vorangegangenen Arbeit (Fischer, 2008), in denen nur entweder TMEM59 oder sein Homologes TMEM59L depletiert wurden, konnten keine signifikanten Änderungen in der APP-Ektodomänenspaltung oder Maturierung verzeichnet werden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass bei Fehlen des einen Homologen das andere die Funktion übernehmen kann, da bekannt ist, dass beide Proteine in HEK293-Zellen exprimiert sind (Elson et al., 1999). Übereinstimmend mit dieser Annahme konnte für den Doppel-„Knockdown“ beider Homologe eine moderate Reduktion der APP-Ektodomänenspaltung beobachtet werden. So konnte für die Produktion von APP $\alpha$  eine Abnahme um ca. 30 % und von APP $\beta$  eine Abnahme um ca. 40 % verzeichnet werden (siehe Abbildung 15A und 15B zugehörige Quantifizierung). Auch die Maturierung des endogenen, intrazellulären APP scheint eine leichte Abnahme aufzuweisen, diese erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.



**Abbildung 15: Effekte des „Knockdowns“ von TMEM59 und TMEM59L auf die Ektodomänenspaltung und die Maturierung von APP.**

A) HEK293E-Zellen wurden transient mit Kontroll-siRNAs (Kon) bzw. mit einer Mischung von siRNAs gegen TMEM59 und TMEM59L transfiziert. In den Zelllysaten wurden im Western Blot zelluläres APP (22C11) und Calnexin detektiert. Die Überstände wurden gegen sekretiertes APPs $\alpha$  (W02), APPs $\beta$  (192wt, nach BAWT 8C10 Immunopräzipitation) geblottet. B) Quantifizierung der APPs $\alpha$ -Produktion (oben) und der APPs $\beta$ -Produktion (unten) aus A). Dargestellt ist die Produktion von APPs $\alpha$  (W02) bzw. APPs $\beta$  (192wt, nach BAWT8C10 Immunopräzipitation) in Abhängigkeit von der Menge an APP im Lysat (22C11). Gezeigt sind die Mittelwerte und zugehörige Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten. \* p < 0,05 nach t Test. C) Endogenes TMEM59 kann in der Immunofluoreszenzmikroskopie nur in Kontroll-siRNA, nicht aber in TMEM59-siRNA behandelten Zellen detektiert werden. Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m. D) Quantifizierung der mRNA-Level von TMEM59 (schwarze Balken) und TMEM59L (graue Balken) mittels quantitativer „Real Time“-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen Expression und zugehörige Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten. \*\*\* p < 0,001 nach t Test.

Die schwache Ausprägung der genannten Effekte könnte damit zu begründen sein, dass zwar gute „Knockdown“-Effizienzen erzielt werden konnten (siehe Abbildung 15C und 15D), diese eventuell aber nicht ausreichend für prominentere Effekte waren. Möglicherweise reichen die verbleibenden mRNA-Mengen von TMEM59 (ca. 20 % verbleibend) bzw. von TMEM59L (ca. 30 % verbleibend), um die Grundfunktionen von TMEM59 und seinem

---

Homologen aufrechtzuerhalten und somit einen stärker ausgeprägten Phänotyp zu verhindern. Dieses Phänomen konnte bereits für ein anderes Protein, das Autophagie-Protein ATG5, beschrieben werden. So ist bekannt, dass ein „Knockdown“ von ATG5, bei dem nur 10 % des Proteins in der Zelle verbleiben, nicht ausreichend ist, den Prozess der Autophagie zu unterbinden. Nur bei einer deutlichen Reduktion der Proteinmenge unter 10 % konnte eine Verhinderung der Autophagie beobachtet werden (Hosokawa et al., 2006). Dementsprechend könnte es auch für TMEM59 und TMEM59L gelten, dass ein stärkerer „Knockdown“ erzielt werden müsste, um stärkere Effekte, beispielsweise auf die Maturierung von APP, zu erzielen. Um diesen stärkeren „Knockdown“ zu erzielen, wäre es notwendig potentere siRNA-Sequenzen zu finden, die einen stärkeren „Knockdown“ mit weniger als 20 bis 30 % verbleibenden mRNA-Mengen ermöglichen. In zukünftigen Studien könnten alternativ RNAi-basierte stabile „Knockdowns“ von TMEM59 und seinem Homologen mit Hilfe von shRNAs durchgeführt werden. Auch in diesem Ansatz wäre es zunächst notwendig, nach potenten shRNA-Sequenzen zu suchen, die eine stärkere Reduktion der verbleibenden mRNA-Mengen bewerkstelligen können.

## **3.2 Genomweites RNAi-„Screening“ zur Identifizierung neuer zellulärer Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP**

### **3.2.1 Etablierung eines Drosophila-„Screenings“**

Zur Identifizierung neuer zellulärer Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP wurde ein genomweites RNAi-basiertes „Screening“ in Drosophila-Schneider 2 (S2)-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden zunächst eine Reporterzelllinie und ein „Screening“-Verfahren etabliert.

#### **3.2.1.1 Etablierung einer Drosophila-Reporterzelllinie**

Die Grundvoraussetzung für ein erfolgreiches „Screening“ im genomweiten Maßstab ist eine geeignete Reporterzelllinie, die hoch reproduzierbare Daten und konsistente Ergebnisse in den gewählten Auswertungsverfahren ermöglicht. Daher wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Richard Page und Katrin Moschke eine Drosophila-S2-Reporterzelllinie etabliert. Diese Zelllinie konnte nicht mit einer stabilen Expression der gewünschten Reporterstrukture generiert werden, da die Selektion von S2-Zellen durch Antibiotikazusatz die Aufnahme der dsRNAs in die Zellen stark verminderte. Deshalb wurden in vorliegender Arbeit die gewünschten Reporterstrukture durch transiente Transfektion in S2-Zellen eingebracht: Zum einen wurden zwei unabhängige Reporter für die Ektodomänenspaltung von APP bzw. für die generelle Sekretion der Zelle und zum anderen ein Konstrukt zur Bestimmung der Transfektionseffizienz verwendet. Mit Hilfe dieser Reporter können somit Gene identifiziert werden, deren „Knockdown“ spezifisch zu einer Veränderung der Ektodomänenspaltung von APP führt, ohne dabei die generelle Sekretion der Zellen zu verändern. Das dritte Reporterkonstrukt wurde verwendet, um die erhaltenen Signale der ersten beiden Reporter in Relation zu der Transfektionseffizienz der Zellen setzen zu können.

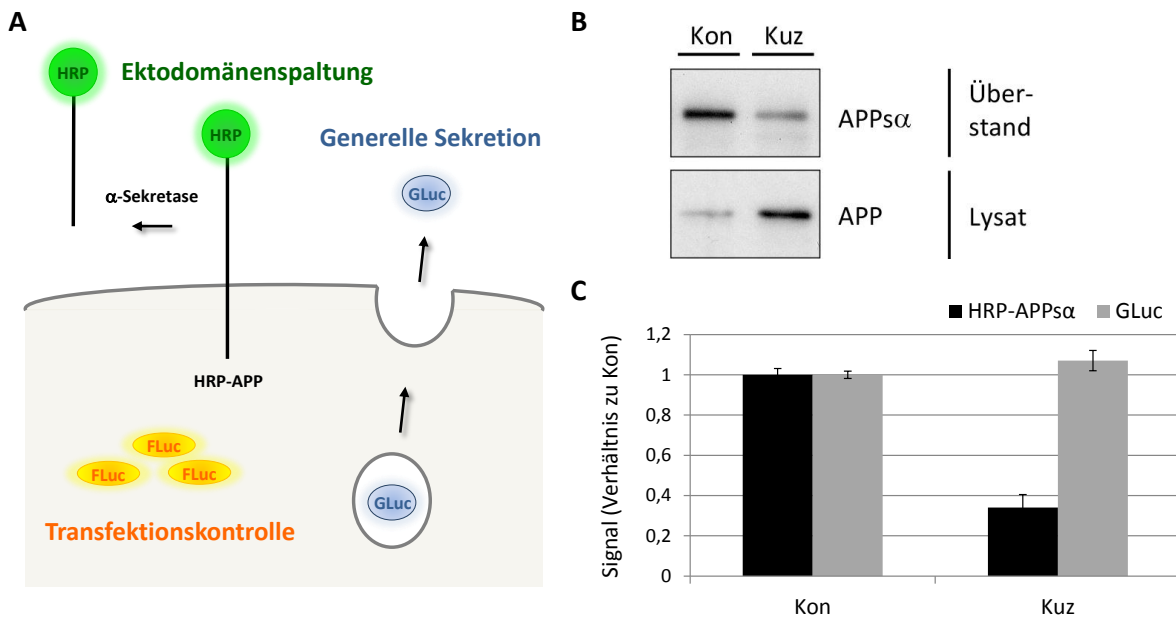
Das Reporterkonstrukt zur Detektion der Ektodomänenspaltung von APP ist ein Fusionsprotein aus der Meerrettich-Peroxidase (HRP, „horseradish peroxidase“) und APP (HRP-APP). Dieses Fusionsprotein wird in Drosophila nur durch die  $\alpha$ -Sekretase Kuzbanian prozessiert, nicht aber durch eine  $\beta$ -Sekretase-Aktivität, da in Drosophila kein BACE-homologes Protein exprimiert wird (Fossgreen et al., 1998; L. Q. Luo et al., 1990; Sapir et al., 2005; Takasugi et al., 2003). Dies ermöglichte die alleinige Detektion von  $\alpha$ -Sekretase-abgespaltener APP-Ektodomäne (HRP-APP $\alpha$ ) in den Überständen der transfizierten S2-

Zellen (Abbildung 16A). Wie aus Abbildung 16B und 16C hervorgeht, konnte belegt werden, dass zum einen das HRP-APP-Produkt von den Zellen gebildet und prozessiert wurde und zum anderen die Effizienz der RNAi in den transient transfizierten Zellen gegeben war: Wurden Zellen im Vergleich zu Kontrollbedingungen (dsRNAs gegen GFP) mit dsRNAs gegen Kuzbanian behandelt, so ist in den Überständen sowohl eine Abnahme der HRP-APP-Bande im Western Blot (Abbildung 16B) als auch eine Abnahme der Signalintensität der Peroxidase-Reaktion (Abbildung 16C) zu beobachten. Zeitgleich ist bei verringerter Prozessierung auch die typische Akkumulation der HRP-APP-Bande im Zelllysät zu beobachten (Abbildung 16B).

Um neben der Ektodomänenspaltung von APP auch die generelle zelluläre Sekretion bestimmen zu können, wurden die S2-Zellen neben HRP-APP auch mit einem Konstrukt der Gaussia-Luziferase (GLuc, „Gaussian luciferase“) transfiziert, dessen Produkt konstitutiv in den Überstand abgegeben wird (Abbildung 16A). Wie in Abbildung 16C gezeigt ist, konnte belegt werden, dass eine direkte Modulation der  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität (dsRNA gegen Kuzbanian) keinen Einfluss auf die generelle Sekretion der Zelle hat, da die Gaussia-Luziferase-Aktivität im Vergleich zu Kontrollbedingungen nicht verändert wurde. Somit konnte diese Luziferase als Reporter für RNAi-Effekte auf die generelle Sekretion der Zelle herangezogen werden.

Um eventuell unterschiedlich starke Transfektionsraten ermitteln zu können, wurde ein drittes Konstrukt transfiziert: die „Firefly luciferase“ (FLuc), welche zytosolisch vorliegt und somit zur Lumineszenzermittlung im Zelllysät und als Referenz für die anderen beiden Reporterkonstrukte verwendet werden kann (Abbildung 16A).

Somit konnte erfolgreich eine adäquate „Screening“-Zelllinie etabliert werden, die zum einen die notwendigen Reporterkonstrukte exprimiert und zum anderen die effiziente Durchführung von RNAi-Studien erlaubt.



**Abbildung 16: Etablierung einer Drosophila-Reporterzelllinie.**

A) Schematische Darstellung einer Drosophila-S2-Zelle mit den Reporterkonstrukten des RNAi-„Screenings“: HRP-APP (pAc5.1-HRP-APP, grün), GLuc (pAc5.1-GLuc, blau) und FLuc (pAc5.1-FLuc, gelb). B) S2-Zellen wurden transient mit pAc5.1-HRP-APP transfiziert. Zeitgleich wurden diese Zellen mit dsRNAs gegen GFP (Kon) oder mit dsRNAs gegen Kuzbaninan (Kuz) behandelt. In den Zelllysaten wurde im Western Blot zelluläres HRP-APP (22C11) nachgewiesen. Die Überstände wurden gegen sekretiertes HRP-APPsα (22C11) geblottet. C) S2-Zellen wurden transient mit pAc5.1-HRP-APP und pAc5.1-GLuc ko-transfiziert. Zeitgleich wurden diese Zellen mit dsRNAs gegen GFP (Kon) oder mit dsRNAs gegen Kuzbaninan (Kuz) behandelt. In den konditionierten Überständen wurden die Aktivitäten der Meerrettich-Peroxidase des sekretierten APP-Fusionsproteins (HRP-APPsα) und der sekretierten Gaussia-Luziferase (GLuc) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von sechs unabhängigen Experimenten.

### 3.2.1.2 Etablierung eines „Screening“-Verfahrens in Drosophila-S2-Zellen

Das Verfahren für das genomweite RNAi-„Screening“ in Drosophila-Zellen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Richard Page und in Kollaboration mit dem Labor von Prof. Dr. Michael Boutros am DKFZ in Heidelberg etabliert. Zunächst wurden die Parameter für die Aufnahme der dsRNAs in die S2-Zellen, die nachfolgende transiente Transfektion der S2 Zellen mit den Reporterkonstrukten sowie die Miniaturisierung der Reaktionen in 384-well-Platten-Format optimiert. So wurden die S2-Zellen (20.000 Zellen/well) zunächst unter Serum-freien Bedingungen mit den dsRNAs inkubiert, die ohne weiteren Zusatz von Transfektionsreagenz in die Zellen aufgenommen werden (Boutros et al., 2004). Nach Zusatz von Serum-haltigem Medium und Übernachtinkubation konnten diese Zellen nun transient mit den Reporterkonstrukten transfiziert werden. Hierbei wurde das lipidbasierte Transfektionsreagenz Effectene verwendet, um jeweils 21 ng des HRP-APP Plasmids und des

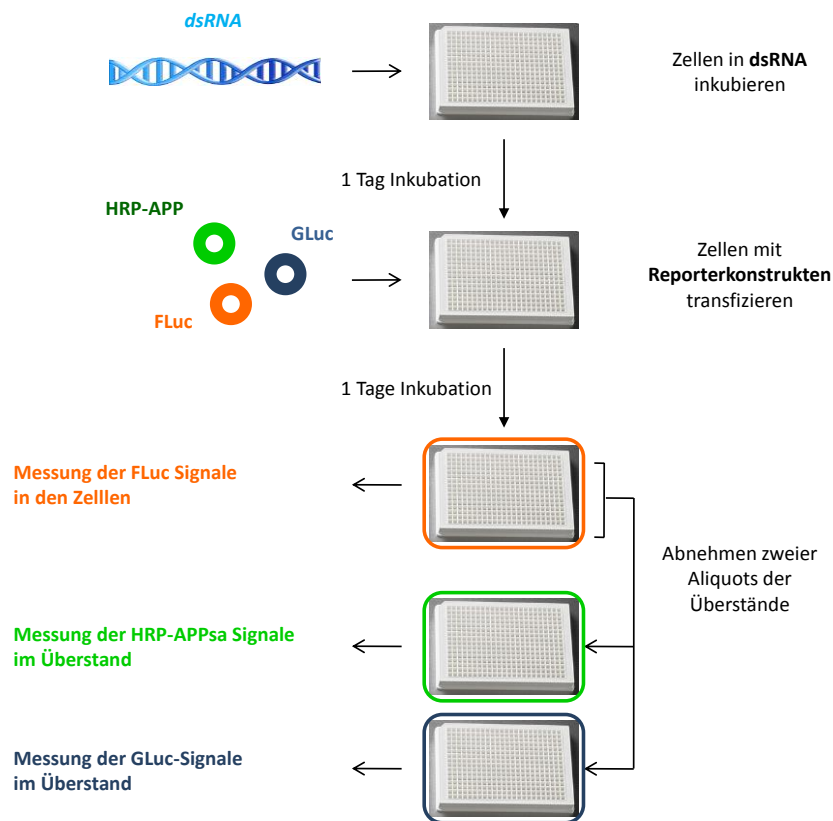
GLuc Plasmids und 8 ng des FLuc Plasmids in die Zellen eines wells einzuschleusen. Diese DNA-Mengen waren ausreichend, um nach einer zweitägigen Inkubation deutliche Signale der Reporter zu erhalten. Des Weiteren wurden die Bedingungen für die Detektion der Signale von HRP, GLuc und FLuc so festgelegt, dass zum einen eine hohe Sensitivität erreicht und zum anderen eine hohe Stabilität der Signale erhalten wurde. Diesen Ansprüchen entsprach die Detektion der HRP-Signale bzw. der GLuc-Signale bei Verwendung des HRP-Substrates „Immobilon Western HRP“ bzw. des GLuc-Substrates „GAR-2B“. Dabei wurden 10 µl bzw. 30 µl Aliquots der Überstände der S2-Zellen verwendet. Die Messung der FLuc-Signale konnte durch Verwendung des FLuc-Substrats „Steady Lite HTS“ ohne vorherige Zelllyse durchgeführt werden. Auch hier konnten starke, stabile Signale erhalten werden.

In Zusammenarbeit mit dem DKFZ Labor wurden in diversen „Prä-Screenings“ die Bedingungen für das genomweite „Screening“ simuliert. Hierbei wurden vor allem das Roboter-basierte Vorgehen getestet und die Reproduzierbarkeit der Daten überprüft. Nach Abschluss dieser Vorbereitungen konnte das Verfahren für das genomweite „Screening“ wie folgt festgelegt werden: Die vom DKFZ Labor synthetisierte und im Rahmen dieser Kollaboration zur Verfügung gestellte dsRNA-Bibliothek (Horn et al., 2010), die das gesamte Drosophila Genom abdeckt, wurde für das geplante genomweite „Screening“ in 384-well-Platten gegeben. Dabei wurden als Positivkontrolle auf jeder Platte mehrfach dsRNAs gegen Kuzbanian aufgebracht. Die Depletierung von Kuzbanian, welches die ADAM10-homologe  $\alpha$ -Sekretase der APP-Prozessierung in Drosophila darstellt (Sapir et al., 2005), sollte zu einer Verminderung der Ektodomänenspaltung von APP führen und somit die „Screening“-Strategie verifizieren. Im Ganzen wurden auf diese Weise 90 (2 x 45) 384-well-Platten präpariert, da das genomweite „Screening“ in Duplikaten durchgeführt wurde.

Die beschriebenen dsRNA-enthaltenden 384-well-Platten wurden darauf folgend mit Hilfe eines Dispensers mit einer Drosophila-S2-Zellsuspension beschickt und für einen Tag inkubiert, so dass die dsRNA von den Zellen aufgenommen werden konnte. Darauf erfolgte die transiente Transfektion der Zellen mit den drei beschriebenen Reporterkonstrukten – auch dieser Schritt wurde automatisiert mit Hilfe eines Dispensers durchgeführt. Nach weiterer zweitägiger Inkubation wurden mit Hilfe eines Pipettier-Roboters zwei Aliquots der konditionierten Überstände abgenommen und in frische 384-well-Platten überführt. Daraufhin konnten in den Zellen die Signale der FLuc gemessen werden. In den konditionierten Überständen wurden die Signale der HRP und der GLuc gemessen. Die notwendigen



Pipettier-Schritte zur Detektion der Reportersignale wurden erneut mit Hilfe von Dispensern vorgenommen. Dieses „Screening“-Verfahren, das in Kollaboration mit dem Boutros Labor des DKFZ erfolgreich etabliert werden konnte, ist schematisch in Abbildung 17 dargestellt.



#### Abbildung 17: Etablierung eines „Screening“-Verfahrens.

Drosophila-S2-Zellen wurden in 384-well-Platten, die bereits mit Aliquots von dsRNAs beschriftet wurden, ausplattiert und inkubiert. Nach einem Tag Inkubation wurden die Zellen zusätzlich transient mit den drei Reporterkonstrukten transfiziert. Nach einer weiteren Inkubationsphase von zwei Tagen wurden zwei Aliquots der konditionierten Überstände abgenommen und in frische 384-well-Platten überführt. Daraufhin konnte die Transfektionseffizienz der Zellen anhand der Signale der FLuc (gelb) gemessen werden. In den konditionierten Überständen wurden die Ektodomänenspaltung (Signale der HRP, grün) und die generelle Sekretion (Signale der GLuc, blau) bestimmt.

#### 3.2.2 Auswertung und Resultate des genomweiten Drosophila RNAi-„Screenings“

Das genomweite Drosophila RNAi-„Screening“ wurde in zwei Schritten durchgeführt: Im Primär-„Screening“ wurden alle ~ 15.000 Gene von Drosophila und im Sekundär-„Screening“ wurden alle interessanten Kandidatengene aus dem Primär-„Screening“ erneut mittels RNAi-Studien untersucht.

Die Auswertung der erhaltenen Datensätze erfolgte durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Boutros unter Verwendung der „High throughput-Screening“-Software

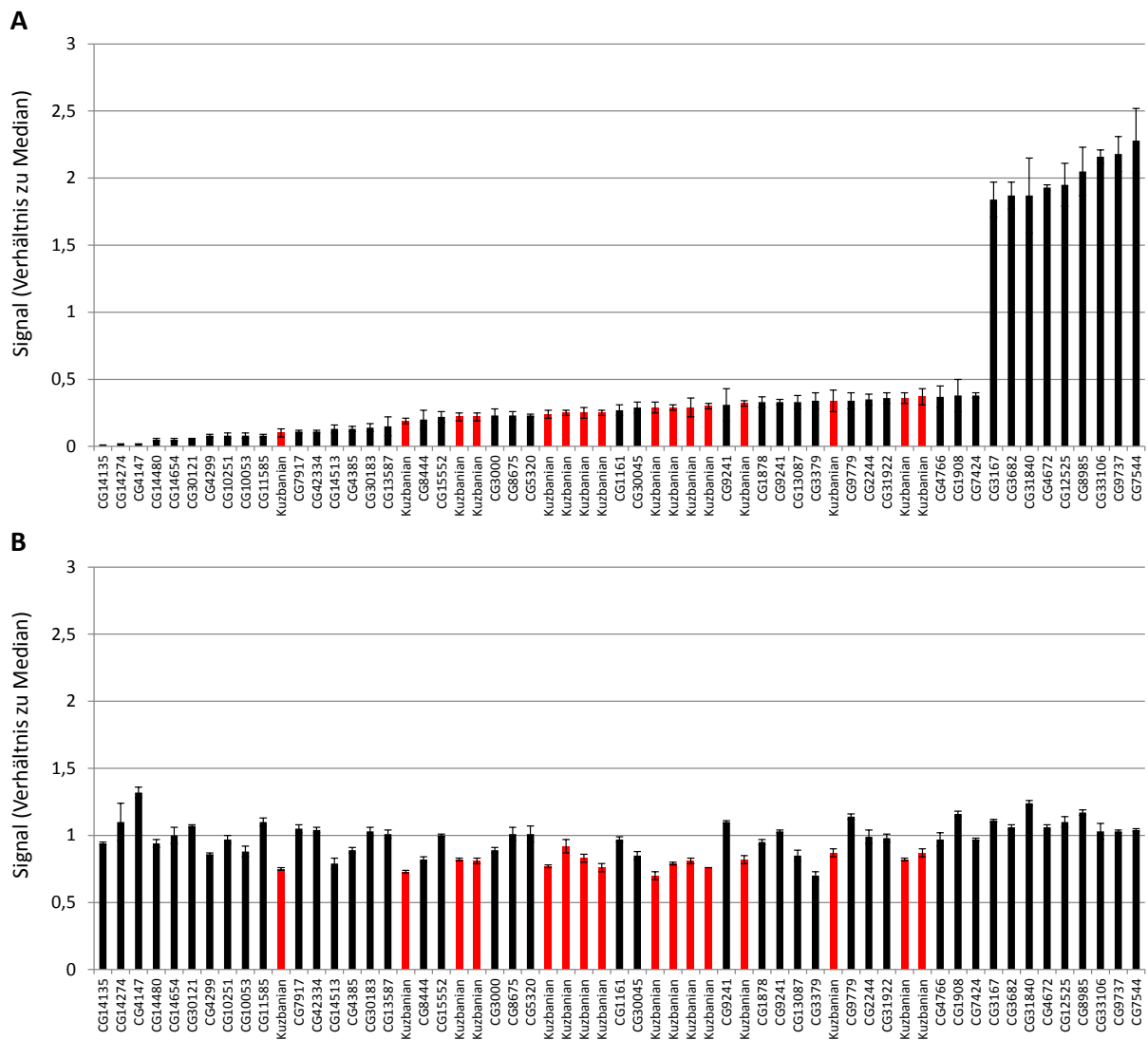
CellHTS (Boutros et al., 2006). Dabei wurden die Signale des HRP-APP $\alpha$  bzw. der sekretierten GLuc im Überstand auf die FLuc-Signale der Zellen normalisiert, um so Unterschiede in den Transfektionseffizienzen zu berücksichtigen. Mit Hilfe der Software CellHTS konnten neben Unterschieden in der Transfektionseffizienz auch technische Probleme und Variationen zwischen den Duplikaten ermittelt und berücksichtigt werden. Im Primär-„Screening“ wurden Gene als positiv gewertet, deren „Knockdown“ mittels dsRNAs zu einer deutlichen Zunahme oder Abnahme der APP-Ektodomänenspaltung (HRP-APP $\alpha$ ), nicht aber zu einer Veränderung der generellen Sekretion (GLuc) oder der Zellviabilität (FLuc) führte. Mit Hilfe dieses Evaluierungsverfahrens des Primär-„Screenings“ konnte eine Liste mit ca. 300 Kandidatengenen für eine weitere Untersuchung im Sekundär-„Screening“ erstellt werden. Die „Screening“-Strategie wurde durch das wiederholte Auftreten der Positivkontrolle Kuzbanian unter den stärksten Modulatoren der Produktion von HRP-APP $\alpha$  validiert.

Die ca. 300 Kandidatengene aus dem Primär-„Screening“ wurden unter vergleichbarem experimentellem Vorgehen erneut mit RNAi-Studien adressiert. Im Sekundär-„Screening“ wurden allerdings Triplikate anstatt wie bisher Duplikate untersucht. Zur Evaluierung der erhaltenen Daten wurde erneut das Signal des HRP-APP $\alpha$  bzw. der sekretierten GLuc auf die Transfektionseffizienz in Form der FLuc-Signale normalisiert (FLuc-normalisierte Daten). Um die Stärke der Effekte auf die Produktion von HRP-APP $\alpha$  und die Sekretion bewerten zu können, wurden die FLuc-normalisierten Daten ins Verhältnis zum Median aller FLuc-normalisierten Daten des Sekundär-„Screenings“ gesetzt (Median-normalisierte Daten). Daraufhin konnten die Mittelwerte der Median-normalisierten Daten der Triplikate gebildet und der resultierende Standardfehler errechnet werden. Durch Sortieren der erhaltenen Datensätze nach der Größe der Median-normalisierten Daten konnten die stärksten Modulatoren der Ektodomänenspaltung von HRP-APP in *Drosophila-S2*-Zellen identifiziert werden.

Für die weitere Untersuchung in humanen Zellen wurden Gene ausgewählt, deren „Knockdown“ mittels dsRNAs in *Drosophila-S2*-Zellen, eine Abnahme bzw. Zunahme der Ektodomänenspaltung von APP auf weniger als 40 % bzw. auf mehr als 180 % des Medians zeigte. Diese Kriterien wurden von 43 Genen erfüllt – die untersuchten Effekte dieser Kandidaten sind in untenstehender Abbildung 18 dargestellt. Aus Abbildung 18A geht der Effekt der dsRNAs gegen die untersuchten Gene auf die Ektodomänenspaltung von APP

---

hervor, während Abbildung 18B die Effekte der dsRNAs gegen die untersuchten Gene auf die generelle zelluläre Sekretion zeigt. Auch hier ist festzuhalten, dass die hohe Identifizierungsrate von dsRNAs gegen Kuzbanian und die starken Effekte dieses „Knockdowns“ die Strategie des „Screening“-Verfahrens validieren konnten. Interessanterweise wurden hier zusätzlich Gene gefunden, deren „Knockdown“ sogar zu einer noch stärkeren Abnahme der Ektodomänenspaltung von APP führte als der „Knockdown“ von Kuzbanian. Für einige Gene wurde bei „Knockdown“ eine drastische Zunahme der APP-Ektodomänenspaltung im Vergleich zum Median aller untersuchten Gene beobachtet. Wie im Primär-„Screening“ als Ausschlusskriterium verwendet, zeigten die hier dargestellten Gene bei „Knockdown“ keine starken Veränderungen der generellen Sekretion (siehe Abbildung 17B) im Vergleich zu den tiefen Effekten auf die APP-Ektodomänenspaltung. Somit konnten mit der Kombination des Primär- und des Sekundär-„Screenings“ erfolgreich 43 Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP, nicht aber der generellen Sekretion der Zelle in *Drosophila*-S2-Zellen identifiziert werden.



**Abbildung 18: Darstellung der Effekte der 43 Kandidatengene des Sekundär-„Screenings“ in Drosophila-S2-Zellen auf die Ektodomänenspaltung von APP (A) und auf die generelle zelluläre Sekretion (B).**

A) Darstellung der Effekte des „Knockdowns“ der 43 Kandidatengene auf die Ektodomänenspaltung von HRP-APP nach Normalisierung auf den Median des gesamten Sekundär-„Screenings“. Die y-Achse zeigt die HRP-APP $\alpha$ -Werte, die bereits mit der Transfektionseffizienz korrigiert wurden. B) Darstellung der Effekte des „Knockdowns“ der 43 Kandidatengene auf die generelle zelluläre Sekretion von GLuc nach Normalisierung auf den Median des gesamten Sekundär-„Screenings“. Die y-Achse zeigt die GLuc-Werte, die bereits mit der Transfektionseffizienz korrigiert wurden. In beiden Diagrammen (A und B) sind auf der X-Achse die Drosophila Annotationen der identifizierten Gene angegeben. Rot hervorgehobene Balken zeigen die Effekte der dsRNAs gegen Kuzbanian. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Triplikate des Sekundär-„Screenings“.

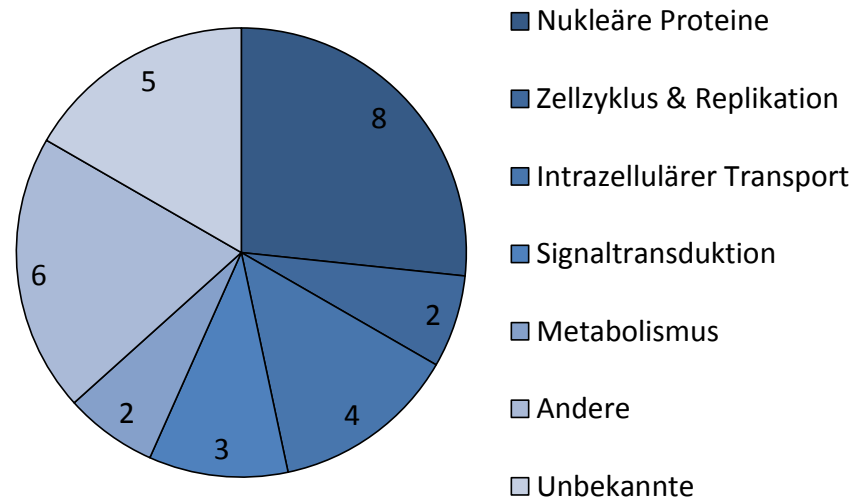
### 3.2.3 Identifizierung orthologer humaner Gene zu den Kandidatengenenen aus dem *Drosophila* RNAi-„Screening“

Nachdem erfolgreich die finale Kandidatenliste aus der Kombination des Primär- und des Sekundär-„Screenings“ in *Drosophila* erstellt wurde, wurden zunächst orthologe humane Gene zu diesen Kandidaten identifiziert. Da die Alzheimer-Demenz eine humane Krankheit ist, sollte in menschlichen Zellen überprüft werden, ob die in *Drosophila* identifizierten Kandidaten auch in menschlichen Zellen als Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP auftreten. Hierzu wurden von der *Drosophila*-spezifischen Datenbank „Flybase“ (<http://flybase.org/>) die Translationen der annotierten Gene aller 43 Kandidaten erhalten und mit Hilfe des sogenannten „Blast“ Werkzeugs mit dem humanen Proteom verglichen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Auf diese Weise wurden für 30 der *Drosophila*-Kandidatengene humane orthologe Gene gefunden. Für die verbleibenden 13 Kandidaten wurden keine konservierten oder ähnlichen Verwandten im humanen Proteom identifiziert. Diese Kandidatengene konnten daher nicht weiter in humanen Zellen untersucht werden.

Neben den Proteinsequenzen der humanen orthologen Gene und deren Annotationen bietet das „National Center for Biotechnology Information“ („NCBI“, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) auch die gebräuchlichen Gennamen sowie die allgemeingültigen „Entrez Gene“-Nummern („GeneID“) und die Annotationen der Transkripte (REFSEQ) (allgemeingültig nach NCBI) an. Neben deren Identität konnte mit Hilfe einer weiteren Datenbank („BioGPS“, <http://biogps.org/>) für alle 30 humanen orthologen Gene die Expression der Transkripte im Gehirn festgestellt werden.

Um einen ersten Überblick über die identifizierten humanen orthologen Gene zu bekommen, wurden die 30 Gene verschiedenen Gruppen zugeordnet. Dazu wurde auf bereits publiziertes Wissen, das in gängigen Datenbanken wie „NCBI“ oder „GeneCards“ (<http://www.genecards.org/>) zugänglich ist, zurückgegriffen. Konnten keine Publikationen zu einem Gen gefunden werden, so erfolgte dessen Kategorisierung auf Grund potentieller subzellulärer Lokalisierungen oder postulierter Funktionen. Mit den erhaltenen Informationen konnten unten dargestellte Gruppierungen durchgeführt werden (siehe Abbildung 19). Einige der identifizierten Gene codieren für Proteine, die eine nukleäre Lokalisierung aufweisen, dabei zum Teil auch mit DNA und/oder RNA interagieren, oder deren Produkte in Zellzyklus und Replikation der genomischen DNA involviert sind. Interessanterweise konnten auch Proteine anderer Klassen mit zentraler biologischer Bedeutung identifiziert werden: so finden

sich auch Proteine mit Funktionen im intrazellulären Transport, in der Signaltransduktion oder im zellulären Metabolismus. Eine weitere Gruppe von Genen wurde hier unter „Andere“ zusammengefasst, da deren Proteine vielfältige Funktionen haben und somit für eine Vielzahl zellulärer Prozesse von Bedeutung sind. Einige Gene sind bis auf ihre Annotation bis dato vollkommen unbekannt und nicht weiter charakterisiert.



**Abbildung 19: Gruppierung der 30 humanen orthologen Gene nach deren biologischer Funktion.**

Darstellung der 30 humanen orthologen Gene zu den initialen Kandidaten des Drosophila-„Screenings“ nach deren Zuordnung zu unterschiedlichen biologischen Gruppen.

#### 3.2.4 Etablierung eines „Screening“-Verfahrens in humanen SH-SY5Y-Zellen

Das „Screening“ nach neuen zellulären Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP in Drosophila-S2-Zellen führte zu 30 Kandidaten, für die humane orthologe Gene existieren. Zur weiteren Untersuchung dieser potentiellen humanen Kandidaten sollten RNAi-Studien dieser Gene in einer humanen Zelllinie durchgeführt werden. Hierzu wurde die Zelllinie SH-SY5Y gewählt, da diese Linie aus einem humanen Neuroblastom generiert wurde und somit Ähnlichkeiten zum neuronalen Zelltyp aufweist (Rettig et al., 1987).

Zur weiteren Untersuchung der 30 humanen Kandidatengene wurde zunächst ein experimentelles Vorgehen etabliert, in dem siRNAs transient in wildtyp-SH-SY5Y-Zellen transfiziert und anschließend deren Effekte auf die Ektodomänenspaltung von APP untersucht werden sollten. Dabei wurden die transient transfizierten siRNAs zunächst in Form von Pools, bestehend aus vier unterschiedlichen einzelnen siRNA-Sequenzen, verwendet. Um mit

diversen siRNA-Sequenzen arbeiten zu können, wurden diese siRNA-Pools von zwei Firmen, Dharmacon und Qiagen, bezogen. Nach der Transfektion in SH-SY5Y-Zellen wurden die Effekte der Depletierung der untersuchten Gene auf die APP-Ektodomänenspaltung untersucht. Da in SH-SY5Y-Zellen, im Gegensatz zu Drosophila-S2-Zellen, sowohl die  $\alpha$ -Sekretase als auch die  $\beta$ -Sekretase in der APP-Ektodomänenspaltung aktiv sind, sollten die Effekte auf beide APP-Spaltprodukte evaluiert werden. Diese beiden löslichen Formen von APP können mit Hilfe des APP $\alpha$ - und APP $\beta$ -Assay zeitgleich in einem Duplex-Verfahren detektiert werden (von Einem et al., 2010). Dabei ist diese Nachweismethode sensitiv genug, um die Spaltprodukte des endogen vorhandenen APPs detektieren zu können, so dass auf die Verwendung eines Reporterkonstrukts verzichtet werden konnte.

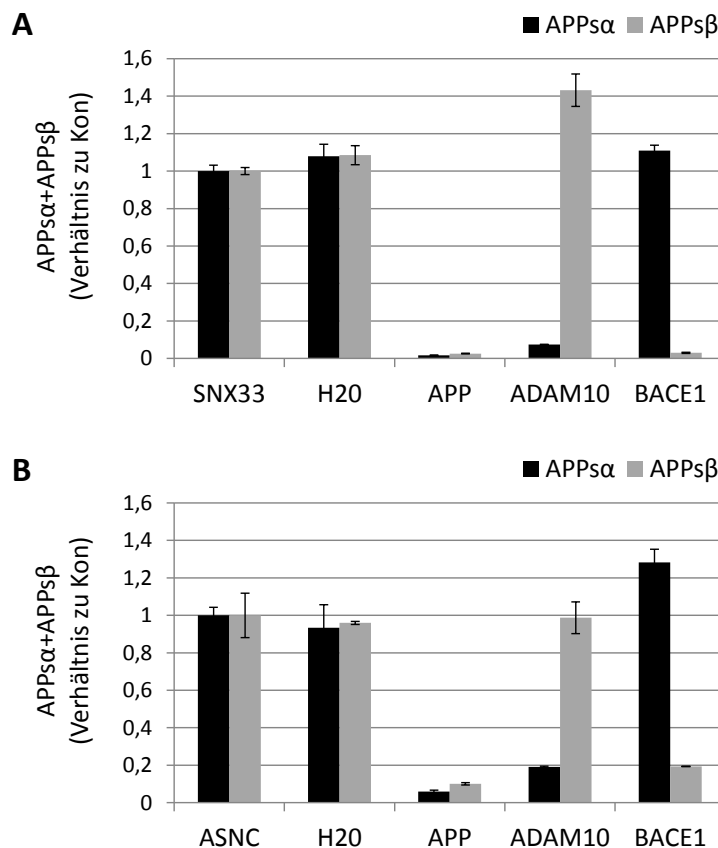
Um sicherzustellen, dass diese Vorgehensweise für die weiteren Untersuchungen der Kandidatengene geeignet ist, wurden zunächst die experimentellen Rahmenbedingungen anhand von Negativ- und Positivkontrollen überprüft. Unter Kontrollbedingungen wurden SH-SY5Y-Zellen transient mit Kontroll-siRNAs transfiziert. Für Experimente mit Dharmacon siRNA-Pools diente dabei ein siRNA-Pool gegen humanes SNX33 als Kontrolle, da dessen „Knockdown“ keinen Einfluss auf die Ektodomänenspaltung von APP in HEK293-Zellen hat (Schobel et al., 2008). Für Experimente mit Qiagen siRNA-Pools wurde eine Kontroll-siRNA, die unter dem Namen „AllStars Negative Control siRNA“ (ASNC) erhältlich ist und sich gegen kein bekanntes humanes Transkript richtet, verwendet. Neben diesen Negativkontrollen wurden auch Zellen, die mit „Wasser“ anstelle eines siRNA-Pools transfiziert wurden, untersucht. Diese „Wasser“-Kontrolle wurde einbezogen, um potentielle, unspezifische Effekte der verwendeten Kontroll-siRNAs festzustellen. Als Positivkontrollen wurden siRNA-Pools von Dharmacon und Qiagen gegen humanes APP, ADAM10 und BACE1 untersucht. Diese Positivkontrollen sind essentiell, um zum einen die „Knockdown“-Effizienzen eines Experiments abzuschätzen und zum anderen die Spezifität der Signale des APP $\alpha$ - und APP $\beta$ -Assays für die APP-Spaltprodukte zu verifizieren.

Die Ergebnisse der Etablierung eines geeigneten Verfahrens zur Überprüfung der 30 humanen Kandidatengene sind in untenstehender Abbildung 20 dargestellt. Abbildung 20A und 20B zeigen jeweils die Negativ- und Positivkontrollen der RNAi-Studien mit Dharmacon bzw. Qiagen siRNA-Reagenzien. Nach transienter Transfektion der siRNA-Reagenzien (5 - 10 nM) in SH-SY5Y-Zellen wurden deren Effekte auf die Ektodomänenspaltung von APP durch Normalisierung auf die jeweilige Negativkontrolle bestimmt. Zunächst ist hier festzuhalten,

dass die gewählten Negativkontrollen SNX33 bzw. ASNC sehr ähnlich zur „Wasser“-Kontrolle waren und somit unspezifische RNAi-Effekte der Kontrollen ausgeschlossen werden konnten. Daher konnten diese Kontrollen als Negativkontrollen für weitere Untersuchungen verwendet werden. Auch die hier gezeigten Positivkontrollen konnten in weiteren Studien verwendet werden, da für alle die erwarteten Effekte vermerkt werden konnten. So zeigt der „Knockdown“ von APP durch die entsprechenden siRNA-Pools beider Firmen eine starke Abnahme der Signale für APPs $\alpha$  und APPs $\beta$ . Dies belegt zum einen, dass ein potenter „Knockdown“ mit beiden siRNA-Pools erreicht und zum anderen die Spezifität der Signale des APPs $\alpha$ - und APPs $\beta$ -Assays verifiziert werden konnten. Diese Befunde werden durch die anderen beiden Positivkontrollen bestätigt: Der „Knockdown“ von ADAM10 zeigte die erwartete Abnahme in der Produktion von APPs $\alpha$ , wobei im Fall des Dharmacon siRNA-Pools auch eine leichte Zunahme der APPs $\beta$ -Menge beobachtet wurde. Der „Knockdown“ von BACE1 reduzierte die Produktion von APPs $\beta$  um ein vielfaches, wobei hier im Fall des Qiagen siRNA-Pools auch eine leichte Zunahme der APPs $\alpha$ -Menge festgestellt wurde. Die geringen Unterschiede zwischen den siRNA-Pools beider Firmen sind vermutlich auf unterschiedliche sequenzabhängige „off target“-Effekte zurückzuführen (Jackson et al., 2003).

Die Identifizierung geeigneter Negativkontrollen und die erwartungsgemäßen Effekte der Positivkontrollen auf die Ektodomänenspaltung von APP bestätigen, dass die gewählte Strategie zur weiteren Untersuchung der potentiellen humanen Kandidatengene verwendet werden konnte. Diese umfasst die transiente Transfektion von siRNA-Reagenzien zum „Knockdown“ der Kandidatengene in wildtyp-SH-SY5Y-Zellen und den Nachweis der endogen vorhandenen APP-Spaltprodukte mit dem sensitiven und spezifischen APPs $\alpha$ - und APPs $\beta$ -Assay.





**Abbildung 20: Darstellung der Negativ- und Positivkontrollen der RNAi-Experimente mit Dharmacon und Qiagen siRNA-Reagenzien.**

A) SH-SY5Y-Zellen wurden transient mit den angegebenen Dharmacon siRNA-Pools (5 nM) transfiziert. Anschließend wurden im konditionierten Medium die Spaltprodukte APPs $\alpha$  und APPs $\beta$  detektiert und auf Kontrollbedingungen normalisiert. B) SH-SY5Y-Zellen wurden transient mit den angegebenen Qiagen siRNA-Reagenzien (10 nM) transfiziert. Die Auswertung erfolgte wie in A) beschrieben. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

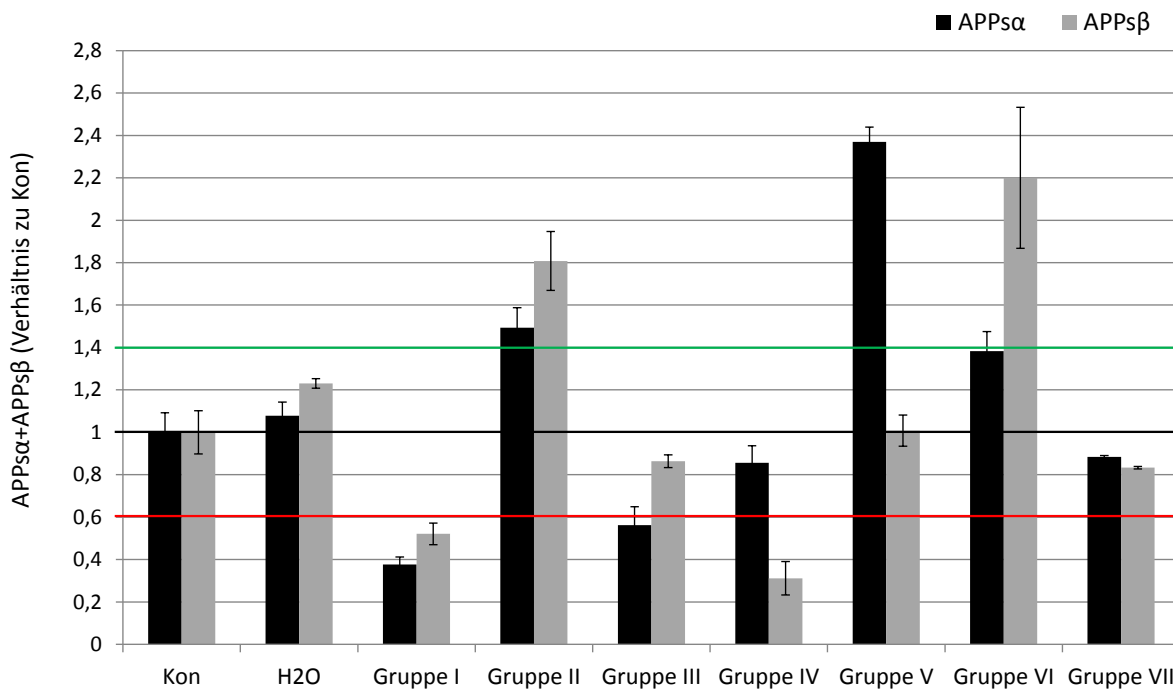
### 3.2.5 Untersuchung der humanen orthologen Gene mit Dharmacon siRNA-Pools

Nach der erfolgreichen Identifizierung der 30 humanen Orthologen wurden diese Kandidatengene in RNAi-Experimenten mit Dharmacon siRNA-Pools weiter untersucht. Dabei wurde mit den etablierten experimentellen Bedingungen in humanen Neuroblastom SH-SY5Y-Zellen gearbeitet.

Die Ektodomänenspaltung von APP wird in den humanen SH-SY5Y-Zellen, im Gegensatz zu den *Drosophila*-S2-Zellen, sowohl durch  $\alpha$ -Sekretase als auch durch die  $\beta$ -Sekretase vermittelt. Deshalb sollen in den nachfolgenden RNAi-Studien der 30 Kandidatengene in SH-SY5Y-Zellen die Effekte auf die Sekretion der APP-Spaltprodukte APPs $\alpha$  und APPs $\beta$  untersucht werden. Nach „Knockdown“ der 30 potentiellen Kandidatengene wurden die

Effekte der Depletierung auf die APP-Ektodomänenspaltung durch Normalisierung auf Kontrollbedingungen festgestellt. Als interessante, weiter zu untersuchende Kandidaten wurden Gene gewertet, deren „Knockdown“ die Ektodomänenspaltung von APP durch die  $\alpha$ - oder die  $\beta$ -Sekretase auf weniger als 60 % reduzierte oder zu einer Zunahme von mehr als 140 % im Vergleich zu Kontrollbedingungen führte. Die erhaltenen Effekte konnten darauf folgend in Gruppen zusammengefasst werden (siehe Abbildung 21). Die Gruppe I ist mit 12 Mitgliedern die größte Gruppe und umfasst Gene, deren „Knockdown“ eine Abnahme der Produktion von sowohl APPs $\alpha$  als auch APPs $\beta$  zur Folge hatte. Eine Zunahme der Produktion von sowohl APPs $\alpha$  als auch APPs $\beta$  konnte nur für den „Knockdown“ eines Kandidaten beobachtet werden. Der „Knockdown“ von 7 bzw. 4 weiteren Kandidatengenen führte jeweils zu einer Abnahme von nur einer der Spezies APPs $\alpha$  oder APPs $\beta$  (Gruppe III und Gruppe IV). Zwei Gene zeigten bei „Knockdown“ eine deutliche Zunahme von entweder APPs $\alpha$  oder APPs $\beta$  (Gruppe V und Gruppe VI). Die Depletierung der verbleibenden 4 Kandidatengene führte zu keiner Änderung der Ektodomänenspaltung von APP (Gruppe VII).

Mit diesen Untersuchungen in SH-SY5Y-Zellen konnte demzufolge erfolgreich gezeigt werden, dass ausgehend von den initial identifizierten *Drosophila* Kandidatengenen auch 26 vielversprechende humane Kandidaten für die Modulation der Ektodomänenspaltung von APP identifiziert werden konnten.



**Abbildung 21: Kategorisierung der 30 humanen Kandidaten nach deren „Knockdown“-Effekten auf die Ektodomänenspaltung von APP.**

SH-SY5Y-Zellen wurden transient mit den Dharmacon siRNA-Pools gegen die 30 potentiellen Kandidatengene (5 nM) transfiziert. Anschließend wurden im konditionierten Medium die Spaltprodukte APPs $\alpha$  und APPs $\beta$  detektiert und auf Kontrollbedingungen normalisiert. Die Kategorisierung nach den Effekten auf die Ektodomänenspaltung von APP führte zu folgenden Gruppierungen, die an Hand repräsentativer Vertreter in oben stehendem Diagramm veranschaulicht wurden: Gruppe I bzw. II beinhaltet Kandidaten, deren „Knockdown“ sowohl APPs $\alpha$  als auch APPs $\beta$  verminderte ( $\leq 60\%$ ) bzw. erhöhte ( $\geq 140\%$ ). Gruppe III bzw. IV umfasst Kandidatengene, die bei „Knockdown“ entweder nur APPs $\alpha$  oder nur APPs $\beta$  reduzierten. Gruppe V bzw. VI schließt potentielle Kandidaten ein, deren „Knockdown“ entweder nur APPs $\alpha$  oder nur APPs $\beta$  erhöhten. Gruppe VII beinhaltet Gene, deren „Knockdown“ zu keiner Änderung in der Ektodomänenspaltung von APP führte. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten repräsentativer Vertreter der unterschiedlichen Gruppen.

### 3.2.6 Untersuchung der humanen orthologen Gene mit Qiagen siRNA-Pools

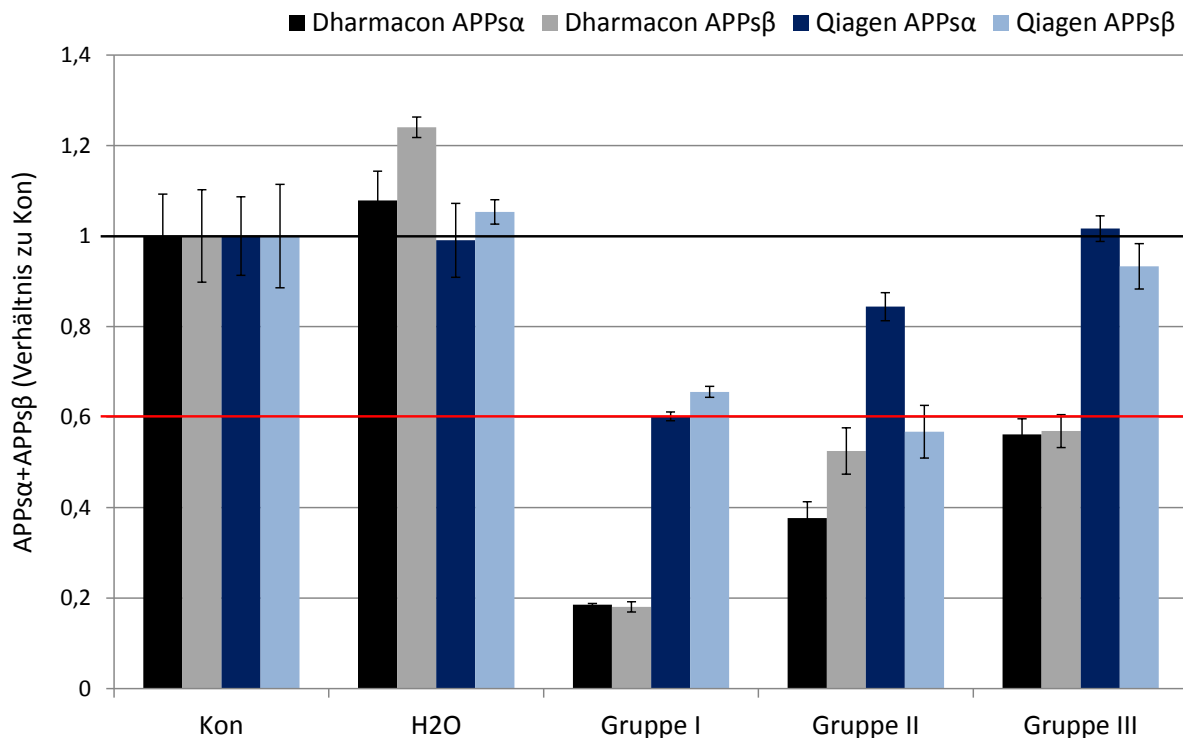
Um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte der 26 verbleibenden Kandidatengene durch deren „Knockdown“ und nicht durch unspezifische „off target“-Effekte auf Transkripte anderer Gene bedingt sind, ist es im RNAi-Feld üblich, die erhaltenen Effekte mit weiteren, unterschiedlichen siRNA-Sequenzen zu verifizieren (Echeverri et al., 2006; Sigoillot & King, 2011). Dabei wird üblicherweise zunächst ein siRNA-Pool einer anderen Firma verwendet. Dadurch, dass die Firmen ihre siRNA-Sequenzen mit unterschiedlichen Algorithmen generieren, ist in der Regel gewährleistet, dass unterschiedliche Regionen in den Zieltranskripten getroffen werden. Somit kann die erfolgreiche Reproduktion bereits

erhaltener Effekte dazu genutzt werden, mögliche „off target“-Effekte auszuschließen. Die Unterschiede in den siRNA-Sequenzen der Dharmacon und der Qiagen Pools wurden für alle verbleibenden 26 Kandidatengene überprüft.

Die RNAi-Studien der 26 verbleibenden potentiellen humanen Kandidaten mit den Qiagen siRNA-Pools wurden nach etabliertem Vorgehen durchgeführt. Auch hier wurden die Effekte des „Knockdowns“ der Kandidatengene auf die APP-Ektodomänenspaltung durch Normalisierung auf Kontrollbedingungen festgestellt. Die erzielten Effekte bei „Knockdown“ eines Gens mit dem Qiagen siRNA-Pool wurden mit denen des Dharmacon siRNA-Pools verglichen, um so „off target“-Effekte auszuschließen. Der Idealfall, bei dem die siRNA-Pools beider Firmen zu gleichen Effekten in der Ektodomänenspaltung von APP führen, konnte für vier Kandidatengene beobachtet werden (Gruppe I). Hierbei fällt dennoch auf, dass die Effekte, die durch den Dharmacon siRNA-Pool erzielt werden konnten, deutlich stärker waren. Dies könnte durch vermehrte „off target“-Effekte des Dharmacon Pools, die den Phänotyp verstärken könnten, zu erklären sein. Bei acht weiteren Kandidatengenen konnte durch den Qiagen siRNA-Pool nur der Effekt des Dharmacon Pools auf die Produktion von APPs $\beta$ , nicht aber auf APPs $\alpha$  reproduziert werden (Gruppe II). In diesem Fall konnten für beide Pools ähnlich starke Abnahmen von APPs $\beta$  beobachtet werden, während die Abnahme von APPs $\alpha$  nur bei Verwendung des Dharmacon Pools eintrat. Somit wurde angenommen, dass die anfangs beobachteten Änderungen in der Produktion von APPs $\alpha$  auf „off target“-Effekte der Dharmacon siRNA-Pools zurückzuführen sind. Für die verbleibenden vierzehn Kandidaten konnte mit den Qiagen siRNA-Pools kein dem Dharmacon Pool vergleichbarer Effekt auf die Ektodomänenspaltung von APP erzielt werden (Gruppe III). Auch in diesem Fall musste davon ausgegangen werden, dass die Effekte der Dharmacon siRNA-Pools durch „off target“-Effekte zustande gekommen sind. Da die Kandidaten der ersten beiden Gruppen (I und II) wahrscheinlich auf Effekten der Depletierung dieser Gene und vermutlich nicht oder nicht ausschließlich auf „off target“-Effekten basieren, wurden Gene dieser beiden Gruppen weiter untersucht. Untenstehende Abbildung 22 zeigt jeweils repräsentativ einen Vertreter der genannten Gruppen. Dargestellt sind die Effekte der „Knockdowns“ der Kandidatengene auf die Ektodomänenspaltung von APP nach Normalisierung auf entsprechend Kontroll-transfizierte Zellen.

Diese vergleichenden Analysen zweier siRNA-Pools ermöglichten somit das erfolgreiche Ausschließen von „off target“-Effekten und die weitere Eingrenzung von Kandidatengenen,

deren „Knockdown“ die Ektodomänenspaltung von APP moduliert.



**Abbildung 22: Gruppierung der 26 humanen Kandidaten nach der Reproduzierbarkeit der Effekte auf die APP-Ektodomänenspaltung mit Dharmacon und Qiagen siRNA-Pools.**

Darstellung der Effekte der 26 verbleibenden Kandidatengene nach RNAi-Studien mit Dharmacon siRNA-Pools (5 nM) und Qiagen siRNA-Pools (10 nM) in SH-SY5Y-Zellen. Durch Normalisierung der APP-Spaltprodukte auf Kontroll-transfizierte Zellen konnten die Effekte auf die Ektodomänenspaltung von APP bestimmt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten repräsentativer Vertreter der unterschiedlichen Gruppen. Die Gruppen lassen sich wie folgt beschreiben: Gruppe I schließt 4 Kandidaten ein, deren „Knockdown“ mit den siRNA-Pools beider Firmen ähnliche Effekte erzielt. Gruppe II umfasst 8 Kandidaten, deren „Knockdown“ mit den siRNA-Pools beider Firmen ähnliche Effekte auf die Produktion von APPsβ hat. Gruppe III beinhaltet 14 Gene, deren „Knockdown“ nur mit den siRNA-Pools von Dharmacon Effekte auf die Ektodomänenspaltung von APP zeigt.

### 3.2.7 Untersuchung der humanen orthologen Gene mit einzelnen siRNA-Sequenzen

Bis jetzt konnten für zwölf Kandidatengene Effekte auf die APPsα- und/oder APPsβ-Produktion mit zwei unabhängigen siRNA-Pools gezeigt werden. Die bisher dargestellten Untersuchungen der Kandidatengene in humanen Zellen gleichen dabei einem „Screening“, in dem nur die Kandidatengene, die zu Veränderungen in der Ektodomänenspaltung von APP führen, selektiert werden. Zur weiteren Verifizierung der Spezifität der erzielten Effekte und zum weiteren Ausschließen von „off target“-Effekten sollte daher nun die Korrelation des erhaltenen Phänotyps mit der Effizienz des „Knockdowns“ überprüft werden (Sigoillot &

King, 2011). Hierzu wurden RNAi-Studien mit den einzelnen siRNA-Sequenzen der siRNA-Pools durchgeführt, um anschließend deren Effekte auf die APP-Ektodomänenspaltung und deren „Knockdown“-Effizienz untersuchen zu können.

Nach Durchführung der RNAi-Experimente mit den unterschiedlichen siRNA-Sequenzen wurden zunächst die Effekte auf die APP-Ektodomänenspaltung mit Hilfe des APP $\alpha$ - und APP $\beta$ -Assays festgestellt. Im Anschluss daran wurden die „Knockdown“-Effizienzen mit der „SYBR Green“-basierten quantitativen „Real Time“-PCR bestimmt. In beiden Fällen wurden die erhaltenen Werte auf Kontrollbedingungen normalisiert. Anschließend wurde untersucht, ob die erzielten Effekte auf die APP-Ektodomänenspaltung durch den siRNA-Pool von den einzelnen siRNA-Sequenzen reproduziert werden konnten. Zum anderen wurde überprüft, ob die beobachteten Effekte auf die APP-Ektodomänenspaltung mit den jeweiligen „Knockdown“-Effizienzen der unterschiedlichen siRNA-Reagenzien korreliert sind.

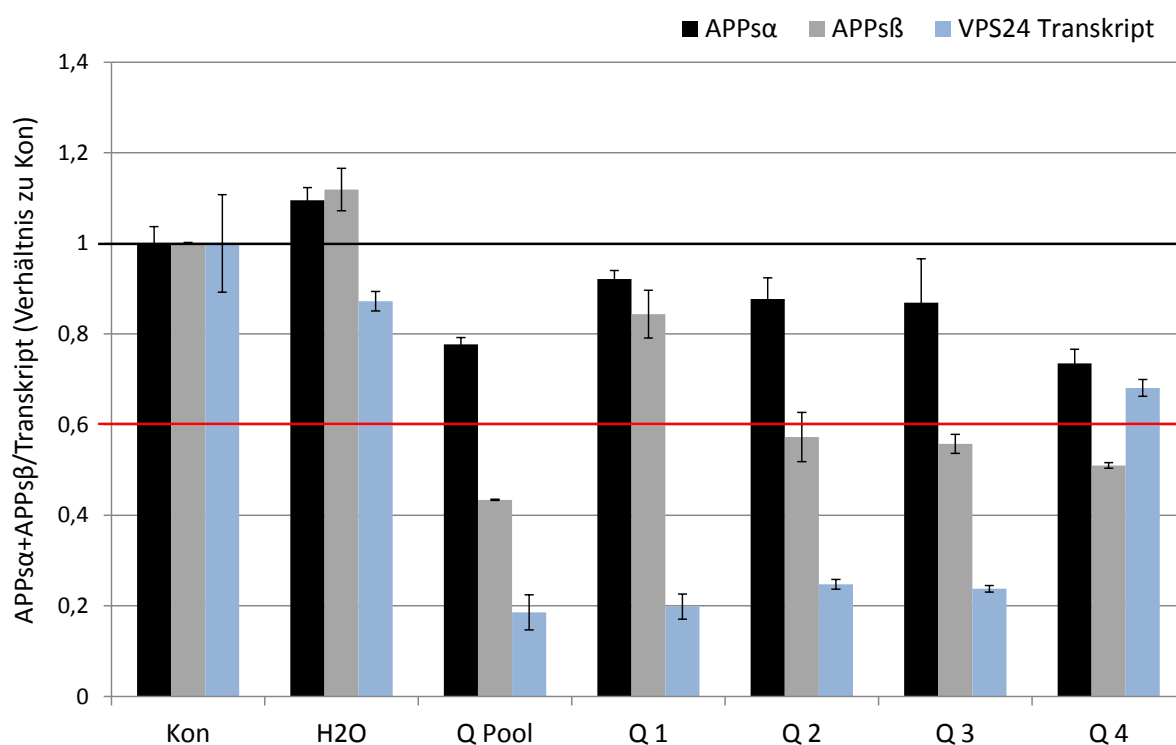
Für sieben der untersuchten Kandidatengene wurde dabei festgestellt, dass die Effekte des siRNA-Pools von zwei unterschiedlichen, unabhängigen einzelnen siRNA-Sequenzen hervorgerufen wurden. So wurde beispielsweise bei „Knockdown“ des Gens ATP6AP2 durch den siRNA-Pool eine Reduktion der Produktion von APP $\alpha$  und APP $\beta$  beobachtet, die nicht durch eine seiner einzelnen siRNA-Sequenzen reproduziert werden konnte: Der „Knockdown“ durch die einzelne siRNA-Sequenz 1 bedingte die Abnahme von APP $\beta$  und zeitgleich eine Zunahme von APP $\alpha$ , während die einzelne siRNA-Sequenz 2 die beobachtete Abnahme von APP $\alpha$  herbeiführte. Da die anderen beiden einzelnen siRNA-Sequenzen 3 und 4 keinen Einfluss auf die Ektodomänenspaltung von APP hatten, muss angenommen werden, dass die Effekte des siRNA-Pools aus der Summe der „off target“-Effekte der beiden einzelnen siRNA-Sequenzen 1 und 2 resultierten. Bei den fünf verbleibenden Kandidatengenen zeigten der siRNA-Pool und mindestens eine einzelne siRNA-Sequenz den gleichen Phänotyp in der APP-Ektodomänenspaltung. In diesem Fall ist es denkbar, dass nur eine der untersuchten einzelnen siRNA-Sequenzen zu einem ausreichend starken „Knockdown“ führt, während die anderen einzelnen siRNA-Sequenzen ohne „Knockdown“ keinen Effekt auf die Ektodomänenspaltung von APP zeigen. Um dies zu überprüfen, wurden die „Knockdown“-Effizienzen der siRNA-Reagenzien gegen die verbleibenden fünf Gene bestimmt. In der vergleichenden Analyse der siRNA-Pools und seiner einzelnen siRNA-Sequenzen konnte für die verbleibenden fünf Kandidatengene festgestellt werden, dass für den siRNA-Pool und mindestens für eine, meist aber zwei oder drei einzelne siRNA-

Sequenzen der „Knockdown“ mit den Effekten auf die APP-Ektodomänenspaltung korreliert war. Die Ergebnisse der „Knockdown“-Phänotyp-Korrelationsstudien werden im nächsten Absatz beispielhaft für das VPS24-Gen, das für ein Protein des intrazellulären Proteintransports codiert, geschildert. Die verbleibenden vier Kandidatengene codieren für das ribosomale Protein RPL36AL bzw. das Histon-Protein HIST1H4C. Neben dem ZMAT5-Protein, das Bestandteil des minoren Spleißosoms ist, wurde ein weiteres Protein mit unbekannter Funktion (METTL16) identifiziert. Die vier letztgenannten Kandidatengene wurden in vorliegender Arbeit nicht weiter untersucht.

Die Ergebnisse der „Knockdown“-Phänotyp-Korrelationsstudien sollen beispielhaft an Hand des Kandidatengens VPS24 („vacuolar protein sorting-associated protein 24“) dargestellt werden (siehe Abbildung 23): Der siRNA-Pool gegen VPS24 zeigte im Vergleich zu Kontrollbedingungen eine deutliche Abnahme der Menge von VPS24 auf 19 % Rest-Transkript und führte somit zu einem potenten „Knockdown“ von VPS24. Mit diesem „Knockdown“ korrelierten eine deutliche Abnahme von APPs $\beta$  und eine geringe Reduktion von APPs $\alpha$ . Diese Effekte des siRNA-Pools wurden von den einzelnen siRNA-Sequenzen 2 und 3 (Q 2 und Q 3) reproduziert. Auch hier wurde bei vergleichbarer „Knockdown“-Effizienz (ca. 20 % Rest-Transkript) eine deutliche Reduktion in der Produktion von APPs $\beta$  und eine leichte Abnahme der APPs $\alpha$ -Mengen beobachtet. Die leichten Unterschiede in der Stärke der Reduktion von APPs $\beta$  durch den siRNA-Pool bzw. die Einzel-siRNAs waren darauf zurückzuführen, dass der Pool die Summe aller Effekte der Einzel-siRNAs und somit auch „off target“-Effekte widerspiegelt (siehe unten: siRNA Q 4). Auch die siRNA-Sequenz 1 (Q 1) zeigte eine dem Pool und den siRNAs Q 1 und Q 2 vergleichbare „Knockdown“-Effizienz, jedoch keine deutlichen Veränderungen der APP-Ektodomänenspaltung. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass diese siRNA-Sequenz „off target“-Effekte produzierte, die den erwarteten Phänotyp überlagern und somit maskieren. Die siRNA-Sequenz 4 (Q 4) zeigte im Vergleich zu den anderen siRNA-Reagenzien keinen potenten „Knockdown“ und die festgestellten Veränderungen von APPs $\alpha$  und APPs $\beta$  waren somit auf „off target“-Effekte zurückzuführen.

Demzufolge konnte für VPS24 und in vergleichbarer Weise auch für die restlichen vier Kandidatengene eine Korrelation von „Knockdown“ und Phänotyp gezeigt werden. Somit ist es wahrscheinlich, dass die beobachteten Effekte auf die APP-Ektodomänenspaltung durch die Depletierung der Kandidatengene und nicht durch unspezifische „off target“-Effekte der

verwendeten siRNA-Sequenzen auf die Transkripte anderer Gene bedingt sind.



**Abbildung 23: Darstellung der „Knockdown“-Phänotyp-Korrelation unterschiedlicher siRNA-Reagenzien am Beispiel von VPS24.**

Ergebnisse der RNAi-Studien mit dem siRNA-Pool von Qiagen (Q Pool) und seiner einzelnen siRNA-Sequenzen (Q 1 – Q 4) in SH-SY5Y-Zellen (10 nM). Durch Normalisierung der APP-Spaltprodukte und der VPS24-Transkript-Mengen auf Kontrollbedingungen (Kon) konnte die Korrelation der Effekte auf die APP-Ektodomänenspaltung und der „Knockdown“-Effizienz überprüft werden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

### 3.2.8 Untersuchung der ESCRT-Maschinerie in RNAi-Studien zur Validierung von VPS24 als Modulator der APP-Ektodomänenspaltung

Für die weitere Validierung von potentiellen Kandidatengenen ist es sinnvoll, homologe Gene oder Gene des gleichen Stoffwechselweges zu untersuchen. Sind die Effekte eines Kandidatengens spezifisch für dessen „Knockdown“, so sollte auch die Depletierung funktionsverwandter oder homologer Gene in ähnlichen Effekten auf die APP-Ektodomänenspaltung resultieren und somit „off target“-Effekte ausschließen.

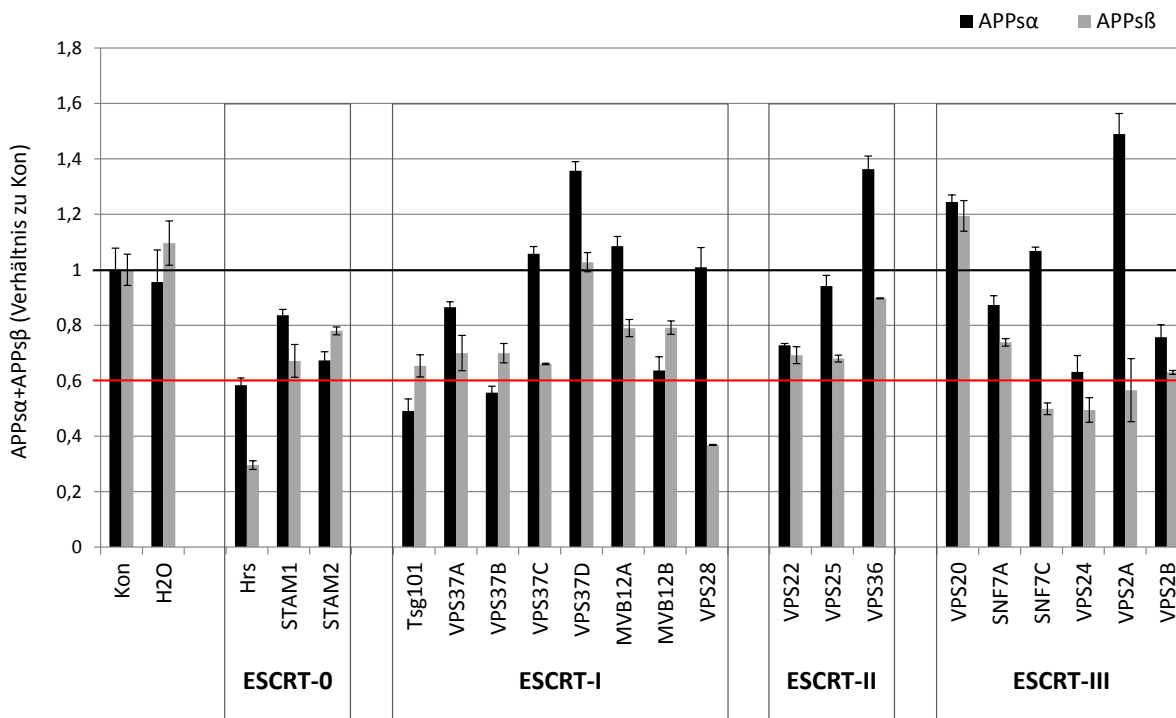
Für die weitere Analyse des Stoffwechselweges wurde von den verbleibenden fünf Kandidatengenen das VPS24-Gen ausgewählt. Das VPS24-Gen codiert ein Produkt, das für die Sortierung und den Transport von Transmembranproteinen von Endosomen in Lysosomen benötigt wird. Dabei agiert das VPS24-Protein in einem großen Komplex, der sogenannten



ESCRT-Maschinerie (ESCRT = „endosomal sorting complex required for transport“). Diese Maschinerie wird in vier unterschiedliche Subkomplexe aufgeteilt, die in der Reihenfolge ihrer Aktivität 0, I, II und III benannt sind. VPS24 wird der Subklasse III zugeteilt (Raiborg & Stenmark, 2009). Wie in Abbildung 23 gezeigt, moduliert VPS24 in humanen Zellen die Ektodomänenspaltung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase. Daher ist es nicht verwunderlich, dass im initialen *Drosophila* RNAi-„Screening“ keine weiteren Untereinheiten der evolutionär konservierten ESCRT-Maschinerie identifiziert werden konnten, da hier ausschließlich nach Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP durch die  $\alpha$ -Sekretase gesucht werden konnte, denn in *Drosophila*-Zellen ist nur eine  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität, aber keine endogene  $\beta$ -Sekretase-Aktivität vorhanden (Fossgreen et al., 1998; L. Q. Luo et al., 1990; Sapir et al., 2005; Takasugi et al., 2003).

Der Verifizierungsstrategie der Stoffwechselweg-Analyse zufolge sollten neben VPS24 auch die anderen ESCRT-Komponenten mit RNAi-Studien in humanen SH-SY5Y-Zellen adressiert werden. Dafür wurden die 13 Komponenten, die der ESCRT-Maschinerie zugerechnet werden (Raiborg & Stenmark, 2009), in Betracht gezogen. Da für einige dieser Komponenten homologe Gene vorhanden sind, wurden die Effekte des „Knockdowns“ auf die APP-Ektodomänenspaltung von insgesamt 20 Genen untersucht. Für das experimentelle Vorgehen wurden die siRNA-Pools der Firma Qiagen gewählt und unter bereits etablierten Bedingungen in SH-SY5Y-Zellen getestet. Zur Auswertung der „Knockdown“-Studien des ESCRT-Stoffwechselweges wurden erneut die Effekte auf die APP-Ektodomänenspaltung durch Normalisierung auf Kontrollbedingungen bestimmt. Darauf folgend wurden die erzielten Effekte des „Knockdowns“ eines bestimmten ESCRT-Gens mit den Effekten des VPS24-„Knockdown“ verglichen. Untenstehende Abbildung 24 zeigt jeweils die Effekte der untersuchten Vertreter der einzelnen ESCRT-Untereinheiten (0 bis III) im Vergleich zu den Effekten des VPS24-„Knockdowns“. Interessanterweise konnte hier für die meisten Komponenten der vier Untereinheiten der ESCRT-Maschinerie eine Abnahme der APPs $\beta$ -Produktion auf durchschnittlich 70 bis 80 % im Vergleich zu Kontrollbedingungen beobachtet werden. Die „Knockdowns“ anderer Vertreter der ESCRT-Untereinheiten zeigten somit dem VPS24-„Knockdown“ ähnliche Reduktionen in der Produktion von APPs $\beta$ . Für Ausnahmen, die keine deutliche Abnahme bzw. eine leichte Zunahme von APPs $\beta$  zeigten, wie VPS37D und VPS36 bzw. VPS20, könnten folgende Szenarien zutreffen: Zum einen könnten die verwendeten siRNA-Pools „off target“-Effekte haben, welche den erwarteten Phänotyp ins

umgekehrte wenden und somit maskieren könnten. Diese Überlegung ist besonders in Betracht zu ziehen, da bereits gezeigt werden konnte, dass die verwendeten siRNA-Pools „off target“-Effekte-produzierende siRNA-Sequenzen enthalten können (siehe Abbildung 23, Q 4). Zum anderen ist es möglich, dass die untersuchten Gene nicht in SH-SY5Y-Zellen exprimiert sind, so dass bei „Knockdown“ keine nennenswerten Effekte beobachtet werden können. Dies ist besonders gut vorstellbar für Gene, die mehrfach codiert sind, wie beispielsweise VPS37. In diesem Fall zeigt die Depletierung von VPS37A, VPS37B und VPS37C eine Verminderung der Produktion von APPs $\beta$ , während der „Knockdown“ von VPS37D keine Änderung der APPs $\beta$  Menge bedingte. Der „Knockdown“ der verschiedenen ESCRT-Untereinheiten führte zu keiner einheitlichen Änderung der Produktion von APPs $\alpha$ . So konnte für die Depletierung einiger Gene eine Zu- bzw. Abnahme oder keine Änderung der APPs $\alpha$ -Menge beobachtet werden. Aus diesen Beobachtungen lässt sich also keine Aussage über die Rolle der ESCRT-Maschinerie in der Produktion von APPs $\alpha$  formulieren. Mit der Strategie der Stoffwechselweg-Analyse konnte demzufolge erfolgreich gezeigt werden, dass neben dem „Knockdown“ von VPS24 auch der „Knockdown“ anderer ESCRT-Komponenten zu Veränderungen der Ektodomänenspaltung von APP führte. Da einheitlich die Abnahme der Produktion von APPs $\beta$  zu beobachten war, ist davon auszugehen, dass dieser Effekt spezifisch mit der Depletierung von Untereinheiten der ESCRT-Maschinerie korreliert und nicht auf unspezifische „off target“-Effekte zurückzuführen ist.



**Abbildung 24: Darstellung der RNAi-Studien der vier Untereinheiten der ESCRT-Maschinerie (ESCRT-0 bis ESCRT-III).**

Ergebnisse der „Knockdown“-Studien mit siRNA-Pools von Qiagen in SH-SY5Y-Zellen (10 nM). Durch Normalisierung der APP-Spaltprodukte auf Kontrollbedingungen (Kon) konnten die Effekte auf die APP-Ektodomänenspaltung überprüft werden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

### 3.2.9 Weitere Validierung von VPS24 als Modulator der APP-Ektodomänenspaltung durch stabilen „Knockdown“ mittels shRNAs

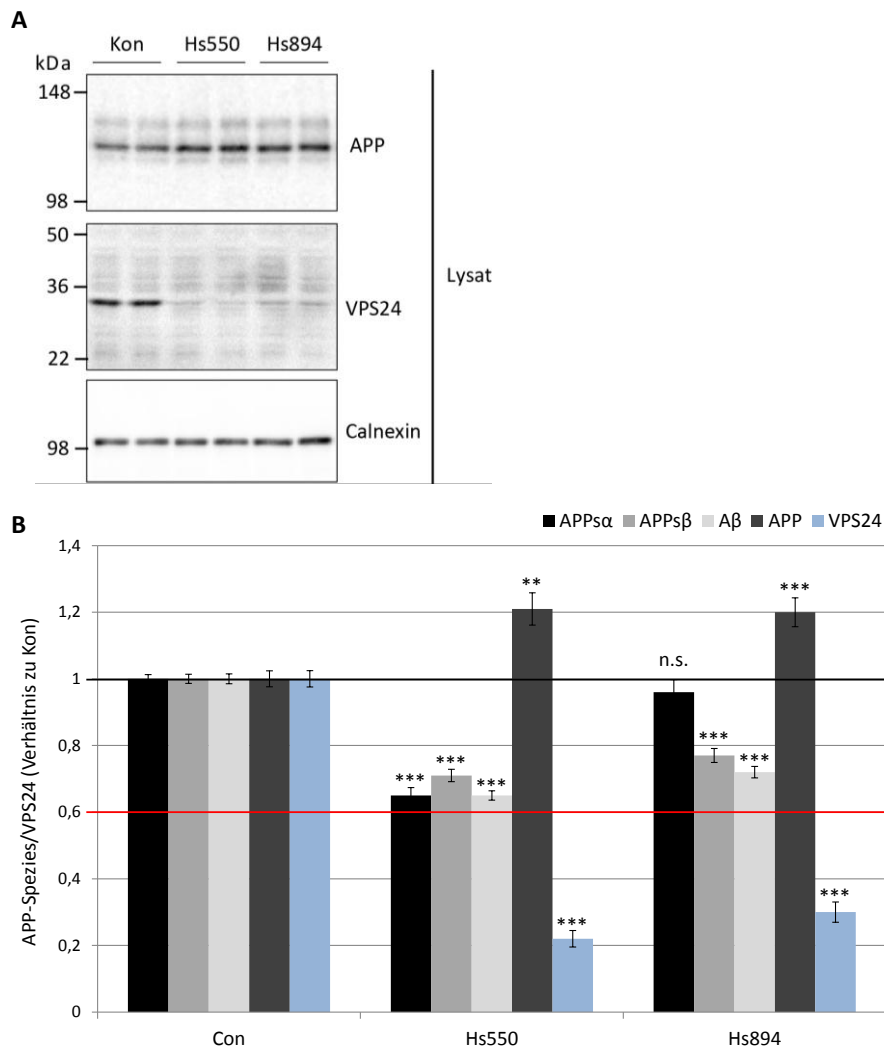
Die bisherigen Daten sprechen dafür, dass VPS24 als Modulator der Ektodomänenspaltung von APP agiert. Eine weitere Möglichkeit, diese Annahme zu bekräftigen, ist die Verwendung eines alternativen RNAi-Systems. Dazu werden statt der synthetischen siRNAs nun Plasmid-codierte shRNAs verwendet, die über virale Transduktion in die Zielzellen eingeschleust werden. Es wurde gezeigt, dass shRNAs weniger Sequenz-abhängige „off target“-Effekte produzieren als siRNAs (Klinghoffer et al., 2010). Als Begründung hierfür wird diskutiert, dass die Transkription und die Prozessierung der shRNAs den endogen vorhandenen Kontroll-Mechanismen der zellulären RNAi-Maschinerie unterliegen und somit „physiologischer“ Bedingungen erzielt werden als bei transienter Transfektion von synthetischen siRNAs (Rao et al., 2009). Ein zusätzlicher Vorteil der Verwendung von shRNAs besteht darin, weitere Zielregionen des Transkripts zu treffen und somit die Multiplizität der siRNA-Sequenzen bzw. shRNA-Sequenzen zu erweitern.

Zur Untersuchung der Effekte des stabilen „Knockdowns“ von VPS24 auf die APP-Ektodomänenspaltung wurden SH-SY5Y-Zellen mit lentiviralen Partikeln, die die Expression von Kontroll-shRNAs oder shRNAs gegen VPS24 ermöglichen, transduziert. Mehrere Tage (mindestens 6 Tage) nach Beginn des VPS24-„Knockdowns“ durch Transduktion wurden die „Knockdown“-Effizienzen und die Effekte auf zelluläres APP sowie die Sekretion unterschiedlicher APP-Spezies durch Normalisierung auf Kontrollbedingungen bestimmt. Wie aus Abbildung 25A hervorgeht, führten die shRNAs Hs550 und Hs894 zu einer deutlichen Abnahme des VPS24-Proteins im Vergleich zu Kontroll-shRNA-transduzierten Zellen. Die „Knockdown“-Effizienzen der beiden shRNAs konnten durch Quantifizierung der erhaltenen Signale auf 22 bzw. 30 % Rest-Protein im Vergleich zu Kontrollbedingungen festgelegt werden. Interessanterweise führten beide shRNAs gegen VPS24 neben dem „Knockdown“ auch zu einer leichten, 20 %-igen Zunahme des zellulären APP (siehe Abbildung 24A und 24B). Im Gegensatz hierzu führt der „Knockdown“ von VPS24 durch die beiden, unabhängigen shRNA-Sequenzen zu einer Abnahme des sekretierten APPs $\beta$  auf 71 bzw. 77 % und des sekretierten A $\beta$  auf 65 bzw. 72 % im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Die Produktion von APPs $\alpha$  scheint nicht mit dem „Knockdown“ von VPS24 zu korrelieren, da für beide, ähnlich potente shRNAs unterschiedliche Effekte auf die Produktion von APPs $\alpha$  beobachtet wurden: die shRNA Hs550 zeigt eine deutliche Reduktion von APPs $\alpha$  auf 65 % im Vergleich zu Kontrollbedingungen, wohingegen die shRNA Hs894 zu keiner Änderung der APPs $\alpha$ -Produktion (96 % im Vergleich zu Kontrollbedingungen) führt (siehe Abbildung 25B).

Diese Beobachtungen, dass der „Knockdown“ von VPS24 mit shRNAs zu einer einheitlichen Abnahme von APPs $\beta$  und A $\beta$ , nicht aber zwingend zu einer Änderung der APPs $\alpha$ -Produktion führt, stimmen mit den Befunden der siRNA-vermittelten „Knockdowns“ überein (siehe Abbildung 23). Es ist demnach denkbar, dass die Reduktion von APPs $\alpha$  durch die shRNA Hs550 ein „off target“-Effekt ist, da dieser nicht durch die ebenfalls potente shRNA Hs894 und die potenten siRNAs Q 2 und Q 3 gezeigt wird (siehe Abbildung 23 und 25).

Somit konnten die Ergebnisse aus den siRNA- und shRNA-Studien zu folgenden Annahmen zusammengefasst werden: Die Depletierung von VPS24 war mit einer Reduktion der Produktion von APPs $\beta$  und A $\beta$  und einer Zunahme der Menge von zellulärem APP korreliert. Die Produktion von APPs $\alpha$  schien nicht spezifisch durch den „Knockdown“ von VPS24 verändert zu sein. Darüber hinaus ließ sich feststellen, dass die Ergebnisse der VPS24-

Depletierung mit siRNAs und shRNAs in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der „Knockdown“-Studien der Komponenten der ESCRT-Maschinerie standen: Auch hier konnte die Abnahme der Produktion von APPs $\beta$  für die Mehrzahl der ESCRT-Komponenten beobachtet werden, während für die Produktion von APPs $\alpha$  keine einheitlichen Änderungen festzustellen waren.



**Abbildung 25: Darstellung der Effekte des stabilen VPS24-„Knockdowns“ auf die Sekretion von APP und zelluläres APP in SH-SY5Y-Zellen.**

A) SH-SY5Y-Zellen wurden stabil mit Viren zur Produktion einer Kontroll-shRNA (Kon) bzw. von shRNAs gegen VPS24 (Hs550 und Hs894) transduziert. In den Zelllysaten wurden im Western Blot VPS24 und zelluläres APP (22C11) nachgewiesen. Als Proteinladekontrolle wurde Calnexin verwendet. In den konditionierten Überständen wurden die gezeigten APP-Spaltprodukte mit Hilfe des APPs $\alpha$ - und APPs $\beta$ -Assays bzw. des A $\beta$ -Triplex-Assays detektiert (Daten siehe B). B) Quantifizierung der zellulären Proteine aus A) und Darstellung der APPs $\alpha$ -, APPs $\beta$ - und A $\beta$  40-Mengen im konditionierten Überstand. Gezeigt sind die Mittelwerte und zugehörige Standardfehler von 12 unabhängigen Experimenten. \*\*\* p < 0,001 nach t Test. n.s. nicht signifikant.

## 4 Diskussion

Die APP-Ektodomänenspaltung ist ein wesentlicher Schritt in der Generierung von A $\beta$ , da die Proteolyse von APP durch die  $\beta$ -Sekretase direkt zur Bildung von A $\beta$  beiträgt, wohingegen die Ektodomänenspaltung durch die  $\alpha$ -Sekretase dessen Produktion verhindert. Die molekularen Mechanismen, welche die Ektodomänenspaltung von APP regulieren, sind bis heute noch wenig verstanden. Obwohl die Identität oder die exakten Mechanismen der zellulären Modulatoren noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten, ist heute jedoch bekannt, dass dem intrazellulären Transport von APP eine wichtige Bedeutung in der Regulation der Ektodomänenspaltung von APP zukommt. Dabei wird durch den intrazellulären Transport das Aufeinandertreffen von APP und seinen Sekretasen bestimmt, so dass die Menge des prozessierten APP kontrolliert werden kann (Sannerud & Annaert, 2009). Vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Funktionen von TMEM59 in der APP-Prozessierung und mit der Identifizierung neuer zellulärer Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP. Zur Suche von neuartigen Modulatoren wurde ein genomweites RNAi-„Screening“ in Drosophila-Zellen durchgeführt. Kandidatengene aus diesem Ansatz wurden nachfolgend in menschlichen Zellen überprüft. In der folgenden Diskussion sollen die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit in Zusammenhang mit den Ergebnissen vorangegangener Publikationen gebracht und kritisch analysiert werden.

### 4.1 TMEM59 ist ein neuartiger Modulator der Ektodomänenspaltung von APP

#### 4.1.1 TMEM59 inhibiert die Ektodomänenspaltung von APP

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass TMEM59 und sein Homologes TMEM59L sowohl die Maturierung als auch die Ektodomänenspaltung von APP modulieren. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von TMEM59 oder seinem Homologen TMEM59L zu einer Abnahme der maturen und einer Zunahme der immaturren APP-Bande führt. Zusätzlich führte die Expression beider Proteine zu einer Abnahme der Ektodomänenspaltung von APP, so dass im Vergleich zu Kontrollbedingungen nur geringe Mengen von  $\alpha$ -Sekretase-geschnittenem APP $\alpha$  und  $\beta$ -Sekretase-geschnittenem APP $\beta$  detektiert werden konnten. Auch die Produktion von A $\beta$  wurde unter Expression von TMEM59 oder seinem Homologen TMEM59L deutlich reduziert (siehe Abbildung 8A und

8B). Neben den Effekten auf die Maturierung und die Ektodomänenspaltung von APP konnte zusätzlich gezeigt werden, dass TMEM59 in der Lage ist, den Transport von APP aus dem Golgi-Apparat zu blockieren und somit APP im ER und im Golgi-Apparat zu arretieren (siehe Abbildung 14). Neben der Expression von TMEM59 und seinem Homologen TMEM59L wurden auch die Effekte der Depletierung beider Proteine in „Knockdown“-Studien untersucht. Hierbei konnte eine moderate Reduktion der APP-Ektodomänenspaltung (APP $\alpha$  und APP $\beta$ ) und eine leichte Abnahme der Maturierung des intrazellulären APP unter „Knockdown“-Bedingungen beobachtet werden (siehe Abbildung 15). Möglicherweise könnte ein stärkerer „Knockdown“, der die mRNA-Mengen von TMEM59 und TMEM59L weiter reduziert, diese Effekte verstärken. Die Suche nach potenteren RNAi-Reagenzien könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Zusammengefasst konnte folglich festgestellt werden, dass sowohl die Expression als auch der „Knockdown“ von TMEM59 und TMEM59L zu ähnlichen Effekten auf die Ektodomänenspaltung und die Maturierung von APP führen. Dieses Phänomen wurde bereits für andere Proteine beschrieben. So zeigen auch endozytotische Endophiline (Schobel et al., 2006; Sugiura et al., 2004; Verstreken et al., 2002), Adaptorproteine wie FE65 (Pietrzik et al., 2004) und c-Jun Kinase interagierende Proteine (Whitmarsh, 2006) ähnliche Phänotypen bei Expression bzw. „Knockdown“. Diese Proteine bilden typischerweise hetero-oligomere Komplexe. Somit kann angenommen werden, dass die Depletierung zu einem Verlust von vollständig assemblierten und funktionsfähigen Komplexen führt. Des Weiteren ist es möglich, dass das Überangebot von Komponenten durch Expression zu einer Akkumulation von nicht vollständig gebildeten und funktionslosen Komplexen führen kann. Daher kann hypothetisiert werden, dass möglicherweise auch TMEM59 und TMEM59L Komplexe mit anderen, bislang nicht identifizierten Proteinen eingehen, so dass Expression oder „Knockdown“ beider Proteine in ähnlichen Effekten auf APP-Ektodomänenspaltung und APP-Maturierung resultieren würden. Somit wäre es interessant in weiteren Studien nach möglichen Interaktionspartnern von TMEM59 und TMEM59L zu suchen und deren Zusammenspiel im Komplex zu analysieren.

#### **4.1.2 Mechanismen von TMEM59 in der Ektodomänenspaltung von APP**

##### **4.1.2.1 TMEM59 hat keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der APP-Sekretasen**

Es konnte gezeigt werden, dass TMEM59 und TMEM59L eine Abnahme der Maturierung von APP bewerkstelligen. Dies zeigte sich in einer Abnahme der maturen Banden und folglich einer Zunahme der immaturen Banden von APP. Da die immature Bande von APP nicht in ihrem Laufverhalten verändert wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass nur Golgi-Glykosylierungsreaktionen, nicht aber Kern-Glykosylierungsreaktionen, die bereits im ER erfolgen, durch TMEM59 und TMEM59L inhibiert werden (siehe Abbildung 8A und 8B). Eine mögliche Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen wäre, dass TMEM59 und TMEM59L die Aktivitäten von einem oder mehreren Golgi-Glykosylierungsenzymen regulieren. Diese Regulation könnte dabei direkt erfolgen oder indirekt über die Kontrolle der richtigen subzellulären Lokalisierung der genannten Enzyme. Für dieses Szenario ist es auch interessant zu bemerken, dass TMEM59 in allen Golgi-Subkompartimenten zu finden ist (siehe Abbildung 11), und somit möglicherweise in unterschiedlichen Golgi-Subkompartimenten für unterschiedliche Glykosylierungsreaktionen von Bedeutung sein könnte. Weitere Studien könnten diese Möglichkeiten überprüfen und analysieren, ob der Wirkmechanismus von TMEM59 direkt oder indirekt mit einem oder mehreren Glykosylierungsenzymen korreliert ist.

Auch die APP-Sekretasen ADAM10 und BACE1 selbst sind komplex-glykosylierte Proteine, für welche zudem bekannt ist, dass eine korrekte Glykosylierung Voraussetzung für eine vollständige enzymatische Aktivität ist (Chang et al., 2005; Charlwood et al., 2001; Escrevente et al., 2008b; Kubota & Nishiwaki, 2006). So wäre es denkbar, dass die reduzierte APP-Ektodomänenspaltung durch eine Verminderung der Aktivitäten der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Sekretase bedingt sein könnte. Da jedoch gezeigt werden konnte, dass TMEM59 keinen Einfluss auf die Aktivität der Sekretasen gegenüber einem fluorogenen Peptid hat (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13), konnte diese Möglichkeit als Wirkmechanismus von TMEM59 auf die Ektodomänenspaltung von APP ausgeschlossen werden.



#### 4.1.2.2 TMEM59 inhibiert den intrazellulären Transport von APP

Die TMEM59-Expression verhindert den Transport von APP an die Zelloberfläche und verursacht den Rückhalt von APP in ER und in Golgi-Apparat (siehe Abbildung 14). Daher liegt die Vermutung nahe, dass TMEM59 Anteil an einem zellulären Mechanismus hat, der den Transport von APP bei mangelnder APP-Glykosylierung verhindert. Diese Erklärungsmöglichkeit ist weitestgehend auszuschließen, da bereits gezeigt werden konnte, dass APP auch bei unvollständiger Glykosylierung intrazellulär transportiert und folglich von seinen Sekretasen gespalten werden kann (Pahlsson & Spitalnik, 1996). Da also nicht die fehlende Glykosylierung von APP allein dessen Transportinhibierung bewirken kann und da in vorliegender Arbeit auch gezeigt werden konnte, dass neben APP auch andere Proteine (z.B. Nicastrin, siehe Abbildung 10) in ihrer Glykosylierung durch TMEM59 beeinträchtigt sind, könnte auch folgendes Szenario zutreffend sein: Es wäre denkbar das ein bis dato unbekanntes, ebenfalls glykosyliertes Protein für den Transport von APP vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran benötigt wird. Wäre die Glykosylierung des unbekanntes Proteins auch von TMEM59 abhängig, so könnte es seine Funktion im APP-Transport nicht mehr übernehmen und so zu einem Rückhalt von APP im Golgi-Apparat führen. Bei dieser Annahme würde der Glykosylierungszustand von APP keine Rolle spielen. Diese Schlussfolgerung wurde auch in einer früheren Studie gemacht, die die APP-Ektodomänenspaltung unter verminderter Glykosylierung untersuchte (Pahlsson & Spitalnik, 1996). Obwohl es sich bei dem angenommenen Protein um ein unbekanntes Protein handelt, ist es dennoch interessant zu bedenken, dass die Assoziation von APP mit anderen glykosylierten Proteinen wie SorLA oder LRP1 im sekretorischen Weg bereits beschrieben werden konnte (Andersen et al., 2005; Waldron et al., 2008). Ob diese oder andere Proteine eine Rolle im Transport von APP aus dem Golgi-Apparat zur Plasmamembran spielen und dafür ihre korrekte Glykosylierung benötigen, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass die Modulation von Golgi-Glykosylierungsreaktionen durch TMEM59 Einfluss auf die Maturierung, den Transport und die Ektodomänenspaltung von APP hat. Diese Resultate stimmen mit den Ergebnissen bisheriger Publikationen überein. Eine Studie, in der N-Komplex-Glykosylierungsreaktionen des Golgi-Apparats durch Swainsonine inhibiert wurden, konnte auch die vermehrte Golgi-Lokalisierung von APP und die Reduktion der A $\beta$ -Produktion zeigen (McFarlane et al., 1999). Diese Resultate unterstützen die Ergebnisse vorliegender Arbeit und die aufgestellte

Hypothese, dass inhibierte Golgi-Glykosylierungsreaktionen den Transport und zeitgleich die Prozessierung von APP beeinträchtigen können. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass die Verstärkung bestimmter Golgi-Glykosylierungsreaktionen gegensätzliche Effekte zeigte. So führte die Expression des Golgi-Glykosylierungsenzyms  $\alpha$ -2,6-Sialyltransferase zu einer vermehrten Ektodomänenspaltung von APP und einer Anreicherung von A $\beta$  (McFarlane et al., 1999; Nakagawa et al., 2006). Dieser Effekt beruht aber allein auf einer vermehrten Sialylierung von APP und nicht auf der von anderen Proteinen, die in den APP-Transport involviert sind (Nakagawa et al., 2006). Bemerkenswerterweise konnten auch Änderungen der Aktivitäten von Glykosylierungsenzymen im Gehirn von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen ähnlichen Alters festgestellt werden. Hierbei wurde die Verminderung der Aktivitäten von Sialyltransferasen und damit korrelierend eine Veränderung der generellen Glykosylierung von Proteinen beschrieben (Breen et al., 1998; Maguire & Breen, 1995). Wie bereits geschildert wurde, verstärkt die Sialylierung von APP dessen Sekretion. So wäre es im Umkehrschluss denkbar, dass eine verminderte Sialylierung von APP durch die Abnahme der Sialyltransferase-Aktivitäten im Gehirn von Alzheimer-Patienten zu einer Abnahme der Produktion des neuroprotektiven und neurotrophen APP $\alpha$  führen könnte. Dies könnte unter anderem eine Begründung für die Reduktion von APP $\alpha$  im Gehirn von Alzheimer-Patienten, die bereits gezeigt werden konnte, sein (Fellgiebel et al., 2009). Dennoch bleibt es unklar und könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, ob verminderte Sialyltransferase-Aktivitäten direkt zum Krankheitsverlauf beitragen oder ob diese als Konsequenz des Krankheitsverlaufs der Alzheimer-Erkrankung auftreten.

## **4.2 Erfolg und Limitationen des genomweiten RNAi-„Screenings“ zur Identifizierung neuartiger Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP**

### **4.2.1 Identifizierung neuer zellulärer Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP**

Vorliegende Arbeit beschreibt die Identifizierung neuer zellulärer Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP durch die Kombination eines großangelegten genomweiten RNAi-„Screenings“ in *Drosophila*-Zellen mit der nachfolgenden Untersuchung der erhaltenen Kandidatengene in humanen Zellen. Im initialen genomweiten „Screening“ nach Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP wurden 43 Kandidatengene identifiziert, deren Depletierung in der *Drosophila*-Reporterzelllinie zu einer Veränderung der Ektodomänenspaltung von APP, nicht aber der generellen Sekretion der Zellen führte (siehe Abbildung 18). Potentielle Unterschiede in der Transfektionseffizienz wurden durch Mitführen eines weiteren Reporters ausgeschlossen. Da in *Drosophila* nur eine  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität (Kuzbanian), aber keine  $\beta$ -Sekretase-Aktivität vorhanden ist (Fossgreen et al., 1998; L. Q. Luo et al., 1990; Sapir et al., 2005; Takasugi et al., 2003), kann angenommen werden, dass die 43 Kandidatengene nur die  $\alpha$ -spezifische Ektodomänenspaltung von APP in *Drosophila*-Zellen modulieren. Unter den stärksten Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP tauchte mehrfach die Positivkontrolle Kuzbanian, die  $\alpha$ -Sekretase in *Drosophila* (Sapir et al., 2005), auf, was die Strategie des genomweiten RNAi-„Screenings“ validierte (siehe Abbildung 18).

Für 30 der 43 Kandidatengene aus dem *Drosophila* RNAi-„Screening“ konnten orthologe humane Gene gefunden werden (siehe Abbildung 19). Bei der weiteren Untersuchung dieser 30 Kandidatengene in humanen SH-SY5Y-Zellen wurden die Effekte auf die sekretierten APP-Spezies APP $\alpha$  und APP $\beta$  analysiert, da in humanen Zellen die Ektodomänenspaltung von APP sowohl durch die  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 als auch durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 erfolgt (siehe Abbildung 20). Zur Validierung potentieller Kandidatengene wurden diese mit Hilfe von siRNAs in SH-SY5Y-Zellen depletiert. Hierzu wurde zunächst mit zwei unabhängigen siRNA-Pools überprüft, ob die erhaltenen Phänotypen mit beiden siRNA-Pools erzielt werden konnten (siehe Abbildung 22). Im nächsten Schritt wurde für die verbleibenden Gene untersucht, ob die Effekte der siRNA-Pools von den entsprechenden einzelnen siRNA-Sequenzen reproduziert wurden und ob der erhaltene Phänotyp mit der „Knockdown“-

Effizienz korreliert war (siehe Abbildung 23). Diese Verifizierungsstrategie führte zu fünf verbleibenden Kandidatengen, deren „Knockdown“ zu einer Modulation der Ektodomänenspaltung von APP in humanen Zellen führte. Diese Gene codieren unterschiedliche Proteine wie das ribosomale Protein RPL36AL („Ribosomal protein L36a-like“), das Histon-Protein HIST1H4C („Histone cluster 1, H4C“) oder das ZMAT5-Protein („Zinc finger, matrin-type 5“) des minoren Spleißosoms. Neben dem VPS24-Protein („Vacuolar protein sorting-associated protein 24“), das am intrazellulären Proteintransport beteiligt ist, wurde das unbekannte Protein METTL16 („Methyltransferase-like protein 16“) identifiziert. Zur weiteren Validierung wurde das VPS24-Protein ausgewählt. Hierzu wurden zum einen die Effekte der Depletierung der ESCRT-Maschinerie, zu der auch VPS24 zählt, untersucht (siehe Abbildung 24). Zum anderen konnten die Effekte des VPS24-„Knockdowns“ in einem alternativen RNAi-System bestätigt werden, so dass VPS24 als neuer Modulator der Ektodomänenspaltung von APP in humanen Zellen verifiziert werden konnte (siehe Abbildung 25).

#### **4.2.2 Genomweite RNAi-„Screenings“ in Drosophila-Zellen zur Untersuchung humaner Genfunktionen**

Genomweite RNAi-Studien werden als wichtige, potente Werkzeuge zur Identifizierung von neuen Genfunktionen gesehen. Dabei wird häufig das initiale genomweite RNAi-„Screening“ in einem Modellorganismus mit geringer genetischer Redundanz (Drosophila, *C. elegans*) durchgeführt, woraufhin Folgestudien in Zelllinien von genetisch komplexen Organismen (Maus, Mensch) durchgeführt werden können (Mohr et al., 2010). Die geringe genetische Redundanz der Modellorganismen erhöht die Wahrscheinlichkeit, bereits bei Depletierung einzelner Gene einen messbaren Phänotyp zu erhalten. In Zellen höherer Organismen müssten unter Umständen mehrere homologe Gene depletiert werden, um einen vergleichbaren Phänotyp zu erhalten (Boutros & Ahringer, 2008). Ein ausschlaggebendes Kriterium für die Verwendung von Drosophila-Zellen in genomweiten RNAi-„Screenings“ ist die einfache Anwendung und die hohe Effizienz der RNAi. So kann in Drosophila-Zellen die RNAi durch den einfachen Zusatz von langen dsRNAs in das Kulturmedium ohne Verwendung von Transfektionsreagenzien ausgelöst werden. Die hohe Effizienz der RNAi in Drosophila-Zellen ist auf die Prozessierung der dsRNAs durch die endogene zelluläre RNAi-Maschinerie zurückzuführen: Die Fragmentierung der langen dsRNA resultiert in einem Pool von vielen

verschiedenen siRNAs, die eine nahezu hundertprozentige Depletierung des Zieltranskripts bewerkstelligen können (Clemens et al., 2000). In vielen Fällen können die erhaltenen Informationen aus initialen genomweiten RNAi-„Screenings“ wertvolle Einblicke in die Funktion humaner orthologer Gene geben (Cullen & Arndt, 2005; Mohr et al., 2010). Die hohe Konservierung zentraler Stoffwechselwege und krankheitsrelevanter humaner Gene zwischen *Drosophila* und dem Menschen spricht dafür (Bier, 2005; Rubin et al., 2000), dass die Informationen aus RNAi-„Screenings“ in *Drosophila* ein großes Potential für die Untersuchung von humanen Genfunktionen bieten (Cullen & Arndt, 2005). Einige Studien zur Identifizierung neuer Faktoren der Transkriptionsregulation, der Zellviabilität und der Interaktion von Wirtszellen mit Viren konnten zeigen, dass der Transfer von Informationen aus dem genomweiten RNAi-„Screening“ in *Drosophila*-Zellen auf humane Zelllinien erfolgreich sein kann (Gwack et al., 2006; Hao et al., 2008; Kwon et al., 2008; Sessions et al., 2009). Allerdings ist hier anzumerken, dass der Transfer von Informationen zwischen *Drosophila*- und humanen Zellen keineswegs vollständig ist: Eine Studie zur Suche nach neuen wirtsspezifischen Faktoren des Dengue-Virus („dengue virus host factors“, DVHFs) beschreibt 116 Kandidatengene im genomweiten RNAi-„Screening“ in *Drosophila*-Zellen. Für diese Kandidaten konnten 82 humane orthologe Gene erhalten werden. Von den 82 potentiellen humanen Kandidatengenen konnten aber nur 42 Gene als humane wirtsspezifische Faktoren des Dengue-Virus verifiziert werden konnten. Für die nicht-verifizierbaren 40 Kandidatengene wird vermutet, dass diese allein *Drosophila*-spezifische DVHFs darstellen und deshalb nicht in menschlichen Zellen verifiziert werden konnten. Die Annahme, dass die erstgenannten 42 Kandidaten auch in menschlichen Zellen als DVHFs agieren, resultiert aus einem siRNA-basierten Ansatz (Sessions et al., 2009). Dieser Ansatz entspricht jedoch nicht den gängigen Vorstellungen der Verifizierung eines Kandidatengens (Echeverri et al., 2006): So wurden die erhaltenen Ergebnisse nicht mit weiteren siRNA-/shRNA-Reagenzien überprüft und auch die erforderliche Korrelation von „Knockdown“ und Phänotyp wird nicht kontrolliert (Sessions et al., 2009). Es kann also spekuliert werden, dass bei weiterer Validierung der angenommenen 42 Kandidaten die Anzahl verifizierbarer Kandidaten weiter sinken würde.

Auch in vorliegender Arbeit wurden die Limitationen des Transfers von erhaltenen Informationen zwischen dem Modellorganismus *Drosophila* und menschlichen Zellen deutlich. So konnten für die 43 Modulatoren der  $\alpha$ -Ektodomänenspaltung von APP aus dem

RNAi-„Screening“ in Drosophila-Zellen nur 30 humane orthologe Gene gefunden werden (siehe Abbildung 19). Von diesen potentiellen humanen Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP konnte für 12 Kandidaten mit zwei unterschiedlichen siRNA-Pools Effekte auf die Produktion von APP $\alpha$  und APP $\beta$  erhalten werden (siehe Abbildung 22). Auffallenderweise wurden nur für 3 der potentiellen Kandidatengene Effekte auf die Ektodomänenspaltung von APP durch die  $\alpha$ -Sekretase beobachtet. Die verbleibenden 9 Kandidatengene traten als Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase in Erscheinung. In Drosophila-Zellen ist keine  $\beta$ -Sekretase-Aktivität vorhanden (Fossgreen et al., 1998; L. Q. Luo et al., 1990; Takasugi et al., 2003), weshalb nicht gezielt nach Modulatoren der  $\beta$ -Ektodomänenspaltung von APP gesucht werden konnte. Da dennoch Modulatoren der  $\alpha$ -Ektodomänenspaltung von APP aus dem Drosophila-„Screening“ auch in humanen Zellen Effekte auf  $\beta$ -Ektodomänenspaltung von APP zeigten, kann spekuliert werden, dass die Regulation der Ektodomänenspaltung von APP in Drosophila-Zellen und humanen Zellen auf unterschiedlichen Ebenen erfolgt. Diese Beobachtungen lassen auf Limitationen im Transfer der erhaltenen Informationen zwischen Drosophila-Zellen und humanen Zellen und Unterschiede in der Regulation der Ektodomänenspaltung von APP schließen.

Weitere Erklärungsmöglichkeiten für die fehlende Verifizierung von humanen Kandidatengenens als Modulatoren der  $\alpha$ -Ektodomänenspaltung von APP leiten sich aus den inhärenten Limitationen genomweiter RNAi-„Screenings“ ab. Solch großangelegte Studien führen stets auch zu falsch positiven Ergebnissen, die nicht in nachfolgenden Untersuchungsverfahren verifiziert werden können. Inhärente Fehlerquellen sind beispielsweise experimentelle Schwankungen und technische Unregelmäßigkeiten (Mohr et al., 2010). Um die Rate der falsch positiven Kandidaten zu minimieren, wurden in vorliegender Arbeit alle RNAi-Experimente in Drosophila-Zellen in Duplikaten bzw. Triplikaten durchgeführt und die erhaltenen Ergebnisse mit der Transfektionseffizienz korreliert (siehe Abbildung 16 und 18). Neben diesen Fehlerquellen können auch die verwendeten dsRNAs zu Identifizierung falsch positiver Kandidaten führen. Dies tritt ein, wenn dsRNAs gegen ein spezifisches Gen zu „off target“-Effekten auf unspezifische Gene führen und diese „off target“-Effekte letztendlich den beobachteten Phänotyp begründen (Bakal, 2011; Echeverri et al., 2006; Mohr et al., 2010). Lange Zeit ging man davon aus, dass die „off target“-Effekte von dsRNAs im Vergleich zu anderen RNAi-Reagenzien

vernachlässigt werden können. Man nahm an, dass nach Prozessierung der dsRNAs die „guten, spezifischen“ siRNAs überwiegen und die „schlechten, unspezifischen“ siRNAs nur einen geringen Anteil haben. Die Annahme, dass die spezifischen „on target“-Effekte die unspezifischen „off target“-Effekte soweit in den Hintergrund drängen, dass sie in großangelegten „Screenings“ nicht beachtet werden müssen, ist mittlerweile widerlegt worden: Es konnte gezeigt werden, dass dsRNAs mit Homologien von  $\geq 19$  Nukleotiden zu einem effizienten „Knockdown“ von unbeabsichtigten, zufällig homologen Transkripten führen können und dass dies zur Identifizierung von falsch positiven Kandidatengenen in RNAi-„Screenings“ führt (Kulkarni et al., 2006). Somit wäre es erstrebenswert, die Spezifität der RNAi-Reagenzien zu erhöhen und unerwünschte „off target“-Effekte zu minimieren. Allerdings konnten bisher noch keine festen Regeln für das erfolgreiche Design von spezifischen und zeitgleich effektiven RNAi-Reagenzien erstellt werden (Bakal, 2011; Mohr et al., 2010).

In vorliegender Arbeit konnte das Auftreten von falsch positiven Kandidatengenen im genomweiten RNAi-„Screening“ in *Drosophila*-Zellen durch „off target“-Effekte der verwendeten dsRNAs nicht vollkommen ausgeschlossen werden, obwohl die verwendete dsRNA-Bibliothek gegen das *Drosophila*-Genom speziell die Minimierung von „off target“-Effekten berücksichtigte. Dazu wurden beim Design der dsRNAs ungünstige Zielregionen, wie Bereiche mit Homologien zu anderen Transkripten, Regionen geringer Komplexität und unspezifische Abschnitte, vermieden. Dennoch können auch diese Maßnahmen das Risiko von „off target“-Effekten nicht vollständig ausschließen (Horn et al., 2010). Der Erhalt von falsch positiven Kandidaten im initialen *Drosophila* RNAi-„Screening“ der vorliegenden Arbeit durch „off target“-Effekte der dsRNAs stellt eine weitere Erklärungsmöglichkeit dafür dar, dass die Verifizierung der *Drosophila*-Kandidatengene in humanen Zellen nur eingeschränkt erfolgreich war.

#### **4.2.3 Strategie zur Validierung von potentiellen Kandidatengenen in humanen Zellen**

Zur Identifizierung neuer Genfunktionen werden häufig genomweite RNAi-„Screenings“ in *Drosophila*-Zellen durchgeführt. Zur Validierung von erhaltenen Kandidatengenen werden orthologe humane Gene in menschlichen Zellen mit RNAi-basierten Methoden depletiert (Mohr et al., 2010). Dabei kann die Depletierung von Genen in humanen Zellen nicht, wie in *Drosophila*-Zellen, mit langen dsRNAs durchgeführt werden, da dsRNAs in humanen Zellen

die Interferon-Antwort aktivieren, die letztendlich zum Zelltod führt. Um die RNAi in humanen Zellen auszulösen, muss deshalb mit siRNAs von 21 - 23 Nukleotiden gearbeitet werden, die die Auslösung der Interferon-Antwort umgehen (Elbashir et al., 2001). Dabei ist zu berücksichtigen, dass siRNAs im Allgemeinen eine geringere „Knockdown“-Effizienz und mehr „off target“-Effekte haben als dsRNAs (Boutros & Ahringer, 2008). Obwohl bereits Fortschritte im Design von siRNAs erzielt werden konnten, ist es noch nicht möglich die Effizienz und Spezifität von siRNAs zuverlässig vorherzusagen (Holen, 2006; Jia et al., 2006; Koberle et al., 2006; Li & Cha, 2007).

Die geringere „Knockdown“-Effizienz und die höhere „off target“-Effektrate der siRNAs im Vergleich zu den dsRNAs bringen Einschränkungen für die Untersuchung von Drosophila-Kandidatengen in humanen Zellen mit sich. Unterschiede in der Effizienz von dsRNAs in Drosophila-Zellen und siRNAs in humanen Zellen können zu falsch negativen Ergebnissen in der Validierung von Kandidatengen in menschlichen Zellen führen. So kann es sein, dass der erhaltene Phänotyp in Drosophila-Zellen nur durch die nahezu vollständige Depletierung des Kandidatengens zustande kommt (Clemens et al., 2000). Ist die Effizienz der verfügbaren siRNAs nicht hoch genug, um eine vergleichbar starke Depletierung des humanen orthologen Gens zu erreichen, so würde das Gen als falsch negativer Kandidat kategorisiert werden (Sessions et al., 2009). Das Auftreten von unspezifischen Nebeneffekten in RNAi-Experimenten in humanen Zellen muss besonderes bei der Validierung von potentiellen Kandidatengen berücksichtigt werden, da diese Effekte zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Alle unspezifischen Nebeneffekte in RNAi-Experimenten werden als „off target“-Effekte bezeichnet, wobei man sequenz-unabhängige und sequenz-abhängige „off target“-Effekte kennt (Sigoillot & King, 2011). Sequenz-unabhängige „off target“-Effekte treten auf, wenn siRNAs die Funktion der zellulären RNAi-Maschinerie stören (Khan et al., 2009) oder Stressantworten der Zelle auslösen (Persengiev et al., 2004; Semizarov et al., 2003). Als sequenz-abhängige „off target“-Effekte werden die Effekte einer siRNA auf die Transkripte von Genen, die different vom eigentlich zu untersuchenden Gen sind, zusammengefasst (Jackson et al., 2003; Scacheri et al., 2004). Mittlerweile ist bekannt, dass siRNAs wie miRNAs wirken können und somit auch bei unvollständiger Basenpaarung mit nicht-homologen Transkripten den Abbruch der Translation bewirken oder den Abbau initiieren können (vergleiche Abbildung 6). Weil dieses Phänomen nur auf kurzen homologen Bereichen zwischen siRNA und unspezifischen Transkripten beruht, kann eine siRNA



theoretisch die Expression hunderter unterschiedlicher Gene reduzieren (Burchard et al., 2009; Carthew & Sontheimer, 2009; Doench et al., 2003; Hammond, 2005). Im Falle von siRNA-Studien zur Verifizierung von Kandidatengen können diese „off target“-Effekte zu falsch positiven Ergebnissen führen, wenn nicht der spezifische „Knockdown“ des Zielgens, sondern die unspezifische Depletierung eines unbekanntes Gens Ursache für den erhaltenen Phänotyp ist (Echeverri et al., 2006; Mohr et al., 2010). Um bei der Validierung von potentiellen Kandidatengen in humanen Zellen das Risiko von falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen zu minimieren, wurde in vorliegender Arbeit der Validierungsansatz der Multiplizität der RNAi-Reagenzien gewählt. Dieser Ansatz wird als entscheidendes Kriterium zur Überprüfung von Kandidatengen in humanen Zellen gesehen und schlägt vor, zur Verifizierung eines Kandidatengens zu zeigen, dass mehrere unabhängige siRNA-Sequenzen, die das Zieltranskript in unterschiedlichen Regionen treffen, im gleichen Phänotyp resultieren (Echeverri et al., 2006; Mohr et al., 2010; Sigoillot & King, 2011). Deshalb wurde zunächst überprüft, ob die Effekte potentieller Kandidatengene auf die Ektodomänenspaltung mit zwei unterschiedlichen siRNA-Pools erhalten werden konnten (siehe Abbildung 22). Nur wenn mit beiden siRNA-Pools ähnliche Effekte erzielt werden konnten, wurden die Kandidatengene weiteruntersucht. Dazu wurden die Effekte der einzelnen siRNA-Sequenzen mit denen des siRNA-Pools verglichen. Nur wenn mindestens eine einzelne siRNA-Sequenz die Effekte des siRNA-Pools reproduzieren konnte, wurde untersucht, ob die erzielten Effekte mit dem „Knockdown“ der einzelnen siRNA-Sequenzen korreliert waren (siehe Abbildung 23). Mit Hilfe dieser Validierungsstrategie konnten 5 Kandidatengene als Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP in humanen Zellen verifiziert werden. Neben Genen, die für ein Histon-Protein (HIST1H4C), ein ribosomales Protein (RPL36AL) und ein Protein des minoren Spleißosoms (ZMAT5) codieren, wurden ein unbekanntes Gen (METTL16) und ein Gen (VPS24), das für ein Protein des intrazellulären Proteintransports codiert, identifiziert.

Zur weiteren Validierung wurde das VPS24-Gen ausgewählt. In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Depletierung dieses Gens mit einer Reduktion der Sekretion von APP $\beta$  korrelierte, während die Produktion von APP $\alpha$  nicht verändert wurde. Der Strategie der „Stoffwechselweg-Analyse“ zufolge sollten nun Gene, die im gleichen Stoffwechselweg wie VPS24 aktiv sind, depletiert werden. Da VPS24 ein Mitglied der ESCRT-Maschinerie ist, wurden die Gene depletiert, die für die restlichen Komponenten dieses multimeren

Proteinkomplexes codieren. Interessanterweise konnte bei „Knockdown“ der meisten ESCRT-Komponenten einheitlich eine Reduktion von APPs $\beta$  auf durchschnittlich 70 - 80 % im Vergleich zu Kontrollbedingungen beobachtet werden. Die Effekte auf APPs $\alpha$  zeigten eine größere Bandbreite und es konnte einheitlicher Phänotyp erzielt werden (siehe Abbildung 24). Nur 3 von 19 untersuchten Genen zeigten bei „Knockdown“ keine deutliche Reduktion von APPs $\beta$  (VPS37D, VPS36 und VPS20; siehe Abbildung 24). Mögliche Begründungen für nicht erhaltene Effekte dieser Gene könnten zum einen sein, dass die verwendeten siRNA-Pools „off target“-Effekte haben, welche den erwarteten Phänotyp ins Umgekehrte wenden und somit maskieren könnten, und zum anderen, dass die untersuchten Gene nicht in SH-SY5Y-Zellen exprimiert sind, so dass bei „Knockdown“ keine Effekte erhalten werden können. Dies ist besonders gut vorstellbar für VPS37, da dieses Protein mehrfach codiert ist (VPS37A-D): Während die Depletierung von VPS37A, VPS37B und VPS37C zu einer Verminderung von APPs $\beta$  führte, zeigte der „Knockdown“ von VPS37C keine Änderung der APPs $\beta$ -Menge. Mit dieser Art der „Stoffwechselweg-Analyse“ konnte demzufolge gezeigt werden, dass nicht nur die Depletierung von VPS24, sondern auch von zahlreichen anderen Komponenten der ESCRT-Maschinerie zu einer Reduktion von APPs $\beta$  führte. Somit konnte nicht nur für VPS24, sondern auch für die gesamte ESCRT-Maschinerie eine Rolle in der Regulation der Ektodomänenspaltung von APP nachgewiesen werden.

Um die bisherigen Ergebnisse zu VPS24 als Modulator der Ektodomänenspaltung weiter zu bekräftigen, wurde VPS24 in humanen Zellen mit Hilfe von shRNAs depletiert (siehe Abbildung 25). Die zelluläre Expression und Prozessierung dieser Plasmid-codierten shRNAs erfolgt dabei nach viraler Transduktion, so dass der „Knockdown“ länger als mit siRNAs, die nur transient eingesetzt werden können, durchgeführt werden kann und deshalb auch als „stabiler Knockdown“ bezeichnet wird. Die weitere Validierung mit shRNAs bietet dabei zwei grundlegende Vorteile: Zum einen kann hierbei der Ansatz der Multiplizität der RNAi-Reagenzien vertieft werden, da die verwendeten shRNA Sequenzen das Zieltranskript in anderen Regionen treffen als die verwendeten siRNAs. Und zum anderen wird angenommen, dass shRNAs weniger „off target“-Effekte mit sich bringen, da die Transkription und die Prozessierung der shRNAs den endogen vorhandenen Kontroll-Mechanismen der zellulären RNAi-Maschinerie unterliegen und somit „physiologischer“ Bedingungen erzielt werden als bei transienter Transfektion von synthetischen siRNAs (Klinghoffer et al., 2010; Rao et al., 2009). Mit zwei unabhängigen shRNA-Sequenzen konnte hier gezeigt werden, dass die

Abnahme von APPs $\beta$  und darüber hinaus auch von A $\beta$  konsistent mit den Daten aus den siRNA-basierten Experimenten war. Interessanterweise konnte bei Depletierung von VPS24 mit beiden unterschiedlichen shRNAs eine Zunahme des zellulären APP beobachtet werden. Für die Produktion von APPs $\alpha$  konnte kein einheitlicher Phänotyp für beide shRNAs erhalten werden (siehe Abbildung 25). Dies ähnelt den Befunden aus den Depletierungen der ESCRT-Maschinerie und ist deshalb vermutlich nicht spezifisch mit dem „Knockdown“ korreliert und auf unspezifische „off target“-Effekte zurückzuführen (siehe Abbildung 24).

Mit der geschilderten Validierungsstrategie, die die Multiplizität der RNAi-Reagenzien, die Korrelation von „Knockdown“ und Phänotyp, die „Stoffwechselweg-Analyse“ und die Verwendung eines alternativen RNAi-Systems einschließt, konnten VPS24 und auch der Stoffwechselweg der ESCRT-Maschinerie als neue Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase identifiziert werden.

Weitere Möglichkeiten, um die Rolle von VPS24 und der ESCRT-Maschinerie in der Regulation der Ektodomänenspaltung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase zu untersuchen, wären zum einen Studien in „Knockout“-Tiermodellen und zum anderen sogenannte „Rescue“-Experimente. Weitere Untersuchungen der Ektodomänenspaltung von APP in Zellen oder Geweben von Tiermodellen, in denen VPS24 oder andere Komponenten der ESCRT-Maschinerie deletiert wurden, sind nicht ohne Weiteres möglich, da nur vereinzelt „Knockout“-Tiermodelle vorhanden sind und diese erhebliche Defekte aufweisen, die zu einer Letalität in frühen Embryonalstadien führt (Kobayashi et al., 2005; Komada & Soriano, 1999). Bei „Rescue“-Experimenten werden Zellen, in denen das Gen von Interesse mittels RNAi depletiert wurde, mit einer RNAi-resistenten cDNA des Gens transfiziert. Folglich können Zellen, in denen das Gen von Interesse depletiert wurde, wieder das gefragte Protein bilden. Wird bei Expression der RNAi-resistenten cDNA der RNAi-bedingte Phänotyp aufgehoben und kann der Phänotyp von Kontroll-Zellen wiederhergestellt werden, so spricht man von einem erfolgreichen „Rescue“-Experiment. Dieses experimentelle Vorgehen wird derzeit als Goldstandard zur Validierung von RNAi-basierten Ergebnissen gesehen (Echeverri et al., 2006). „Rescue“-Experimente sind methodisch aufwendig und können auf Grund technischer Limitationen oft nicht die endgültige Verifizierung von RNAi-validierten Kandidatengen erbringen (Echeverri et al., 2006; Sigoillot & King, 2011; Zhou et al., 2008). Eine der experimentellen Herausforderungen ist, mit der Überexpression der RNAi-resistenten cDNA die zelluläre Funktion des Zielproteins wiederherzustellen. Die

Hauptschwierigkeit dabei ist, die Proteinmengen zu erhalten, die dem endogenen, physiologischen Expressionslevel entsprechen und damit den Verlust des funktionellen, zellulären Proteins ausgleichen können (Sigoillot & King, 2011). Für Proteine der ESCRT-Maschinerie sind „Rescue“-Experimente schwierig, da bekannt ist, dass die Überexpression von ESCRT-Komponenten zur Aggregation der ESCRT-Proteine in der Zelle führt (Bache et al., 2006; Wollert et al., 2009). Durch das Auftreten dieser Aggregationsartefakte bei Expression von ESCRT-Komponenten werden erfolgreiche „Rescue“-Experimente zur Wiederherstellung der zellulären Funktion der ESCRT-Maschinerie experimentell sehr anspruchsvoll.

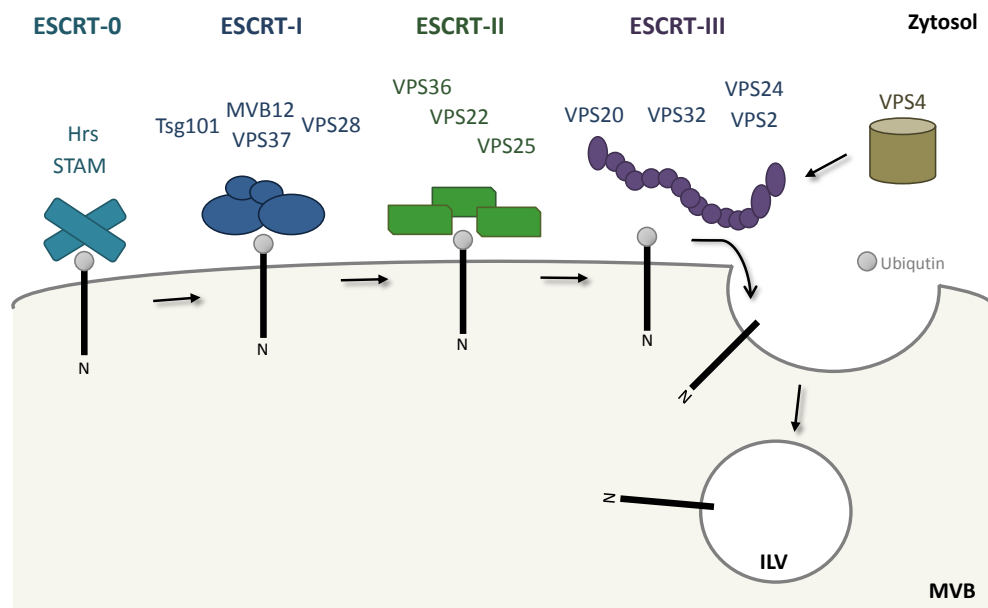
### **4.3 Die ESCRT-Maschinerie moduliert die Ektodomänenspaltung von APP**

#### **4.3.1 Aufbau und zelluläre Funktionen der ESCRT-Maschinerie**

Das RNAi-basierte „Screening“ zur Suche von Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP führte zur Identifizierung von VPS24 („vacuolar protein sorting-associated protein 24“), welches Bestandteil der ESCRT-Maschinerie ist (ESCRT = „endosomal sorting complex required for transport“). Der multimere Komplex agiert in der Sortierung und im Transport von Transmembranproteinen im endosomal-lysosomalen Weg und übernimmt dabei distinkte, aber korrelierte Funktionen (Katzmann et al., 2001; Raiborg & Stenmark, 2009): a) Erkennung und Bindung von ubiquitinylierten Kargo-Proteinen in den Membranen früher Endosomen b) Deformation der endosomalen Membranen und Sortierung der Kargo-Proteine in die entstehenden Einstülpungen und c) Abschnürung der entstehenden Einstülpungen zu intralumenalen Vesikeln (ILVs) (Raiborg & Stenmark, 2009). Die Anzahl der gebildeten ILVs wird als Charakterisierungsmerkmal verwendet: Frühe Endosomen enthalten bis zu 8 ILVs und späte Endosomen 9 oder mehr ILVs (Saftig & Klumperman, 2009). Späte Endosomen werden synonym als „Multivesicular Bodies“ (MVBs) oder „Multivesicular Endosomes“ (MVEs) bezeichnet (Gruenberg & Stenmark, 2004; Raposo & Marks, 2007). Bei Fusion der MVBs mit Lysosomen werden die ILVs in das lysosomale Lumen freigesetzt und vollständig abgebaut, wobei Lipasen die Lipidanteile und lysosomale Proteasen die Kargo-Proteine abbauen (Gruenberg & Stenmark, 2004; Raiborg & Stenmark, 2009).

Die ESCRT-Maschinerie besteht aus den vier Untereinheiten ESCRT-0 bis ESCRT-III, deren Rekrutierungsabfolge und Funktionen in der MVB-Entstehung bereits gut verstanden sind

(Hurley & Hanson, 2010; Raiborg & Stenmark, 2009): Ubiquitinylierte Kargo-Proteine und endosomale Lipide (Phosphatidylinositol-3-Phosphate) vermitteln die Rekrutierung von Hrs an die Membran früher Endosomen (Bache et al., 2003a; Katzmann et al., 2001). Hrs rekrutiert STAM, so dass die Bildung der ESCRT-0-Untereinheit vervollständigt wird (Bache et al., 2003b). Neben STAM bindet Hrs auch Tsg101 und initiiert damit die Assemblierung des ESCRT-I-Subkomplexes (Lu et al., 2003). Zu ESCRT-I gehören neben Tsg101 auch MVB12, VPS37 und VPS28, die von Tsg101 rekrutiert werden (Katzmann et al., 2001). VPS28 übernimmt die Bindung von VPS36, welches die ESCRT-II-Komponenten VPS25 und VPS22 an die endosomale Membran holt (Babst et al., 2002b). VPS25 leitet die Nukleation des ESCRT-III-Subkomplexes ein: An rekrutiertes VPS20 wird eine Vielzahl von VPS32-Proteinen angelagert, so dass filamentöse Oligomere entstehen. Die Ausdehnung der VPS32-Oligomere wird durch Bindung von VPS24 gestoppt (Babst et al., 2002a). Die Assemblierung der Oligomere dient der Deformation und der Einstülpung von endosomalen Membranen (Teis et al., 2008). Nach heutigem Kenntnisstand geht man davon aus, dass der Transport der Kargo-Proteine in die entstehenden ILVs durch „Weiterreichen“ der Kargo-Proteine zwischen den Ubiquitin-bindenden ESCRT-Untereinheiten bewerkstelligt wird (Raiborg & Stenmark, 2009). An das „Kappen“-Protein VPS24 bindet VPS2, welches die ATPase VPS4 und weitere ESCRT-assoziierte, deubiquitinylierende Enzyme rekrutiert (Babst et al., 2002a). Die Aktivität der ATPase leitet die Auflösung des ESCRT-III-Subkomplexes ein und trägt somit zur Abschnürung der intralumenalen Vesikel bei, die in das Lumen der MVBs freigesetzt werden (Saksena et al., 2009). Eine schematische Darstellung der Komponenten der ESCRT-Maschinerie ist in untenstehender Abbildung 26 zu finden.



**Abbildung 26: Schematische Darstellung der ESCRT-Maschinerie und ihrer Funktionen im Transport von ubiquitinylierten Transmembranproteinen.**

Die Subkomplexe ESCRT-0 bis ESCRT-III agieren sequentiell in der Erkennung, Sortierung und dem Transport von Kargo-Proteinen in intralumenale Vesikel (ILVs) der „Multivesicular Bodies“ (MVB).

Bisherige Studien zur Aufklärung der zellulären Funktionen der ESCRT-Maschinerie basierten häufig auf der Depletierung einzelner Komponenten der ESCRT-Maschinerie. Neben den Effekten auf Integrität der ESCRT-Maschinerie und die Morphologie von endosomalen Kompartimenten wurden besonders die Effekte auf den endosomal-lysosomalen Proteintransport untersucht. Dabei wurde oftmals der sehr gut charakterisierte EGFR („Epidermal-Growth-Factor-Receptor“) als beispielhaftes Substrat verwendet (Bache et al., 2004b; Eden et al., 2009; Woodman, 2009). Da vorliegende Arbeit auch mit der Depletierung von ESCRT-Komponenten arbeitet, sollen hier die wichtigsten Veränderungen durch Depletierung von ESCRT-Komponenten im Überblick dargestellt werden: Es ist bekannt, dass die Depletierung von zentralen Komponenten, wie Hrs, Tsg101 oder VPS22, die Proteinlevel der anderen Subkomplex-Komponenten reduziert. Daraus resultiert die Auflösung der entsprechenden Subkomplexe (ESCRT-0, ESCRT-I bzw. ESCRT-II) (Bache et al., 2004a; Kobayashi et al., 2005; Malerod et al., 2007). Im Gegensatz hierzu führt der „Knockdown“ von VPS24 zu keiner Reduktion der Mengen von VPS20 und VPS32 des ESCRT-III-Subkomplexes (Babst et al., 2002a). Wird die Integrität der ESCRT-Maschinerie durch Depletierung verschiedener Komponenten (0: Hrs, I: Tsg101, II: VPS22 oder III: VPS24) gestört, so werden morphologische Veränderungen der endosomalen Kompartimente und des endosomal-lysosomalen Proteintransports festgestellt: Im Vergleich zu Kontrollzellen

findet man in ESCRT-depletierten Zellen vergrößerte frühe Endosomen, verkleinerte MVBs und eine verringerte Anzahl von ILVs (Bache et al., 2006; Doyotte et al., 2005; Kobayashi et al., 2005; Komada & Soriano, 1999; Malerod et al., 2007; Raiborg et al., 2008). Der Proteintransport in Zellen, in denen genannte ESCRT-Komponenten depletiert wurden, unterliegt großen Einschränkungen: So akkumulieren endozytierte Zelloberflächenproteine, wie beispielsweise der EGFR, in den vergrößerten frühen Endosomen und werden nicht korrekt in ILVs sortiert. Folglich können Kargo-Proteine der ESCRT-Maschinerie nicht über den MVB-Weg in Lysosomen transportiert werden und dort nicht abgebaut werden. Dieser fehlende lysosomale Abbau führt zu einer Zunahme der zellulären Mengen des untersuchten Substrats. Heute ist bekannt, dass die ESCRT-Maschinerie nicht nur für den erfolgreichen Transport der Kargo-Proteine in die ILVs der MVBs, sondern auch für die erfolgreiche Fusion von MVBs mit Lysosomen benötigt wird (Bache et al., 2006; Bishop et al., 2002; Hasdemir et al., 2007; Komada & Soriano, 1999; Malerod et al., 2007; Metcalf & Isaacs, 2010; Raiborg et al., 2008).

Im Gegensatz zur essentiellen Funktion der ESCRT-Maschinerie im endosomal-lysosomalen Proteintransport scheinen andere zentrale zelluläre Proteintransportwege nicht unmittelbar in Abhängigkeit von der ESCRT-Maschinerie zu stehen. So wurde interessanterweise gezeigt, dass die Clathrin-abhängige Endozytose von Zelloberflächenproteinen nicht durch die Depletierung der genannten ESCRT-Komponenten beeinträchtigt wird (Babst et al., 2000; Bache et al., 2006; Doyotte et al., 2005; Langelier et al., 2006; Malerod et al., 2007; Morino et al., 2004; Raiborg et al., 2008; Razi & Futter, 2006). Im Gegensatz hierzu ist die Funktion der ESCRT-Maschinerie im Recycling von Zelloberflächenproteinen von Endosomen zur Plasmamembran umstritten. Einerseits gibt es Publikationen, die bei Depletierung von ESCRT-Komponenten Defekte in diesem Transportweg zeigen (Baldys & Raymond, 2009; Doyotte et al., 2005; Fujita et al., 2003; Yoshimori et al., 2000). Andere Studien wiesen nach, dass die Inhibierung der ESCRT-Maschinerie entweder keine Effekte hat oder sogar zu einer Zunahme des Recyclings führt (Babst et al., 2000; Raiborg et al., 2008; Razi & Futter, 2006). Aktuelle Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass es verschiedene Recycling-Routen gibt, die sich in ihrer Abhängigkeit von der ESCRT-Maschinerie unterscheiden, und deshalb bei Inhibierung der ESCRT-Maschinerie unterschiedliche Effekte auftreten können (Dukes et al., 2008; Grant & Donaldson, 2009).

### **4.3.2 Potentielle Mechanismen der ESCRT-Maschinerie in der Ektodomänenspaltung von APP**

In vorliegender Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Depletierung von VPS24 und weiteren ESCRT-Komponenten mit siRNAs zu einer Modulation der Ektodomänenspaltung von APP führt: So konnte festgestellt werden, dass die Sekretion von APPs $\beta$  bei Depletierung der ESCRT-Komponenten einheitlich um ca. 20 - 30 % vermindert wurde, während für die Produktion von APPs $\alpha$  keine einheitliche Modulation beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 24). Des Weiteren konnte mit zwei unabhängigen shRNAs gegen VPS24 gezeigt werden, dass nicht nur die Sekretion von APPs $\beta$ , sondern auch von A $\beta$  um ca. 30 % vermindert wurde. Interessanterweise wurde in diesen VPS24-„Knockdown“-Zellen zeitgleich eine Zunahme des zellulären APP um ca. 20 % festgestellt (siehe Abbildung 25). Auf Grund der bereits publizierten Effekte auf die endosomale Morphologie und den zellulären Proteintransport bei Depletierung von ESCRT-Komponenten können potentielle Modulationsmechanismen der ESCRT-Maschinerie in der Ektodomänenspaltung von APP diskutiert werden. So ist es denkbar, dass Veränderungen im Transport von APP und/oder BACE1 ursächlich für die beobachtete Reduktion der Sekretion von APPs $\beta$  und A $\beta$  in ESCRT-„Knockdown“-Zellen und für die gezeigte Zunahme des zellulären APP in stabilen VPS24-„Knockdown“-Zellen sind.

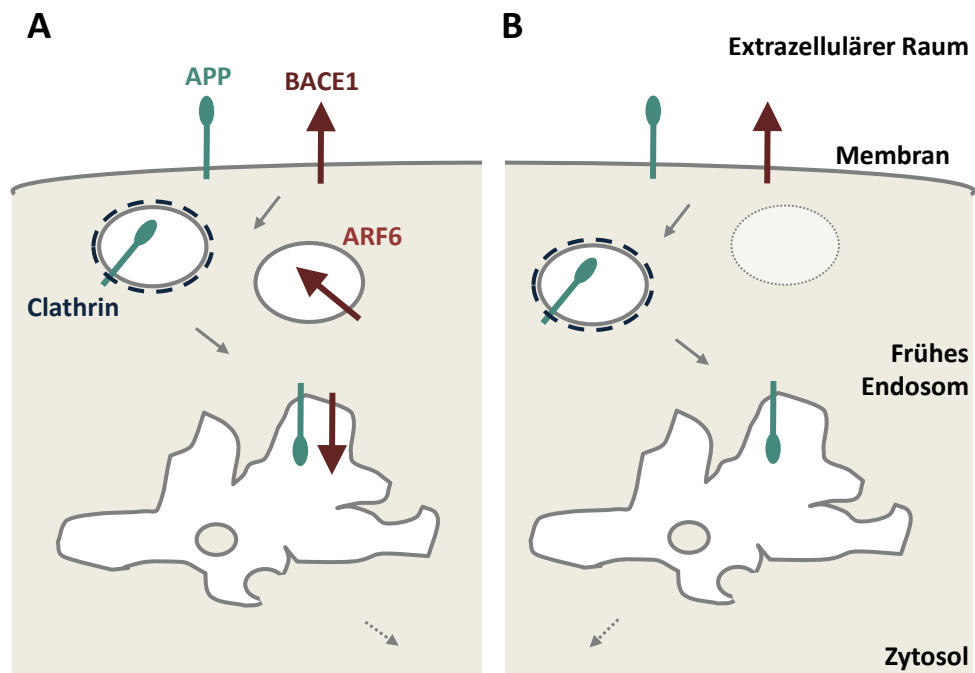
#### **4.3.2.1 Die ESCRT-Maschinerie könnte die Endozytose von BACE1 modulieren**

APP und seine  $\beta$ -Sekretase BACE1 werden durch Endozytose von der Plasmamembran in die Zellen aufgenommen. Dabei unterscheiden sich die Endozytose-Wege der beiden Proteine: APP wird über Clathrin-abhängige Endozytose in frühe Endosomen gebracht (Koo & Squazzo, 1994; Perez et al., 1999; Vetrivel & Thinakaran, 2006), wohingegen BACE1 über eine alternative Route in die frühen Endosomen transportiert wird. Da diese Route mit ARF6 („small GTPase ADP ribosylation factor“) assoziiert ist, wird diskutiert, dass die Endozytose von BACE1 den Clathrin-Caveolin-unabhängigen Endozytose-Wegen zugeschrieben werden kann (Sannerud et al., 2011). Es wurde bereits gezeigt, dass die Clathrin-abhängige Endozytose nicht durch die Depletierung von ESCRT-Komponenten der vier Subkomplexe beeinträchtigt wird (Raiborg et al., 2008), daher kann hypothetisiert werden, dass auch in den „Knockdown“-Studien der ESCRT-Komponenten in vorliegender Arbeit keine Veränderungen in der Endozytose von APP vorliegen, die die Modulation der



---

Ektodomänenspaltung begründen könnten. Im Gegensatz dazu liegen keine Studien vor, ob alternative Endozytose-Routen, wie die ARF6-regulierte Aufnahme von BACE1 in frühe Endosomen, bei Funktionsverlust der ESCRT-Maschinerie verändert werden. Würde tatsächlich eine Beeinträchtigung dieser alternativen Routen bei ESCRT-Depletierung erfolgen, so wäre es denkbar, dass weniger BACE1 in die frühen Endosomen gelangen und somit weniger  $\beta$ -spezifische Spaltung von APP erfolgen kann, so dass damit die beobachtete Reduktion der Sekretion von APPs $\beta$  und A $\beta$  erklärt werden könnte (siehe Abbildung 23 bis 25). Eine schematische Darstellung dieses Modells ist in Abbildung 27 zu finden. Diese Annahme könnte in weiteren Studien zum intrazellulären Transport von BACE1 bei Depletierung von ESCRT-Komponenten überprüft werden. Die beobachtete Zunahme des zellulären APP in VPS24-, „Knockdown“-Zellen könnte das Resultat des verringerten lysosomalen Abbaus von APP sein (siehe Abbildung 25). Diese Hypothese wird von Untersuchungen des Transports und des Abbaus des EGFR in VPS24-, „Knockdown“-Zellen unterstützt: Der unverändert endozytierte EGFR akkumulierte in frühen Endosomen und wurde von dort nicht effektiv in Lysosomen transportiert, weshalb auch weniger Abbau des EGFR erfolgte und eine Zunahme der zellulären Level des EGFR beobachtet wurde (Bache et al., 2006), ähnlich wie für APP in vorliegender Arbeit (siehe Abbildung 25). Daher wäre es interessant, in weiteren Studien den Abbau von APP in VPS24-, „Knockdown“-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zu untersuchen.



**Abbildung 27: Die ESCRT-Maschinerie könnte die Ektodomänenspaltung von APP durch Modulation der Endozytose der  $\beta$ -Sekretase BACE1 verändern.**

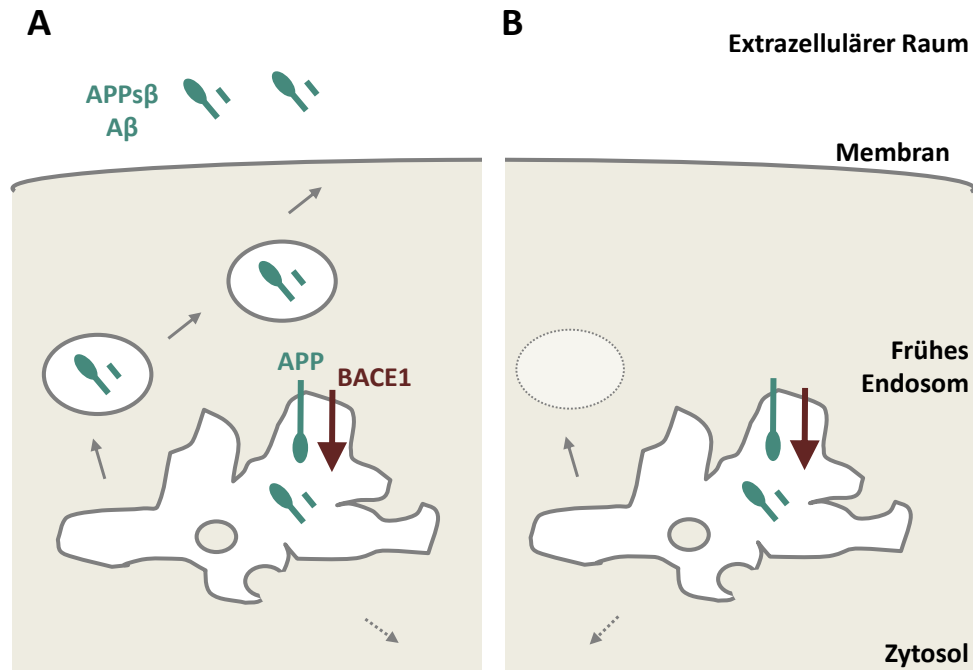
A) Unter Kontrollbedingungen werden APP und BACE1 über Clathrin- bzw. ARF6-abhängige Endozytose von der Plasmamembran in das frühe Endosom gebracht. Dort erfolgt die Ektodomänenspaltung von APP durch BACE1. B) Bei Depletierung von ESCRT-Komponenten könnte nur noch APP über die Clathrin-abhängige Endozytose in das frühe Endosom gelangen, während BACE1 an der Zelloberfläche verbleibt, wo keine Ektodomänenspaltung von APP durch BACE1 stattfindet. Demzufolge würden die Mengen an APPs $\beta$  und A $\beta$  reduziert.

#### 4.3.2.2 Die ESCRT-Maschinerie könnte die Sekretion von APPs $\beta$ und A $\beta$ regulieren

Falls jedoch die Endozytose von APP und seiner  $\beta$ -Sekretase BACE1 unabhängig von der Integrität der ESCRT-Maschinerie sind, könnten alternativ auch Veränderungen des Recyclings von frühen Endosomen zur Plasmamembran die beobachtete Abnahme der Sekretion von APPs $\beta$  und A $\beta$  erklären. Wie eingangs geschildert, wird die Funktion der ESCRT-Maschinerie im Recycling von Zelloberflächenproteinen kontrovers diskutiert. Studien, die bei Depletierung von ESCRT-Komponenten Defekte im Recycling beobachteten, gehen von einer zentralen Rolle der ESCRT-Maschinerie im Recycling aus (Baldys & Raymond, 2009; Doyotte et al., 2005; Fujita et al., 2003; Yoshimori et al., 2000). Andere Studien lehnen diese Funktion der ESCRT-Maschinerie ab, da hier keine Effekte auf das Recycling oder sogar eine Zunahme desselben erhalten wurden (Babst et al., 2000; Raiborg et al., 2008; Razi & Futter, 2006). Als Erklärungsmöglichkeit wird diskutiert, dass es differente Recycling-Routen gibt, die sich in ihrer Abhängigkeit von der ESCRT-Maschinerie

unterscheiden, so dass hieraus die gegensätzlichen Effekte bei Depletierung der ESCRT-Maschinerie auf das Recycling von Zelloberflächenproteinen resultieren würden (Dukes et al., 2008; Grant & Donaldson, 2009). Allgemein wird die Zunahme von Recycling-Ereignissen bei ESCRT-Depletierung durch die fehlende Sortierung der untersuchten Proteine in den MVB-Weg, die somit für das Recycling zur Verfügung stehen, begründet (Babst et al., 2000; Raiborg et al., 2008; Razi & Futter, 2006). Defekte im Recycling von Transmembranproteinen hingegen werden auf einen generellen Verlust der Integrität der endosomalen Kompartimente und deren Mikrodomänen-Architektur zurückgeführt (Dukes et al., 2008; Woodman, 2009). Es wird diskutiert, dass diese globalen Störungen der endosomalen Strukturen in einer generellen Reduktion des Recyclings und der Formation von entsprechenden Vesikeln an endosomalen Membranen resultieren und somit ursächlich für die beschriebenen Reduktionen des Recyclings von Oberflächenrezeptoren sein könnten (Doyotte et al., 2005). Diese tiefen Veränderungen der endosomalen Kompartimente und die damit verbundene Reduktion in der Bildung von Recycling-Vesikeln könnten auch Ursache für die Abnahme der Sekretion von APPs $\beta$  und A $\beta$  sein (siehe Abbildung 23 bis 25). Diese beiden Spaltprodukte von APP entstehen in endosomalen Kompartimenten und werden durch die Aktivität der  $\beta$ - bzw. auch  $\gamma$ -Sekretase in das Lumen der Endosomen freigesetzt. Die Sekretion dieser Spaltprodukte in den extrazellulären Raum kann über das Einschließen von APPs $\beta$  und A $\beta$  in Recycling-Vesikel erfolgen, die bei Verschmelzen mit der Plasmamembran ihren Inhalt in den extrazellulären Raum abgeben (Zhi et al., 2011). Die in der Literatur beschriebenen Defekte in der Formation von Recycling-Vesikeln durch Inhibierung der ESCRT-Maschinerie könnten die in vorliegender Arbeit erhaltenen Resultate wie folgt erklären: Der siRNA-vermittelte „Knockdown“ von Komponenten der ESCRT-Maschinerie würde, wie bereits in anderen Studien gezeigt, zum Verlust der endosomalen Integrität führen. Daraus resultierend könnten Zellen, in denen ESCRT-Komponenten depletiert wurden, weniger Recycling-Vesikel bilden als Kontrollzellen. Damit wäre die beobachtete Abnahme der Sekretion von APPs $\beta$  und A $\beta$  in „Knockdown“-Zellen im Vergleich zu Zellen unter Kontrollbedingungen zu erklären (siehe Abbildung 23 bis 25). Eine schematische Darstellung dieses Modells ist in Abbildung 28 zu finden. Bei Zutreffen dieser Hypothese wäre dementsprechend eine Akkumulation von APPs $\beta$  und A $\beta$  in ESCRT-„Knockdown“-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen im Lumen der endosomalen Kompartimente zu vermuten, die es mit geeigneten Methoden nachzuweisen gilt. Auch in diesem Modell könnte die

Akkumulation des zellulären APP durch Beeinträchtigung der Fusion von MVBs mit Lysosomen und folglich den fehlenden Abbau erklärt werden.



**Abbildung 28: Modelle zur Modulation der Sekretion der Spaltprodukte APPsβ und Aβ durch Beeinträchtigung des Recyclings von Endosomen zur Plasmamembran.**

A) Unter Kontrollbedingungen werden APPsβ und Aβ über den Transport in Recycling-Vesikeln von der Zelle sekretiert. B) Ist bei Depletierung von ESCRT-Komponenten die Bildung der Recycling-Vesikel eingeschränkt, so könnten dementsprechend weniger APPsβ und Aβ von der Zelle freigesetzt werden.

#### 4.3.2.3 Die ESCRT-Maschinerie könnte indirekt die β-Sekretase-Spaltung von APP modulieren

Neben den geschilderten Szenarien ist es auch denkbar, dass der „Knockdown“ von ESCRT-Komponenten auf indirektem Weg die Ektodomänenspaltung von APP moduliert. Dabei ist es wahrscheinlich, dass die Depletierung von ESCRT-Komponenten durch die Defekte im endosomal-lysosomalen Abbau-Weg die Akkumulation verschiedener Proteine in Endosomen bewirkt. So könnte ein Protein (oder eine Proteingruppe), das unter Kontrollbedingungen in ILVs sortiert und über MVBs in Lysosomen transportiert und dort abgebaut wird, unter ESCRT-„Knockdown“-Bedingungen in endosomalen Kompartimenten akkumulieren und dort in verschiedenster Weise die Ektodomänenspaltung von APP durch die β-Sekretase BACE1 modulieren. Die Modulation der Ektodomänenspaltung durch ein bis dato unbekanntes Protein (oder eine Proteingruppe), das bei Depletierung der ESCRT-

---

Maschinerie zusammen mit APP und BACE1 in frühen Endosomen akkumuliert, könnte dabei in vielfältiger Weise stattfinden: So wäre es denkbar, dass das unbekannte Protein das Aufeinandertreffen von APP und BACE1 kontrollieren könnte, indem es beispielweise direkt an APP oder BACE1 binden und somit den  $\beta$ -Sekretase-Schnitt verhindern könnte. Es könnte aber auch sein, dass das unbekannte Protein den Transport von APP oder BACE1 aus dem Endosom an die Plasmamembran oder das trans-Golgi-Netzwerk unterstützt und so das Aufeinandertreffen von Substrat und Sekretase vermindert. Zusätzlich könnte die Prozessierung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase auch dadurch vermindert werden, dass das unbekannte Protein die enzymatische Aktivität von BACE1 negativ reguliert. Dieses unbekannte Protein (oder die Proteingruppe) könnte also ein direkter Bindepartner von APP oder BACE1 sein oder aber indirekt auf APP oder BACE1 Einfluss nehmen, falls es sich beispielsweise um einen Regulator des endosomalen Recyclings handelt. Da in vorgeschlagenem Modell die ESCRT-Depletierung auch die subzelluläre Lokalisierung und den endosomal-lysosomalen Transport des unbekanntes Proteins (der Proteingruppe) verändern würde, ist es denkbar, dass es sich bei postuliertem Protein um ein Transmembranprotein handelt, das in Abhängigkeit von der ESCRT-Maschinerie in ILVs der MVBs sortiert und für den Abbau in Lysosomen transportiert wird.

## 5 Ausblick

Die Ektodomänenspaltung von APP ist ein entscheidender Schritt in der Entstehung der charakteristischen A $\beta$ -Peptide der Alzheimer-Erkrankung. Dabei verhindert die Spaltung von APP durch die  $\alpha$ -Sekretase die Entstehung von A $\beta$ , während die Prozessierung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase die Produktion der toxischen A $\beta$ -Peptide ermöglicht. Auf Grund der zentralen Funktion der Ektodomänenspaltung von APP in der Regulation der A $\beta$ -Produktion besteht großes Interesse daran, die zellulären Regulationsmechanismen, die die Ektodomänenspaltung von APP kontrollieren, besser zu verstehen. Deshalb beschäftigte sich vorliegende Arbeit mit der Identifizierung von neuen zellulären Modulatoren und der Charakterisierung von zellulären Prozessen, die die Ektodomänenspaltung von APP kontrollieren.

Bei der Untersuchung des bis dato unbekanntes Proteins TMEM59 konnte festgestellt werden, dass TMEM59 durch Modulation von Golgi-Glykosylierungsreaktionen die Maturierung von APP und dessen Prozessierung durch die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase inhibiert. Die proteolytischen Aktivitäten der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Sekretase wurden nicht durch TMEM59 beeinträchtigt, wohingegen der intrazelluläre Transport von APP stark von TMEM59 inhibiert wurde. Die Arretierung von APP im ER und im Golgi-Apparat blockiert den Transport an die Plasmamembran, wo APP durch die  $\alpha$ -Sekretase gespalten wird, und folglich auch den weiteren Transport in endosomale Kompartimente, wo die  $\beta$ -Sekretase aktiv ist. APP wird unabhängig von seiner eigenen Glykosylierung in der Zelle transportiert und von seinen Sekretasen prozessiert (Pahlsson & Spitalnik, 1996). Daher muss ein weiteres Protein gemeinsam mit TMEM59 für den Rückhalt von APP in ER und Golgi-Apparat verantwortlich sein. Es ist wahrscheinlich, dass das unbekannte Protein selbst eine Glykosylierung erfährt und dies für seine Aktivität im APP-Transport benötigt, da seine Funktion unter TMEM59-Expression offensichtlich verloren geht. Das unbekannte Protein scheint also den erfolgreichen Transport von APP aus dem ER bzw. Golgi-Apparat zu garantieren, was die Vermutung nahe legt, dass das unbekannte Glykoprotein in diesen Kompartimenten lokalisiert ist. Damit ergibt sich die Möglichkeit, in zukünftigen Studien gezielt nach Proteinen zu suchen, die diese Kriterien erfüllen. So wäre es denkbar, siRNA-Bibliotheken gegen ER-Golgi-residente Glykoproteine zu konzipieren und die Effekte der Depletierung solcher Proteine auf die Ektodomänenspaltung von APP zu untersuchen. Die Durchführung eines solchen „Screenings“ könnte nach entwickelten Methoden und Validierungsstrategien

der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden.

Mit Hilfe des genomweiten RNAi-„Screenings“ in Drosophila-Zellen konnten neue Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP identifiziert werden. Nach Untersuchung der humanen orthologen Gene und Festlegung einer Validierungsstrategie konnte gezeigt werden, dass VPS24 und die ESCRT-Maschinerie die Ektodomänenspaltung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase in humanen Zellen modulieren. Auf Grund der bereits publizierten Studien über die Veränderungen zellulärer Prozesse bei ESCRT-Depletierung konnten Modelle aufgestellt werden, wie VPS24 bzw. die gesamte ESCRT-Maschinerie die Ektodomänenspaltung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase modulieren könnten: Es könnte eine Beeinträchtigung der BACE1-Endozytose oder der Bildung von Recycling-Vesikeln durch die Depletierung von ESCRT-Komponenten auftreten. Beide Modelle könnten die Abnahme der Produktion bzw. Sekretion von APPs $\beta$  und A $\beta$  erklären. Die beobachtete Zunahme des zellulären APP ist höchstwahrscheinlich auf Defekte in der Fusion von Endosomen und Lysosomen und somit vermindertem lysosomalen Abbau bei Depletierung von ESCRT-Komponenten zurückzuführen. In zukünftigen Studien sollten diese Hypothesen überprüft werden. Dazu sollten zum einen die subzelluläre Lokalisierung von BACE1 und APP überprüft werden: In Mikroskopie-Analysen könnte untersucht werden, ob BACE1 an der Zelloberfläche und APP in endosomalen Kompartimenten akkumulieren, nachdem ESCRT-Komponenten depletiert wurden. Weitere Untersuchungen wie spezielle Assays zur Endozytose von BACE1, zur Bildung von Recycling-Vesikeln oder der Akkumulation von intrazellulärem APPs $\beta$  und A $\beta$  könnten folgen. Auf Grund der Nachteile von siRNAs gegenüber shRNAs und zur weiteren Validierung der ESCRT-Maschinerie als Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP wäre es erstrebenswert, neben VPS24 auch stabile „Knockdown“-Zelllinien von Hrs (ESCRT-0), Tsg101 (ESCRT-I) und VPS22 (ESCRT-II) zu generieren und in diesen ähnliche Studien, wie für VPS24-„Knockdown“-Zellen gezeigt und geplant, durchzuführen.

## 6 Zusammenfassung

Die Prozessierung von APP kann in zwei alternativen Wegen erfolgen: Wird die Ektodomäne von APP durch die  $\alpha$ -Sekretase freigesetzt, entsteht das neuroprotektive APP $\alpha$ -Fragment. Wird dieser Schritt jedoch durch die  $\beta$ -Sekretase vorgenommen, so kann in Folge das neurotoxische A $\beta$ -Peptid gebildet werden. Um in Zukunft die Produktion der A $\beta$ -Peptide beeinflussen zu können, ist es essentiell zu verstehen, wie entschieden wird, ob APP durch die  $\alpha$ - oder die  $\beta$ -Sekretase-geschnitten wird. Bisher ist nur sehr wenig über die Kontrolle dieser alternativen Prozessierungen bekannt. Die molekularen Mechanismen und vor allem die daran beteiligten zellulären Modulatoren sind bis heute nicht im Detail verstanden oder identifiziert worden. Um zelluläre regulatorische Prozesse besser zu verstehen und um neue zelluläre Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP zu identifizieren, wurden in vorliegender Arbeit zwei Ansätze gewählt: Zum einen wurden die zellulären Mechanismen, mit denen das Protein TMEM59 die Ektodomänenspaltung von APP inhibieren kann, untersucht. Und zum anderen wurde ein genomweites RNAi-„Screening“ in Drosophila-Zellen durchgeführt, um auf diesem Weg neue zelluläre Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP in humanen Zellen zu identifizieren.

TMEM59 wurde im Labor in einem cDNA-Expressions-„Screening“ als neuer Modulator der Ektodomänenspaltung von APP identifiziert (Neumann et al., 2006; Schobel et al., 2008; Schobel et al., 2006). TMEM59 ist ein Golgi-Protein, das zum einen die Prozessierung und Maturierung von APP und zum anderen Golgi-Glykosylierungsreaktionen inhibiert (Fischer, 2008). In vorliegender Arbeit konnten die Effekte von TMEM59 und seinem Homologen TMEM59L auf die Prozessierung und Maturierung von APP verifiziert werden. Im Speziellen konnte gezeigt werden, dass die Effekte nicht nur für transient exprimiertes APP, sondern auch für endogen in der Zelle vorhandenes APP zutreffen. In detaillierten Immunofluoreszenz-Analysen konnte gezeigt werden, dass TMEM59 mit unterschiedlichen Markern der Golgi-Subkompartimente ko-lokalisiert und somit TMEM59 im gesamten Golgi-Apparat zu finden ist. Dieses Ergebnis deutet auf eine mehr generelle Modulation von Golgi-Glykosylierungsreaktionen durch TMEM59 hin. Um zu überprüfen, ob die TMEM59-anhängige Modulation von Golgi-Glykosylierungsreaktionen auch Auswirkungen auf die APP-Sekretasen ADAM10 und BACE1 hat, die selbst auch glykosylierte Proteine sind, wurden die Aktivitäten dieser Proteasen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die proteolytischen Aktivitäten der beiden Enzyme nicht verändert waren, womit ausgeschlossen



werden konnte, dass eine Beeinträchtigung der Sekretase-Aktivitäten durch TMEM59 zur beobachteten Beeinträchtigung der Prozessierung von APP führte. Allerdings konnte in Studien des intrazellulären Transports in lebenden Zellen belegt werden, dass TMEM59 einen Rückhalt von APP im Golgi-Apparat und eine Blockade des Transports an die Zelloberfläche und in endosomale Kompartimente verursachte. Da APP an der Plasmamembran durch die  $\alpha$ -Sekretase und in Endosomen durch die  $\beta$ -Sekretase-geschnitten wird, ist es wahrscheinlich, dass die TMEM59-vermittelte Blockade im Transport von APP Ursache für die beobachtete Inhibierung der Ektodomänenspaltung von APP ist. Zur weiteren Validierung von TMEM59 und seinem Homologen TMEM59L als Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP wurde ein Doppel-„Knockdown“ durchgeführt. Auch hier konnten Effekte auf die Ektodomänenspaltung von APP nachgewiesen werden und somit TMEM59 und sein Homologes TMEM59L als neue Modulatoren mit neuartigen zellulären Mechanismen der Ektodomänenspaltung von APP bestätigt werden.

Zur Identifizierung neuer zellulärer Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP wurden in vorliegender Arbeit ein genomweites RNAi-„Screening“ in Drosophila-Zellen durchgeführt und die erhaltenen Kandidatengene in humanen Zellen weiter untersucht. Hierzu wurde zunächst eine geeignete Drosophila-Reporterzelllinie etabliert, die ein Reporterkonstrukt für die Ektodomänenspaltung von APP (HRP-APP) exprimiert. Für die Überwachung der generellen Sekretion (GLuc) und der Transfektionseffizienz (FLuc) wurden zwei weitere Reporterkonstrukte verwendet. Anhand der Positivkontrolle Kuzbanian, der  $\alpha$ -Sekretase in Drosophila (Sapir et al., 2005), wurde sichergestellt, dass die Transfektion der Drosophila-Zellen mit cDNA nicht die Aufnahme der dsRNAs oder die Effizienz der RNAi stört und dass das Reporterkonstrukt HRP-APP normal in den Reporterzellen gebildet und prozessiert wird. Nach erfolgreicher Etablierung der Reporterzelllinie wurde in zwei Schritten das genomweite RNAi-„Screening“ durchgeführt: Im Primär-„Screening“ wurden ca. 300 Kandidatengene erhalten, von denen 43 im Sekundär-„Screening“ als Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP verifiziert werden konnten. Das RNAi-„Screening“ wurde durch das mehrfache Auftreten der Positivkontrolle Kuzbanian unter den stärksten Modulatoren verifiziert. Zur weiteren Untersuchung dieser Kandidaten wurden zunächst humane orthologe Gene gesucht. Die erhaltenen 30 humanen Kandidatengene wurden im Folgenden in humanen SH-SY5Y-Zellen in RNAi-Studien untersucht. In diesen Zellen wird APP sowohl durch die  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 als auch durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 gespalten, so dass hierbei die Effekte der

Depletierung der Kandidatengene mit siRNAs auf die Spaltprodukte beider Sekretasen (APPs $\alpha$  und APPs $\beta$ ) untersucht wurden. Es ist bekannt, dass diese siRNAs eine sehr hohe Rate von „off target“-Effekten haben. Somit war es notwendig, eine geeignete Validierungsstrategie zu entwickeln: Hierzu wurden die Kandidatengene zunächst mit zwei unabhängigen siRNA-Pools depletiert und die Effekte auf die Ektodomänenspaltung von APP verglichen. Die verbleibenden 12 Kandidatengene wurden darauf folgend mit einzelnen siRNA-Sequenzen depletiert und deren Effekte mit denen des siRNA-Pools verglichen. Nur wenn eine Reproduktion der Effekte beobachtet werden konnte, wurde im nächsten Schritt die Korrelation von „Knockdown“ und Phänotyp überprüft. Mit Hilfe dieser bisherigen Schritte der Validierungsstrategie konnten 5 Kandidatengene als Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP in humanen Zellen verifiziert werden: Neben Genen, die für ein Histon-Protein (HIST1H4C), ein ribosomales Protein (RPL36AL) und ein Protein des minoren Spleißosoms (ZMAT5) codieren, wurden ein unbekanntes Gen (METTL16) und das VPS24-Gen, das für ein Protein des intrazellulären Proteintransports codiert, identifiziert. Zur weiteren Validierung über die Stoffwechselweg-Analyse wurde VPS24 ausgewählt, das Bestandteil der ESCRT-Maschinerie („endosomal sorting complex required for transport“) und somit des endosomal-lysosomalen Proteintransports ist. In weiteren RNAi-Studien wurden die anderen Mitglieder dieser ESCRT-Maschinerie in humanen Zellen depletiert und deren Effekte mit denen von VPS24 auf die Ektodomänenspaltung von APP verglichen: Einheitlich konnte eine Reduktion der Sekretion von APPs $\beta$  beobachtet werden. Um diese Resultate zu vertiefen, wurde VPS24 mit einem alternativen RNAi-System depletiert. Auch mit diesem Ansatz konnten die bisherigen Ergebnisse verifiziert werden. Mit dieser Strategie zur Validierung von Kandidatengen aus dem initialen Drosophila RNAi-„Screening“ konnte VPS24 als Modulator der Ektodomänenspaltung von APP in humanen Zellen identifiziert werden.

## 7 Summary

The processing of APP occurs in two alternative ways: upon release of the ectodomain by  $\alpha$ -secretase, the neuroprotective APP $\alpha$ -fragment is produced. But if APP is cleaved by the  $\beta$ -secretase the A $\beta$ -peptide can be produced. To be able to influence the production of A $\beta$ -peptides, it is essential to understand how it is decided if cleavage occurs by  $\alpha$ - or  $\beta$ -secretase. At present little is known about the control of the alternate processing. Until now, the molecular mechanisms and especially the responsible cellular modulators are not understood in detail or not yet identified. To get a better understanding of cellular regulatory processes and to identify novel cellular modulators of APP ectodomain shedding, the present work chose two approaches: on the one hand cellular mechanisms of TMEM59-mediated inhibition ectodomain shedding of APP were investigated. On the other hand a genome-wide RNAi screening in *Drosophila* cells was performed in order to identify novel cellular modulators of APP ectodomain shedding in human cells.

TMEM59 was identified as a novel modulator of APP ectodomain shedding in a cDNA expression screening in the lab (Neumann et al., 2006; Schobel et al., 2008; Schobel et al., 2006). TMEM59 is a Golgi protein that inhibits on the one hand processing and maturation of APP and on the other hand Golgi glycosylation reactions (Fischer, 2008). My own work could verify these effects of TMEM59 and its homolog TMEM59L on processing and maturation of APP. In particular, it was shown that these effects are not only true for transiently expressed APP but also for endogenous levels of APP. In detailed immunofluorescence studies it was shown that TMEM59 colocalizes with different markers of the Golgi subcompartments and that therefore TMEM59 is present throughout the whole Golgi apparatus. This finding points to a more general modulation of Golgi glycosylation reactions by TMEM59. To test if TMEM59-dependent modulation of Golgi glycosylation reactions also affects APP secretases ADAM10 and BACE1, which are also glycosylated proteins, the activities of these proteases were investigated. It was shown that proteolytic activities were not changed, ruling out that impairment of secretase activities by TMEM59 could cause the observed inhibition of APP processing. But interestingly, studies of intracellular APP transport could show that TMEM59 caused retention of APP in the Golgi apparatus and blockage of transport towards the cell surface and into endosomal compartments. Since APP is cleaved by  $\alpha$ -secretase at the plasma membrane and by  $\beta$ -secretase in endosomes it is likely that a TMEM59-dependent APP transport block causes the

observed inhibition of APP ectodomain shedding. For further validation of TMEM59 and its homolog TMEM59L as modulators of APP ectodomain shedding, a double knockdown study was performed. In this approach effects on APP ectodomain shedding could also be established, affirming TMEM59 and its homolog TMEM59L as modulators of APP ectodomain shedding with novel cellular mechanisms.

In order to identify novel cellular modulators of APP ectodomain shedding a genome wide RNAi screening in *Drosophila* cells was performed and candidate genes were investigated in human cells in present work. Initially a suitable *Drosophila* reporter cell line expressing a reporter construct of APP ectodomain shedding (HRP-APP) was established. Other constructs were used to monitor general secretion (GLuc) and transfection efficiency (FLuc). Using Kuzbanian, the  $\alpha$ -secretase in *Drosophila* (Sapir et al., 2005), as a positive control guaranteed that transfection of cDNAs into *Drosophila* cells did not interfere with uptake of dsRNAs or efficiency of RNAi and that the reporter construct HRP-APP is normally produced and processed in reporter cells. After successful establishment of the reporter cell line the genome wide RNAi was performed in two steps: a primary screening revealed approx. 300 candidate genes out of which 43 could be confirmed in a secondary screening to be modulators of APP ectodomain shedding. The RNAi screening was verified by the several-fold appearance of Kuzbanian among the top modulators. For further investigation of the top candidates human ortholog genes were identified. The 30 human candidate genes were investigated in RNAi studies in human SH-SY5Y cells. In these cells, APP is processed by  $\alpha$ -secretase ADAM10 as well as by  $\beta$ -secretase BACE1. Therefore effects on both shedding products (APP $\alpha$  and APP $\beta$ ) were investigated upon depletion of candidate genes using siRNAs. It is known that siRNAs produce a high rate of off target effects, to this end a robust validation strategy was developed. Candidate genes were first depleted with two different siRNA pools and their effects on APP shedding were compared. Afterwards the remaining 12 candidate genes were depleted using single siRNA sequences and the effects were compared to those of the siRNA pool. Only when a reproduction of effects was obtained in a next step correlation of knockdown and phenotype were assessed. Using these steps of validation 5 candidate genes could be verified as modulators of APP shedding in human cells: next to genes coding for a histone protein (HIST1H4C), a ribosomal protein (RPL36AL), a protein of the minor spliceosom (ZMAT5), an unknown gene (METTL16) and the gene VPS24 („vacuolar protein sorting-associated protein 24“), coding for a protein of intracellular protein transport, were

---

identified. VPS24 was chosen for further validation by a pathway analysis. VPS24 belongs to the ESCRT machinery („endosomal sorting complex required for transport“) and therefore participates in endosomal-lysosomal protein transport. In further RNAi studies other members of the ESCRT machinery were depleted in human cells and effects on APP shedding were compared to VPS24 depletion. For most of the ESCRT members a consistent reduction in APPs $\beta$  production could be observed. To engross these results VPS24 was depleted by using an alternative RNAi system. With this stable knockdown approach, the knockdown phenotype could be confirmed. This stepwise validation strategy for candidate genes of the initial *Drosophila* RNAi screening verified VPS24 as a modulator of APP ectodomain shedding in human cells.

## 8 Material und Methoden

### 8.1 Material

#### 8.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

##### 8.1.1.1 Allgemein

**Tabelle 1: Auflistung der allgemein verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.**

Material	Hersteller
Analysenwaage (Analytical+ 200 g - 0,0001 g)	Ohaus
Autoklav (Tuttnauer 3850 EL)	Systec
Einwegauslaufpipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml)	Sarstedt
Feinwaage (Standard 2000 g - 0,01 g)	Ohaus
Gefrierschrank -20°C (Arktis)	AEG
Gefrierschrank -80°C	Heraeus
Heizblöcke	NeoLab
Kolbenhubpipetten (1 ml, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Gilson
Kühlschrank 4°C (Santo)	AEG
Kühlzentrifuge	Eppendorf
Magnetrührer, heizbare Platte	Heidolph
Mehrkanalpipetten	Eppendorf
Mikrotiterplatten (96-well, transparent)	Nunc
Mikrowelle	Sharp
pH-Elektrode	Schott
pH-Meter (Inolab pH Level 1)	WTW
Pipettenspitzen (1 ml, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Sarstedt
Pipettierhilfe (Accu-Jet)	Brand
Scanner	Hewlett Packard
Thermomixer kompakt	Eppendorf
Tischzentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus
Vortex VF2	IKA-Labortechnik
Wärmeschrank 37°C (Function line)	Heraeus
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore

##### 8.1.1.2 Molekularbiologische Methoden

**Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte für Molekularbiologische Methoden.**

Material	Hersteller
7500 Fast Real-Time PCR	Applied Biosystems
Agarosegeldokumentation (Quickstore plus II)	MS Laborgeräte
Agarosegeldokumentationskamera (CCD Video Camera)	MS Laborgeräte
Agaroselektrophoresekammern	PeqLab
Drucker Geldokumentationsanlage	Mitsubishi
Fast Optical 96-well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems
Nanophotometer	Implen
Schüttelinkubator (Certomat BS-1 B.)	Braun Biotech International

Material	Hersteller
UV-Photometer (V-550)	Jasco
UV-Schirm für Agarosegele	Intas

### 8.1.1.3 Zellkultur

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien in der Zellkultur.**

Material	Hersteller
Bunsenbrenner	Heraeus
Deckgläser	Menzel Gläser
Einfriergefäße (Qualifreeze)	Qualilab
Einwegauslaufpipetten, steril (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Einweg-Röhrchen "Falcon", steril (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Filter (0,45 mm)	VWR
Glasplättchen (12 mm Durchmesser)	Marienfeld
Mikroskop (Wiloverts 10x 4/10/20)	Hund
Pasteurpipetten (Glas)	Sarstedt
Poly-D-Lysin-beschichtete Zellkulturgefäße (24-well)	BD Biosciences
Spritze (5 ml)	Terumo
Stickstofftank (Chronos)	Messer Griesheim
Wasserbad	GFL
Zählkammer (Neubauer)	Optik Labor
Zellkulturflaschen (T-75)	Nunc
Zellkulturinkubator	Heraeus
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm, 24-well, 12-well, 6-well)	Nunc
Zellkultursterilwerkbank	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus

### 8.1.1.4 Zelluläre Untersuchungen (Assays)

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien in zellulären Assays.**

Material	Hersteller
Analyst HT 384-well plate reader (Luminometer)	Molecular Dynamics
Dispenser Multidrop	Labsystems
Konfokales Mikroskop LSM 510 Meta	Zeiss
Lebendzell-Kammern (15 µm, 8well)	IBIDI
Pipettier-Roboter Biomek FX Roboter	Beckmann-Coulter
Poly-D-Lysin-beschichtete 24-well-Platten	Becton Dickinson
selbstklebende Aluminiumfoliendeckel	Costar
weiße 384-well LIA Platten	Greiner

### 8.1.1.5 Proteinbiochemische Methoden

**Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien der Proteinbiochemie.**

Material	Hersteller
Filterpapier für den Western Blot (Whatmanpapier)	Macherey-Nagel
Human (6E10) Aβ Triplex Assay Kit	MSD
Kanüle (0,6 mm)	B.Braun

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Konfokales Mikroskop LSM 510 Meta	Zeiss
Microluminometer	Berthold Technologies
Mikrotiterplatten (96-well, schwarz)	Nunc
MSD sAPP $\alpha$ /sAPPs $\beta$ Assay Kit	MSD
Nitrozellulose Membran (Protran)	Schleicher & Schuell
Plate Reader Sektor Imager MSD	MSD
Plattenspektrometer	BioTek
PVDF Membran (Immobilon-P)	Millipore
Röntgenfilme (SuperRX)	Fujifilm
SDS-PAGE Elektrophoresekammern	Bio-Rad
SDS-PAGE Glasplatten und zugehörige Käbme	Bio-Rad
SDS-PAGE Transferkammern	Bio-Rad
Spannungsquelle für SDS-PAGE und Transfer	Bio-Rad
Spektrofluorimeter	Jasco
Spritze (1 ml)	Terumo
Überkopfschüttler	Heidolph
Westernblot Dokumentationsgerät (LAS-4000)	Fujifilm
Westernblotfilmentwicklungsgerät (Curix 60)	AGFA

## 8.1.2 Enzyme, Versuchssysteme (Kits) und Chemikalien

### 8.1.2.1 Allgemein

Nicht spezifisch aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, Serva oder Sigma bezogen. Die Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad p.a. eingesetzt.

### 8.1.2.2 Molekularbiologische Methoden

**Tabelle 6: Folgende Enzyme, Kits und Chemikalien wurden für molekularbiologische Methoden verwendet.**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
1 kb-DNA-Leiter	Gibco Invitrogen Corporation
7500 Fast Real-Time PCR	Applied Biosystems
Agarose NA	Amersham Biosciences
Ampizillin	Roth
DEPC	Sigma
Fast Optical 96-well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems
HEPES	Biomol
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
NucleoBond AX500 Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
Oligonukleotide	Sigma oder Thermo
Power SYBR-Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
QIAshredder	Qiagen
Restriktionsenzyme	Fermentas / New England Biolabs
RNase-Free DNase Set	Qiagen



Material	Hersteller
RNeasy Mini Kit	Qiagen
T4 DNA-Ligase	Roche
T4 DNA-Ligase-Puffer	Roche
TaqMan Gene Expression Assays	Applied Biosystems
TaqMan Universal PCR Master Mix (ROX)	Applied Biosystems

### 8.1.2.3 Zellkultur

**Tabelle 7: Folgende Medien und Chemikalien wurden in der Zellkultur verwendet.**

Material	Hersteller
DMEM Medium	Gibco
DMEM-F12 Medium	Invitrogen
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco
Fötale Kälberserum (FCS) für Drosophila Zellkultur	JRH Biosciences
G418	Invitrogen
Optimem Medium	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma
Schneiders Medium	Gibco
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco

### 8.1.2.4 Zelluläre Untersuchungen (Assays)

**Tabelle 8: Folgende Reagenzien wurden in zellulären Assays verwendet.**

Material	Hersteller
„Firefly luciferase Assay“-Reagenz: Steady Lite HTS	Perkin Elmer
„Gaussia luciferase Assay“-Reagenz: GAR-2B	Targeting Systems
„Horseradish Peroxidase Assay“-Reagenz: Immobilon Western HRP Substrate	Millipore
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Effectene Transfektionsreagenz	Qiagen
Lipofectamine <sup>TM</sup> 2000	Invitrogen
Lipofectamine <sup>TM</sup> RNAimax	Invitrogen
Triton X-100	Merck

### 8.1.2.5 Proteinbiochemische Methoden

**Tabelle 9: Folgende Kits und Chemikalien wurden in der Proteinbiochemie verwendet.**

Material	Hersteller
Acrylamid (19:1 / 40 % (w/v))	Bio-Rad
Ammonium-Persulfat (APS)	Roche
BCA-Assay Kit Uptima	Interchim
Bovines Serumalbumin (BSA) Uptima	Interchim
C3 (BACE1-Inhibitor)	Calbiochem
ECL Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences
ECLplus Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences
Fluorogenes ADAM Substrat (ADAM Substrate III)	R&D
Fluorogenes BACE1 Substrat (BACE1 Substrate IV)	R&D

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Glycin	Biomol
I-Block	Tropix
Magermilchpulver (instant)	Frema
Molekulargewichtsstandard Marker (See Blue Plus 2)	Invitrogen
MSD Read-Puffer	MSD
MSD Standards für APPs $\alpha$ -, APPs $\beta$ - und A $\beta$ -Assays	MSD
NP-40	Sigma
Protease-Inhibitor-Mix (PI-Mix)	Sigma
Protein-A-Sepharose (PAS)	Sigma
TAPII (ADAM-Inhibitor)	Peptides International
Tween-20	Merck
Western Star Kit	Tropix
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck

### 8.1.3 Puffer und Medien

Alle Lösungen wurden mit voll entsalztem H<sub>2</sub>O angesetzt, das mit einer Milli-Q Anlage zur bidest. Qualität gereinigt wurde und einen elektrischen Widerstand >18.2 M $\Omega$  cm bei 25°C hat. Bei Prozentangaben handelt es sich um Volumenprozent, soweit keine anderen Angaben gemacht wurden. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien.

**Tabelle 10: Folgende Puffer und Medien wurden verwendet.**

<b>Puffer oder Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
4x DNA-Probenpuffer	30 % Glycerin
	10 mM EDTA
	0,05 % Orange G
4x SDS-Probenpuffer (10 ml)	4 ml 20 % Glycerin
	4 ml 20 % (w/v) SDS
	1 ml $\beta$ -Mercaptoethanol
	1,25 ml 1 M Tris pH 6,8
	10 $\mu$ l 10 % Bromphenolblau
Acrylamid-Lösung für Tris-Tricin-Gele	48 % (w/v) Acrylamid
	1,5 % (w/v) Bisacrylamid
Ammoniumchlorid-Lösung	PBS
	50 mM NH <sub>4</sub> Cl
Ampizillin-Stammlösung (1000x)	100 mg/ml Ampizillin in 70 % Ethanol
Anoden-Puffer (Tris-Tricin-Gele)	0,2 M Tris-HCl pH 8,9
Antikörperlösung für APPs $\alpha$ -, APPs $\beta$ - und A $\beta$ -Assays	TBS
	0,05 % Tween-20
	1 % BSA
Blockierlösung für APPs $\alpha$ -, APPs $\beta$ - und A $\beta$ -Assays	TBS
	0,05 % Tween-20
	3 % BSA

<b>Puffer oder Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Blockierlösung für Western Blot	5 % Magermilchpulver
	PBS-T
	oder
	0,2 g I-Block
	100 µl Tween-20
Blokierungslösung für Immunofluoreszenz	100 ml PBS
	PBS
	1 % BSA
	1 % FCS
Einfriermedium	0,1 % Gelatine
	Zelltypspezifisches Medium
Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)	10 % DMSO
	25 mM Tris
	0,2 M Glycin
Gelpuffer für Tris-Tricin-Gele	0,1 % SDS
	3 M Tris-HCl pH 8,45
	0,3 % (w/v) SDS
Hypotonpuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,4
	1 mM EDTA
	1 mM EGTA
	PI-Mix
Kathoden-Puffer (Tris-Tricin-Gele)	0,1 M Tris-HCl
	0,1 M Tricin
	0,1 % SDS
LB-Medium	1 % Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	0,5 % NaCl pH 7,0
	autoklaviert
Lysispuffer	50 mM Tris pH 7,5
	150 mM NaCl
	1 % NP-40
	2 mM EDTA
	PI-Mix
Natrium-Acetat-Puffer	10 mM Natrium-Acetat pH 4,5
PBS	140 mM NaCl
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,75 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 7,4
PBS-EDTA	PBS
	25 mM EDTA
PBS-T	PBS
	0,05 % Tween-20
PFA-Lösung	4 % PFA
	4 % Succrose
Poly-L-Lysin-Lösung	100 µg/ml Poly-L-Lysin in dH <sub>2</sub> O (steril)
Primärantikörper	Antikörper in entsprechender Konzentration (siehe Tabelle 11)
	0,25 % (w/v) BSA
	0,05 % (w/v) Natriumazid
	in PBS-T

<b>Puffer oder Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Primärantikörper für Immunofluoreszenz	Antikörper in entsprechender Konzentration (siehe Tabelle 13)
	Blokierungslösung für Immunofluoreszenz
Protein-A-Sepharose	2 mg PAS in 1 ml 20 % Ethanol
	vor Gebrauch 3x mit PBS gewaschen
Sammelgelpuffer für Tris-Glycin-Gele	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
	0,4 % (w/v) SDS
Sekundärantikörper	Antikörper in entsprechender Konzentration (siehe Tabelle 11)
	0,25 % BSA
	in PBS-T
Sekundärantikörper für Immunofluoreszenz	Antikörper in entsprechender Konzentration (siehe Tabelle 13)
	Blokierungslösung für Immunofluoreszenz
siRNA-Puffer	300 mM KCl
	30 mM HEPES pH 7,5
	1 mM MgCl <sub>2</sub>
SOB-Medium	2 % Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	0,5 % NaCl
	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM MgSO <sub>4</sub>
	2,5 mM KCl
autoklaviert	
STE	50 mM Tris-HCl pH 7,5
	150 mM NaCl
	2 mM EDTA
STEN	50 mM Tris-HCl pH 7,5
	150 mM NaCl
	2 mM EDTA
	0,2 % NP40
STEN-NaCl	STEN
	175 mM NaCl
STEN-SDS	STEN
	0,1 % SDS
STE-T	STE
	1 % Triton
TAE-Puffer (50x Stammlösung)	2 M Tris
	1 M Essigsäure
	50 mM EDTA
TB-Puffer	10 mM HEPES
	15 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	250 mM KCl pH 6,7
	55 mM MnCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
TBS	50 mM Tris-HCl pH 7,4
	150 mM NaCl
TBS-T	TBS
	0,05 % Tween-20

<b>Puffer oder Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Transferpuffer	25 mM Tris
	0,2 M Glycin
Trenngelpuffer für Tris-Glycin-Gele	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
	0,4 % (w/v) SDS
Triton X-100-Lösung	PBS
	0,2 % Triton x-100
Waschlösung für APPs $\alpha$ -, APPs $\beta$ - und A $\beta$ -Assays	TBS
	0,05 % Tween-20
STEN	50 mM Tris-HCl pH 7,5
	150 mM NaCl
	2 mM EDTA
	0,2 % NP40
STEN-NaCl	STEN
	175 mM NaCl
STEN-SDS	STEN
	0,1 % SDS
STE-T	STE
	1 % Triton
TAE-Puffer (50x Stammlösung)	2 M Tris
	1 M Essigsäure
	50 mM EDTA
TB-Puffer	10 mM HEPES
	15 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	250 mM KCl pH 6,7
	55 mM MnCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	steril filtrieren
TBS	50 mM Tris-HCl pH 7,4
	150 mM NaCl
TBS-T	TBS
	0,05 % Tween-20
Transferpuffer	25 mM Tris
	0,2 M Glycin
Trenngelpuffer für Tris-Glycin-Gele	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
	0,4 % (w/v) SDS
Triton X-100-Lösung	PBS
	0,2 % Triton x-100
Waschlösung für APPs $\alpha$ -, APPs $\beta$ - und A $\beta$ -Assays	TBS
	0,05 % Tween-20

### 8.1.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden im Laufe der vorliegenden Arbeit verwendet.

**Tabelle 11: Übersicht über die für den Western Blot verwendeten Antikörper.**

Antikörper	Epitop	Spezies	Verdünnung	Quelle
192wt	APPs $\beta$ (wt)	Hase, polyklonal	1:100	Elan Pharmaceuticals
22C11	APP N-Terminus	Maus, monoklonal	1:5000	K. Beyreuther
6E10	A $\beta$ 1-16	Maus, monoklonal	1:2000	Senetek Inc.
Calnexin	Calnexin	Hase, polyklonal	1:2000	Stressgene
GFP	GFP	Maus, monoklonal	1:2000	Clontech
HA.11	HA-tag	Maus, monoklonal	1:100	Covance
N1660	Nicastrin	Hase, polyklonal	1:1000	Sigma
VPS24 (F1)	VPS24	Ziege, polyklonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology
W02	APPs $\alpha$	Maus, monoklonal	1 $\mu$ g/ml	K. Beyreuther
$\alpha$ -goat-HRP	Ziegen IgG	Esel	1:5000 - 1:10000	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -mouse-AP	Maus IgG	Ziege	1:5000	Tropix
$\alpha$ -mouse-HRP	Maus IgG	Ziege	1:5000 - 1:10000	Promega
$\alpha$ -rabbit-HRP	Hase IgG	Ziege	1:5000 - 1:10000	Promega
$\alpha$ -rat-HRP	Ratten IgG	Ziege	1:5000	Santa Cruz Biotechnology

HRP: Meerrettich-Peroxidase; AP: alkalische Phosphatase

**Tabelle 12: Übersicht über die für die Immunopräzipitation verwendeten Antikörper.**

Antikörper	Epitop	Western Blot	Spezies	Verdünnung	Quelle
3552	A $\beta$ 1-40	6E10	Hase, polyklonal	1:400	Eurogentec
BAWT 8C10	APPs $\beta$	192wt	Maus, monoklonal	1:10	E. Kremmer

**Tabelle 13: Übersicht über die in der Immunofluoreszenz verwendeten Antikörper.**

Antikörper	Epitop	Spezies	Verdünnung	Quelle
93	TMEM59	Hase, polyklonal	1:200	Eurogentec
Anti-mouse-Alexa488	Maus IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
Anti-mouse-Alexa555	Maus IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
Anti-rabbit-Alexa488	Hase IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
Anti-rabbit-Alexa555	Hase IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
ERGIC-53	ERGIC-53	Maus, monoklonal	1:1000	Alexis
Giantin	Giantin	Maus, monoklonal	1:1000	Alexis
GM130	GM130	Maus, monoklonal	1:1000	BD Transduction Laboratories

Antikörper	Epitop	Spezies	Verdünnung	Quelle
GS15	GS15	Maus, monoklonal	1:1000	BD Transduction Laboratories
p230	p230	Maus, monoklonal	1:1000	BD Transduction Laboratories
TGN38	TGN38	Maus, monoklonal	1:1000	BD Transduction Laboratories

Alexa488 und Alexa555: Fluorophore

**Tabelle 14: Übersicht über die für den Nachweis von APP $\alpha$ , APP $\beta$  und A $\beta$  verwendeten Antikörper.**

Antikörper	Epitop	Spezies	Verdünnung	Quelle
APP $\alpha$	APP $\alpha$	nicht bekannt	nicht bekannt	MSD
APP $\beta$	APP $\beta$	nicht bekannt	nicht bekannt	MSD
A $\beta$ 1-38	A $\beta$ 1-38	nicht bekannt	nicht bekannt	MSD
A $\beta$ 1-40	A $\beta$ 1-40	nicht bekannt	nicht bekannt	MSD
A $\beta$ 1-42	A $\beta$ 1-42	nicht bekannt	nicht bekannt	MSD
SULFO-TAG <sup>TM</sup> 6E10	A $\beta$ 1-16	Maus, monoklonal	1:50	MSD
SULFO-TAG <sup>TM</sup> anti-APP	APP N-Terminus (Aminosäuren 66-81 der humanen APP695 Sequenz)	nicht bekannt	1:50	MSD

SULFO-TAG<sup>TM</sup>: Elektrochemilumineszenz-vermittelnde Seitengruppe

### 8.1.5 Plasmide

**Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Plasmide.**

Plasmid	Bezugsquelle
peak12-TMEM59-HA	erhalten von S. Ullrich
peak12-TMEM59L-HA	
peak12-Luziferase	erhalten von S. Lichtenthaler
peak12-APP695	
peak12-GFP	
peak12-BACE1	
pShuttle/CMV-YFP-APP	erhalten von K. Simons (Eehalt et al., 2003)
pAc5.1-HRP-APP	generiert von R. Page
pAc5.1-Gluc	
pAc5.1-Fluc	
pLKO2mod-EGFP-WPRE	generiert von P. Kuhn
psPAX2	
pCDNA3.1(-)-VSV-G	
pLKO2mod-EGFP-WPRE-RNAi Con	
pLKO2mod-EGFP-WPRE-Hs550	
pLKO2mod-EGFP-WPRE-Hs894	vorliegende Arbeit

## 8.1.6 siRNAs

Tabelle 16: Auflistung der verwendeten siRNAs von Dharmacon für den transienten „Knockdown“ von Kandidatengen aus dem Drosophila-“Screening“ in humanen Zellen.

Zieltranskript	siRNA-Nummer	Sequenz (5' → 3')
Kontroll-siRNA 3	3	AUGUAUUGGCCUGUAUUAG
Kontroll-siRNA 4	4	AUGAACGUGAAUUGCUCAA
TMEM59	1	GCACAGAGCUUCAUAACCU
	2	GCAGGAGCCUACAAAUUUG
	3	AGAAUCAUCUCUAAGCAA
	4	GAAGAGGAGUUGUACGCAU
TMEM59L	1	GACAAUGACUUCCUCAGUU
	3	CCACCCAAACUGAGUGUGA
Dharmacon Kontroll-siRNA-Pool (SNX33)	1	GGACGAGGCAGACGGCAUU
	2	GAAAGGCCGAGCCCUCUAU
	3	GCAGUGUGGUGGGCCGUA
	4	CCUCUUAUGUGGAGAUCGU
APP	1	CAAGAAAGCCGCUCAGAUC
	2	GGAAGCACCAACGAGAGA
	3	GCCUAAAGCUGAUAAGAAG
	4	UUGAUGAGCUGCUUCAGAA
ADAM10	1	GCUAAUGGCUGGAUUUAUU
	2	GGAACAAACUUAACAACAAU
	3	CCCAAAGUCUCUCACAUA
	4	GCAAGGGAAGGAAUAUGUA
BACE1	1	AGACGACUGUUACAAGUUU
	2	GGAGAUCAAUGGACAGGAU
	3	CGAAUUGGCUUUGCUGUCA
	4	CUGUAUAAAUAUUGAGCGU
ANKHD1	1	GGACAAAGAAUUAGUGCUA
	2	CAAUAAUGUUCUGUCAGU
	3	GAGAGAAUGAUCACAAUAA
	4	CGAU AUGGUUCAGACA UU
ANLN	1	GGAGAUUGGAUCAAGCAUUA
	2	GGAUAAAUCUGGCUAAUUG
	3	ACGCAACACUUUUGAAUUA
	4	ACAGAAAAGGUGACCGAAA
ATP6AP2	1	GGACUAUCCUUGAGGCAA
	2	GGGAACGAGUUUAGUAUUAU
	3	GAGUGUAUAUGGUAGGGAA
	4	CAGGCAGUGUCAUUUCGUA
C9ORF85	1	GAAGGAUUCUUAUCACAU
	2	CAGAAUACGUUUAGCUUCA
	3	GAGGAGACCAUCAAUGAA
	4	GUUCUUGAGUGGCGUGUAA
CCDC75	1	AAAGUGGCAUUGGUCAUGA
	2	UAUAUUGUAUUUGGUGUGG
	3	UUCUGCAGAUCAUGACUAA
	4	AGAAGAAGCCAGCGAGCCU



Zieltranskript	siRNA-Nummer	Sequenz (5' → 3')
FZR1	1	GCACGGAGACCGCUUCAUC
	2	CCACAGGAUUAACGAGAAU
	3	GCAAAACCCGUUCGACAAA
	4	GCAACGAUGUGUCUCCCUA
GLUD1	1	GCAACCAUGUGCUGAGUCU
	2	UAAAUCAUGUCAGCUAUGG
	3	CAAUGAAGCUUCUACAUG
	4	GAAAUUAAGGUUAGCGGAU
HIST1H4C	1	GUAAGGUGCUCGCGGAUAA
	2	UAGAGAACGUUAUUCGAGA
	3	GAUGUAGUAUAUGCCCUAA
	4	GAGGUGUGCUUAAGGUUUU
HPN	1	CGACAGCGGUGGUCCCUUU
	2	CAAUGGCGCUGACUUCUAU
	3	GAGGAGAACAGCAACGAUA
	4	GCAAUGAUGUCUGCAAUGG
HSPA5	1	CCACCAAGAUGCUGACAUAU
	2	GAAAGGAUGGUUAAUGAUG
	3	CGACUCGAAUCCAAAGAU
	4	CAGAUGAAGCUGUAGCGUA
LEMD3	1	GGAUAGAGCUGUUGACUUC
	2	GAACUUCUCCAGCAAUUUA
	3	GGAAUAAGGUGUGUUGGUU
	4	CAAGGCAGAUGUAUGAUAU
MAB21L2	1	GCAAAUCACUCCGGCGUUC
	2	GAGGUCAAGUUGCGCAUCA
	3	GCUACUCGCUGACCGGCAA
	4	GCUGUACGAGUGCGAGAAA
MCM10	1	GAACGGGACGGAAUGCUGAA
	2	GCACAAACUUGAUCAUCCA
	3	GGAGGUGUGUUUAUCUAUC
	4	GGACGAAUCCAAAGAAGU
METTL16	1	CAACAGAAGUGGAUGAUAU
	2	UAAGCAGCAUGUUCAGAUUA
	3	CCGCCUAGUUCUGUUAUAUA
	4	GAGGUGAAUUAGAGUUUGU
MTA3	1	GCAGAAACAUCAGUUGAAA
	2	UGACUAGCAUCAUUGAAUA
	3	CUUCA AUGACAUACGGCAA
	4	GUGCAACAGAAACGUCUAA
NIP30	1	GAUGGUAACCUUAUUAUCA
	2	CAGGAGCUGUGAAGCAUAA
	3	GACCCUCGAUCUCUAUAUG
	4	AGAAUAACCUCAAGAAGG
NKD2	1	GAACUACACGUCCAGAUUC
	2	GGGCAGCGCCUCAACAUG
	3	GCAAGACCCUCCGUGUGAA
	4	GGACGUUCACGCUCUAUGA

Zieltranskript	siRNA-Nummer	Sequenz (5' → 3')
NPM3	1	GAGCCAAAGACGAGUGUAA
	2	CCUGUAACCUUCCGCCUGA
	3	GCACCAGAUUGUUACGAUG
	4	CGGUCACUAUGGACAGUUU
PIP5K1A	1	AGAAGCAGCUCCUCUUUAA
	2	GGAGAGACUUUGCAA AUGC
	3	ACACAGUACUCAGUUGAUA
	4	AGUGAGGGCUCGCCUAUUC
PRG3	1	GAUGGGAGCCACUGGAAUU
	2	CAAAGGAGGUUAUUGGCGA
	3	GAGACUUGGCUCUGACGGA
	4	GCUCAAUGCGACAAGCAAC
RPL36AL	1	GGAAGGAGGCGCUAUGAUC
	2	UGGAAUGUGUUGAGCCUAA
	3	GCAAGCAUCAGCCUCACAA
	4	GGAAGAAGGCUAAGACCAC
SET	1	GAGGAAGGAUUAGAAGUA
	2	GGAUGAAGGUGAAGAAGAU
	3	GAAGUCCACCGAAAUCAAA
	4	CGAGUCAACGCAGAAUAA
SLC18A2	1	GAUCACAACUGCCCUAUUA
	2	GGAGUGUGCUCUAUGAGUU
	3	GCAUUAAGCAUGAGAAGAA
	4	GAAGAGAGAGGCAACGUCA
SOX10	1	GAACGAAAGUGACAAGCGC
	2	GAGAUCAGCCACGAGGUAA
	3	GCGGGAAGCCUCACAUCGA
	4	CCGUAUGCAGCACAAGAAA
SERINC1	1	GGAAACAACUCCACUGUAA
	2	CAACUAGUCUUAUUUUG
	3	UGAAUUAUCUGCUGUCUUU
	4	UCACCGAGCUGUAGAUAAU
THAP4	1	GAUAAGAGUGGCAUUUCUA
	2	GCUGAAUUCUGAAGGCAA
	3	GGACUCCACUAAGUAUUC
	4	CGUCUAAUCCAAUGGUUAA
TMEM9	1	GAAGAUAUCCGGUGCAA AU
	2	GAAUGAGGAUGCUCGCUCU
	3	GAAAGCCGGAUGCAUAUAC
	4	AGGUGCAGGAGCAGCGGAA
UBN1	1	AUACAGGACUUGAUCGAUA
	2	CACCACAGCUUGCCACGGA
	3	CGAUAACUCUGAGGCGUAU
	4	CGGGAACCCUGCAGUUUAG
VPS24	1	UGACAGAAUUCUCUUUGAA
	2	GAAGAGCACAGAAGUGAUG
	3	GGGCAAAGCACCCAGUAAA
	4	AGAACCAGCUCGCGGUCUU

Zieltranskript	siRNA-Nummer	Sequenz (5' → 3')
ZMAT5	1	UAGCAGGGCUGAACCCAUC
	2	GCAAGAAGCACCUGAACGG
	3	GCAGGAAGUUUCUACUGAC
	4	CGACAUGUCCGAGAUGCA

**Tabelle 17: Auflistung der verwendeten siRNAs von Qiagen für den transienten „Knockdown“ von Kandidatengenen aus dem Drosophila-“Screening“ in humanen Zellen.**

Zieltranskript	siRNA-Nummer	Sequenz (5' → 3')
Qiagen „AllStars Negative Control siRNA“ (ASNC)	---	Nicht zur Verfügung gestellt
APP	1	CTGGTCTTCAATTACCAAGAA
	2	AAGGATGACTACAGACATTAA
	3	ACCCAATTAAGTCCTACTTTA
	4	TTGGCCAACATGATTAGTGAA
ADAM10	1	AAAGATGAGTAATTTGCTTAA
	2	ATGGTAAGAAGAAGTCCTTAA
	3	ATGGTGTTGCTGAGAGTGTTA
	4	TTGGTGGGCAGTATTACTTAT
BACE1	1	CACAGTGGCACTAGCATTATA
	2	ACCAAACAACCTGGTTGTGAA
	3	CCCAAGATCATTCTACAAGTA
	4	CCGGCGGGAGTGGTATTATGA
ANKHD1	1	CTGGAAGGGAGTGACTTGTTA
	2	CTGGCCTCATCTAATCTGGAA
	3	CACCTTCTGACTGCTTAGTAA
	4	CAGGATCATCTACGACCGAAA
ANLN	1	CACCGTTTCCATCGTCTCGTA
	2	CTGATGCTTGCTACAAACCTA
	3	CTCAATCTAAAGACAAATCTA
	4	CTGGCTTCATTAAGATCATT
ATP6AP2	1	ATGGGCTAATATGGATACTAA
	2	AAGGACTATCCTTGAGGCAAA
	3	AACATGGATCCTGGATATGAT
	4	GGGAACGAGTTTAGTATATTA
C9ORF85	1	AAGTTCTTGAGTGGCGTGTA
	2	CTGGGAGTAGTTCGTTGGTTT
	3	TTGATGGTTGTATAAGAATA
	4	TTCGGCGATGAGCTCCAGAA
CCDC75	1	CACCAACAGGTAACCTTCTTAT
	2	TTCCTAGGGATAGACAATTTA
	3	TTGCTATATTGTGATACGTGA
	4	AGAGAGCTGTCAGATACTATA
FZR1	1	CGGGTCGATCTTCCACATTCA
	2	TGCAGTGACGCTGTCATTAAA
	3	TCGCCAGATCGTCATCCAGAA
	4	AAGGGCGAGAACCACATTGGA

Zieltranskript	siRNA-Nummer	Sequenz (5' → 3')
GLUD1	1	AAGTGTGCAGTGGTTGATGTG
	2	CGGGTGCATCTGAGAAAGACA
	3	TTGAAGATCTATGGTTGACTA
	4	TTGCTTACTATAATTATGATA
HIST1H4C	1	CGGCGGCTGAATCTAAGAATA
	2	ATGGATGTAGTATATGCCCTA
	3	CGCGGTCTCCTGAGAACTTCA
	4	AAGGGTGGTGCTAAGCGCCAT
HSPA5	1	TAGGGTGTGTGTTACCTTCA
	2	TGGGATAAGGAAACACTTCTA
	3	CAAGCCCAATACAGCCATTAA
	4	AACTGTTACAATCAAGGTCTA
MAB21L2	1	ACCCTGAGCTGTCTTGTTGAA
	2	AACAACGCCTCCAGTAGGAAA
	3	CTGCTGTACGAGTGCGAGAAA
	4	CACACGGTCATCTTTACATAT
MCM10	1	TAGGAGTATACTTCTACTTTA
	2	ACGGCGACGGTGAATCTTATA
	3	CTCCTTGGACAGACTCCCGAA
	4	TTCTTGATTGACGCCGTCAAA
METTL16	1	CTCCGCCTAGTTCTGTTAATA
	2	ATGGCTGGTATTTCCCTCGCAA
	3	CTCCGAAGAGGAATTGACATA
	4	CTGTTCTAGGTCACTCTTCAA
MTA3	1	ACGGCCGTTTGTTGCTATTAA
	2	CTCGCAGATAAGCATGCTAAA
	3	CACCTAATATGCAGTGTAGAT
	4	ATCATTGACTAGCATCATTGA
NIP30	1	AACGTAGGCCTTGTTTACTAA
	2	CACCTCGTCTCATAAAGGGAA
	3	ACAGAGGGTTGCAGGGTTTAA
	4	CTCTATTGTGGCGGTGAGGAA
NPM3	1	CACCCGCTCCTTCACCTTTAA
	2	CCAGATTGTTACGATGAGCAA
	3	CCCGGTCACTATGGACAGTTT
	4	AAAGACGAGTGTAATGTGGTA
PIP5K1A	1	CAGCCTCTTGATGTCAATCCA
	2	CCCTGCCTTGATAATATGTTA
	3	CTACTTTGTATTGTTTCAGAAA
	4	AAGGAAAGAATTCTTGCTATT
RPL36AL	1	TACAGTGATATTCTTACGCAA
	2	CCAGTTCTAAACTTTGGGATA
	3	AAAGATGGTCAACGTACCTAA
	4	AGGATGCTGGCCATTAAGAGA
SET	1	CAGGAATCTTGCTCCAATAAA
	2	TTGGGATACCAGATAGCTCAA
	3	AAGAAGATAGGCTCTCAGTAA
	4	TTAGAAGATATTGACGAAGAA

Zieltranskript	siRNA-Nummer	Sequenz (5' → 3')
SLC18A2	1	ATGGTTATGGTCGATTGCCAA
	2	CAGCTAGTATCTCTTATCTCA
	3	CAGTCATATCCGATAGGTGAA
	4	TTGGAATGGTGGATTTCGTCAA
SOX10	1	CTCCGTATGCAGCACAAGAAA
	2	CAGCCACGAGGTAATGTCCAA
	3	CCACCTGGTGTGGATGCCAAA
	4	CAGGAATGACCCTCTATCCCA
SERINC1	1	AAGAGTAGCAGTGATCCTAGA
	2	GACGATGTTACCCGAGCTGTA
	3	TAAGCATAATTGGCTACAATA
	4	CAAGGCGTTCATCAGTGTCAA
THAP4	1	CGCCAGGATCTCCTTCGCCAA
	2	CATGCTGAACCTTCGTTCAA
	3	CTCAACGGTTCGGCTCCTCAA
	4	AAACGTCTAATCCAATGGTTA
TMEM9	1	TTAGAGTTGTGTGTAATCAA
	2	TCGGCACAAGATGCTCAGCTA
	3	AAGCATGAAGCTCTTATCTTT
	4	CGGTTCCAGTCTTCCCTTTAA
UBN1	1	CAGGATATTAATGGAATCCTA
	2	CAGGCTCATCTTACAAGAATA
	3	TACGGTGGAAAGAAACGTAGA
	4	ATCGTCTACCTCCTTGTCAAA
VPS24	1	CGCGATCTTAGTCTTTACAAA
	2	AAGATTCACTCTGGTGTGTA
	3	TAGATTGCCCTGTGCAGTAAA
	4	CTGGTCCAAGTTGTATGTGCA
ZMAT5	1	CAAGGCCAAGAAGGTCTGGTA
	2	TACGACATGTTCCGAGATGCA
	3	CTCCGCACTGGAAGACTTGAA
	4	CCAGTGCGACTTTGGCTCCAA

### 8.1.7 shRNAs

**Tabelle 18:** Auflistung der verwendeten shRNA-Sequenzen für den stabilen „Knockdown“ von humanem VPS24.

Zieltranskript	Plasmid	Zielsequenz (5' → 3')
Negativkontrolle	pLKO2mod-EGFP-WPRE-RNAi Con	CAACAAGATGAAGAGCACCAA
VPS24	pLKO2mod-EGFP-WPRE-Hs550	TGATGAAGGCTGGGATCATAG
	pLKO2mod-EGFP-WPRE-Hs894	CTGTTGTGAGGACTACCATTT

### 8.1.8 Oligonukleotide für die qRT-PCR

**Tabelle 19:** Auflistung der verwendeten Oligonukleotidpaare für die „quantitative real time PCR“ nach der „SYBR Green“-Methode.

Name	Zieltranskript	Sequenz (5' → 3')
hsActin_fw	ACTB	CCTGGCACCCAGCACAAT
hsActin_rev	NM_001101.3	GGGCCGGACTCGTCATAC
hsHIS1TH4C_rev2	HIST1H4C	AAATGCGCTTGACGCCACCG
hsHIST1H4C_fw2	NM_003542	GCCATCGTAAGGTGCTCCGGG
hsHSPA5_fw2	HSPA5	GCTGCTGTCCAGGCTGGTGT
hsHSPA5_rev2	NM_005347	TGGTCATGACACCTCCCACAGT
hsMETT10D_fw2	METTL16	AGCCTGGCGCCTCTGAAGGA
hsMETT10D_rev2	NM_024086	GGCCCATCTCATTGTCCGACCT
hsRPL36AL_fw2	RPL36AL	AACAGCCCTGCTGCAAAGATGGT
hsRPL36AL_rev2	NM_001001	TTGTGAGGCTGATGCTTGCCACA
hsVPS24_fw2	VPS24	TGGACGATCAGGAAGAAATGGAGGA
hsVPS24_rev2	NM_001005753	ACTGGGTGCTTTGCCCAAGGC
hsZMAT5_fw2	ZMAT5	GAGCGAGACCTGCAGGAGCTG
hsZMAT5_rev2	NM_001003692	CCCTCGGGGAGCTCAGGAGC

Die Abkürzung hs steht für Homo sapiens.

## **8.2 Methoden**

### **8.2.1 Molekularbiologische Methoden**

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien ist in Tabelle 10 aufgeführt.

#### **8.2.1.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Für präparative Restriktionen zur Klonierung von shRNAs wurde 1 µg DNA des Vektors pLKO2mod-EGFP-WPRE (Kuhn et al., 2010) unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen mit den Restriktionsenzymen MluI und XmaI (jeweils 5 Einheiten) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Analyse und Isolierung des Vektor-Rückgrats erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Isolierung der DNA aus dem Gel. Für analytische Zwecke wurden ca. 250 ng Plasmid-DNA für 1 h bei 37°C mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (2 Einheiten) und unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen in 20 µl Reaktionsansatz inkubiert. Die Analyse der Restriktion erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

#### **8.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur elektrophoretischen Trennung und Analyse von verdauter Plasmid-DNA oder zellulärer Gesamt-RNA wurden 1-2%-ige Agarosegele in TAE-Puffer und 0,2 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben in vierfachem DNA-Probenpuffer aufgenommen. Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 - 140 V in TAE-Puffer in Agarose-Gelkammern.

#### **8.2.1.3 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen**

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht mithilfe eines Skalpellens aus dem Agarosegel geschnitten. Anschließend wurde die DNA mit dem „Nucleospin Extract Kit“ nach den Angaben des Herstellers isoliert.

#### **8.2.1.4 Klonierung von „short hairpin RNAs“ (shRNAs)**

Für den stabilen „Knockdown“ von relevanten Genen wurden Oligonukleotid-Duplexe („short hairpin RNAs“ oder shRNAs) nach Empfehlung des RNAi-Konsortiums

(<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/gene/search>) designt. Hierbei konnten die vorgeschlagenen Zielsequenzen, die zugehörigen revers komplementären Zielsequenzen und die „loop“-Sequenz direkt übernommen werden. Die 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen wurden den MluI/XmaI-Schnittstellen des lentiviralen „Knockdown“-Vektors pLKO2mod-EGFP-WPRE (Kuhn et al., 2010) angepasst. Eine Negativkontroll-shRNA, die sich gegen keine bekannte humane oder murine mRNA richtet, wurde ebenfalls nach Empfehlung des RNAi-Konsortiums designt. Die benötigten Oligonukleotide wurden von Sigma bezogen und entsprechend der Volumenangaben des Herstellers in dH<sub>2</sub>O gelöst (c = 100 µM). Jeweils 1 µl des Vorwärts-Oligonukleotids und 1 µl des Rückwärts-Oligonukleotids wurden gemischt und für die Duplexbildung mit 5 µl Puffer NEB2 und 43 µl dH<sub>2</sub>O versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 95°C wurde das Oligonukleotid-Gemisch langsam auf 37°C abgekühlt. Für die Ligation in den MluI/XmaI-verdauten Vektor pLKO2mod-EGFP-WPRE wurde dieses Oligonukleotid-Gemisch 1:100 in dH<sub>2</sub>O verdünnt.

#### **8.2.1.5 Ligation von DNA**

Die Insertion der abgekühlten Duplex-Oligonukleotide in den MluI/XmaI-verdauten Vektor erfolgte unter der Verwendung der T4 DNA-Ligase. Dafür wurde 1 µl Vektor-DNA und 4 µl Oligonukleotid-Gemisch mit T4 DNA-Ligase (5 Einheiten) und T4 DNA-Ligase-Puffer in einem 20 µl Ligationsansatz vereinigt und für 2-3 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert.

#### **8.2.1.6 Herstellen des kompetenten *E. coli*-Stammes DH5α**

100 ml SOB-Medium wurden mit einer *E. coli* DH5α-Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C bei 200 upm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakterienkultur mit SOB-Medium in einem Volumen von 250 ml auf eine OD<sub>605</sub> von 0,1 verdünnt und bei 18°C bei 250 upm für 20 bis 24 h inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Kompetenz der Zellen sich erhöht, wenn das Wachstum bei 18°C stattfindet (Inoue et al., 1990). Nach dem Erreichen einer OD<sub>605</sub> von 0,6-0,8 wurde die Kultur auf fünf 50 ml-Falkon-Gefäße aufgeteilt und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C bei 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 bei 3500 upm für 20 min wurde



das Sediment in 20 ml TB-Puffer (4°C) gelöst und 1,5 ml DMSO (Endkonzentration: 7 %) zugegeben. Nach einer weiteren 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Aliquotierung der Bakteriensuspension in 200 µl-Aliquots bei 4°C. Die Aliquots wurden umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **8.2.1.7 Transformation von DNA-Konstrukten in kompetente E. coli DH5α**

Zur Transformation der hergestellten DNA-Konstrukte in E. coli DH5α wurde der Ligationsansatz mit 60 µl Bakteriensuspension vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Um eine Aufnahme der DNA in die Bakterienzellen zu ermöglichen wurden die Ansätze für 90 sek bei 42°C inkubiert und dann für weitere 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 600 µl LB-Medium zugesetzt und die Ansätze für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler (200 upm) inkubiert. Danach wurden die transformierten Bakterien auf Antibiotikum-haltige LB-Platten (100 µg/ml Ampizillin) ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden einzelne Klone in 5 ml Vorkulturen überführt und erneut über Nacht inkubiert, so dass aus diesen Plasmid-DNA nach dem Mini-Präp Verfahren gewonnen werden konnte. Zur Gewinnung von größeren Mengen Plasmid-DNA wurden 250 ml Antibiotikum-haltiges LB-Medium (100 µg/ml Ampizillin) mit der Vorkultur der transformierten Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus diesen Kulturen konnte Plasmid-DNA nach dem Midi-Präp Verfahren gewonnen werden.

#### **8.2.1.8 Präparation von Plasmid-DNA (Mini- und Midi-Präp)**

Für eine Mini-Präp bzw. Midi-Präp wurden 5 ml bzw. 250 ml Antibiotikum-haltiges LB-Medium (100 µg/ml Ampizillin) mit einer Einzelkolonie bzw. einer Vorkultur der transformierten E. coli DH5α angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler (200 upm) inkubiert. Die DNA wurde mithilfe des „Nucleospin Plasmid Kits“ (Mini) bzw. des „Nucleobond AX Kits“ (Midi) nach Vorschrift des Herstellers aus den Bakterienzellen präpariert und gereinigt. Die Plasmide wurden mittels Kontrollverdau und anschließender Sequenzierung überprüft.

#### **8.2.1.9 Sequenzierung von DNA-Konstrukten**

Die Sequenzierung erzeugter DNA-Konstrukte wurde von der Firma GATC Biotech AG durchgeführt. Zur Sequenzierung von shRNA-Konstrukten im pLKO2mod-EGFP-WPRE-

Vektor wurde ein Oligonukleotid mit der Sequenz 5'-CCTTCACCGAGGGCCTATTTC-3' verwendet.

#### **8.2.1.10 Isolierung zellulärer RNA**

Die Isolierung zellulärer erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ nach den Angaben des Herstellers. Die empfohlene Homogenisierung der Proben wurde mithilfe der „QIAshredder spin column“ durchgeführt. Um potentiellen Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA vorzubeugen, wurde die zelluläre RNA mit dem Enzym DNase I aus dem „RNase-free DNase Set“ nach den Angaben des Herstellers behandelt. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde durch photometrische Absorptionsmessungen bei 260 und 280 nm bestimmt und überprüft: reine RNA weist ein Verhältnis von A<sub>260</sub>:A<sub>280</sub> von 2:1 auf (Glasel, 1995). Zusätzlich wurde die Qualität der isolierten RNA anhand der typischen ribosomalen RNA-Banden in der Agarose-Gelelektrophorese gesichert: intakte zelluläre RNA weist ein Verhältnis der 28S-Bande:18S-Bande von 2:1 auf, die 5S-Bande ist meist kaum oder nicht sichtbar (Chomczynski und Sacchi, 1987).

#### **8.2.1.11 Reverse Transkription von RNA**

Die isolierte zelluläre RNA wurde mithilfe des „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits“ unter Verwendung eines Gemisches von zufälligen Hexameren („Random Hexamers“) entsprechend den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Diese wurde im Anschluss in der sogenannten „quantitative real time PCR“ (qRT-PCR) zur Bestimmung der Expression verschiedener Transkripte verwendet.

#### **8.2.1.12 „Quantitative real time PCR“ nach dem „TaqMan“-Verfahren**

Die „quantitative real time PCR“ (qRT-PCR) nach der „TaqMan“-Methode wurde mit dem PCR-Gerät „7500 Fast Real-Time PCR“ unter Verwendung des „TaqMan Universal PCR Master Mix (ROX)“ und den entsprechenden Angaben des Herstellers durchgeführt. Grundsätzlich wurden alle PCR-Reaktionen in Duplikaten in 96-well-Platten („Fast Optical 96-well Reaction Plate“) mit folgendem Temperaturzyklen-Protokoll durchgeführt:

Schritt 1:	95°C, 10 min	} 40 Zyklen
Schritt 2:	95°C, 15 sec	
Schritt 3:	60°C, 1 min	

Zur Bestimmung der Expressionsraten von TMEM59 und TMEM59L im Vergleich zum Referenzgen Actin wurden kommerziell synthetisierte „TaqMan Gene Expression Assays“ verwendet. Diese bestehen aus einem Gemisch aus einem spezifischen Oligonukleotidpaar und einer Sonde, die ebenfalls spezifisch nur an ihr Zieltranskript bindet. Die Auswertung der durchgeführten qRT-PCR Reaktionen basierte auf der  $\Delta$ Ct-Wert Methode.

### 8.2.1.13 „Quantitative real time PCR“ nach der „SYBR Green“-Methode

Die „quantitative real time PCR“ (qRT-PCR) nach der „SYBR Green“-Methode wurde mit dem PCR-Gerät „7500 Fast Real-Time PCR“ unter Verwendung des „Power SYBR-Green PCR Master Mix“ und den entsprechenden Angaben des Herstellers durchgeführt. Grundsätzlich wurden alle PCR-Reaktionen in Duplikaten in 96-well-Platten („Fast Optical 96-well Reaction Plate“) mit folgendem Temperaturzyklen-Protokoll durchgeführt:

Schritt 1:	95°C, 10 min	} 40 Zyklen
Schritt 2:	95°C, 15 sec	
Schritt 3:	60°C, 1 min	

Schmelzkurve 60°C bis 90°C mit 0,75°C/min

Das Design von transkriptspezifischen Oligonukleotidpaaren wurde mit Hilfe des „Basic Local Alignment Search Tools“ von „NCBI“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) vorgenommen. Dabei wurden die Kriterien so ausgewählt, dass das Oligonukleotidpaar folgende in Tabelle 20 zusammengefassten Eigenschaften erfüllt.

**Tabelle 20: Auflistung der Kriterien für das Design von Oligonukleotidpaaren für die „Quantitative real time PCR“ nach der „SYBR Green“-Methode.**

Kriterium	Anforderung
Oligonukleotid-Länge	18 bis 25 bp
Schmelztemperatur	60°C +/- 2
GC-Gehalt	40 bis 60 %
Amplikon-Länge	70 bis 150 bp
Exon	Oligonukleotide müssen in unterschiedlichen Exons binden; Amplikon muss Exon-Exon-Grenze umfassen
Isoformen	Oligonukleotidpaare müssen alle Isoformen eines Gens amplifizieren

Die designten Oligonukleotidpaare, wurden mit cDNA des entsprechenden Organismus

verifiziert und dabei auf ihre Effizienz (Ermittlung aus der Standardkurve: Effizienz zwischen 1.8-2.2) und ihre Spezifität (Ermittlung aus der Schmelzkurve: ein deutliches, scharfes Signal) überprüft. Erfolgreich getestete Oligonukleotidpaare wurden zur Bestimmung der Expressionsraten zu untersuchender Gene im Vergleich zu verschiedenen Referenzgenen verwendet. Die Auswertung der durchgeführten qRT-PCR Reaktionen basierte auf der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert Methode. Die verwendeten Oligonukleotidpaare sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

## **8.2.2 Zellkultur**

### **8.2.2.1 Verwendete Zelllinien**

HEK293E-Zellen, die das „Epstein-Barr nuclear antigen 1“ enthalten, und COS-Zellen wurden in „Dulbecco`s modified eagles medium“ (DMEM), dem 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden, kultiviert. Auch HEK293T-Zellen wurden in genanntem Medium mit Zusatz von G418 kultiviert. Humane SH-SY5Y-Zellen wurden in einer Mischung aus 50 % „Dulbecco`s modified eagles medium“ und 50 % HAM`s F12 (DMEM-F12), dem 15 % FCS, 2 mM Glutamin, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden, kultiviert. Drosophila-Schneider 2 (S2)-Zellen wurden in Schneiders Medium, dem 10 % FCS von JRH Biosciences und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden, kultiviert. Unter bestimmten Umständen wurde Medium dieser Zusammensetzung aber ohne Zusatz von Serum verwendet (Serum-freies Medium). HEK293T-Zellen, die zur Produktion von Viren transfiziert wurden, wurden in „DMEM HIGH GLUCOSE“, dem 10 % FCS, 1 mM Pyruvat und 1 % nicht-essentielle Aminosäuren zugesetzt wurden, kultiviert.

### **8.2.2.2 Kultivierung von Zellen**

Die verwendeten Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Drosophila-Schneider 2 (S2)-Zellen wurden bei 26°C kultiviert. Dazu wurden die Zellen in 10 cm-Schalen oder in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen in den entsprechenden Medien ausgesät und im Inkubator gezüchtet. Bei Erreichen von ca. 70 - 80 % Konfluenz wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und mit steriler PBS-EDTA-Lösung oder mit einer 0,05 %-ige Trypsin-EDTA-Lösung von dem Zellkulturgefäß abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit Medium verdünnt und auf neue Zellkulturgefäße mit frischem Medium verteilt. Zum

Entfernen des Trypsins wurden die Zellen nach dem Resuspendieren für 5 min bei 1000 upm pelletiert, in frischem Medium aufgenommen und auf neue Zellkulturgefäße mit frischem Medium verteilt.

### **8.2.2.3 Beschichtung von Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin**

Die Zellkulturgefäße wurden vollständig mit steriler Poly-L-Lysin-Lösung bedeckt (1:1000-Lösung in sterilem dH<sub>2</sub>O) und mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abnahme der Poly-L-Lysin-Lösung wurden die Schalen einmal mit PBS (steril) und einmal mit dH<sub>2</sub>O (steril) gewaschen und anschließend getrocknet.

### **8.2.2.4 Aussäen von Zellen**

Zum Aussäen wurden die Zellen abgelöst, mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt, auf die gewünschte Zelldichte verdünnt und auf die jeweiligen Zellkulturgefäße verteilt. Bis zum Versuchsstart wurden die Zellen dann bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **8.2.2.5 Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)**

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden die Zellen nach Erreichen von 70 - 80 % Konfluenz mit sterilem PBS gewaschen und mithilfe von PBS/EDTA bzw. Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und für 5 min bei 1000 upm pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 - 2 ml Einfriermedium aufgenommen und in 1 bis 2 Kryoröhrchen gegeben. Die Kulturen wurden bei -80°C eingefroren und für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

## **8.2.3 Zelluläre Untersuchungen (Assays)**

### **8.2.3.1 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Zur Untersuchung der Lokalisierung oder Ko-Lokalisierung von zellulären Proteinen und/oder transfizierten Konstrukten wurden Zellen fixiert und durch Antikörperfärbungen zu Immunfluoreszenzpräparaten verarbeitet. Dazu wurden zunächst sterile Glasplättchen (12 mm Durchmesser) in 24-well-Platten ausgebracht und mit Poly-L-Lysin beschichtet. Anschließend wurden 7,5 - 10 x 10<sup>4</sup> Zellen/well ausgesät und die Zellen zu einer Dichte von

50 - 60 % Konfluenz inkubiert. Für die Detektion intrazellulärer Proteine wurden die Zellen nach einem einfachen PBS Waschschrift für 20 min in PFA-Lösung fixiert und anschließend erneut zweimal mit PBS gewaschen. Hierauf erfolgte eine 10 minütige Inkubation in Ammoniumchlorid-Lösung, welche anschließend durch 2 maliges Waschen mit PBS wieder entfernt wurde. Die Permeabilisierung der Zelloberfläche erfolgte durch eine 2 minütige Behandlung der Zellen mit Triton X-100-Lösung, die wiederum durch 2-maliges Waschen mit PBS entfernt wurde. Zum Blockieren unspezifischer Antikörperbindestellen wurden die Zellen 10 min in Blockierungslösung inkubiert, bevor sie für 20 min mit dem Primärantikörper versetzt wurden. Nach mehrfachem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, welche wieder von mehrfachem Waschen mit PBS gefolgt wurde. Zum Abschluss wurde das Glasplättchen mit den fixierten, gefärbten Zellen einmal kurz in dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend auf einem Glasobjektträger in Mowiol eingebettet. Nach Aushärten des Mowiol konnten die Präparate mithilfe des Zeiss LSM 510 Meta konfokalen Mikroskops aufgenommen und die Aufnahmen in der „LSM Image Browser“-Software ausgewertet werden.

### **8.2.3.2 Lebend-Zell-Aufnahmen**

Zur Untersuchung der Lokalisierung von Fluorophor-gekoppelten Proteinen in lebenden, nicht fixierten Zellen wurden spezielle Lebendzell-Kammern von Ibidi verwendet. Diese wurden mit Poly-L-Lysin beschichtet und mit  $5 \times 10^4$  Zellen/well ausgesät. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Transfektion der Zellen. Nach 24 h und in weiteren 24 h Intervallen erfolgte die Analyse der Zellen unter Verwendung des Zeiss LSM 510 Meta konfokalen Mikroskops und die Aufnahmen in der „LSM Image Browser“-Software ausgewertet werden.

### **8.2.3.3 Transiente Überexpression von rekombinanter DNA**

Die entsprechenden Zelllinien wurden in Poly-D-Lysin-beschichteten 24-well-Platten in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/well ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mittels Lipofectamine 2000 transfiziert. Dazu wurden pro Ansatz 2 µl Lipofectamine 2000 mit 50 µl OPTIMEM (Lipo-Mix) und die gewünschte DNA-Menge ebenfalls mit 50 µl OPTIMEM (DNA-Mix) gemischt und für 5 min prä-inkubiert. Anschließend wurden Lipo-Mix und DNA-Mix vereinigt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Mischung auf die Zellen eines wells pipettiert. Am folgenden Tag wurde das Medium

gewechselt. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurde das konditionierte Medium gesammelt und die Zellen zu Lysaten verarbeitet. Wurden besonders hohe Transfektionseffizienzen benötigt wurde das Standardprotokoll dahingehend modifiziert, dass bis zu 5-fach weniger Zellen als üblich verwendet wurden, da bekannt ist, dass die Transfektionseffizienz mit der Zelldichte zum Zeitpunkt der Transfektion korreliert (QIAGEN, 1999-2002).

Die für die Herstellung von viralen Partikeln notwendige transiente Transfektion von Verpacker HEK293T-Zellen wurde revers durchgeführt. Hierzu erfolgte die Vorbereitung der Transfektionsansätze wie bereits beschrieben. Alternativ wurden diese aber nicht auf adhärente Zellen gegeben, sondern in einem well einer 6-well-Platte mit einer Zellsuspension ( $2 \times 10^6$  Zellen/well) vermischt, so dass die Plasmid-Aufnahme in Lösung erfolgen konnte.

#### **8.2.3.4 Transienter Doppel-„Knockdown“ von TMEM59 und TMEM59L**

Der transiente Doppel-„Knockdown“ von TMEM59 und seinem Homologen TMEM59L erfolgte mittels RNA Interferenz (RNAi). Zu diesem Zweck wurden „small interfering RNAs“ (siRNAs), die den vorzeitigen Abbau von Zieltranskripten initiieren können, in humane Zellen transfiziert. Die siRNAs wurden als Set von vier Sequenzen oder als Einzelsequenzen von der Firma Dharmacon bezogen. Die lyophilisiert vorliegenden siRNAs wurden zunächst in siRNA-Puffer aufgenommen und aliquotiert. Die Aufbewahrung der Aliquots erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , die verwendeten Sequenzen sind in Tabelle 16 aufgelistet. Das Einschleusen der siRNAs in die Zielzellen erfolgte mit einer Lipid-basierten reversen Transfektion, bei der die Zellen in Suspension transfiziert werden. Für den transienten „Knockdown“ von TMEM59 bzw. TMEM59L wurde eine Mischung aus vier bzw. zwei siRNA Sequenzen verwendet. Als Referenz dienten Zellen die mit einer Mischung aus zwei Kontroll-siRNAs, die sich gegen kein bekanntes humanes Transkript richten, transfiziert wurden. Die Gemische der siRNA-Sequenzen wurden mit einer Endkonzentration von 5 nM verwendet. Hierzu wurde zunächst der Transfektionsansatz, bestehend aus 1,5 ml OPTIMEM mit der entsprechenden Menge siRNA und 10  $\mu\text{l}$  Lipofectamine RNAiMAX, hergestellt und für 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die HEK293E-Zellen abgelöst, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in Medium (DMEM + 10 % FCS) auf eine Zellzahl von  $3,5 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt. Anschließend wurden sowohl der Transfektionsansatz als auch 3,5 ml Zellsuspension in eine 6 cm-Platte (Poly-L-Lysin

beschichtet) gegeben zum Durchmischen leicht geschwenkt. Nach 24 h Inkubation wurden 2 ml Medium (DMEM + 10 % FCS) zugesetzt. Nach weiteren 24 h Inkubation wurde das Medium gewechselt und durch 1,5 ml frisches Medium (DMEM + 10 % FCS) ersetzt. Nach einer weiteren Übernachtinkubation wurden die Überstände gesammelt, die Zellen lysiert und im Weiteren für die Western Blot Analyse vorbereitet.

## **8.2.4 RNAi-basierte „Screenings“ in unterschiedlichen zellulären Systemen**

### **8.2.4.1 RNAi „Screening“ in Drosophila-Schneider 2 (S2)-Zellen**

Für das „Screening“ nach neuen zellulären Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP in Drosophila-Zellen, wurden Schneider 2 (S2)-Zellen zunächst für die gewünschten RNAi-Studien mit langen doppelsträngigen RNAs (dsRNAs) behandelt. Anschließend wurden die Zellen transient mit den entsprechenden Reporterkonstrukten transfiziert.

#### **8.2.4.1.1 RNAi-Studien in Drosophila-S2-Zellen mit langen dsRNAs**

Das RNAi-„Screening“ zur Identifizierung neuer zellulärer Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP wurde in Drosophila-Schneider 2 (S2)-Zellen durchgeführt. Dieses Verfahren eignet sich besonders für „Screenings“ mit einem großen Umfang, da kultivierte Drosophila-Zellen lange doppelsträngige RNAs (dsRNAs) ohne Zusatz von Transfektionsreagenz aus dem Kulturmedium aufnehmen. Die aufgenommenen dsRNAs werden durch die zelluläre RNAi-Maschinerie prozessiert und bewirken somit den gezielten Abbau von spezifischen Gentranskripten. Die verwendete dsRNA-Bibliothek, die sich gegen das gesamte Drosophila-Genom richtet, wurde im Labor von M. Boutros synthetisiert (Horn et al., 2010) und im Rahmen einer Kollaboration zur Verfügung gestellt. Zu Beginn der RNAi-Experimente wurde die dsRNA-Bibliothek (250 ng dsRNA/well) mit Hilfe eines Pipettier-Roboters in 384-well-Platten ausgebracht. Darauf folgend wurden S2-Zellen in Serum-freien Medium aufgenommen und die Zellzahl auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Diese Zellsuspension wurde nun in die wells der 384-well-Platten der dsRNA-Bibliothek verteilt – es wurden jeweils 20 µl Zellsuspension pro well (20.000 Zellen pro well) von einem Dispenser (Multidrop) zugegeben. Nach einer kurzen Zentrifugation (500 upm, 20 sek) wurden die vorbereiteten Platten 45 min im Inkubator (26°C) prä-inkubiert. Anschließend wurden die wells mit Hilfe des Dispensers mit 30 µl normalem Medium versetzt und erneut kurz zentrifugiert (500 upm, 20 sek). Nachdem die Platten mit selbstklebenden



Aluminiumfoliendeckeln verschlossen wurden, konnten diese über Nacht bei 26°C inkubiert werden. Am nächsten Tag erfolgte die transiente Transfektion der Zellen mit Reporterkonstrukten.

#### **8.2.4.1.2 Transiente Transfektion von S2-Zellen mit Reporterkonstrukten**

Das RNAi-„Screening“ zur Identifizierung neuer zellulärer Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP wurde in *Drosophila*-Schneider 2 (S2)-Zellen durchgeführt. Die benötigten Reporterkonstrukte wurden transient am zweiten Tag des Experiments transfiziert. Die lipid-basierte Transfektion wurde an den Zellen vorgenommen, die bereits dsRNAs aufgenommen hatten. Zunächst wurde hierzu in zwei Schritten der Transfektionsansatz vorbereitet: Im ersten Schritt wurden 12.3 µl Effectene-Puffer EC und 1.2 µl Enhancer mit den entsprechenden Mengen folgender Plasmide vermischt: 8 ng pAc5.1-FLuc Plasmid, 21 ng pAc5.1-HRP-APP Plasmid und 21 ng pAc5.1-GLuc Plasmid. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur, wurden im zweiten Schritt 1.5 µl Effectene Transfektionsreagenz zu dem bestehenden Transfektionsansatz gegeben und erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die genannten Mengen beziehen sich auf ein well der 384-well-Platten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 15 µl pro well des Transfektionsansatzes mit Hilfe des Dispensers zu den S2-Zellen der 384-well-Platten gegeben. Anschließend wurden die Platten mit selbstklebenden Aluminiumfoliendeckeln verschlossen und kurz zentrifugiert (500 upm, 20 sek). Nach einer zweitägigen Inkubation (48 h) bei 26°C wurden die Platten erneut zentrifugiert (500 upm, 20 sek) um anschließend zwei Medium-Aliquots (10 µl und 30 µl) mit Hilfe des Pipettier-Roboters abnehmen und in frische 384-well-Platten überführen zu können. Diese Aliquots des konditionierten Mediums wurden für weitere Untersuchungen verwendet. Die restlichen Zellen verblieben für die weitere Analyse in den wells der 384-well-Platten.

#### **8.2.4.2 RNAi-Studien von potentiellen Kandidatengen in SH-SY5Y-Zellen**

Mit Abschluss des *Drosophila* RNAi-„Screenings“ wurde eine Liste von potentiellen Modulatoren der APP-Ektodomänenspaltung erhalten. Diese Kandidatengene wurden weiterhin mit RNAi-basierten Studien in humanen SH-SY5Y-Zellen untersucht. Dabei wurden zum einen „small interfering RNAs“ (siRNAs) und zum anderen „short hairpin RNAs“ (shRNAs) verwendet.

#### 8.2.4.2.1 Transienter „Knockdown“ in SH-SY5Y-Zellen mit siRNAs

In den initialen RNAi-Studien der 30 Kandidatengene in humanen SH-SY5Y-Zellen wurden „small interfering RNAs“ (siRNAs) verwendet. Die benötigten Oligonukleotide wurden von den Firmen Dharmacon und QIAGEN im Set von vier Sequenzen (Pools) oder als Einzelsequenzen (Singles) bezogen. Zu Beginn wurden Experimente mit den siRNA-Pools und im Anschluss daran Untersuchungen der einzelnen siRNA Sequenzen vorgenommen. Die methodischen Versuchsdurchführungen unterscheiden sich dabei nicht. Als Kontrolle für Dharmacon-basierte Experimente wurde ein siRNA-Pool gegen humanes SNX33 als Kontrolle verwendet, da dessen „Knockdown“ keinen Einfluss auf die Ektodomänenspaltung von APP in HEK293-Zellen hat (Schobel et al., 2008). Für QIAGEN-basierte Experimente wurde die Kontroll-siRNA „AllStars Negative Control siRNA“ (ASNC), die sich gegen kein bekanntes humanes Transkript richtet, verwendet. Die lyophilisiert vorliegenden siRNAs wurden zunächst in siRNA Puffer (Dharmacon) oder RNase freiem Wasser (QIAGEN) aufgenommen, aliquotiert bzw. auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C, vermehrtes Auftauen und erneutes Einfrieren wurde verhindert. Die verwendeten Sequenzen sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 aufgelistet. Das Einschleusen der siRNAs in die SH-SY5Y-Zellen erfolgte mittels reverser Transfektion. Hierzu wurde zunächst der Transfektionsansatz, bestehend aus 150 µl OPTIMEM mit der gewünschten Menge siRNA und 1 µl Lipofectamine RNAiMAX für ein well einer 24-well-Platte, hergestellt und für 15 - 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen abgelöst, mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in antibiotikumfreien Medium auf die gewünschte Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der gesamte Transfektionsmix in ein well einer 24-well-Platte gegeben und mit 350 µl Zellsuspension versetzt. Zum Durchmischen wurde die Platte lediglich leicht geschwenkt. Am Tag nach der reversen Transfektion wurde den wells jeweils 350 µl antibiotikumfreies Medium zugesetzt. Erst am zweiten Tag nach der Transfektion wurde das Medium komplett abgenommen und durch 250 µl frisches, antibiotikumfreies Medium ersetzt. Nach weiteren 24 h Inkubation wurden die Überstände gesammelt und für die Detektion von APP $\alpha$  und APP $\beta$  im entsprechenden Assay verwendet. Die Zellen wurden für die Präparation von RNA vorbereitet, so dass in den folgenden Schritten die „Knockdown“-Effizienz mittels der „Quantitativen real time PCR“ nach der „SYBR Green“-Methode bestimmt werden konnte.

#### **8.2.4.2.2 Stabiler „Knockdown“ in SH-SY5Y-Zellen mit shRNAs**

Der stabile „Knockdown“ von Zielgenen in SH-SY5Y-Zellen erfolgte mit einer RNAi-basierten Methode, bei der „short hairpin RNA“ (shRNA)-Oligonukleotide in Zellen eingeschleust werden. Diese shRNAs können, nach Prozessierung durch die zelleigene RNAi-Maschinerie, den vorzeitigen Abbau von Zieltranskripten initiieren. Die verwendeten shRNAs wurden in lentivirale Vektoren kloniert und diese zur Produktion von Viren in sogenannten HEK293T-Verpackerzellen verwendet. Dazu wurden Verpackerzellen in einer 6-well-Platte transient mit den 3 Plasmiden, die für die erfolgreiche Virusproduktion benötigt werden, revers ko-transfiziert: psPAX2, das die virale Polymerase codiert, pCDNA3.1(-)-VSV-G, das das virale Hüllprotein codiert, (Kuhn et al., 2010) und das Plasmid, das für die shRNA codiert. Am Tag nach der Transfektion wurde das Medium komplett abgenommen und durch 1,5 ml frisches, antibiotikumfreies Verpackermedium ersetzt. Hierauf wurde über 24 h das Medium gesammelt, welches nach steril filtrieren (0.45 mm Filter) zur Transduktion der Zielzellen verwendet werden konnte. Die Transduktion der Zielzellen erfolgte wiederum in Suspension, so dass der virale Überstand zu 1 ml  $1 \times 10^6$ /ml Zielzellen gegeben wurde. Nach Übernachtinkubation wurde das Medium komplett abgenommen und durch 1,5 ml frisches zelltypspezifisches Medium ersetzt. Nach mehreren Tagen Inkubation und Expansion der stabilen Zellen wurde die „Knockdown“-Effizienz mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen (siehe Tabelle 11).

### **8.2.5 Proteinbiochemische Methoden**

#### **8.2.5.1 Herstellung von Zelllysaten**

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen in ihrem Kulturgefäß mit kaltem PBS gewaschen, in 250 -300 µl (24-well-Platte) bzw. 500 - 800 µl (6-well-Platte) Lysispuffer aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 14000 upm für 5 min. Hierauf wurde das erhaltene Proteinextrakt abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß gegeben, das entstandene Pellet wurde verworfen. Alle genannten Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. In den gewonnenen Zelllysaten erfolgte eine Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Proben mithilfe des BCA-Assays. Zur Verwendung der Proben in SDS-PAGE und Western Blot wurden die Proben mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C gekocht. Die Lagerung der

Zelllysate erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **8.2.5.2 Präparation von zellulären Membranen**

Für die Gewinnung der zellulären Membranen wurden alle Zellen eines wells einer 6-well-Platte mit kaltem PBS gewaschen und vorsichtig in 1,5 ml PBS aufgenommen. Die Zellen wurden zunächst durch Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 3000 upm für 5 min geerntet, anschließend zur Lyse in 800  $\mu\text{l}$  Hypotonpuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde jede Probe 15-mal mit einer 1 ml Spritze und einer 0,6 mm Kanüle auf-und-abgezogen um die Membranfragmente zu zerkleinern. Anschließend wurden durch Zentrifugation bei 14000 upm für 60 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  sämtliche Zellfragmente pelletiert, die in 150 - 200  $\mu\text{l}$  STE-T Puffer gelöst und für 20 min auf Eis inkubiert wurden. Durch eine weitere Zentrifugation bei 14000 upm für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  konnte überschüssiger Debris von den Membranen, die im Überstand verbleiben, getrennt werden. Anschließend konnte die Proteinkonzentration bestimmt und mit Natriumacetatpuffer die gewünschte Proteinkonzentration sowie der angestrebten pH-Wert von 4,5 eingestellt werden.

### **8.2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA-Verfahrens**

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurden je 10  $\mu\text{l}$  eines Zelllysates in Duplikaten in eine transparente 96-well-Platte pipettiert. Die BCA-Reagenzien (Bicinchoninsäure) A und B wurden im Verhältnis 1:50 gemischt und je 200  $\mu\text{l}$ /well zu den vorgelegten Lysaten gegeben. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden zusätzlich Verdünnungen einer BSA-Standardlösung zwischen 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  angesetzt und ebenfalls mit 200  $\mu\text{l}$  der BCA-Reagenz-Mischung versetzt. Die 96-well-Platte wurde anschließend 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte photometrisch bei 562 nm. Mithilfe der Eichgeraden konnte aus den erhaltenen Werten die Proteinkonzentration bestimmt werden.

### **8.2.5.4 Immunopräzipitation von Proteinen**

Zum Nachweis bestimmter löslicher APP-Spezies wurde eine Immunopräzipitation im konditionierten Medium zur Anreicherung der Peptide durchgeführt. Dabei wurden Aliquots der konditionierten Medien (Volumina normiert auf die Proteinkonzentrationen der entsprechenden Zelllysate) mit der entsprechenden Menge des jeweiligen Antikörpers (siehe

Tabelle 12) und 30 µl Protein-A-Sepharose versetzt und für 2 - 16 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Das Immunopräzipitat wurde durch Zentrifugation (6000 upm für 5 min bei 4°C) pelletiert und nacheinander mit je 1 ml STEN-NaCl-Puffer, STEN-SDS-Puffer und STEN-Puffer gewaschen. Die Pellets wurden anschließend mit 30 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min unter Schütteln von 1000 upm bei 95°C gekocht und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

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

Die eindimensionale Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem (Laemmli, 1970). Zur Herstellung der Gele sowie zur Trennung der Proteine wurden Minigelsysteme verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 21 aufgeführt.

**Tabelle 21: Zusammensetzung der Gele für SDS-PAGE (Tris-Glycin-Gele; die angegebenen Mengen reichen für 2 Gele mit einer Dicke von 1,5 mm)**

	8 % Gel	12 % Gel
<b>Trenngel</b>		
dH <sub>2</sub> O	8,8 ml	7,5 ml
40 % Acrylamid-Bis Lösung	3,2 ml	4,5 ml
Trenngelpuffer	4 ml	4 ml
10 % APS	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl
<b>Sammelgel</b>		
dH <sub>2</sub> O	6,8 ml	6,8 ml
40 % Acrylamid-Bis Lösung	1 ml	1 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml	2,5 ml
10 % APS	30 µl	30 µl
TEMED	30 µl	30 µl

Vor Verwendung wurden die Glasplatten mit Isopropanol von Rückständen befreit, das Trenngel bis zu einer Höhe von ca. 2 cm unterhalb des oberen Randes gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisieren wurde der über dem Trenngel befindliche Raum mit saugfähigem Papier getrocknet, mit Sammelgel gefüllt und ein Kamm eingefügt. Nach dem vollständigen Aushärten des Sammelgels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammer wurde sowohl auf der Seite der Anode, als auch auf der Seite der Kathode mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Taschen mehrmals damit gespült. Die Proben (Aliquots der konditionierten Medien bzw. Zelllysate) wurden vor dem Auftragen mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Als Molekulargewichtsstandard wurden 7 µl See Blue Plus 2-Marker geladen.

Anode und Kathode wurden mit der Spannungsquelle verbunden. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 90 V und nach Eintritt der Proteine in das Trenngel bei 140 V.

### 8.2.5.6 Tris-Tricin-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von niedermolekularen Peptiden und Proteinen wurde das Gelsystem nach Schägger und Jagow (Schagger and von Jagow, 1987) unter Verwendung des Bio-Rad Minigelsystems eingesetzt. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 22 aufgeführt.

**Tabelle 22: Zusammensetzung der Tris-Tricin-Gele (die angegebenen Mengen reichen für 2 Gele mit einer Dicke von 1,5 mm)**

	<b>Trenngel (16,5 %)</b>	<b>Spacergel (10 %)</b>	<b>Sammelgel (4 %)</b>
dH <sub>2</sub> O	---	3,5 ml	4,2 ml
Acrylamid-Lösung für Tris-Tricin-Gele	3,5 ml	1,5 ml	0,5 ml
Gelpuffer	3,5 ml	2,5 ml	1,55 ml
32 % Glycerol	3,5 ml	---	---
10 % APS	32,5 µl	35 µl	50 µl
TEMED	4 µl	4 µl	5 µl

Beim Gießen der Gele wurde das Trenngel noch vor dem Aushärten mit dem Spacergel überschichtet. Die Elektrophoreskammer wurde auf der Seite der Anode mit Anodenpuffer und auf der Seite der Kathode mit Kathodenpuffer gefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich beide Puffer-Lösungen nicht mischen. Anschließend wurden die gewünschten Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte zu Beginn bei 80 V und nach Eintreten der Proben in das Spacergel bei 120 V.

### 8.2.5.7 Western Blot

Nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine in einer Transferkammer auf eine PVDF-Membran übertragen. Vor dem Transfer ist eine Aktivierung der Membran durch kurze Inkubation in Isopropanol notwendig. Nach der Aktivierung wurde die Membran kurz mit dH<sub>2</sub>O gespült und in Transferpuffer äquilibriert. Alternativ wurde eine Nitrozellulose-Membran verwendet. Bei dieser ist keine Aktivierung mit Isopropanol notwendig. Für den Transfer wurde das Mini-Gel-Transfersystem von Bio-Rad verwendet.

Transferaufbau:

- Anodenplatte
- poröser Schwamm in Transferpuffer äquilibriert
- zwei Lagen Filterpapier in Transfer-Puffer äquilibriert
- Membran
- SDS-Polyacrylamid-Gel
- zwei Lagen Filterpapier in Transfer-Puffer äquilibriert
- poröser Schwamm in Transferpuffer äquilibriert
- Kathodenplatte

Die Transferkammer wurde komplett mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte bei konstantem Stromfluss von 400 mA für 65 min. Zur Kühlung des Systems wurde ein Kühlakku in die Transferkammer eingesetzt. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen 30 min bei RT in Blockierlösung geschüttelt. Die so vorbehandelte Membran wurde zweimal mit PBS-T gewaschen und 2 x 5 min mit PBS-T auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 11) für bis zu 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten Waschschrte der Membran für 3 x 5 min mit PBS-T. Der entsprechende Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (siehe Tabelle 11) wurde anschließend für bis zu 45 min bei RT auf die Membran gegeben. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde viermal je 5 min mit PBS-T-Puffer gewaschen. Die Detektion der mit den Antikörpern markierten Proteine erfolgte mittels der sogenannten „enhanced chemoluminescence“ (ECL)-Technik nach Angaben des Herstellers. Die Signale wurden durch Schwärzung von Röntgenfilmen (Super RX, Fuji) sichtbar gemacht. Zum Nachweis schwacher Signale wurde das „ECLplus Western Blotting Detection System“ verwendet. Zur Quantifizierung der Intensitäten wurden die Signale mit dem Westernblot Dokumentationsgerät (LAS-4000) eingescannt und mittels der „Multi Gauge V3.0“ Software ausgewertet.

#### **8.2.5.8 Western Blot-Protokoll zum Nachweis von A $\beta$**

Zum Nachweis von A $\beta$  nach Auftrennung in der Tris-Tricin-Gelelektrophorese wurde ein leicht modifiziertes Western Blot-Protokoll verwendet. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde diese für 5 min in PBS-Puffer gekocht. Anschließend

wurden die unspezifischen Bindestellen auf der Membran mit I-Block-Lösung abgesättigt. Die Membran wurde dann über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde 3 x 5 min mit PBS-T gewaschen und ein an alkalische Phosphatase gekoppelter Sekundärantikörper (Tropix) für 60 min auf die Membran gegeben. Danach wurde 3 x 10 min mit PBS-T und 2 x 5 min mit Assay-Puffer (Western Star Kit) gewaschen. Zur Detektion wurde in diesem Fall das „Western Star Kit“ eingesetzt.

### **8.2.5.9 Nachweis der sekretierten APP-Spezies APPs $\alpha$ , APPs $\beta$ und A $\beta$**

In vorliegender Arbeit wurden die sekretierten APP-Spezies APPs $\alpha$ , APPs $\beta$  und A $\beta$  mit der Technologie von „Meso Scale Discovery“ (MSD) nachgewiesen. Diese Methode beruht auf einer Antikörper-basierten Immobilisierung der Zielproteine, die sodann mit einem weiteren Antikörper, an den ein spezieller Ruthenium-SULFO-TAG<sup>TM</sup> gekoppelt ist, markiert werden. In einer Elektro-Chemilumineszenz-Reaktion wird der Ruthenium-SULFO-TAG<sup>TM</sup> zunächst so elektrochemisch stimuliert, dass er daraufhin Licht emittiert, das detektiert werden kann. Vorteil dieses Nachweisverfahrens sind die minimalen Hintergrundsignale und das hohe Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis, da der Stimulus unterschiedlich zum detektierten Signal ist und somit die Messwerte nicht beeinflussen kann.

#### **8.2.5.9.1 APPs $\alpha$ - und APPs $\beta$ -Assay**

Zur Detektion der sekretierten APP-Spezies APPs $\alpha$  und APPs $\beta$  wurde das „sAPP $\alpha$ /sAPPs $\beta$  Assay Kit“ von MSD verwendet. In den Wells dieser Platten sind räumlich getrennte „Spots“, die jeweils APPs $\alpha$ - und APPs $\beta$ -spezifische Erstantikörper („Fang“ oder „Capture“-Antikörper) enthalten, so dass beide APP-Spezies zeitgleich detektiert werden können (von Einem et al., 2010). Die Messungen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die Platten zunächst für 1 h bei RT bzw. 16 h bei 4°C mit Blockierlösung geblockt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurden die Platten mit 25  $\mu$ l der Standards (APPs $\alpha$  und APPs $\beta$ , beide von MSD) oder des konditionierten Zellkulturüberstandes versehen. Darauf erfolgte zunächst eine einstündige Inkubation auf einem Schüttler bei RT bevor nach vier Waschschritten mit Waschlösung 25  $\mu$ l des Detektionsantiköpers SULFO-TAG<sup>TM</sup> anti-APP (1:50) zugesetzt wurde. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation auf einem Schüttler bei RT wurden die Platten je dreimal mit Waschlösung gewaschen, mit 1x „MSD Read Puffer“ versetzt und für 10 min inkubiert. Die



Messung der Elektrochemilumineszenz-Signale erfolgte mit dem „Sektor Imager 2400“ (MSD). Für alle Inkubations- bzw. Waschschrte wurden 100 µl pro well eingesetzt, alle Ausnahmen wurden benannt.

#### **8.2.5.9.2 Aβ-Triplex-Assay**

Zur Detektion der sekretierten Aβ-Spezies Aβ 38, Aβ 40 und Aβ 42 wurde das „Aβ-Triplex Assay Kit“ von MSD verwendet. Auch in den wells dieser Platten sind räumlich getrennte „Spots“, die jeweils Aβ 38-, Aβ 40- und Aβ 42-spezifische Erstantikörper enthalten, so dass alle drei APP-Spezies zeitgleich detektiert werden können (Page et al., 2010). Die Messungen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die Platten zunächst für 1 h bei RT bzw. 16 h bei 4°C mit Blockierlösung geblockt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurden die Platten mit 25 µl der Standards (Aβ 38, Aβ 40 und Aβ 42 MSD) oder des konditionierten Zellkulturüberstandes versehen. Zeitgleich wurden hier bereits 25 µl des Detektionsantiköpers SULFO-TAG<sup>TM</sup> anti-Aβ 6E10 (1:50) zu den Proben gegeben und dieses Gemisch für 2 h auf einem Schüttler bei RT in den Platten inkubiert. Nach vier Waschschrten mit Waschlösung wurden die Platten mit 2x „MSD Read Puffer“ versetzt und die Elektrochemilumineszenz-Signale unmittelbar mit dem „Sektor Imager 2400“ (MSD) gemessen. In SH-SY5Y-Zellen konnte mit dieser Nachweismethode nur die abundanteste Spezies Aβ 40 detektiert werden. Für alle Inkubations- bzw. Waschschrte wurden 100 µl pro well eingesetzt, alle Ausnahmen wurden benannt.

#### **8.2.5.10 Messung von HRP-APP-Signalen in konditioniertem Medium**

Zur Identifizierung neuer zellulärer Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP wurde ein genomweites RNAi-„Screening“ in Drosophila-Schneider 2 (S2)-Zellen durchgeführt. Als Reporter für die Ektodomänenspaltung von APP diente eine Version von APP, die N-terminal mit HRP versehen wurde. Somit kann die Ektodomänenspaltung des Fusionsproteins durch die α-Sekretase Kuzbanian (Sapir et al., 2005) im Überstand an Hand der HRP-katalysierten Lumineszenz-Reaktion detektiert werden. Hierzu wurden die 10 µl Aliquots der konditionierten Medien aus dem Drosophila RNAi-„Screening“ mit 50 µl des „Horseradish Peroxidase Assay“-Reagenz „Immobilon Western HRP Substrate“ versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die HRP-Signale im Luminometer „Analyst HT 384-well plate reader“ gemessen. Die Signale des HRP-APPsα wurden auf die

Transfektionseffizienz in Form der FLuc-Signale normalisiert.

#### **8.2.5.11 Messung der „Gaussia luciferase“-Aktivität in konditioniertem Medium**

In dem „Screening“ nach neuen zellulärer Modulatoren der Ektodomänenspaltung von APP in Drosophila-S2-Zellen wurde zur Sicherung der Spezifität potentieller Modulatoren auch die generelle Sekretion der Zellen überwacht. Hierzu wurde ein Reporterkonstrukt der Gaussia-Luziferase (GLuc, „Gaussian luciferase“) verwendet, dessen Produkt konstitutiv in den Überstand abgegeben wird. Zur Bestimmung der Gaussia-Luziferase-Aktivität im konditionierten Medium des Drosophila RNAi-„Screenings“ wurden die 30 µl Medium-Aliquots in den 384-well-Platten mit 30 µl des „Gaussia luciferase Assay“-Reagenz „GAR-2B“ versetzt. Anschließend wurde ohne weitere Inkubation das Signal der Gaussia-Luziferase-Reaktion in einem Plattenluminometer „Analyst HT 384-well plate reader“ gemessen. Die Signale der konstitutiv sekretierten Gaussia-Luziferase wurden auf die Transfektionseffizienz in Form der FLuc-Signale normalisiert.

#### **8.2.5.12 Messung der „Firefly luciferase“-Aktivität in Drosophila S2-Zellen**

Um im RNAi-„Screening“ in Drosophila-S2-Zellen Unterschiede in der Transfektionseffizienz berücksichtigen zu können, wurde zur Bestimmung der individuellen Transfektionsrate ein Reporterplasmid zur Expression der zellulären „Firefly luciferase“ ko-transfiziert. Zur Messung der „Firefly luciferase“-Aktivität in den Zellen des Drosophila RNAi-„Screenings“ wurden den Zellen in den 384-well-Platten 25 µl „Firefly luciferase Assay“-Reagenz „Steady Lite HTS“ zugesetzt. Dieses Reagenz ist speziell für die Messung intrazellulärer Signale ohne vorherige Zelllyse geeignet. Nach 6 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Signale der „Firefly luciferase“-Aktivität im Luminometer „Analyst HT 384-well plate reader“ gemessen. Das FLuc-Signal diente als Transfektionskontrolle und wurde zur Normalisierung der anderen beiden Werte HRP-APP und GLuc verwendet.

#### **8.2.5.13 Nachweismethoden der Sekretase-Aktivitäten**

Zur in vitro Bestimmung der Aktivitäten der APP-Sheddasen und eventueller Einflüsse der TMEM59-Expression auf deren Aktivität wurden Nachweismethoden der Sekretase-Aktivitäten verwendet, die auf der Spaltung eines fluorogenen Substrates beruhen. Hierbei

werden kurze Peptide, die die bevorzugte Schnittstelle einer Sekretase repräsentieren, und gleichzeitig mit einer fluoreszenten und einer absorbierenden Gruppe ausgestattet sind, zusammen mit der Sekretase inkubiert, so dass erst nach erfolgtem Schnitt die beiden Gruppen weit genug voneinander getrennt und Fluoreszenzsignale detektiert werden können.

#### **8.2.5.13.1 ADAM-Aktivitätsassay**

Der Nachweis der ADAM Aktivität ist mit Hilfe des fluorogenen Peptids „ADAM Substrate III“ (Mca-P-L-A-Q-A-V-Dpa-R-S-S-S-R-NH<sub>2</sub>; R&D) in lebenden Zellen und mit endogener ADAM10 Aktivität möglich. Für die Messungen wurden zunächst Zellen in 6-well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit Kontroll- bzw. TMEM59-Plasmid transfiziert. Nach einem Mediumswechsel und einer weiteren Übernachtinkubation wurden die Überstände abgenommen, für den Western Blot aufbewahrt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden alle Zellen mit 1 ml PBS überschichtet, wobei die Kontrollgruppe zusätzlich 50 µM TAPII erhielt, und für 30 min prä-inkubiert. Aus diesen Überständen wurde zum Zeitpunkt  $t = -10$  min photometrisch die Hintergrundfluoreszenz (Anregung 320 nm, Emission 405 nm) gemessen. Zum Startzeitpunkt von  $t = 0$  min wurden alle Zellen mit 1 ml PBS, das 10 µM des fluorogenen Peptidsubstrats enthielt, überschichtet, wobei die Kontrollgruppe zusätzlich mit 50 µM TAPII behandelt wurde, und für 6 h inkubiert. Alle 30 min wurden 100 µl der Zellüberstände abgenommen und ihre Fluoreszenz gemessen, woraufhin diese wieder in ihr Ursprungswell zurückgegeben wurden um das Ausgangsvolumen konstant zu halten. Mit zunehmender Messzeit konnte eine zunehmende Fluoreszenz, die mit der Spaltung des fluorogenen Substrats durch ADAM korreliert ist, festgestellt werden. Ein autokatalytischer Abbau des Substrats konnte durch eine Negativkontrolle (fluorogenes Substrat, das parallel aber ohne Kontakt zu Zellen in PBS inkubiert wurde) ausgeschlossen werden. Nach Abschluss der Messreihe konnten die intakten, immer noch adhären Zellen zu Lysaten für die Proteinbestimmung und den Western Blot verarbeitet werden. Zur Auswertung wurden die erhaltenen Fluoreszenzsignale auf das vorhandene Protein normalisiert und als Anteil der Kontroll-Plasmid transfizierten Zellen ausgedrückt.

#### **8.2.5.13.2 BACE1-Aktivitätsassay**

Im Gegensatz zum Nachweis der ADAM Aktivität ist der Nachweis der BACE1 Aktivität mit Hilfe des fluorogenen Peptids „BACE1 Substrate IV“ (Mca-S-E-V-N-L-D-A-E-F-R-K(Dnp)-

---

R-R-NH<sub>2</sub>; R&D) in HEK293E-Zellen auf Grund der geringen endogenen BACE1 Level nur in Membranen und nur nach transienter Transfektion von BACE1 möglich. Auch hier wurden zunächst Zellen in 6-well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit BACE1-Plasmid und Kontroll- bzw. TMEM59-Plasmid ko-transfiziert. Nach einem Mediumswechsel und einer weiteren Übernachtinkubation wurden die Überstände abgenommen, für den Western Blot aufbewahrt und aus den Zellen die Membranen präpariert. Nach Verdünnen der Proben auf eine Proteinkonzentration von 3,3 µg/µg und des Einstellens des pH-Werts auf 4,5 wurden jeweils 100 µl einer Probe mit 10 µM des fluorogenen Substrats versetzt und über 90 min die Fluoreszenz (Anregung 320 nm, Emission 405 nm) in einer gewärmten Küvette (37°C) gemessen. Zur Kontrolle der Signalspezifität wurden parallel Membranen zusätzlich mit 1 µM des bekannten BACE1 Inhibitor C3 inkubiert. Ein autokatalytischer Abbau des Substrats konnte durch eine Negativkontrolle (fluorogenes Substrat, das ohne Membranen in Natriumacetatpuffer pH 4,5 inkubiert wurde) ausgeschlossen werden.

## 9 Literaturverzeichnis

- Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J., & Hooper, N. M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res*, *74*(3), 342-352.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und phychisch-Gerichtliche Medizin*(64), 146-148.
- Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R., & Fahrenholz, F. (2001). Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J*, *15*(10), 1837-1839.
- Andersen, O. M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., von Arnim, C. A., Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu, X., Bales, K. R., Cappai, R., Masters, C. L., Gliemann, J., Mufson, E. J., Hyman, B. T., Paul, S. M., Nykjaer, A., & Willnow, T. E. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(38), 13461-13466.
- Andrau, D., Dumanchin-Njock, C., Ayrat, E., Vizzavona, J., Farzan, M., Boisbrun, M., Fulcrand, P., Hernandez, J. F., Martinez, J., Lefranc-Jullien, S., & Checler, F. (2003). BACE1- and BACE2-expressing human cells: characterization of beta-amyloid precursor protein-derived catabolites, design of a novel fluorimetric assay, and identification of new in vitro inhibitors. *J Biol Chem*, *278*(28), 25859-25866.
- Annaert, W., & De Strooper, B. (1999). Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction. *Trends Neurosci*, *22*(10), 439-443.
- Arribas, J., & Massague, J. (1995). Transforming growth factor-alpha and beta-amyloid precursor protein share a secretory mechanism. *J Cell Biol*, *128*(3), 433-441.
- Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T., & Emr, S. D. (2002a). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell*, *3*(2), 271-282.
- Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B., & Emr, S. D. (2002b). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell*, *3*(2), 283-289.
- Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J., & Emr, S. D. (2000). Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic*, *1*(3), 248-258.
- Bache, K. G., Brech, A., Mehlum, A., & Stenmark, H. (2003a). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol*, *162*(3), 435-442.
- Bache, K. G., Raiborg, C., Mehlum, A., & Stenmark, H. (2003b). STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J Biol Chem*, *278*(14), 12513-12521.
- Bache, K. G., Slagsvold, T., Cabezas, A., Rosendal, K. R., Raiborg, C., & Stenmark, H. (2004a). The Growth-Regulatory Protein HCRP1/hVps37A Is a Subunit of Mammalian ESCRT-I and Mediates Receptor Down-Regulation. *Mol Biol Cell*, *15*, 4337-4346.
- Bache, K. G., Slagsvold, T., & Stenmark, H. (2004b). Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. *EMBO J*, *23*(14), 2707-2712.
- Bache, K. G., Stuffers, S., Malerod, L., Slagsvold, T., Raiborg, C., Lechardeur, D., Walchli, S., Lukacs, G. L., Brech, A., & Stenmark, H. (2006). The ESCRT-III subunit hVps24 is required for degradation but not silencing of the epidermal growth factor receptor. *Mol Biol Cell*, *17*(6), 2513-2523.
- Bakal, C. (2011). Drosophila RNAi screening in a postgenomic world. *Brief Funct Genomics*, *10*(4), 197-205.
- Baldys, A., & Raymond, J. R. (2009). Critical role of ESCRT machinery in EGFR recycling. *Biochemistry*, *48*(40), 9321-9323.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., & Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *Lancet*, *377*(9770), 1019-1031.
- Bandyopadhyay, S., Goldstein, L. E., Lahiri, D. K., & Rogers, J. T. (2007). Role of the APP non-

- amyloidogenic signaling pathway and targeting alpha-secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*, 14(27), 2848-2864.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R. L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D., & Yednock, T. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med*, 6(8), 916-919.
- Behr, D., & Graham, S. L. (2005). Protease inhibitors as potential disease-modifying therapeutics for Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 14(11), 1385-1409.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363-366.
- Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2008). Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci*, 9(10), 768-778.
- Bier, E. (2005). Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet*, 6(1), 9-23.
- Bishop, N., Horman, A., & Woodman, P. (2002). Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J Cell Biol*, 157(1), 91-101.
- Boutros, M., & Ahringer, J. (2008). The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nat Rev Genet*, 9(7), 554-566.
- Boutros, M., Bras, L. P., & Huber, W. (2006). Analysis of cell-based RNAi screens. *Genome Biol*, 7(7), R66.
- Boutros, M., Kiger, A. A., Armknecht, S., Kerr, K., Hild, M., Koch, B., Haas, S. A., Paro, R., & Perrimon, N. (2004). Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in Drosophila cells. *Science*, 303(5659), 832-835.
- Braak, H., Braak, E., Bohl, J., & Reintjes, R. (1996). Age, neurofibrillary changes, A beta-amyloid and the onset of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 210(2), 87-90.
- Breen, K. C., Coughlan, C. M., & Hayes, F. D. (1998). The role of glycoproteins in neural development function, and disease. *Mol Neurobiol*, 16(2), 163-220.
- Burchard, J., Jackson, A. L., Malkov, V., Needham, R. H., Tan, Y., Bartz, S. R., Dai, H., Sachs, A. B., & Linsley, P. S. (2009). MicroRNA-like off-target transcript regulation by siRNAs is species specific. *RNA*, 15(2), 308-315.
- 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., & 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(43), 27765-27767.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., & Wong, P. C. (2001). BACE1 is the major beta-secretase for generation of A beta peptides by neurons. *Nat Neurosci*, 4(3), 233-234.
- Cao, X., & Sudhof, T. C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, 293(5527), 115-120.
- Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G., & Haass, C. (2000). Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J Biol Chem*, 275(40), 30849-30854.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655.
- Chang, K. H., Yang, J. M., Chun, H. O., & 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(4), 359-367.
- Charlwood, J., Dingwall, C., Matico, R., Hussain, I., Johanson, K., Moore, S., Powell, D. J., Skehel, J. M., Ratcliffe, S., Clarke, B., Trill, J., Sweitzer, S., & Camilleri, P. (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(20), 16739-16748.

- Cisse, M. A., Gandreuil, C., Hernandez, J. F., Martinez, J., Checler, F., & Vincent, B. (2006). Design and characterization of a novel cellular prion-derived quenched fluorimetric substrate of alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun*, *347*(1), 254-260.
- Clemens, J. C., Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B. A., & Dixon, J. E. (2000). Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(12), 6499-6503.
- Cramer, A., Biondi, E., Kuehnle, K., Lutjohann, D., Thelen, K. M., Perga, S., Dotti, C. G., Nitsch, R. M., Ledesma, M. D., & Mohajeri, M. H. (2006). The role of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and Abeta generation in vivo. *EMBO J*, *25*(2), 432-443.
- Cullen, L. M., & Arndt, G. M. (2005). Genome-wide screening for gene function using RNAi in mammalian cells. *Immunol Cell Biol*, *83*(3), 217-223.
- Cupers, P., Bentahir, M., Craessaerts, K., Orlans, I., Vanderstichele, H., Saftig, P., De Strooper, B., & Annaert, W. (2001). The discrepancy between presenilin subcellular localization and gamma-secretase processing of amyloid precursor protein. *J Cell Biol*, *154*(4), 731-740.
- De Pietri Tonelli, D., Mihailovich, M., Di Cesare, A., Codazzi, F., Grohovaz, F., & Zacchetti, D. (2004). Translational regulation of BACE-1 expression in neuronal and non-neuronal cells. *Nucleic Acids Res*, *32*(5), 1808-1817.
- De Strooper, B., & Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci*, *113* ( Pt 11), 1857-1870.
- Dislich, B., & Lichtenthaler, S. F. (2012). The membrane-bound aspartyl protease BACE1: Molecular and functional properties in Alzheimer's disease and beyond. *Frontiers in Physiology and Membrane Biophysics*.
- Doench, J. G., Petersen, C. P., & Sharp, P. A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*, *17*(4), 438-442.
- Doyotte, A., Russell, M. R., Hopkins, C. R., & Woodman, P. G. (2005). Depletion of TSG101 forms a mammalian "Class E" compartment: a multicisternal early endosome with multiple sorting defects. *J Cell Sci*, *118*(Pt 14), 3003-3017.
- Dukes, J. D., Richardson, J. D., Simmons, R., & Whitley, P. (2008). A dominant-negative ESCRT-III protein perturbs cytokinesis and trafficking to lysosomes. *Biochem J*, *411*(2), 233-239.
- Dyrks, T., Weidemann, A., Multhaup, G., Salbaum, J. M., Lemaire, H. G., Kang, J., Muller-Hill, B., Masters, C. L., & Beyreuther, K. (1988). Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J*, *7*(4), 949-957.
- Echeverri, C. J., Beachy, P. A., Baum, B., Boutros, M., Buchholz, F., Chanda, S. K., Downward, J., Ellenberg, J., Fraser, A. G., Hacohen, N., Hahn, W. C., Jackson, A. L., Kiger, A., Linsley, P. S., Lum, L., Ma, Y., Mathey-Prevot, B., Root, D. E., Sabatini, D. M., Taipale, J., Perrimon, N., & Bernards, R. (2006). Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat Methods*, *3*(10), 777-779.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H., & Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol*, *5*(5), 486-488.
- Eden, E. R., White, I. J., & Futter, C. E. (2009). Down-regulation of epidermal growth factor receptor signalling within multivesicular bodies. *Biochem Soc Trans*, *37*(Pt 1), 173-177.
- Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., & Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*, *160*(1), 113-123.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, *411*(6836), 494-498.
- Elson, G. C., de Coignac, A. B., Aubry, J. P., Delneste, Y., Magistrelli, G., Holzwarth, J., Bonnefoy, J. Y., & 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*(1), 55-62.
- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., & Ward, P. J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*, *248*(4959), 1122-1124.
- Escrevente, C., Morais, V. A., Keller, S., Soares, C. M., Altevogt, P., & Costa, J. (2008a). Functional

- role of N-glycosylation from ADAM10 in processing, localization and activity of the enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 1780(6), 905-913.
- Escrevente, C., Morais, V. A., Keller, S., Soares, C. M., Altevogt, P., & Costa, J. (2008b). Functional role of N-glycosylation from ADAM10 in processing, localization and activity of the enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 6, 905-913.
- Fabian, M. R., Sonenberg, N., & Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*, 79, 351-379.
- Faghihi, M. A., Modarresi, F., Khalil, A. M., Wood, D. E., Sahagan, B. G., Morgan, T. E., Finch, C. E., St Laurent, G., 3rd, Kenny, P. J., & Wahlestedt, C. (2008). Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med*, 14(7), 723-730.
- Fahrenholz, F. (2007). Alpha-secretase as a therapeutic target. *Curr Alzheimer Res*, 4(4), 412-417.
- Fellgiebel, A., Kojro, E., Muller, M. J., Scheurich, A., Schmidt, L. G., & Fahrenholz, F. (2009). CSF APPs alpha and phosphorylated tau protein levels in mild cognitive impairment and dementia of Alzheimer's type. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 22(1), 3-9.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.
- Fischer, S. (2008). *Analyse des neuen Proteins TMEM59 und seiner Funktion in dem Transport und der Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins*. (Dr. rer. nat. Dissertation), LMU München, München. (8596)
- Fossgreen, A., Bruckner, B., Czech, C., Masters, C. L., Beyreuther, K., & 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(23), 13703-13708.
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M. C., Parks, A. L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R. L., Himes, C. S., Hiebsch, R., Ruble, C., Nye, J. S., & Curtis, D. (2002). *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell*, 3(1), 85-97.
- Friedhoff, P., von Bergen, M., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2000). Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim Biophys Acta*, 1502(1), 122-132.
- Fujita, H., Yamanaka, M., Imamura, K., Tanaka, Y., Nara, A., Yoshimori, T., Yokota, S., & Himeno, M. (2003). A dominant negative form of the AAA ATPase SKD1/VPS4 impairs membrane trafficking out of endosomal/lysosomal compartments: class E vps phenotype in mammalian cells. *J Cell Sci*, 116(Pt 2), 401-414.
- Furukawa, K., Sopher, B. L., Rydel, R. E., Begley, J. G., Pham, D. G., Martin, G. M., Fox, M., & 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(5), 1882-1896.
- Gleeson, P. A., Anderson, T. J., Stow, J. L., Griffiths, G., Toh, B. H., & Matheson, F. (1996). p230 is associated with vesicles budding from the trans-Golgi network. *J Cell Sci*, 109 (Pt 12), 2811-2821.
- Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 122(3), 1131-1135.
- Glenner, G. G., Wong, C. W., Quaranta, V., & Eanes, E. D. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol*, 2(6), 357-369.
- Golde, T. E., Estus, S., Younkin, L. H., Selkoe, D. J., & Younkin, S. G. (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science*, 255(5045), 728-730.
- Gralle, M., Botelho, M. G., & Wouters, F. S. (2009). Neuroprotective secreted amyloid precursor protein acts by disrupting amyloid precursor protein dimers. *J Biol Chem*, 284(22), 15016-15025.



- Grant, B. D., & Donaldson, J. G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(9), 597-608.
- Gruenberg, J., & Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(4), 317-323.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & 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(13), 4913-4917.
- Gruninger-Leitch, F., Schlatter, D., Kung, E., Nelbock, P., & Dobeli, H. (2002). Substrate and inhibitor profile of BACE (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases. *J Biol Chem*, 277(7), 4687-4693.
- Gunawardena, S., & Goldstein, L. S. (2001). Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron*, 32(3), 389-401.
- Gwack, Y., Sharma, S., Nardone, J., Tanasa, B., Iuga, A., Srikanth, S., Okamura, H., Bolton, D., Feske, S., Hogan, P. G., & Rao, A. (2006). A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature*, 441(7093), 646-650.
- Haapasalo, A., & Kovacs, D. M. (2011). The many substrates of presenilin/gamma-secretase. *J Alzheimers Dis*, 25(1), 3-28.
- Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Oltersdorf, T., Teplow, D. B., & Selkoe, D. J. (1993a). 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., & Selkoe, D. J. (1993b). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem*, 268(5), 3021-3024.
- Haass, C., Koo, E. H., Mellon, A., Hung, A. Y., & Selkoe, D. J. (1992). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*, 357(6378), 500-503.
- Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., & Selkoe, D. J. (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med*, 1(12), 1291-1296.
- Haass, C., & Steiner, H. (2002). Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol*, 12(12), 556-562.
- Hammond, S. M. (2005). Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett*, 579(26), 5822-5829.
- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature*, 418(6894), 244-251.
- Hao, L., Sakurai, A., Watanabe, T., Sorensen, E., Nidom, C. A., Newton, M. A., Ahlquist, P., & Kawaoka, Y. (2008). *Drosophila* RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature*, 454(7206), 890-893.
- Hardy, J., & Higgins, G. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-185.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353-356.
- Hasdemir, B., Bunnett, N. W., & Cottrell, G. S. (2007). Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS) mediates post-endocytic trafficking of protease-activated receptor 2 and calcitonin receptor-like receptor. *J Biol Chem*, 282(40), 29646-29657.
- Hattori, C., Asai, M., Onishi, H., Sasagawa, N., Hashimoto, Y., Saido, T. C., Maruyama, K., Mizutani, S., & Ishiura, S. (2006). BACE1 interacts with lipid raft proteins. *J Neurosci Res*, 84(4), 912-917.
- Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., Lipp, H. P., Wolfer, D. P., & Muller, U. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci*, 20(21), 7951-7963.
- Hebert, S. S., Horre, K., Nicolai, L., Papadopoulou, A. S., Mandemakers, W., Silahatoglu, A. N., Kauppinen, S., Delacourte, A., & De Strooper, B. (2008). Loss of microRNA cluster miR-

- 29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(17), 6415-6420.
- Hebert, S. S., Serneels, L., Tolia, A., Craessaerts, K., Derks, C., Filippov, M. A., Muller, U., & De Strooper, B. (2006). Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. *EMBO Rep*, 7(7), 739-745.
- Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretschmar, H., Sisodia, S., & Muller, U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J*, 23(20), 4106-4115.
- Herrmann, N., Chau, S. A., Kircanski, I., & Lancot, K. L. (2011). Current and emerging drug treatment options for Alzheimer's disease: a systematic review. *Drugs*, 71(15), 2031-2065.
- Hoe, H. S., Cooper, M. J., Burns, M. P., Lewis, P. A., van der Brug, M., Chakraborty, G., Cartagena, C. M., Pak, D. T., Cookson, M. R., & Rebeck, G. W. (2007). The metalloprotease inhibitor TIMP-3 regulates amyloid precursor protein and apolipoprotein E receptor proteolysis. *J Neurosci*, 27(40), 10895-10905.
- Holen, T. (2006). Efficient prediction of siRNAs with siRNARules 1.0: an open-source JAVA approach to siRNA algorithms. *RNA*, 12(9), 1620-1625.
- Hong, L., Koelsch, G., Lin, X., Wu, S., Terzyan, S., Ghosh, A. K., Zhang, X. C., & Tang, J. (2000). Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science*, 290(5489), 150-153.
- Horn, T., Sandmann, T., & Boutros, M. (2010). Design and evaluation of genome-wide libraries for RNA interference screens. *Genome Biol*, 11(6), R61.
- Hornsten, A., Lieberthal, J., Fadia, S., Malins, R., Ha, L., Xu, X., Daigle, I., Markowitz, M., O'Connor, G., Plasterk, R., & Li, C. (2007). APL-1, a *Caenorhabditis elegans* protein related to the human beta-amyloid precursor protein, is essential for viability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(6), 1971-1976.
- Hosokawa, N., Hara, Y., & Mizushima, N. (2006). Generation of cell lines with tetracycline-regulated autophagy and a role for autophagy in controlling cell size. *FEBS Lett*, 580(11), 2623-2629.
- Hurley, J. H., & Hanson, P. I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(8), 556-566.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., Gloger, I. S., Murphy, K. E., Southan, C. D., Ryan, D. M., Smith, T. S., Simmons, D. L., Walsh, F. S., Dingwall, C., & Christie, G. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci*, 14(6), 419-427.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23-28.
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., & Linsley, P. S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, 21(6), 635-637.
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., & 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(18), 4693-4697.
- Jia, P., Shi, T., Cai, Y., & Li, Y. (2006). Demonstration of two novel methods for predicting functional siRNA efficiency. *BMC Bioinformatics*, 7, 271.
- Kaether, C., Lammich, S., Edbauer, D., Ertl, M., Rietdorf, J., Capell, A., Steiner, H., & Haass, C. (2002). Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J Cell Biol*, 158(3), 551-561.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., & Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106), 733-736.
- Karran, E., Mercken, M., & De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 10(9), 698-712.
- Katzmann, D. J., Babst, M., & Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-

- I. *Cell*, 106(2), 145-155.
- Khan, A. A., Betel, D., Miller, M. L., Sander, C., Leslie, C. S., & Marks, D. S. (2009). Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol*, 27(6), 549-555.
- Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2), 209-216.
- Kimberly, W. T., & Wolfe, M. S. (2003). Identity and function of gamma-secretase. *J Neurosci Res*, 74(3), 353-360.
- Klinghoffer, R. A., Magnus, J., Schelter, J., Mehaffey, M., Coleman, C., & Cleary, M. A. (2010). Reduced seed region-based off-target activity with lentivirus-mediated RNAi. *RNA*, 16(5), 879-884.
- Knops, J., Lieberburg, I., & 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(23), 16022-16024.
- Kobayashi, H., Tanaka, N., Asao, H., Miura, S., Kyuuma, M., Semura, K., Ishii, N., & Sugamura, K. (2005). Hrs, a mammalian master molecule in vesicular transport and protein sorting, suppresses the degradation of ESCRT proteins signal transducing adaptor molecule 1 and 2. *J Biol Chem*, 280(11), 10468-10477.
- Koberle, C., Kaufmann, S. H., & Patzel, V. (2006). Selecting effective siRNAs based on guide RNA structure. *Nat Protoc*, 1(4), 1832-1839.
- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saïdo, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., & Ishiura, S. (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J*, 343 Pt 2, 371-375.
- Kojro, E., Fuger, P., Prinzen, C., Kanarek, A. M., Rat, D., Endres, K., Fahrenholz, F., & Postina, R. (2010). Statins and the squalene synthase inhibitor zaragozic acid stimulate the non-amyloidogenic pathway of amyloid-beta protein precursor processing by suppression of cholesterol synthesis. *J Alzheimers Dis*, 20(4), 1215-1231.
- Komada, M., & Soriano, P. (1999). Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis. *Genes Dev*, 13(11), 1475-1485.
- Koo, E. H., & Squazzo, S. L. (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*, 269(26), 17386-17389.
- Koo, E. H., Squazzo, S. L., Selkoe, D. J., & 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.
- Korenberg, J. R., Pulst, S. M., Neve, R. L., & West, R. (1989). The Alzheimer amyloid precursor protein maps to human chromosome 21 bands q21.105-q21.05. *Genomics*, 5(1), 124-127.
- Kornfeld, R., & Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*, 54, 631-664.
- Kowalska, A. (2003). Amyloid precursor protein gene mutations responsible for early-onset autosomal dominant Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*, 41(1), 35-40.
- Kubota, Y., & Nishiwaki, K. (2006). *C. elegans* as a model system to study the function of the COG complex in animal development. *Biol Chem*, 387(8), 1031-1035.
- Kuhn, P. H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Rossner, S., & Lichtenthaler, S. F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J*, 29(17), 3020-3032.
- Kulkarni, M. M., Booker, M., Silver, S. J., Friedman, A., Hong, P., Perrimon, N., & Mathey-Prevot, B. (2006). Evidence of off-target effects associated with long dsRNAs in *Drosophila melanogaster* cell-based assays. *Nat Methods*, 3(10), 833-838.
- Kuttenkeuler, D., & Boutros, M. (2004). Genome-wide RNAi as a route to gene function in *Drosophila*. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 3(2), 168-176.
- Kwon, M., Godinho, S. A., Chandhok, N. S., Ganem, N. J., Azioune, A., They, M., & Pellman, D.

- (2008). Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev*, 22(16), 2189-2203.
- Lammich, S., Buell, D., Zilow, S., Ludwig, A. K., Nuscher, B., Lichtenthaler, S. F., Prinzen, C., Fahrenholz, F., & Haass, C. (2010). Expression of the anti-amyloidogenic secretase ADAM10 is suppressed by its 5'-untranslated region. *J Biol Chem*, 285(21), 15753-15760.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., & 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(7), 3922-3927.
- Lammich, S., Schobel, S., Zimmer, A. K., Lichtenthaler, S. F., & Haass, C. (2004). Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region. *EMBO Rep*, 5(6), 620-625.
- Langelier, C., von Schwedler, U. K., Fisher, R. D., De Domenico, I., White, P. L., Hill, C. P., Kaplan, J., Ward, D., & Sundquist, W. I. (2006). Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release. *J Virol*, 80(19), 9465-9480.
- Lansbury, P. T., Jr. (1997). Inhibition of amyloid formation: a strategy to delay the onset of Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol*, 1(2), 260-267.
- Levy-Lahad, E., Wijsman, E. M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K. A., Weber, J. L., Bird, T. D., & Schellenberg, G. D. (1995). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*, 269(5226), 970-973.
- Li, W., & Cha, L. (2007). Predicting siRNA efficiency. *Cell Mol Life Sci*, 64(14), 1785-1792.
- Lichtenthaler, S. F. (2006). Ectodomain shedding of the amyloid precursor protein: cellular control mechanisms and novel modifiers. *Neurodegener Dis*, 3(4-5), 262-269.
- Lichtenthaler, S. F. (2011a). Alpha-Secretase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein: Proteolysis Regulated by Signaling Pathways and Protein Trafficking. *Curr Alzheimer Res*.
- Lichtenthaler, S. F. (2011b). Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem*, 116(1), 10-21.
- Lichtenthaler, S. F., Haass, C., & Steiner, H. (2011). Regulated intramembrane proteolysis--lessons from amyloid precursor protein processing. *J Neurochem*, 117(5), 779-796.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., & 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(4), 1456-1460.
- Linstedt, A. D., Foguet, M., Renz, M., Seelig, H. P., Glick, B. S., & Hauri, H. P. (1995). A C-terminally-anchored Golgi protein is inserted into the endoplasmic reticulum and then transported to the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(11), 5102-5105.
- Linstedt, A. D., & Hauri, H. P. (1993). Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. *Mol Biol Cell*, 4(7), 679-693.
- Lopez-Perez, E., Zhang, Y., Frank, S. J., Creemers, J., Seidah, N., & Checler, F. (2001). Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10. *J Neurochem*, 76(5), 1532-1539.
- Lu, Q., Hope, L. W., Brasch, M., Reinhard, C., & Cohen, S. N. (2003). TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13), 7626-7631.
- Luo, L. Q., Martin-Morris, L. E., & White, K. (1990). Identification, secretion, and neural expression of APPL, a Drosophila protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci*, 10(12), 3849-3861.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J. C., Yan, Q., Richards, W. G., Citron, M., & Vassar, R. (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci*, 4(3), 231-232.
- Luzio, J. P., Brake, B., Banting, G., Howell, K. E., Braghetta, P., & Stanley, K. K. (1990). Identification, sequencing and expression of an integral membrane protein of the trans-Golgi

- network (TGN38). *Biochem J*, 270(1), 97-102.
- Maguire, T. M., & Breen, K. C. (1995). A decrease in neural sialyltransferase activity in Alzheimer's disease. *Dementia*, 6(4), 185-190.
- Malerod, L., Stuffers, S., Brech, A., & Stenmark, H. (2007). Vps22/EAP30 in ESCRT-II mediates endosomal sorting of growth factor and chemokine receptors destined for lysosomal degradation. *Traffic*, 8(11), 1617-1629.
- Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (1998). Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*, 8(11), 425-427.
- Martin, S. E., & Caplen, N. J. (2007). Applications of RNA interference in mammalian systems. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 8, 81-108.
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., & Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(12), 4245-4249.
- McFarlane, I., Georgopoulou, N., Coughlan, C. M., Gillian, A. M., & 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(1), 15-25.
- Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006), 343-349.
- Mendell, J. T. (2005). MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle*, 4(9), 1179-1184.
- Metcalf, D., & Isaacs, A. M. (2010). The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes. *Biochem Soc Trans*, 38(6), 1469-1473.
- Meziane, H., Dodart, J. C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M., & 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(21), 12683-12688.
- Mohr, S., Bakal, C., & Perrimon, N. (2010). Genomic screening with RNAi: results and challenges. *Annu Rev Biochem*, 79, 37-64.
- Morino, C., Kato, M., Yamamoto, A., Mizuno, E., Hayakawa, A., Komada, M., & Kitamura, N. (2004). A role for Hrs in endosomal sorting of ligand-stimulated and unstimulated epidermal growth factor receptor. *Exp Cell Res*, 297(2), 380-391.
- Morris, H. R., Khan, M. N., Janssen, J. C., Brown, J. M., Perez-Tur, J., Baker, M., Ozansoy, M., Hardy, J., Hutton, M., Wood, N. W., Lees, A. J., Revesz, T., Lantos, P., & Rossor, M. N. (2001). The genetic and pathological classification of familial frontotemporal dementia. *Arch Neurol*, 58(11), 1813-1816.
- Nakagawa, K., Kitazume, S., Oka, R., Maruyama, K., Saido, T. C., Sato, Y., Endo, T., & Hashimoto, Y. (2006). Sialylation enhances the secretion of neurotoxic amyloid-beta peptides. *J Neurochem*, 96(4), 924-933.
- Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreis, T. E., & Warren, G. (1995). Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol*, 131(6 Pt 2), 1715-1726.
- Neumann, S., Schobel, S., Jager, S., Trautwein, A., Haass, C., Pietrzik, C. U., & Lichtenthaler, S. F. (2006). Amyloid precursor-like protein 1 influences endocytosis and proteolytic processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 281(11), 7583-7594.
- Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D. D., & Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*, 457(7232), 981-989.
- Offe, K., Dodson, S. E., Shoemaker, J. T., Fritz, J. J., Gearing, M., Levey, A. I., & Lah, J. J. (2006). The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *J Neurosci*, 26(5), 1596-1603.
- Oltersdorf, T., Ward, P. J., Henriksson, T., Beattie, E. C., Neve, R., Lieberburg, I., & Fritz, L. C. (1990). The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J Biol Chem*, 265(8), 4492-4497.
- Page, R. M., Gutsmedl, A., Fukumori, A., Winkler, E., Haass, C., & Steiner, H. (2010). Beta-amyloid precursor protein mutants respond to gamma-secretase modulators. *J Biol Chem*, 285(23),

- 17798-17810.
- Pahlsson, P., & 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(2), 177-186.
- Pardossi-Piquard, R., Yang, S. P., Kanemoto, S., Gu, Y., Chen, F., Bohm, C., Sevalle, J., Li, T., Wong, P. C., Checler, F., Schmitt-Ulms, G., St George-Hyslop, P., & Fraser, P. E. (2009). APH1 polar transmembrane residues regulate the assembly and activity of presenilin complexes. *J Biol Chem*, 284(24), 16298-16307.
- Perez, R. G., Soriano, S., Hayes, J. D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D. J., Chen, X., Stokin, G. B., & 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(27), 18851-18856.
- Perez, R. G., Zheng, H., Van der Ploeg, L. H., & Koo, E. H. (1997). The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J Neurosci*, 17(24), 9407-9414.
- Persengiev, S. P., Zhu, X., & Green, M. R. (2004). Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA*, 10(1), 12-18.
- Pfeffer, S. R. (2001). Constructing a Golgi complex. *J Cell Biol*, 155(6), 873-875.
- Pietrzik, C. U., Yoon, I. S., Jaeger, S., Busse, T., Weggen, S., & Koo, E. H. (2004). FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. *J Neurosci*, 24(17), 4259-4265.
- Pike, C. J., Cummings, B. J., Monzavi, R., & Cotman, C. W. (1994). Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 63(2), 517-531.
- Prinzen, C., Muller, U., Endres, K., Fahrenholz, F., & Postina, R. (2005). Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *FASEB J*, 19(11), 1522-1524.
- Prokop, S., Haass, C., & Steiner, H. (2005). Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain determines its function in the stabilization of presenilin fragments. *J Neurochem*, 94(1), 57-62.
- Prokop, S., Shirotani, K., Edbauer, D., Haass, C., & Steiner, H. (2004). Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex. *J Biol Chem*, 279(22), 23255-23261.
- QIAGEN. (1999-2002). The QIAGEN® Transfection Resource Book. *Second Edition*.
- Qiu, W. Q., Ferreira, A., Miller, C., Koo, E. H., & Selkoe, D. J. (1995). Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *J Neurosci*, 15(3 Pt 2), 2157-2167.
- Raiborg, C., Malerod, L., Pedersen, N. M., & Stenmark, H. (2008). Differential functions of Hrs and ESCRT proteins in endocytic membrane trafficking. *Exp Cell Res*, 314(4), 801-813.
- Raiborg, C., & Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, 458(7237), 445-452.
- Rao, D. D., Vorhies, J. S., Senzer, N., & Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev*, 61(9), 746-759.
- Raposo, G., & Marks, M. S. (2007). Melanosomes-dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(10), 786-797.
- Razi, M., & Futter, C. E. (2006). Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. *Mol Biol Cell*, 17(8), 3469-3483.
- Rettig, W. J., Spengler, B. A., Chesa, P. G., Old, L. J., & Biedler, J. L. (1987). Coordinate changes in neuronal phenotype and surface antigen expression in human neuroblastoma cell variants. *Cancer Res*, 47(5), 1383-1389.
- Ring, S., Weyer, S. W., Kilian, S. B., Waldron, E., Pietrzik, C. U., Filippov, M. A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C. B., Korte, M., Wolfer, D. P., & Muller, U. C. (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical,

- behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci*, 27(29), 7817-7826.
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J. H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C. T., Cheng, R., Hasegawa, H., Chen, F., Shibata, N., Lunetta, K. L., Pardossi-Piquard, R., Bohm, C., Wakutani, Y., Cupples, L. A., Cuenco, K. T., Green, R. C., Pinessi, L., Rainero, I., Sorbi, S., Bruni, A., Duara, R., Friedland, R. P., Inzelberg, R., Hampe, W., Bujo, H., Song, Y. Q., Andersen, O. M., Willnow, T. E., Graff-Radford, N., Petersen, R. C., Dickson, D., Der, S. D., Fraser, P. E., Schmitt-Ulms, G., Younkin, S., Mayeux, R., Farrer, L. A., & St George-Hyslop, P. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*, 39(2), 168-177.
- Rogers, G. W., Jr., Edelman, G. M., & Mauro, V. P. (2004). Differential utilization of upstream AUGs in the beta-secretase mRNA suggests that a shunting mechanism regulates translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9), 2794-2799.
- Rossner, S., Sastre, M., Bourne, K., & Lichtenthaler, S. F. (2006). Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression--implications for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 79(2), 95-111.
- Roth, J. (1991). Localization of glycosylation sites in the Golgi apparatus using immunolabeling and cytochemistry. *J Electron Microscop Tech*, 17(2), 121-131.
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J. M., Henikoff, S., Skupski, M. P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M. S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S. E., Chervitz, S. A., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, R. F., Gelbart, W. M., George, R. A., Goldstein, L. S., Gong, F., Guan, P., Harris, N. L., Hay, B. A., Hoskins, R. A., Li, J., Li, Z., Hynes, R. O., Jones, S. J., Kuehl, P. M., Lemaitre, B., Littleton, J. T., Morrison, D. K., Mungall, C., O'Farrell, P. H., Pickeral, O. K., Shue, C., Vossell, L. B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X. H., & Lewis, S. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, 287(5461), 2204-2215.
- Saftig, P., & Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(9), 623-635.
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A. E., & Emr, S. D. (2009). Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell*, 136(1), 97-109.
- Sánchez, M. A., Sánchez Catusús, C. A., Pedroso Ibañez, I., Bringas, M. L., & Sánchez, A. P. (2011). Alzheimer's Disease – The New Actors of an Old Drama. In S. De La Monte (Ed.), *Alzheimer's Disease Pathogenesis-Core Concepts, Shifting Paradigms and Therapeutic Targets* (pp. 3-20): InTechWeb.org.
- Sandbrink, R., Masters, C. L., & Beyreuther, K. (1994). Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4-amyloid protein precursor-like proteins. *J Biol Chem*, 269(19), 14227-14234.
- Sannerud, R., & Annaert, W. (2009). Trafficking, a key player in regulated intramembrane proteolysis. *Semin Cell Dev Biol*, 20(2), 183-190.
- Sannerud, R., Declerck, I., Peric, A., Raemaekers, T., Menendez, G., Zhou, L., Veerle, B., Coen, K., Munck, S., De Strooper, B., Schiavo, G., & Annaert, W. (2011). ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(34), E559-568.
- Sapir, A., Assa-Kunik, E., Tsruya, R., Schejter, E., & Shilo, B. Z. (2005). Unidirectional Notch signaling depends on continuous cleavage of Delta. *Development*, 132(1), 123-132.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M. M., Teplow, D. B., & Haass, C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep*, 2(9), 835-841.
- Scacheri, P. C., Rozenblatt-Rosen, O., Caplen, N. J., Wolfsberg, T. G., Umayam, L., Lee, J. C., Hughes, C. M., Shanmugam, K. S., Bhattacharjee, A., Meyerson, M., & Collins, F. S. (2004). Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7), 1892-1897.

- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., & Seubert, P. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, *400*(6740), 173-177.
- Schobel, S., Neumann, S., Hertweck, M., Dislich, B., Kuhn, P. H., Kremmer, E., Seed, B., Baumeister, R., Haass, C., & Lichtenthaler, S. F. (2008). A novel sorting nexin modulates endocytic trafficking and alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, *283*(21), 14257-14268.
- Schobel, S., Neumann, S., Seed, B., & Lichtenthaler, S. F. (2006). Expression cloning screen for modifiers of amyloid precursor protein shedding. *Int J Dev Neurosci*, *24*(2-3), 141-148.
- Schochet, S. S., Jr., Lampert, P. W., & McCormick, W. F. (1973). Neurofibrillary tangles in patients with Down's syndrome: a light and electron microscopic study. *Acta Neuropathol*, *23*(4), 342-346.
- Schweizer, A., Fransen, J. A., Bachi, T., Ginsel, L., & Hauri, H. P. (1988). Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kD protein associated with a tubulo-vesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus. *J Cell Biol*, *107*(5), 1643-1653.
- Selkoe, D. J. (1994). Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Biol*, *10*, 373-403.
- Selkoe, D. J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*, *399*(6738 Suppl), A23-31.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, *81*(2), 741-766.
- Selkoe, D. J., & Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci*, *26*, 565-597.
- Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D. N., & Fesik, S. W. (2003). Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(11), 6347-6352.
- Sessions, O. M., Barrows, N. J., Souza-Neto, J. A., Robinson, T. J., Hershey, C. L., Rodgers, M. A., Ramirez, J. L., Dimopoulos, G., Yang, P. L., Pearson, J. L., & Garcia-Blanco, M. A. (2009). Discovery of insect and human dengue virus host factors. *Nature*, *458*(7241), 1047-1050.
- Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M. G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D. L., Bryant, K., Fritz, L. C., Galasko, D., Thal, L. J., & et al. (1993). Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature*, *361*(6409), 260-263.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J. F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R. J., Wasco, W., Da Silva, H. A., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Tanzi, R. E., Roses, A. D., Fraser, P. E., Rommens, J. M., & St George-Hyslop, P. H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, *375*(6534), 754-760.
- Shimizu, H., Tosaki, A., Kaneko, K., Hisano, T., Sakurai, T., & Nukina, N. (2008). Crystal structure of an active form of BACE1, an enzyme responsible for amyloid beta protein production. *Mol Cell Biol*, *28*(11), 3663-3671.
- Sigoillot, F. D., & King, R. W. (2011). Vigilance and validation: Keys to success in RNAi screening. *ACS Chem Biol*, *6*(1), 47-60.
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L., & John, V. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*, *402*(6761), 537-540.
- Sisodia, S. S. (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(13), 6075-6079.
- Sisodia, S. S., Koo, E. H., Beyreuther, K., Unterbeck, A., & Price, D. L. (1990). Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science*, *248*(4954),



- 492-495.
- Slack, B. E., Ma, L. K., & Seah, C. C. (2001). Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *Biochem J*, 357(Pt 3), 787-794.
- Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H., & Williams, B. R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, 5(9), 834-839.
- Small, S. A., & Gandy, S. (2006). Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis. *Neuron*, 52(1), 15-31.
- Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., Masters, C. L., Muller, U., Kins, S., & Beyreuther, K. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J*, 24(20), 3624-3634.
- Spoelgen, R., von Arnim, C. A., Thomas, A. V., Peltan, I. D., Koker, M., Deng, A., Irizarry, M. C., Andersen, O. M., Willnow, T. E., & 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(2), 418-428.
- Sprecher, C. A., Grant, F. J., Grimm, G., O'Hara, P. J., Norris, F., Norris, K., & Foster, D. C. (1993). Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry*, 32(17), 4481-4486.
- Stachel, S. J., Coburn, C. A., Steele, T. G., Jones, K. G., Loutzenhiser, E. F., Gregro, A. R., Rajapakse, H. A., Lai, M. T., Crouthamel, M. C., Xu, M., Tugusheva, K., Lineberger, J. E., Pietrak, B. L., Espeseth, A. S., Shi, X. P., Chen-Dodson, E., Holloway, M. K., Munshi, S., Simon, A. J., Kuo, L., & Vacca, J. P. (2004). Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of human beta-secretase (BACE-1). *J Med Chem*, 47(26), 6447-6450.
- Stein, T. D., Anders, N. J., DeCarli, C., Chan, S. L., Mattson, M. P., & 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(35), 7707-7717.
- Steiner, H., & Haass, C. (2000). Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(3), 217-224.
- Sugiura, H., Iwata, K., Matsuoka, M., Hayashi, H., Takemiya, T., Yasuda, S., Ichikawa, M., Yamauchi, T., Mehlen, P., Haga, T., & Yamagata, K. (2004). Inhibitory role of endophilin 3 in receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem*, 279(22), 23343-23348.
- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., & Iwatsubo, T. (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature*, 422(6930), 438-441.
- Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Watkins, P. C., Bruns, G. A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M. L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D. M., & Neve, R. L. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*, 235(4791), 880-884.
- Teis, D., Saksena, S., & Emr, S. D. (2008). Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell*, 15(4), 578-589.
- Terry, R. D., Gonatas, N. K., & Weiss, M. (1964). Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. *Am J Pathol*, 44, 269-297.
- Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*, 283(44), 29615-29619.
- Thornton, E., Vink, R., Blumbergs, P. C., & Van Den Heuvel, C. (2006). Soluble amyloid precursor protein alpha reduces neuronal injury and improves functional outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain Res*, 1094(1), 38-46.
- Thorsett, E. D., & Latimer, L. H. (2000). Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol*, 4(4), 377-382.
- Tippmann, F., Hundt, J., Schneider, A., Endres, K., & Fahrenholz, F. (2009). Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J*, 23(6), 1643-1654.

- Tomari, Y., & Zamore, P. D. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev*, *19*(5), 517-529.
- Tu, L., & Banfield, D. K. (2010). Localization of Golgi-resident glycosyltransferases. *Cell Mol Life Sci*, *67*(1), 29-41.
- Ungar, D., Oka, T., Krieger, M., & Hughson, F. M. (2006). Retrograde transport on the COG railway. *Trends Cell Biol*, *16*(2), 113-120.
- Vassar, R. (2001). The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*, *17*(2), 157-170.
- Vassar, R. (2002). Beta-secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev*, *54*(12), 1589-1602.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., & Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, *286*(5440), 735-741.
- Vassar, R., & Citron, M. (2000). Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research. *Neuron*, *27*(3), 419-422.
- Verstreken, P., Kjaerulff, O., Lloyd, T. E., Atkinson, R., Zhou, Y., Meinertzhagen, I. A., & Bellen, H. J. (2002). Endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release. *Cell*, *109*(1), 101-112.
- Vetrivel, K. S., & Thinakaran, G. (2006). Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology*, *66* (2 Suppl 1), S69-73.
- von Einem, B., Schwanzar, D., Rehn, F., Beyer, A. S., Weber, P., Wagner, M., Schneckenburger, H., & von Arnim, C. A. (2010). The role of low-density receptor-related protein 1 (LRP1) as a competitive substrate of the amyloid precursor protein (APP) for BACE1. *Exp Neurol*, *225*(1), 85-93.
- Voorhoeve, P. M., & Agami, R. (2003). Knockdown stands up. *Trends Biotechnol*, *21*(1), 2-4.
- Waldron, E., Heilig, C., Schweitzer, A., Nadella, N., Jaeger, S., Martin, A. M., Weggen, S., Brix, K., & Pietrzik, C. U. (2008). LRP1 modulates APP trafficking along early compartments of the secretory pathway. *Neurobiol Dis*, *31*(2), 188-197.
- 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., & Zheng, H. (2005). Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci*, *25*(5), 1219-1225.
- Wang, W. X., Rajeev, B. W., Stromberg, A. J., Ren, N., Tang, G., Huang, Q., Rigoutsos, I., & Nelson, P. T. (2008). The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J Neurosci*, *28*(5), 1213-1223.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E., & 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*(22), 10758-10762.
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M. D., Romano, D. M., Sisodia, S. S., Hyman, B. T., Neve, R. L., & Tanzi, R. E. (1993). Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet*, *5*(1), 95-100.
- Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., & Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*, *57*(1), 115-126.
- Wertkin, A. M., Turner, R. S., Pleasure, S. J., Golde, T. E., Younkin, S. G., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (1993). Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(20), 9513-9517.
- Weyer, S. W., Klevanski, M., Delekat, A., Voikar, V., Aydin, D., Hick, M., Filippov, M., Drost, N., Schaller, K. L., Saar, M., Vogt, M. A., Gass, P., Samanta, A., Jaschke, A., Korte, M., Wolfer, D. P., Caldwell, J. H., & Muller, U. C. (2011). APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP. *EMBO J*, *30*(11), 2266-2280.

- Whitmarsh, A. J. (2006). The JIP family of MAPK scaffold proteins. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 5), 828-832.
- Wilson, C., & Ragnini-Wilson, A. (2010). Conserved molecular mechanisms underlying homeostasis of the Golgi complex. *Int J Cell Biol*, 2010, 758230.
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., & Hurley, J. H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature*, 458(7235), 172-177.
- Woodman, P. (2009). ESCRT proteins, endosome organization and mitogenic receptor down-regulation. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 1), 146-150.
- Xu, Y., Martin, S., James, D. E., & Hong, W. (2002). GS15 forms a SNARE complex with syntaxin 5, GS28, and Ykt6 and is implicated in traffic in the early cisternae of the Golgi apparatus. *Mol Biol Cell*, 13(10), 3493-3507.
- Xu, Y., Wong, S. H., Zhang, T., Subramaniam, V. N., & Hong, W. (1997). GS15, a 15-kilodalton Golgi soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) homologous to rbet1. *J Biol Chem*, 272(32), 20162-20166.
- 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., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L., & Gurney, M. E. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*, 402(6761), 533-537.
- Yoshimori, T., Yamagata, F., Yamamoto, A., Mizushima, N., Kabeya, Y., Nara, A., Miwako, I., Ohashi, M., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (2000). The mouse SKD1, a homologue of yeast Vps4p, is required for normal endosomal trafficking and morphology in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 11(2), 747-763.
- Zeevaert, R., Foulquier, F., Jaeken, J., & Matthijs, G. (2008). Deficiencies in subunits of the Conserved Oligomeric Golgi (COG) complex define a novel group of Congenital Disorders of Glycosylation. *Mol Genet Metab*, 93(1), 15-21.
- Zhi, P., Chia, C., & Gleeson, P. A. (2011). Intracellular trafficking of the beta-secretase and processing of amyloid precursor protein. *IUBMB Life*.
- Zhou, H., Xu, M., Huang, Q., Gates, A. T., Zhang, X. D., Castle, J. C., Stec, E., Ferrer, M., Strulovici, B., Hazuda, D. J., & Espeseth, A. S. (2008). Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe*, 4(5), 495-504.

## 10 Danksagung

Ganz herzlich danke ich PD Dr. Stefan Lichtenthaler für die hervorragende Betreuung dieser Doktorarbeit, für seine Zeit, die vielen interessanten und wertvollen Diskussionen und sein Vertrauen in meine wissenschaftlichen Fähigkeiten.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christian Haass und Prof. Dr. Harald Steiner für die Unterstützung des „Screening“-Projekts, die zahlreichen Diskussionen und die wertvollen Anregungen für die bestmögliche Gestaltung des Projekts.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Richard Page für seine großartige Unterstützung bei der Durchführung des genomweiten RNAi-„Screenings“, seine Geduld und seine Antworten auf meine vielen Fragen.

Auch bei Prof. Dr. Michael Boutros und seinen Mitarbeitern bedanke ich mich für die Kollaboration und die Unterstützung, das genomweite RNAi-„Screening“ zu etablieren und durchzuführen.

Meinen lieben Kollegen aus der AG Lichtenthaler danke ich herzlich für die tolle Atmosphäre im Labor, für die Unterstützung und die Ermutigung im Laboralltag. Besonders die spontanen und langen Diskussionen, der Austausch von Erfahrungen und die vielen neuen Ideen haben mir immer bei meinen Projekten geholfen.

Ebenso bedanke ich mich bei den Mitgliedern des gesamten Haass-Labors für die gute Stimmung im Labor, für die Hilfsbereitschaft und die inspirierenden Diskussionen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, Hannes und meinen Freunden, die mich mit großem Interesse begleitet und voller Herzlichkeit unterstützt haben.

## 12 Publikation

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit resultierten in folgender Publikation:

Ullrich, S.\*, **Münc**h, A.\*, Neumann, S., Kremmer, E., Tatzelt, J., & Lichtenthaler, S. F. (2010). The novel membrane protein TMEM59 modulates complex glycosylation, cell surface expression, and secretion of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 285(27), 20664-20674. \* Geteilte Erstautorenschaft

# The Novel Membrane Protein TMEM59 Modulates Complex Glycosylation, Cell Surface Expression, and Secretion of the Amyloid Precursor Protein\*

Received for publication, August 26, 2009, and in revised form, April 27, 2010. Published, JBC Papers in Press, April 28, 2010, DOI 10.1074/jbc.M109.055608

Sylvia Ullrich<sup>†1</sup>, Anna Münch<sup>†1</sup>, Stephanie Neumann<sup>‡</sup>, Elisabeth Kremmer<sup>§</sup>, Jörg Tatzelt<sup>‡</sup>, and Stefan F. Lichtenthaler<sup>‡2</sup>

From the <sup>†</sup>German Center for Neurodegenerative Diseases Munich (DZNE) and Adolf Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians University Munich, 80336 Munich and the <sup>§</sup>Helmholtz Zentrum München German Research Center for Environmental Health, Institute of Molecular Immunology, 81377 Munich, Germany

Ectodomain shedding of the amyloid precursor protein (APP) by the two proteases  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase is a key regulatory event in the generation of the Alzheimer disease amyloid  $\beta$  peptide ( $A\beta$ ). At present, little is known about the cellular mechanisms that control APP shedding and  $A\beta$  generation. Here, we identified a novel protein, transmembrane protein 59 (TMEM59), as a new modulator of APP shedding. TMEM59 was found to be a ubiquitously expressed, Golgi-localized protein. TMEM59 transfection inhibited complex *N*- and *O*-glycosylation of APP in cultured cells. Additionally, TMEM59 induced APP retention in the Golgi and inhibited  $A\beta$  generation as well as APP cleavage by  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleavage, which occur at the plasma membrane and in the endosomes, respectively. Moreover, TMEM59 inhibited the complex *N*-glycosylation of the prion protein, suggesting a more general modulation of Golgi glycosylation reactions. Importantly, TMEM59 did not affect the secretion of soluble proteins or the  $\alpha$ -secretase like shedding of tumor necrosis factor  $\alpha$ , demonstrating that TMEM59 did not disturb the general Golgi function. The phenotype of TMEM59 transfection on APP glycosylation and shedding was similar to the one observed in cells lacking conserved oligomeric Golgi (COG) proteins COG1 and COG2. Both proteins are required for normal localization and activity of Golgi glycosylation enzymes. In summary, this study shows that TMEM59 expression modulates complex *N*- and *O*-glycosylation and suggests that TMEM59 affects APP shedding by reducing access of APP to the cellular compartments, where it is normally cleaved by  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase.

Processing of the amyloid precursor protein (APP)<sup>3</sup> by two different proteases, called  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase, is a central regu-

latory event in the generation of the amyloid  $\beta$  peptide ( $A\beta$ ), which has a key role in Alzheimer disease (AD) pathogenesis (1). Both  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleave the type I membrane protein APP within its ectodomain close to its transmembrane domain (2). This leads to the secretion of soluble forms of APP (APPs) and is referred to as APP shedding. The  $\beta$ -secretase is the aspartyl protease BACE1 and cleaves APP at the N terminus of the  $A\beta$  peptide domain, thus catalyzing the first step in  $A\beta$  peptide generation (3, 4). After the initial cleavage of APP by BACE1, the remaining C-terminal APP fragment is cleaved by  $\gamma$ -secretase within its transmembrane domain at the C terminus of the  $A\beta$  domain, leading to the secretion of the  $A\beta$ -peptide (5). In contrast to  $\beta$ -secretase,  $\alpha$ -secretase cleaves within the  $A\beta$ -sequence of APP, and thereby precludes  $A\beta$  peptide generation. Additionally,  $\alpha$ - but not  $\beta$ -secretase cleavage generates a secreted form of APP (APPs $\alpha$ ), which has neurotrophic and neuroprotective properties (6–8). The  $\alpha$ -secretase is a member of the ADAM family (A disintegrin and metalloprotease) of proteases (9–12). At present little is known about how the cell controls access of APP to its secretases and the amount of  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleavage (reviewed in Refs. 13 and 14). Recent studies increasingly imply intracellular APP trafficking as a mechanism to regulate access of APP to its secretases and thus, the amount of APP processing (15). For example, the neuronal sorting receptor SorL1 (sorLA, LR11) influences how much APP is present in the endosomes and is available for cleavage by  $\beta$ -secretase (16, 17). Likewise, changes in endocytic trafficking control APP  $\alpha$ - versus  $\beta$ -secretase cleavage and are associated with early neuropathological changes observed in AD brains (18). Additionally, previous reports indicated that changes in Golgi glycosylation may affect APP trafficking and  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleavage, but the underlying molecular mechanisms remain unclear. For example, increased sialylation of APP increases  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase cleavage, whereas inhibition of the Golgi-localized mannosidase II reduces APP shedding (19, 20). APP has two *N*-glycosylation sites at amino acids Asn<sup>467</sup> and Asn<sup>496</sup> (with regard to the 695-amino acid long APP isoform). Depending on the cell line only one or both of them may be used (21, 22). *N*-Glycosylation begins in the endoplas-

\* This work was supported by grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB596 Projects B12 (to S. F. L.), B4 (to J. T.), and Z2 (to E. K.), the competence network degenerative dementias (Bundesministerium für Bildung und Forschung) (to S. F. L.), the European Commission (NeuroNE), and the Friedrich-Baur-Stiftung (to S. F. L.).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 49-89-218075453; Fax: 49-89-218075415; E-mail: Stefan.Lichtenthaler@med.uni-muenchen.de.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: APP, amyloid precursor protein; AD, Alzheimer disease; ADAM, a disintegrin and metalloprotease; APPs, soluble form of APP; COG, conserved oligomeric golgi; HEK, human embryonic kidney; YFP, yellow fluorescent protein; TGN, *trans*-Golgi network; SEAP, soluble enzyme secretory alkaline phosphatase; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; HA, hemagglutinin; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione *S*-trans-

ferase; CHO, Chinese hamster ovary; siRNA, small interfering RNA; Tricine, *N*-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine; PrP, prion protein; TMEM59, transmembrane protein 59; wt, wild-type.

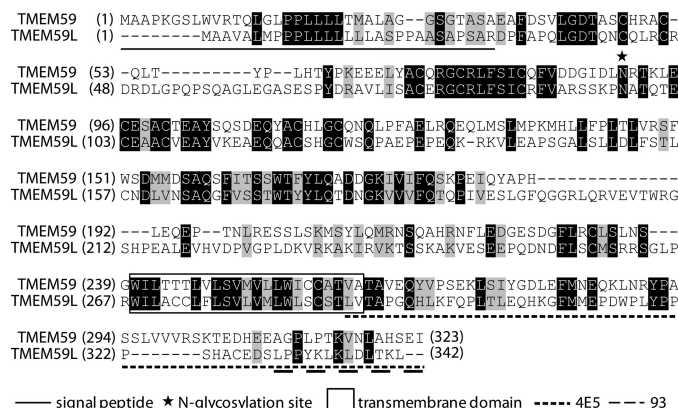
mic reticulum, where a core of sugars of the high-mannose type is co-translationally added to APP and then gradually trimmed. As APP transits the Golgi, further post-translational modifications occur (23, 24). The *N*-glycans are processed to complex glycans containing galactose and sialic acid. The generation of complex glycans can be monitored by their sensitivity to endoglycosidase H, which only removes high-mannose sugars, but not sugars of the complex type. APP also undergoes *O*-glycosylation in the Golgi, leading to a marked increase in its molecular mass. As additional post-translational modification, APP may be phosphorylated and sulfated.

In general, *O*-glycosylation and complex *N*-glycosylation, which occur in the Golgi, are multistep processes, which involve a number of different enzymes. New proteins controlling the correct cellular localization and the activity of glycosylation enzymes continue to be identified. Among them are the subunits of the conserved oligomeric Golgi (COG) complex, which is a hetero-oligomeric complex localized to the cytoplasmic face of the Golgi (25, 26). The eight subunits of the COG complex are soluble proteins named COG1 through COG8. The COG complex is assumed to act as a retrograde vesicle tethering factor in intra-Golgi trafficking and is particularly required for the correct localization and activity of Golgi glycosylation enzymes. Mutations or deletions of COG proteins lead to multiple defects in glycoprotein processing and are linked to human disorders, called congenital disorders of glycosylation (27). It is not yet known whether COG proteins influence APP processing.

Here, we report that expression of the novel type I transmembrane protein 59 (TMEM59) inhibits the Golgi glycosylation of APP, reduces APP cell surface levels, and blocks APP cleavage by both  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase. The protein was identified from a human cDNA library, which we screened for modulators of APP shedding (28, 29). TMEM59 has a distant homolog called TMEM59L or BSMAP (brain-specific membrane-associated protein), which is expressed in brain, but also in peripheral tissues and in human embryonic kidney 293 cells (30) (sequence alignment shown in Fig. 1). TMEM59 and TMEM59L do not have any known functional domains apart from the signal peptide and the transmembrane domain. Moreover, both proteins have not yet been functionally described. Interestingly, a similar inhibition of APP glycosylation and shedding as for TMEM59 expression was observed in COG1- or COG2-deficient cells, suggesting that TMEM59 affects the Golgi glycosylation machinery, which also requires the COG proteins. These results underline that changes in Golgi glycosylation have a profound effect on APP shedding.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Reagents and Antibodies**—The following antibodies were used: anti-HA HA.11 (Covance) and 12CA5 (Roche), anti-FLAG (Sigma), anti-GFP (Clontech), anti- $\beta$ -actin, (Sigma), anti-calnexin (Stressgene), horseradish peroxidase-coupled goat anti-mouse and anti-rabbit (Promega), Alexa 555/Alexa 488-coupled secondary anti-mouse (Molecular Probes), Alexa 555-coupled secondary anti-rat antibody (Molecular Probes), Alexa 488-coupled anti-rabbit secondary antibody (Molecular Probes), anti-giantin (Alexis) (31), 6E10 (against  $A\beta_{1-17}$ ,



**FIGURE 1. Sequence alignment of TMEM59 and its homolog TMEM59L.** Alignment of the protein sequences of human TMEM59 (323 amino acids) and its human homolog TMEM59L (342 amino acids, 32% identity between TMEM59 and TMEM59L). Both proteins are type I transmembrane proteins. The signal peptide is *underlined*, the transmembrane domain is marked by a *box*, the putative *N*-glycosylation site is marked with an *asterisk*, and the antibody epitopes are *underlined* (*dashed*). Identical amino acids are on a *dark background*, similar amino acids are on a *light gray background*. Between humans and mice, the amino acid sequence of TMEM59 is highly conserved (93.8% identity, 97.2% similarity to mouse). Apart from the transmembrane domain, no other known functional domains are found in TMEM59. TMEM59 is mostly found in vertebrates, but orthologs are also found in some insects (28.5% identity, 44% similarity to *Ixodes scapularis*), but not in other invertebrates, such as *Caenorhabditis elegans* or *Drosophila melanogaster*.

Senetek Inc.), 6687 (against APP C terminus) (32), 22C11 (against APP ectodomain, provided by Konrad Beyreuther), 192wt (specific for the C terminus of APPs $\beta$ , provided by Dale Schenk), W02 (against amino acids 5–8 of A $\beta$ , provided by Konrad Beyreuther) (33), 3552 (against A $\beta_{1-40}$ ) (34), EE-17 (against N terminus of BACE1, Sigma), Nicastrin (N1660, Sigma), and the antibodies GM130, GS15, GS27, GS28, p230, Syntaxin 6, Vti1a, and Vti1b of the Golgi Sampler Kit, as well as the antibody against TGN38 (both BD Transduction Laboratories). Polyclonal TMEM59-antiserum 93 was generated against a synthetic peptide (H<sub>2</sub>N-309–323-CONH<sub>2</sub>) from the C terminus of TMEM59 (Eurogentec Seraing, Belgium), 3F4 (anti-mouse PrP) (35). Rat monoclonal antibody 4E5 (IgG2b), binding to the C terminus of TMEM59 was generated by immunization with a GST fusion protein of amino acids 261–323 of TMEM59 (GST-TMEM59-CT). GST-TMEM59-CT was expressed in *Escherichia coli* BL21 cells and purified according to the manufacturer's protocol (Amersham Biosciences). Control rat antibody 4G8 (IgG2b) was generated against the mouse Fcy-receptor. Rat monoclonal antibody BAWT (IgG2a), specific for APPs $\beta$ , was generated against the peptide ISEVKM derived from the APP  $\beta$ -secretase cleavage site.

**Plasmid Construction**—TMEM59 in the peak8-vector was obtained from a human brain cDNA library (Edgebio). The TMEM59 nucleotide sequence corresponds to accession number AF047439. Plasmids p12/APP695 and peak12/BACE1 have been described (36–38). Soluble APPs $\beta$  was cloned into peak12-vector (ending with amino acids KM at the  $\beta$ -secretase cleavage site). cDNAs of TMEM59 (without UTRs, with C-terminal fusions to GFP and HA tag or N-terminal fusions to HA tag), TMEM59L (C-terminal fusion to HA tag), and HA-TMEM59-KKXX with an endoplasmic reticulum-reten-



## TMEM59 Modulates APP Shedding

tion signal added to the C terminus of TMEM59 (...SEIKKTN) were cloned into peak12-vector. GST-TMEM59-CT was cloned in pGEX5.1. Peak12/FLAG-TNF $\alpha$ -HA, peak12/HA-SEAP, peak12/GFP (transfection control), and peak12/luciferase (negative control) have been described (29, 36, 39, 40). The pcDNA3.1/wtPrP construct was cloned as described (41). The pShuttle/CMV-YFP-APP was obtained from Kai Simons (42). The pCAG-IRES2-golgiVENUS was obtained from Timm Schroeder (43).

**Cell Culture, Transfection, and Western Blot**—Human embryonic kidney 293 EBNA (HEK293) cells, COS cells, H4 cells, and U373 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Cambrex) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone), 50 units/ml of penicillin and 50  $\mu$ g/ml of streptomycin (Invitrogen) (44). Chinese hamster ovary (CHO) wt, ldlB, ldlC knockout, and [ldlB] rescue CHO cells were obtained from Monty Krieger and cultured as above. Transfections were done using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). One day after transfection the medium was changed. After an additional overnight incubation cell lysates (in 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Nonidet P-40) were prepared and medium was collected and analyzed. To detect secreted and cellular APP or other cellular proteins, the protein concentration in the cell lysate was measured, and corresponding aliquots of lysate or medium were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blot.

**Knockdown of TMEM59**—TMEM59 and TMEM59L double knockdown was achieved using siRNAs (Dharmacon): siRNA-pool against TMEM59 and a combination of the single siRNAs number 1 and 3 against TMEM59L. A non-targeting siRNA-pool (composed of non-targeting siRNA numbers 3 and 4) was used to assess unspecific effects of siRNA delivery. HEK293 cells were transfected with 5 nM siRNAs using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). Fresh medium was added after 24 h, completely changed 48 h post-transfection, and cells were analyzed 72 h after transfection. Knockdown of TMEM59 protein was visualized by immunofluorescence using antibody 93. Knockdown efficiency was determined using quantitative real-time PCR, because the antibodies generated against TMEM59 were not sensitive enough to detect endogenous TMEM59 in the Western blot. Total RNA was isolated (using the RNeasy mini kit from Qiagen), checked for quality by agarose gel electrophoresis, and reverse transcribed into cDNA (using the high capacity cDNA reverse transcription kit from Applied Biosystems.) real-time PCR was performed with a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using the TaqMan Universal PCR Master Mix (ROX) and TMEM59- and TMEM59L-specific probes as well as the corresponding primers (Applied Biosystems). The mRNA level was normalized against the amount of actin gene transcript.

**Immunoprecipitations**—For HA-soluble enzyme secretory alkaline phosphatase (SEAP) immunoprecipitation, cell lysates were incubated with antibody (anti-HA, 12CA5, Roche) overnight (4 °C) using protein G-Sepharose (Amersham Biosciences). After washing with STEN-NaCl (STEN buffer + 0.35 M NaCl) and twice with STEN (0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 2 mM EDTA, and 0.2% Nonidet P-40), bound proteins were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot. For

A $\beta$  detection in the conditioned medium immunoprecipitation with antibody 3552 was performed prior to SDS-PAGE. Precipitates were transferred to nitrocellulose membranes. A $\beta$  was analyzed with antibody 6E10 using a Tris-Tricine gel according to Ref. 45. For APPs $\beta$  detection in the conditioned medium, immunoprecipitation with antibody BAWT was performed prior to Western blot using 192wt. Interaction between TMEM59 and APP was tested by coimmunoprecipitation. HEK293 cells were transfected with HA-TMEM59 and lysed as described above. Lysates were incubated with HA tag antibody overnight (4 °C) using protein G-Sepharose (Amersham Biosciences). After three washing steps (as above), bound proteins were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot using antibody 6687 against the APP C terminus.

**Northern Blot Analysis**—Multiple tissue Northern blot analysis was performed according to the supplier's protocol (Clontech, BD Biosciences). Briefly, a [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham Biosciences)-labeled TMEM59 or actin probe (Random Primer DNA Labeling System, Invitrogen) was added to a human multiple tissue Northern blot (BD Biosciences). Hybridization was performed overnight at 65 °C. Excess probe was removed by washing with 2 $\times$  SSC, 0.1% SDS at room temperature followed by washing with 0.1 $\times$  SSC, 0.1% SDS at 65 °C. The blot was exposed to Super RX film (Fuji).

**Immunocytochemistry**—COS cells plated on coated coverslips were left untreated or were transfected with GFP-tagged TMEM59, respectively. After 24 h the cells were washed in ice-cold phosphate-buffered saline supplemented with 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, transferred to 4% paraformaldehyde, 4% sucrose in phosphate-buffered saline, and fixed for 20 min and stained with 1:200 diluted anti-TMEM59 93 antibody/peptide blocked antibody or undiluted anti-TMEM59 4E5-antibody/IgG2b antibody and 1:200 diluted giantin antibody. As secondary antibodies, 1:500 diluted Alexa 555-/Alexa 488-coupled secondary anti-mouse, Alexa 555-coupled secondary anti-rat antibody, and Alexa 555-/Alexa 488-coupled anti-rabbit secondary antibody were used. Cells were analyzed using a Zeiss 510Meta confocal system equipped with a 40/1.3 objective.

**Live Cell Imaging**—HEK293 cells plated in poly-L-lysine-coated 15- $\mu$ m slide 8-well plates (Ibidi) were cotransfected with yellow fluorescent protein (YFP)-APP and either control plasmid or HA-TMEM59. HEK293 cells transfected with pCAG-IRES2-golgiVENUS were also incubated in this format. After 24 h the cells were analyzed using a Zeiss 510Meta confocal system equipped with a 100/1.3 objective.

**N-Linked Glycosylation Analysis**—HEK293 cells were transfected with TMEM59-HA. In additional experiments BACE1 was cotransfected with either control plasmid or TMEM59. Cell lysates were divided into four aliquots and treated with or without 1 unit of N-glycosidase F or with and without 1 milli-unit of endoglycosidase H for 17 h at 37 °C in the presence of the buffers recommended by the supplier (Roche). Samples were loaded onto a SDS-PAGE and analyzed by Western blot using the APP-antibody 22C11, anti-HA HA.11, or anti-BACE1 EE-17.

**ADAM and BACE Fluorimetric Assays**—ADAM activity was measured in intact cells as described previously (46, 47). HEK293 cells were transfected with either control plasmid or



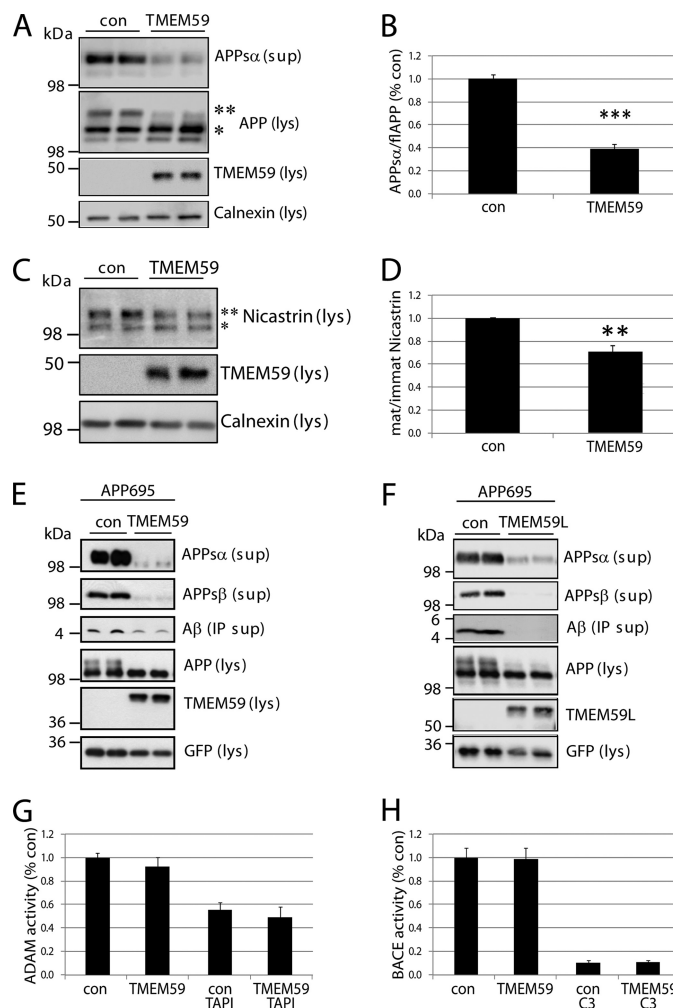
TMEM59. The metalloprotease inhibitor TAPI-1 (50  $\mu\text{M}$ ; Peptides International) and the fluorogenic substrate (10  $\mu\text{M}$ ; Mca-PLAQAV(Dpa)RSSSR-NH<sub>2</sub>; R & D Systems) were used. ADAM activity was measured as fluorescence and recorded every 30 min. At the end of the incubation the obtained fluorescence signals were normalized to protein content and samples were checked for TMEM59 effects on APP shedding and maturation (data not shown).

To investigate BACE activity in TMEM59 expressing cells a fluorimetric assay (48, 49) was used. HEK293 cells were co-transfected with BACE1 and either control plasmid or TMEM59. Samples were prepared by harvesting membranes (50), solving them in STET buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 2 mM EDTA, and 1% Triton X-100), and diluting to 3.3 mg/ml of protein in 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.5. Hydrolysis of a fluorogenic BACE substrate (10  $\mu\text{M}$ ; Mca-SEVNLDAEFRK(Dnp)RR-NH<sub>2</sub>; R & D Systems) was recorded in the absence or presence of BACE inhibitor C3 (1  $\mu\text{M}$ ; Calbiochem) in 100  $\mu\text{l}$  of the described samples. Additionally samples were checked for TMEM59 effects on APP shedding and maturation (data not shown).

## RESULTS

**TMEM59 Modulates Maturation and Shedding of APP**—To analyze the effect of TMEM59 on APP processing, TMEM59 was transiently transfected into HEK293 cells expressing endogenous APP. Compared with control cells TMEM59 expression reduced the level of  $\alpha$ -secretase cleaved, secreted APP (APPs $\alpha$ ) in the conditioned medium by about 60% (Fig. 2A and for quantification, see B). In the cell lysate of control cells APP was present in lower (~100 kDa) and higher (~115 kDa) molecular mass forms (Fig. 2A). The lower molecular mass form corresponds to immature APP, which has obtained the core N-glycosylation in the endoplasmic reticulum (high-mannose form) but does not carry complex sugars and is not yet O-glycosylated. The higher molecular mass form (Fig. 2A) corresponds to mature APP, which is O-glycosylated and carries complex N-linked sugars (24). Both modifications are added as APP transits the Golgi complex. Surprisingly, in the TMEM59 expressing cells the mature form of APP was strongly diminished and showed a reduced apparent molecular mass. The immature form of APP carrying the core N-glycosylation was slightly increased (Fig. 2A), suggesting a reduction of complex APP glycosylation. Additionally, we observed that TMEM59 mildly affected the complex glycosylated form of the  $\gamma$ -secretase subunit nicastrin (Fig. 2C), but this effect was less pronounced than for APP (Fig. 2, B and D).

Because the amount of A $\beta$  derived from endogenous APP is below the detection limit of the commonly used antibodies, we next coexpressed APP with either control vector or TMEM59 in HEK293 cells. Similar to endogenous APP, TMEM59 strongly inhibited APPs $\alpha$  secretion and APP maturation (Fig. 2E). The  $\beta$ -secretase cleaved, soluble APP (APPs $\beta$ ) was reduced to a similar extent as APPs $\alpha$ . Consistent with the reduction in APPs $\beta$  levels, expression of TMEM59 reduced A $\beta$  generation (Fig. 2E). The low amounts of APPs $\alpha$  and APPs $\beta$  that were still secreted upon TMEM59 expression showed a slightly enhanced electrophoretic mobility. This may be due to a



**FIGURE 2. TMEM59 effect on APP shedding and APP maturation.** A, control plasmid (*con*) or TMEM59 were transfected into HEK293 cells. The lysate (*lys*) was blotted against cellular APP (22C11, \*\*, mature and \*, immature form of the APP751 splice variant; the band below the asterisk corresponds to the immature form of the shorter APP695 variant) and TMEM59 (HA.11), the supernatant (*sup*) was blotted against secreted APPs $\alpha$  (W02). B, TMEM59 expression reduced the amount of secreted APP (APPs $\alpha$ ) by about 60% compared with control cells. Quantification of blots shown in A. Given are mean  $\pm$  S.E. of 4 independent experiments. \*\*\*,  $p < 0.001$ , determined with *t* test. C, control plasmid (*con*) or TMEM59 were transfected into HEK293 cells. The lysate (*lys*) was blotted against nicastrin (N1660, \*\*, mature and \*, immature form of nicastrin) and TMEM59 (HA.11). D, TMEM59 expression reduced the amount of mature nicastrin by about 30% compared with control cells. Total amounts of nicastrin were not changed. Quantification of blots shown in C. Given are mean  $\pm$  S.E. of 8 independent experiments. \*\*,  $p < 0.01$ , determined with *t* test. E, APP695 and either control plasmid (*con*) or HA-TMEM59 with GFP as transfection control were transfected into HEK293 cells. The lysate was blotted against cellular APP (22C11), TMEM59 (HA.11), and GFP, the supernatant was blotted against secreted APPs $\alpha$  (W02), APPs $\beta$  (192wt), and A $\beta$  (6E10, after immunoprecipitation). F, HEK293 cells were transfected with APP695 and either control plasmid (*con*) or TMEM59L-HA. The experiment was carried out as described in E. G, control plasmid (*con*) or TMEM59 were transfected into HEK293 cells. ADAM activity was measured in intact cells for 6 h in the presence or absence of TAPI-1 (50  $\mu\text{M}$ ). Shown is the relative ADAM activity in % of control cells. Given are mean  $\pm$  S.E. of 5 (*con*/TMEM59) or 3 (*con* TAPI-1/TMEM59 TAPI-1) independent experiments. H, BACE1 and either control plasmid (*con*) or TMEM59 were transfected into HEK293 cells. BACE activity was recorded for 90 min in membranes in the presence or absence of BACE inhibitor C3 (1  $\mu\text{M}$ ). Shown is the relative BACE activity in % of control cells. Given are mean  $\pm$  S.E. of 6 (*con*/TMEM59) or 3 (*con* C3/TMEM59 C3) independent experiments.

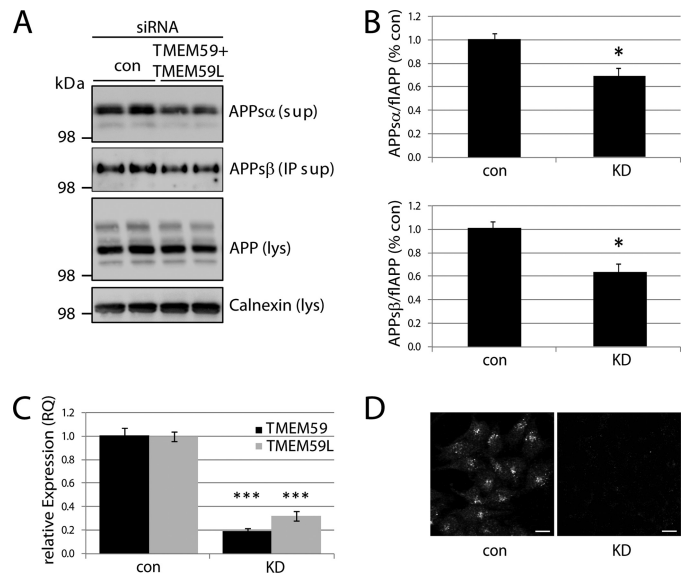
reduced complex glycosylation similar to the observed reduction of the complex glycosylated, mature APP in the cell lysate. The apparent molecular mass of the immature APP (only core

## TMEM59 Modulates APP Shedding

*N*-glycosylation) was not altered, demonstrating that TMEM59 did not affect the core *N*-glycosylation of APP (compare also Fig. 7A), but specifically blocked the *O*-glycosylation and the complex *N*-glycosylation of APP. Similar results on APP maturation and shedding as in HEK293 cells were observed in COS7 (data not shown) and CHO cells (see Fig. 8). The TMEM59 homolog TMEM59L had a similar inhibitory effect on APP maturation and shedding as TMEM59 (Fig. 2F), revealing that both proteins have similar functions, at least with regard to APP. An N-terminal or C-terminal HA-epitope tag or fusion to GFP did not alter the effect of TMEM59 on APP glycosylation or shedding (data not shown).

TMEM59 expression did not affect the activity of  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase, as measured by established assays using fluorogenic substrates (46, 48) (Fig. 2, G and H). As a control for the specificity of the assay, cleavage of the fluorogenic  $\alpha$ -secretase substrate could be inhibited to about 50% by the metalloprotease inhibitor TAPI-1 (Fig. 2G), in agreement with a previous study (46). Likewise, cleavage of the fluorogenic  $\beta$ -secretase substrate could be inhibited by about 90% using the specific BACE1 inhibitor C3 (51) (Fig. 2H). This experiment demonstrates that the TMEM59-induced reduction of APPs $\alpha$  and APPs $\beta$  levels is not due to a reduction of secretase activities, but may be caused by altered APP glycosylation and trafficking (see below).

Next, we analyzed how knockdown of TMEM59 affects APP maturation and shedding. HEK293 cells were transiently transfected with control siRNAs or siRNAs against TMEM59 or TMEM59L or against both. The single knockdown of TMEM59 or TMEM59L did not significantly affect APP shedding or maturation (data not shown). This may be due to the fact that even in the absence of one or both proteins, the other homolog is still present, because both proteins are expressed in HEK293 cells (30). In fact, the combined knockdown of TMEM59 and TMEM59L reduced shedding of the endogenous APPs $\alpha$  and APPs $\beta$  by 30–40%, respectively (Fig. 3, A and B). APP maturation showed a mild reduction, which, however, did not reach statistical significance. This may be due to the fact that despite an efficient knockdown, ~20% of TMEM59 and ~30% of TMEM59L RNA were still remaining, as measured by quantitative reverse transcription-PCR (Fig. 3C). The successful knockdown of TMEM59 was also verified by immunofluorescence (Fig. 3D). For TMEM59L no antibody is available that detects the endogenous protein, either by immunoblot or immunofluorescence. The finding that both knockdown and overexpression of TMEM59 and TMEM59L affected APP shedding in a similar manner is reminiscent of what has been reported for other proteins, such as endocytic endophilins (29, 52, 53), adaptor proteins FE65 (54), and c-Jun N-terminal kinase-interacting proteins (55). Typically, these proteins form hetero-oligomeric complexes. A protein knockdown leads to a loss of fully assembled, functional complexes, and protein overexpression is assumed to lead to too many complexes that are not fully assembled, thus again resulting in a loss of functional complexes. Potentially, TMEM59 and TMEM59L also form complexes with as yet unidentified proteins, such that overexpression and knockdown affect APP maturation and shedding in a similar manner.



**FIGURE 3. Knockdown of TMEM59 and TMEM59L affects APP shedding.** A, HEK293 cells were transfected with control siRNA or siRNAs against TMEM59 and TMEM59L. Endogenous APP and its cleavage products were detected as described in the legend to Fig. 2A. B, knockdown (KD) of TMEM59 and its homolog reduced the amount of secreted APP (APPs $\alpha$  and APPs $\beta$ ) by about 30–40% compared with control cells. Quantification of blots shown in A. Given are mean  $\pm$  S.E. of 4 independent experiments. \*,  $p < 0.05$ , determined with *t* test. C, siRNA treatment reduced mRNA levels of TMEM59 and TMEM59L by about 70–80%, as determined by quantitative reverse transcription-PCR. Given are mean  $\pm$  S.E. of 4 independent experiments. \*\*\*,  $p < 0.001$ , determined with *t* test. D, endogenous TMEM59 (antibody 93) was detected in permeabilized HEK293 cells treated with control siRNAs (con) but not in cells treated with siRNAs against TMEM59 and TMEM59L (KD). Scale bars = 10  $\mu$ m. For a more detailed immunofluorescence analysis, see Fig. 5.

**TMEM59 Reduces APP Cell Surface Levels**—In addition to the reduction of APP maturation and shedding, the expression of TMEM59 strongly reduced APP levels at the cell surface, as observed by live cell imaging using a fusion protein (YFP-APP) of YFP and APP. In control transfected HEK293 cells YFP-APP was found at the plasma membrane and in the Golgi (Fig. 4A). In contrast, in cells transfected with TMEM59, YFP-APP fluorescence was confined to the Golgi and perinuclear sites, but no plasma membrane staining was observed (Fig. 4B). This analysis reveals that TMEM59 strongly reduced the APP levels in the later cellular compartments where APP normally undergoes shedding and is consistent with the reduced levels of APPs $\alpha$  and APPs $\beta$  upon TMEM59 expression. Taken together, TMEM59 strongly reduced the amount of mature APP (complex *N*- and *O*-glycosylated), APP staining at the cell surface, as well as APP cleavage by  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase.

**TMEM59 Is a Glycosylated, Golgi-localized Protein**—Given that TMEM59 reduced the Golgi glycosylation of APP and confines APP staining to the Golgi, we next tested whether TMEM59 itself is a Golgi-localized protein. Indeed, immunofluorescence analysis of COS cells demonstrated Golgi staining of the endogenous TMEM59, which overlapped with the well characterized Golgi markers giantin (cis-medial Golgi) (31, 56) and p230 (*trans*-Golgi and TGN) (57) (Fig. 5, A and B). With both markers a partial colocalization was observed, indicating localization of TMEM59 throughout all Golgi cisternae. A similar partial colocalization was observed with several other



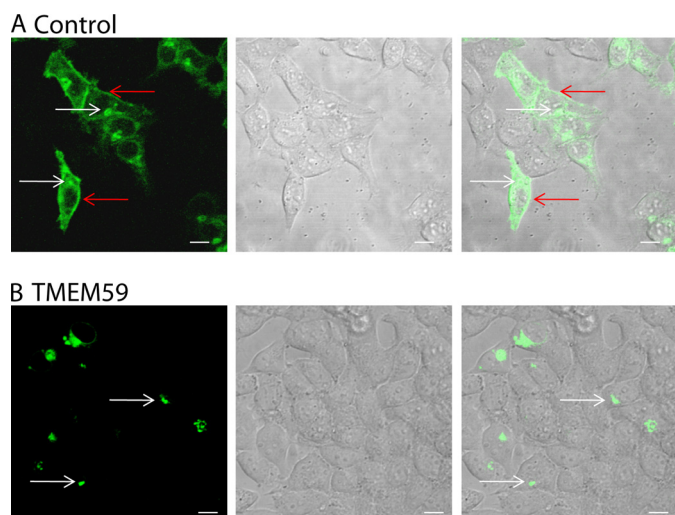


FIGURE 4. **TMEM59 leads to retention of APP in the Golgi.** HEK293 cells were transiently cotransfected with YFP-APP and either control plasmid (*con*) (A) or TMEM59 plasmid (B). The living cells were analyzed using a Zeiss 510Meta confocal system. The *arrows* point to the plasma membrane (*red*) and the Golgi (*white*), respectively. Scale bars = 10  $\mu$ m.

markers for the Golgi cisternae, such as GM130, GS15, and GS28 (data not shown).

The costaining with giantin was observed using two different antibodies against TMEM59, a polyclonal (Fig. 5A) and a monoclonal one (Fig. 5B). As a specificity control, TMEM59 was not detected, when the polyclonal antibody was blocked by the antigenic peptide (Fig. 5A) or when the isotype control antibody for the monoclonal antibody was used (Fig. 5B). Endogenous TMEM59 also showed Golgi staining in human neuroglioma H4 and human astrogloma U373 cells (data not shown), which is in agreement with its ubiquitous expression, as determined by Northern blot analysis (data not shown). GFP-tagged TMEM59 showed the same Golgi localization as the endogenous protein and to a lower extent additional reticular staining, presumably of the endoplasmic reticulum (Fig. 5C). These experiments show that TMEM59 is a Golgi-localized protein and may be used as a novel Golgi marker for immunofluorescence studies.

The Golgi localization of TMEM59 is in line with its glycosylation pattern. In the immunoblot the transfected TMEM59 showed an apparent molecular mass of about 40 kDa (Fig. 3D). Endogenous TMEM59 was not detected, presumably because the endogenous expression level was below the detection limit of the antibodies in the immunoblot. The apparent molecular mass of 40 kDa is slightly higher than its calculated molecular mass of 36 kDa. This difference is likely due to *N*-glycosylation at amino acid 90, where a typical *N*-glycosylation amino acid motif is located (Asn-Arg-Thr, Fig. 1). In fact, treatment with *N*-glycosidase F reduced the apparent molecular mass to about 38 kDa (Fig. 5D). The sugar moiety could also be removed with endoglycosidase H (Fig. 5D), which only removes sugars that are not of the complex type. This suggests that TMEM59 is localized in an early compartment of the secretory pathway and is in good agreement with Golgi localization observed by fluorescence microscopy.

**TMEM59 Inhibits Complex Glycosylation in the Golgi—**Next, we investigated in more detail the mechanism by which

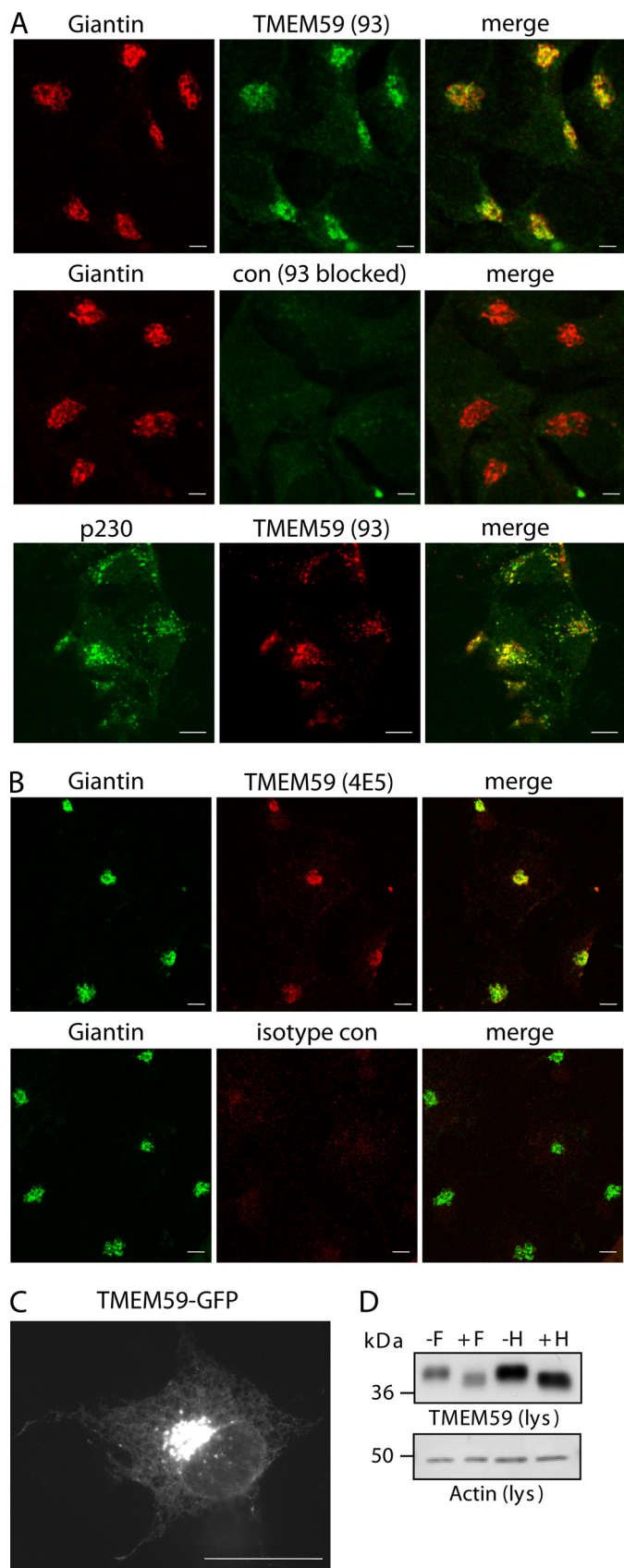
TMEM59 inhibits the maturation of APP. Given that TMEM59 localizes to the Golgi and blocks the Golgi glycosylation of APP, we generated a TMEM59 mutant with an added endoplasmic reticulum retention signal (TMEM59-KKXX). This mutant did not inhibit APP glycosylation and shedding compared with wild-type TMEM59 (Fig. 6A), revealing that TMEM59 must be able to leave the endoplasmic reticulum to inhibit APP shedding and maturation. Next, we tested whether an unrelated Golgi membrane protein could induce a similar effect on APP maturation and shedding as observed for TMEM59. To this aim we used golgiVENUS, which consists of the cytoplasmic and transmembrane domains of  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase fused to the fluorescent protein VENUS. This protein showed Golgi staining (not shown), in agreement with a previous study (43). In contrast to TMEM59, golgiVENUS did not affect APP maturation and shedding (Fig. 6B), revealing that the inhibitory effect on APP glycosylation and shedding was specific to TMEM59.

By coimmunoprecipitation, no significant interaction was observed between TMEM59 and APP in HEK293 cells (data not shown), suggesting that TMEM59 does not directly act on APP. Instead, we considered the possibility that TMEM59 leads to a more general modulation of Golgi glycosylation reactions. To test this possibility, we analyzed whether TMEM59 also affects the complex *N*-glycosylation of two other proteins unrelated to APP, the  $\beta$ -secretase BACE1 and the prion protein (PrP). Both proteins are *N*-, but not *O*-glycosylated. Additionally, the immature (core *N*-glycosylation) and the mature (complex *N*-glycosylation) forms of both proteins can be well separated by gel electrophoresis. BACE1 was cotransfected with either control vector or TMEM59 into HEK293 cells. In control cells BACE1 was mainly present in a mature and to a low extent in an immature form, in agreement with previous publications (58, 59). The mature form is complex *N*-glycosylated and resistant to treatment with endoglycosidase H, which only removes *N*-linked sugars that are not complex glycosylated (Fig. 7A). In contrast, the immature form is sensitive to endoglycosidase H and lacks complex glycosylation (Fig. 7A) (58, 60). Expression of TMEM59 strongly suppressed the mature form of BACE1, but increased the amount of immature BACE1, which lacks complex glycosylation (Fig. 7A). This reveals that TMEM59 inhibits the complex *N*-glycosylation of BACE1.

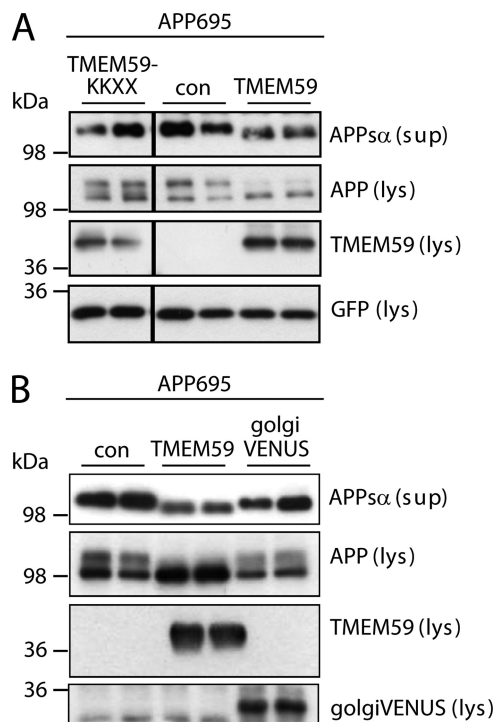
PrP is a glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein that is involved in the prion diseases. PrP expressed in HEK293 cells was present in differentially glycosylated forms (Fig. 7B), in agreement with previous publications (61, 62). The lower three bands correspond to the unglycosylated, the monoglycosylated, and the diglycosylated forms, which carry the core *N*-glycosylation in a high-mannose form. The upper broad band represents the complex *N*-glycosylated PrP (Fig. 7B). Similar to BACE1, expression of TMEM59 inhibited the complex *N*-glycosylation of PrP, but did not affect core glycosylation with the high-mannose sugars. Together with the data on APP these results suggest that TMEM59 induces a more general block of Golgi glycosylation reactions.

**TMEM59 Does Not Affect the Secretion of Soluble Proteins—**Because TMEM59 not only affects the Golgi glycosylation, but also the shedding of APP, we next tested, whether TMEM59

## TMEM59 Modulates APP Shedding



**FIGURE 5. TMEM59 localizes to the Golgi.** *A*, endogenous TMEM59 was detected in permeabilized COS cells with polyclonal antibody 93 (green) and showed costaining with the endogenous Golgi marker giantin (red). As a control the TMEM59 antibody did not detect TMEM59 when blocked by the

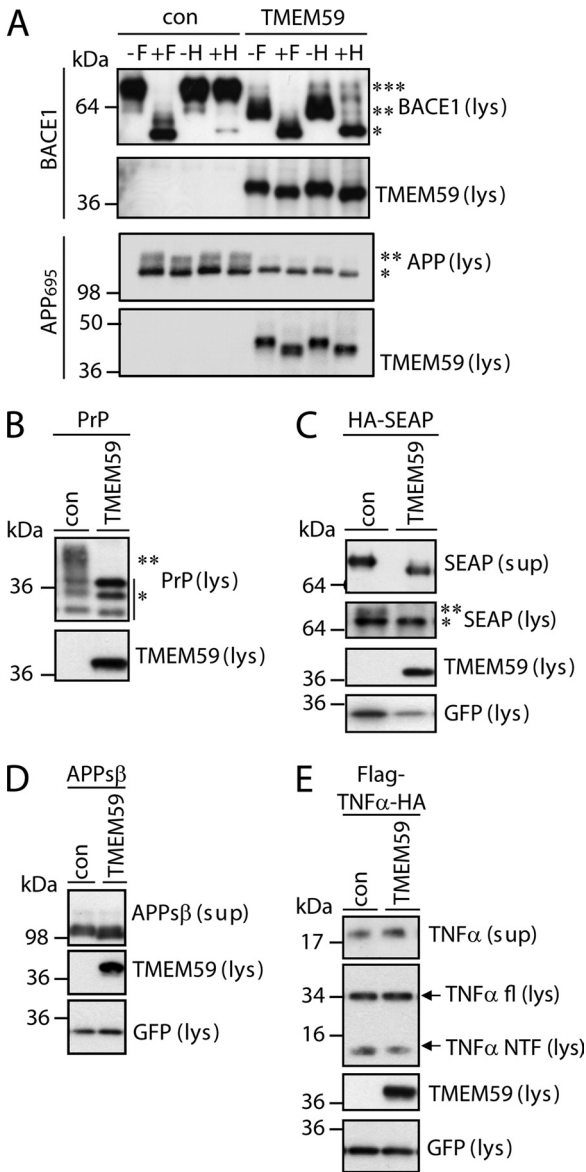


**FIGURE 6. Control proteins do not affect APP shedding and maturation.** *A*, control plasmid (con), HA-TMEM59 or HA-TMEM59-KKXX were transfected into HEK293 cells. The lysate (lys) was blotted against cellular APP (22C11), TMEM59 (HA.11), and GFP as a transfection control, the supernatant (sup) was blotted against secreted APPs $\alpha$  (W02). The vertical black lines in the gels indicate that the samples were run on the same gel, but not directly next to each other. *B*, control plasmid (con), HA-TMEM59, or golgiVENUS were transfected into HEK293 cells. The experiment was carried out as described in *A*, golgiVENUS was detected by anti-GFP.

blocked general post-Golgi traffic. To this aim, the effect of TMEM59 on the secretion of the SEAP was investigated. SEAP is a complex *N*-glycosylated protein. Upon TMEM59 expression, the mature band of SEAP was absent in the cell lysate (Fig. 7C). In the conditioned medium the apparent molecular mass was decreased, which is in line with a lack of Golgi glycosylation. Despite the lack of SEAP maturation the total amount of SEAP secretion was not significantly reduced upon TMEM59 expression (Fig. 7C), demonstrating that TMEM59 does not affect the general protein secretion. Likewise, when the APP ectodomain (APPs $\beta$ ) was expressed as a soluble protein lacking transmembrane and cytoplasmic domains, the amount of secretion was not altered upon TMEM59 expression (Fig. 7D). Similar to SEAP, the secreted APPs $\beta$  had a lower apparent molecular mass, indicating a loss of Golgi glycosylation. As a further control we tested whether TMEM59 affects shedding of the cytokine tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), which is a non-glycosylated single-span membrane protein. TNF $\alpha$  undergoes

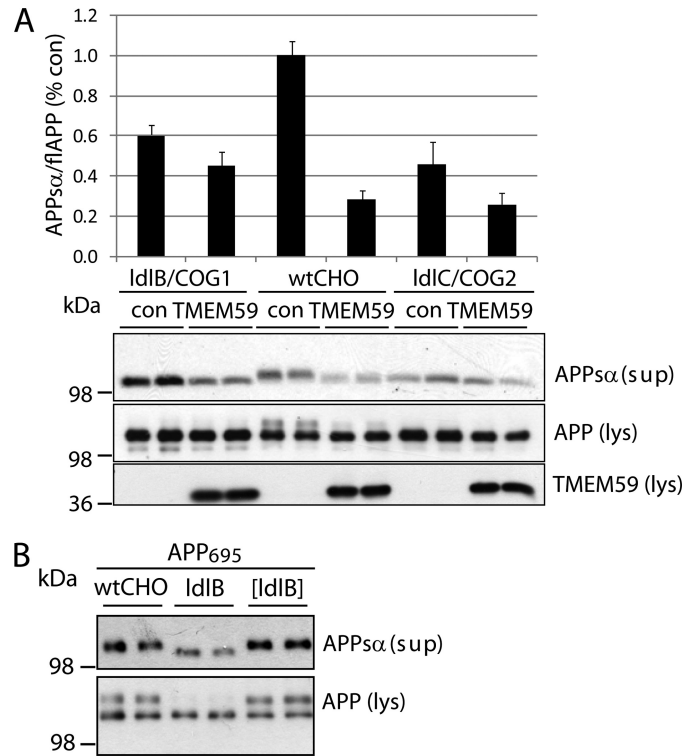
antigenic peptide. TMEM59 was detected in permeabilized COS cells with the polyclonal antibody 93 (red) and showed costaining with the endogenous Golgi marker p230 (green). *B*, endogenous TMEM59 was detected in permeabilized COS cells with the monoclonal antibody 4E5 (red) and showed a costaining with the endogenous Golgi marker giantin (green). An isotype antibody served as control for the specificity of the 4E5 antibody. *C*, GFP-tagged TMEM59 was transiently transfected into COS cells. Scale bars = 10  $\mu$ m. *D*, HEK293 cells were transiently transfected with HA-TMEM59. Aliquots of the cell lysate were treated (+) or not (-) with endoglycosidase F or H as indicated. The actin blot shows equal loading in all lanes.





**FIGURE 7. TMEM59 inhibits glycosylation of different proteins.** HEK293 cells were transiently transfected with the indicated constructs and either control vector (*con*) or TMEM59. GFP served as transfection control, where indicated. Lysates (*lys*) and supernatants (*sup*) were blotted against TMEM59 (93) and the indicated proteins. *A*, lysates of BACE1 transfected cells were treated with *N*-glycosidase F (+F) or endoglycosidase H (+H), controls remained untreated (–F, –H). The samples were blotted against BACE1 (EE-17, \*\*\*, mature, \*\*, immature, and \*, de-glycosylated BACE1) and TMEM59 (93). As a control, APP was deglycosylated in the same manner, revealing that TMEM59 does not affect the core *N*-glycosylation, but only the complex glycosylation (mature form) of APP. *B*, transfected PrP was detected in the lysate (3F4, \*\*, complex glycosylated and \*, di-/mono-/unglycosylated forms of PrP). *C*, secreted alkaline phosphatase (HA-SEAP) was detected in the supernatant (after immunoprecipitation) or in lysate (\*\*, mature and \*, immature SEAP) and detected with anti-HA antibody. *D*, transfected APPsβ was detected in the supernatant (192wt) and TMEM59 in the lysate (93). *E*, FLAG-TNFα-HA was transfected. *fl*-TNFα and TNFα-NTF were detected in the lysate (FLAG), secreted TNFα (HA) in the supernatant.

shedding in an α-secretase like fashion similar to APP (63). In contrast to APP, TMEM59 did not alter TNFα shedding (Fig. 7E), demonstrating that it does not act on all proteins, which undergo shedding. Together, these results demonstrate that despite the more general inhibitory effect on Golgi glycosylation reactions and the reduction of APP shedding, TMEM59



**FIGURE 8. A knockout of COG proteins shows similar defects of APP glycosylation as TMEM59 expression.** *A*, wtCHO, IdIB-CHO, and IdIC-CHO cells were cotransfected with APP695 and either control plasmid (*con*) or TMEM59. The lysates (*lys*) were blotted against cellular APP (22C11) and TMEM59 (93), the supernatant (*sup*) was blotted against secreted APPsα (W02). The quantification shows the secreted APPsα normalized to the cellular APP and is represented as mean ± S.E. of three to four independent experiments. *B*, wtCHO, IdIB-CHO, and [IdIB]-CHO cells were transfected with APP695. [IdIB]-CHO cells are COG1-deficient IdIB cells retransfected with COG1. The lysates (*lys*) were blotted against cellular APP (22C11) and the supernatants (*sup*) against secreted APPsα (W02).

does not inhibit all functions of the Golgi apparatus. Secretion of soluble proteins (SEAP, APPsβ) as well as shedding of an unglycosylated protein (TNFα) occurred normally.

**TMEM59 Expression Resembles a Loss-of-function of the COG Complex**—Next, we tested whether other proteins involved in Golgi *N*- and *O*-glycan processing would have a similar effect on APP maturation and shedding as TMEM59. Defects in Golgi glycan processing can also be caused by the loss of function of the COG complex. The COG complex is a hetero-octameric protein complex consisting of COG1 through COG8 and is required for correct localization and activity of Golgi-localized proteins, in particular enzymes involved in the glycosylation process (25, 26). For example, CHO cells lacking COG1 or COG2 show defects in the glycosylation and cell surface levels of the low density lipoprotein receptor and other protein glycoconjugates (64). This raises the possibility that the COG-deficient CHO cells show a similar defect of APP glycosylation and shedding as the TMEM59 expressing cells. To test this possibility, wild-type CHO cells as well as IdIB (COG1-deficient) and IdIC (COG2-deficient) CHO cells were cotransfected with APP and either control vector or TMEM59. In wild-type CHO cells, APP was detected in its mature and immature forms. Transfection of TMEM59 reduced APP maturation (Fig. 8A), consistent with the results in HEK293 cells (Fig. 8A). Like-

## TMEM59 Modulates APP Shedding

wise, APP shedding was reduced by about 70% as measured by the amount of APP $\alpha$  detected with the W02 antibody (Fig. 8A). The remaining APP showed a slightly enhanced electrophoretic mobility, consistent with the results in HEK293 cells (Fig. 8A). Compared with the wild-type CHO cells, IdlB and IdlC cells showed no mature APP, indicating an inhibition of APP maturation (Fig. 8A), similar to the effect of TMEM59 observed in the wild-type cells. Additionally, when the amount of secreted APP $\alpha$  was normalized to the total amount of APP in the cell lysate, a reduction of APP shedding by 40 and 55% was observed for IdlB and IdlC cells, respectively (Fig. 8A). Importantly, when COG1 was retransfected into IdlB (Cog1-deficient) cells ([IdlB]), APP maturation and shedding were restored to wild-type levels (Fig. 8B). This demonstrates that COG1 and COG2 are required for normal APP maturation and shedding. TMEM59 expression did not further reduce APP shedding in the IdlB and IdlC cells, suggesting that TMEM59 inhibits the same cellular Golgi glycosylation machinery, which requires the COG proteins.

### DISCUSSION

APP shedding is a central event in A $\beta$  generation, because shedding by  $\beta$ -secretase directly contributes to A $\beta$  generation, whereas shedding by  $\alpha$ -secretase prevents A $\beta$  formation. The molecular mechanisms that regulate APP shedding are not yet well defined, but include cellular signaling pathways, such as the mitogen-activated protein kinase pathway, and a diverse group of compounds, including lipid derivatives, calcium, and cholinesterase inhibitors (14, 65). Additionally, recent studies increasingly imply intracellular APP trafficking as a mechanism to regulate access of APP to its secretases and thus, the amount of APP processing (15). This study identifies TMEM59 as a novel protein modulating cell surface APP levels, APP shedding by  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase, and A $\beta$  generation. Moreover, this study identifies three additional proteins: TMEM59L, COG1, and COG2 as novel modulators of APP shedding.

Our study shows that TMEM59 is a novel Golgi-localized protein, which affects glycosylation processes in the Golgi, but not in the endoplasmic reticulum. TMEM59 expression blocked both O-glycosylation and complex N-glycosylation, which occur in the Golgi, but did not affect the cotranslational addition of the core N-glycosylation in the endoplasmic reticulum. A function of TMEM59 as a modulator of Golgi glycosylation was further supported by the finding that TMEM59 induced a similar phenotype on APP glycosylation and shedding as the loss of COG1 and COG2. The COG complex is a hetero-octameric protein complex consisting of subunits COG1 through COG8. The COG complex is assumed to act as a retrograde vesicle tethering factor in intra-Golgi trafficking and is particularly required for the correct localization and activity of Golgi glycosylation enzymes (25, 26). Deficiencies in individual COG complex proteins are linked to human congenital disorders of glycosylation and result in different defects in protein glycosylation, presumably due to mislocalization or degradation of enzymes involved in the glycosylation process (26, 27). In particular, CHO cells lacking COG1 (IdlB cells) or COG2 (IdlC cells) show defects in glycosylation and cell surface levels of the low density lipoprotein receptor and other protein

glycoconjugates (64) without apparent defects in overall secretion or endocytosis (66).

In contrast to the COG proteins, which are soluble proteins binding to the cytoplasmic face of the Golgi, TMEM59 and its homolog TMEM59L are membrane proteins. Potentially, both proteins affect the activity of one or several Golgi glycosylation enzymes, which are also transmembrane proteins. Alternatively, TMEM59 may indirectly modulate Golgi glycosylation by affecting the correct cellular localization of the corresponding glycosylation enzymes.

The reduction of APP Golgi glycosylation was accompanied by reduced levels of mature APP and slightly increased levels of immature APP in TMEM59 expressing cells. Additionally, TMEM59 induced a predominant Golgi staining of APP and a reduction of cell surface APP staining. These results suggest that TMEM59 prevents access of APP to the plasma membrane and the endosomes, where it is normally cleaved by  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase. The activity of both enzymes was found to be not affected by TMEM59 expression. Additionally, the shedding of TNF $\alpha$  as well as the secretion of soluble proteins, such as SEAP, were not affected, demonstrating that TMEM59 did not block general protein transport to the cell surface. Currently, it is unclear why TMEM59 induces the inhibition of cell surface transport of APP but not TNF $\alpha$  or soluble proteins. We consider the following possibilities. Potentially, there is a cellular control mechanism ensuring that Golgi glycosylation of APP, but not the other proteins, is complete, before APP can exit the Golgi or the TGN for its transport to the plasma membrane. However, this scenario seems unlikely, because a previous study found that APP shedding was normal in CHO cells expressing an APP mutant lacking N-glycosylation sites or when APP lacked normal O-glycosylation (67).

Given that TMEM59 not only inhibits the glycosylation of APP, an alternative explanation could be that an as yet unknown glycoprotein is required for APP transport to the cell surface, regardless of whether APP is fully glycosylated or not. This conclusion has also been drawn in a previous study that analyzed APP shedding in CHO cells with reduced N- or O-glycosylation (67). We would expect that upon TMEM59 expression such a glycoprotein would no longer be complex glycosylated and may have lost its function of allowing APP transport to the cell surface. Although such a protein is not yet known, it is interesting to note that APP does associate with glycosylated membrane proteins, such as SorL1 and LRP1, and that this interaction occurs in the secretory pathway (16, 68). Whether these or other proteins require their glycosylation for correct transport of APP remains to be tested in future studies.

In an alternative scenario, the plasma membrane transport of APP may occur in a manner different from those proteins, which were secreted normally, even in the absence of complex glycosylation. In fact, different membrane proteins use different transport routes from the TGN to the plasma membrane. For example, distinct TGN exit sites have been reported for the transport of TNF $\alpha$  and E-cadherin to the plasma membrane. Although TNF $\alpha$  leaves the TGN through p230/golgin-245-coated tubules, E-cadherin exits through golgin-97-coated tubules (69). If APP exits the TGN through other sites than

TNF $\alpha$  and the soluble proteins, we would expect that TMEM59 blocks the exit site for APP but not for the other proteins.

Our finding that changes in Golgi glycan processing not only affect APP glycosylation, but also APP cell surface levels and APP shedding by  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase is in agreement with previous studies. One study blocked complex N-glycosylation in the Golgi by use of the drug swainsonine, which inhibits Golgi-localized mannosidase II (19). Under these conditions APP showed increased Golgi localization, which supports the idea that changes in the Golgi glycosylation process can impair the intracellular transport of APP. Additionally, APP shedding was reduced, presumably both by  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase. Conversely, transfection of the  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase ST6Gal-I increased APP sialylation and enhanced APP shedding by both  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase, as well as A $\beta$  secretion (19, 20). In this case, the increased APP shedding appeared to result specifically from the enhanced sialylation of APP and not other cellular proteins (20).

Interestingly, changes in the activity of glycan processing enzymes have been observed in AD brains compared with age-matched controls, such as reduction in the activity of sialyltransferases and a corresponding change in general protein glycosylation (70, 71). Because sialylation increases APP secretion, a reduced sialyltransferase activity may contribute to the reduced levels of the neuroprotective and neurotrophic APPs $\alpha$ , as it is found in Alzheimer disease (72). However, it remains to be determined whether the altered sialyltransferase activity directly contributes to the disease process or occurs as a consequence of the disease process.

*Acknowledgment*—We thank Monty Krieger for providing COG-deficient and wild-type CHO cells.

## REFERENCES

- Selkoe, D. J., and Schenk, D. (2003) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 545–584
- Haass, C. (2004) *EMBO J.* **23**, 483–488
- Cole, S. L., and Vassar, R. (2008) *Curr. Alzheimer Res.* **5**, 100–120
- Rossner, S., Sastre, M., Bourne, K., and Lichtenthaler, S. F. (2006) *Prog. Neurobiol.* **79**, 95–111
- Steiner, H., Fluhrer, R., and Haass, C. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 29627–29631
- Furukawa, K., Sopher, B. L., Rydel, R. E., Begley, J. G., Pham, D. G., Martin, G. M., Fox, M., and Mattson, M. P. (1996) *J. Neurochem.* **67**, 1882–1896
- Meziane, H., Dodart, J. C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M., and Ungerer, A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 12683–12688
- Stein, T. D., Anders, N. J., DeCarli, C., Chan, S. L., Mattson, M. P., and Johnson, J. A. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 7707–7717
- Allinson, T. M., Parkin, E. T., Condon, T. P., Schwager, S. L., Sturrock, E. D., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2004) *Eur. J. Biochem.* **271**, 2539–2547
- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., and Ishiura, S. (1999) *Biochem. J.* **343**, 371–375
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 3922–3927
- Slack, B. E., Ma, L. K., and Seah, C. C. (2001) *Biochem. J.* **357**, 787–794
- Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2003) *J. Neurosci. Res.* **74**, 342–352
- Lichtenthaler, S. F. (2006) *Neurodegener. Dis.* **3**, 262–269
- Sannerud, R., and Annaert, W. (2009) *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 183–190
- Andersen, O. M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., von Arnim, C. A., Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu, X., Bales, K. R., Cappai, R., Masters, C. L., Gliemann, J., Mufson, E. J., Hyman, B. T., Paul, S. M., Nykjaer, A., and Willnow, T. E. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 13461–13466
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J. H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C. T., Cheng, R., Hasegawa, H., Chen, F., Shibata, N., Lunetta, K. L., Pardossi-Piquard, R., Bohm, C., Wakutani, Y., Cupples, L. A., Cuenco, K. T., Green, R. C., Pinessi, L., Rainero, I., Sorbi, S., Bruni, A., Duara, R., Friedland, R. P., Inzelberg, R., Hampe, W., Bujo, H., Song, Y. Q., Andersen, O. M., Willnow, T. E., Graff-Radford, N., Petersen, R. C., Dickson, D., Der, S. D., Fraser, P. E., Schmitt-Ulms, G., Younkin, S., Mayeux, R., Farrer, L. A., and St. George-Hyslop, P. (2007) *Nat. Genet.* **39**, 168–177
- Nixon, R. A. (2005) *Neurobiol. Aging* **26**, 373–382
- McFarlane, I., Georgopoulou, N., Coughlan, C. M., Gillian, A. M., and Breen, K. C. (1999) *Neuroscience* **90**, 15–25
- Nakagawa, K., Kitazume, S., Oka, R., Maruyama, K., Saido, T. C., Sato, Y., Endo, T., and Hashimoto, Y. (2006) *J. Neurochem.* **96**, 924–933
- Yazaki, M., Tagawa, K., Maruyama, K., Sorimachi, H., Tsuchiya, T., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1996) *Neurosci. Lett.* **221**, 57–60
- Pahlsson, P., Shakin-Eshleman, S. H., and Spitalnik, S. L. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 1667–1673
- Oltersdorf, T., Ward, P. J., Henriksson, T., Beattie, E. C., Neve, R., Lieberburg, I., and Fritz, L. C. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4492–4497
- Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1989) *Cell* **57**, 115–126
- Smith, R. D., and Lupashin, V. V. (2008) *Carbohydr. Res.* **343**, 2024–2031
- Ungar, D., Oka, T., Krieger, M., and Hughson, F. M. (2006) *Trends Cell Biol.* **16**, 113–120
- Zeevaert, R., Foulquier, F., Jaeken, J., and Matthijs, G. (2008) *Mol. Genet. Metab.* **93**, 15–21
- Schöbel, S., Neumann, S., Hertweck, M., Dislich, B., Kuhn, P. H., Kremmer, E., Seed, B., Baumeister, R., Haass, C., and Lichtenthaler, S. F. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 14257–14268
- Schöbel, S., Neumann, S., Seed, B., and Lichtenthaler, S. F. (2006) *Int. J. Dev. Neurosci.* **24**, 141–148
- Elson, G. C., de Coignac, A. B., Aubry, J. P., Delneste, Y., Magistrelli, G., Holzwarth, J., Bonnefoy, J. Y., and Gauchat, J. F. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 55–62
- Linstedt, A. D., and Hauri, H. P. (1993) *Mol. Biol. Cell* **4**, 679–693
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. L., Baumeister, R., Fechteler, K., and Haass, C. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 848–851
- Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schröder, J., Zerfass, R., Förstl, H., Sandbrink, R., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 22908–22914
- Yamasaki, A., Eimer, S., Okochi, M., Smialowska, A., Kaether, C., Baumeister, R., Haass, C., and Steiner, H. (2006) *J. Neurosci.* **26**, 3821–3828
- Kascak, R. J., Rubenstein, R., Merz, P. A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R. I., Wisniewski, H. M., and Diring, H. (1987) *J. Virol.* **61**, 3688–3693
- Lichtenthaler, S. F., Dominguez, D. I., Westmeyer, G. G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., and Seed, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48713–48719
- Lichtenthaler, S. F., Ida, N., Multhaup, G., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1997) *Biochemistry* **36**, 15396–15403
- Lammich, S., Schöbel, S., Zimmer, A. K., Lichtenthaler, S. F., and Haass, C. (2004) *EMBO Rep.* **5**, 620–625
- Kuhn, P. H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C., and Lichtenthaler, S. F. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 11982–11995
- Neumann, S., Schöbel, S., Jäger, S., Trautwein, A., Haass, C., Pietrzik, C. U., and Lichtenthaler, S. F. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 7583–7594
- Gilch, S., Winkhofer, K. F., Groschup, M. H., Nunziante, M., Lucassen, R., Spielhauer, C., Muranyi, W., Riesner, D., Tatzelt, J., and Schätzl, H. M. (2001) *EMBO J.* **20**, 3957–3966
- Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., and Simons, K. (2003) *J. Cell*



## TMEM59 Modulates APP Shedding

- Biol.* **160**, 113–123
43. Okita, C., Sato, M., and Schroeder, T. (2004) *BioTechniques* **36**, 418–422, 424
  44. Chatterton, J. E., Hirsch, D., Schwartz, J. J., Bickel, P. E., Rosenberg, R. D., Lodish, H. F., and Krieger, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 915–920
  45. Schägger, H., and von Jagow, G. (1987) *Anal. Biochem.* **166**, 368–379
  46. Cissé, M. A., Gandreuil, C., Hernandez, J. F., Martinez, J., Checler, F., and Vincent, B. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 254–260
  47. Alfa Cissé, M., Sunyach, C., Slack, B. E., Fisher, A., Vincent, B., and Checler, F. (2007) *J. Neurosci.* **27**, 4083–4092
  48. Andrau, D., Dumanchin-Njock, C., Ayrat, E., Vizzavona, J., Farzan, M., Boisbrun, M., Fulcrand, P., Hernandez, J. F., Martinez, J., Lefranc-Jullien, S., and Checler, F. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 25859–25866
  49. Lefranc-Jullien, S., Lisowski, V., Hernandez, J. F., Martinez, J., and Checler, F. (2005) *Br. J. Pharmacol.* **145**, 228–235
  50. Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M. M., Teplow, D. B., and Haass, C. (2001) *EMBO Rep.* **2**, 835–841
  51. Stachel, S. J., Coburn, C. A., Steele, T. G., Jones, K. G., Loutzenhiser, E. F., Gregro, A. R., Rajapakse, H. A., Lai, M. T., Crouthamel, M. C., Xu, M., Tugusheva, K., Lineberger, J. E., Pietrak, B. L., Espeseth, A. S., Shi, X. P., Chen-Dodson, E., Holloway, M. K., Munshi, S., Simon, A. J., Kuo, L., and Vacca, J. P. (2004) *J. Med. Chem.* **47**, 6447–6450
  52. Verstreken, P., Kjaerulff, O., Lloyd, T. E., Atkinson, R., Zhou, Y., Meinerzhagen, I. A., and Bellen, H. J. (2002) *Cell* **109**, 101–112
  53. Sugjura, H., Iwata, K., Matsuoka, M., Hayashi, H., Takemiya, T., Yasuda, S., Ichikawa, M., Yamauchi, T., Mehlen, P., Haga, T., and Yamagata, K. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 23343–23348
  54. Pietrzik, C. U., Yoon, I. S., Jaeger, S., Busse, T., Weggen, S., and Koo, E. H. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 4259–4265
  55. Whitmarsh, A. J. (2006) *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 828–832
  56. Linstedt, A. D., Foguet, M., Renz, M., Seelig, H. P., Glick, B. S., and Hauri, H. P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5102–5105
  57. Gleeson, P. A., Anderson, T. J., Stow, J. L., Griffiths, G., Toh, B. H., and Matheson, F. (1996) *J. Cell Sci.* **109**, 2811–2821
  58. Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M., and Doms, R. W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 33729–33737
  59. Westmeyer, G. G., Willem, M., Lichtenthaler, S. F., Lurman, G., Multhaup, G., Assfalg-Machleidt, I., Reiss, K., Saftig, P., and Haass, C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 53205–53212
  60. Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lam-mich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 30849–30854
  61. Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B., and Kobata, A. (1989) *Biochemistry* **28**, 8380–8388
  62. Winklhofer, K. F., Heller, U., Reintjes, A., and Tatzelt, J. (2003) *Traffic* **4**, 313–322
  63. Hooper, N. M., Karran, E. H., and Turner, A. J. (1997) *Biochem. J.* **321**, 265–279
  64. Kingsley, D. M., Kozarsky, K. F., Segal, M., and Krieger, M. (1986) *J. Cell Biol.* **102**, 1576–1585
  65. Vardy, E. R., Catto, A. J., and Hooper, N. M. (2005) *Trends Mol. Med.* **11**, 464–472
  66. Oka, T., and Krieger, M. (2005) *J. Biochem.* **137**, 109–114
  67. Pahlsson, P., and Spitalnik, S. L. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **331**, 177–186
  68. Waldron, E., Heilig, C., Schweitzer, A., Nadella, N., Jaeger, S., Martin, A. M., Weggen, S., Brix, K., and Pietrzik, C. U. (2008) *Neurobiol. Dis.* **31**, 188–197
  69. Lieu, Z. Z., Lock, J. G., Hammond, L. A., La Gruta, N. L., Stow, J. L., and Gleeson, P. A. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 3351–3356
  70. Breen, K. C., Coughlan, C. M., and Hayes, F. D. (1998) *Mol. Neurobiol.* **16**, 163–220
  71. Maguire, T. M., and Breen, K. C. (1995) *Dementia* **6**, 185–190
  72. Fellgiebel, A., Kojro, E., Müller, M. J., Scheurich, A., Schmidt, L. G., and Fahrenholz, F. (2009) *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **22**, 3–9